

Aus dem Exzellenzcluster Kardiopulmonales System

am Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Regulation und Funktion der NADPH-Oxidase 1 in
pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen aus Ratten im Modell
der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

(Fachbereich 08 Biologie und Chemie)

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Florian Veit

aus Solms

Gießen 2012

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
Abteilung Molekulare Zellphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 38 (Büro)
Heinrich-Buff-Ring 26 (Post), 35392 Giessen

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann
Exzellenzcluster Kardiopulmonales System (ECCPS)
Lungenzentrum der Universität Gießen (UGMLC)
Medizinische Klinik II/V
Klinikstr. 36, 35392 Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Graduiertenkollegs *Molecular Biology and Medicine of the Lung* (MBML) und *Signaling Mechanisms in Lung Physiology and Disease* (SMLPD) am Exzellenzcluster Kardiopulmonales System des Lungenzentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen (UGMLC, *University of Giessen and Marburg Lung Center*) und dem Zentrum für Innere Medizin – Medizinische Klinik II/V in der Zeit von Oktober 2008 bis Januar 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Clauss angefertigt. Das Thema und das Labor wurden von Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann bereitgestellt, unter dessen Betreuung diese Arbeit entstand.

Für Johanna und Svea

Inhalt

1	EINLEITUNG	9
1.1	Atmungsorgane	9
1.2	Aufbau und Funktion der Säugerlunge	9
1.3	Der Blutkreislauf	11
1.4	Aufbau und Funktion der Blut- und KapillargefäÙe	12
1.5	Pulmonale Hypertonie (PH) und vaskulärer GefäÙumbau	12
1.6	Experimentelle Tiermodelle der PH	16
1.7	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	19
1.8	Antioxidative Mechanismen	21
1.9	NADPH-Oxidasen	22
1.10	Mitochondrien	28
1.11	NADPH-Oxidasen und PH	30
1.12	Mitochondrien und PH	30
1.13	Zielsetzung dieser Arbeit	31
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Geräte	33
2.2	Verbrauchsmaterialien/-chemikalien	34
2.3	Zellkultur	38
2.4	GröÙenstandards	38
2.5	Kits und Assays	38
2.6	Antikörper	39
2.7	Software	40

2.8 Versuchstier und Forschungsobjekte	40
2.8.1 Die Wanderratte, <i>Rattus norvegicus</i>	40
2.8.2 Haltung der Tiere	41
2.8.3 Monocrotalin (MCT)-Behandlung	41
2.8.4 Humanes Lungengewebe	42
2.9 Hämodynamik	42
2.9.1 Messung der Rechtsherzhypertrophie	43
2.10 Zellkultur	43
2.10.1 Isolierung der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) aus Ratten.....	43
2.10.2 Kultivierung der PASMC.....	46
2.10.2 Isolierung und Kultivierung der humanen PASMC.....	47
2.11 Molekularbiologische Methoden	48
2.11.1 Immunzytochemie	48
2.11.1.1 Immunfluoreszenz	48
2.11.1.2 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen	49
2.11.1.3 Auswertung der direkten Färbung von α -glattmuskulärem Aktin	50
2.11.1.4 Auswertung der indirekten Färbung von Superoxiddismutase (Sod) und Katalase	50
2.11.2 Immunhistochemie.....	51
2.11.2.1 Elastika-Färbung	51
2.11.2.2 Muskularisierung und Endothel-Färbung	51
2.11.3 mRNA-Interferenz.....	52
2.11.4 Messung der Proliferation	53
2.11.5 Messung der Migration	53
2.11.6 Messung der Apoptose.....	54
2.11.7 Messung der Sod-Aktivität	54
2.11.8 RNA-Extraktion	54
2.11.9 Synthese komplementärer DNA	55
2.11.10 Primer	55
2.11.11 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	56
2.11.12 In situ-Hybridisierung	57
2.11.12.1 Präparation der Lungenschnitte	57
2.11.12.2 Sonden	58
2.11.13 Western Blot.....	59
2.11.14 <i>Platelet Derived Growth Factor</i> (PDGF) - Stimulation.....	61
2.11.15 Subzelluläre Fraktionierung.....	61

2.12 Messungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	61
2.12.1 <i>Spin traps</i> und <i>Spin probes</i>	62
2.12.2 Radikalfänger	64
2.12.3 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie	65
2.12.3.1 Datenerfassung und Auswertung der ESR-Messungen	67
2.12.4 Dihydroethidium (DHE) – Färbung.....	68
2.12.4.1 Auswertung der DHE-Färbung	70
2.12.5 Messung der mitochondrialen ROS-Produktion	71
2.13 Statistik	72
3 ERGEBNISSE	73
3.1 MCT-Behandlung führt zur Ausbildung einer PH	73
3.2 Identifizierung der isolierten und kultivierten PASM C	75
3.3 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies	76
3.3.1 ESR-Spektroskopie	76
3.3.1.1 Erhöhte intrazelluläre Superoxid Produktion in PASMC nach MCT-Behandlung	78
3.3.2 DHE-Färbung intrazellulärer Superoxidradikale	80
3.3.3 Detektion der mitochondrialen ROS-Produktion.....	81
3.4 Erhöhte Superoxidproduktion führt zu oxidativem Stress in MCT-PASM C	82
3.5 Erhöhte Expression der Sod2 und gesteigerte Aktivität der totalen Sod in MCT-PASMC.....	83
3.6 MCT-Behandlung führt zu gesteigerter NADPH-Oxidase 1 (Nox1)-Expression	85
3.7 Lokalisierung der Nox1	87
3.8 Nox1 als Quelle der erhöhten Superoxidproduktion in MCT-PASM C	89
3.9 Superoxid von Nox1 verursacht beschleunigte Migration und Proliferation von PASM C	91
3.10 Potentieller Mechanismus zur Aktivierung der Nox1 im Modell der MCT-induzierten PH	96
4 DISKUSSION	97
4.1 Physiologische Bedeutung und klinische Relevanz der Ergebnisse	111
4.2 Diskussion der angewandten Methoden und Modelle	114

4.3	Ausblick	117
4.4	Zusammenfassung	118
4.5	Summary	120
6	ANHANG.....	153
6.1	Abbildungsverzeichnis	153
6.2	Tabellenverzeichnis	154
6.3	Abkürzungsverzeichnis	155
6.4	Wissenschaftliche Beiträge	160
6.4.1	Veröffentlichungen	160
6.4.2	Kongressbeiträge	161
6.4.3	Preise	163
6.5	Versicherung.....	164
6.6	Danksagung	165

1 Einleitung

1.1 Atmungsorgane

Im Laufe der Evolution haben sich bei den unterschiedlichen Organismen innerhalb der Vertebraten und Invertebraten verschiedene Atmungsorgane entwickelt, deren Aufbau und Funktionsprinzipien sich deutlich unterscheiden¹. Trotz der vielen unterschiedlichen Organtypen und Funktionsweisen dienen alle Atmungsorgane demselben Zweck, nämlich dem Gasaustausch zwischen Umwelt und Blut über respiratorische Oberflächen des Körpers. Dieser Prozess wird als „äußere Atmung“ bezeichnet und unterscheidet sich von der „inneren Atmung“, die den Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe bzw. Zellen beschreibt².

Bei den wasserbewohnenden Formen findet man in der Regel Ausstülpungen der Körperoberfläche, die Kiemen genannt werden. Bei Landbewohnern handelt es sich um Einstülpungen der Körperoberfläche in das Innere des Tieres, die als Tracheen (röhrenförmig, Insekten) oder Lungen (sackförmig, Vertebraten) bezeichnet werden³. Lungen sind die typischen Atmungsorgane Landbewohnender, d.h. luftatmender Tiere.

1.2 Aufbau und Funktion der Säugerlunge

Die Lunge der Vertebraten (Wirbeltiere) entwickelt sich aus dem Vorderdarm und besteht aus einem Netz von Röhren und Bläschen, wobei es in ihrem Feinbau wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Vertebratenklassen gibt⁴. Im Folgenden liegt das Hauptaugenmerk auf der Lunge der Säugetiere.

Die Lunge der Säuger ist ein blind endendes, sackartiges Organ, welches in der Pleurahöhle liegt. Bei Säugern nimmt die Lunge in dem durch Rippenfell und Zwerchfell begrenzten Brustkorb den größten Raum ein. Die Lunge ist über die Trachea mit der Außenwelt verbunden⁴. Die respiratorische Oberfläche der Säugerlunge erreicht durch Millionen von Alveolen (Lungenbläschen) eine Größe von ca. 100 m². Ein zentraler Luftraum ist nicht mehr vorhanden¹. Eine eingehende Beschreibung der Funktionsweise der Lunge soll nun anhand der menschlichen Lunge stattfinden. Andere Säugetierlungen funktionieren nach dem gleichen Prinzip¹.

Die menschliche Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln. Der rechte Lungenflügel besteht aus drei (dreilappig), der linke Lungenflügel hingegen nur aus zwei Lungenlappen (zweilappig)^{1, 4}. Diese Lappen werden wiederum in Lungensegmente unterteilt. Von diesen befinden sich 10 Segmente im rechten Lungenflügel und 9 im linken. Da auf der linken Seite außerdem das Herz liegt, ist der linke Lungenflügel etwas kleiner als der rechte. Der Weg den die Atemluft nimmt verläuft wie folgt: Die Luft gelangt über den Mund-Rachenraum in die Trachea, welche sich in die zwei Hauptbronchien (*Bronchi principales*) aufteilt. Die Hauptbronchien teilen sich weiter baumartig bis zu den Bronchioli (terminale Bronchien) auf, die ihrerseits in die respiratorischen Bronchiolen (*Bronchioli respiratorii*) übergehen. Diese, von der Trachea ausgehenden, Verzweigungen nennt man den Bronchialbaum. Bis einschließlich zu den terminalen Bronchien, dienen diese Gänge ausschließlich der Leitung der Atemgase. Sie werden als anatomischer Totraum bezeichnet, da hier kein Gasaustausch stattfindet. Die Wände der respiratorischen Bronchiolen bestehen schon teilweise aus Alveolen und ihre Endaufzweigungen sind die ausschließlich aus Alveolen bestehenden *Ductuli alveolares* und *Sacculi alveolares* (Alveolargänge und Alveolarsäckchen). Oft auch zusammen als *Acini* bezeichnet. Den Abschluss der Alveolargänge bilden die Alveolen (*Alveoli pulmonales*), über deren sehr dünne Wand, die aus einem einschichtigen Epithel besteht, der Gasaustausch erfolgt^{1, 4}.

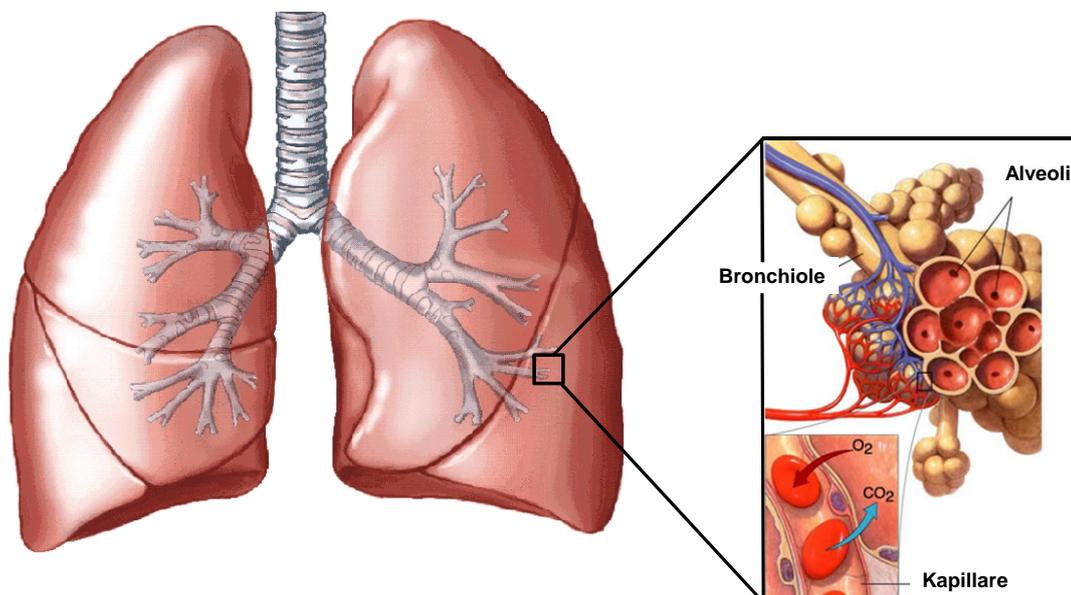


Abb. 1.1: Gasaustausch in einer Säugerlunge.

Der Gasaustausch findet in den Alveolen über das Alveolarepithel statt. Venöses Blut = blau; Arteriell Blut = rot; O₂ = Sauerstoff; CO₂ = Kohlendioxid. Verändert nach lungcarecenter.com 2011.

1.3 Der Blutkreislauf

Im Gefäßsystem der Lunge wird das Blut mit Sauerstoff angereichert, wobei Kohlendioxid abgegeben wird. Der aufgenommene Sauerstoff wird dann im Gefäßnetz des Körpers an die Gewebe und Zellen weitergegeben, wobei gleichzeitig Kohlendioxid als Stoffwechselprodukt aufgenommen wird. Der Kreislauf ist wie folgt: Das venöse (sauerstoffarme) Blut des Körperkreislaufs gelangt zum rechten Vorhof des Herzens und wird über den rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie (*Arteria pulmonalis*) gepumpt. Die pulmonalarteriellen Blutgefäße des Lungenkreislaufs verlaufen parallel zu den Bronchien und teilen sich genau wie diese auch immer weiter auf, bis sie schließlich ein ausgedehntes Kapillarnetz um die Alveolen bilden.

Nach Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff, in den Kapillaren der Lunge, strömt das sauerstoffreiche (arterielle) Blut über die Lungenvene (*Vena pulmonalis*) zurück in den linken Vorhof des Herzens und wird schließlich über die Aorta in den Körperkreislauf gepumpt. Der Gasaustausch in den Kapillaren der Lunge dient nicht nur der Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff, sondern auch der Abgabe von Kohlendioxid in den Alveolarraum. Die treibende Kraft für die Diffusion der Atemgase liegt in den Partialdruckunterschieden zwischen den Alveolen und dem Blut.

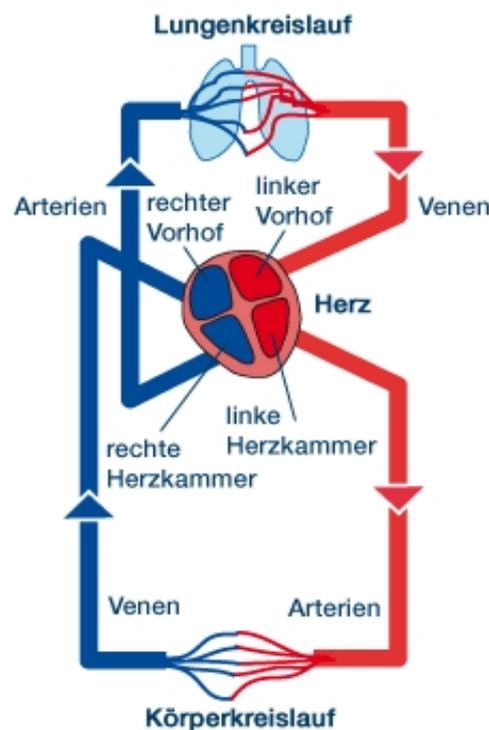


Abb. 1.2: Lungen- und Körperkreislauf des Blutes.

Sauerstoffreiches Blut = rot; Sauerstoffarmes Blut = blau. Verändert nach onmeda.de 2011.

Im sauerstoffarmen Blut der Pulmonalarterie liegt der Partialdruck für Sauerstoff etwa bei 40 mmHg und für Kohlendioxid bei etwa 46 mmHg, während in den Alveolen der Partialdruck für Sauerstoff etwa bei 100 mmHg und für Kohlendioxid bei etwa 40 mmHg liegt. Nachdem die Partialdrücke von Blut und Alveolarraum durch den Gasaustausch angeglichen wurden, beträgt der Sauerstoffpartialdruck im sauerstoffreichen Blut ca. 100 mmHg und der Kohlendioxidpartialdruck ca. 40 mmHg^{5, 6}.

1.4 Aufbau und Funktion der Blut- und Kapillargefäße

Blutgefäße bestehen grundsätzlich aus drei Schichten, wobei die einzelnen Schichten bei Arterien und Venen unterschiedlich aufgebaut sind. Die innere Schicht (*Tunica intima*) besteht aus einschichtigen Endothelzellen, die mittlere Schicht (*Tunica media*) vor allem aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern und schließlich die äußere Schicht (*Tunica adventitia*) überwiegend aus Fibroblasten (Abb. 1.3). Bei Arterien findet sich zusätzlich zwischen den drei Schichten jeweils noch eine elastische Membran (*Membrana elastica interna* und *Membrana elastica externa*). Arterien besitzen außerdem eine dickere Muskelschicht als Venen, um gefäßmotorische Funktionen wahrzunehmen. Durch Veränderung des Gefäßdurchmessers infolge einer Vasodilation bzw. Vasokonstriktion kann der Blutstrom reguliert und gesteuert werden. Im Vergleich zu Arterien bestehen Kapillaren nur aus einer Schicht, der *Tunica intima*, um den Gasaustausch durch eine Verkürzung der Diffusionsstrecke zu erleichtern.

1.5 Pulmonale Hypertonie (PH) und vaskulärer Gefäßumbau

Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwerwiegende, progressive Erkrankung der pulmonalen Gefäße, welche durch die Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Druckes (mPAP) auf 25 mmHg in Ruhe definiert ist⁷.

Die Krankheit wurde erstmals 1891 durch Ernst von Romberg beschrieben und in all ihren Varianten sind weltweit bis zu 100 Millionen Menschen betroffen. Die chronische PH ist

durch eine deutliche Erhöhung des pulmonalen Vasotonus, pathognomonische proliferative Lungengefäßveränderungen und einer Hypertrophie des rechten Ventrikels (Vergrößerung des rechten Herzens aufgrund der erhöhten Nachlast: *Cor pulmonale* im Sinne der WHO-Definition;⁸) charakterisiert. Die Patienten leiden unter stark eingeschränkter körperlicher Leistungsfähigkeit, Kreislaufstörungen, peripheren Ödemen und Müdigkeit. Die durchschnittliche Lebenserwartung ohne Therapie beträgt drei Jahre ab Diagnose⁹. Oft ist PH eine Folge von chronischer obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) oder anderen Erkrankungen (AIDS, Asthma, Lungenfibrose etc.). Die sehr selten auftretende idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH) allerdings, stellt im Gegensatz zu den anderen Typen, nicht die Folge einer anderen Grunderkrankung dar⁹⁻¹¹. Für sie kann häufig keine Ursache gefunden werden. Die pathophysiologischen Mechanismen, die zur IPAH führen sind nicht vollständig verstanden.

Im Jahr 2008 wurde PH in fünf Gruppen klassifiziert¹²:

1. pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)

1.1 idiopathisch (IPAH)

1.2 familiär

1.3 induziert durch Medikamente und Toxine

1.4 assoziiert mit identifizierten Erkrankungen (Kollagenosen, angeborene Shunts, portale Hypertonie, HIV-assoziiert)

1.5 Persistierende PH bei Neugeborenen

1'. PH mit signifikanter venöser oder kapillärer Beteiligung (u.a. pulmonale veno-okklusive Erkrankung, pulmonale kapilläre Hämangiomatose)

2. pulmonale Hypertonien bei Linksherzerkrankungen

➤ Erkrankung des linken Ventrikels oder Atrium

➤ Erkrankung der linken Ventile

3. pulmonale Hypertonien bei Erkrankungen des respiratorischen Systems und/oder Hypoxämie

4. pulmonale Hypertonie infolge chronisch thrombotischer und/oder embolischer Krankheiten

5. gemischte Gruppe (PH bei Sarkoidose, Histiozytose, Lymphangiomatose; PH durch Kompression von Lungengefäßen)

Diese Subkategorien der PH unterscheiden sich in ihren Ursachen, sind jedoch alle durch eine exzessive Vasokonstriktion und/oder einen pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozess charakterisiert¹³. Bei einer akuten PH kommt es, als Antwort auf Stimuli wie z.B. Hypoxie¹⁴, Medikamente oder Toxine^{9, 15} zu einer lokalen Vasokonstriktion der präkapillären Widerstandsgefäße (muskularisierte Arterien) in der Lunge, wodurch sich das Lumen der Gefäße verringert und der Blutdruck steigt^{10, 11, 16, 17}. Hält diese Situation an, so wird um dem konstant hohen Druck stand zu halten, der Zustand der Vasokonstriktion morphologisch „fixiert“, indem es zum Umbau der betroffenen Gefäße kommt, dem pulmonalvaskulären Gefäßumbau (pulmonalvaskuläres *Remodeling*)^{18, 19}. Dieser Gefäßumbau kann allerdings auch ohne vorherige Vasokonstriktion entstehen²⁰⁻²². Pulmonalvaskuläres *Remodeling* bezeichnet strukturelle und funktionelle Veränderungen in der normalen Architektur der Wände von pulmonalen Blutgefäßen⁸. Es handelt sich dabei z.B. um eine Umgestaltung der Widerstandsgefäße in der Lunge, die zu einer Verringerung des Lumens dieser Gefäße führt^{19, 23}. Solche Veränderungen führen so zu einem erhöhten Gefäßwiderstand und werden in zwei Prozesse unterteilt: 1. Umbau der Wände der Widerstandsgefäße und 2. Reduktion der insgesamt vorhandenen Blutgefäße in der Lunge^{18, 24-28}. Vaskuläres *Remodeling* führt so zu einem Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes und dies resultiert in pulmonaler Hypertonie.

Alle PH-Formen sind mit dieser funktionellen Veränderung der Gefäße assoziiert, welche durch Vasodilatoren und Vasokonstriktoren, die aus dem Endothel kommen, moduliert wird²⁹⁻³¹. In Patienten mit PH kann ein Ungleichgewicht der vasoaktiven Mediatoren bestehen, wobei die Produktion vasodilatatorischer Mediatoren reduziert ist (Prostaglandin I₂, NO, cGMP)³²⁻³⁴. Auf der anderen Seite kann die Produktion potenter Vasokonstriktoren in PH-Patienten erhöht sein (Thromboxan, Endothelin 1, 5-Hydroxytryptamin (5-HT))^{32, 35-37}.

Beim pulmonalvaskulären *Remodeling* kommt es hauptsächlich zur Proliferation (bzw. verringerter Apoptose¹⁶) von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cell*, PASM) und dadurch zu einer Verdickung der Tunica media. Die Proliferation von PASM kann z.B. auch durch Endothelin 1, 5-HT und Ca²⁺-Einstrom induziert werden³⁶⁻³⁹. Zudem tritt eine *de novo*-Muskularisierung von, normalerweise nicht muskularisierten, präkapillären Arteriolen auf^{23, 40-42}. Viele Wachstumsfaktoren fördern außerdem die Zellproliferation, das Überleben von Zellen und die Zellmigration. So z.B. der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *transforming growth factor- und -* (TGF- , TGF-), *platelet derived growth factor*

(PDGF) und *hepatocyte growth factor* (HGF) ⁴³⁻⁴⁸. Als Auslöser einer PH können außerdem Entzündungen eine Schlüsselrolle spielen. In den umgebauten Gefäßen findet man Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und dendritische Zellen. Zudem kann PH mit verschiedenen Viruserkrankungen, über Viren wie HIV (humanes Immundefizienz-Virus), humaner Herpesvirus (HHV), Epstein-Barr Virus und Zytomegalie-Virus assoziiert sein. Auch parasitäre Infektionen, wie Schistosomiasis, verursachen eine umfangreiche Entzündung und können zur Ausbildung einer PH führen ⁴⁹⁻⁵³. Inflammatorische Zytokine und Chemokine spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei IPAH. In IPAH-Patienten konnten erhöhte Level von IL-1, IL-6, *monocyte chemoattractant protein-1*, *tumor necrosis factor* (TNF), FKN (Fraktalkin), RANTES und *chemokine ligand 2* (CCL-2) gemessen werden ⁵⁴⁻⁵⁸.

Der Gefäßumbau findet hauptsächlich im mikrovaskulären Bereich statt, kann aber auch in großen pulmonalen Arterien beobachtet werden ^{25, 59}. Bei einer IPAH kommt es ohne einen erkennbaren Grund zu einem *Remodeling*-Prozess, der letztendlich zum allgemeinen Krankheitsbild der PH führt.

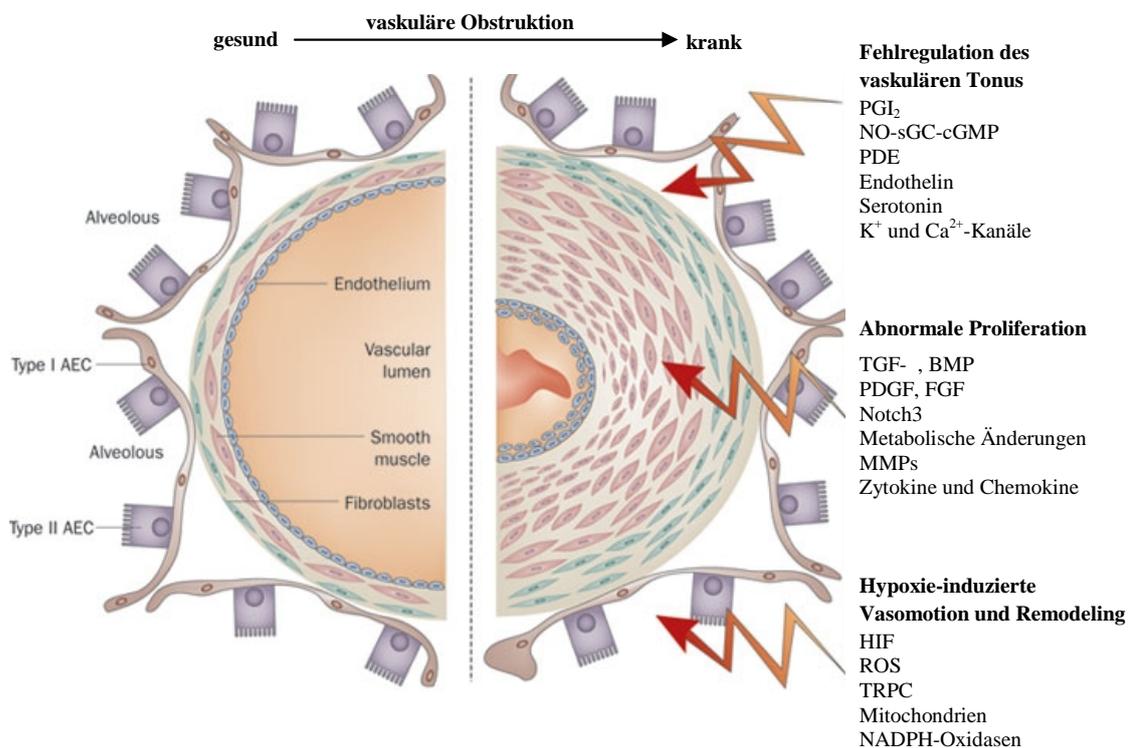


Abb. 1.3: Vaskuläres Remodeling bei pulmonalarterieller Hypertonie.

K- und Ca²⁺-Kanäle = Kalium und Calcium Kanäle; AEC = alveoläre Epithelzellen; BMP = *bone morphogenetic protein*; cGMP = zyklisches Guanosinemonophosphat; ECM = extrazelluläre Matrix; EGF = *epidermal growth factor*; EPC = *endothelial progenitor cells*; HIF = Hypoxie induzierbarer Faktor; MMPs = Matrixmetalloproteinasen; NADPH = Nikotinamidadenindinucleotidphosphat; NO = Stickstoffmonoxid; PDE = Phosphodiesterase;

PDGF = *platelet-derived growth factor*; PGI₂ = Prostaglandin I₂; Rho-Ki = Rho-Kinasen; ROS = *reactive oxygen species*; sGC = lösliche Guanylatzyklase; TGF = *transforming growth factor*; TK = Tyrosinkinase; TKi = Tyrosinkinase-Inhibitor; TRPC = *transient receptor potential cation channels*; VEGF = *vascular endothelial growth factor*. Verändert nach Schermuly et al. 2011⁶⁰.

Das pulmonalvaskuläre *Remodeling* findet nicht nur in der Gefäß-Media statt, sondern umfasst alle Schichten der Gefäßwand, und viele vaskuläre Zelltypen sind in diesen Prozess involviert⁸. Es kommt ebenfalls zu einer Hypertrophie der Adventitia, endothelialer Zellproliferation und Deposition zusätzlicher Matrixkomponenten^{1 42, 61, 62}. Pulmonalvaskuläres *Remodeling* fördert und resultiert also in einer chronischen PH²⁵.

Als primäre Antwort auf den erhöhten Widerstand des pulmonalen Gefäßbettes und als kompensatorischer Mechanismus, entwickelt sich bei PH eine rechtsventrikuläre Hypertrophie (RVH). Durch diese Hypertrophie wird der linke Ventrikel zusammengedrückt. Durch den anhaltenden bzw. progressiv ansteigenden Widerstand in der Pulmonalarterie kommt es letztendlich zu einer kontraktilen Dysfunktion, Dekompensation und Dilatation, was zu einem Rechtsherzversagen führt⁶³.

1.6 Experimentelle Tiermodelle der PH

Die Ausbildung einer PH setzt eine sehr komplexe und heterogene Konstellation multipler genetischer, molekularer und humoraler Unregelmäßigkeiten voraus, welche in einer komplizierten Art und Weise interagieren und sich im vaskulären *Remodeling* manifestieren. Um den Prozess des Gefäßumbaus der PH in Tiermodellen zu studieren, werden eine Vielzahl von chemischen, physiologischen und molekularen Stimuli eingesetzt. Alle *in vivo* Tiermodelle versuchen verschiedene Eigenschaften der Pathophysiologie und Vaskulopathie der humanen PH nachzuahmen. Um die pathophysiologischen Mechanismen und Signalwege zu verstehen, die zum vaskulären *Remodeling* und damit zu PH führen, finden häufig zwei Modelle ihre Anwendung. Die Rede ist von den Modellen der Hypoxie-induzierten und der Monocrotalin-induzierten PH. Im Folgenden soll nun zuerst das Modell der akuten und chronischen Hypoxie erläutert werden, welches auf einem (Patho)physiologischen Stimulus beruht, indem die Tiere bzw. Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt werden.

¹ Es handelt sich hierbei hauptsächlich um eine Zunahme der Kollagen- und Elastin-Fasern.

Die ausreichende Sauerstoffversorgung eines Organismus ist von entscheidender Bedeutung und dies setzt eine Optimierung des Gasaustausches in der Lunge voraus. Da die Ventilation der Alveolen ungleichmäßig ist⁶⁴, muss diese Heterogenität auf irgendeine Weise kompensiert werden. Eine physiologische Antwort auf eine alveoläre Hypoxie (Sauerstoffmangel, -unterversorgung) in der Lunge stellt die *hypoxische pulmonale Vasokonstriktion* (HPV) dar. Im Gegensatz zu den Gefäßen der Lunge, die für die Sauerstoffaufnahme zuständig sind, verteilen die systemischen Gefäße den Sauerstoff in alle Gewebe des Körpers. Aufgrund dieser funktionellen Unterschiede zeigen die Gefäße unterschiedliche Reaktion auf Hypoxie. Systemische Gefäße reagieren auf Hypoxie mit einer Vasodilation (mit Ausnahme der Plazenta⁶⁵), die Lungengefäße hingegen zeigen eine Vasokonstriktion^{14, 30}. Dabei wird der lokale Blutfluss an die regionale Ventilation der Lunge adaptiert, indem es zu einer lokalen Vasokonstriktion der präkapillären Gefäße von schlecht ventilierten, dadurch hypoxischen, Arealen der Lunge kommt^{66, 67}. Dieser Mechanismus führt also zu einer Umverteilung des pulmonalen Blutflusses, von Arealen mit einem niedrigen Sauerstoff-Partialdruck, zu solchen mit einer hohen Verfügbarkeit von Sauerstoff. Dadurch wird der Gasaustausch in der Lunge optimiert^{68, 69}. HPV verlagert also das Blut von schlecht ventilerten Gebieten, in besser ventilerte Lungensegmente und optimiert so das Ventilations-Perfusions Verhältnis, reduziert den Fließwiderstand⁷⁰ und optimiert die systemische O₂-Versorgung⁷¹. Zudem steigt aber auch der pulmonalarterielle Druck während hypoxischer Ventilation, wenn weite Bereiche der Lunge von alveolärer Hypoxie betroffen sind^{72, 73}. Als Effektor-Zellen der HPV wurde die präkapilläre glatte Muskelschicht der Widerstandsgefäße in der Lunge identifiziert, genauer die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC)⁷⁴⁻⁷⁶, die auch beim pulmonalvaskulären *Remodeling* eine wichtige Rolle spielen. Eine Beeinträchtigung der HPV unter pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. das Atemnot-Syndrom des Erwachsenen, das hepatopulmonale Syndrom oder unter Anästhesie, kann zu einer schlechten Oxygenierung des Blutes während der Lungenpassage führen¹⁴.

Unter Bedingungen einer globalen und anhaltenden alveolären Hypoxie führt die permanente Vasokonstriktion und der damit verbundene Druckanstieg zu einer Hypoxie-induzierten pulmonalarteriellen Hypertonie⁶⁴, welche durch pulmonalvaskuläre *Remodeling*-Prozesse morphologisch „fixiert“ wird^{18, 19}. Unter normoxischen Bedingungen kommt es, nach chronischer Hypoxie, zu einem Rückgang der Verdickung der Media und der Adventitia der Widerstandsgefäße bis fast zur Ausgangsdicke. Die Kollagenfasern hingegen bleiben verstärkt vorhanden⁷⁷. Daher ist es, für das Hypoxie-

Modell, äußerst wichtig, dass die hypoxischen Bedingungen während eines Experimentes konstant aufrechterhalten werden. Die chronische Hypoxie ist das am häufigsten verwendete Modell zur Untersuchung der PH. Die in diesem Modell beobachteten pathologischen Befunde zeigen aber auch Gemeinsamkeiten mit anderen humanen Erkrankungen, wie z.B. verstärkte Muskularisierung der Widerstandsgefäße in chronischer Bronchitis, zystischer Fibrose, COPD, Hypoventilation und chronischen Herzerkrankungen (treten als Folge der Hypoxie auf)⁷⁸⁻⁸¹.

Demgegenüber steht das Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie, welches sich stark von dem Hypoxie-Modell unterscheidet. Es handelt sich hierbei nicht um einen (Patho)physiologischen Stimulus, sondern um einen inflammatorischen, toxischen Stimulus zur Induzierung der PH. In diesem Modell kann keine Vasokonstriktion oder Polyzythämie², wie unter Hypoxie, beobachtet werden. Vielmehr entwickelt sich eine stark inflammatorische Reaktion, mit endotheliale Zelltod und einer Reduktion der peripheren Arterien⁸². Monocrotalin (MCT) ist ein Phytotoxin, was aus den Samen von *Crotalaria spectabilis* gewonnen wird und gehört zu den Pyrrolizidinalkaloiden^{30, 83}. Im Tiermodell wird MCT subkutan verabreicht^{82, 84}. Die Toxizität der Pyrrolizidinalkaloide beruht *in vivo* auf deren Aktivierung in der Leber. Die Verstoffwechslung der Alkaloide durch die mischfunktionellen Oxidasen³ in der Leber führt zur Bildung des reaktiven, alkylierenden Dehydromonocrotalin (MCT-Pyrrol). Dieser Metabolit wird in den Blutstrom freigesetzt und hat einen mehr oder weniger selektiven Effekt auf die pulmonalen Gefäße, ohne die systemischen Gefäße zu beeinflussen, da die Lunge das erste große Gefäßbett distal der Leber ist³⁰. Dehydromonocrotalin bewirkt in den Gefäßen der Lunge eine Endothelschädigung, was die Permeabilität des Endothels erhöht⁸⁵⁻⁸⁷. Es kommt zur Thrombozytenaggregation (Plättchensequestrierung, intravaskuläre Thromben und zur Sekretion von Wachstumsfaktoren, sowie von Zytokinen aus dem Endothel⁸⁸⁻⁹¹. All dies führt letztendlich zu einem Gefäßumbau, also zur Migration und Proliferation von PASMC, was in einer verstärkten Muskularisierung von bereits muskularisierten Gefäßen und einer *de novo*-Muskularisierung von normalerweise nicht-muskularisierten Gefäßen resultiert⁹². Die glatten Muskelzellen selbst produzieren weitere Wachstumsfaktoren sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und weisen eine veränderte Kollagen- und Elastinsynthese auf^{93, 94}, wodurch der *Remodeling*-Prozess weiter unterstützt wird^{8, 83}.

² Seltene myeloproliferative Erkrankung, bei der sich alle Zellen im Blut übermäßig vermehren. Vor allem die Erythrozyten, aber auch in geringerem Maße die Thrombozyten und Granulozyten sind betroffen.

³ Monocrotalin wird vorwiegend durch die Zytochrom-P450-Monooxygenasen verstoffwechselt.

Innerhalb von 24 Stunden wird Dehydromonocrotalin fast vollständig über die Nieren ausgeschieden, so dass danach keine Reste in Körperflüssigkeiten oder -geweben nachweisbar sind. Dies lässt darauf schließen, dass eine einmalige Endothelschädigung durch Dehydromonocrotalin ausreicht, um den Gefäßumbau auszulösen⁹⁵. Der Effekt von Dehydromonocrotalin beschränkt sich auf den mikrovaskulären Bereich der Lungengefäße, so dass auch nur in diesen Gefäßen ein *Remodeling* zu erkennen ist^{59, 92}. Das Modell der MCT-induzierten PH stellt bei Ratten ein gut etabliertes Modell dar.

Beide Modelle, MCT-induzierter PH und Hypoxie-induzierte PH, führen also zu einer verstärkten Proliferation und Migration von PASMC, was zu einer zunehmenden Muskularisierung der präkapillären pulmonalen Arteriolen und einer *de novo*-Muskularisierung führt. Der Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks und die rechtventrikuläre Hypertrophie finden im MCT-Modell jedoch langsamer statt³⁰. Aufgrund der Speziesunterschiede zwischen Ratten und Mäusen, reagieren beide Arten natürlich unterschiedlich auf die verschiedenen Stimuli. Ratten weisen, im Vergleich zu Mäusen, eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber hypoxischen Bedingungen auf und reagieren mit verhältnismäßig großen hämodynamischen Veränderungen⁹⁶. Andererseits, kann das MCT-Modell bei Mäusen nicht angewendet werden. Zwar ist MCT bei Mäusen ebenfalls hepatotoxisch, allerdings kommt es nicht zur Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie mit vaskulärem *Remodeling*⁹⁷⁻¹⁰⁰.

1.7 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

ROS sind Sauerstoff enthaltende Moleküle mit einer hohen Reaktivität gegenüber anderen Biomolekülen. Sie beinhalten sowohl freie Radikale (ein oder mehr ungepaarte Elektronen), als auch nicht-Radikal-Spezies und werden von allen vaskulären Zellen produziert¹⁰¹. Unter normalen physiologischen Bedingungen, ist die Produktion von ROS sehr spezifisch auf subzelluläre Kompartimente beschränkt und durch eine Vielzahl negativer Rückkopplungsmechanismen reguliert¹⁰²⁻¹⁰⁴. Kommt es zu einer übermäßigen ROS-Produktion resultiert dies in einer zellulären Dysfunktion^{105, 106}. Eine große Anzahl experimenteller Nachweise deutet darauf hin, dass reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der Entwicklung von PH spielen¹⁰⁷⁻¹¹¹. Die ROS-„Familie“ umfasst diverse Moleküle, welche weitreichende und unterschiedliche Einflüsse auf die Funktion vaskulärer Zellen haben. ROS sind

ubiquitär reaktive Derivate des O₂-Metabolismus der Zellen, die man in allen biologischen Systemen findet. Dazu gehören klassischerweise Superoxid-Anionen (O₂^{•-}), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Hydroxyl-Radikale (OH[•]), Peroxynitrit (ONOO⁻) und Singulett-Sauerstoff (¹O₂); wobei Superoxid und Wasserstoffperoxid meist als Vorläufer für die Bildung der anderen ROS dienen^{112, 113}. ROS haben einen wichtigen Anteil an Signalkaskaden und regulatorischen Prozessen in Zellen¹¹⁴. Werden sie innerhalb subzellulärer Kompartimente in kontrollierten Mengen produziert, können ROS als Signalmoleküle wirken und die normalen zellulären Funktionen regulieren¹¹². In den vaskulären Zellen modulieren ROS physiologische, Redox-sensitive Prozesse wie Vasokonstriktion und -dilatation, Zellmigration, Wachstum, Apoptose, den Auf- bzw. Abbau extrazellulärer Matrixproteine und die Stimulation vieler Kinasen, indem sie direkten oder indirekten Einfluss auf multiple Ebenen verschiedener Signalwege nehmen^{87, 111, 114-119}.

Unter normalen physiologischen Bedingungen halten sich Bildung und Abbau von ROS die Waage. Für die Produktion von ROS durch vaskuläre Zellen sind verschiedenste Enzyme verantwortlich, auf die später genauer eingegangen werden soll. Um das ROS-Aufkommen auf einem konstanten Niveau zu halten werden die ROS durch Antioxidantien in der Zelle abgebaut. Dazu gehören z.B. die zytosolische und mitochondriale Superoxiddismutase (Sod1 und Sod2) und die Katalase. Diese Enzyme wandeln Superoxid in H₂O₂ und weiter in molekularen Sauerstoff um^{120, 121}.

Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Substanzen, so resultiert dies in oxidativem Stress. Oxidativer Stress ist die pathogene Folge der Überproduktion von Oxidantien, welche die antioxidative Kapazität der Zelle übersteigt und den Zustand einer chronisch erhöhten ROS-Konzentration beschreibt^{111, 122}. Eine stetig wachsende Anzahl von Untersuchungen deutet darauf hin, dass verstärkter oxidativer Stress und das damit einhergehende erhöhte Vorkommen von ROS die Ursache von Gefäßschädigungen in kardio- und pulmonalvaskulären Erkrankungen, wie PH oder Arteriosklerose, sind¹²³. Unter oxidativem Stress laufen die oben genannten physiologischen Redox-sensitiven Signalwege unkontrolliert ab, was einen geänderten vaskulären Tonus, verstärktes PASMC-Wachstum, Inflammation und eine verstärkte Deposition extrazellulärer Matrixproteine (Kollagen, Fibronectin, Elastin etc.) zur Folge hat. Diese Prozesse führen dann zum pulmonal-vaskulären *Remodeling* und so zu PH^{114, 124-127}. Eine verstärkte ROS-Produktion, die zu oxidativem Stress führt, kann also vaskuläres *Remodeling* auslösen^{108, 123, 128, 129}.

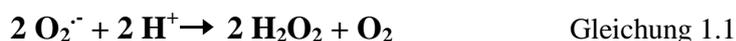
1.8 Antioxidative Mechanismen

Der Redox-Status einer lebenden Zelle (oxidierende/reduzierende Bedingungen) hat einen maßgeblichen Einfluss auf die zellulären Signalwege. Eine angemessene ROS-Produktion ist daher zur Aufrechterhaltung der normalen physiologischen Funktionen einer Zelle unbedingt notwendig¹³⁰. Eine exzessive ROS-Produktion hingegen führt zu einer pathophysiologischen Situation, in welcher zelluläre Prozesse nicht normal bzw. gar nicht ablaufen können. Unter oxidativem Stress verläuft die ROS-abhängige Regulation der betreffenden Signalkaskaden unkontrolliert und es kann zur Ausbildung von PH aufgrund des Gefäßumbaus kommen¹¹⁴.

Um diesen oxidativen Stress bewältigen zu können, haben aerobe Organismen effiziente enzymatische und nicht-enzymatische Verteidigungssysteme entwickelt. Die enzymatischen Systeme setzen ROS enzymatisch in harmlose Nebenprodukte um, während die nicht-enzymatischen Systeme (kleine Moleküle) direkt mit den Radikalen reagieren. Im Folgenden soll lediglich auf die wichtigsten enzymatischen Mechanismen eingegangen werden. Dazu gehören die intrazellulären Isoformen der Superoxiddismutase (Sod), die Katalase und die Peroxidasen. Die Expression und die Aktivität antioxidativer Enzyme werden durch viele Faktoren reguliert. Der primäre Faktor ist der oxidative Status der Zelle. Sowohl endogene, als auch exogene Substanzen wirken als Oxidationsmittel. Sie verändern dadurch das zelluläre, oxidative Gleichgewicht und somit die Genexpression antioxidativer Enzyme¹³¹.

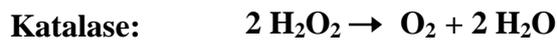
Die Enzyme repräsentieren die erste „Verteidigungslinie“ gegen die, in hoher Konzentration toxischen, Radikale.

Die erste enzymatische Reaktion der Reduktionskaskade von Sauerstoff ist die Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff.



Die dafür verantwortlichen Enzyme sind die zytosolische Superoxiddismutase (Cu²⁺/Zn-Sod; Sod1), die mitochondriale Superoxiddismutase (Mn-Sod; Sod2) und die extrazelluläre Superoxiddismutase (EC-Sod, Sod3). Obwohl Wasserstoffperoxid kein Radikal ist, weist es dennoch eine hohe Reaktivität auf und wird durch die Fenton-Reaktion schnell in das reaktive Hydroxid-Radikal ([•]OH) umgewandelt.

Zwei Enzyme sind an der Entfernung von H_2O_2 beteiligt, die Peroxidasen und die Katalase. Die Peroxidasen sind sowohl im Zytosol, als auch in den Mitochondrien präsent. Katalase findet man hauptsächlich in den Peroxisomen, aber auch im Zytosol und dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Peroxidasen und Katalase setzen das zelltoxische Wasserstoffperoxid zu Wasser und ebenfalls molekularen Sauerstoff um^{131, 132}.



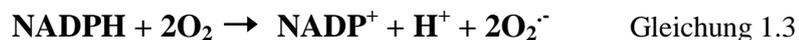
Gleichung 1.2



1.9 NADPH-Oxidasen

In den Gefäßen wird ROS von den Endothelzellen, den PASMC der Media und den Fibroblasten der Adventitia produziert, also von allen Typen vaskulärer Zellen¹³³⁻¹³⁶. Die wichtigsten Enzyme, welche im pulmonal-vaskulären System ROS produzieren, sind nach derzeitigem Kenntnisstand Xanthin-Oxidasen, Lipoxygenasen, NO-Synthasen, die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette und die NADPH-Oxidasen (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidasen)^{112, 115, 137}. Einige Arbeiten postulieren, dass die vaskuläre ROS-Produktion hauptsächlich auf die Aktivität der NADPH-Oxidasen zurückzuführen^{114, 138, 139} ist, deren Vorkommen in allen Gefäßschichten nachgewiesen werden konnte^{134, 140-143}.

Die NADPH-Oxidasen sind Superoxid produzierende Enzyme^{139, 144, 145}. Sie katalysieren die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid, wobei NADPH als Elektronendonator fungiert^{114, 138}.



Die gängige Literatur unterscheidet zwei Typen von NADPH-Oxidasen: 1. Die phagozytären NADPH-Oxidasen und 2. die nicht-phagozytären NADPH-Oxidasen^{138, 139, 146}. Beide Typen bestehen aus einem Multi-Protein-Komplex^{14, 114}. Die prototypische, und am besten charakterisierte, NADPH-Oxidase ist die der Leukozyten⁴ (gp91^{phox} oder Nox2), die eine zentrale Rolle bei der Verteidigung des Wirtes gegen Bakterien einnimmt^{147, 148}.

⁴ Neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen.

Im Folgenden soll der Aufbau der NADPH-Oxidasen am Beispiel der Nox2 erläutert werden. Der Enzym-Komplex besteht aus den zwei membrangebundenen Untereinheiten gp91^{phox} und p22, die den heterodimeren Flavozytochrom-b₅₅₈-Komplex bilden, sowie aus den drei zytosolischen Untereinheiten p47^{phox}, p67^{phox} und p40^{phox} (phox = phagozytäre Oxidase)^{146, 147, 149}. Zusätzliche Komponenten sind die kleinen G-Proteine Rac2⁵ und Rap1A^{114, 146}. Nox2 ist ein stark glykosyliertes Protein¹⁵⁰ und hat, wie alle Nox-Isoformen, sechs Transmembrandomänen^{151, 152}, wobei sich C- und N-Terminus im Zytoplasma befinden^{153, 154}. Eine FAD- und NADPH-Bindungsstelle befinden sich am C-Terminus¹⁵⁵. Die Untereinheit gp91^{phox} dient als Elektronentransporter der NADPH-Oxidase und stellt den eigentlichen Prototyp einer NADPH-Oxidase dar¹⁵⁶. Das Membranprotein p22^{phox} liegt im Verhältnis 1:1 eng mit gp91^{phox} assoziiert vor und besitzt zwei (möglicherweise vier) Transmembrandomänen, wobei C- und N-Terminus ebenfalls ins Zytoplasma ragen¹⁵⁶. Die zwei wichtigsten Funktionen von p22^{phox} sind: 1. Die Bindung an gp91^{phox} und die damit einhergehende Stabilisierung des Proteins und 2. die Bindung von p47^{phox}¹⁵⁶. Das dem zugrunde liegende Konzept ist, dass gp91^{phox} und p22^{phox} nur als Heterodimer stabil sind, während die Monomere durch das Proteosom abgebaut werden¹⁵⁸. Während die Funktionen von gp91^{phox} und p22^{phox} klar erscheinen, sind die der zytosolischen Untereinheiten weniger präzise definiert. Das als „Organisator-Untereinheit“ bezeichnete zytosolische p47^{phox} ist nicht-glykosyliert und besitzt eine sogenannte phox (PX)-Domäne, die mit Membranphospholipiden interagiert. Außerdem sind zwei SH3-Domänen vorhanden, die mit den Prolin-reichen Regionen des C-Terminus von p22^{phox} interagieren können^{159, 160}. Diese Interaktion wird allerdings durch eine autoinhibitorische Region (AIR) solange verhindert, bis p47^{phox} phosphoryliert wird und dadurch eine Konformationsänderung durchläuft. p47^{phox} scheint demnach als eine Art Adapter-Protein zu dienen, welches als Plattform für die Aggregation des funktionellen Enzyms auf der zytosolischen Seite von Flavozytochrom b⁵⁵⁸ funktioniert^{156, 160, 161}. Die zytosolische Untereinheit p67^{phox} ist ebenfalls nicht glykosyliert und wird als „Aktivator-Untereinheit“ bezeichnet. p67^{phox} enthält 1. einen N-Terminalen Tetratricopeptid-Repeat (TPR), 2. eine Aktivator-Domäne (AD), 3. eine „Phox und Bem1“-Domäne und 4. eine C-Terminale SH3-Domäne, die mit der ebenfalls C-terminalen Prolin-reichen Region von p47^{phox} interagiert¹⁵⁶. Man geht davon aus, dass p67^{phox} den Elektronentransfer von NADPH zu Flavin reguliert. Die AD ist essentiell für den Elektronenfluss im Flavozytochrom b₅₅₈. Man nimmt daher an, dass diese Region den Hydrid-Transfer von NADPH zu FAD im

⁵ Rac2 ist ausschließlich in myeloiden Zellen exprimiert. Rac1 kommt ubiquitär in allen Zellen vor und kann Rac2 ersetzen.

Flavozytochrom b_{558} reguliert¹⁴⁷. Die Untereinheit $p40^{phox}$ ist ebenfalls nicht glykosyliert und enthält folgende strukturelle Domänen: 1. Eine SH3-Domäne, 2. eine PX-Domäne und 3. eine PB1-Domäne. $p40^{phox}$ interagiert in einer 1:1:1 Stöchiometrie mit $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$ und ist nur in Kombination mit $p67^{phox}$ stabil¹⁶². $p40^{phox}$ ist in die Regulation von $gp91^{phox}$ involviert und verstärkt wahrscheinlich die Oxidase-Funktion^{163, 164}. Das G-Protein Rac2 stellt keine Untereinheit der NADPH-Oxidasen im engeren Sinne dar, da es auch andere Zellfunktionen reguliert. Nichtsdestotrotz sind Rac-GTPasen an der Regulation von $gp91^{phox}$ maßgeblich beteiligt, was später erläutert werden soll. Die Aufgabe des kleinen G-Proteins Rap1A ist unklar¹⁴⁴.

In nicht-stimulierten, ruhenden Phagozyten liegen $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und $p40^{phox}$ im Zytosol vor, wogegen $gp91^{phox}$ und p22 in der Membran lokalisiert sind und das Flavozytochrom b_{558} bilden. Rac2 liegt in einer inaktiven GDP-Form vor. In diesem Zustand wird kein Superoxid produziert. Werden die Phagozyten aber stimuliert (z.B. durch fMLP = formyl-Met-Leu-Phe oder durch opsonieren mit Zymosan), kommt es zur Phosphorylierung von $p47^{phox}$ an einem Serin-Rest durch die Proteinkinase C (PKC). Die Phosphorylierung von $p47^{phox}$ führt zu einer Konformationsänderung, was die Interaktion mit $p67^{phox}$ und die Translokation des $p47^{phox}/p67^{phox}$ Komplexes zur Plasmamembran erlaubt. Dort interagiert $p47^{phox}$ mit $p22^{phox}$ und $p67^{phox}$ kann so anschließend durch eine direkte Protein-Protein Interaktion als Aktivator von $gp91^{phox}$ wirken. $p47^{phox}$ organisiert also die Translokation der anderen Cofaktoren und bringt $p67^{phox}$ (Aktivator-Untereinheit) in Kontakt mit $gp91^{phox}$. Die GTPase Rac2 interagiert in der aktiven GTP-Form mit der Oxidase durch das TPR-Motiv am N-Terminus von $p67^{phox}$ und steuert ebenfalls der Annäherung von $p67^{phox}$ an $gp91^{phox}$ bei. Die Rollen von $p40^{phox}$ und Rap1A sind unklar, $p40^{phox}$ scheint aber an der Rekrutierung von $p67^{phox}$ und $p47^{phox}$ zur Membran beteiligt zu sein. Nach der Aktivierung werden ROS, als Verteidigungsmechanismus, in den Extrazellulärraum freigesetzt (*oxidative burst*)^{114, 139, 146, 147, 156, 165}. Mit der Komplettierung des menschlichen Genomprojekts, wurde eine Vielzahl von Homologen der phagozytären NADPH-Oxidase ($gp91^{phox}$) identifiziert und als Nox-Homologe bezeichnet¹⁶⁶. $gp91^{phox}$ wurde in diesem Zusammenhang in Nox2 umbenannt¹⁶⁷. Auch für die zytosolischen Untereinheiten $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$ wurden Homologe Proteine benannt und daher wurde $p47^{phox}$ in NoxO2 und $p67^{phox}$ in NoxA2 umbenannt^{156, 165, 167}.

Wie oben beschrieben, benötigt Nox2 für seine Aktivierung mindestens fünf zusätzliche Komponenten. Andere Nox-Isoformen unterscheiden sich in ihrem Bedarf an diesen

Proteinen⁶ oder derer Homologe. Tabelle 1.1 liefert eine Übersicht über die bekannten Homologe von gp91^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} sowie über die Regulationsproteine und Aktivierungsmechanismen der gp91^{phox}-Homologe. Die vorherrschende NADPH-Oxidase in Leukozyten ist die Nox2-Isoform. In Gefäßen ist die Situation wesentlich komplexer. Jede Gefäßschicht scheint eine spezifische Zusammensetzung von NADPH-Oxidasen aufzuweisen, die zwischen verschiedenen Spezies variieren kann. Aus diesem Grund bezieht sich der Begriff „nicht-phagozytäre NADPH-Oxidasen“ auf die Gruppe von Oxidasen, die in den vaskulären Zellen exprimiert sind^{139, 146}. Es kann lediglich festgehalten werden, dass p22^{phox} und Nox4 in allen vaskulären Zellen exprimiert sind^{141, 168-170} und Nox2 hauptsächlich im Endothel und der Adventitia von leitenden Gefäßen zu finden ist^{141, 171}. Die vaskuläre Expression von Nox1 ist gering und spielt hauptsächlich in PASMC eine Rolle in der Superoxidproduktion^{166, 169, 172}. In Bezug auf die zytoplasmatischen Untereinheiten konnten Rac1 und p47phox in allen vaskulären Zellen¹³⁹ aber p67phox nur im Endothel¹⁷³ und der Adventitia¹⁷¹, aber nicht in PASMC¹⁷⁴, nachgewiesen werden¹⁴⁶. Als Konsequenz der Heterogenität vaskulärer NADPH-Oxidasen kann keine generelle Aussage über den Aktivierungsmechanismus getroffen werden. Die Antwort auf einen identischen Stimulus unterscheidet sich zwischen den Zelltypen und Nox-Isoformen. Es besteht also keine einheitliche Antwort der Nox-Isoformen auf einen bestimmten Stimulus. Zudem unterscheidet sich der Aktivierungsmechanismus einzelner Isoformen abhängig vom Zelltyp, in welchem sie exprimiert sind¹⁴⁶. Als grundlegender Mechanismus für die Aktivierung gilt jedoch der, der phagozytären NADPH-Oxidasen. Alle anderen leiten sich von diesem ab¹³⁹.

⁶ p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, Rac-GTPase und p40^{phox}.

Tab. 1. 1: Zusammenfassung der verschiedenen Nox-Enzyme und deren regulatorische Untereinheiten, Aktivierungsmechanismen und Expressionsmuster in den Zellen der Lunge^{156, 165}. VSMC = *vascular smooth muscle cell*

	Homologe	Expression in der Lunge	Regulatorische Untereinheiten	Aktivierung
gp91 ^{phox} -Homologe	Nox1	VSMC, Endothel, Atemwege	p22 ^{phox} , NoxO1 (p47 ^{phox}), NoxA1, Rac1	AngII, PDGF, LPS, PGF2, Thrombin
	Nox2 (gp91 ^{phox})	Myeloide Zellen, Endothel, VSMC, Fibroblasten	p22 ^{phox} , p47 ^{phox} , p40 ^{phox} , p67 ^{phox} , Rac1/2	Ca ²⁺ , Phosphorylierung
	Nox3	?	p22 ^{phox} , NoxO1, evtl. NoxA1, evtl. Rac	?
	Nox4	Endothel, VSMC, Fibroblasten	p22 ^{phox} , Poldip2, Tks5	konstitutiv aktiv, TGF-
	Nox5	Endothel, VSMC	/	Ca ²⁺
	Duox1	Epithel der Atemwege und Alveolen	/	Ca ²⁺ , Phosphorylierung
	Duox2	Epithel der Atemwege und Alveolen	/	Ca ²⁺ , Phosphorylierung
zytosolische Homologe	NoxO1	/	/	
	NoxO2 (p47 ^{phox})	Myeloide Zellen, Endothel, glatte Muskulatur der	/	
	NoxA1	Epithel der <i>Arteria basilaris</i> , glatte	/	
	NoxA2 (p67 ^{phox})	Leukozyten, Endothel	/	

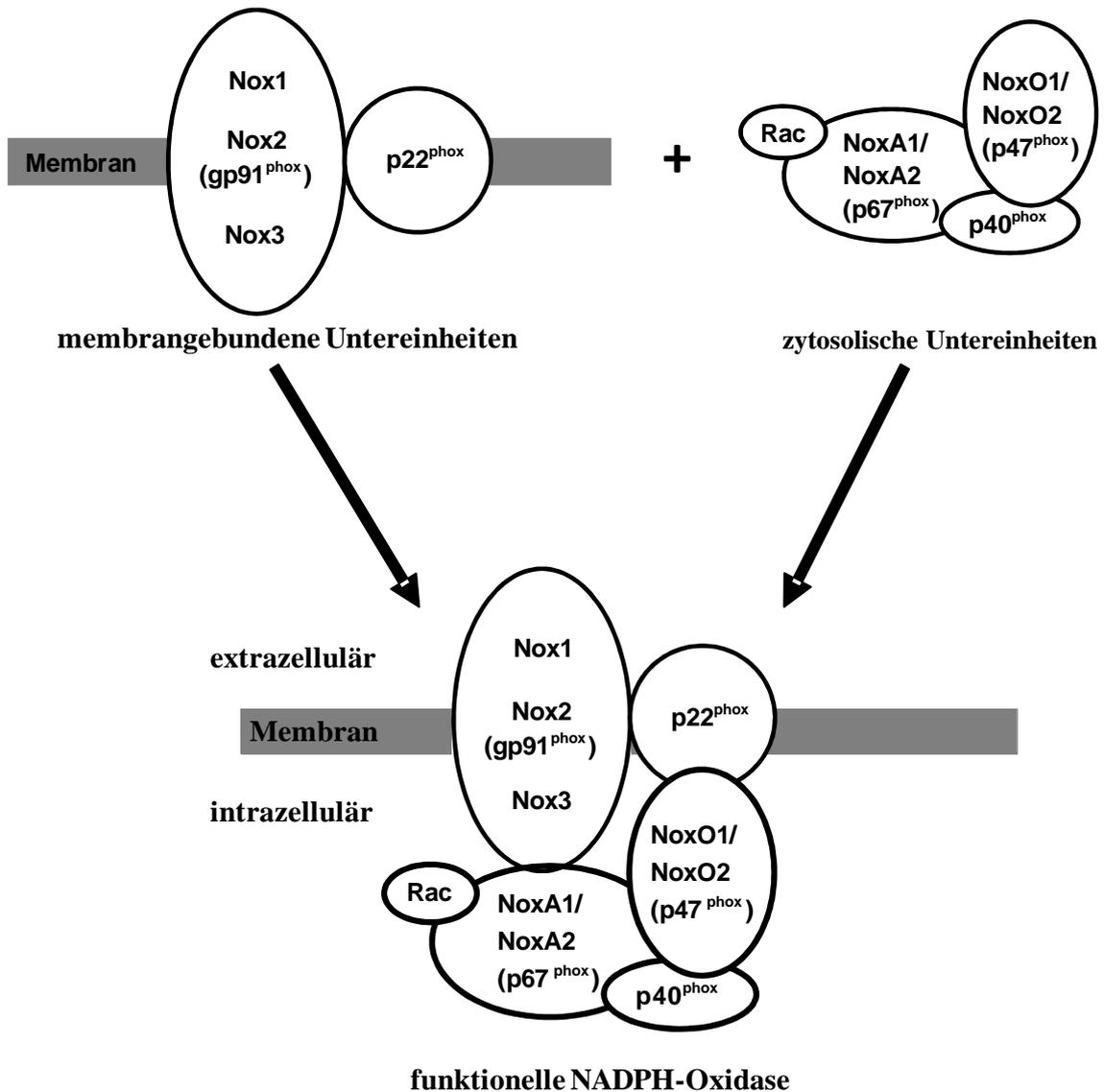


Abb. 1.4: Anlagerung der zytosolischen Untereinheiten an die membrangebundenen Komponenten zur Bildung einer funktionellen NADPH-Oxidase.

In der Abbildung sind die zytosolischen Untereinheiten bereits als Komplex dargestellt. Allerdings findet auch hier, wie im Text beschrieben, zuvor eine Zusammenlagerung der einzelnen Komponenten statt. Die Ellipsen repräsentieren jeweils alle bekannten Homologe, bis auf Nox4, Nox5 sowie Duox1 und 2, da diese Isoformen durch andere Mechanismen aktiviert werden (siehe Tabelle 1.1)

Die nicht-phagozytäre NADPH-Oxidase besitzt einige spezifischen Eigenschaften, die sie von der phagozytären NADPH-Oxidase unterscheiden¹³⁹: 1. Die Rate der Superoxidproduktion ist wesentlich geringer (ca. 10% der Leukozyten)^{175, 176}, 2. die nicht-phagozytäre NADPH-Oxidase ist konstitutiv aktiv und in subzellulären Kompartimenten

lokalisiert^{7 177-179}, 3. das Enzym besitzt jedoch eine induzierbare Aktivität, was bedeutet das die Produktion von Superoxidradikalen durch bestimmte Agonisten verstärkt werden kann^{180, 181}, 4. eine weitere spezifische Eigenschaft ist, dass das vaskuläre Enzym Superoxidradikale auch intrazellulär freisetzen kann und nicht nur extrazellulär, wie es beim phagozytären Enzym der Fall ist^{182, 183}, 5. im Gegensatz zu den zytotoxischen Mengen Superoxid die in Phagozyten produziert werden, produzieren die nicht-phagozytären Zellen geringe Mengen von Superoxid, die eine Rolle in vielen zellulären Signalwegen übernehmen¹⁸⁴⁻¹⁸⁸ und 6. im Unterschied zur phagozytären Oxidase, die ausschließlich NADPH benutzt¹⁴⁵, kann die nicht-phagozytäre Oxidase auch NADH als Elektronendonator verwenden¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

1.10 Mitochondrien

Die Mitochondrien werden auch als "Kraftwerke der Zelle" bezeichnet, da sie über die oxidative Phosphorylierung am Ende der Atmungskette ATP produzieren. Neben den NADPH-Oxidasen stellt die Atmungskette der Mitochondrien in den meisten Säugetierzellen eine der bedeutendsten Quellen der ROS Produktion dar¹⁹²⁻¹⁹⁴. Diese, in den Mitochondrien produzierten ROS, spielen eine wichtige Rolle in vielen Krankheiten, Zelldifferenzierung und Redox-Signalwegen^{193, 195}. Mitochondrien besitzen zwei Membransysteme, eine äußere Membran und eine ausgedehnte, stark gefaltete innere Membran. Die äußere Membran ist entgegen der inneren Membran für die meisten kleinen Moleküle und Ionen aufgrund des Mitochondrienporins vollständig permeabel. Die beiden Membranen bilden zwei Kompartimente: Einen Intermembranraum zwischen der äußeren und der inneren Membran und die Matrix, welche von der inneren Membran begrenzt wird. Die oxidative Phosphorylierung findet in der inneren Membran statt. Die Atmungskette besteht aus vier Komplexen: Drei Protonenpumpen und einer direkten Verbindung zum Zitratzyklus. In der Atmungskette werden Elektronen von NADH auf die NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I), weiter auf die Succinat-Q-Reduktase (Komplex II), die Q-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (Komplex III) und letztendlich auf die Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV) übertragen¹⁹⁶.

Bei der ROS Produktion in der mitochondrialen Atmungskette handelt es sich um Superoxidradikale, die an den Komplexen I, II und III gebildet werden können und somit

⁷ Das phagozytäre Enzym befindet sich nur in der Zellmembran und ist ohne Stimulation inaktiv.

als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung auftreten¹⁹⁷⁻²⁰⁰. Komplex I ist der Eintrittspunkt für die Elektronen von NADH in die Atmungskette^{201, 202}. Von NADH werden zwei Elektronen auf das Flavinmononucleotid (FMN) übertragen. Die Elektronen werden dann auf eine Reihe von sieben Eisen-Schwefel-Clustern transferiert. Durch den Fluss von zwei Elektronen durch den Komplex I werden vier Protonen aus der Matrix in das Zytosol gepumpt, der Mechanismus ist allerdings nicht genau bekannt²⁰¹⁻²⁰³. Die ROS-Produktion des isolierten Komplex I findet unter Anwesenheit von NADH in Form von $O_2^{\bullet-}$ statt²⁰⁴. Der isolierte Komplex I produziert $O_2^{\bullet-}$ durch die Reaktion von O_2 mit dem vollständig reduzierten FMN, dessen Anteil wahrscheinlich durch die $NADH/NAD^+$ - Ratio bestimmt wird^{205, 206}. Die Inhibierung der Atmungskette in intakten Mitochondrien durch Beschädigung, Mutation, Ischämie, Verlust von Cytochrom *c* oder die Anhäufung von NADH aufgrund eines niedrigen ATP-Verbrauchs und einer damit einhergehenden niedrigen Atmungsrate, führt zum Anstieg der $NADH/NAD^+$ - Ratio und zur $O_2^{\bullet-}$ - Bildung. Unter normalen Umständen ist die ROS-Produktion durch Komplex I allerdings nur gering²⁰⁶⁻²¹¹. Ein zweiter Mechanismus, durch den Komplex I große Mengen von $O_2^{\bullet-}$ produzieren kann, findet während des *reverse electron transport* (RET) statt^{207, 210, 212, 213}. RET findet statt, wenn der Coenzym Q (CoQ)-Pool durch die Versorgung mit Elektronen reduziert wird. Dabei fließen Elektronen vom $CoQH_2$ zurück in den Komplex I und können so, an der Position des FMN, NAD^+ zu NADH reduzieren. Obwohl die Stelle der $O_2^{\bullet-}$ - Produktion während RET nicht bekannt ist, scheint die Menge des produzierten $O_2^{\bullet-}$ die höchste zu sein, die in Mitochondrien auftritt²¹⁴⁻²¹⁷.

Der Succinat-Q-Reduktase-Komplex (Komplex II) ist ein integrales Membranprotein der inneren Mitochondrienmembran. Es stellt den Eintrittspunkt für das $FADH_2$ dar, welches bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat durch die Succinat-Dehydrogenase (eine Komponente des Komplexes II) im Zitratzyklus entsteht. Die Elektronen des $FADH_2$ werden auf das Coenzym Q übertragen²¹⁸. Die Komplexe I und II sind die hauptsächlichen Quellen für die mitochondriale ROS-Produktion unter physiologischen Bedingungen. Sie produzieren $O_2^{\bullet-}$ vorwiegend auf der Matrixseite, wo es durch die Sod2 schnell zu H_2O_2 dismutiert wird^{199, 219}. Komplex III ist die zweite Protonenpumpe in der Atmungskette. Diese katalysiert die Elektronenübertragung von $CoQH_2$ (Coenzym Q wird auch als Q oder Ubichinon bezeichnet) auf das oxidierte Cytochrom *c* (Cyt *c*) und transportiert so zwei Protonen aus der Matrix in das Cytosol²¹⁸. Der Komplex besteht aus 11 Polypeptidketten, drei Hämgruppen, einem Eisen-Schwefel-Protein (Rieske-Zentrum) und zwei getrennten Bindungsstellen für die Ubichinone Q_o und Q_i ^{218, 220}. Schon lange wird der Komplex III als

potentielle $O_2^{\bullet-}$ -Quelle innerhalb der Mitochondrien angesehen^{204, 221}. Wenn der Komplex III mit $CoQH_2$ versorgt und die Q_i -Stelle durch Antimycin inhibiert wird, so produziert dieser große Mengen von Superoxidradikalen ($O_2^{\bullet-}$) durch die Reaktion von O_2 mit Ubisemichinon (QH) an der Q_o -Stelle^{204, 210, 221-224}. Die Superoxidradikale werden vom Komplex III auf beide Seiten der inneren Membran abgegeben^{207, 225-227}. Allerdings ist diese ROS-Produktion in Abwesenheit von Antimycin nur sehr gering. Die maximale $O_2^{\bullet-}$ -Produktion des nicht-inhibierten Komplex III ist im Vergleich zur der des Komplex I während RET unbedeutend²²⁸.

1.11 NADPH-Oxidasen und PH

Viele Studien deuten daraufhin, dass die ROS-Produktion durch NADPH-Oxidase eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von PH spielt. So ist z.B. bekannt, dass speziell Nox2 und Nox4 an der pulmonalvaskulären Antwort auf chronische Hypoxie involviert sind²²⁹⁻²³². Zudem konnten Dennis *et al.* zeigen, dass die ROS-Produktion durch Nox1 zu Hypoxie-induzierter PH in neugeborenen Ferkel beiträgt²³³. Auch bei der Rechtsherzhypertrophie, einer Konsequenz der pulmonalen Hypertonie, konnte eine erhöhte Expression von Nox1, Nox2 und Nox4 nachgewiesen werden²³⁴.

Neben pulmonaler Hypertonie, übernehmen Nox-Isoformen auch bei anderen pulmonalen Erkrankungen eine pathophysiologische Rolle, wie akuter Lungenschaden²³⁵, COPD²³⁶, Ischämie-Reperfusionsschaden²³⁷, Schlafapnoe²³⁸, Lungenkrebs²³⁹, pulmonale Fibrose²⁴⁰, Mukoviszidose²⁴¹, Asthma²⁴² und Emphysem²³⁶.

1.12 Mitochondrien und PH

Die Mitochondrien sind wichtige Sauerstoffsensoren in den PASMC, welche z.B. unter Hypoxie die mitochondriale ROS-Produktion verändern. Dies führt wiederum zur Inhibierung Redox-sensitiver Kaliumkanäle in der Plasmamembran, was eine Depolarisierung, das Öffnen spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, den Einfluss von Ca^{2+} und folglich eine Kontraktion verursacht²⁴³. Ob es anfänglich zu einem Anstieg oder Abfall der ROS-Produktion kommt, wird in der Fachliteratur diskutiert. Dennoch, als eine der bedeutendsten ROS-Quellen können Mitochondrien, in welcher Form auch immer, den

Redox-Status einer Zelle regulieren. Die Superoxidradikale, welche in der Atmungskette produziert werden, können durch die Sod2 zu H_2O_2 umgewandelt werden. H_2O_2 hat einen größeren Diffusionsradius und kann daher auch entfernte, nicht-mitochondriale Ziele erreichen, wie z.B. Redox-sensitive Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) in der Plasmamembran²⁴⁴. Diese Kv-Kanäle regulieren das Membranpotential der PASMC, was wiederum einen Einfluss auf die Öffnung spannungsabhängiger- Ca^{2+} -Kanäle hat (der maßgebliche Eintrittspunkt von Ca^{2+} -Ionen für PASMC). Ein erhöhter Ca^{2+} -Influx trägt zu einer erhöhten Proliferationsbereitschaft und Kontraktion der PASMC bei²⁴⁵, was zu vaskulärem *Remodeling* und damit zu pulmonalarterieller Hypertonie führen kann. Aufgrund der Nähe der Mitochondrien zum endoplasmatischen Retikulum (ER) können die Mitochondrien das intrazelluläre Ca^{2+} auch direkt, durch die Aufnahme von Ca^{2+} welches vom ER freigesetzt wurde, regulieren²⁴⁶. Da die Mitochondrien Redox- und Ca^{2+} -abhängige Signalwege regulieren können, beeinflussen sie eine Vielzahl zellulärer Funktionen und Transkriptionsfaktoren, die zur Entstehung und Manifestierung von PH beitragen können. Dazu gehören z.B. HIF^{247, 248} und NFAT^{249, 250}.

Im Falle von PH sind die Mitochondrien der PASMC hyperpolarisiert. Dies scheint eine gemeinsame Eigenschaft aller PH-Typen zu sein, unabhängig von der Ursache für die Erkrankung. Dies gilt unter anderem für Hypoxie- und Monocrotalin-induzierte PH²⁵¹, für *fawn-hooded rats* (FHR)-PH²⁵² und humane PH²⁵³. Zudem weisen die PASMC in all diesen Modellen molekulare Besonderheiten auf, wie eine supprimierte Expression von Kv-Kanälen, erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} und die Aktivierung von HIF und NFAT^{252, 253}. Weiter konnte gezeigt werden, dass es zu einer Aktivierung der mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase-Kinase (Inhibierung der Pyruvatdehydrogenase)²⁵⁴, sowie einer Fragmentierung und/oder Hyperpolarisierung des mitochondrialen Retikulums kommt²⁵². Diese Veränderungen in der Zellphysiologie von PASMC könnten durch eine veränderte mitochondriale Funktion erklärt werden und fördern eine verringerte Apoptose und einer erhöhte Proliferation von PH-PASMC.

1.13 Zielsetzung dieser Arbeit

Man nimmt an, dass ROS beim pulmonalvaskulären *Remodeling*, welches während chronischer alveolärer Hypoxie auftritt, eine wichtige Rolle einnehmen^{14, 255}. Zudem konnten unter Hypoxie, neben einer Hypoxie-abhängigem Regulation nicht-phagozytärer

Nox-Isoformen, eine erhöhte pulmonalvaskuläre ROS-Produktion nachgewiesen werden^{119, 231, 256}. All diese Experimente wurden im Modell der Hypoxie-induzierten PH durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob die im Hypoxie-Modell erlangten Erkenntnisse auch im Modell der MCT-induzierten PH zutreffen, da die auftretenden pathologischen Veränderungen, im Gegensatz zum Modell der chronischen Hypoxie, mit vielen Läsionen die bei IPAH und anderen schweren PH-Formen des Menschen auftreten, vergleichbar sind.

Dabei standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Findet sich im Monocrotalin-Modell der PH eine verstärkte oder verringerte ROS-Produktion in PASMC?
2. Kommt es zur Veränderung des antioxidativen Potentials bzw. zu einer antioxidativen Antwort?
3. Was ist die Quelle einer etwaigen erhöhten ROS-Produktion?
4. Welche Signalwege werden beeinflusst?
5. Welche zellulären Funktionen werden beeinflusst, die bei der Pathophysiologie des vaskulären *Remodeling* eine Rolle spielen.

Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) von *Rattus norvegicus* untersucht, da diese Zellen unter Hypoxie hauptsächlich für den Prozess des Gefäßumbaus und die *de novo*-Muskularisierung verantwortlich sind^{23, 40-42}. Der Fokus dieser Arbeit lag dabei auf der Rolle der NADPH-Oxidasen, da die Hypoxie-abhängige Regulation nicht-phagozytärer Nox-Isoformen im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH bereits nachgewiesen werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Analog-Digital-Wandler	Advantech, Feldkirchen
CASY® Cell Counter + Analyser Model TT	Innovatis AG, Bielefeld
ChemiGenius Bio Imaging System	VWR, Bruchsal
Combi-Spin Zentrifuge	Kisker-Biotech, Steinfurt
DMR Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Druckaufnehmer	Hottinger Baldwin Messtechnik, Fuchstal
Einbettungsmaschine	Leica Microsystems, Nussloch
Elektrophorese-Kammer	Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Entwässerungsmaschine	Leica Microsystems, Nussloch
ESR-Spektrometer EMXmicro	Bruker BioSpin, Karlsruhe
Filmentwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Färbekammer	Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Gradienten PCR-iCycler	Bio-Rad, München
Heizblock	VWR, Bruchsal
Heizplatte Hi 1220	Leica Microsystems, Wetzlar
Homogenisator Precellys 24	Peqlab, Erlangen
Hotplate/Stirrer (371)	VWR, Bruchsal
Kryostat	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica LMD6000 Mikrodisektion	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DMLA	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetischer Konzentrierer	Invitrogen, Karlsruhe
Mikroplattenlesegerät ELx808	Bio-Tek, Bad Friedrichhall
Mikrotom RM 2165	Leica Microsystems, Nussloch
Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Western blotting Equipment)	Bio-Rad, München
Mx3000Pro (q-PCR)	Stratagene, Heidelberg
NanoDrop (ND-1000)	Kisker-Biotech, Steinfurt
Neubauer-Zählkammer Homburg	LO – Laboroptik GmbH, Bad

O ₂ -Controller	Labotect, Göttingen
Ofen	Heraeus, Gießen
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore, Schwalbach
Schüttelgerät Eb Swip KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Spannungsgerät für Elektrophorese	Bio-Rad, Göttingen
Sterilbank HERA Safe	Thermo Scientific, Dreieich
Tierwaage	August Sauter GmbH, Albstadt- Ebingen
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Transducer	B. Braun Melsungen AG,
Melsungen	
TPersonal Thermocycler (PCR-Cycler)	Biometra, Göttingen
Scintillationszähler (-counter)	Canberra Packard, Central Europe
GmbH	
Semi-Dry-Blotkammer	Keutz Labortechnik, Reiskirchen
VERSA _{max} <i>lunable microplate reader</i>	Molecular Devices, Ismaning
Vortexer MS1 <i>Minishaker</i>	IKA GmbH, Staufen
Waage für Substanzen (Mettler Toledo PL 303)	Mettler Toledo, Schweiz
Wetblotting-System	Bio-Rad, München
Zellinkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen

2.2 Verbrauchsmaterialien/-chemikalien

0,9 %ige NaCl-Lösung	B. Braun, Melsungen
2-Propanol	Merck, Darmstadt
4x NuPage LDS-Ladepuffer	Invitrogen, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- -ethansulfonsäure (HEPES)	Invitrogen, Karlsruhe
ABgene® PCR-Platten	Thermo Scientific, Hamburg
ABsoluteQ PCR <i>seal</i>	Thermo Scientific, Hamburg
Aceton	Sigma-Aldrich, München

Agarose	Fermentas, St. Leon-Rot
Agarose Type VII (niedrig schmelzend)	Sigma-Aldrich, München
AGFA Cronex 5 Medical X-Ray Film	AGFA, Mortsel, Belgien
Amersham ECL Plus Detection System	GE Healthcare, München
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Ammoniumsulfat (APS)	Promega, Mannheim
Ampuwa [®] (Ampullenwasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Baytril [®] 2,5%	Bayer Vital, Leverkusen
Beatmungsgas (50 % O ₂ , 50 % N ₂)	Air Liquid, Siegen
Blocking Reagent	Roche, Basel, Schweiz
Blotting-Papier Whatman	Schleicher & Schuell, Dassel
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
<i>Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module</i>	Thermo Scientific, Hamburg
CMH	Noxygen, Elzach
Collagenase Type IV	Sigma-Aldrich, München
Complete [™] Protease Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
CPH	Noxygen, Elzach
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako, Hamburg
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen
Deferoxaminmesylat-Salz	Sigma-Aldrich, München
Denhardts Reagenz	Eigenproduktion
Dextransulfat	Sigma Aldrich, München
Diethylpyocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, München
Dihydroethidium (DHE)	Sigma Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, München
Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
Eisenkügelchen (Eisen-II, III-Oxid, 98 % Fe ₃ O ₄)	Sigma-Aldrich, München
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin	Waldeck GmbH & Co. KG,
Münster ESR-Krebs HEPES-Puffer	Noxygen, Elzach
Ethanol 70 %, 96 % und 100 %	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
Ethanol (reinst) für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, München

Chirurgiefaden	Ethicon, Norderstedt
Falcon-Tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filterpapier	Bio-Rad, München
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hefe tRNA	Roche, Basel, Schweiz
Hämalaun	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
Heparin Liquemin N 25000 [®]	Roche, Basel, Schweiz
Isofluran	Baxter, Unterschleissheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml Ketamin [®]	Pharmacia, Erlangen
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, München
Laemmli Proben-Puffer (2x)	Sigma-Aldrich, München
Lidocainhydrochlorid 2 % Xylocain [®]	Astra Zeneca, Wedel
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, München
Medetomidinhydrochlorid (1mg/ml) Domitor [®]	Janssen, Bad Homburg
Membran-Slides	Microdissect, Herborn
Methanol	Sigma-Aldrich, München
Methylgrün	Vector, Burlingame, CA, USA
Methylzellulose	Sigma-Aldrich, München
Monocrotalin	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid (Na ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, München
Natriumdiethyldithiocarbamattrihydrat	Sigma-Aldrich, München
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Promega, Mannheim
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumvanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, München

Nylon-Membran, Amersham Hybond™-N ⁺	GE Healthcare, München
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	Nerbe plus GmbH, Wiesen/Luhe
PeqGOLD Proteinase K	Peqlab, Erlangen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Phorbolmyristatacetat	Sigma-Aldrich, München
Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	R&D, Minneapolis, MN, USA
Polyethylenglycol-Superoxiddismutase	Sigma-Aldrich, München
Povidoniod (Braunoderm®)	B. Braun, Melsungen
PVDF-Membran Immobilon™-P	Millipore, Bedford, USA
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe
Salmon sperm	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Superoxiddismutase (Sod)	Sigma-Aldrich, München
Staurosporin	Sigma-Aldrich, München
Sterilfilterspitzen	Nerbe plus GmbH, Wiesen/Luhe
SYBR® Safe	Invitrogen, Karlsruhe
Szinti-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Tergitol® (NP-40)	Sigma-Aldrich, München
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
[³ H] Thymidin	Amersham, München
TissueTek®	Sakura Finetek, Staufen
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, München
Tri-Natriumacetat	Merck, Darmstadt
TRIS Base	Sigma-Aldrich, München
TRIS-HCl	Sigma-Aldrich, München
Triton®-X 100	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Invitrogen, Camarillo, CA, USA
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Merck, Darmstadt
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

2.3 Zellkultur

8-Well <i>Chamber Slides</i>	BD Falcon, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
L-Glutamin (200mM, 100x)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Lipofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
Medium 199 (M199)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM [®] Medium	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Serologische Pipetten 5, 10, 25, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>	PromoCell, Heidelberg
Sterilfilter, Porengröße 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Trypsin/EDTA (1x)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Zellkulturflaschen, -schalen, -platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen
X-tremeGENE	Roche, Mannheim

2.4 Größenstandards

<i>Precision plus Protein™ Dual Color Standard</i>	Bio-Rad, München
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

2.5 Kits und Assays

AP-fast red Kit	Zytochem, Berlin
CaspACE Assay System	Promega, Mannheim
DAB-Peroxidase Substrate Kit	Vector, Burlingame, CA, USA
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad, München
iTaq Sybr Green Supermix plus ROX	Bio-Rad, München
Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix UDG	Invitrogen, Karlsruhe

QIAquick [®] PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
PeqGOLD Total RNA Kit	Peqlab, Erlangen
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
WT-Ovation [™] Pico RNA Amplifikations-System	Nugene, Bemmell, Niederlande

2.6 Antikörper

Anti-DIG-POD-Fab Fragments	Roche, Mannheim
Akt	Cell Signaling, Boston, USA
phospho-Akt	Serin 473; Cell Signaling, Boston, USA
Cofilin	Cell Signaling, Boston, USA
phospho-Cofilin	Serin 3; Cell Signaling, Boston, USA
Cyclin D1	Cell Signaling, Boston, USA
FITC-markiertes <i>smooth muscle actin</i>	Sigma-Aldrich, München
Katalase	Abcam, Cambridge, UK
Nox1	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Nrf2	Abcam, Cambridge, UK
PAK1 (Serin199/204)/PAK2 (Serin192/197);	Cell Signaling, Boston, USA
Sod1 and Sod2	Abcam, Cambridge, UK
Von-Willebrand-Faktor (vWF)	Dako, Hamburg
-Aktin	Biozol, Eching
- <i>smooth muscle actin</i>	Maus: Sigma Aldrich, München Hase: NeoMarkers, Fremont, USA
Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Pierce, Rockford, USA
Alexa Fluor [®] 555	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 555 Tyramid	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Software

Q-Win	Leica, Wetzlar
GeneTools	Syngene, Cambridge, UK
GeneSnap	Syngene, Cambridge, UK
GraphPad Prism	GraphPad, La Jolla, CA, USA
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies, Waldbronn
Magnettech MS200	Magnettech, Berlin

2.8 Versuchstier und Forschungsobjekte

2.8.1 Die Wanderratte, *Rattus norvegicus*

In der vorliegenden Arbeit wurden adulte Männchen der Wanderratte (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769) verwendet. Es handelte sich um männliche Ratten des Auszuchtstammes Sprague-Dawley (Handelsbezeichnung CD/SD-Ratte, Charles River Laboratories, Sulzfeld) mit einem Gewicht von ca. 300-350 g. Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Die Wanderratte ist ein zu den Altweltmäusen zählendes Nagetier (*Rodentia*) aus der Familie der Langschwanzmäuse und ist der Vorfahre aller Farbratten. Sie stammt ursprünglich aus Zentralasien und Nordchina und hat sich, wie die Hausratte, als Kulturfolger des Menschen in alle Welt ausgebreitet.

Hier eine genaue Darstellung der Systematik nach Berkenhout, 1769 :

Stamm:	Chordata
Unterstamm:	Vertebrata
Klasse:	Mammalia
Ordnung:	Rodentia
Unterordnung:	Myomorpha (Mäuseverwandte)
Überfamilie:	Muroidea (Mäuseartige)
Familie:	Muridae (Langschwanzmäuse)
Unterfamilie:	Murinae (Altweltmäuse)
Gattung:	<i>Rattus</i> (Ratten)
Art:	<i>Rattus norvegicus</i> (Wanderratte)

Ratten werden vor allem in der biomedizinischen Grundlagenforschung genutzt. Hierzu sind eine Reihe von Inzucht-Linien gezüchtet worden (wie z.B. der Sprague-Dawley (SD/CD)-Auszuchtstamm). Diese sind teilweise durch eine besondere Anfälligkeit für bestimmte Erkrankungen gekennzeichnet und werden dann als Tiermodelle für diese Erkrankungen verwendet. Hierzu zählen beispielsweise die BB-Ratte (*bio breeding*) für den Typ-1-Diabetes oder die SHR (*spontaneous hypertension Rat*) für den essentiellen Bluthochdruck.

2.8.2 Haltung der Tiere

Die Tiere wurden in Tierhaltungsräumen mit maximal fünf Tieren pro Käfig unter Standard-Haltungsbedingungen gehalten. Wasser und Futter wurden *ad libitum* verabreicht.

2.8.3 Monocrotalin (MCT)-Behandlung

Den Ratten wurde Monocrotalin subkutan verabreicht, um in dem pulmonalarteriellen Gefäßbett der Lunge eine Endothelschädigung hervorzurufen. 250 mg kristallines Monocrotalin (MCT; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wurden auf der Analysenwaage abgewogen, in 1N Salzsäure (HCl; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gelöst und mit 1N Natronlauge (NaOH; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) auf pH 7,4 eingestellt. Die Ratten wurden gewogen und mit Isofluran bis zur Immobilisation betäubt und 60 mg/kg KG (Körpergewicht) MCT wurden einmalig subkutan in die Nackenfalte injiziert. Als Kontrollen dienten Tiere, denen die entsprechende Menge isotone 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung (NaCl; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) ebenfalls subkutan in die Nackenfalte verabreicht wurde. Über die nächsten 14 Tage wurde kontinuierlich das Breitbandantibiotikum Baytril 2,5% (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) oral verabreicht, um frühe inflammatorische und pneumonische Lungenveränderungen sowie eventuelle Begleitinfektionen in den mit MCT behandelten Ratten zu vermeiden. Fünf Wochen nach MCT-Injektion folgte die Analyse. Im folgenden Text werden Tiere, die mit MCT behandelt wurden, als MCT-Tiere bezeichnet werden. Gesunde, mit NaCl behandelte Tiere, werden als Kontroll-Tiere

bezeichnet. Alle Studien wurden entsprechend den Richtlinien der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt und waren von Regierungspräsidium genehmigt.

2.8.4 Humanes Lungengewebe

Proben von humanen Lungen stammten von 8 Donoren (durchschnittliches Alter, 48 ± 17 Jahre; 4 Frauen, 4 Männer) und 8 IPAH Patienten (durchschnittliches Alter, 34 ± 13 Jahre; 5 Frauen, 3 Männer) nach Lungentransplantation. Die Proben wurden entweder in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren oder binnen 30 min nach der Lungenentnahme in 4 %iges (w/v) Paraformaldehyd gelegt. Das Protokoll wurde von der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität genehmigt (AZ 31/93 und 10/06).

2.9 Hämodynamik

Für die Erhebung hämodynamischer Parameter wurden die Ratten durch eine *intraperitoneale* (i.p.) Injektion mit Ketamin und Medetomidin (10:1 v/v) anästhesiert. Die Applikation von 1000 I.E. Heparin (Roche, Basel, Schweiz) zur Antikoagulation fand intravenös über die *Vena jugularis* statt. Die Ratten wurden einer Tracheotomie unterzogen und mit einer Frequenz von 60 Atemzügen pro Minute beatmet. Der positive, endexpiratorische Druck wurde auf 1 cmH₂O gesetzt. Der arterielle Druck wurde an der linken *Arteria carotis* gemessen. Ein Rechtsherzkatheter wurde über die *Vena jugularis*, zur Messung des rechtsventrikulären Drucks durch einen flüssigkeitsgefüllten Messfühler eingeführt (Nullpunkt-Eichung auf Hilushöhe). Diese Methode wurde bereits beschrieben²⁵⁷. Die Tierversuche wurden bis zur Tötung der Tiere durch Ausbluten von Frau Christina Vroom (technische Assistentin) durchgeführt

Anschließend wurden die Lungen über die *Arteria pulmonalis* mit isotonischer Salzlösung gespült (30 cmH₂O). Der rechte Lungenflügel wurde für molekulare Studien bzw. die Isolation der PASMC verwendet. Der linke Lungenflügel wurde abgebunden und nach der PASMC-Isolation (später im Text) für histologische Untersuchungen über die *Arteria pulmonalis* für 5 min mit 3,5% Formalin durchspült (30 cmH₂O). Dann wurde das Gewebe in 3,5% Formalin für 12 Std. bei 4°C fixiert und zum Schluss in Phosphat-Puffer überführt.

2.9.1 Messung der Rechtsherzhypertrophie

Bei allen Tieren wurde die Herzratio als Maß der Rechtsherzhypertrophie gemessen. Die Herzen wurden von Perikard und Fettgewebe befreit und auf einem Objektträger bei 37°C über Nacht getrocknet. Die Herzratio errechnete sich aus dem Gewichts-Verhältnis vom rechten zum linken Ventrikel.

Die hierfür verwendete Formel lautete wie folgt:

$$\text{Herzratio} = \frac{\text{Gewicht rechter Ventrikel}}{\text{Gewicht linker Ventrikel} + \text{Septum}} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Die Isolierung der PASMCM fand vor der Entnahme des Herzens statt, da das Herz für die Isolation benötigt wurde.

2.10 Zellkultur

2.10.1 Isolierung der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCM) aus Ratten

Zellisolation und –kultivierung erfolgten wie bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben²⁵⁸⁻²⁶⁰. Die Isolation der PASMCM fand im Anschluss an die hämodynamischen Untersuchungen aus dem rechten Lungenflügel statt, nachdem die linke Lunge abgebunden worden war. Im Detail :

Nach Tötung des Tieres wurde die Bauchdecke durch einen Schnitt parallel zu den unteren Rippenbögen eröffnet. Durch stumpfes Abpräparieren des Diaphragmas wurde die Lunge zum kollabieren gebracht und der Thorax konnte eröffnet werden. Die vollständige Öffnung des Thorax erfolgte durch einen medianen Schnitt entlang des gesamten Sternums. Nach Entfernung des Thymus und

Eröffnung des Perikards (Hertzbeutel) 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,

Melungen) luftblasenfrei mit einer Spritze (Becton Dickinson, Heidelberg) verbunden war. Der linke Lungenflügel wurde abgebunden und nach Eröffnen des linken Ventrikels wurde die pulmonal vaskuläre Strombahn, wie bereits erwähnt, über die Pulmonalarterie langsam mit isotonischer Kochsalzlösung gespült. 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 (Typ VII, Sigma-Aldrich, Steinheim) mit niedrigem Schmelzpunkt und 0,5% Eisenpartikel (Eisen-II, III-oxid, 98% Fe₃O₄, Sigma-Aldrich, Steinheim) enthielt und zuvor zum Lösen der Agarose für 20 Minuten bei ca. 75°C im Wasserbad erwärmt worden war. Die Eisenpartikel sammelten sich aufgrund ihrer definierten Größe besonders in den mikrovaskulären präkapillären Gefäßen der Lunge⁸, da diese nicht durch die Kapillaren passten. Diese Partikel dienten dazu, Gewebestückchen mit den anhaftenden Gefäßstückchen zu präparieren. Die überwiegend präkapilläre Lokalisation wurde histologisch gesichert (Fuchs, B., persönliche Mitteilung). Eine visuelle Kontrolle bestand dabei darin, dass die Eisenpartikel sichtbar in der Lunge akkumulierten und diese grau färbten. Letzteres ist beispielhaft in Abb. 2.1 dargestellt.

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 (60 ml/kg Körpergewicht) + 1% P/S + 1% Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt langsam befüllt und die Lunge so gebläht. Zur 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.

⁸ Nur in den präkapillären (mikrovaskulären) Gefäßabschnitten der *Arteria pulmonalis* findet das Gefäßremodeling statt.

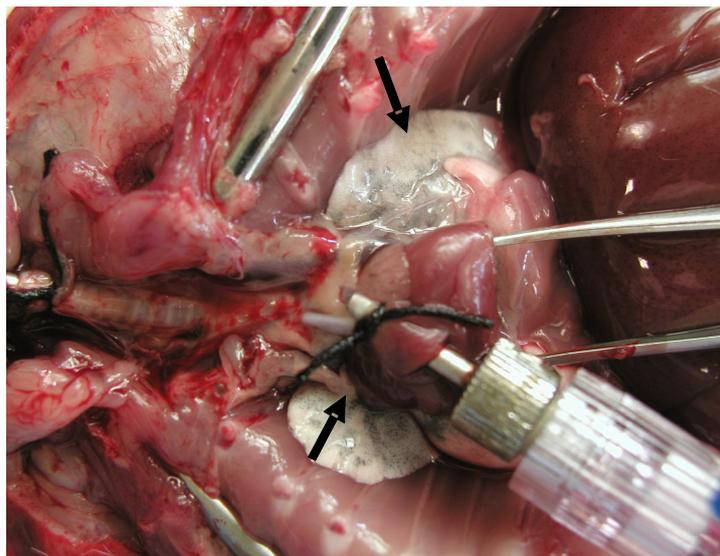


Abb. 2.1: Lunge von *Rattus norvegicus* mit Eisenpartikeln (Pfeile) in den pulmonalarteriellen Gefäßen für die Isolierung von PASMC aus der Ratte.

Die Eisenpartikel wurden mit Hilfe des abgebildeten Katheters über die Pulmonalarterie (*Arteria pulmonalis*) instilliert. Aufgrund ihrer definierten Größe setzten sich die Eisenpartikel hauptsächlich in den präkapillären (mikrovaskulären) Gefäßabschnitten fest.

Von den Herzen wurde die Herzratio bestimmt. 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 (Dyna A.S, Oslo, Norwegen) fixiert, wodurch eine Ansammlung der Eisenpartikel enthaltenden magnetischen, Gewebestückchen an den Rand des Plastikröhrchens erfolgte. So wurde ein Absaugen des Überstandes mit Gewebestückchen, die keine Eisenpartikel enthielten, ermöglicht. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt.

Daraufhin wurden die Eisenpartikel zum Ablösen des Bindegewebes und der Fibroblasten mit 80 U/ml Kollagenase Typ IV (Sigma-Aldrich, Steinheim) bei (Flow Laboratories, Meckenheim) bei 37°C und 5% Kohlendioxid über einen Zeitraum von 55 min inkubiert. Dadurch konnten die Partikel vereinzelt werden. Die Kollagenase war zuvor in Medium 199 und 1% P/S gelöst worden. 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 Medium 199 + 1% P/S + 10% FCS (Fetales Kälberserum, PAA Laboratories, Cölbe) überführt und nach dem gleichen Prinzip, wie bereits oben beschrieben, dreimal mit Medium 199 + 1% P/S + 10% FCS (Kulturmedium) gewaschen. Die isolierten Gefäßstücke wurden dann, zur Kultivierung oder zur direkten

Verwendung der Passage 0, mit Kulturmedium auf Zellkulturflaschen (Greiner *Bio-One*, Frickenhausen) ausgesät ²⁶¹.

2.10.2 Kultivierung der PASMCM

Zum Kultivieren der präkapillären PASMCM der Ratte wurde Medium 199 mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Bereits drei Tage nach Aussaat der isolierten Zellen konnte ein Auswachsen von PASMCM aus den Gefäßstückchen beobachtet werden. Dies wurde durch mikroskopische Beobachtung sichergestellt (Mikroskop IMT-2, Olympus, Hamburg). Abbildung 2.2 zeigt eine typische Aufnahme kurz nach der ersten Aussaat. Im Falle der Verwendung von PASMCM höherer Passagen als Passage 0 wurden die isolierten Gefäßstückchen in Zellkulturflaschen (T25 oder T75) kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Zellkulturmedium durch frisches ersetzt, um eine ausreichenden Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten.

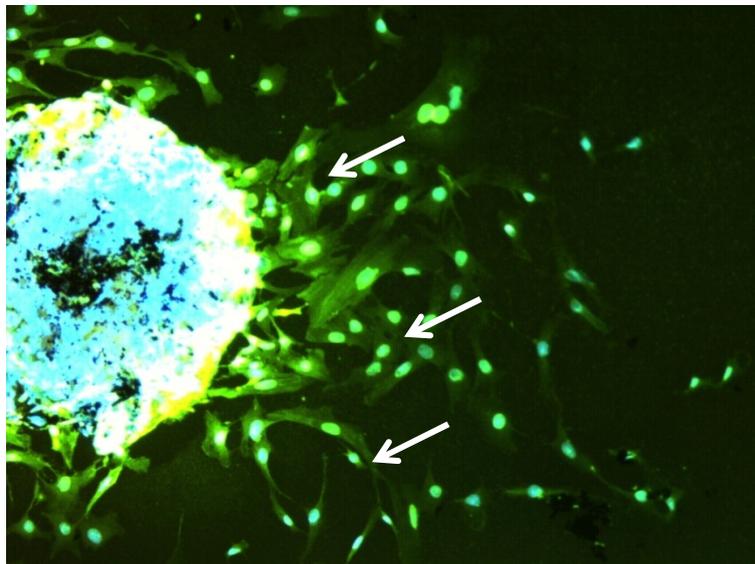


Abb. 2.2: Fluoreszenzmikroskopische Abbildung von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen auf einer Zellkulturplatte kurz nach der Aussaat.

Bereits zwei Stunden nach der Aussaat begannen die Zellen in den Zellkulturflaschen adhären zu werden, was durch eine deutliche Abflachung und Streckung der in Lösung runden Zellen zu erkennen war. Exemplarisch sind PASMCM mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Links im Bild ist ein Eisenpartikel als blau-weiß gefärbte Kugel zu erkennen. Vergrößerung: 100x.

Nach 10-14 Tagen bzw. einer Konfluenz von ca. 70% erfolgte die Passagierung (*splitten*) der Zellen mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (PAN Biotech, Aidenbach). Für die Subkultivierung adhärenter Zelllinien ist dies die am weitesten verbreitete Methode. Vor dem Trypsinierungsprozess, dem *splitten*, wurden die verwendeten Lösungen auf 37°C vorgewärmt, was auch die optimale Temperatur für die Trypsin-Wirkung ist. Ehe die Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben werden konnte, wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), die weder Calcium noch Magnesium enthielt, gewaschen, denn geringe Spuren von serumhaltigem Medium führen zu beeinträchtigter Wirkung von Trypsin und verlängerten die Einwirkzeit auf die Zellen. Mit einer Pipette wurden anschließend ca. 7 ml des Trypsin/EDTA-Gemisches in die Zellkulturplatte gegeben. Nach einer 1-2 minütigen Einwirkzeit bei 37°C im Inkubator konnten die abgelösten Zellen in FCS aufgenommen werden. Beim Trypsinierungsprozess war stets darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu lange Kontakt mit der Trypsin-EDTA-Lösung hatten (max. 1-2 Minuten). Längere Einwirkzeiten verminderten die Lebensfähigkeit der Zelle. Mit Hilfe einer Zentrifuge (Mikro 22, Hettich, Tuttlingen) wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 250 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellsediment in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Aussaat erfolgte zur weiteren Kultivierung in neue Zellkulturflaschen. Jeder Trypsinierungsprozess entsprach einem Übergang in die nächste Passage.

Die Zellen, welche aus MCT-Tieren isoliert wurden, sollen im folgenden Text als MCT-PASMC oder MCT-Zellen bezeichnet werden. Analog dazu werden die Zellen der Kontroll-Tiere als Kontroll-PASMC oder Kontroll-Zellen benannt. Mit „MCT-behandelte PASMC“ sind solche Zellen definiert, die aus MCT-behandelten Tieren isoliert wurden. Für alle Experimente wurden Zellen in der Passage 2 benutzt.

2.10.2 Isolierung und Kultivierung der humanen PASMC

Zur Isolation von humanen PASMC wurden 3-5 cm der *Arteria pulmonalis* aus dem Lungengewebe präpariert und in RPMI-Medium (PromoCell, Heidelberg) + 2% P/S überführt. In einer Petrischale reinigte man das Gefäß von äußerem Binde- und Fettgewebe und schnitt es der Länge nach auf. Dabei wurde das Gefäß stets feucht gehalten (RPMI). Danach wurde erst das Endothel und dann die Media mit einem Skalpell abgestreift. Die Media überführte man in eine weitere Petrischale mit RPMI. Das RPMI tauschte man dann

gegen PBS + 2% P/S, die Media wurde zerkleinert und in ein Bluecap-Gefäß gegeben. Die Mediastückchen wurden im Anschluss dreimal mit PBS + 2% P/S gewaschen und in SMC-Medium (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2, PromoCell, Hedelberg) aufgenommen. Letztlich wurden die Zellen auf T25er Zellkulturflaschen ausgesät.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Immunzytochemie

2.11.1.1 Immunfluoreszenz

Für alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen von den Kulturplatten abgelöst, gewaschen und die Gesamtzellzahl mit einem CASY® *Cell Counter Model DT* (Schärfe System GmbH, Reutlingen) bestimmt. Im Folgenden wurden die Zellen auf 8 Well-Permanox-Kammer-Objektträger (*8 well permanox chamber slides*; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) ausgesät. In jede verwendete Kammer wurden ca. 1500 Zellen in 300µl M199 + 10% FCS + 1% P/S ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die Adhärenz und Konfluenz der Zellen mikroskopisch (Mikroskop IMT-2, Olympus, Hamburg) überprüft. Wenn die Zellen adhärent und zu 70% konfluent waren, wurde mit der Färbung begonnen. Zu Beginn der Färbung wurde das Nährmedium von den Zellen entfernt. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1x DPBS + 0,1% BSA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Waschmedium), jeweils 500µl pro Feld, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten mit -20°C kaltem Aceton-Methanol-Gemisch (Sigma-Aldrich, Steinheim; Verhältnis 1:1) fixiert. Danach wurden die Zellen erneut fünfmal mit Waschmedium gewaschen, um das Aceton-Methanol-Gemisch vollständig zu entfernen. Vor der Inkubation mit einem primären bzw. direkt markierten Antikörper wurden unspezifische Bindungsstellen für 60 Minuten mit 3% BSA in DPBS-Puffer geblockt. Die Antikörperinkubation fand in 0,1% BSA bei 4°C über Nacht statt.

Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: -sma (monoklonaler Anti-Aktin, - *Smooth Muscle-Cy3*TM Antikörper, Anti- -Sm-1, 1:2500, Abcam plc, Cambridge, UK), Superoxiddismutase 1 (Sod1; 1:1000; Abcam plc, Cambridge, UK), Superoxiddismutase 2 (Sod2; 1:1000; Abcam plc, Cambridge, UK), Katalase-Peroxisom-Marker (Abcam plc, Cambridge, UK). Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Zellen mit

dem entsprechenden fluorochromkonjugierten sekundären Antikörper für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert (Alexa Fluor® 488 F(ab')₂-Fragment von Ziege anti-Kaninchen IgG (2 mg/ml) und Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Kaninchen IgG; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Im Falle der direkten -sma-Färbung war der zweite Schritt nicht nötig. Abschließend wurden die Zellen nochmals gewaschen und die Zellkerne mit DAPI-Farbstoff angefärbt (DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich, Steinheim). Für eine solche Kernfärbung wurden die Zellen bei Raumtemperatur 10 Minuten lang mit 0,1 µg/ml DAPI-Farbstoff, gelöst in Waschmedium, inkubiert. Hinterher wurden die Zellen ein letztes Mal gewaschen. Jetzt entfernte man die auf den Objektträger aufgeklebten Felder und deckte jedes Feld mit einem Tropfen *DAKO fluorescent mounting medium* (Dako cytomation, Hamburg) ein. Die Objektträger wurden mit Deckgläschen (24 x 50 mm; Menzel-Gläser, Braunschweig) abgedeckt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung der Färbungen fand stets innerhalb von 24 Stunden nach Inkubation des Antikörpers statt. Die Visualisierung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) durchgeführt.

2.11.1.2 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Bei fluorophormarkierten Antikörpern erfolgt die Detektion direkt im Fluoreszenzmikroskop. Die direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung der PASMIC wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Leica, CTR MIC) und eines Personal Computers (Leica Microsystems, Wetzlar) mit der Software Leica QWin (Leica Microsystems, Wetzlar) ausgewertet. Die Digitalisierung der Bilder geschah mittels einer Kamera (Leica DC300FX; Leica Microsystems, Wetzlar) und eines Computers. Die Bilder wurden in das .jpg-Format überführt. Die maximale Anregungswellenlänge für DAPI lag bei 359 nm (Filter AL; 340-380 nm; Leica Microsystems, Wetzlar) und das Maximum des Emissionsspektrums bei 461 nm. Die Zellkerne erschienen durch die DAPI-Färbung als blaues Fluoreszenzsignal. Für jede einzelne Färbung wurden alle Aufnahmen mit denselben Einstellungen (Belichtungszeit und Verstärkung) aufgenommen um einen Vergleich der Bilder zu ermöglichen. Die Einstellungen wurden jedoch für jede Färbung neu optimiert und dann für jedes Bild des jeweiligen Versuchsansatzes beibehalten. Um die Intensität des Fluoreszenzsignals zutreffend bewerten zu können, wurde unter Zuhilfenahme des Programmes Image J (Java-basiertes Bildbearbeitungsprogramm; National Institutes of Health) von jedem aufgenommenen Bild die Anzahl der Kerne und

die integrierte Fluoreszenzdichte des gesamten Bildes bestimmt. So konnte die integrierte Fluoreszenzdichte pro Kern berechnet werden, indem man die Fluoreszenzdichte des gesamten Bildes durch die Anzahl der Kerne teilte. Pro Kammer wurden 6 Bilder von verschiedenen Bereichen der Kammer aufgenommen und deren Werte gemittelt. Ebenso wurde dann der Mittelwert der Ergebnisse aller 8 Kammern pro Objektträger ausgerechnet. Dieser Wert diente als Endergebnis der Färbung für den einzelnen Objektträger.

2.11.1.3 Auswertung der direkten Färbung von -glattmuskulärem Aktin

Die Anregung des Cy3- (Cyanin-Farbstoff-Familie) konjugierten primären Antikörpers erfolgte unter Zuhilfenahme eines Filters der Bandbreite 546 nm (Leica Microsystems, Wetzlar). Das Maximum des Emissionsspektrums lag bei 569 nm und wurde als rot fluoreszierendes Signal detektiert, während die Zellkerne durch die DAPI-Färbung blau erschienen. Nach Aufnahme der beiden Fluoreszenzbilder wurden diese zu einem neuen Bild überlagert, um die Lokalisierung des Kerns zu verdeutlichen. Eine Bewertung der Färbung wurde nicht durchgeführt, da es hier die Identifizierung der Zellen als glatte Muskelzellen im Vordergrund stand und kein Vergleich zwischen Kontroll- und MCT-Zellen stattfand.

2.11.1.4 Auswertung der indirekten Färbung von Superoxiddismutase (Sod) und Katalase

Der Alexa Fluor® 488 konjugierte sekundäre Antikörper (grün fluoreszierend) wurde mit einem Filter der Bandbreite 498 nm, der Alexa Fluor® 555 konjugierte (rot fluoreszierend) mit einem Filter der Bandbreite 546 nm angeregt. Das Emissionsmaximum für Alexa Fluor® 488 lag bei 520 nm, für Alexa Fluor® 555 bei 568 nm. Detektion und Digitalisierung des Fluoreszenzsignals entsprachen dem Vorgehen, wie unter 2.10.1.1 beschrieben. Da hier ein Vergleich zwischen Kontroll- und MCT-Zellen in Bezug auf die Menge von Katalase, Sod1 und Sod2 in diesen Zellen durchgeführt werden sollte, wurde von jedem aufgenommenen Bild die integrierte Fluoreszenzdichte pro Kern bestimmt (2.10.1.1). Der Mittelwert aller 8 Kammern pro Objektträger diente dann als Endergebnis

der Färbung für den einzelnen Objektträger. Des Weiteren wurde aus den Ergebnissen jeder Einzelfärbung ebenfalls der Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte aller Messungen für die integrierte Fluoreszenzdichte / Kern wurden dann zwischen gesunden und MCT-behandelten Zellen verglichen.

2.11.2 Immunhistochemie

Die Beurteilung des pulmonalvaskulären Gefäßumbaus fand durch Elastika-Färbung (elastische Fasern), Endothel-Färbung (von Willebrand-Faktor) und -sma-Färbung (glatte Muskelschicht) statt. Alle immunhistochemischen Versuche wurden mit Lungengewebe von MCT- bzw. Kontroll-Ratten durchgeführt.

2.11.2.1 Elastika-Färbung

Nachdem das Lungengewebe dehydriert und in Paraffin eingebettet war, wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden dann, wie bereits beschrieben^{262, 263}, nach Elastika – Kernechtrot (Elastica Van Gieson) gefärbt, um die mittlere Wanddicke zu bestimmen (Färbung der elastischen Fasern). Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Kernechtrot Aluminiumsulfat. Die mittlere Wanddicke wurde als die Distanz zwischen *lamina elastica interna* und *lamina elastica externa* definiert. 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.

Das Ausmaß der mittleren Wanddicke (% MWT, *medial wall thickness*) wurde mittels Lichtmikroskopie und einem EDV unterstütztem morphometrischem System festgelegt (Qwin; *Wall thickness Macro* Leica, Wetzlar).

2.11.2.2 Muskularisierung und Endothel-Färbung

3µm dicke Schnitte von Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Lungengewebe wurden einer Doppelfärbung mit einem anti- -glattmuskuläres Aktin Antikörper (-sma;

1:900; clone 1A4; Sigma, Saint Louis, Missouri) und einem anti-von Willebrand Faktor Antikörper (vWF; 1:900; Dako, Hamburg), wie bereits beschrieben^{252, 263}, unterzogen. Die Schnitte wurden zuerst für 60min bei 58-60°C erhitzt. Danach wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die endogene Peroxidase Aktivität wurde mittels einer frisch zubereiteten Lösung aus Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Methanol (1:1) geblockt. Auf ähnliche Weise wurde endogenes Biotin und Streptavidin durch eine Biotin/Streptavidin-"Blockerlösung" (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) eliminiert. Die Auffindung des Antigens fand durch Behandlung mit Trypsin (Zymed Laboratories, INC.; San Francisco, CA, USA) für 10 min bei 37°C statt. Für die Färbung der pulmonalvaskulären glatten Muskelschicht und des Endotheliums wurden die Schnitte erst für 30 min mit normalem Pferdeserum (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, die auf Antikörper-Kreuzreaktionen zurückzuführen sind. Anschließend inkubierte man die Schnitte mit dem primären Antikörper (anti- α -sma bei Raumtemperatur; anti-von Willebrand bei 37°C). Beide Antikörper wurden in 10% BSA 1:900 verdünnt und für 30min auf den Schnitten gelassen. Im Anschluss wurden die Schnitte mehrere Male mit PBS (selbst zubereitet) gewaschen und mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) inkubiert. Für die Farbentwicklung durch Reaktion mit dem Meerrettich Peroxidase / Streptavidin-Komplex (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) wurden zwei unterschiedliche Substrate benutzt: VIP Substrat (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) für die lila/violette Färbung der vaskulären glatten Muskulatur und DAB (Linaris Biologische Produkte; Wertheim-Bettingen) für die braune Färbung des vaskulären Endotheliums. Letztendlich wurden die Schnitte mit Methylgrün (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) gegengefärbt, dann schrittweise dehydriert (aufsteigende Alkoholreihe), mit Eindeckmedium eingedeckt und mittels Lichtmikroskopie und einem EDV unterstützten morphometrischen System angeschaut (Qwin; Leica, Wetzlar). Gefäße mit einem Durchmesser von 20-50µm wurden für die Analyse verwendet.

2.11.3 mRNA-Interferenz

PASMC wurden in 6-well Zellkulturplatten (Greiner bio-one, Frickenhausen) kultiviert. Die Zellen wurden konstant bei 37°C und einer feuchten 5% CO₂, 95% O₂ Atmosphäre

aufbewahrt. Bei einer Konfluenz von 60% fand ein Mediumwechsel auf 1% (v/v) FCS, 1% (m/v) Penicillin und Streptomycin (P/S) in M199 (Gibco, Karlsruhe, Germany) statt, um die Zellen über Nacht zu synchronisieren.

Die Transfektion der Nox1 siRNA (*small interference RNA*) wurde vollständig in OPTI-MEM Medium (Gibco, Karlsruhe) durchgeführt. 100 nM von 2'-OMe-Rest stabilisierter Nox1 siRNA (5'-AAGUGGAUCCUCCCGAUU-3'; Biospring, Frankfurt) wurden mit Hilfe von 0.5µl Lipofectamin / cm² als (Invitrogen, Frankfurt) transfiziert. Sowohl die siRNA als auch das Transfektionsreagenz wurden in OPTI-MEM verdünnt. Als Kontrolle diente eine Cy3-markierte, *scrambled* (Scr) siRNA (Invitrogen, Frankfurt). Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Medium erneut auf M199 + 10% (v/v) FCS, 1% (m/v) P/S gewechselt. 96 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen für die verschiedenen Experimente aufbereitet.

2.11.4 Messung der Proliferation

PASMC wurden in 48-*well* Zellkulturplatten (Greiner bio-one, Frickenhausen) kultiviert (5,000 cells pro *well*). Die Zellen wurden konstant bei 37°C und einer feuchten 5% CO₂, 95% O₂ Atmosphäre aufbewahrt. Einen Tag vor dem Experiment wurden die Zellen auf null-Medium gesetzt (1% (v/v) FCS, 1% (m/v) P/S in M199 (Gibco, Karlsruhe) und über Nacht synchronisiert. Daraufhin wurden die Zellen für 20 Std. mit M199 + 5% (v/v) FCS inkubiert, gefolgt 5 Std. 3H-thymidine (Amersham, München). Im Anschluss wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit NaOH (Natronlauge) bei 4°C über Nacht lysiert. Die Radioaktivität im Lysat wurde mit *liquid scintillation counting* (Rotiszint® eco plus, Roth, Germany) in einem *liquid scintillation counter* (Packard Bioscience (jetzt Perkinelmer); Meriden, USA) gemessen.

2.11.5 Messung der Migration

Die Migration der PASMC wurde mittels *Transwell in vitro* Migration untersucht. 5000 Zellen pro *well* wurden in 100µl Medium + 0% (v/v) FCS, 1% (m/v) P/S (Gibco, Karlsruhe, Germany) in die obere Kammer der *Transwells* (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) pipettiert. Die Porengröße der *Transwells* betrug 8µm. Die untere Kammer

enthielt 600µl Medium + 10% (v/v) FCS, 1% (m/v) P/S. Dann ließ man die PASMC bei einer 37°C, 5% CO₂ und 95% O₂ Atmosphäre für 8 Std. wandern. Nach 8 Std. wurden die Filter mit PBS gewaschen und die Zellen mit einem Aceton/Methanol – Gemisch (1:1) auf dem Filter fixiert. Die obere Seite der Filter (auf welche die Zellsuspension pipettiert wurde) reinigte man dann mit einem Wattestäbchen, um die Zellen zu entfernen, die nicht gewandert waren. Schließlich färbte man die Filter 20 min mit Kristallviolett (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München). Nachdem das Kristallviolett in Wasser abgewaschen worden war, wurden die Filter auf Objektträger gelegt und mittels Lichtmikroskopie und einem EDV unterstützten morphometrischen System ausgezählt (Qwin; Leica, Wetzlar).

2.11.6 Messung der Apoptose

Zur Bestimmung der Apoptose, wurde das CaspACE Assay System *Colorimetric* (Promega, Mannheim) verwendet. Die Durchführung des Protokolls entsprach dabei den Instruktionen des Herstellers. 1 µM Staurosporin (für 4 Stunden; Sigma-Aldrich, München) wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

2.11.7 Messung der Sod-Aktivität

Die Aktivität der totalen Superoxiddismutase-Aktivität wurde mit Hilfe des *superoxide dismutase assay* von Cell Technology (Mountain View, CA) gemessen. Das Protokoll basiert auf der Inhibierung der Formazanbildung durch Sod. Die Durchführung des Protokolls entsprach den Instruktionen von Cell Technology.

2.11.8 RNA-Extraktion

Die RNA aus Zellen und Homogenat wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (RNeasy, Qiagen, Germany) extrahiert. Die Extraktion fand entsprechend des Qiagen-Protokolls für eukaryotische Monolayerzellen oder Homogenat statt.

2.11.9 Synthese komplementärer DNA

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA, *complementary DNA*) fand mittels des *Bio-Rad iScriptTM cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, Hercules, CA) statt. Die Durchführung entsprach den Protokollvorgaben des Herstellers.

2.11.10 Primer

Alle verwendeten *Primer* wurden mit der Internet-Freeware „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) konstruiert und von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) bezogen. Die Schmelztemperaturen der *Primer* lag stets zwischen 61 und 63 °C. Alle *Primer* waren *intron-spanning*. Die *Primer* wurden im lyophilisierten Zustand geliefert und entsprechend einer 100µM Ausgangslösung gelöst. Vor der Verwendung wurde die *Primer* weiter 1:10 verdünnt. Folgende *Primer* wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tab. 2. 1: Auflistung der verwendeten Primer-Paare.

HPRT = Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase; Nox = NADPH-Oxidase; Sod = Superoxiddismutase; Gpx = Glutathion-Peroxidase; NoxA/O = NADPH-Oxidase Aktivator/Organisator; Duox = Duale-Oxidase; phox = Phagozytäre-Oxidase; F = Forward (vorwärts); R = Reverse (rückwärts).

Gen	Primersequenzen
HPRT	F: 5`-CTCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3` R: 5`-AGCACACAGAGGGCCACAAT-3`
Nox1	F: 5`-ATGGTCCCTTTGGCACAGTC-3` R: 5`-ATCCCAGCCAGTGAGGAAGA-3`
Nox2	F: 5`-GCAGTGTCCAAGCTGGAGTG-3` R: 5`-CCAATCCCAGCTCCCCTAA-3`
Nox4	F: 5`-CCAGTGGTTTGCAGACTTGC-3` R: 5`-CGAGGACGCCCAATAAAAAG-3`
Duox1	F: 5`-CTGATGAGGGCAGCAGTGAC-3` R: 5`-CCTTGTCGGCCAGAGAAAAC-3`

Duox2	F: 5`-ATGCTCGCAAGAGGGTCATT-3` R: 5`-CTGGAGAGCTGCTGGAACCT-3`
NoxA1	F: 5`-GCCATGGACAAAGTGCAGAA-3` R: 5`-TACACACGGGTGAGGACGAC-3`
NoxO1	F: 5`-CTGGCAACCTCACAGCACAT-3` R: 5`-TCCAGGTAGGGAGCTGGAAA-3`
p67 ^{phox}	F: 5`-ACTGCCTGACCCTCTGGTGT-3` R: 5`-ACTCCCCTTCCAGCCATTCT-3`
p47 ^{phox}	F: 5`-CTGGTGGTTTTGCCAGATGA-3` R: 5`-TGATGTCCCCTTTCCTGACC-3`
Rac1	F: 5`-GTGTGACACAACCTGGCAGCA-3` R: 5`-CTACTGCTGGAGCGCCTCTT-3`
Gpx1	F: 5`-CGTGCAATCAGTTCGGACAT-3` R: 5`-TAAAGAGCGGGTGAGCCTTC-3`
Sod1	F: 5`-GCGTCATTCACTTCGAGCAG-3` R: 5`-CCTGCAGTGGTACAGCCTTG-3`
Sod2	F: 5`-GGCCATATCAATCACAGCA-3` R: 5`-CCAGCCTGAACCTTGGACTC-3`
Katalase	F: 5`-CTGGAGCACCATAGCCAGTG-3` R: 5`-TCAGGTGGTTGGCAATGTTC-3`

2.11.11 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression (Genexpressionsanalyse, *real time polymerase chain reaction*, real time PCR) erfolgte mit dem Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, Waldbronn) und dem iQ *SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers. Die Ansätze hatten ein Endvolumen von 25µl und waren wie folgt zusammengesetzt:

Tab. 2. 2: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion.

F = Forward (vorwärts); R = Reverse (rückwärts); cDNA = complementary (komplementäre) DNA.

Substanz	Volumen (µl)
iQ SYBR Green Supermix	12,5
Primer (F/R)	je 0,5
steriles Wasser	9,5
cDNA (<i>Template</i>)	2

Als Negativ-Kontrolle diente ein *non-template*-Ansatz, der keine cDNA enthielt. Die erhaltenen Ct-Werte (*cycle of threshold*) wurden gegen das endogene Referenzgen HPRT (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase) normalisiert. Der *fold change* (2^{-Ct}) wurde berechnet, wie bereits beschrieben²⁶⁴.

Tab. 2. 3: Temperaturprofil der Real-Time PCR.

Abschnitt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Denaturierung/Enzymaktivierung	95	10 min	-
Denaturierung	95	10 sec	-
Primer-Anlagerung	59	10 sec	40
Elongation	72	10 sec	40
Denaturierung	95	1 min	40

2.11.12 In situ-Hybridisierung

2.11.12.1 Präparation der Lungenschnitte

Zuerst wurden die Lungen mit PBS (*phosphate buffered saline*; PAA Laboratories, Cölbe) und einem Druck 20cm H₂O bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Katheters gespült. Während der Perfusion konnte der Puffer ungehindert in den linken Ventrikel fließen. Sobald die Lunge frei von Blut war, wurde vorgewärmtes TissueTek® (Sakura Finetek,

Zoeterwoude, Niederlande) über eine Trachea-Kanüle in die Atemwege instilliert. Die Trachea wurde daraufhin abgebunden, die Lunge herausgeschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.11.12.2 Sonden

Die Sonden für die *in situ*-Hybridisierung wurden von Exiqon A/S (Vedbaek, Dänemark) bezogen. Die Vorbereitung und Nutzung der Sonden entsprach den Vorgaben des Herstellers.

Tab. 2. 4: Auflistung der verwendeten *in situ*-Hybridisierungssonden

DIG = Digoxigenin, Neg. = negativ, Pos. = positiv.

Sonde	Sequenz/Markierung	DNA- T_m / RNA T_m
Nox1	/5DigN/ TTCACTCATGCTCTCTTCTGTT/3Dig_N/	70°C/84°C
Neg.Kontrolle	/5DigN/GTGTAACACGTCTATACGCCCA/3Dig_N/	78°C/87°C
Pos.Kontrolle	PolyT(25)Vn/ 5'-DIG und 3'DIG	–

2.11.12.3 Kombinierte nicht-isotopische *in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz

Die nicht-isotopische *in situ* Hybridisierung (NISH) wurde mit 8µm dicken, in Tissue Tek eingebetteten Kryoschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden im Ofen für 15min auf 65°C erhitzt und anschließend für 30min bei 70°C in 2× SSC Puffer überführt. Danach wurden die Schnitte 1min in DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser) gewaschen und 10min mit Proteinase K (5 µg/ml) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K brachte man die Schnitte für 30sec in 0,2% (m/v) Glycin in PBS, danach in für 30sec PBS und für 20 min in frisches, kaltes 4% (m/v) Paraformaldehyd. Nach erneutem waschen in PBS für 5min, folgten 10min in 0,1 M acetyliertem Triethanolamin (0,5 ml acetisches Anhydrid / 200 ml Triethanolamin) auf einem Schüttler und Dehydrierung mittels einer 70% (v/v), 80% (v/v) und 90% (v) Ethanolreihe (je 2 min). Darauf folgte die Prähybridisierung (1 M NaCl, 0.02 M Tris (pH

7,5), 2× Denhardt's Reagenz, 2 mM EDTA, 10 mg/ml Lachssamen DNA, 0,2 mg/ml Hefe tRNA) bei 55°C für 2-3 Std. in einer angefeuchteten Kammer und die anschließende Hybridisierung mit der denaturierten *antisense* Nox1-Sonde in 2× Hybridisierungs-Lösung (1 M NaCl, 0,02 M Tris (pH7,5), 2× Denhardt's Reagenz, 2 mM EDTA, 2 g Dextranulphat, 0,2 mg/ml Hefe tRNA) bei 55°C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Schnitte wie folgt gewaschen: 2× SSC für 1 Std. bei RT, 0,1× SSC bei 60°C und vorgeheiztes 0,1x SSC (60°C), gefolgt von einer Inkubation bei RT. Die Schnitte wurde dann 30 min bei RT mit einer Lösung zum blocken unspezifischer Bindungsstellen behandelt (2% Blockreagenz (Roche, Mannheim, Germany), 0,1% (m/v) BSA, 0,1 M Tris (pH 7,5), 5 M NaCl) und mit einem Peroxidase-markierten anti-DIG Fab Fragment (Roche, Mannheim, Germany) in einer 1:20 Verdünnung für 2 Std. bei RT inkubiert. Nach dieser Behandlung folgte ein weiterer Waschschrift bei RT in TBT Puffer (50 mM, 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl und 0.1% Triton X-100; 3 × 15 min). Das fluoreszierende Substrat *Alexa fluor 555 tyramide* (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit einer Verdünnung von 1:60 in Amplifikationspuffer für 2 Std. angewandt. Anschließend wurden die Schnitte ein weiteres Mal gewaschen (3 × 20 min in PBT-Puffer (PBS, 0,1% (v/v) Tween 20)) und mit einem monoklonalen, FITC-markierten -sma Antikörper (Maus; 1:100; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) für 1 Std. inkubiert. Wieder wurden die Schnitte gewaschen (3 × 3 min in PBS) in PBS und die Zellkerne nachfolgend mit Dapi (1:10.000 in PBS; Invitrogen, Karlsruhe) für 10min angefärbt. Letztendlich folgte ein Waschschrift und das Eindecken in Dako Fluoreszenz Eindeckmedium (Dako, Hamburg).

2.11.13 Western Blot

Zur Detektion der Proteinexpression wurde die western blot Technik verwendet. Die Proteinextrakte wurden aus isolierten PASMC und Lungengewebe gewonnen. Die PASMC wurden auf Eis mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit RIPA-Puffer (1 mM Natriumvanadat, Protease-Inhibitor Mix *complete* (Roche, Mannheim) und 0,1 mM PMSF) von den Zellkulturplatten gekratzt und lysiert wurden. Für die Herstellung des Lungenhomogenats wurden kleine Stücke der Lunge in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Stößel zermahlen und mittels eine Homogenisators (Precellys 24, Peqlab, Erlangen) homogenisiert. Das Lungenhomogenat nahm man dann ebenfalls in RIPA-Puffer +

Protease-Inhibitor Mix auf. Die Proteinmenge wurde mittels des DC Protein Assay (Bio-Rad, München) bestimmt. Äquivalente Mengen an Protein wurden in RIPA-Puffer, LDS Proben Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) und β -Mercaptoethanol gelöst und in SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Daraufhin wurden die Proteine aus den Gelen, durch *semi-dry*- oder *wet blotting*, auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen (Pall Corporation, Dreieich) transferriert. Nichtspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch Inkubation in 6% (m/v) fettfreiem Milchpulver + T-TBS (20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20) für ein Std. bei RT geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper fand bei 4°C über Nacht statt. Nach wiederholtem Waschen wurde der Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt) bei RT für eine Std. inkubiert. Nach erneutem Waschen in T-TBS-Puffer, wurden immunreaktive Signale per Chemilumineszenz (ECL plus, Amersham, Freiburg) detektiert. Folgende Antikörper wurden verwendet:

Tab. 2. 5: Auflistung der verwendeten Antikörper.

Nox1 = NADPH-Oxidase 1; Sod = Superoxiddismutase; Gpx = Glutathion-Peroxidase; PDI = Proteindisulfidisomerase; Nrf2 = Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like; PAK1 = p21-activating kinase; Akt = non-specific serine/threonine-protein kinase; JNK = c-Jun N-terminal kinase

Protein/Ziel	Verdünnung	Hersteller
Sod1	1:1000	Abcam plc, Cambridge, UK
Sod2	1:1000	Abcam plc, Cambridge, UK
Katalase	1:5000	Abcam plc, Cambridge, UK
Gpx1	1:1000	Abcam plc, Cambridge, UK
PAK1/phospho PAK1	1:1000	Epitomics, Burlingame, CA, USA
Akt/phospho Akt	1:1000	Epitomics, Burlingame, CA, USA
JNK/phospho JNK	1:700	Epitomics, Burlingame, CA, USA
Cofilin/phospho Cofilin	1:2000	Abcam plc, Cambridge, UK / Cell signaling, Danvers, MA, USA
Cyclin D1	1:5000	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Nrf2	1:1000	Abcam plc, Cambridge, UK
PDI	1:2000	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Nox1	1:750	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
-Aktin	1:30000	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.11.14 *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) - Stimulation

MCT- bzw. Kontroll-PASMC der 2. Passage wurden in M199 + 10% + 1% P/S kultiviert. Für die Stimulation mit PDGF (*platelet derived growth factor*) synchronisierte man die Zellen für 24 Stunden in M199 ohne Zusätze. Daraufhin wurden die Zellen mit 5ng/ml PDGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) für eine bzw. zwei Stunden stimuliert, indem die entsprechende Menge PDGF in das Medium gegeben wurde. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen auf Eis zweimal mit 1xPBS gewaschen und in RLT-Puffer lysiert. Aus diesem Zelllysate wurde die mRNA isoliert.

2.11.15 Subzelluläre Fraktionierung

PASMC wurden in 500µl Fraktionierungspuffer (250 mM Saccharose, 20 mM HEPES (7,4), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM DTT, PI Cocktail (III) 50 µl) lysiert und sofort von den Platten gekratzt. Das Lysat wurde mit einer 1 ml Spritze ca. 10 mal durch eine 25 G Nadel gezogen und für 20 min auf Eis gestellt. Danach wurde für 5 min bei 720 G das Nukleus-Pellet abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wieder für 5 min bei 10000 G zentrifugiert. Im Pellet befand sich nun die Mitochondrienfraktion, der Überstand enthielt die Zytosol- und Membranfraktion. Um die Membranfraktion zu erhalten, wurde dieser Überstand in einer Ultrazentrifuge bei 100000 G für eine Stunde zentrifugiert. Das entstandene Pellet nahm man in 400µl Fraktionierungspuffer auf, resuspendierte es mit einer 25 G Nadel (wie oben) und zentrifugierte erneut für 45 min. Zum Schluss wurde das Pellet in Ripa-Puffer aufgenommen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

2.12 Messungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch PASMC der Ratte wurde mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) und Dihydroethidium-Färbung (DHE = 2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-9,10-dihydrophenanthridin) (Invitrogen,

Frankfurt) bestimmt. Die ESR-Spektroskopie soll im Folgenden genauer erläutert werden. Die ESR-Messungen wurden ausschließlich mit gefrorenen Proben durchgeführt. Daher bezieht sich die folgende Beschreibung der ESR-Technik nur auf die Detektion von ROS in gefrorenen Proben. Für die DHE-Färbung wurden lebende Zellen verwendet.

2.12.1 *Spin traps* und *Spin probes*

Die meisten biologisch relevanten Radikale haben nur eine sehr kurze Lebenszeit (10^{-6} – 10^{-9} sec) und sind somit in biologischen Proben nur sehr schwer zu detektieren^{112, 265}. Nur manche Radikale, wie z.B. Nitroxylverbindungen, können unverändert für Monate oder Jahre bestehen²⁶⁶. Aus diesem Grund finden bei der ESR-Spektroskopie Substanzen Anwendung, die mit den Radikalen reagieren und stabile Produkte bilden²⁶⁷. Diese Moleküle werden als *spin traps* („Spinfalle“) bezeichnet. Die Reaktion solcher *spin traps* mit Radikalen resultiert in Produkten die jeweils ein spezifisches Spektrum verursachen, wenn sie mit ESR-Spektroskopie betrachtet werden^{112, 268}. *Spin traps* können sowohl zur Quantifizierung, als auch zur Identifizierung der produzierten Radikale verwendet werden¹¹².

Sie reagieren mehr oder weniger spezifisch mit den unterschiedlichen Radikalen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf die *spin probes* CMH (1 – Hydroxy– 3 – methoxycarbonyl - 2, 2, 5, 5 – tetramethylpyrrolidin; Alexis Biochemicals, Axxora Deutschland GmbH, Lörrach) und CPH (1 – Hydroxy – 3 – carboxy - 2, 2, 5 – tetramethylpyrrolidinhydrochlorid; Alexis Biochemicals, Axxora Deutschland GmbH, Lörrach) als Sonden für die Detektion von ROS in Zellen zurückgegriffen, da *spin traps*, verglichen mit CMH und CPH, eine geringe Reaktivität gegenüber O_2^- (Superoxidradikal) aufweisen ($74 \text{ mol/L}^{-1} \text{ s}^{-1}$)²⁶⁹. Die Rede ist von zyklischen Hydroxylaminen, die sich als sehr effektiv für den Gebrauch in kultivierten, intakten Zellen und Geweben erwiesen haben^{112, 270}. Diese Moleküle sind aber keine *spin traps*, wie weiter oben beschrieben, da sie die Radikale nicht „fangen“, sondern mit ihnen reagieren und selbst zu Radikalen werden. Hydroxylamine werden durch Oxidation in ein mehr oder weniger stabiles, paramagnetisches Nitroxid-Radikal (3-Carboxy-Proxyl Radikal) umgewandelt, welches eine Halbwertszeit von mehreren Stunden hat²⁷¹. Aus diesem Grund bezeichnet man diese Moleküle als *spin probes*. Unter optimalen Bedingungen reagiert jedes einzelne Molekül der *spin probe* mit einem Molekül der ROS und somit entspricht, unter diesen Umständen, die Konzentration

der Nitroxid-Radikale der ROS-Konzentration. Mittels ESR-Spektroskopie können die stabilen Radikale der *spin probes* dann detektiert werden, wobei die Höhe der ESR-Signalamplitude proportional zur Konzentration der Nitroxid-Radikale ist, da je nur ein Molekül der *spin probe* mit einem freien Radikal reagiert ²⁷².

CMH und CPH reagieren zwar mehr oder weniger spezifisch mit Superoxidradikalen, allerdings ebenso mit anderen ROS (wenn auch deutlich langsamer). CPH reagiert sehr schnell mit O_2^- ($3,2 \times 10^3 \text{ mol/L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und $ONOO^-$ (Peroxynitrit). Die resultierenden Nitroxid-Radikale sind sehr stabil und unterliegen minimaler Bioreduktion ²⁷¹. Die Strukturformeln von CMH, CPH und deren Nitroxid-Radikale sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Dass aufgrund seiner Methylgruppe zellpermeable CMH wurde für die Detektion der gesamten ROS (intrazellulär und extrazellulär) genutzt ^{273, 274}. CPH hingegen ist wegen seiner polaren Hydroxylgruppe nicht oder kaum zellpermeabel und kann zur Messung der extrazellulären ROS-Menge genutzt werden ²⁷⁵. CMH und CPH reagieren mit verschiedenen ROS, sind aber sehr gut geeignet um Superoxidradikale zu detektieren, da sie hundert Mal schneller mit Superoxid reagieren als beispielsweise Nitroverbindungen. CMH und CPH können auch ohne Anwesenheit von Radikalen oxidiert werden. Dieser Vorgang wird *Autoxidation* genannt ¹¹². Der Mechanismus der Autoxidation spielte im Bezug auf die hier durchgeführten Messungen aber eine geringe Rolle, da die Autoxidation in allen Proben gleich sein sollte und keine quantitative Bestimmung der Konzentration der gemessenen Radikale vorgenommen wurde.

Jede *spin probe* erzeugt ein spezifisches ESR-Spektrum. Da das verwendete CMH und CPH sich aber nur durch eine Methyl- bzw. Hydroxylgruppe unterscheiden, erhält man für beide Moleküle das gleiche Spektrum. Dies gilt für flüssige, sowie gefrorene Proben. Das Spektrum von CMH und CPH in gefrorenen Proben, wie es in den durchgeführten Messungen aufgezeichnet wurde, ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

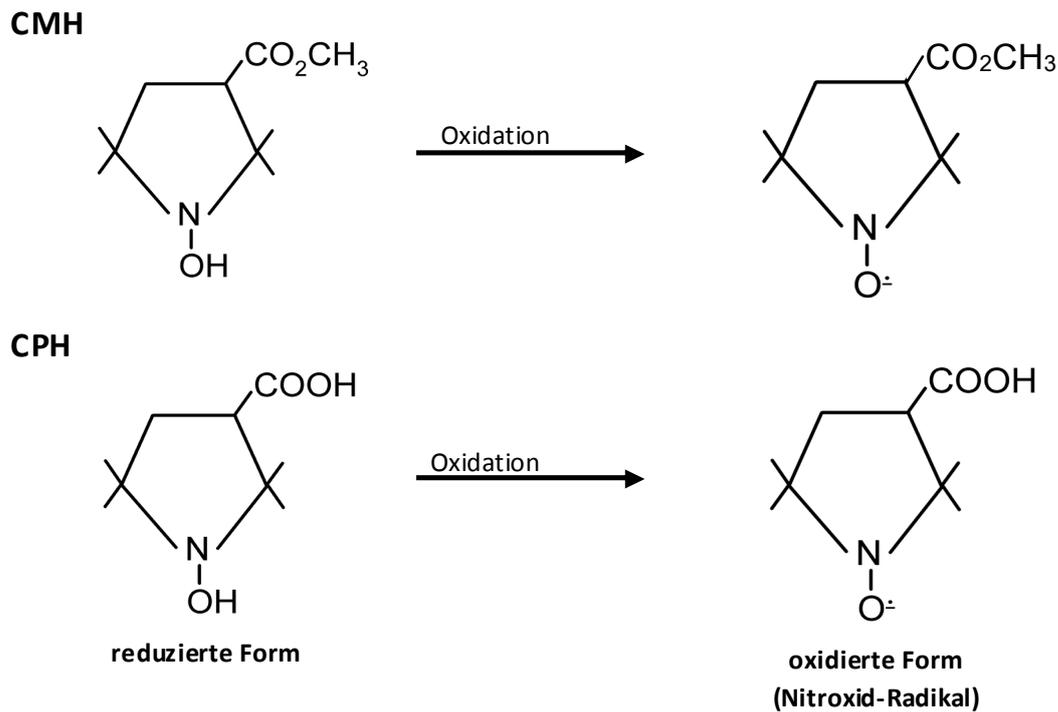


Abb. 2.3: Oxidation der *spin probes* CMH und CPH durch ROS zu einem stabilen Nitroxid-Radikal.

Spin probes reagieren mit freien Radikalen und bilden Nitroxid-Radikale (3-Carboxy-Proxyl Radikale) mit einer Halbwertszeit von ca. 330 min²⁷¹.

2.12.2 Radikalfänger

Die verwendeten *spin probes* (CMH und CPH) sind Moleküle die zwar zu bestimmten ROS eine höhere Affinität aufweisen als zu anderen, aber dennoch mit verschiedensten ROS reagieren können. Man verwendet diese Moleküle daher zur allgemeinen Detektion von ROS. Da diese Substanzen also von vielen verschiedenen ROS oxidiert werden können, ist es allein durch den Einsatz dieser *spin probes* nicht möglich zu definieren, um welche Art von ROS es sich handelt. Daher ist es wichtig spezifische Inhibitoren für die untersuchte ROS einzusetzen, um spezielle ROS identifizieren zu können.

In dieser Arbeit wurden Sod (Superoxiddismutase; Sigma-Aldrich, Steinheim) bzw. PEG-Sod (Superoxiddismutase-Polyethylenglycol (pSod); Sigma-Aldrich, Steinheim) als spezifische Radikalfänger eingesetzt, um den reinen Superoxidanteil des gemessenen ESR-

Signals, welches proportional zur ROS-Konzentration ist, bestimmen zu können⁹. Der Superoxidanteil in MCT-PASMC wurde dann mit dem von Kontroll-Zellen verglichen werden.

2.12.3 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie

Die Superoxidproduktion präkapillärer PASMC wurde, abgesehen von wenigen Änderungen, wie bereits bei Kuzkaya *et al.* beschrieben gemessen²⁷⁴. Die Zellen wurden mit 1-hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CPH) oder Methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidin (CMH) inkubiert (0,5mM; Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH, Elzach, Germany). In parallelen, identischen Ansätzen waren durchgehend Sod oder PEG (Polyethylenglycol)-Sod (Sigma-Aldrich, Steinheim) vorhanden um den Superoxidanteil des Gesamtsignals zu bestimmen. Nachdem die Proben für 20min bei 37°C mit CMH oder CPH inkubiert hatten, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Messungen wurden bei 77°K mit einem MS 100 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektrometer (Magnettech, Berlin, Germany) durchgeführt. Um den Superoxidanteil des totalen ROS-Signals bestimmen zu können, wurden die gemessenen Werte aus den Proben mit Sod von den Werten der dazugehörigen Proben ohne Sod abgezogen. Die Differenz repräsentiert die Menge von Superoxidradikalen in der Probe, das Sod Superoxid zu H₂O₂ umsetzt, welches von CMH/CPH nicht detektiert wird. PMA (Phorbol Myristat Acetat; Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde als Stimulator für NADPH-Oxidasen eingesetzt. Von PMA ist bekannt, dass es als Agonist der Proteinkinase C (PKC) die neutrophile NADPH-Oxidase aktivieren kann und so die Freisetzung von Superoxid-Anionen verursacht²⁷⁶⁻²⁷⁸.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen, wurden nach einigen Kalibrierungsmessungen folgende Parametereinstellungen gewählt:

⁹ NADPH-Oxidasen produzieren Superoxid, welches in folgenden Schritten in andere reaktive Sauerstoffspezies umgewandelt wird.

Tab. 2. 6: Verwendete Einstellungen der modifizierbaren Parameter des ESR-Spektrometers: High Sensitive Benchtop ESR Spektrometer MiniScope MS200 (Magnettech, Berlin).

Parameter	Einstellung
B0-field	3343,94 G
Sweep	69,15 G
Sweeptime	20 s
Smooth	0
Steps	1024
Number	5
Modulation	5000 mG
MW attenuation	17 dB
Gain	$5 \cdot 10^2$
Phase	180 Grad

Die Sensoren sind:

- *Detector current*: Zeigt den Diodenstrom nach automatischen Abgleich an
- *Field error*: Abweichung des Magnetfeldwertes von seinem Sollwert
- *ACF-Level*: Regelabweichung der automatischen Mikrowellenfrequenzregelung

Der aktuelle Status der einzelnen Parameter wurde von der Software durch die Position eines Cursors in einer Skala angezeigt und konnte so kontrolliert werden.

Folgende Ansätze wurden dann abhängig von der Fragestellung vorbereitet:

Tab. 2. 7: Auflistung der für die ESR-Spektroskopie vorbereiteten Ansätze.

MCT- und Kontroll-Zellen wurden stets identisch behandelt. pSod = PEG-Sod.

Fragestellung	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Intra- + extrazelluläre ROS-Menge + Superoxidanteil	CMH	CMH+pSod	CMH+PMA	CMH+PMA+pSod
Extrazelluläre ROS-Menge + Superoxidanteil	CPH	CPH+Sod	CPH+PMA	CPH+PMA+Sod

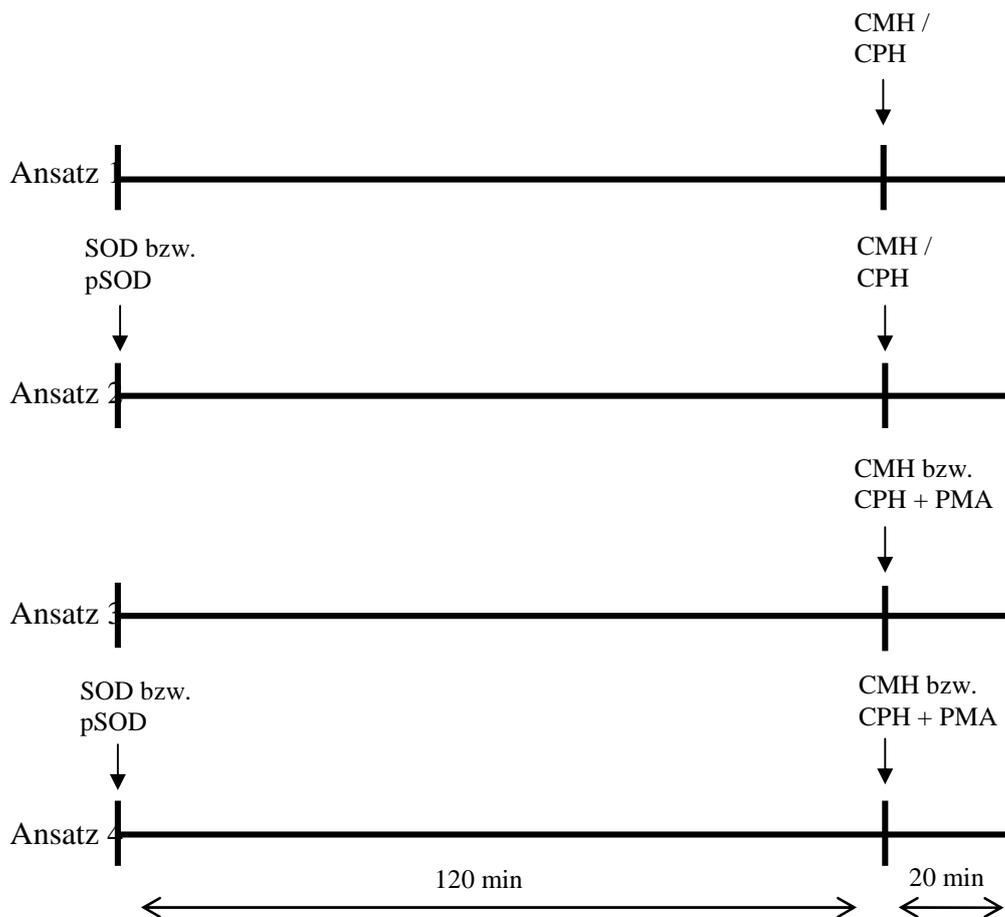


Abb. 2.4: Zeitachse des Versuchsablaufs für die einzelnen Ansätze.

CMH und CPH bzw. Sod und pSod wurden abhängig von der Fragestellung appliziert.

pSod = PEG-Sod

2.12.3.1 Datenerfassung und Auswertung der ESR-Messungen

Die aufgenommenen ESR-Spektren wurden mit Hilfe der Software *ESR-Applications MS200 Control* (Magnettech GmbH, Berlin) aufgenommen und mit *ESR-Applications MS200 Analysis* (Magnettech GmbH, Berlin) und der darin enthaltenen Funktion *line width* ausgewertet. *Line width* gibt die Differenz zwischen Maximum und Minimum des aufgenommenen Spektrums, also die Amplitude, in (AU) (*arbitrary units*) an. Dieser Wert ist proportional zur Menge der freien Radikale in der Probe. Die Werte wurden in eine *Prism*-Tabelle eingegeben und als Balkendiagramm dargestellt. Außerdem wurde der Anteil des Signals berechnet, der sich mit Sod bzw. PEG-Sod inhibieren lässt. Dies wurde für das intrazelluläre, das extrazelluläre und das totale Signal vorgenommen.

Abbildung 2.5 zeigt ein typisches Spektrum der beiden verwendeten *spin probes* in einer gefrorenen Probe. Ausgewertet wurde der Peak in der Mitte des Spektrums, da hier die Resonanz, also die Absorption der Mikrowellenenergie durch die Probe, am größten war

112

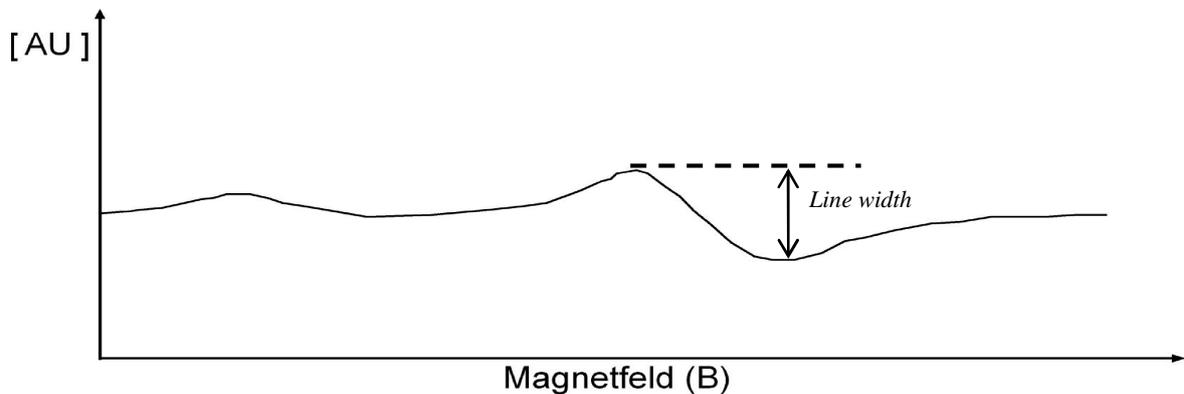


Abb. 2.5: ESR-Spektrum der *spin probes* CMH bzw. CPH in gefrorenen Proben.

In jeder einzelnen Messung wurde die Höhe der Signalamplitude, wie oben angezeigt, ausgewertet. Dafür wurde die Funktion *line width* der mitgelieferten Software (MS200 Analysis) genutzt.

2.12.4 Dihydroethidium (DHE) – Färbung

Dihydroethidium (DHE), auch als Hydroethidin (HE) bezeichnet, ist zellpermeabel und wird von ROS zu dem fluoreszierenden Ethidium oxidiert (Oxyethidium), welches die Zellmembran nicht mehr passieren kann²⁷⁸⁻²⁸⁰. Ethidium interkaliert dann in die DNA und ist als Fluoreszenz im Kern nachweisbar. Ethidium fluoresziert stark bei ca. 600 nm, wenn es mit Licht einer Wellenlänge von 500-530 nm angeregt wird²⁸¹. Die Oxidation von DHE zum Oxyethidium verläuft sehr schnell, wenn das Oxidationsmittels O_2^- ist, aber langsamer bei z.B. O_2 , H_2O_2 , $HOCl$ oder $ONOO^-$ ²⁷⁹. Da es von lebenden Zellen aufgenommen werden kann, wird es konsequenterweise als Detektor für intrazellulär vorliegende ROS genutzt²⁸²⁻²⁸⁴.

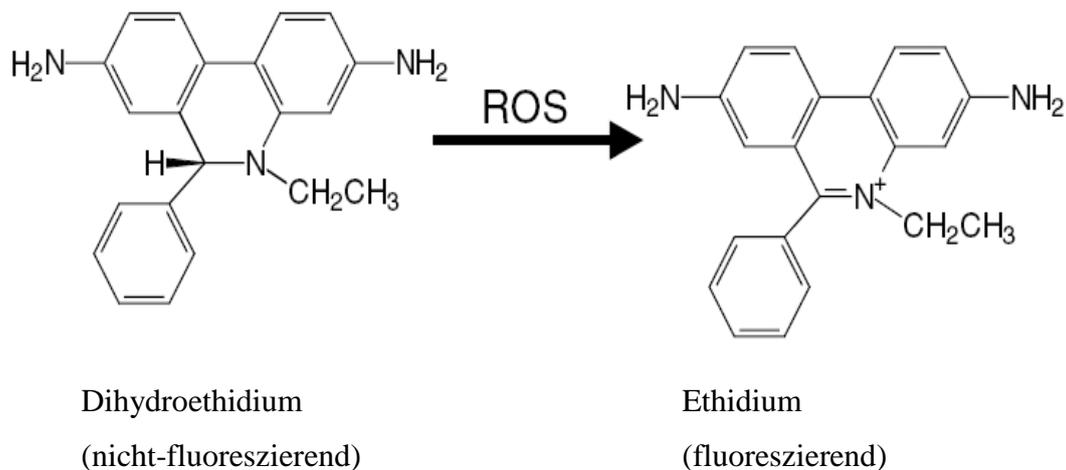


Abb. 2.6: Oxydation von Dihydroethidium zu dem fluoreszierenden Ethidium durch ROS¹⁰.

Verändert nach ²⁸¹.

Für die Färbung von intrazellulärem ROS mittels DHE in gesunden und MCT-behandelten PSMC wurden die Zellen, wie unter 2.10.1.1 beschrieben, von den Kulturplatten abgelöst und in M199 + 10% FCS + 1% P/S aufgenommen. Die Gesamtzellzahl der Suspension wurde mit einem CASY® Cell Counter Model DT bestimmt. Anschließend wurden die Zellen auf 8 Kammer-Permanox-Objekträger (*8 well permanox chamber slides*; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) ausgesät. In jede Kammer wurden ca. 1500 Zellen in 500µl M199 + 10% FCS + 1% P/S ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die Adhärenz und Konfluenz der Zellen mikroskopisch (Mikroskop IMT-2, Olympus, Hamburg) überprüft. Wenn alle Zellen adhärent und zu ca. 80% konfluent waren, wurde mit der Behandlung begonnen.

Zuerst wurde in DMSO stabilisiertes DHE (Invitrogen GmbH Technologiepark, Karlsruhe) in DMEM-Medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching) gelöst, so dass man eine 5µM Lösung erhielt. Das DMEM-Medium wurde zuvor mit N₂ begast um es weitestgehend sauerstofffrei zu bekommen und so die vorzeitige Oxidation von DHE zu minimieren. Anschließend wurde das Medium M199 + 10% FCS + 1% P/S aus den Kammern abgesaugt und durch 300µl der 5µM DHE-Lösung ersetzt. Nun wurden die Zellen eine Stunde lang im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1x DPBS dreimal gewaschen und mit 100µl eiskaltem Aceton-Methanol (1:1; Sigma Aldrich, Steinheim) pro Kammer 10 Minuten fixiert. Danach wusch man die

¹⁰ Die Oxidation von DHE zu Oxyethidium verläuft, verglichen mit anderen Radikalen, sehr schnell wenn das Oxidationsmittels O₂⁻ ist.

Zellen erneut dreimal mit DPBS. Mit Hilfe von DAPI wurden dann die Zellkerne, wie unter 2.10.1.1 beschrieben, angefärbt. Jetzt wurden die Zellen ein letztes Mal gewaschen. Danach entfernte man die aufgesetzten Kammern vom Objektträger und deckte diese mit DAKO *fluorescent mounting medium* und einem Deckgläschen ab. Als Kontrolle dienten Kammern ohne Zellen aber mit DHE und Kammern mit Zellen ohne DHE. Die komplette Prozedur der DHE-Färbung fand in Dunkelheit bei Rotlicht statt. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.12.4.1 Auswertung der DHE-Färbung

Da das fluoreszierende Ethidium sehr lichtempfindlich ist und die Fluoreszenzintensität unter Belichtung somit sehr schnell nachlässt, wurden die Objektträger stets exakt 24 Stunden nach der Färbung ausgewertet, um sicherzugehen, dass das DEKA *mounting medium* getrocknet und die Fluoreszenz nicht verblasst war. Die DHE-Färbung von intrazellulärem Superoxid wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Leica CTR MIC) und der Software Leica QWin (Leica Microsystems, Wetzlar) ausgewertet. Die Anregung des in der DNA interkalierten Ethidiums erfolgte unter Zuhilfenahme eines Filters der Bandbreite 500-530 nm (Filter I3L, Leica Microsystems, Wetzlar). Die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes (Maximum des Emissionsspektrums bei 600 nm) mit anschließender Digitalisierung geschah mittels einer Kamera (Leica DC300FX, Leica Microsystems, Wetzlar) und eines Computers. Die maximale Anregungswellenlänge für DAPI lag bei 359 nm (Filter AL, 340-380 nm, Leica Microsystems, Wetzlar) und das Maximum des Emissionsspektrums bei 461 nm.

Die Bilder wurden in das .jpg-Format überführt und die qualitative Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des Programmes Image J (Java-basiertes Bildbearbeitungsprogramm, *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA).

Um eine repräsentative Aussage treffen zu können, wurde von jedem aufgenommenen Bild die Anzahl der Kerne und die integrierte Fluoreszenzdichte des gesamten Bildes bestimmt. So konnte die integrierte Fluoreszenzdichte pro Kern berechnet werden, indem man die Fluoreszenzdichte des gesamten Bildes durch die Anzahl der Kerne teilte. Pro Kammer wurden 6 Bilder von verschiedenen Bereichen aufgenommen und deren Werte gemittelt. Ebenso wurde dann der Mittelwert der Ergebnisse aller acht Kammern pro Objektträger

ausgerechnet. Dieser Wert diene als Endergebnis der Färbung für den einzelnen Objektträger.

Die Fluoreszenzbilder wurden alle jeweils mit denselben Einstellungen (Belichtungszeit und Verstärkung) aufgenommen. Die Einstellungen wurden je nach Experiment optimiert und dann für jedes Bild des einzelnen Versuchs beibehalten. Nach Aufnahme der beiden Fluoreszenzbilder (DAPI und DHE) wurden diese zu einem neuen Bild überlagert, um die Lokalisierung des Kerns zu verdeutlichen.

2.12.5 Messung der mitochondrialen ROS-Produktion

Die mitochondriale ROS-Produktion wurde mittels MitoSOXTM Red (Invitrogen, Frankfurt) gemessen. Kurz vor Beginn des Experiments (<15min) wurde das MitoSOXTM entsprechend den Angaben des Herstellers gelöst. Alle folgenden Arbeiten wurden im Dunkeln durchgeführt. Für den Versuch ließ man die verwendeten Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen und gab frisches Medium (M199 + 10% FCS + 1% P/S) auf die Zellen. Wichtig hierbei war, dass man die Zellen nach der Aussaat nicht länger als 48h kultivierte. MitoSOXTM Red wurde anschließend zum Medium gegeben, so dass man eine Endkonzentration von 5 µM erhielt. Die Zellen wurden dann für 30 min bei 37°C inkubiert, um das MitoSOXTM Red aufnehmen zu können. Im Anschluss wurden die Zellen trypsiniert und zweimal in *Hank's buffered salt solution* mit Calcium und Magnesium (GIBCO, Invitrogen, Frankfurt) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in einem sterilen 1,5ml Reaktionsgefäß mit 500 µl *FACS binding buffer* (*Hank's buffered salt solution* + 5 mM Calciumchlorid und Magnesiumchlorid + 1% m/v BSA) resuspendiert. Die Proben wurden dann in zwei 250µl Duplikate aufgeteilt und mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL2-H gemessen. Es wurden 30000 Ereignisse (Zellen) pro Probe gesammelt. Während den Messungen wurden die Proben stets auf Eis aufbewahrt und die Messungen fanden stets innerhalb von 30min nach der Resuspendierung statt. Zur Datenanalyse wurden die Ereignisse zuerst als FSC/SSC-Diagramm aufgetragen, um Zelltrümmer mit niedrigem FSC und SSC von der Analyse auszuschließen. Im Anschluss wurde dann die Anzahl der Ereignisse (*Counts*) gegen FL2-H aufgetragen um die mittlere FL2-H-Intensität bestimmen zu können. Die verwendete Software war CFlow Plus.

2.13 Statistik

Alle Daten sind, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM = *standard error of mean*) angegeben. Für die statistische Analyse der Daten wurde der ungepaarte t-Test nach Student verwendet, um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen. Ein p -Wert von $<0,05$ wurde als signifikant angesehen und ist mit * gekennzeichnet. Für die statistische Analyse mehrerer Gruppen wurde eine ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test (SNK-Test) benutzt. Ein Unterschied von $P < 0,05$ wurde als signifikant definiert und ist mit # gekennzeichnet.

Die Anzahl der Tiere ist mit „N“, die der einzelnen Messungen mit „n“ gekennzeichnet. Die einzelnen Werte waren stets normal verteilt und wiesen eine normale Varianz auf.

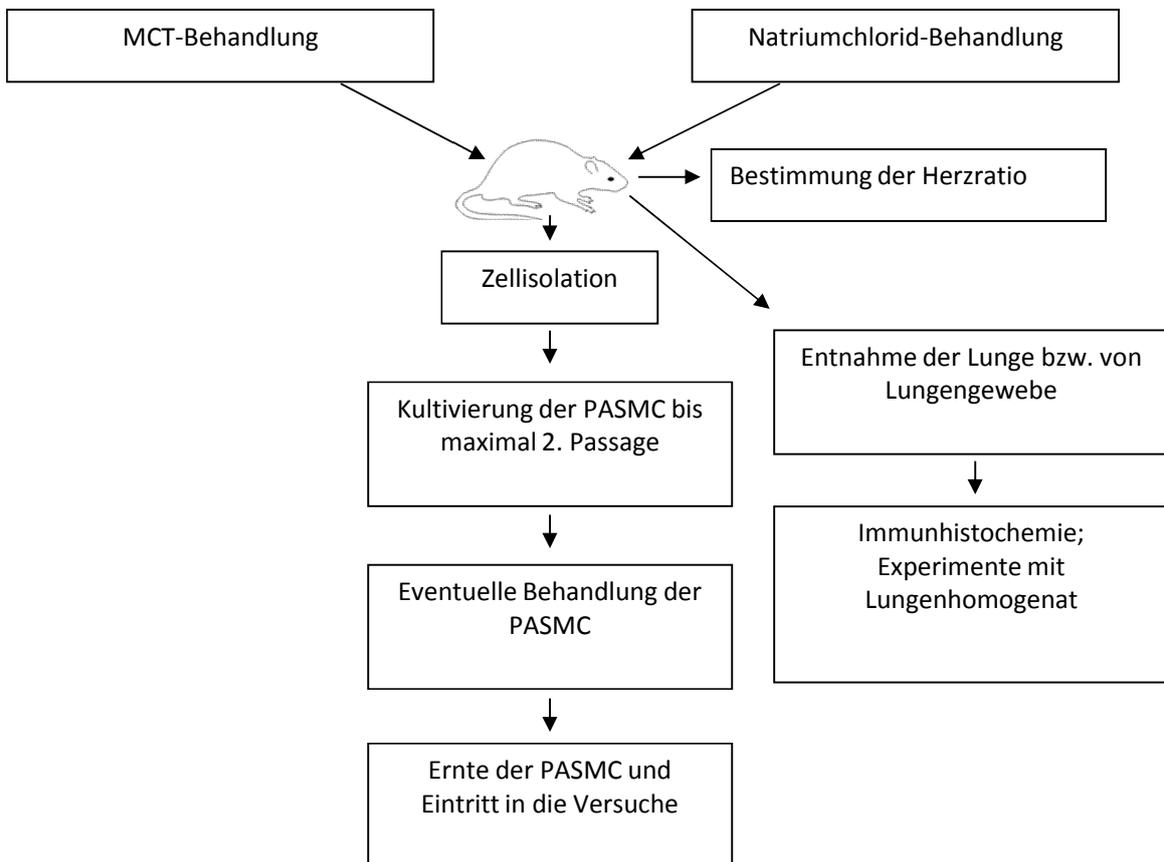


Abb. 2.7: Schematische Übersicht des experimentellen Ablaufs.

MCT = Monocrotalin. PASMCM = pulmonalarterielle glatte Muskelzelle.

3 Ergebnisse

3.1 MCT-Behandlung führt zur Ausbildung einer PH

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nach der Rolle von ROS im Ratten-Modell der MCT-induzierten PH und dem MCT-induzierten Gefäßumbau nachgegangen. Um die SD-Ratten an PH erkranken zu lassen, wurde den Tieren einmalig eine Dosis von 60 mg/kg KG (KG = Körpergewicht) MCT subkutan in die Nackenfalte injiziert. Bekannt war, dass die Injektion von MCT bei Ratten, innerhalb weniger Wochen, zur Ausbildung einer PH führt⁸. Als Kontrolle dienten Tiere denen die entsprechende Menge einer isotonen Natriumchlorid-Lösung (NaCl) subkutan verabreicht wurde.

Fünf Wochen nach der Injektion von MCT bzw. NaCl wurde die Herzratio (Rechtsherzhypertrophie) ermittelt und hämodynamische Untersuchungen zur Messung des RVSP (Rechtsventrikulärer systolischer Druck) durchgeführt. Weiter wurden auf Paraffinschnitten von MCT- und Kontroll-Tieren, Färbungen von elastischen Fasern (Elastika-Färbung), dem von Willebrand - Faktor (Endothel-Färbung) und -sma durchgeführt. Diese Untersuchungen galten der Verifizierung des MCT-induzierten Krankheitsbildes der PH.

In Abb. 3.1 sind die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen dargestellt. Die Injektion von MCT bewirkte bei den Tieren eine signifikante Erhöhung der Herzratio um fast 110 % gegenüber den Tieren, welche die isotone NaCl-Lösung bekommen hatten (a). Die Werte für die Herzratio lagen im Mittel für die MCT-Tiere bei $0,47 \pm 0,03$, für die Kontroll-Tiere bei $0,21 \pm 0,01$. Die linken Ventrikel der Tiere, die mit MCT behandelt wurden, waren unverändert und entsprachen denen der Kontroll-Gruppe. Der RVSP stieg nach MCT-Behandlung auf ca. 250% des Kontroll-Wertes (b). Die Endothel- und Elastika-Färbungen zeigten eine deutliche Zunahme an elastischen Fasern zwischen der *Lamina elastica externa* und der *Lamina elastica interna*, also eine Zunahme der mittleren Wanddicke (c) und eine signifikante Verdickung der Endothelschicht nach MCT-Behandlung (d). Ähnliches galt für die *Tunica media* der MCT behandelten Tiere. Die -sma-Färbung wies auf eine deutliche Verdickung der pulmonalvaskulären glatten Muskelschicht hin. MCT führte demnach zur allgemeinen Verdickung der Gefäßwand und zur Verringerung des Lumens kleiner Pulmonalarterien (vaskuläres *Remodeling*).

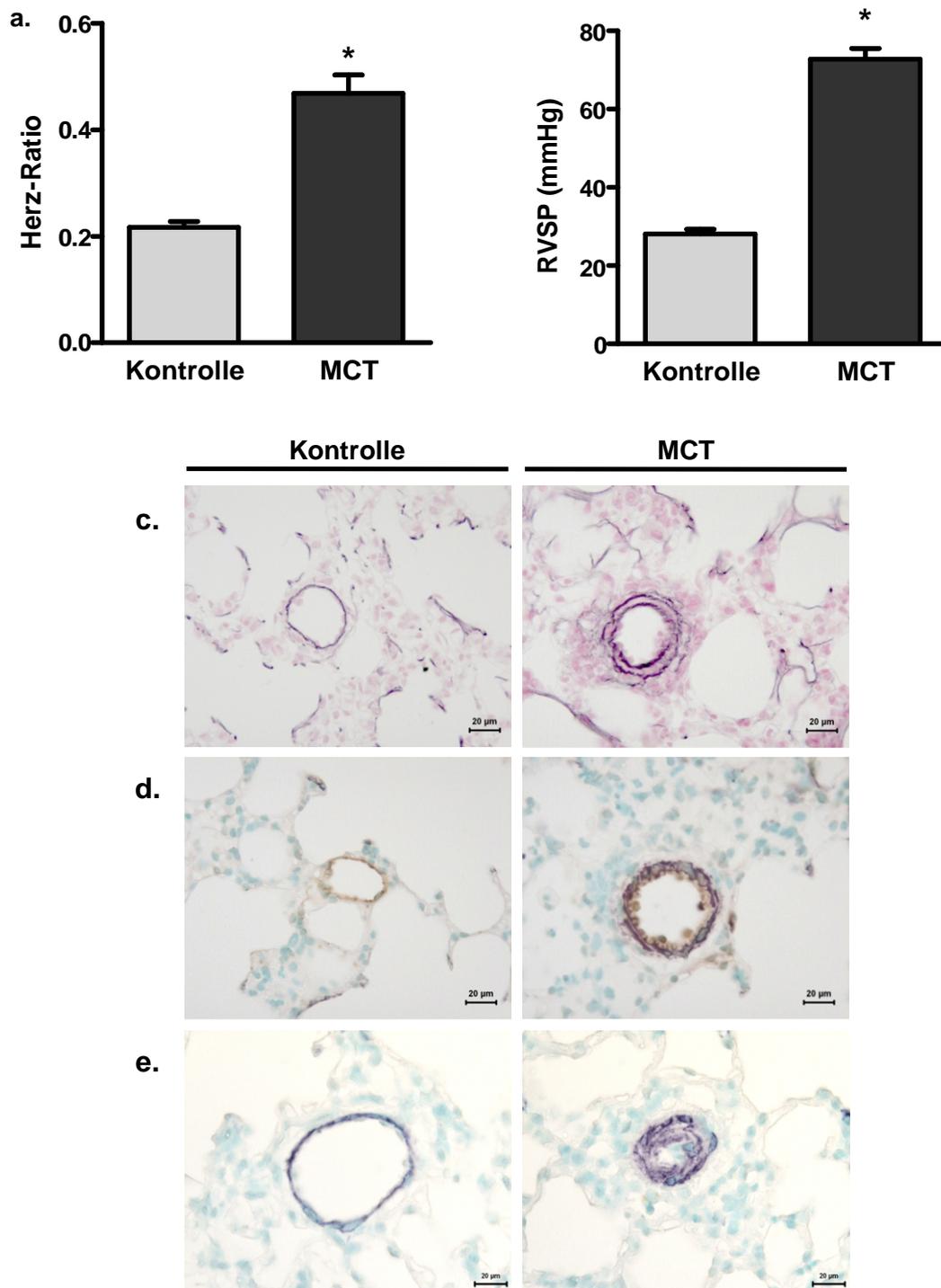


Abb. 3.1: Hämodynamische und vaskuläre Veränderungen durch MCT-Behandlung.

Die einmalige Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht MCT führte bei den CD-Ratten zu einer signifikanten Rechtsherzhypertrophie (a) und des RVSP (b; rechtsventrikulärer systolischer Druck). Zudem kam es zum Gefäßumbau in kleinen, pulmonalarteriellen Gefäßen (c = Elastika-Färbung; d = von Willebrand-Faktor + -sma-Färbung; e = -sma-Färbung). * = $p > 0,05$; N = 10

Es war eine deutliche rotfluoreszierende Markierung einer faserartigen Struktur in allen PASMC zu erkennen, was darauf schließen ließ, dass es sich um PASMC aus den isolierten Gefäßen handelte. Außerdem konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Fluoreszenzintensität zwischen den PASMC beider Gruppen festgestellt werden, so dass man ebenfalls davon ausgehen konnte, dass alle PASMC vom gleichen Typ und die Kulturen nicht mit anderen Zellen verunreinigt waren.

Die PASMC aus MCT- und Kontroll-Tieren zeigten bezüglich der Färbung von α -sma keine Unterschiede. Intensität der Fluoreszenz, Anordnung der faserartigen Struktur und die Morphologie der PASMC waren identisch. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den isolierten Zellen um pulmonal arterielle glatte Muskelzellen handelte und dass die Injektion von MCT keine Auswirkungen auf die äußere Morphologie der kultivierten PASMC hatte. Nachdem sichergestellt worden war, dass es sich tatsächlich um PASMC handelte, konnten die Zellen nun für die jeweiligen Versuche genutzt werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der ROS-Messungen mittels ESR-Spektroskopie und Dihydroethidium-Färbung mit den isolierten PASMC aufgeführt.

3.3 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies

Die dominanten ROS-Quellen in eukaryotischen Zellen sind die NADPH-Oxidasen und die Atmungskette der Mitochondrien. Um den Einfluss der MCT-Behandlung auf die ROS-Produktion dieser enzymatischen Quellen in isolierten PASMC untersuchen zu können, wurden verschiedene Methoden angewendet. Die zytoplasmatische ROS-Produktion wurde durch ESR-Spektroskopie und DHE-Färbung erfasst. Die mitochondriale ROS-Bildung wurde mit MitoSOXTM Red, einem mitochondrialen Superoxidindikator für lebende Zellen, gemessen.

3.3.1 ESR-Spektroskopie

Die unter 2.4.3 (Tabelle 2.6) beschriebenen Ansätze wurden nach den, von der Fragestellung abhängigen, Versuchen in einer randomisierten Reihenfolge eingefroren und in einer ebenfalls randomisierten Reihenfolge im ESR-Spektrometer gemessen. So konnte eine objektive Betrachtung der Ergebnisse gewährleistet werden.

3.2 Identifizierung der isolierten und kultivierten PASMIC

Da PASMIC die Hauptursache für das, in MCT-induzierter PH beobachtete, vaskuläre *Remodeling* sind⁵⁹, lag der Fokus in der vorliegenden Arbeit auf diesen Zellen. Zur Identifizierung der isolierten PASMIC aus den präkapillären (mikrovaskulären) Gefäßabschnitten der *Arteria pulmonalis* der Ratten wurden diese mittels der direkten Immunfluoreszenztechnik, wie unter 2.10.1.1 beschrieben, untersucht. Neben der direkten Fluoreszenzfärbung von glattmuskulärem α -Aktin (α -sma) wurde auch eine Kernfärbung mittels DAPI durchgeführt. Nach entsprechender Anregung des fluoreszierenden Farbstoffs erschien die Cy3-markierte Fluoreszenzfärbung rot und die DAPI-Färbung blau. Wenn es sich um PASMIC handelte, dann sollte die α -sma-Färbung positiv ausfallen, da große Mengen von α -sma in PASMIC vorhanden sind^{285, 286}. Die Identifizierung wurde an Zellen von Tieren beider Gruppen durchgeführt. Nach Aufnahme der beiden Fluoreszenzbilder wurden diese mit Hilfe der Software überlagert. Abbildung 3.2 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von gefärbten Kontroll-PASMIC in der Passage 2 (P2) in unterschiedlicher Auflösung.

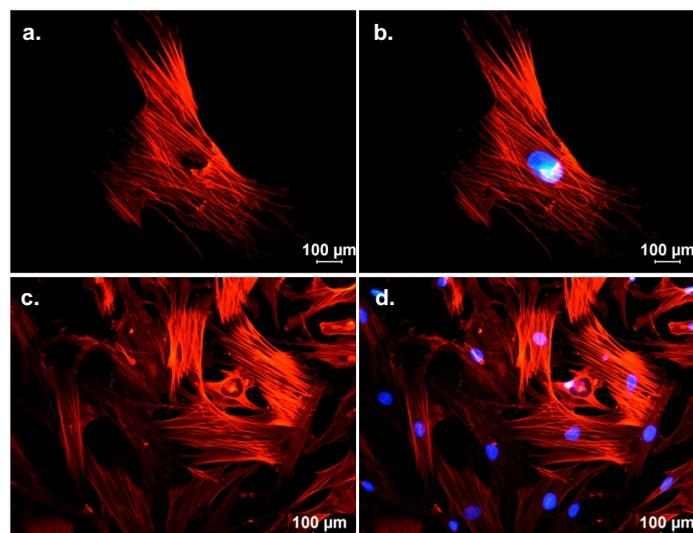


Abb. 3.2: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer direkten Immunfluoreszenzfärbung von α -sma in isolierten PASMIC der Passage 2.

In den isolierten PASMIC war nach Behandlung mit dem Anti- α -sma-Antikörper eine deutliche Färbung von α -sma zu erkennen (rot; a, b, c, d). Die Kerne der PASMIC wurden mit DAPI angefärbt und erschienen blau (b, d). Die Aufnahmen a und b zeigen eine einzelne glatte Muskelzelle, links ohne und rechts mit Kernfärbung (Vergrößerung 400x). Die Aufnahmen c und d zeigen eine Übersichtsaufnahme der PASMIC, links ohne und rechts mit Kernfärbung (Vergrößerung 200x). Die abgebildeten Aufnahmen sind repräsentativ für alle durchgeführten Färbungen von α -sma in Kontroll-Tieren.

Die zytosolische ROS-Produktion wurde mit Hilfe der *spin probe* CMH (Abschnitt 2.4.1) gemessen. Dabei diene CMH der Detektion der gesamten ROS-Konzentration, also der intrazellulären + extrazellulären ROS. CPH (500 μ M) wurde ausschließlich für die Detektion extrazellulär vorliegender ROS eingesetzt, wodurch intrazelluläre ROS von extrazellulären differenziert werden konnten.

CMH und CPH reagieren mit den sehr kurzlebigen freien Radikalen in einer 1:1 Stöchiometrie. Die Höhe der ESR-Signalamplitude, angegeben in *arbitrary units* (AU), sollte demnach proportional zur ROS-Konzentration in der Probe sein²⁸⁷.

Als eine Art Positivkontrolle für die Aktivität von NADPH-Oxidasen, sollte die Inkubation der PASMC aus gesunden und an PH erkrankten Ratten mit PMA (Phorbol Myristat Acetat) dienen. PMA ist ein Agonist der Proteinkinase C (PKC), die wiederum phagozytäre und nicht-phagozytäre NADPH-Oxidasen aktivieren kann und so die Produktion von Superoxidradikalen stimuliert. PMA induziert über die Stimulierung der PKC die Aggregation der Untereinheiten der NADPH-Oxidase und so die Produktion von Superoxidradikalen²⁷⁶. Weiter wurde der Superoxidanteil der detektierten ROS bestimmt. Da Superoxidradikale das primäre Produkt aktiver NADPH-Oxidasen sind und nicht-phagozytäre NADPH-Oxidasen als potentielle Quelle vaskulärer reaktiver Sauerstoffspezies unter MCT-induzierter PH in Frage kamen, war die Bestimmung des Superoxidanteils am gesamten detektierbaren ESR-Signal von großem Interesse.

Dazu wurden die Enzyme Sod und PEG-Sod (Polyethylenglycol-Sod; pSod) als Radikalfänger eingesetzt.

Sod und PEG-Sod katalysieren, wie bereits erwähnt, die Dismutation von Superoxidradikalen ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoff (H^+) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2) (Gleichung 1.1)²⁸⁸. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass der AU-Wert in Ansätzen mit Sod bzw. PEG-Sod geringer sein sollte.

PEG-Sod wurde aufgrund der oberflächenaktiven Eigenschaften von PEG verwendet. Durch die Konjugation von Sod an PEG (PEG-Sod, pSod) kann PEG-Sod in die Zelle diffundieren^{289, 290}. PEG-Sod diene also der Bestimmung des totalen (extra- und intrazellulären) Superoxidanteils. Sod wurde zur Bestimmung des extrazellulären Superoxidanteils des totalen Signals eingesetzt.

3.3.1.1 Erhöhte intrazelluläre Superoxid Produktion in PASMC nach MCT-Behandlung

Die ROS-Messungen am ESR-Spektrometer mit CMH und CPH als *spin probes* ergaben, dass MCT-PASMC gegenüber Kontroll-Zellen eine deutlich höhere intrazelluläre Produktion von ROS aufwies. Da CMH und CPH sowohl Superoxid, als auch Peroxynitrit detektieren¹¹², wurde Sod oder zellpermeables PEG-Sod in parallelen Ansätzen dazugegeben. Durch die Sod bzw. PEG-Sod-Versuche konnte in MCT-PASMC eine erhöhte intrazelluläre Superoxidproduktion gemessen werden. Extrazellulär waren keinerlei Unterschiede zwischen MCT- und Kontroll-PASMC aufzuweisen. PMA löste einen zusätzlichen Anstieg der ROS-Produktion in allen Gruppen aus. Interessanterweise führte die PMA-Stimulation dazu, dass die höhere intrazelluläre ROS- und Superoxidproduktion der MCT-PASMC gegenüber den Kontroll-Zellen weiter verstärkt wurde. Extrazellulär war, abgesehen von der generellen Stimulation durch PMA, wiederum kein Unterschied zwischen MCT- und Kontroll-PASMC festzustellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MCT-PASMC gegenüber Kontroll-PASMC intrazellulär vermehrt Sauerstoffradikale bildeten, maßgeblich aufgrund einer erhöhten Superoxidproduktion. Da PMA-Stimulation diesen Unterschied zusätzlich verstärkte, konnte von einer PKC abhängigen ROS Quelle, wie z.B. NADPH-Oxidasen, ausgegangen werden.

Abbildung 3.3 stellt die beschriebenen Ergebnisse graphisch dar.

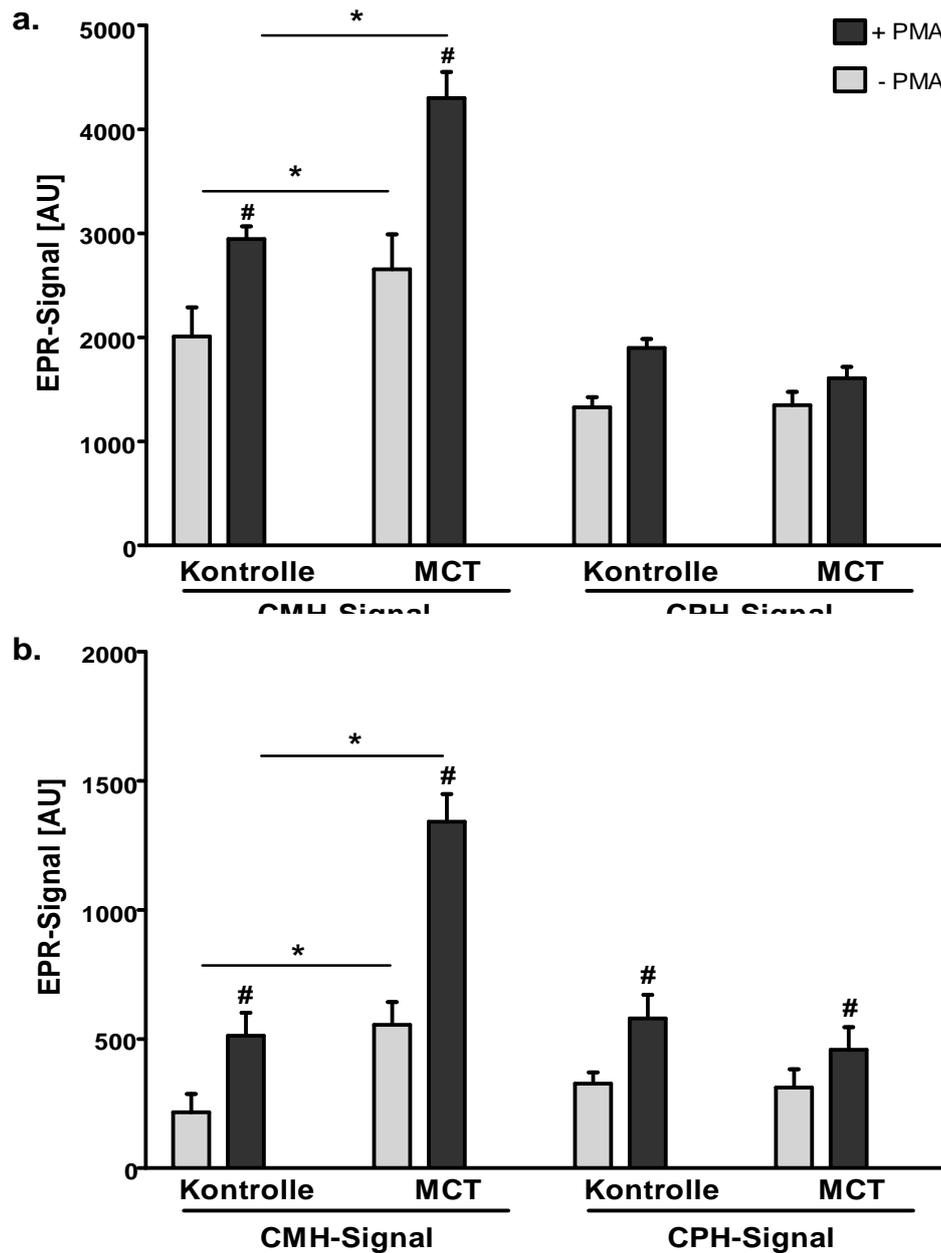


Abb. 3.3: Erhöhte intrazelluläre Superoxidproduktion in MCT-PASMC.

Das mit CMH bzw. CPH detektierbare ESR-Signal (a) und das detektierbare Superoxid von PASMC wurde mittels ESR-Spektroskopie und den *spin probes* CPH (extrazellulär) bzw. CMH (intra- und extrazellulär) gemessen. Sowohl unter basalen (graue Balken), als auch unter stimulierten Bedingungen (schwarze Balken) zeigen die MCT-PASMC ein signifikant höheres CMH-Signal (a) bzw. eine signifikant höhere Superoxidproduktion (b). Für das extrazellulär vorliegende CPH konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden. Der Superoxidanteil des Gesamtsignals wurde durch parallele Ansätze mit Sod bzw. PEG-Sod bestimmt. CMH entspricht in (b) dem intra- und extrazellulären, CPH nur dem extrazellulären Superoxid-Vorkommen. [AU] = *Arbitrary Units*. N = 12; * signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und MCT; # signifikanter Unterschied zwischen -PMA und + PMA. PMA= Phorbol 12-Myristat 13-Acetat.

3.3.2 DHE-Färbung intrazellulärer Superoxidradikale

In der vorliegenden Arbeit diente die DHE-Färbung zur Verifizierung der, mittels ESR-Spektroskopie, erlangten Daten. DHE ermöglichte intrazellulär vorhandene ROS zu messen. Die Intensität der Färbung wurde dann quantitativ zwischen MCT- und Kontroll-PASMC verglichen. DHE wird von ROS zu dem fluoreszierenden Ethidium oxidiert (Oxyethidium)²⁷⁸⁻²⁸⁰.

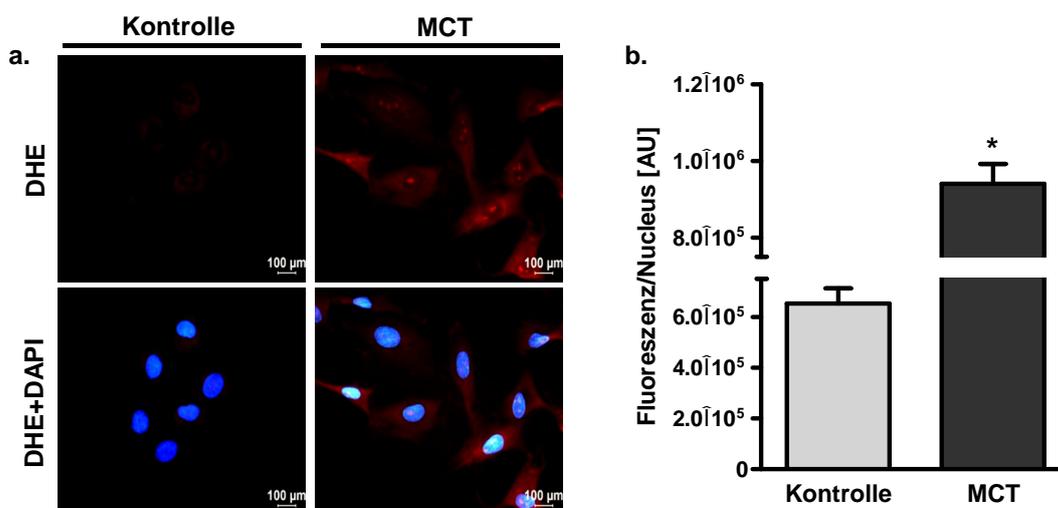


Abb. 3.4: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der DHE-Färbung intrazellulärer Superoxidradikale.

Die DHE-Färbung zeigte ebenfalls ein erhöhtes intrazelluläres ROS Aufkommen in MCT-PASMC, was anhand der intensiveren Fluoreszenz (rot) zu erkennen ist (a; Vergrößerung 400x). Die Färbungen wurden quantifiziert, indem die Fluoreszenz pro Kern (Zelle) bestimmt wurde. Die Kerne der PASMC wurden mit DAPI angefärbt und erschienen blau. Die Intensität der auftretenden Fluoreszenz wurde als integrierte Fluoreszenzdichte pro Kern gemessen und wird mit der Dimension IF/Kern (Integrierte Fluoreszenz / Kern) bezeichnet. [AU] = arbitrary units. N = 12; * signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und MCT. Je n = 12 Zellpräparationen (je 2 chamber slides) aus N = 6 Tieren.

Abbildung 3.4 zeigt eine typische DHE-Färbung intrazellulärer ROS. Das zellpermeable DHE kann in die Zelle eindringen und wird dort zu Ethidium oxidiert, welches nicht mehr zellpermeabel ist und mit der DNA interkaliert. Dadurch ist Ethidium dann als Fluoreszenz im Kern nachweisbar. Die DHE-Färbung bestätigte die ESR spektroskopischen Daten und zeigte ebenfalls eine erhöhte intrazelluläre ROS-Produktion in MCT-PASMC gegenüber den Kontrollen.

Die PASMCM der MCT-Gruppe wiesen eine wesentlich stärkere Färbung auf als die PASMCM der Kontroll-Gruppe. Das Fluoreszenzsignal war im Bereich des Kerns bei beiden Gruppen am intensivsten. Das Zytoplasma war hingegen, bei beiden Gruppen, verglichen mit dem Kernbereich, eher schwach angefärbt. Im Mittel lag die Differenz bei etwa 40 % und stellte einen signifikanten Unterschied zwischen der MCT- und der Kontroll-Gruppe dar.

3.3.3 Detektion der mitochondrialen ROS-Produktion

Um zu prüfen, ob und inwiefern die MCT-Behandlung einen Einfluss auf die mitochondriale ROS-Produktion hatte, wurde die mitochondriale Superoxidproduktion mittels MitoSOXTM Red gemessen. Die Fluoreszenzintensität wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Gegenüber den Kontroll-PASMCM, konnte in MCT PASMCM ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 3.5).

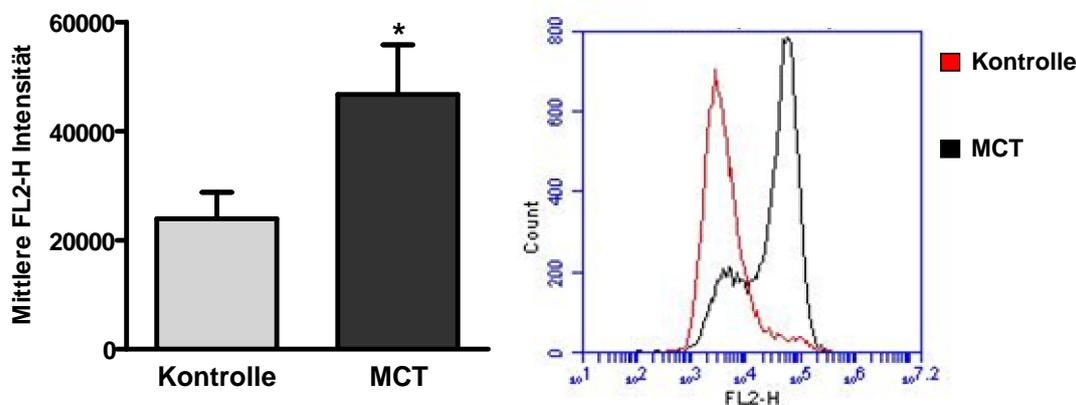


Abb. 3.5: Mitochondriale ROS-Produktion.

Die mitochondriale ROS-Produktion wurde mit MitoSOXTM Red detektiert und die entstandene Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie im FL2-H-Kanal gemessen und quantifiziert. MCT-PASMCM wiesen eine signifikant höhere mittlere FL2-H Fluoreszenzintensität auf als Kontroll-PASMCM. N=8; * signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und MCT.

Obwohl die Beobachtung einer erhöhten mitochondrialen Superoxidproduktion sehr interessant war, sollte im folgenden Verlauf dieser Arbeit nicht weiter auf die Mitochondrien als potentielle ROS-Quelle in MCT-PASMCM eingegangen werden. Der

Fokus lag auf der Rolle der NADPH-Oxidasen, deren wichtige pathophysiologische Rolle bereits in anderen Tiermodellen der PH gezeigt werden konnte²²⁹.

3.4 Erhöhte Superoxidproduktion führt zu oxidativem Stress in MCT-PASMC

Ein Anstieg der intrazellulären Produktion von Sauerstoffradikalen bedeutet nicht, dass diese notwendigerweise das physiologische Ausmaß überschreitet und zu oxidativem Stress führt. Um zu prüfen, ob MCT-PASMC oxidativem Stress ausgesetzt waren, wurde die Expression von Nrf2 (NFE2-related factor 2) untersucht. Nrf2 stellt einen der wichtigsten Regulatoren von zellulären Entgiftungsantworten und des Redox-Status dar²⁹¹⁻²⁹⁴. Die Expression von Nrf2 in MCT-PASMC, war gegenüber den Kontroll-PASMC deutlich erhöht (Abbildung 3.6).

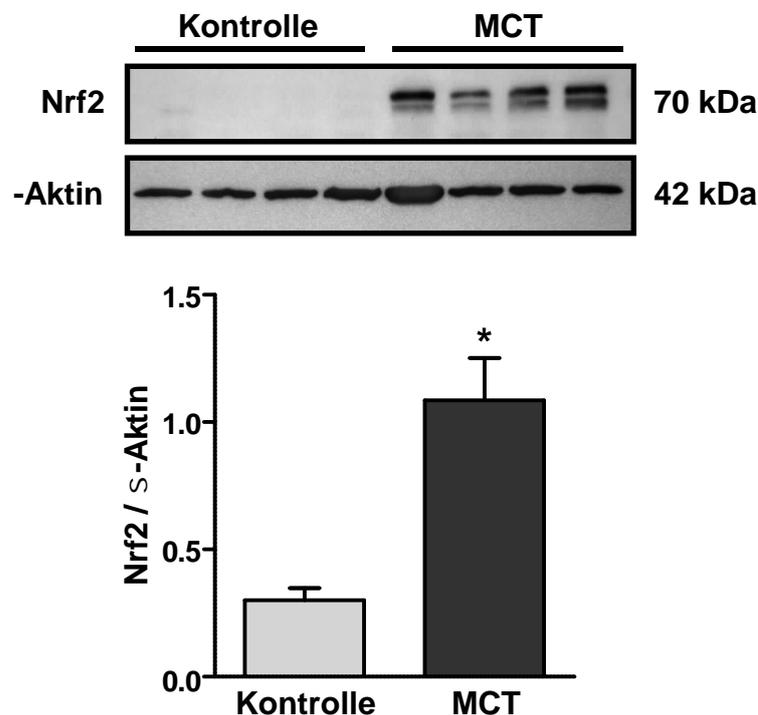


Abb. 3.6: Nrf2 ist in MCT-PASMC hochreguliert.

Western-Blot Analysen ergaben eine erhöhte Expression von Nrf2 in MCT-PASMC, im Vergleich zu Kontroll-PASMC. Die Nrf2-Expression wurde gegen β -Aktin normalisiert (Nrf2 = NFE2-related factor 2; N = 19; * signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und MCT).

3.5 Erhöhte Expression der Sod2 und gesteigerte Aktivität der totalen Sod in MCT-PASMC

Ausgehend von den Ergebnissen der ROS-Messungen, sollte die Expression der wichtigsten antioxidativen Enzyme in den PASMC ermittelt werden. Untersucht wurden die Enzyme Superoxiddismutase 1 (Sod1) und 2 (Sod2), Glutathionperoxidase 1 (Gpx1) und Katalase. Wie aus Abbildung 3.7 hervorgeht, zeigten Sod2 und Gpx1 in MCT-PASMC eine gesteigerte mRNA-Expression gegenüber Kontroll-PASMC. Auf Proteinebene konnte lediglich die Hochregulation von Sod2 bestätigt werden. Um sicherzugehen, dass ein vermehrtes Aufkommen von Sod2 auch eine erhöhte antioxidative Kapazität mit sich bringt, wurde die Aktivität der insgesamt vorhandenen Sod (Sod1 + Sod2) gemessen. MCT-PASMC wiesen eine signifikant höhere Sod-Aktivität auf als Kontroll-PASMC. Diese Messungen basierten auf der Inhibierung der Formazanbildung durch Sod.

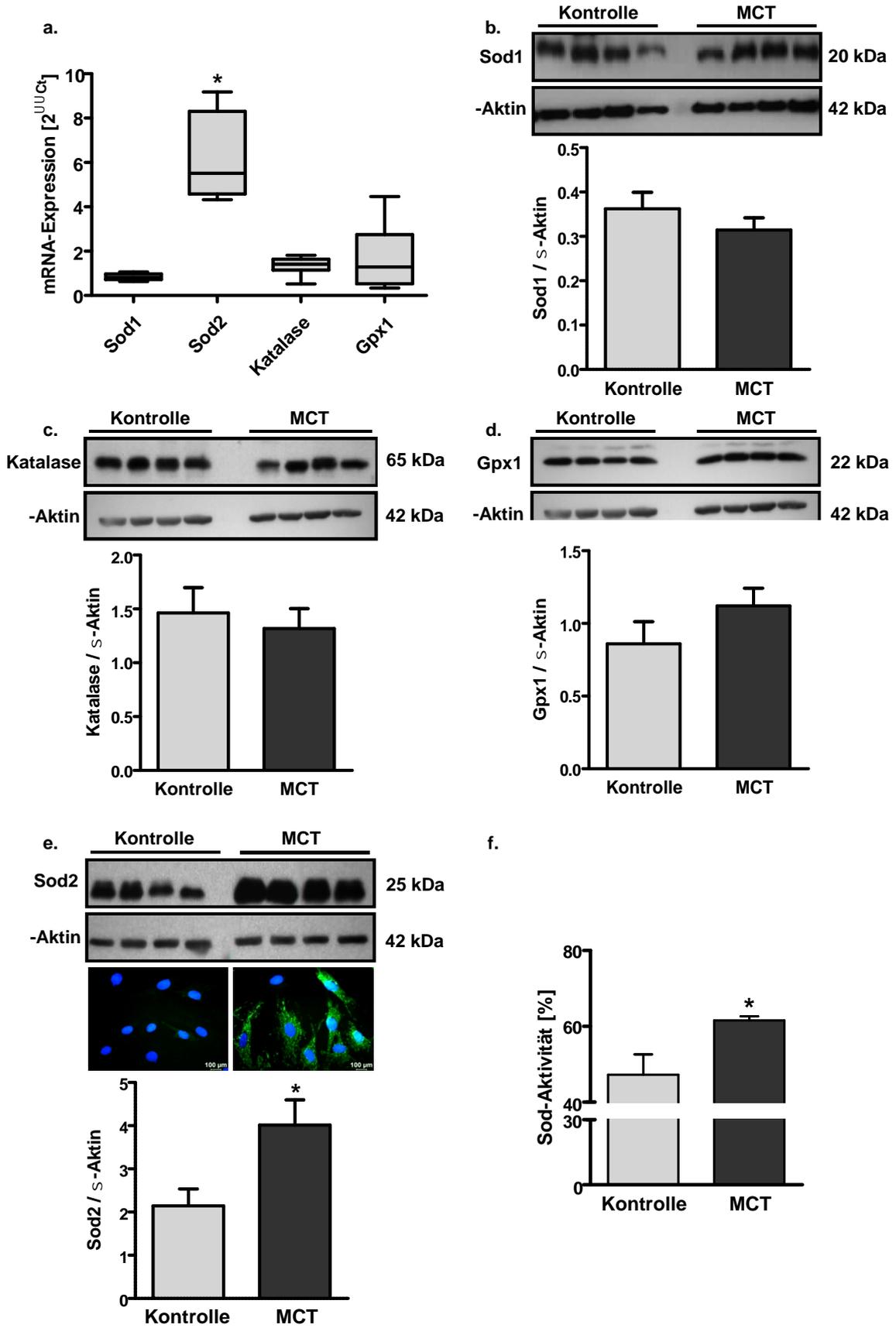


Abb. 3.7: Expression der antioxidativen Sod1, Sod2, Katalase, Gpx1 und Sod-Aktivität in PAMSC.

Mittels real time-PCR (a), western blot (b-e) und Immunfluoreszenz (e) wurde die Expression der antioxidativen Enzyme Sod1(b), Sod2 (e), Katalase (c) und Gpx1 (d) in Kontroll- und MCT-PASMC untersucht. Lediglich Sod2 (e) wies eine erhöhte Expression in MCT-PASMC auf. Um die Sod-Aktivität (f) in den PASMC bestimmen zu können wurde das wasserlösliche Tetrazoliumsalz, WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-(2,4-Disulfophenyl)-2H-Tetrazolium, Mononatriumsalz) angewandt, welches durch Reaktion mit Superoxidradikalen zu einem wasserlöslichen Formazanfarbstoff wird. Diese Reaktion wird durch Sod inhibiert. Die Bildung des Formazanfarbstoffs wurde bei einer Absorption von 440nm gemessen. Die prozentuale Sod-Aktivität wurde aus dieser Absorption berechnet. Die Expression der untersuchten Proteine wurde gegen β -Aktin normalisiert. Sod1/2 = Superoxiddismutase 1/2; Gpx1 = Glutathionperoxidase 1; MCT = Monocrotalin; N = 16; * signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und MCT. Boxen: Perzentil = 25 und 75; schwarzer Balken = Median; Whiskers: Perzentil = 0 und 100.

3.6 MCT-Behandlung führt zu gesteigerter NADPH-Oxidase 1 (Nox1)-Expression

Um die Quelle der erhöhten Superoxidproduktion unter den NADPH-Oxidase-Isoformen und -Untereinheiten eingrenzen zu können, wurde im Folgenden die Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten Nox1, Nox2, Nox4, Duox1, Duox2, NoxA1, NoxO1, p67^{phox}, p47^{phox} und Rac1 mittels real time-PCR (a) in PASMC auf mRNA Ebene untersucht.

Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, konnten alle untersuchten Untereinheiten, außer Nox2, detektiert werden. Dennoch waren Nox1 und Rac die einzigen Untereinheiten, die fünf Wochen MCT-Applikation eine veränderte Expression aufwiesen. Passend zu den mRNA-Daten, konnte die erhöhte Expression von Nox1 fünf Wochen nach MCT-Applikation, sowohl in Lungenhomogenat, als auch in PASMC auf Proteinebene bestätigt werden. Zusätzlich konnte eine erhöhte Expression der Proteindisulfidisomerase (PDI) in der Membranfraktion von MCT-PASMC nach Zellfraktionierung gezeigt werden. PDI ist ein Dithiol/Disulfidoxidoreduktase Chaperon der Thioredoxin-Familie im endoplasmatischen Retikulum und ist in die Proteinprozessierung und -Translokation von, unter anderem, Nox1 involviert²⁹⁵. Eine Redox-abhängige Anlagerung von PDI an p47^{phox} wurde ebenfalls beschrieben²⁹⁶.

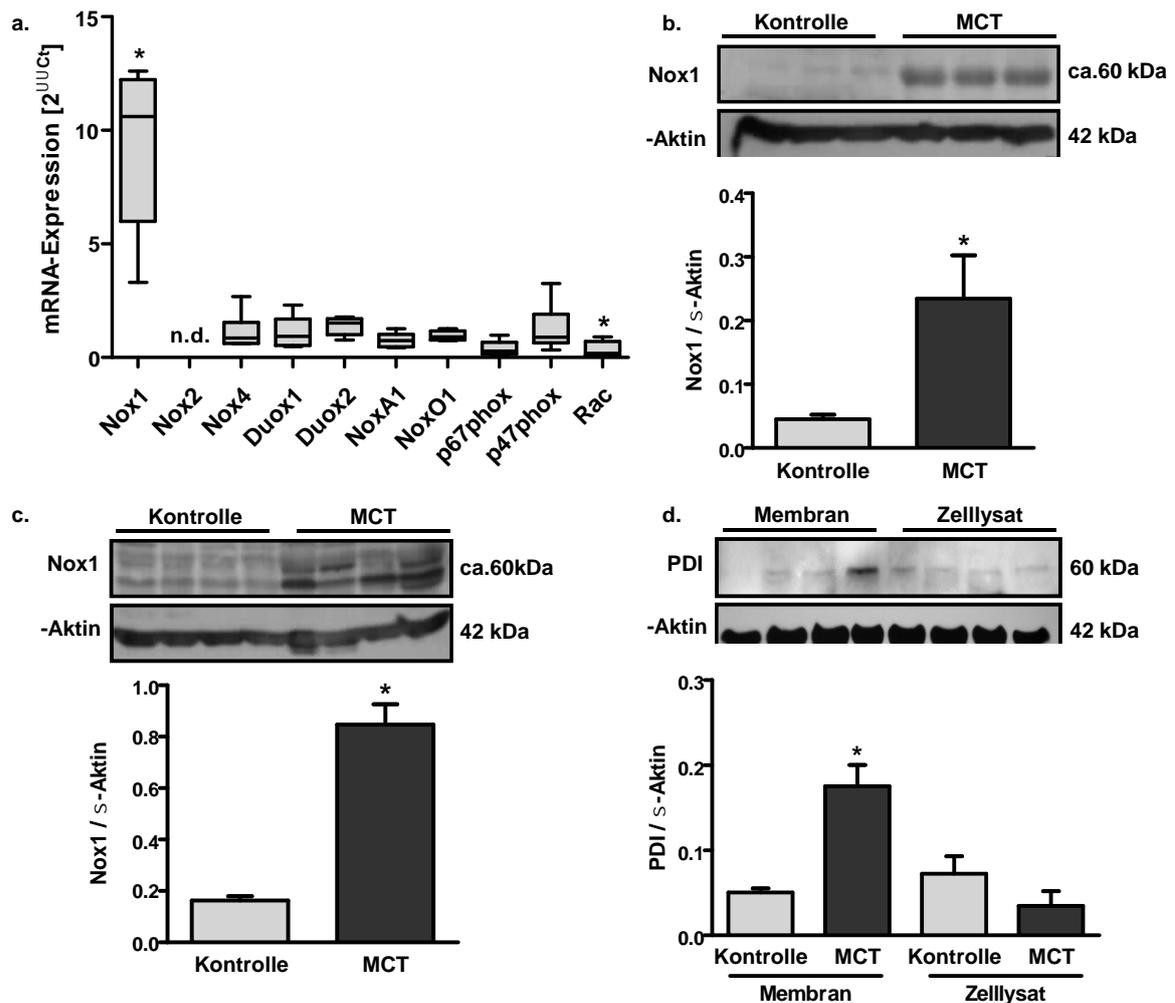


Abb. 3.8: Expression von Nox1 und PDI in Ratten-PASMC bzw. im Lungenhomogenat.

Mittels eines real time-PCR *screening* (a) und western blot-Analysen (b, c, d) wurde die Expression von Nox1, PDI und anderer NADPH-Oxidase Untereinheiten in PASMC (a, b, d) bzw. von Nox1 in Lungenhomogenat (c) von Ratten untersucht. Die real time-PCR-Daten sind als *fold regulation* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dargestellt und wurden mit gesunden Kontrollen verglichen (Kontrollen wurden auf „1“ normalisiert). Die Ergebnisse der western blot-Analysen wurden gegen -Aktin normalisiert. * signifikanter Unterschied gegenüber Kontroll-PASMC bzw. -Lungenhomogenat. N=6 unabhängige Zellpräparationen; n = 12 Experimente. PDI = Proteindisulfidisomerase. Boxen: Perzentil = 25 und 75; schwarzer Balken = Median; Whiskers: Perzentil = 0 und 100.

Unter den experimentellen Tiermodellen, kommt die MCT- induzierte PH der WHO-Gruppe I - Pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) beim Menschen am nächsten.

Vor diesem Hintergrund sollte, aufgrund der parallelen zur humanen Erkrankung, die Regulation der Nox1 in PASMC und Lungengewebe von IPAH-Patienten untersucht werden. Sowohl die erlangten real time PCR-Daten aus PASMC, als auch western blot-Daten aus Lungengewebe zeigten keine Regulation von Nox1 in IPAH-Patienten verglichen mit gesunden Donor-Zellen.

Da nur eine geringe Zellzahl für die Experimente zur Verfügung stand, konnte aus humanen PASMC keine ausreichende Proteinmenge für western blots gewonnen werden. Aufgrund der Heterogenität der Patienten-Proben traten große Schwankungen der Daten auf (Abb. 3.9).

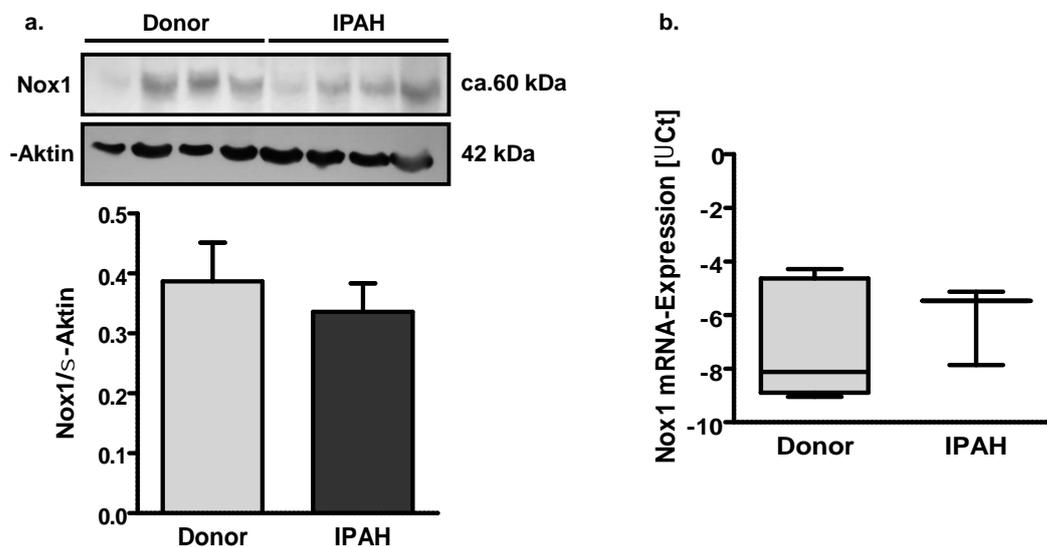


Abb. 3.9: Expression von Nox1 in humanen PASMC und Lungengewebe.

Die western blot-Analysen (a) und real time-PCR *screening* (b) zeigten keine Regulation von Nox1 in humanen PASMC (b) oder Lungenhomogenat (a). Die real time-PCR-Daten sind als Ct dargestellt. Die Ergebnisse der western blot-Analysen wurden gegen β -Aktin normalisiert. N=8 unabhängige Präparationen. Boxen: Perzentil = 25 und 75; schwarzer Balken = Median; Whiskers: Perzentil = 0 und 100.

3.7 Lokalisierung der Nox1

Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung konnte die Expression von Nox1 mRNA in verschiedenen Zelltypen von Rattenlungenschnitten nachgewiesen werden, jedoch hauptsächlich in der *Tunica media* kleiner, präkapillärer Pulmonalarterien (bestätigt durch Kolo-kalisation mit α -sma; Abbildung 3.10).

Nichtvaskuläre Bereiche, die eine positive Färbung für Nox1 mRNA zeigten, stellen bronchiale glatte Muskelzellen dar. Hier konnte jedoch keine Kolo-kalisation festgestellt werden. Auch im Endothel der Pulmonalarterien war eine deutliche Expression des Nox1-Transkripts zu erkennen, allerdings wurde keine Endothelfärbung zur Verifizierung durchgeführt.

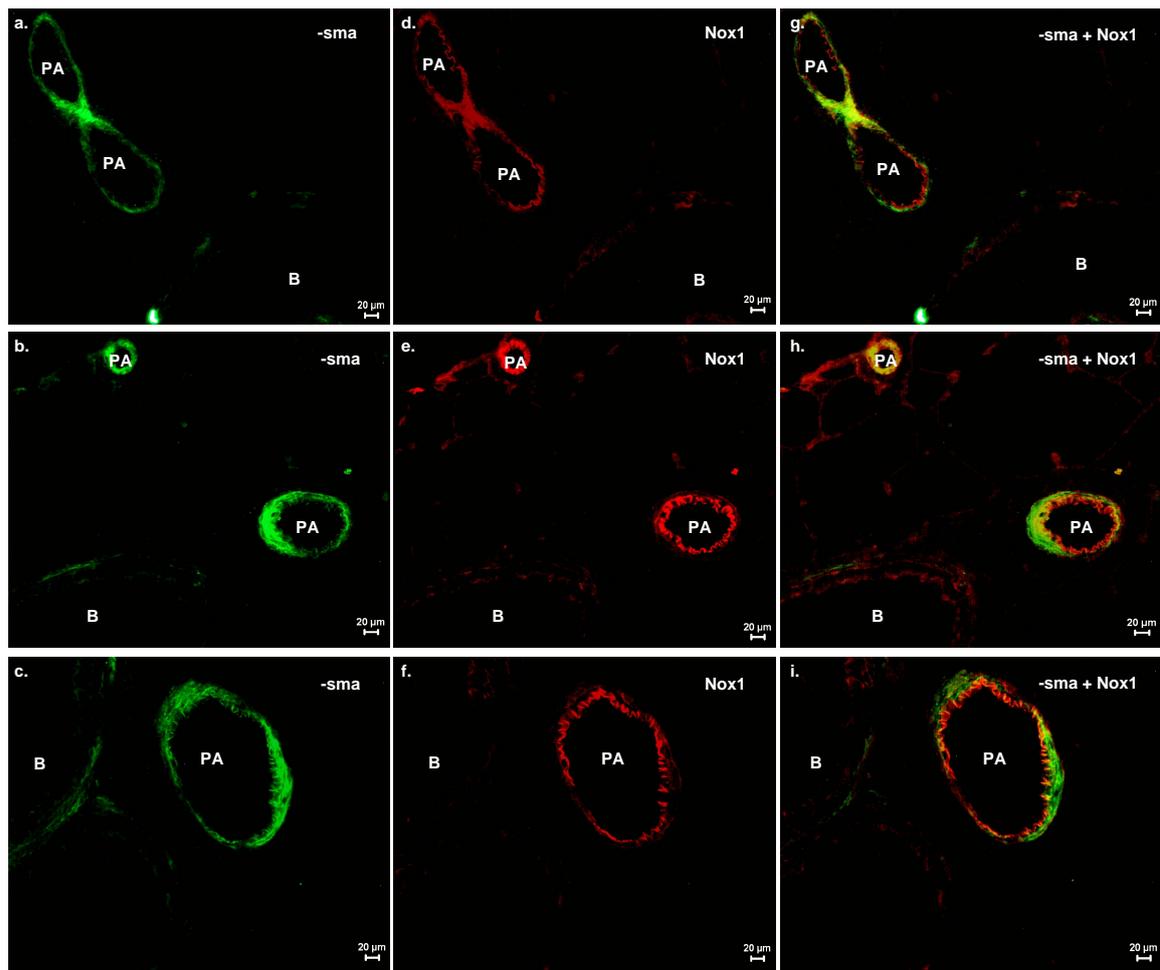


Abb. 3.10. Lokalisation von Nox1 in Rattenlungenschnitten.

Mittels nicht-isotopischer *in situ* Hybridisierung (NISH) wurde die Expression der Nox1 mRNA in Kryoschnitten von Rattenlungen sichtbar gemacht. Die Bilder a, b und c zeigen eine Färbung mit einem FITC - markierten Antikörper gegen -sma (grüne Fluoreszenz). Die Bilder d, e und f zeigen dieselben Bereiche nach Hybridisierung mit der Nox1 *antisense*-Sonde (rote Fluoreszenz). Die Überlagerung beider Färbungen zeigt die Lokalisation der Nox1-Transkripte, unter anderem mit -sma in der glatten Muskelschicht kleiner Pulmonalarterien (gelbliche Fluoreszenz; g, h ,i). B = Bronchus; PA = Pulmonalarterie; Nox1 = NADPH-Oxidase 1; -sma = *alpha-smooth muscle actin*. Vergrößerung = 200x.

3.8 Nox1 als Quelle der erhöhten Superoxidproduktion in MCT-PASMC

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte Expression von Nox1 die Ursache für die erhöhte Superoxidproduktion in MCT-PASMC war, wurden mRNA-Interferenz Experimente durchgeführt. Die PASMC beider Gruppen wurden dabei mit einer siRNA (*small interference RNA*) transfiziert, welche mit der Nox1-mRNA hybridisierte und zum Abbau des Nox1-Transkripts führte. Somit konnte die Produktion des Nox1-Proteins verringert werden. Anschließend wurden ROS-Messungen mittels ESR-Spektroskopie durchgeführt. Abbildung 3.11 zeigt die erlangten Daten. Es wurden der stimulatorische Effekt von PMA (c) und die Superoxidproduktion nach PMA-Stimulation (d) gemessen. Für diese Experimente mussten alle Zellen mit PMA stimuliert werden, da die basale ROS-Produktion nach der siRNA-Transfektion unter dem Detektionslimit lag. Zudem wurden keine Messungen mit CPH durchgeführt, sondern nur mit CMH, da mit CPH keine Unterschiede gemessen werden konnten (siehe Abbildung 3.11). Weiter lag der Fokus ausschließlich auf der Superoxidproduktion, da Nox1 ein Superoxid produzierendes Enzym ist¹⁶⁶. Der Nox1 *knockdown* führte zur Normalisierung der erhöhten intrazellulären Superoxidproduktion in MCT-PASMC. In nicht-transfizierten MCT-PASMC hatte PMA einen weitaus größeren stimulatorischen Effekt auf die Superoxidproduktion als in Kontroll-PASMC. Auch hier verursachte der Nox1 *knockdown* einen Rückgang der Stimulierbarkeit der MCT-PASMC durch PMA auf Kontroll-Level. Diese Ergebnisse identifizierten Nox1 als eine wichtige Quelle der erhöhten Superoxidproduktion in PASMC nach MCT-Injektion. Die Superoxidproduktion der Kontroll-PASMC wurde durch den Nox1 *knockdown* nicht signifikant beeinflusst.

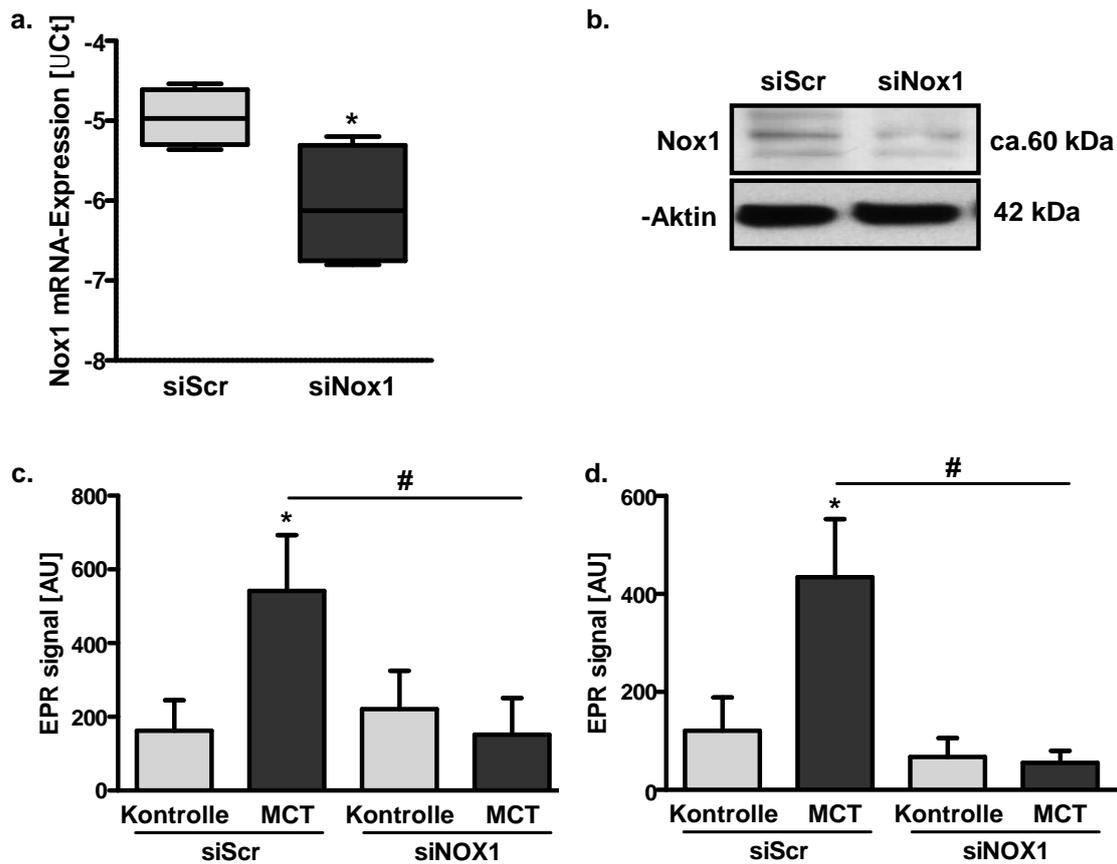


Abb. 3.11: Einfluss von Nox1 siRNA auf die Superoxidproduktion nach PMA-Stimulation der PASMC.

Real-time PCR and Western-Blot der Nox1-Interferenz (a und b), Stimulatorischer Effekt von PMA (c) und Superoxidproduktion (d). Die Transfektion der MCT-PASMC mit Nox1-spezifischer siRNA führte zu einem signifikanten Rückgang des stimulativen-Effekt von PMA auf MCT-PASMC (c) und normalisierte die Superoxidproduktion (d). Auf Kontroll-PASMC hatte die siRNA-Transfektion, in diesem Fall, keinen signifikanten Effekt. [AU] = arbitrary units; EPR = Elektronenparamagnetische Resonanz; MCT = Monocrotalin; Scr = *scrambled*; Nox1 = NADPH-Oxidase 1; siRNA = *small interference RNA*; N = 8; Zwei Messungen pro Tier; * signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und MCT; # signifikanter Unterschied zwischen siScr und siNox1.

3.9 Superoxid von Nox1 verursacht beschleunigte Migration und Proliferation von PASMC

MCT-induzierte PH ist mit einer gesteigerten Proliferation und Migration von PASMC verbunden, was in medialer Hypertrophie und Neomuskularisierung präkapillärer Gefäße resultiert ^{297, 298}. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Superoxidproduktion durch Nox1 zur Aktivierung einer Vielzahl von Signalkaskaden führt. So kann Nox1 über p38 MAP kinase/mitogen-activated protein kinase activated protein kinase-2 (MAPKAPK2)/Akt, Hypertrophie induzieren ²⁹⁹⁻³⁰¹. Neben Hypertrophie wurde Nox1 außerdem mit Migration in Verbindung gebracht ³⁰²⁻³⁰⁴. Die Effekte von Nox1 auf die nachfolgende Migration-Signalkaskade werden durch die Aktivierung der p21-activated protein kinase-1 (PAK1) ³⁰⁵, die Dephosphorylierung/Aktivierung von Cofilin ³⁰⁶ sowie die Aktivierung von *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) mit anschließender Phosphorylierung des zytoskelettalen Adapterproteins Paxillin vermittelt ³⁰⁴. Auch bei der Proliferation konnte gezeigt werden, dass Nox1 eine essentielle Rolle spielt und z.B. Cyclin D1 konnte als Ziel der mit Nox1 verbundenen Zellzyklusregulation, ausgemacht werden ^{307, 308}. Über anhaltende JNK-Aktivierung kann Nox1 auch Apoptose und Nekrose einleiten ³⁰⁹.

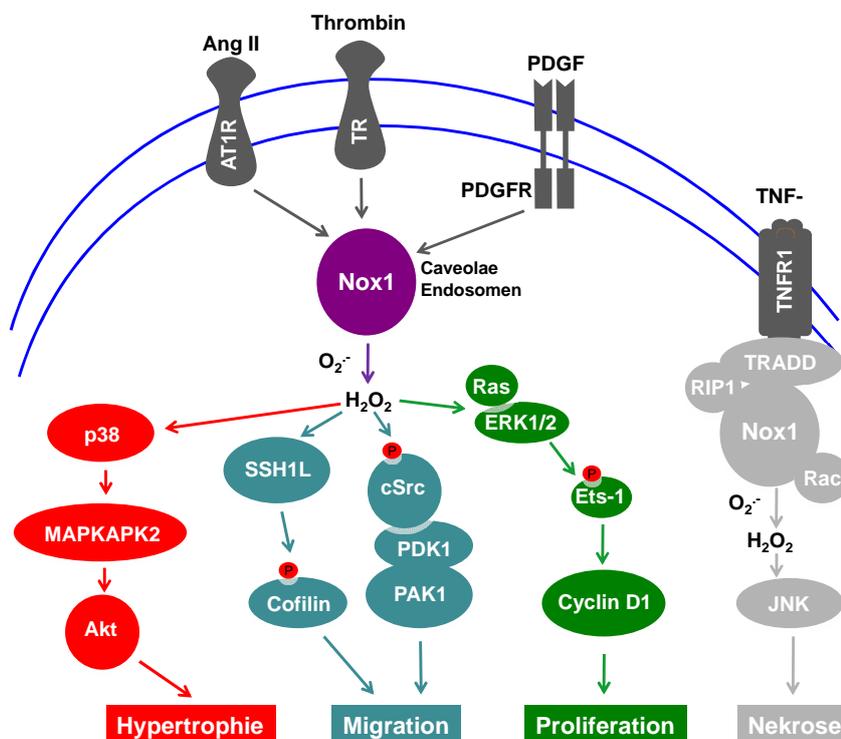


Abb. 3.12: Nox1-Signalwege

Verändert nach Brown und Griendling 2009 ³¹⁰.

Unter basalen Bedingungen konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden, dass MCT-PASMC schneller migrierten und proliferierten als Kontroll-PASMC. Im Gegensatz dazu, hatte die MCT-Behandlung keinen Effekt auf die Apoptose der PASMC. Da bekannt war, dass Nox1 anormales vaskuläres Wachstum herbeiführen kann³¹¹, wurden erneut *knockdown*-Experimente mit Nox1-spezifischer siRNA durchgeführt. Diese Versuche sollten aufklären, ob Nox1 die Ursache für die erhöhte Proliferation und Migration von MCT-PASMC war. Der Nox1-*knockdown* führte zwar zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation in beiden Gruppen, brachte die Proliferation der MCT-PASMC jedoch auf das Ausgangsniveau der Kontroll-PASMC. In ähnlicher Weise wurde die Migration der MCT-PASMC durch den Nox1-*knockdown* beeinflusst. Die gesteigerte Migration der MCT-PASMC konnte auf Kontroll-Niveau reduziert werden, wobei die Transfektion keinen Einfluss auf die Migration der Kontroll-PASMC hatte. Die Apoptose der PASMC wurde weder durch MCT-Behandlung, noch durch den Nox1-*knockdown* beeinflusst.

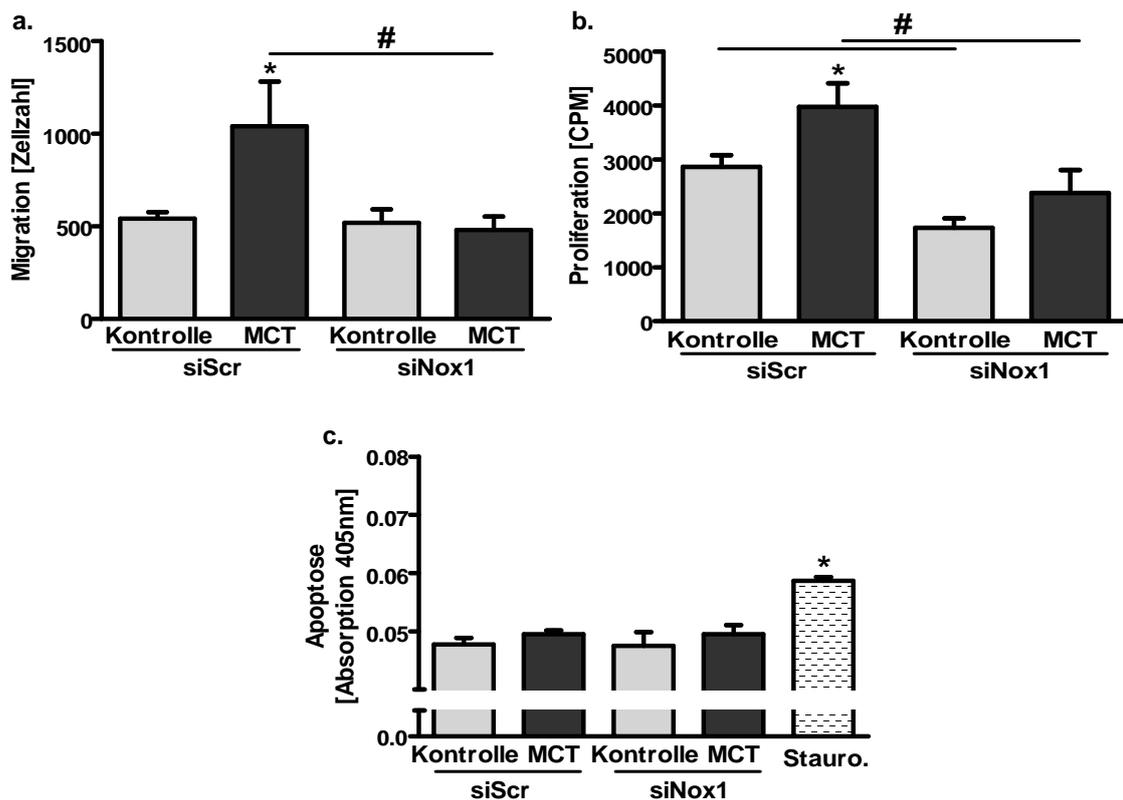


Abb. 3.13: Einfluss von MCT und Nox1 *knockdown* auf Proliferation, Migration und Apoptose der PASMC.

Mittels *Transwell*-Migration, [³H]Thymidin-Einlagerung und Caspase-Aktivität wurden Migration, Proliferation und Apoptose der PASMC nach MCT-Behandlung und Nox1 *knockdown* untersucht. Die Zellen wurden 96 Std. nach siRNA Transfektion für das jeweilige Experiment aufbereitet. MCT verursachte einen Anstieg von Migration (a) und Proliferation (b) der PASMC.

Der Nox1 *knockdown* führte zur Normalisierung dieses Anstiegs. Weder MCT noch der Nox1 *knockdown* hatten einen Einfluss auf die Apoptose (c) der PSMC. Alle Proben wurden als Duplikate gemessen. N=6-12; stauro=staurosporin (Positivkontrolle); Scr = *scrambled*; * signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen; # signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen.

Übereinstimmend mit der erhöhten Proliferation und Migration von MCT-PASMC, konnte in diesen Zellen eine erhöhte Expression von Cyclin D1 und gesteigerte Phosphorylierung von Cofilin nachgewiesen werden. Allerdings wurden keine signifikanten Änderungen der totalen Cofilin Expression beobachtet.

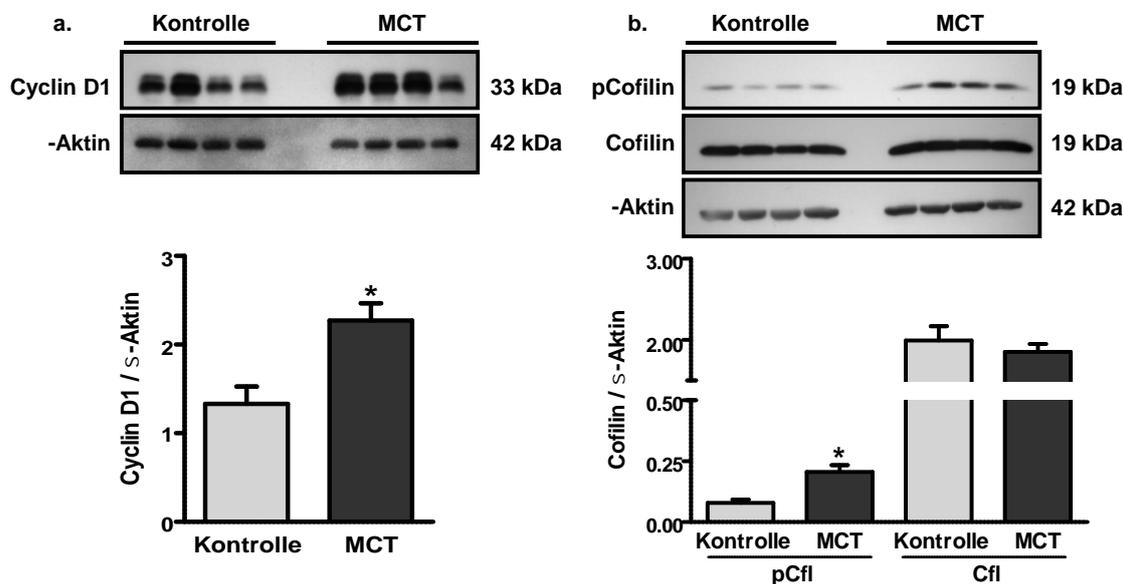


Abb. 3.14: Expression von Cyclin D1, Cofilin und Phosphorylierung von Cofilin.

Mittels western blot-Analyse wurde die Expression von Cyclin D1 (a), Cofilin (b) und die Phosphorylierung von Cofilin in Kontroll- und MCT-PASMC untersucht. In MCT-PASMC konnte eine erhöhte Cyclin D1-Expression (a), sowie eine gesteigerte Phosphorylierung von Cofilin (b) nachgewiesen werden. Die Expression von Cyclin D1 wurde gegen -Aktin, die Phosphorylierung von Cofilin gegen die totale Cofilin-Expression normalisiert. pCofilin = phospho Cofilin; Cfl = Cofilin; N = 16; * signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und MCT.

Die Expression und Phosphorylierung von JNK, Akt und PAK1 wiesen ebenfalls keine signifikanten Änderungen auf (Abb. 3.15).

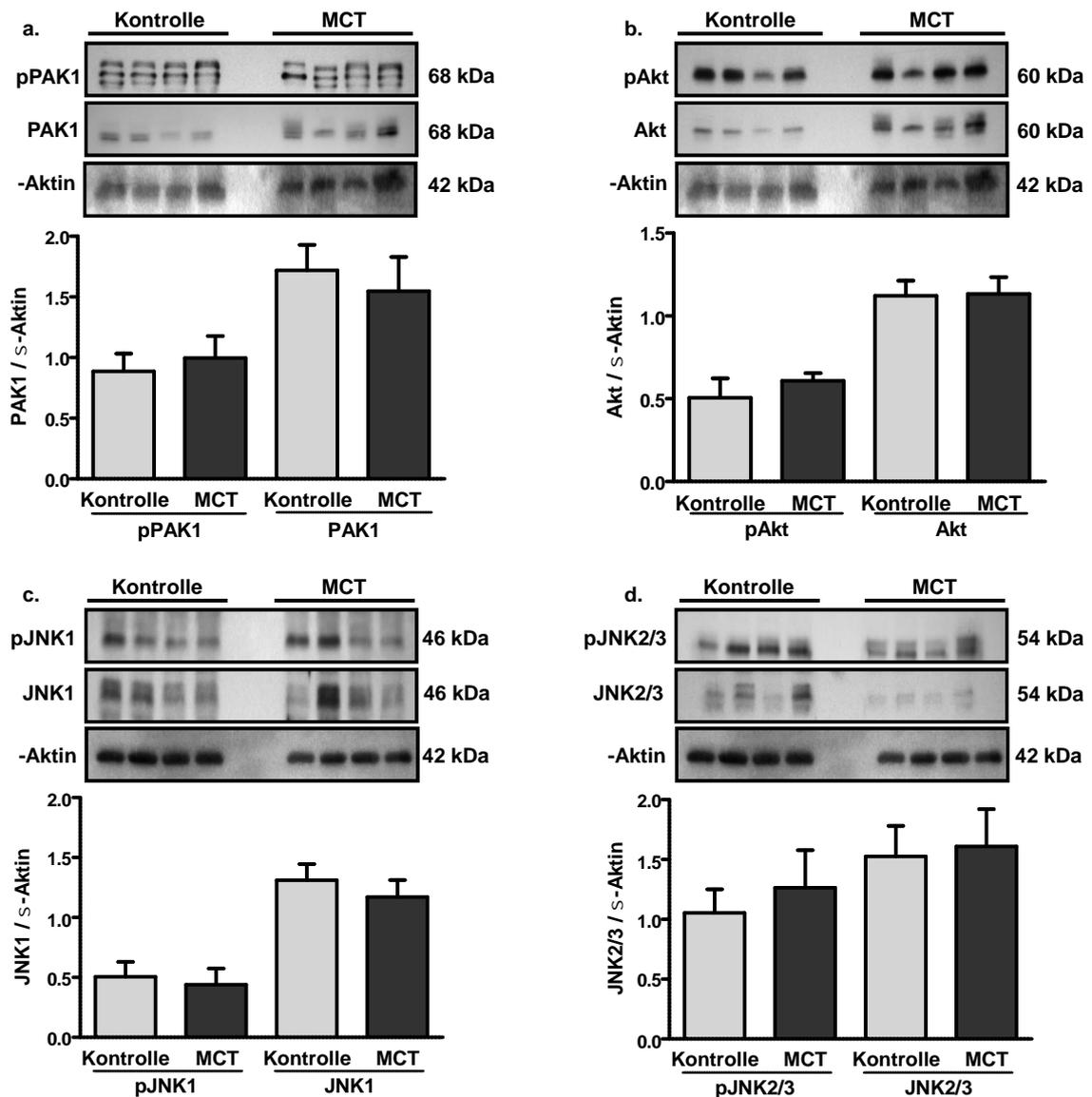


Abb. 3.15: Expression und Phosphorylierung von Akt, PAK1 und JNK 1/2/3.

Mittels western blot-Analyse wurde die Expression von PAK1 (a), Akt (b), JNK1 (c) und JNK2/3 ermittelt. MCT- und Kontroll-PASMC wiesen keine Unterschiede auf. Die Expression wurde gegen -Aktin, die Phosphorylierung von Cofilin gegen die totale Expression normalisiert. PAK1 = *p21-activated protein kinase-1*; JNK = *c-Jun N-terminal kinase*; N = 16.

Um sicherzustellen, dass Nox1 für die Änderungen in der Cyclin D1-Expression bzw. der Cofilin-Phosphorylierung verantwortlich ist, wurde auch hier die Expression von Nox1 mittels *small interference RNA* supprimiert. Zudem sollte an dieser Stelle geprüft werden, ob die Expression von Nrf2 und Sod2 durch eine verringerte Nox1-Expression beeinflusst werden konnte. Die Behandlung von MCT-PASMC mit Nox1 siRNA führte zu einem signifikanten Rückgang der Cyclin D1 und Nrf2 Expression. Die Phosphorylierung von Cofilin blieb durch den Nox1 *knockdown* unbeeinflusst. Ähnliches galt auch für die

Expression von Sod2, obwohl sich hier deutlich eine tendenzielle Verringerung der Expression zeigte (Abb. 3.16).

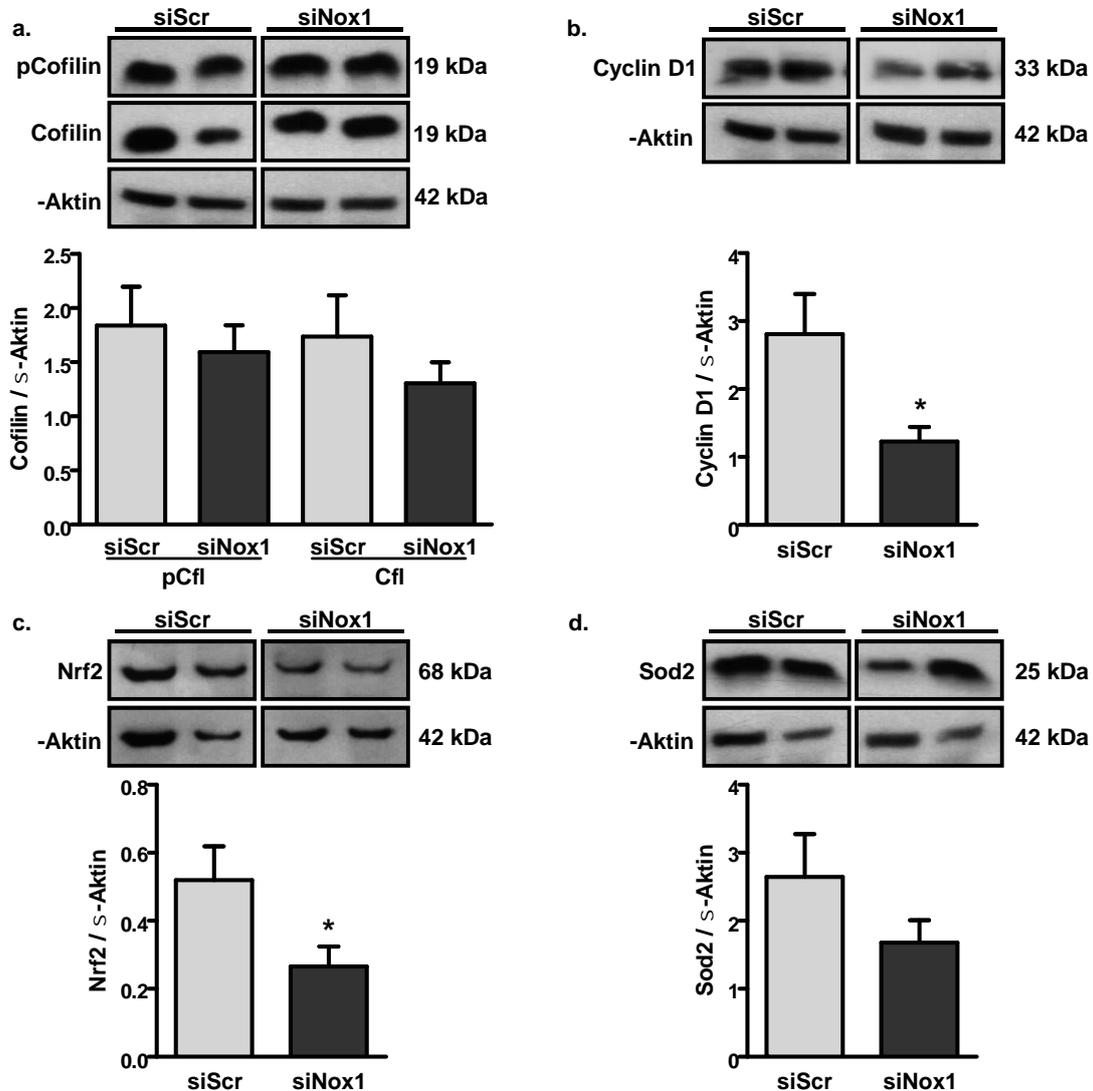


Abb. 3.16: Einfluss der Nox1 siRNA-Behandlung auf die Expression von Cyclin D1, Sod2, Nrf2 und die Phosphorylierung von Cofilin.

Mittels western blot-Analyse wurde die Expression von Cyclin D1 (b), Nrf2 (c), Sod2 (d) und die Expression bzw. Phosphorylierung von Cofilin (a) in MCT-PASMC nach Nox1 siRNA-Behandlung untersucht. Die Expression wurde gegen -Aktin, die Phosphorylierung von Cofilin gegen die totale Expression normalisiert. Sod2 = Superoxiddismutase 2; Nrf2 = NFE2-related factor 2; pCofilin = phospho Cofilin; Cfl = Cofilin; Scr = *scrambled*; si = *small interference*; Nox1 = NADPH-Oxidase 1; N = 20. * signifikanter Unterschied zwischen siScr und siNox1.

3.10 Potentieller Mechanismus zur Aktivierung der Nox1 im Modell der MCT-induzierten PH

Die Expression und Aktivität von Nox1 kann von verschiedenen Faktoren induziert werden (siehe Abbildung 3.12). Im Modell der MCT-induzierten PH geht man von einer Endothelschädigung durch MCT-Pyrrol (in der Leber aktiviertes MCT) im pulmonalvaskulären Gefäßbett aus, welche zur Freisetzung unterschiedlichster Wachstumsfaktoren führt. Unter anderem kommt es dabei zur Freisetzung von PDGF (*platelet derived growth factor*). Über PDGF ist bekannt, dass es sowohl die Expression als auch die Aktivierung von Nox1 induzieren kann^{166, 310}. Weiter konnte bereits gezeigt werden, dass es im Modell der MCT-induzierten PH zu einer vermehrten Expression und Phosphorylierung des PDGFR (PDGF-Rezeptor) kommt³¹². Um der Frage nachzugehen, ob die Freisetzung von PDGF nach einer Endothelschädigung durch MCT-Pyrrol die Nox1-Expression in PASMOC induzieren kann, wurden MCT- und Kontroll-PASMC mit PDGF stimuliert.

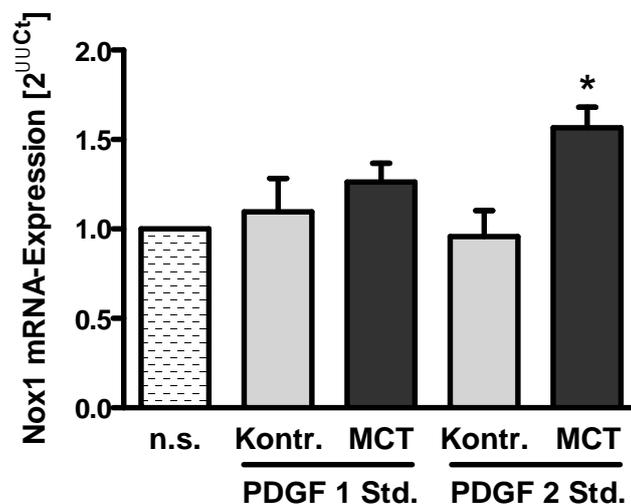


Abb. 3.17: Effekt der PDGF-Stimulation auf die Nox1-Expression in MCT- und Kontroll-PASMC.

Mittels real-time PCR wurde die Expression von Nox1 auf mRNA-Ebene untersucht. Die Zellen wurden mit PDGF (5ng/ml) im Kulturmedium stimuliert und dann für die Isolation der mRNA lysiert. Die Nox1-Expressionsdaten sind als *fold regulation* dargestellt. Std. = Stunde/n; n.s. = nicht stimuliert. * signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und MCT.

Die PASMOC beider Gruppen wurden für eine bzw. zwei Stunden mit PDGF stimuliert. Nach zwei Stunden Stimulation zeigten MCT-PASMC eine signifikante Erhöhung der Nox1 mRNA-Expression. Die Nox1-Expression der Kontrollen blieb sowohl eine, als auch zwei Stunden nach Stimulation unverändert.

4 Diskussion

Im Modell der durch chronische Hypoxie induzierten PH konnte eine Regulation der NADPH-Oxidase Nox4 in PASMC gezeigt werden, welche mit einer erhöhten ROS-Produktion einherging²²⁹. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob ähnliche Mechanismen im inflammatorischen Tiermodell der MCT-induzierten PH bei Ratten zu beobachten sind. Zudem galt das Interesse der Quelle einer evtl. erhöhten ROS-Produktion und dem Einfluss einer erhöhten ROS-Produktion auf die zelluläre Physiologie und Funktion. Es konnte gezeigt werden, dass die einmalige Injektion von 60mg/kg Körpergewicht MCT nach fünf Wochen zur Ausbildung einer starken PH führte. Die Tiere wiesen ein signifikantes vaskuläres *Remodeling*, einen erhöhten RVSP und eine deutliche Rechtsherzhypertrophie auf (Abbildung 3.1). Weiter wurde eine erhöhte intrazelluläre Superoxidproduktion in mikrovaskulären PASMC gemessen, die auf einen Anstieg der Nox1 Expression bzw. Aktivität zurückgeführt werden konnte. Dieser Anstieg der ROS-Produktion führte zu einer vermehrten, Nox1-abhängigen Migration und Proliferation von PASMC und könnte eine wichtige Rolle für das vaskuläre *Remodeling* präkapillärer Gefäße nach MCT-Injektion spielen.

Für die Induktion von PH in Tieren wurde eine Vielzahl von experimentellen Tiermodellen etabliert. Unter diesen Modellen sind die chronische alveoläre Hypoxie (CAH)- und die MCT-induzierte PH wohl die bedeutendsten. Bei CAH führen die anhaltende Vasokonstriktion und der damit einhergehende Druckanstieg zur Ausbildung einer akuten PH, welche durch das vaskuläre *Remodeling* morphologisch fixiert wird^{18, 64}. MCT ein Phytotoxin aus den Samen von *Crotalaria spec.* und wird nach subkutaner Injektion in der Leber zu Dehydromonocrotalin verstoffwechselt^{313, 314}. Dieser Metabolit führt dann in den pulmonalvaskulären Gefäßen der Lunge zu einer Endothelschädigung, indem Dehydromonocrotalin kovalent an zytosolische Proteine (z.B. Galectin-1), Proteine des Zytoskeletts (z.B. Aktin und Tropomyosin) und an die DNA bindet. Durch diesen toxischen Stimulus kommt es vermutlich zur Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen⁸. MCT hat einen selektiven Effekt auf pulmonale Gefäße, da die Lunge distal der Leber das erste große Gefäßbett darstellt. Dort schädigt MCT-Pyrrol das Endothelium^{30, 315}. Beide Modelle (Hypoxie, MCT)³⁰ weisen große Unterschiede auf. Die wichtigsten sind wohl, dass im MCT-Modell zwar keine Vasokonstriktion stattfindet, allerdings kommt es zu einer starken inflammatorischen Antwort, gefolgt von endotheliale Zelltod³⁰. Eine direkte Schädigung von Gewebe tritt im Hypoxie-Modell nicht auf. Gemeinsame

hämodynamische und histologische Charakteristika sind der vaskuläre Gefäßumbau, ein erhöhter RVSP und die Rechtsherzhypertrophie.

Das Modell der MCT-induzierten pulmonalarteriellen Hypertonie ist ein Tiermodell, welches dem drastischen klinischen Verlauf und der damit verbundenen Sterblichkeit der IPAH des Menschen am nächsten kommt⁸. Die strukturellen Änderungen in MCT-induzierter pulmonaler Hypertonie ähneln sehr stark den Charakteristika der humanen PAH, wie z.B. die Verdickung und Proliferation der Media, Proliferation der *Intima* und die Formation plexiformer Läsionen (Abb. 3.1). Dies alles resultiert in einem dramatischen Rückgang der Kapazität der Widerstandsgefäße und damit zu einem erhöhten Widerstand^{316, 317}. Hauptsächlich kommt es zu einer verstärkten Migration und Proliferation von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC). Die Muskularisierung von bereits muskularisierten Gefäßen nimmt drastisch zu und nicht-muskularisierte Gefäße erfahren eine *de novo*-Muskularisierung^{8, 315}. Diese Prozesse werden dann als Gefäßumbau (*Remodeling*) bezeichnet³¹⁷. Der genaue Vorgang, durch den Dehydromonocrotalin einen Gefäßumbau induziert ist weiterhin unklar. Die proliferativen Gefäßveränderungen in den Lungengefäßen sind sehr schwerwiegend, so dass es zu einer deutlichen Verringerung des ursprünglichen Gefäßquerschnittes kommt. Dadurch steigt der Blutdruck in den pulmonalen Gefäßen erheblich an. Um diesem konstanten Druckanstieg standhalten zu können, kommt es zu weiteren proliferativen Veränderungen der *Tunica media*, was wiederum einen Rückgang des Lumens und so einen weiteren Blutdruckanstieg zur Folge hat. Die Verringerung des Gefäßquerschnitts in den pulmonalen Gefäßen führt außerdem zu einer Erhöhung des Fließwiderstandes. Um diesen Widerstand überwinden zu können, muss die rechte Herzkammer eine bedeutend größere Kraft aufbringen, als unter normalen Umständen. Dies resultiert in einer starken, nachhaltigen Hypertrophie der rechten Herzkammer (Rechtsherzhypertrophie, *Cor pulmonale*)^{92, 318-320}. Die Herzratio nimmt also zu (Abb. 3.1).

Da das Modell der MCT-induzierten PH auf einem toxischen, inflammatorischen Stimulus beruht, ist es mit diesem Modell nicht möglich den Krankheitsverlauf der IPAH des Menschen exakt zu kopieren. Dennoch besteht eine große Ähnlichkeit. Es sollte nochmals erwähnt werden, dass die Endothelschädigung durch Dehydromonocrotalin nur der Auslöser für die pathogenen Gefäßveränderungen ist, da Dehydromonocrotalin nach 24 Stunden von den Nieren ausgeschieden wird⁸³. Die, durch MCT-Injektion, initiierten pathogenen Prozesse erhalten sich dann selbständig aufrecht. Die Nachteile des MCT-Modells sind, dass nicht alle typischen Gefäßveränderungen des Menschen, wie plexiforme

Läsionen und Neointima-Bildung, nachvollzogen werden können³¹⁶. Dies ist bisher jedoch bei keinem Tiermodell möglich, welches allein auf einem Auslöser beruht³⁰. Im Vergleich zur Hypoxie-induzierten PH kann bei dem MCT-Modell keine Vasokonstriktion oder Polyzythämie beobachtet werden, jedoch entwickelt sich eine stark inflammatorische Reaktion mit endotheliale Zelltod in kleinen Arteriolen, Reduktion der Anzahl peripherer Arterien und einer deutlichen Zunahme des Verhältnisses von Alveolen zu Arterien, die beim Hypoxie-Modell ausbleibt³⁰.

Verglichen mit dem Modell der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie bei der Ratte ist das Hypoxie-Modell sowohl klinisch als auch pathohistologisch weniger schwerwiegend als das MCT-Modell. Eine erhöhte Sterblichkeitsrate und deutliche proliferative Gefäßveränderungen fehlen und es wird postuliert, dass die Hypoxie-induzierten vaskulären Veränderungen zum Teil vasokonstriktorischer Natur sind und es zu keinem konzentrischen Gefäßumbau mit Verringerung des Lumens kommt⁵⁹. Es besteht jedoch kein Zweifel, dass auch chronische Hypoxie durch einen strukturellen Gefäßumbau von Gefäßen arteriellen Ursprungs begleitet wird³²¹. Die Hypoxie bedingten Gefäßumbauprozesse sind nach Verbringen der Tiere in normale Raumluft teilweise reversibel¹⁴. Auch im MCT-Modell kann der Gefäßumbau zu einem Großteil rückgängig gemacht werden, dies ist jedoch nur durch eine pharmakologische Behandlung möglich^{312, 316}.

Proliferation und Migration von hauptsächlich PASMC, welche eine verstärkte und *de novo* Muskularisierung der mikrovaskulären Region der Pulmonalarterie verursachen, sind die Hauptursache des vaskulären *Remodelings* in beiden Modellen^{77, 322, 59}. Daher wurden diese Zellen für die folgenden Experimente als Forschungsobjekt verwendet. Zur Identifizierung der isolierten Zellen aus MCT- und Kontroll-Tieren wurden diese mittels der direkten Immunfluoreszenztechnik angefärbt. Obwohl Aktin eines der am stärksten konservierten eukaryotischen Proteine ist, kommt es in Säugetieren und Vögeln in sechs Isoformen vor. Nur zwei davon repräsentieren Marker, welche glatte Muskelzellen von anderen Zelltypen unterscheiden. Diese sind α - und β -glattmuskuläre Aktin. Beide Isoformen weisen ein zelltypisches Expressionsmuster in glatten Muskelzellen auf und können daher als Marker verwendet werden. Die Aktin-Isoformen weisen insgesamt eine Sequenzhomologie von >90% auf, aber nur 50-60% im N-Terminus. Die N-terminale Region von Aktin stellt damit den antigenen Bereich des Proteins dar²⁸⁵.

Sowohl in MCT-Zellen als auch in Kontroll-Zellen war eine deutliche Färbung von α -sma zu erkennen. Allerdings wiesen die MCT-PASMC eine etwas höhere Intensität der

Färbung auf und die Anordnung der α -SMA-Stränge erschien weniger organisiert als bei Kontroll-PASMC, was auf eine morphologische Veränderung der MCT-PASMC durch die MCT-Behandlung schließen ließ. Durch die Färbung von α -SMA konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um glatte Muskelzellen aus der Pulmonalarterie (PASMC) handelte. In anderen Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, fiel die Färbung von α -SMA negativ aus (mündliche Mitteilung, B. Fuchs). Zudem wiesen die Zellen, die typische Morphologie glatter Muskelzellen auf.

Es ist sowohl vom Hypoxie- als auch vom MCT-Modell bekannt, dass ROS unter anderem Vasokonstriktion (nicht im MCT-Modell), PASMC-Proliferation und vaskuläres *Remodeling* verursachen können³²³. Nichtsdestotrotz ist es unwahrscheinlich, dass der vaskuläre Gefäßumbau in beiden Modellen auf einem gemeinsamen Mechanismus beruht. Wie bereits einleitend erwähnt wurde, stellen die NADPH-Oxidasen wahrscheinlich die wichtigste ROS-Quelle im kardiovaskulären Gefäßsystem dar^{324, 325}. Unterschiedliche Studien schlagen eine wesentliche Rolle für Nox2³²² und Nox4²²⁹ in CAH-PH vor. Die Rolle von NADPH-Oxidasen in MCT-induzierter PH ist unklar. Eine Untersuchung der mRNA- und Protein-Expression der relevanten Nox-Isoformen und deren Untereinheiten, in der vorliegenden Arbeit, ergab eine erhöhte Nox1 Expression. Interessanterweise unterscheidet sich die MCT-induzierte PH hier deutlich vom Modell der CAH in Mäusen und auch Ratten, wo eine Regulation von Nox4 beobachtet werden konnte²²⁹. Diese Diskrepanz lässt sich vermutlich folgendermaßen erklären. Nach der Injektion von MCT entwickelt sich eine starke inflammatorische Antwort, gefolgt von endotheliale Zelltod in kleinen Arteriolen und einer Reduktion der Anzahl peripherer Arterien³⁰. Obwohl der präzise Mechanismus unbekannt ist, ist der endotheliale Zelltod nachfolgend wahrscheinlich mit einem vaskulären Leckstrom und Thrombozytenaggregation verbunden, was die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokinen verursacht. In diesem Zusammenhang könnte es zu einer vermehrten Bildung von beispielsweise PDGF, Angiotensin II (ATII), Thrombin und TNF- kommen. Von diesen Faktoren ist bekannt, dass sie die Nox1-Expression (PDGF¹⁶⁶, ATII³²⁶) und -Aktivität³¹⁰ stimulieren, was für PDGF auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Zudem weisen MCT-PASMC eine erhöhte Expression des PDGFR auf³¹². Dieser Mechanismus könnte auch erklären, warum in präkapillären PASMC in MCT- und Hypoxie-induzierter PH unterschiedliche Nox-Isoformen reguliert sind (Nox1 in MCT- und Nox4 in Hypoxie induzierter PH), da chronische Hypoxie im pulmonalen Gefäßbett keine inflammatorische Antwort auslöst. Die Expression und damit auch die Aktivität der konstitutiv aktiven

Nox4, scheint eher durch die Stabilisierung von HIF1 unter chronischer Hypoxie induziert zu werden³²⁷. Im Gegensatz dazu scheint Nox1 im MCT-Modell und auch generell eher durch Wachstumsfaktoren und Zytokine induziert zu werden³²⁸. Generell wird in PASMC die Superoxidproduktion der NADPH-Oxidase 1 als physiologische Antwort auf inflammatorische Stimulatoren, wie TNF-, TGF- und IL1, sowie auf Wachstums-Stimuli wie AngII, PDGF, VEGF, FGF, EGF, Thrombin, Urokinase Plasminogen Aktivator und PGF2 induziert^{165, 167, 329, 330}. Im Gegensatz dazu, führen AngII, PDGF, IL-1, Thrombin und auch PMA zu einer verminderten Expression der mRNA von Nox4 in VSMC und adventitiellen Fibroblasten^{139, 331, 332}.

Besonders inflammatorische Zytokine wie TNF-a und IL-1b aktivieren Nox1 auch in endosomalen Vesikeln³³³. Auch bei inflammatorischen Erkrankungen oder Umständen wie chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD)³³⁴, akuter Lungenschaden (ALI)³³⁵, und bei verschiedenen Formen von Krebs³³⁶ scheint Nox1 eine wichtige pathologische Rolle einzunehmen. Nox4 und Nox1 übernehmen also offenbar vollkommen unterschiedliche Funktionen.

Die beiden wichtigsten, in diesem Fall möglicherweise pathophysiologischen Signalwege, sind wohl der PDGF- und der AngII-Signalweg. Beide Signalwege leiten Prozesse ein, die beim pulmonalarteriellen Gefäßumbau eine wichtige Rolle spielen. Sowohl AngII, als auch PDGF stimulieren die Aktivierung und Expression von Nox1 in PASMC^{337, 146, 139}. Zudem konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, dass der PDGF-Rezeptor (PDGFR) bei MCT-induzierter PH in Ratten stärker exprimiert ist, als in PASMC aus gesunden Tieren³¹⁶. Basierend auf diesen Daten und um der Frage nachzugehen, wie es nach MCT-Injektion zu einer Induktion der Nox1-Expression kommt, wurden hier Kontroll- und MCT-PASMC mit PDGF stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von Nox1 mittels real-time PCR überprüft. Die Stimulation mit PDGF führte in MCT-PASMC nach zwei Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Nox1 mRNA-Expression. In Kontroll-PASMC blieb die Nox1-Expression hingegen unverändert. Gründe hierfür könnten eine zu kurze Inkubationszeit oder eine zu geringe PDGF-Konzentration gewesen sein. MCT-PASMC schienen demnach, aufgrund der erhöhten PDGFR-Expression, sensibler gegenüber der PDGF-Stimulation zu sein.

Der PDGF-PDGFR Signalweg trägt also definitiv zu einer vermehrten Expression von Nox1 nach MCT-Injektion bei. Dafür würden auch andere Ergebnisse von Schermuly *et al.* 2005 sprechen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von PDGF bei Ratten mit etablierter MCT-induzierter PH einen kurativen Effekt hatte. Außerdem konnte auch in

humanen PAH-Patienten gezeigt werden, dass die Expression des PDGFR im Lungengewebe stark erhöht ist³¹².

Die auf die MCT-Injektion folgende Entzündung besteht allerdings nur wenige Tage. Es ist also unwahrscheinlich, dass die erhöhte Nox1-Expression in MCT-PASMC durch inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren aufrechterhalten wird. Es erscheint plausibler, dass die initiale Entzündung eine gesteigerte Nox1-Expression und -Aktivität auslöst. Nox1 selbst könnte dann seine eigene Expression und Aktivität erhalten, da $O_2^{\cdot-}$ und daraus resultierendes H_2O_2 *per se* die PKC aktivieren kann³³⁸. Es ist außerdem bekannt, dass die Stimulation von PASMC mit H_2O_2 zur Autophosphorylierung von PDGFR führt³³⁹. Daher ist denkbar, dass ROS selbst die Aktivierung von Nox1, über den PDGF-Signalweg, auslösen können. Da H_2O_2 die Zellmembran gut passieren kann, spielt höchstwahrscheinlich auch extrazelluläres H_2O_2 als parakriner bzw. autokriner Signalgeber, dabei eine wichtige Rolle, da es von außen nach innen diffundieren und an einem positiv rückgekoppelten Kreislauf teilnehmen könnte.

Weiterhin geht man davon aus, dass H_2O_2 Src aktivieren und so eine EGF-Rezeptorphosphorylierung induzieren kann¹⁴⁶. Dieses komplexe Zusammenspiel verschiedener Signalwege positioniert die Nox1 in der Reihenfolge sowohl vor, als auch nach Src und den EGF-Rezeptor im Sinne einer positiven Rückkopplung (*self-enforcing loop*). Dass solch ein Mechanismus tatsächlich funktionell ist wird durch die Beobachtung gestützt, dass exogen appliziertes H_2O_2 die NADPH-Oxidase Aktivität in Fibroblasten und VSMC steigern kann³⁴⁰. Signalwege die zur Aktivierung von NADPH-Oxidasen führen, können demnach also auch ligandenunabhängig aktiviert werden. Zudem ist bekannt, dass AP-1 in VSMC durch ROS aktiviert wird³⁴¹. Der Transkriptionsfaktor AP-1 kontrolliert aber auch die mRNA-Expression von Nox1 in VSMC³⁴², was eine weitere positive Rückkopplung für Nox1 darstellen könnte. Ebenfalls wurde vorgeschlagen, dass andere Sauerstoff-Radikale die Aktivierung von NADPH-Oxidasen durch die Transaktivierung von Tyrosin-Kinase Rezeptoren, wie EGFR und PDGFR, auslösen³⁴³. Diese Transaktivierung würde bedeuten, dass NADPH-Oxidasen nun von zwei unterschiedlichen Stimuli (PDGF und EGF) aktiviert werden können, wodurch die ROS-Produktion zusätzlich gesteigert werden kann. Offensichtlich gibt es demnach deutliche Überschneidungen innerhalb der Signaltransduktionsmechanismen von EGF- und PDGF-Rezeptoren (EGFR und PDGFR), in Bezug auf die Aktivierung von NADPH-Oxidasen, die in MCT-PASMC zu einer erhöhten intrazellulären ROS- und Superoxidproduktion führen¹⁴⁶. Sogar die Formation aktiver Rezeptor-Heterodimere wurde beschrieben³⁴⁴. Die

Transaktivierung von EGF- und PDGF-Rezeptoren ist ein Phänomen, welches ebenfalls bei anderen Stimuli, wie Ang II, Thrombin und Lipiden beobachtet werden konnte³⁴⁵⁻³⁴⁷.

Die pathophysiologischen Aktivierung der Nox1 in den MCT-PASMC könnte also womöglich auch durch Transaktivierung von Tyrosin-Kinase Rezeptoren wie EGFR und PDGFR stattfinden^{343, 348}.

Die Lokalisierung der Nox1-Expression im Lungengewebe wurde mittels FISH auf mRNA-Ebene ermittelt. Demnach wird das Enzym hauptsächlich in der glatten Muskulatur von Bronchien und Pulmonalarterien exprimiert. Andere Zelltypen zeigten nur geringe bis überhaupt keine Expression. Ein Vergleich der Nox1-Expression von Kontroll- und MCT-PASMC mit Hilfe von FISH wurde zwar durchgeführt, lieferte aber im Widerspruch zu den real time- und western blot-Daten keine signifikanten Unterschiede. Ursache hierfür könnte die vergleichsweise geringe Sensitivität der FISH gegenüber einer real time PCR sein. Die Expression von Nox1 in VSMC ist gegenüber anderen Proteinen verhältnismäßig gering und um das Enzym, z.B. auf einem western blot, sichtbar machen zu können, müssen große Mengen an Protein geladen werden. Außerdem sind die Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und MCT-PASMC sehr schwach, so dass die feinen Unterschiede mittels FISH möglicherweise nicht deutlich gemacht werden können. Bei dieser Methode kommt es zusätzlich stets zu einer unspezifischen Bindung der Sonden an andere Strukturen oder ähnliche mRNAs. Da auch diese Sonden später ein Fluoreszenzsignal abgeben, besteht durchaus die Gefahr einer Maskierung kleiner Expressionsunterschiede.

Basierend auf der erhöhten Nox1-Expression und da Nox1 ein Superoxid produzierendes Enzym ist¹⁶⁶, wurde die intra- und extrazelluläre ROS-Produktion mittels dem stark zellpermeablen CMH und dem nur teilweise zellpermeablen (geringe Zellpermeabilität bei einem physiologischem pH)²⁷⁵ detektiert. Die *spin probes* CMH und CPH weisen im Grunde nur einen einzigen strukturellen Unterschied auf. Anstelle einer Hydroxylgruppe bei CPH, befindet sich eine Methylgruppe bei CMH. Dadurch ist CMH unpolar, somit zellpermeabel und sollte sich nach den Gesetzen der Diffusion gleichmäßig im intra- und extrazellulären Raum verteilen^{112, 349}. Obwohl CPH schwach zellpermeabel ist, ist es für die Detektion extrazellulären Superoxids anerkannt^{272, 350, 351}. Beide *spin probes* wurden alleine oder in Kombination mit Sod bzw. PEG-Sod eingesetzt. Die Zugabe von Sod erlaubte den Anteil von Superoxidradikalen am totalen Signal zu definieren. PEG machte Sod zellpermeabel. Die Messungen ergaben eine, ausschließlich intrazellulär, erhöhte Superoxidproduktion in MCT-PASMC. In folgenden Experimenten wurden die Zellen mit

PMA stimuliert. PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C (PKC) und vermittelt dadurch die Zusammenlagerung der zytosolischen und membrangebundenen Untereinheiten von NADPH-Oxidasen, was zur Aktivierung des Enzyms führt ²⁷⁶. Durch Zugabe von PMA wurde die erhöhte ROS- bzw. Superoxidproduktion in MCT-PASMC gegenüber Kontroll-PASMC wesentlich verstärkt. Zwar führte PMA in allen Proben zu einem Anstieg des detektierbaren Signals, aber auch nach diesem Stimulus unterschied sich lediglich die intrazelluläre ROS-/Superoxidproduktion von MCT- und Kontroll-PASMC. Da der stimulierende Effekt von PMA auf NADPH-Oxidasen mit dem vorher beschriebenen Aktivierungsmechanismus beschränkt ist, schließt dies eine Aktivierung der konstitutiv aktiven Nox4 und anderer Nox-Isoformen ohne zytosolische Untereinheiten aus. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass die beobachtete, erhöhte Nox1-Expression für den Anstieg des intrazellulären Superoxids in MCT-PASMC verantwortlich ist. Um diese Hypothese bestätigen zu können, wurde die Expression von Nox1 mittels RNA-Interferenz (siRNA) supprimiert und die ROS-Messungen wiederholt. Da unter basalen Bedingungen nach der siRNA-Behandlung keine ausreichenden ROS-Mengen detektiert werden konnten, wurden alle Messungen nach PMA-Stimulation durchgeführt. Die Hemmung der Nox1-Expression hob den stimulatorischen Effekt von PMA auf die ROS-Produktion auf und normalisierte die Superoxidproduktion in MCT-PASMC. Dadurch wurde Nox1 eindeutig als Ursache der erhöhten, intrazellulären ROS-Produktion in MCT-PASMC identifiziert. Eine mögliche Erklärung für die Notwendigkeit der PMA-Stimulation ist, dass die Zellen 96 Stunden dem Gemisch von siRNA und Transfektionsreagenz ausgesetzt waren. Diese sehr unphysiologischen Bedingungen und die, mit der langen Kultivierungszeit verbundene Dedifferenzierung der Zellen, könnten zu einer verminderten basalen ROS-Produktion führen. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Nox1-Expression mit der Dedifferenzierung von VSMC zunimmt ³⁵², so bedeutet dies nicht gleichzeitig auch eine Zunahme der basalen ROS-Produktion. Um ROS produzieren zu können, bedarf es Nox1 einer Stimulation durch externe Faktoren und die Zusammenlagerung der zytosolischen und membrangebundenen Untereinheiten. Diese Umstände sind in Kulturbedingungen in der Regel nicht gegeben, besonders wenn bei einer siRNA-Transfektion (wie in der vorliegenden Arbeit) serumfreies Medium verwendet wird. Zudem ist bekannt, dass die basale ROS-Produktion in VSMC maßgeblich von Nox4 bestimmt wird. Im Gegensatz zu Nox1, nimmt die Nox4-Expression mit zunehmender Dedifferenzierung ab, was einen Rückgang der basalen ROS-Produktion zur Folge hat ³⁵². Zur Beobachtung einer erhöhten intrazellulären ROS-Produktion durch

Nox1 in MCT-PASMC passt, dass inflammatorische Zytokine wie TNF- und IL-1b Nox1 in endosomalen Vesikeln aktivieren³³³. Werden reaktive Sauerstoffspezies unter physiologischen Bedingungen intrazellulär in kontrollierten Mengen produziert, sind sie ein wichtiger Bestandteil zellulärer Signalwege. Es ist bekannt, dass sie als *second messenger* agieren können und somit Signaltransduktionswege in verschiedenen Systemen getrennt voneinander beeinflussen^{115, 353}. Unter anderem nehmen sie Einfluss auf Wachstumsfaktoren, sowie Transkriptionsfaktoren welche die Expression von solchen Genen regulieren, die mit Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose assoziiert sind. Außerdem beeinflussen sie die GTPase-abhängige Umgestaltung des Zytoskeletts. Insgesamt nehmen ROS also großen Einfluss auf zelluläre Funktionen. Die PASMC repräsentieren eine dynamische Komponente des Gefäßsystems. ROS sind in viele physiologische und pathophysiologische Prozesse vaskulärer glatter Muskelzellen involviert: Wachstum, Migration, Sekretion inflammatorischer Zytokine, Kinase-Aktivierung, Umgestaltung der extrazellulären Matrix, Regulation von Matrix-Metalloproteasen, Aktivierung der Genexpression und von Transkriptionsfaktoren, Kontraktion, Differenzierung und Apoptose^{115, 146}. Diese Signalwege sind demnach Redox-sensitive Signalwege und werden bei einem physiologischen Redox-Status der Zelle streng kontrolliert. Unter diesen Umständen sind ROS-Produktion und -Abbau sehr gut reguliert, wodurch diesen *second messengern* (theoretisch nur H₂O₂³⁵⁴) eine kurzzeitige Wirkungsweise ermöglicht wird, um auf benachbarte Ziele Einfluss nehmen zu können.

Das Zytoplasma von MCT-PASMC war jedoch unter basalen Bedingungen, als auch nach Stimulation mit PMA, einem erhöhten Superoxidaufkommen ausgesetzt, was vermutlich zu einer Verschiebung des Redox-Status der Zelle in Richtung einer eher oxidativen Umgebung und somit zu oxidativem Stress führte (auch reduktiver Stress ist möglich³⁵⁵). Die deutlich erhöhte, Nox1-abhängige Expression von Nrf2 in MCT-PASMC bestätigte diese Vermutung. Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor der, unter anderem, die Expression verschiedener antioxidativer Enzyme induziert und dadurch eine entscheidende physiologische Rolle bei der Regulation von oxidativem Stress spielt³⁵⁶. Der Abbau von ROS durch antioxidative Enzyme ist unter normalen physiologischen Bedingungen ausreichend, um eine kontrollierte Regulation der ROS-abhängigen Signalkaskaden aufrechtzuerhalten. Übersteigt die Produktion von ROS jedoch die endogene antioxidative Kapazität der Zelle, so laufen die Redox-sensitiven Signalwege unkontrolliert ab, es kommt zu oxidativem Stress, wodurch die Prozesse des Gefäßbaus und der *de novo*-

Muskularisierung ausgelöst werden können³³⁰. Die Expression und die Aktivität antioxidativer Enzyme werden durch viele Faktoren reguliert. Der primäre Faktor ist der oxidative Status der Zelle. Sowohl endogene, als auch exogene Substanzen wirken als Oxidationsmittel. Sie verändern dadurch das zelluläre oxidative Gleichgewicht und somit die Genexpression antioxidativer Enzyme¹³¹.

Die Hypothese war, dass die PASMC bei einem erhöhten intrazellulären ROS-Niveau eigentlich versuchen sollten ihren Redox-Status aufrechtzuerhalten, indem sie die Expression antioxidativer Enzyme verstärken. Das antioxidative System von Zellen besteht, unter anderem, aus Superoxiddismutasen und Katalase. Die Aufgaben dieses Systems ist es, das intrazelluläre ROS-Aufkommen auf einem physiologischen und kontrollierten Niveau zu halten. Es kann generell in antioxidative Enzyme und kleine Moleküle klassifiziert werden. Die Enzyme setzen ROS indirekt enzymatisch um und die kleinen Moleküle reagieren direkt mit den freien Radikalen. Die Enzyme repräsentieren die erste „Verteidigungslinie“ gegen die, in großen Mengen toxischen Radikale, indem sie diese in harmlose Nebenprodukte (O_2 , H_2O) umwandeln.

Die erste enzymatische Reaktion der Reduktionskaskade von Sauerstoff ist die Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff (siehe Gleichung 1.1). Die dafür verantwortlichen Enzyme sind die zytosolische Superoxiddismutase (Cu^{2+}/Zn -Sod; Sod1) und die mitochondriale Superoxiddismutase (Mn-Sod; Sod2). Obwohl Wasserstoffperoxid kein Radikal als solches ist, weist es eine hohe Reaktivität auf und wird durch die Fenton-Reaktion schnell in das reaktive Hydroxid-Radikal ($\cdot OH$) umgewandelt³⁵⁷.

Zwei Enzyme sind an der Entfernung von H_2O_2 beteiligt, die Peroxidasen und die Katalase. Die Peroxidasen sind sowohl im Zytosol, als auch in den Mitochondrien präsent. Katalase findet man hauptsächlich in den Peroxisomen, aber auch im Zytosol und dem endoplasmatischen Retikulum. Die Peroxidasen und Katalase setzen das zelltoxische Wasserstoffperoxid zu Wasser und ebenfalls molekularem Sauerstoff um (siehe Gleichung 1.2)^{131, 132}.

Eine Sichtung der Expression der wichtigsten antioxidativen Enzyme ergab, dass in MCT-PASMC lediglich Sod2 (mitochondriale Sod) eine erhöhte aufwies. Sod1, Katalase und Gpx1 wiesen in der vorliegenden Arbeit keine Regulation auf und zeigten somit keine Antwort auf den verschobenen Redox-Status der MCT-PASMC. Obwohl in Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie (IPAH) eine epigenetisch verminderte Expression der Sod2 beobachtet wurde, stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keinen Widerspruch dar

³⁵⁸. Schließlich handelt es sich bei dem Modell der MCT-induzierten PH, wie bereits erwähnt, um einen direkten, inflammatorischen und noxischen Stimulus. Dadurch unterscheidet sich das Modell (obwohl der IPAH noch am nächsten) deutlich von der humanen IPAH, welcher eher genetische bzw. vererbte Ursachen zu Grunde liegen ³⁵⁹. Die erhöhte Expression von Sod2 ging mit einem Anstieg der totalen Sod-Aktivität einher. Warum neben Sod1, Gpx1 und Katalase nur Sod2 reguliert war, könnte folgende Ursachen haben. Die Sod-Gene enthalten viele transkriptionelle regulatorische Elemente, welche als Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF) dienen: NF- κ B, AP-1, Ap-2, Sp1 und C/EBP. Diese TF übernehmen wichtige Aufgaben bei der Regulation der Expression aller Sod-Isoformen, haben jedoch einen relativ ähnlichen Einfluss auf die Regulation der Sod-Gene ³⁶⁰⁻³⁶². Unter den drei Sod-Isoformen, hat die genetische Sequenz von Sod2 nur wenige Gemeinsamkeiten mit Sod1 und Sod3 ³⁶³⁻³⁶⁵. Im Gegensatz zu Sod1 und Sod3 ist die Induktion von Sod2 als Antwort auf oxidativen Stress in aeroben Organismen gut etabliert. NF- κ B, ein Redox-sensitiver TF, ist der relevanteste TF für die Induktion von Sod2 ³⁶⁶. Dagegen wird Sod1 sehr oft konstitutiv exprimiert, ist nur schwer induzierbar und wird als eher als "Haushältergen" beschrieben. Zudem reagiert die NF- κ B-Bindungsstelle im Sod1 Promotor nur schwach auf externe Stimuli ³⁶⁷. Bei Katalase und Gpx1 handelt es sich um Enzyme die H_2O_2 zu H_2O umsetzen. Das primäre Produkt der NADPH-Oxidasen und der meisten anderen ROS produzierenden Enzyme ist Superoxid, welches als Vorläufer für andere ROS und auch H_2O_2 dient. Wasserstoffperoxid entsteht dabei entweder sekundär, spontan aus der Reduktion von Superoxidradikalen oder ist z.B. das Produkt einer enzymatischen Entgiftungsreaktion. Da H_2O_2 also eher ubiquitär als Stoffwechselprodukt in der Zelle anfällt, ist die ausreichende enzymatische Kapazität zur Entgiftung von H_2O_2 (in Form von diversen enzymatischen Reaktionen) eine mögliche Ursache für die unveränderte Regulation von Gpx1 und Katalase. Die Supprimierung der Nox1-Expression hatte zwar keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Sod2, dennoch zeigte sich eine deutliche Tendenz in Richtung einer verringerten Sod2-Expression. Ungeachtet dessen, dass von den Sod-Enzymen hauptsächlich Sod2 einer starken Redox-abhängigen Regulation unterliegt, handelt es sich dennoch um die mitochondriale Isoform (Sod1 = Zytosol; Sod3 = extrazellulär). Initiale Experimente konnten in dieser Arbeit zeigen, dass in MCT-PASMC neben einer erhöhten zytosolischen ROS-Produktion auch ein Anstieg der mitochondrialen ROS-Konzentration zu verzeichnen war. Von Mingatto *et al.* 2007 wurde publiziert, dass Dehydromonocrotalin den mitochondrialen Komplex I in Leberzellen inhibieren kann. Dadurch kann es zur

Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette kommen, somit zur unvollständigen Reduktion von Sauerstoff, was letztendlich zur Entstehung von ROS führen kann³⁶⁸. Eine weitere Erklärung wäre, dass die erhöhte Nox1-Expression in MCT-PASMC die mitochondriale ROS-Produktion induziert. Möglicherweise war der hier gewählte Zeitpunkt nach Nox1-Suppression zu früh, um einen Effekt auf die Sod2-Expression beobachten zu können. Dass ein potentieller Zusammenhang zwischen der Sod2-Expression und der Aktivität von NADPH-Oxidasen besteht, konnte bereits in humanen koronararteriellen Endothelzellen gezeigt werden³⁶⁹. Es ist davon auszugehen, dass Sod2 nicht nur als Antwort auf die erhöhte Superoxidproduktion durch Nox1 hochreguliert war, sondern auch dem Anstieg der mitochondrialen Superoxidproduktion entgegen wirken sollte. Die gesteigerte mitochondriale ROS-Produktion in MCT-PASMC könnte eine direkte Folge der MCT-Behandlung³⁶⁸ oder durch Nox1 induziert sein. Inwiefern ein Zusammenhang zwischen Nox1 und den Mitochondrien, bzw. der mitochondrialen ROS-Produktion besteht, bleibt zu eruieren.

An dieser Stelle ergibt sich ein interessanter Zusammenhang. Die gesteigerte Expression von Sod2 in den Mitochondrien führt zu einem vermehrten Auftreten von H₂O₂. Für den Fall, dass nicht alles H₂O₂ von der Katalase abgebaut werden kann, kommt es möglicherweise durch H₂O₂ wieder zur Aktivierung von Src und so zur Transaktivierung von EGFR und PDGFR. Dadurch kann es wiederum zur Expression und Aktivierung der Nox1 kommen, was in einer vermehrten Superoxidproduktion resultieren würde. Antioxidative Mechanismen und die nicht ausreichend gesteigerte Expression von Katalase würden in diesem Fall zur positiven Rückkopplung des Kreislaufs der Superoxidproduktion durch NADPH-Oxidasen eher noch beitragen. Die Mitochondrien hätten dabei einen entscheidenden Anteil an der gesamten intrazellulären ROS-Produktion, da von ihnen, über Sod2, die erhöhte H₂O₂-Produktion ausgeht. Es ist eine häufig akzeptierte Annahme, dass eine verringerte antioxidative Kapazität zu einem reduzierten Niveau von Radikalfängern, wie Vitamin E, Glutathion oder Sod führt und das eine gesteigerte Aktivität vaskulärer NADPH-Oxidasen oxidativen Stress in Patienten mit PH verursacht^{370, 371}. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PASMC bei MCT-induzierter PH eher ein erhöhtes Vorkommen antioxidativer Enzyme aufweisen, als die PASMC gesunder Tiere.

Eine Vielzahl von Studien konnte nachweisen, dass die Nox1-gebundene Superoxidproduktion Proliferation und Migration von VSMC induziert. Die entartete Migration und Proliferation von PASMC in PH stellt eine der Hauptursachen für das

vaskuläre *Remodeling* präkapillärer Gefäße dar. Genauer: Das von Nox1 produzierte Superoxid bzw. das daraus resultierende H₂O₂, kann JNK (Nekrose), PAK1 und Cofilin (Migration), Akt (Hypertrophie) und Cyclin D1 (Proliferation) induzieren^{305, 309, 372, 373}. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Nox1-abhängige Zunahme der Proliferation und Migration von MCT-PASMC nachgewiesen werden, was die Idee eines Nox1-getriebenen vaskulären *Remodelings* in MCT-induzierter PH unterstützte und das vaskuläre *Remodeling*, sowie die *de novo* Muskularisierung der präkapillären pulmonalarteriellen Gefäße erklärt. Die Supprimierung der Nox1-Expression normalisierte sowohl Migration, als auch Proliferation. Im Gegensatz dazu blieb die Apoptose der PASMC nach MCT-Behandlung oder Nox1-Supprimierung unverändert. Erwartet wurde eine erhöhte apoptotische Resistenz, also eine verringerte Apoptose der MCT-PASMC. Bei näherer Betrachtung ist ein Rückgang der Apoptose allerdings auch keine Voraussetzung für pulmonalarterielles *Remodeling*. Solange sich Proliferation und Apoptose der PASMC im Gleichgewicht befinden, wird die Dicke der arteriellen Wand auf einem optimalen Niveau gehalten. Verschiebt sich dieses Gleichgewicht jedoch in Richtung der Proliferation, durch verminderte Apoptose und/oder gesteigerte Proliferation, so kommt es zu einer Verdickung der Gefäßwand, einer Verengung des Lumens und einem erhöhten Gefäßwiderstand¹⁶. Eine gesteigerte Proliferation der MCT-PASMC könnte also ausreichen, um pulmonalarterielles *Remodeling* zu verursachen. Gemäß den relevanten und publizierten Signalwegen, welche durch Nox1 induziert bzw. aktiviert werden können, wurden in diesem Zusammenhang Expression und Phosphorylierungsstatus der Proteine PAK1, Akt, JNK 1/2/3, Cofilin und Cyclin D1 untersucht³¹⁰. Die erlangten Daten zeigten eine vermehrte Phosphorylierung von Cofilin und eine erhöhte Expression von Cyclin D1 in MCT-PASMC. Alle anderen Proteine wiesen keine Unterschiede in Expression bzw. Phosphorylierungsstatus auf. Allerdings konnte lediglich Cyclin D1 mit Nox1 in MCT-PASMC in Verbindung gebracht werden, wie mit Hilfe von Nox1 *knockdown* Experimenten gezeigt werden konnte. Die Zunahme der intrazellulären Superoxidproduktion, durch Nox1, führte in MCT-PASMC also zu einer Zunahme der Cyclin D1-Expression und damit zu einer beschleunigten Proliferation der Zellen. Wie bereits beschrieben, konnte interessanterweise auch eine erhöhte Phosphorylierung von Cofilin in MCT-PASMC gefunden werden. Hier konnte, anhand von siRNA-Experimenten, allerdings keine Nox1-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse widersprechen zudem denen von Dai *et al.*, die einen relativen Rückgang der Phosphorylierung von Cofilin 21 Tage nach MCT-Injektion in PASMC feststellen konnten

³⁷⁴. Die von Dai *et al.* vorgestellten Daten unterscheiden sich von denen in dieser Arbeit jedoch dadurch, dass die Zellen bei Dai *et al.* eine Woche früher nach MCT-Behandlung isoliert wurden. Laut der gängigen Fachliteratur scheint der Aktivierungsmechanismus generell unklar bzw. Zelltyp abhängig zu sein. Verschiedene Studien beschreiben, dass die Aktivierung von Cofilin und die damit verbundene Induzierung der Zellmigration durch Dephosphorylierung des Proteins stattfinden ^{306, 374-376}. Andere Gruppen konnten zeigen, dass die Dephosphorylierung von Cofilin nicht mit der Aktivierung des Proteins zusammenhängt ^{377, 378}. Demnach könnte die erhöhte Phosphorylierung von Cofilin in PASMC 35 Tage nach MCT-Injektion eine Endpunkt-Situation darstellen, in der die PASMC in den umgebauten Gefäßen den Übergang von einem proliferativen Zustand zurück in einen ruhenden Status durchlaufen haben. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Migration der PASMC nach MCT-Behandlung einem anderen Signalweg unterliegt, der in dieser Arbeit nicht aufgedeckt werden konnte. Um dieser Theorie nachzugehen, wären weitere Experimente notwendig. Spekulativ könnte der Prozess folgendermaßen ablaufen:

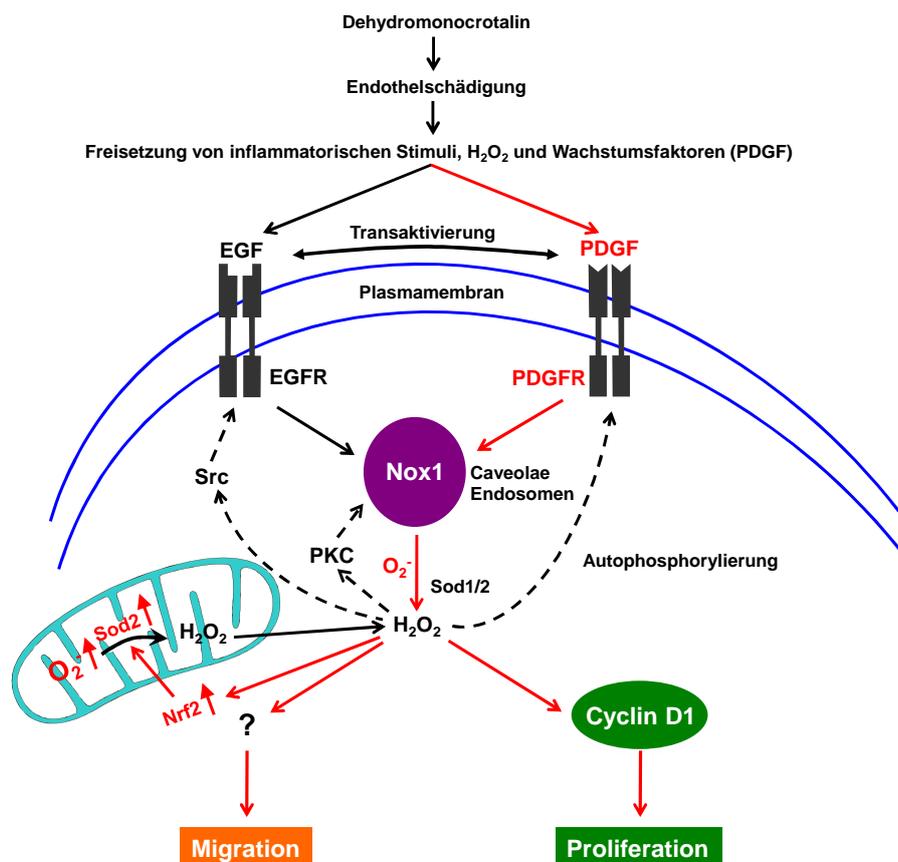


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des postulierten pathologischen Nox1-Signalweges bei MCT-induzierter PH

Abgebildet ist eine pulmonalarterielle glatte Muskelzelle (PASMC) eines MCT-Tieres. Dehydromonocrotalin verursacht eine Endothelschädigung und es kommt zur Freisetzung von

inflammatorischen Stimuli und Wachstumsfaktoren aus dem Endothel. Unter anderem binden die Liganden EGF, PDGF an ihren Rezeptoren, was zur Aktivierung dieser Signalwege führt. Dies wiederum leitet die Aktivierung und Expression von Nox1 in Caveolae und Endosomen ein, was zur Produktion intrazellulärer Superoxidradikale führt. Superoxid wird durch Sod in H_2O_2 umgewandelt. H_2O_2 kann nun zum einen die Autophosphorylierung des PDGFR, die Phosphorylierung des EGFR über Src und/oder die direkte Aktivierung der Nox1 über PKC verursachen. Außerdem kann es zur Transaktivierung des EGF- und PDGF-Rezeptors führen, wodurch die Nox1 erneut aktiviert werden kann. rote Pfeile = in der vorliegenden Arbeit gezeigt; schwarze Pfeile = Literatur; H_2O_2 = Wasserstoffperoxid; $O_2^{\cdot -}$ = Superoxid; EGF = *epidermal growth factor*; EGFR = *epidermal growth factor – receptor*; PDGF = *platelet derived growth factor*; PDGFR = *platelet derived growth factor – receptor*; Nox1 = NADPH-Oxidase 1; Src = *sarcoma*; PKC = Proteinkinase C; Sod = Superoxiddismutase; durchgängiger Pfeil = Induzierung/Aktivierung/Diffusion; unterbrochener Pfeil = potentieller Signalweg.

Diese Arbeit zeigt nach Wissen des Autors zum ersten Mal, dass es im inflammatorischen Modell der MCT-induzierten PH in PASMC zu einer erhöhten, pathophysiologischen, intrazellulären, PDGF induzierbaren Produktion von Superoxidradikalen durch Nox1 kommt. Dies führt zu einer Nox1-abhängigen beschleunigten Migration und Proliferation von MCT-PASMC.

4.1 Physiologische Bedeutung und klinische Relevanz der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die einmalige Injektion von MCT bei Ratten nach 35 Tagen zu einem Anstieg der Nox1-Expression PASMC führt. Dies ist mit einer übermäßigen, intrazellulären Produktion von ROS und speziell Superoxidradikalen verbunden. Nox1 löst so eine gesteigerte Proliferation und Migration von PASMC aus, was signifikant zum pulmonalvaskulären Gefäßumbau beiträgt. In humanen Zellen bzw. Lungengewebe von Donoren und IPAH Patienten konnte hingegen keine Regulation von Nox1 beobachtet werden, obwohl angemerkt werden sollte, dass die Daten sehr heterogen waren. Im Hinblick darauf, dass Nox1 in IPAH-Patienten keine signifikante Regulation aufwies, scheint die klinische Relevanz dieser Arbeit bezogen auf die IPAH gering zu sein. Verglichen mit den restlichen Gruppen der PH-Klassifizierung kommt die IPAH mit einer Inzidenz von 2-3 pro 1000000 allerdings nur sehr selten vor³⁷⁹. Außerdem ist das Modell

der MCT-induzierten PH ein inflammatorisches Modell und dadurch nur schwer mit der humanen IPAH zu vergleichen, die prinzipiell keine inflammatorische Erkrankung darstellt. Demgegenüber mehrten sich die Untersuchungen die der Inflammation bei humanen Formen der PH besondere Beachtung zukommen lassen. Von Nox1 ist bekannt, dass die Expression und Aktivität durch die Sekretion inflammatorischer Wachstumsfaktoren und Zytokinen induziert werden kann³²⁸. So spielt Nox1 besonders unter inflammatorischen Bedingungen wie COPD³³⁴, ALI³³⁵ und verschiedenen Formen von Krebs³³⁶ eine wichtige Rolle. Demnach ist die klinische Relevanz der erlangten Daten für alle Formen der PH, welche mit einer inflammatorischen Erkrankung assoziiert sind, sehr hoch. Zudem ist die Inzidenz dieser PH-Formen deutlich höher. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass manche der Patienten neben IPAH an einer inflammatorischen Lungenerkrankung litten, was die hohen Schwankungen der Expressionsdaten erklären würde.

Abgesehen von pulmonalen Erkrankungen hat es den Anschein, dass Nox1 generell mit Inflammation in Verbindung zu bringen ist³⁸⁰⁻³⁸². Allerdings gibt es auch viele andere Bereiche, in denen NADPH-Oxidasen eine wichtige pathologische Rolle übernehmen. Die mit Abstand bekanntesten pathologischen Bedingungen, die mit der Superoxidproduktion durch NADPH-Oxidasen assoziiert werden, sind chronische Krankheiten, welche dazu tendieren in späten Lebensabschnitten aufzutreten, wie z.B. Arteriosklerose, Krebs und Alzheimer. Die Überproduktion von ROS führt zu oxidativem Stress³⁸³. Dadurch kommt es mit der Zeit zu einer Gewebeschädigung und möglicherweise zu einem unkontrollierten Ablauf von Signalkaskaden, die unter normalen Umständen durch ein kontrolliertes ROS-Vorkommen reguliert werden.

Im angeborenen Immunsystem dienen die Enzyme den Phagozyten zur Verteidigung des Wirtes gegen Krankheitserreger¹⁴⁷. Diese Enzyme spielen auch bei der Bildung von Entzündungsherden eine wichtige Rolle³⁸⁴. In Epithelzellen verhindert die ROS-Produktion von NADPH-Oxidasen das Wachstum von Bakterien, Pilzen und Viren³⁸⁵. Auch in der Lunge sind NADPH-Oxidasen an Immunabwehrmechanismen und der Verteidigung gegen Mikroben beteiligt³⁸⁶.

Man könnte sich die pathologische Rolle der NADPH-Oxidasen in den pulmonalen Arterien auch im Sinne einer antagonistischen Pleiotropie vorstellen: Gene, die in frühen Lebensabschnitten einen reproduktiven Vorteil verleihen, könnten sich später nachteilig auswirken. Solche Gene blieben während der Evolution trotz ihrer schädigenden Wirkung erhalten, da die Kraft der natürlichen Selektion mit fortschreitendem Alter abnimmt. Die

physiologische Rolle der NADPH-Oxidasen in den Pulmonalarterien wäre demnach vorwiegend auf die frühen Lebensjahre beschränkt. Der Redox-Status einer Zelle könnte später auch durch andere ROS-Quellen aufrechterhalten werden.

Vom klinischen Standpunkt aus betrachtet stellt die intrazelluläre Superoxidproduktion durch NADPH-Oxidasen, die in Hypoxie-induzierter PH und mit dieser Arbeit auch in MCT-induzierter PH nachgewiesen werden konnte, einen möglichen Ansatzpunkt für eine kurative Behandlung von PH dar. Diese Ergebnisse bieten eine Grundlage für Forschungsarbeiten mit dem Ziel die Symptome bzw. Entstehung der PH zu therapieren. Wenn es möglich wird die pathophysiologische ROS-Produktion durch NADPH-Oxidasen zu verhindern oder eine Identifizierung der auslösenden NADPH-Oxidase gelingt, so könnte möglicherweise auch das progressive Fortschreiten oder gar das Auftreten der Krankheit verhindert werden. Vor diesem Hintergrund sollte darauf eingegangen werden, dass die verschiedenen Nox-Isoformen offensichtlich unterschiedliche physiologische, sowie pathophysiologische Rollen einnehmen können. So scheint Nox1 für die Pathophysiologie inflammatorischer Erkrankungen wichtig zu sein, wie z.B. auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte^{334-336, 380-382}. Nox4 und Nox2 wurden hingegen unter CAH als pathophysiologische ROS-Quelle identifiziert^{96, 229-232}. Es ist durchaus denkbar, dass bei humanen Formen der PH noch andere Nox-Isoformen oder Kombinationen verschiedener Isoformen eine Rolle spielen. Gründe hierfür könnten die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der Nox-Isoformen, die Art und Weise der Aktivierung oder die Regulation der Expression der Nox-Isoformen sein.

Da beobachtet werden konnte, dass trotz einer verstärkten Expression von Sod2 in MCT-PASMC, verglichen mit Kontroll-PASMC, eine sehr hohe ROS-Konzentration vorliegt, bieten sich auch hier mögliche therapeutische Ansätze. Beispielsweise könnte eine Überexpression von Katalase, hervorgerufen durch z.B. Plasmide mit entsprechendem Vektor, das Vorkommen von H₂O₂ soweit senken, dass es zu keiner pathologischen Proliferation der PASMC kommt. Auch dies stellt eventuell eine kurative Behandlungsmöglichkeit für PH dar. Am Ende dieser Forschung könnte ein Medikament stehen, durch das die idiopathische PAH des Menschen, auf Basis der pathophysiologischen ROS-Produktion und der Expression antioxidativer Enzyme, behandelt werden kann.

4.2 Diskussion der angewandten Methoden und Modelle

Um die pathophysiologischen Mechanismen des vaskulären *Remodeling* bei PH untersuchen zu können wurde das Rattenmodell der MCT-induzierten PH verwendet. Dabei handelt es sich um ein Toxin induziertes PH-Modell. MCT führt zu einer verstärkten Muskularisierung präkapillärer Arteriolen, einem Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (PAP) und Rechtsherzhypertrophie. Zwar kommt es zu keiner Vasokonstriktion oder Polyzythämie (wie unter Hypoxie), aber dafür zu einer starken inflammatorischen Reaktion mit endotheliale Zelltod, einer Reduktion der Anzahl peripherer Arterien und einer Zunahme der Alveolen/Arterien-Ratio⁸². Eine Vielzahl experimenteller Tiermodelle wurde etabliert, um die humane PH im Tiermodell studieren zu können. Ein Vergleich aller Modelle würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Die Wahl des Modells hängt sicherlich maßgeblich von der Fragestellung und dem Versuchsdesign ab. Chronische Hypoxie, *pulmonary arterial banding* (PAB), MCT und Kombinationen dieser Modelle sind wohl die gebräuchlichsten³⁸⁷. Die Injektion von MCT führt zu einer vergleichsweise ernsthaften Form von PH, mit hohem PAP, ausgeprägtem *Remodeling* und deutlicher Rechtsherzhypertrophie. Gerade in Bezug auf den Schweregrad des vaskulären *Remodelings*, kommt das MCT-Modell den manifestierten Endpunkt-Formen pulmonaler Hypertonien am nächsten. Der Umbauprozess ist ohne Behandlung irreversibel, was dieses Modell von den meisten anderen unterscheidet. Im Fall der vorliegenden Studie ließ die Fragestellung kein anderes Modell zu, da die MCT-induzierte PH, in Bezug auf die ROS-Produktion von PASMC und das vaskuläre *Remodeling*, mit dem Modell der chronischen alveolären Hypoxie (CAH) verglichen werden sollte. Das MCT-Modell unterscheidet sich in den Punkten Stimulus, *Remodeling*, Schweregrad und Umkehrbarkeit sehr prägnant von der CAH. Daher waren abweichende Pathomechanismen zu erwarten.

Die wichtigsten Methoden dieser Studie lassen sich in die Detektion reaktiver Sauerstoffspezies, allgemeine molekularbiologische Methoden und die Bestimmung von Migration, Apoptose und Proliferation einteilen. Zuerst soll auf die Detektion der Sauerstoffradikale eingegangen werden.

Der ideale Ansatz für die Detektion von ROS sollte spezifisch für die Art von ROS sein, die für die Fragestellung von Interesse ist. Hier war vor allem Superoxid von großem Interesse, da es das primäre Produkt fast aller NADPH-Oxidasen ist. Die, in der vorliegenden Arbeit verwendete, ESR-Spektroskopie stellt eine der modernsten Methoden

zur Detektion von Sauerstoffradikalen dar und ist in der modernen Forschung *state of the art*. Bei dieser Methode werden die sehr kurzlebigen Sauerstoffradikale mittels sogenannten *spin probes* oder *spin traps* stabilisiert und so detektierbar gemacht. ESR-Spektroskopie erlaubt zwar keine Lokalisierung von Sauerstoffradikalen, jedoch eine genaue Quantifizierung. In dieser Arbeit wurden die *spin probes* CMH und CPH eingesetzt. Obwohl CMH und CPH bevorzugt und deutlich schneller mit Superoxidradikalen reagieren, als mit allen anderen Arten reaktiver Sauerstoffspezies, muss man dennoch davon ausgehen, dass sich das gemessene Signal aus der Reaktion von CMH bzw. CPH mit allen vorhandenen ROS zusammensetzt¹¹². Die Detektion bzw. Definition einer einzelnen Art von ROS ist mit *spin probes* im Grunde nicht möglich, daher wurden Sod bzw. PEG-Sod eingesetzt. Ebenso ist eine exakte Bestimmung der detektierten ROS-Konzentration mit CMH und CPH nur sehr schwer durchführbar und war auch nicht Ziel dieser Arbeit. Das Problem der genauen Konzentrationsbestimmung ist zum einen der Prozess der Autoxidation, dem nahezu alle bekannten *spin probes* unterliegen und zum anderen die Tatsache, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass eine *spin probe* mit der gesamten Menge der vorhandenen ROS reagieren kann. Die Autoxidation stellt ein weiteres großes Problem dar und beschreibt die Oxidation der *spin probes* durch Luftsauerstoff, wodurch diese selbst zu detektierbaren Radikalen werden, ohne mit einer Art ROS reagiert zu haben. Aufgrund seiner Hydroxylgruppe ist CPH gegenüber Autoxidation sogar noch empfindlicher als CMH (mündliche Mitteilung, Egemnazarov, B. 2008). Um den Prozess der Autoxidation als Fehler ausschließen zu können, waren die Inkubationszeiten und Versuchsbedingungen eines jedes Experiments exakt gleich. Die Präparation des benötigten Puffers ist ebenfalls eine potentielle Problemquelle. Die Zellen müssen für die Messung in einem Puffer aufgenommen werden. Bei der Vorbereitung dieses ESR-Puffers ist eine Kontamination mit den Ionen von Übergangsmetallen nicht zu vermeiden. Diese Ionen besitzen, genau wie ROS, ein ungepaartes Elektron, welches mittels ESR-Spektroskopie detektiert wird und den tatsächlichen Messwert verfälschen kann. Um dieses Artefakt zu eliminieren wurden die Puffer stets zusammen mit verschiedenen Chelatoren angesetzt. Aufgrund der zuvor genannten Gründe, sollte in den durchgeführten Experimenten keine genaue Bestimmung der detektierten ROS-Konzentration vorgenommen werden. Dennoch konnte, aus folgenden Gründen, eine Quantifizierung der Ergebnisse erfolgen. Alle Messungen wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt und in Anbetracht der Tatsache, dass die Reaktion von CMH bzw. CPH mit ROS eine 1:1 Stöchiometrie aufweist, war ein

quantitativer Vergleich der erlangten Werte möglich. Die Ergebnisse der MCT- und Kontroll-Gruppe konnten daher quantitativ miteinander verglichen werden, indem man davon ausging, dass die Signalstärke proportional zur vorhandenen ROS-Konzentration war. Unabhängig von den verwendeten *spin probes* bzw. *spin traps* gilt die ESR-Spektroskopie als sehr genaue, gut reproduzierbare Methode. Der Einsatz unterschiedlicher Sonden erlaubt es, verschiedene ROS in einer Probe detektieren zu können. Durch die hohe Sensitivität können kleine Mengen an Probenmaterial eingesetzt werden. Der wohl größte Nachteil ist, dass mit dieser Methode keine Lokalisierung des detektierten Signals durchgeführt werden kann.

Zur Validierung der mittels ESR-Spektroskopie erlangten Daten und zur Messung der mitochondrialen Superoxidproduktion, wurde eine DHE-Färbung eingesetzt (die Detektion der mitochondrialen ROS-Produktion mittels MitoSOX basiert ebenfalls auf einer DHE-Färbung). Dabei handelt es sich um eine Färbung von intrazellulären Superoxidradikalen. DHE ist die reduzierte Form von Ethidium. Es wird von Zellen aufgenommen und intrazellulär durch Superoxid zu dem fluoreszierenden Ethidium oxidiert, welches in die DNA interkaliert²⁸¹. Diese Methode ist zwar prinzipiell anerkannt, wird aber kontrovers diskutiert. DHE ist eine der bekanntesten fluorogenen Sonden zur Detektion intrazellulärer Superoxidradikale. Aus der Reaktion von DHE mit Superoxid gehen zwei Produkte hervor: 1) das sehr spezifische 2-Hydroxyethidium (2-OH-E(+)) und 2) Ethidium. Ethidium entsteht in deutlich größeren Mengen, jedoch nur in biologischen Proben. Fasst man die Diskussion zusammen, so wird befürchtet, dass es mittels Konfokal- oder Fluoreszenzmikroskopie unmöglich sei intrazelluläre Mengen des Superoxid-spezifischen Produkts 2-OH-E(+) erfassen zu können. Man schlägt hier den Einsatz einer HPLC (*high pressure liquid chromatography*) vor, um eine angemessene Quantifizierung durchführen zu können³⁸⁸. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ist jedoch immer noch anerkannt.

Die durchgeführten molekularbiologischen Methoden entsprechen den weltweit anerkannten Standardmethoden zur Erfassung von Expressionsunterschieden auf mRNA und Proteinebene, subzellulärer Lokalisation und Lokalisation im Gewebe. Sie stellen diesbezüglich die zurzeit aktuellsten Labormethoden dar. Ähnliches gilt für die Methoden zur Bestimmung von Migration, Proliferation, Apoptose und Sod-Aktivität. Hierbei handelte es sich ebenfalls um weltweit etablierte Methoden bzw. Kits, deren Protokolle gut etabliert und deren Vor- und Nachteile bekannt sind.

Bei der Isolierung und Kultivierung von PASCs besteht stets die Möglichkeit, dass eine PASC-Kultur durch andere vaskuläre Zelltypen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, verunreinigt wird. Um dieser Problematik vorzubeugen, wurde stets eine α -SMA-Färbung durchgeführt, wodurch eine Verunreinigung mit Endothelzellen ausgeschlossen werden konnte. Fibroblasten können durch eine solche Färbung nicht von PASC unterschieden werden. Das Wachstum von Fibroblasten wurde in der vorliegenden Arbeit durch Optimierung der Kulturbedingungen minimiert (Aussaat, Passagierung, Selektionsmedien).

4.3 Ausblick

Aufbauend auf den erlangten Daten soll zum Zwecke der Vervollständigung der Signalweg der Migration eruiert werden, da keine Nox1-Abhängigkeit von Cofilin bzw. PAK1 beobachtet werden konnte. Die Aufklärung der Signalkaskade, welche die erhöhte Migration von MCT-PASC auslöst, ist von großem Interesse. In diesem Zusammenhang gibt die beobachtete erhöhte mitochondriale ROS-Produktion in MCT-PASC Anlass für weitere Experimente. Das Aufdecken von Ursache und Quelle der mitochondrialen ROS-Produktion, sowie deren Einfluss auf die Migration der PASC steht dabei im Fokus. Auch die Interaktion von Mitochondrien und NADPH-Oxidasen stellt ein aktuelles und wachsendes Forschungsgebiet dar, dem ebenfalls großes Interesse gilt.

Bezugnehmend auf die Methode der ESR-Spektroskopie eröffnen sich diverse Bereiche zur weiteren Etablierung dieser Methodik. So ist z.B. ein Ziel die Entwicklung zielgerichteter *spin traps*, welche die ROS-Produktion in bestimmten zellulären Subkompartimenten oder Organellen detektieren sollen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Untersuchung des Einfluss von Nox1 *in vivo*. Dafür würden sich *knockout*-Modelle besonders gut eignen. Da sich das MCT-Modell aber leider nicht auf die Maus übertragen lässt, setzt dies den Einsatz von *knockout*-Ratten (KO-Ratten) voraus. Der Einsatz von KO-Ratten steckt noch in einer sehr frühen Phase der Entwicklung, wird aber zukünftig einen potentiell großen Nutzen haben. Weiter gilt es zu untersuchen, welche Nox-Isoformen für die verschiedenen Formen der humanen PH wichtig sind und inwiefern sich inflammatorische Formen der humanen PH von nicht-inflammatorischen Formen unterscheiden.

4.4 Zusammenfassung

Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwerwiegende Erkrankung der pulmonalarteriellen Gefäße und ist durch einen hohen mittleren pulmonalarteriellen Blutdruck charakterisiert. Die Krankheit steht in Verbindung mit einem Umbau der betroffenen Gefäße, dem sog. *Remodeling*. Dadurch wird das Lumen der Gefäße verringert, es kann zu einem Verlust von Gefäßen kommen und der Blutdruck steigt an. Obwohl kontrovers diskutiert, geht eine Hypothese davon aus, dass der Umbauprozess, unter anderem, durch die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst werden kann, wodurch es in den Zellen der Gefäßwand zu oxidativem Stress kommt, der eine Dedifferenzierung, sowie eine unkontrollierte Migration und Proliferation von verschiedenen Zelltypen der Gefäßwand verursacht. Es ist bekannt, dass bei verschiedenen Formen der pulmonalen Hypertonie die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) wesentlich an dem genannten Gefäßumbau beteiligt sind, so dass es zu einer verstärkten Muskularisierung von bereits muskularisierten Gefäßen und einer *de novo*-Muskularisierung von nicht-muskularisierten Gefäßen kommt. Neben den Mitochondrien sind nicht-phagozytäre NADPH-Oxidasen eine mögliche Quelle der ROS-Produktion.

Für die tierexperimentelle Erforschung von PH sind insbesondere zwei experimentelle Modelle etabliert: 1. Hypoxie-induzierte PH und 2. Monocrotalin (MCT)-induzierte PH.

Jüngst konnte gezeigt werden, dass die ROS-Produktion der PASMC im Modell der Hypoxie-induzierten PH erhöht ist und dies zum Großteil auf die verstärkte Expression bzw. Aktivität von nicht-phagozytären NADPH-Oxidasen zurückzuführen ist. Im Modell der MCT-induzierten PH ist nicht bekannt, ob es zu einer vermehrten ROS-Produktion kommt und auch über die etwaige Quelle einer solchen ROS-Produktion gibt es in diesem Modell keine Erkenntnisse. Aufgrund dessen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich 1. auch im MCT-Modell der PH eine verstärkte ROS-Produktion durch PASMC beobachten lässt und 2. ob es zur Veränderung des antioxidativen Potentials der PASMC kommt. Darüber hinaus sollten 3. Ansatzpunkte erarbeitet werden, um die möglichen Quellen einer etwaigen ROS-Bildung und deren Effekt auf zelluläre Funktionen im MCT-Modell aufzudecken.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von MCT auf die ROS-Produktion der PASMC von *Rattus norvegicus* untersucht. Außerdem galt das Interesse der Expression und Aktivität antioxidativer Enzyme, der Migration, Proliferation und Apoptose der PASMC, sowie den durch ROS beeinflussten Signalwegen. Untersucht wurden PASMC

aus Tieren, bei welchen durch Monocrotalin eine PH induziert wurde und PASMC aus gesunden Kontroll-Tieren. Mit Hilfe von ESR-Spektroskopie und DHE-Färbung konnte eine Zunahme der intrazellulären Superoxidproduktion in MCT-PASMC gezeigt werden. Durch real-time PCR und western blot Analysen konnte einer erhöhte Expression von Nox1 nachgewiesen und mittels siRNA-Experimenten als Quelle der beschriebenen Superoxidproduktion identifiziert werden. In folgenden Experimenten wurde Nox1 als Ursache für eine beschleunigte Proliferation und Migration von MCT-PASMC identifiziert. Die Proliferation unterlag einer Nox1-abhängigen Zunahme der Cyclin D1-Expression. Der Migration konnte kein Nox1-abhängiger Signalweg zugeordnet werden. Weiter konnte, basierend auf einer erhöhten Expression von Nrf2 und Sod2 zusammen mit der erhöhten Superoxid-Produktion, auf oxidativen Stress in MCT-PASMC geschlossen werden. Die Supprimierung von Nox1 führte zur Normalisierung der Nrf2-Expression, Sod2 zeigte eine deutliche Tendenz in Richtung einer verminderten Expression, jedoch nicht signifikant. Als potentieller Auslöser der gesteigerten Nox1-Expression in PASMC nach MCT-Behandlung wurde PDGF identifiziert, da PDGF-Stimulation zu einer Zunahme der Nox1-Expression in PASMC führte.

Diese Befunde weichen von den Erkenntnissen im Modell der Hypoxie-induzierten PH deutlich ab, insofern anstelle von Nox4, Nox1 verantwortlich ist. Zumindest mit Bezug auf die hier untersuchten humanen Proben, konnten die Ergebnisse nicht auf die humane IPAH übertragen werden. Allerdings handelt es sich beim MCT-Modell, zumindest initial, um eine stark inflammatorisches Modell. Möglicherweise stellen die Ergebnisse somit ein grundlegendes Charakteristikum der Ausbildung von pulmonalen Hypertonien dar, welche mit inflammatorischen Erkrankungen assoziiert sind, bzw. generell von inflammatorischen Gefäßerkrankungen.

Sollte sich die Übertragbarkeit dieses Postulats auf die humanen Erkrankungen bestätigen, wäre die vermehrte Produktion von Superoxidradikalen durch Nox1 in den PASMC ein möglicher Ansatzpunkt für eine Behandlung dieser Erkrankungen.

4.5 Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a severe disease of the pulmonary arterial vasculature and is characterized by an increase of the mean pulmonary arterial pressure. PH is accompanied with a remodeling of the affected vessels. The lumen of the vessels is decreased, and the blood pressure is increased. Although controversially discussed, one hypothesis suggests that the remodeling could, among other factors, be due to an increased production of reactive oxygen species (ROS), which is associated with oxidative stress inside the cells. Oxidative stress causes dedifferentiation, but also unregulated migration, and proliferation of various cell types in the vascular wall.

It is a common feature of most PH forms that pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) are intrinsically involved in the vascular remodeling process. The uncontrolled migration and proliferation of PASMC causes enhanced muscularization of muscularized vessels and a *de novo*-muscularization of non-muscularized vessels. Besides mitochondria, non-phagocytic NADPH-oxidases are a possible source of ROS production. For investigation of PH in animals, two experimental models are mainly used: 1. hypoxia-induced PH, and 2. MCT-induced PH. Recently it was shown that PASMC-derived ROS production is increased under hypoxia, and that non-phagocytic NADPH-oxidases are highly expressed under such conditions. Currently no data about the regulation of ROS and their potential source in MCT-induced PH are available. The objectives of the present study were thus to investigate, 1. if there is, similar to hypoxia-induced PH, an increased ROS production of PASMC in the MCT-induced PH and 2. if there is a change in the oxidative potential of the PASMC. Additionally, the study aimed to discover a potential source of ROS production, and their effect on cellular functions in the MCT-model.

Therefore, the effect of MCT on the ROS production of PASMC isolated from *Rattus norvegicus* was analyzed. Also, the expression of antioxidative enzymes, migration, proliferation and apoptosis, as well as ROS sensitive pathways were examined. PASMC isolated from rats with MCT-induced PH have been used, as well as PASMC of untreated controls.

ESR recordings and DHE-staining could demonstrate an increase of the intracellular superoxide production in MCT-PASMC. Real-time PCR and western blot analysis revealed an increased expression of Nox1, which was identified as the source of intracellular superoxide production by RNAi experiments. In subsequent experiments, Nox1 was proven to be the reason for elevated migration and proliferation of MCT-

PASMC. Changes in proliferation were caused by a Nox1-dependent upregulation of Cyclin D1. For migration no Nox1-dependent pathway has been found. Further, MCT-PASMC show oxidative stress, as supported by increased superoxide levels as well as by upregulation of Nrf2 and Sod2. Knockdown of Nox1 normalized Nrf2 expression and Sod2 expression by trend. As the possible trigger for increased Nox1 expression after MCT-treatment PDGF was identified, since PDGF stimulation led to an upregulation of Nox1 in PASMC. Compared to previous observations made in hypoxia-induced PH, it could be proven that Nox1, and not Nox4, is responsible for this effect in MCT-induced PH. When referring to the available analyzed human samples, these results could not be translated into human IPAH. However, the MCT model is an inflammatory model for PH. It is well possible that these data reflect basic characteristics of the development of PH associated to inflammatory diseases or inflammatory disease of the vasculature in general. If the transferability of this postulate should be confirmed, the increased superoxide production by Nox1 in PASMC might represent a new field for development of PH therapies.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Clauss W, Clauss C. Atmung und Gasaustausch. *Tierphysiologie kompakt*. 1. Auflage 2007 ed. Heidelberg, Stuttgart: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag; 2007. p. 135-55.
- (2) Campbell NA, Reece JB. *Biologie*. 6 ed. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2003.
- (3) Penzlin H. *Lehrbuch der Tierphysiologie*. 6 ed. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1996.
- (4) Eckert R, Randall D, Burggren W, French K. *Tierphysiologie*. 4 ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2002.
- (5) Faller A. *Der Körper des Menschen*. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag; 1995.
- (6) Golenhofen K. *Physiologie*. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1997.
- (7) Hoepfer MM. The new definition of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009 October;34(4):790-1.
- (8) Dony E. Therapeutischer Effekt des Protein-Tyrosinkinasehemmers Imatinib (STI 571) im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte. Giessen: JLU Giessen; 2006.
- (9) Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004 June 16;43(12 Suppl S):5S-12S.
- (10) Petkov V, Doberer D. Pulmonale Hypertonie. *Journal of Hypertonie* 2003;7(3):7-15.
- (11) Eddahibi S, Morrell N, D'Ortho MP, Naeije R, Adnot S. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2002 December;20(6):1559-72.
- (12) Butrous G, Ghofrani HA, Grimminger F. Pulmonary vascular disease in the developing world. *Circulation* 2008 October 21;118(17):1758-66.
- (13) Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. *Annu Rev Pathol* 2007;2:369-99.
- (14) Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 2006 September 1;71(4):620-9.
- (15) Voelkel NF, Tudor RM. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 1995 December;8(12):2129-38.

- (16) Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1997 January 9;336(2):111-7.
- (17) Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3(1):111-5.
- (18) Stenmark KR, McMurtry IF. Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: a time for reappraisal? *Circ Res* 2005 July 22;97(2):95-8.
- (19) Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2002 February;4(1):49-55.
- (20) Martinez-Lemus LA, Galinanes EL. Matrix metalloproteinases and small artery remodeling. *Drug Discov Today Dis Models* 2011;8(1):21-8.
- (21) Martinez-Lemus LA, Zhao G, Galinanes EL, Boone M. Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011 June;300(6):H2005-H2015.
- (22) Aytekin M, Aulak KS, Haserodt S, Chakravarti R, Cody J, Minai OA, Dweik RA. Abnormal platelet aggregation in idiopathic pulmonary arterial hypertension: Role of nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012 January 13.
- (23) Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* 2002 June;17:105-9.
- (24) Hislop A, Reid L. New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol* 1976 October;57(5):542-54.
- (25) Howell K, Preston RJ, McLoughlin P. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. *J Physiol* 2003 February 15;547(Pt 1):133-45.
- (26) Meyrick B, Reid L. The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study. *Lab Invest* 1978 February;38(2):188-200.
- (27) Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* 1979 June;236(6):H818-H827.
- (28) Ryland D, Reid L. The pulmonary circulation in cystic fibrosis. *Thorax* 1975 June;30(3):285-92.
- (29) Fishman AP, Pietra GG. Primary pulmonary hypertension. *Annu Rev Med* 1980;31:421-31.
- (30) Marsboom GR, Janssens SP. Models for pulmonary hypertension. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2004;1(3):289-95.

- (31) Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tudor RM. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004 June 16;43(12 Suppl S):25S-32S.
- (32) Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992 July 9;327(2):70-5.
- (33) Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2006 August;5(8):689-702.
- (34) Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, Phillips SC, Wilkins MR. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 July 1;172(1):105-13.
- (35) Kreymborg K, Uchida S, Gellert P, Schneider A, Boettger T, Voswinckel R, Wietelmann A, Szibor M, Weissmann N, Ghofrani AH, Schermuly R, Schranz D, Seeger W, Braun T. Identification of right heart-enriched genes in a murine model of chronic outflow tract obstruction. *J Mol Cell Cardiol* 2010 October;49(4):598-605.
- (36) Launay JM, Herve P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, Etienne N, Drouet L, Humbert M, Simonneau G, Maroteaux L. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 2002 October;8(10):1129-35.
- (37) Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, Dewachter L, Fadel E, Darteville P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 2006 April 18;113(15):1857-64.
- (38) Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 February 1;165(3):398-405.
- (39) Burg ED, Remillard CV, Yuan JX. Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications. *Br J Pharmacol* 2008 March;153 Suppl 1:S99-S111.
- (40) Voelkel NF, Tudor RM. Cellular and molecular biology of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 1997 October;10(5-6):231-41.
- (41) Stenmark KR, Orton EC, Reeves JT, Voelkel NF, Crouch EC, Parks WC, Mecham RP. Vascular remodeling in neonatal pulmonary hypertension. Role of the smooth muscle cell. *Chest* 1988 March;93(3 Suppl):127S-33S.

- (42) Stenmark KR, Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 1997;59:89-144.
- (43) Geiger R, Berger RM, Hess J, Bogers AJ, Sharma HS, Mooi WJ. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *J Pathol* 2000 June;191(2):202-7.
- (44) Benisty JI, McLaughlin VV, Landzberg MJ, Rich JD, Newburger JW, Rich S, Folkman J. Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2004 October;126(4):1255-61.
- (45) Le Cras TD, Hardie WD, Fagan K, Whitsett JA, Korfhagen TR. Disrupted pulmonary vascular development and pulmonary hypertension in transgenic mice overexpressing transforming growth factor- α . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 November;285(5):L1046-L1054.
- (46) Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le PJ, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Herve P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 July 1;178(1):81-8.
- (47) Ono M, Sawa Y, Mizuno S, Fukushima N, Ichikawa H, Bessho K, Nakamura T, Matsuda H. Hepatocyte growth factor suppresses vascular medial hyperplasia and matrix accumulation in advanced pulmonary hypertension of rats. *Circulation* 2004 November 2;110(18):2896-902.
- (48) Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, Newman JH, Phillips JA, III, Soubrier F, Trembath RC, Chung WK. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009 June 30;54(1 Suppl):S32-S42.
- (49) Graham BB, Bandeira AP, Morrell NW, Butrous G, Tuder RM. Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest* 2010 June;137(6 Suppl):20S-9S.
- (50) Pullamsetti SS, Savai R, Janssen W, Dahal BK, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Weissmann N, Schermuly RT. Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clin Microbiol Infect* 2011 January;17(1):7-14.
- (51) Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX, Humbert M. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2009 June 30;54(1 Suppl):S10-S19.
- (52) Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF, Tuder RM. Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Hum Pathol* 1997 April;28(4):434-42.

- (53) Hamamdžić D, Kasman LM, LeRoy EC. The role of infectious agents in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2002 November;14(6):694-8.
- (54) Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 May;151(5):1628-31.
- (55) Itoh T, Nagaya N, Ishibashi-Ueda H, Kyotani S, Oya H, Sakamaki F, Kimura H, Nakanishi N. Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology* 2006 March;11(2):158-63.
- (56) Dorfmüller P, Zarka V, Durand-Gasselin I, Monti G, Balabanian K, Garcia G, Capron F, Coulomb-Lhermine A, Marfaing-Koka A, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 February 15;165(4):534-9.
- (57) Balabanian K, Foussat A, Dorfmüller P, Durand-Gasselin I, Capel F, Bouchet-Delbos L, Portier A, Marfaing-Koka A, Krzysiek R, Rimaniol AC, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 May 15;165(10):1419-25.
- (58) Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M, Dartevielle P, Simonneau G, Adnot S, Eddahibi S. Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 November 15;176(10):1041-7.
- (59) van Suylen RJ, Smits JF, Daemen MJ. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 May;157(5 Pt 1):1423-8.
- (60) Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2011;8(8):443-55.
- (61) Rabinovitch M. EVE and beyond, retro and prospective insights. *Am J Physiol* 1999 July;277(1 Pt 1):L5-12.
- (62) Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. *Clin Chest Med* 2001 September;22(3):433-49, viii.
- (63) Bogaard HJ, Abe K, Vonk NA, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 2009 March;135(3):794-804.
- (64) Weissmann N, Grimminger F, Seeger W. Hypoxia in lung vascular biology and disease. *Cardiovasc Res* 2006 September 1;71(4):618-9.
- (65) Jakoubek V, Bibova J, Hampl V. Voltage-gated calcium channels mediate hypoxic vasoconstriction in the human placenta. *Placenta* 2006 September;27(9-10):1030-3.

- (66) Voelkel NF. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1986 June;133(6):1186-95.
- (67) von Euler US, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 1946;12:301-20.
- (68) Marshall BE, Marshall C, Benumof J, Saidman LJ. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs: effects of lung segment size and oxygen tension. *J Appl Physiol* 1981 December;51(6):1543-51.
- (69) Marshall BE, Marshall C, Frasch F, Hanson CW. Role of hypoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas exchange and blood flow distribution. 1. Physiologic concepts. *Intensive Care Med* 1994;20(4):291-7.
- (70) Thomas HM, III, Garrett RC. Strength of hypoxic vasoconstriction determines shunt fraction in dogs with atelectasis. *J Appl Physiol* 1982 July;53(1):44-51.
- (71) Brouns I, Pintelon I, Van GJ, De P, I, Timmermans JP, Adriaensen D. Vesicular glutamate transporter 2 is expressed in different nerve fibre populations that selectively contact pulmonary neuroepithelial bodies. *Histochem Cell Biol* 2004 January;121(1):1-12.
- (72) Plumier L. La circulation pulmonaire chez le chien. *Arch Int Physiol* 1904;1:176-213.
- (73) Bradford JR, Dean HP. The Pulmonary Circulation. *J Physiol* 1894 March 22;16(1-2):34-158.
- (74) Hillier SC, Graham JA, Hanger CC, Godbey PS, Glenny RW, Wagner WW, Jr. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J Appl Physiol* 1997 April;82(4):1084-90.
- (75) Kato M, Staub NC. Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia. *Circ Res* 1966 August;19(2):426-40.
- (76) Staub NC. Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 1985 October;88(4 Suppl):240S-5S.
- (77) Meyrick B, Reid L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol* 1980 July;100(1):151-78.
- (78) Janssens SP, Thompson BT, Spence CR, Hales CA. Polycythemia and vascular remodeling in chronic hypoxic pulmonary hypertension in guinea pigs. *J Appl Physiol* 1991 December;71(6):2218-23.
- (79) Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, Johns RA. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003 September 23;108(12):1493-8.

- (80) Nong Z, Stassen JM, Moons L, Collen D, Janssens S. Inhibition of tissue angiotensin-converting enzyme with quinapril reduces hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling. *Circulation* 1996 October 15;94(8):1941-7.
- (81) Steudel W, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Weimann J, Huang PL, Jones RC, Picard MH, Zapol WM. Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. *J Clin Invest* 1998 June 1;101(11):2468-77.
- (82) Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S, Rabinovitch M. Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat Med* 2000 June;6(6):698-702.
- (83) Environmental Health Criteria 80: Pyrrolizidine Alkaloids WHO. 1988.
- (84) Campbell AI, Kuliszewski MA, Stewart DJ. Cell-based gene transfer to the pulmonary vasculature: Endothelial nitric oxide synthase overexpression inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 November;21(5):567-75.
- (85) Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, McMurtry IF, Reeves JT. Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol* 1983 February;54(2):371-4.
- (86) Valdivia E, Lalich JJ, Hayashi Y, Sonnad J. Alterations in pulmonary alveoli after a single injection of monocrotaline. *Arch Pathol* 1967 July;84(1):64-76.
- (87) Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* 1989 July;38(1):57-80.
- (88) Schultze AE, Roth RA. Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1998 October;1(4):271-346.
- (89) Roth RA, Ganey PE. Platelets and the puzzles of pulmonary pyrrolizidine poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988 May;93(3):463-71.
- (90) Lalich JL, Johnson WD, Raczniak TJ, Shumaker RC. Fibrin thrombosis in monocrotaline pyrrole-induced cor pulmonale in rats. *Arch Pathol Lab Med* 1977 February;101(2):69-73.
- (91) Allen JR, Carstens LA. Pulmonary vascular occlusions initiated by endothelial lysis in monocrotaline-intoxicated rats. *Exp Mol Pathol* 1970 October;13(2):159-71.
- (92) Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 1980 November;239(5):H692-H702.

- (93) Todorovich-Hunter L, Johnson DJ, Ranger P, Keeley FW, Rabinovitch M. Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline. A biochemical and ultrastructural study. *Lab Invest* 1988 February;58(2):184-95.
- (94) Todorovich-Hunter L, Dodo H, Ye C, McCready L, Keeley FW, Rabinovitch M. Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease. *Am Rev Respir Dis* 1992 July;146(1):213-23.
- (95) Hayashi Y, Lalich JJ. Renal and pulmonary alterations induced in rats by a single injection of monocrotaline. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967 February;124(2):392-6.
- (96) Mittal M, Gu XQ, Pak O, Pamenter ME, Haag D, Fuchs DB, Schermuly RT, Ghofrani HA, Brandes RP, Seeger W, Grimminger F, Haddad GG, Weissmann N. Hypoxia induces K(v) channel current inhibition by increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2011 December 16.
- (97) Dumitrascu R, Koebrich S, Dony E, Weissmann N, Savai R, Pullamsetti SS, Ghofrani HA, Samidurai A, Traupe H, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulm Med* 2008;8:25.
- (98) Miranda CL, Carpenter HM, Cheeke PR, Buhler DR. Effect of ethoxyquin on the toxicity of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline and on hepatic drug metabolism in mice. *Chem Biol Interact* 1981 October;37(1-2):95-107.
- (99) Miranda CL, Reed RL, Cheeke PR, Buhler DR. Protective effects of butylated hydroxyanisole against the acute toxicity of monocrotaline in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981 July;59(3):424-30.
- (100) Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Solliday NH. Monocrotaline pneumotoxicity in mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1989;57(3):149-55.
- (101) Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Moreno L. Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 2010 December 31;174(3):212-20.
- (102) Irrcher I, Ljubicic V, Hood DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009 January;296(1):C116-C123.
- (103) Lee C, Miura K, Liu X, Zweier JL. Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000 December 15;275(50):38965-72.
- (104) Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Update: role of the angiotensin type-2 (AT(2)) receptor in blood pressure regulation. *Curr Hypertens Rep* 2000 April;2(2):198-201.

- (105) Ohashi M, Runge MS, Faraci FM, Heistad DD. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 October;26(10):2331-6.
- (106) Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003 June;4(2):51-61.
- (107) Romanowski A, Murray JR, Huston MJ. Effects of hydrogen peroxide on normal and hypertensive rats. *Pharm Acta Helv* 1960 July;35:354-7.
- (108) Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004 September;44(3):248-52.
- (109) Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species and Hypertension: A Complex Association. *Antioxid Redox Signal* 2008 March 3.
- (110) Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med* 2007 February;17(2):48-54.
- (111) Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006 July 15;71(2):247-58.
- (112) Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 2007 April;49(4):717-27.
- (113) Witko-Sarsat V, Rieu P, Scamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000 May;80(5):617-53.
- (114) Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004 October;122(4):339-52.
- (115) Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2006 July 15;71(2):216-25.
- (116) Demiryurek AT, Wadsworth RM. Superoxide in the pulmonary circulation. *Pharmacol Ther* 1999 December;84(3):355-65.
- (117) Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 October;20(10):2175-83.
- (118) Rhoades RA, Packer CS, Roepke DA, Jin N, Meiss RA. Reactive oxygen species alter contractile properties of pulmonary arterial smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1990 December;68(12):1581-9.
- (119) Weissmann N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Hanze J, Goyal P, Grimminger F, Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction--triggered by an increase in reactive oxygen species? *Novartis Found Symp* 2006;272:196-208.

- (120) Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 1970 July;50(3):319-75.
- (121) Fridovich I. Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. *Adv Exp Med Biol* 1976;74:530-9.
- (122) Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 2003 May;41(5):1096-101.
- (123) Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003 May;1(1):91-106.
- (124) Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992 March;70(3):593-9.
- (125) Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996 December 1;98(11):2572-9.
- (126) Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000 January;35(1 Pt 2):193-201.
- (127) Suematsu M, Suzuki H, Delano FA, Schmid-Schonbein GW. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation* 2002;9(4):259-76.
- (128) Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 2002 February;39(2):269-74.
- (129) Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2004 May 18;109(19):2357-62.
- (130) Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med* 1996;21(3):335-48.
- (131) Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004 January;36(1):1-9.
- (132) Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000 November 16;153(1-3):83-104.

- (133) Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 November;15(11):2032-6.
- (134) Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. 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* 1996 April 15;97(8):1916-23.
- (135) Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999 October;31(4):261-72.
- (136) Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol* 2002 December;53(4 Pt 1):515-24.
- (137) Tsutsui M. Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *J Atheroscler Thromb* 2004;11(2):41-8.
- (138) Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000 March 17;86(5):494-501.
- (139) Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003 August;285(2):R277-R297.
- (140) Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 2004 April 13;109(14):1795-801.
- (141) Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 2000 July 7;87(1):26-32.
- (142) Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997 February 4;95(3):588-93.
- (143) Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL, Pagano PJ. Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). *Circulation* 2002 November 5;106(19):2497-502.
- (144) Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002 September;59(9):1428-59.
- (145) Cross AR, Parkinson JF, Jones OT. The superoxide-generating oxidase of leucocytes. NADPH-dependent reduction of flavin and cytochrome b in solubilized preparations. *Biochem J* 1984 October 15;223(2):337-44.
- (146) Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* 2005 January 1;65(1):16-27.

- (147) Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002 January 15;397(2):342-4.
- (148) Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. *J Lab Clin Med* 1996 November;128(5):461-76.
- (149) Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 2003 September;28(9):502-8.
- (150) Harper AM, Chaplin MF, Segal AW. Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem J* 1985 May 1;227(3):783-8.
- (151) Henderson LM, Banting G, Chappell JB. The arachidonate-activable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel. Evidence that gp91-phox functions as an essential part of the channel. *J Biol Chem* 1995 March 17;270(11):5909-16.
- (152) Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JH, Chavan AJ, Haley B, Garcia RC, Rosen H, Scrace G. Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J* 1992 June 15;284 (Pt 3):781-8.
- (153) Paclet MH, Henderson LM, Campion Y, Morel F, Dagher MC. Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem J* 2004 September 15;382(Pt 3):981-6.
- (154) Rotrosen D, Kleinberg ME, Nunoi H, Leto T, Gallin JI, Malech HL. Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocyte oxidase cytochrome b558. *J Biol Chem* 1990 May 25;265(15):8745-50.
- (155) Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 2008 July;275(13):3249-77.
- (156) Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007 January;87(1):245-313.
- (157) Huang J, Hitt ND, Kleinberg ME. Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry* 1995 December 26;34(51):16753-7.
- (158) DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM. Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* 2000 May 5;275(18):13986-93.
- (159) Leto TL, Adams AG, de M, I. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 October 25;91(22):10650-4.
- (160) Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 2003 July 4;278(27):25234-46.

- (161) Leusen JH, Fluiter K, Hilarius PM, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BG. Interactions between the cytosolic components p47phox and p67phox of the human neutrophil NADPH oxidase that are not required for activation in the cell-free system. *J Biol Chem* 1995 May 12;270(19):11216-21.
- (162) Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 2002 March 22;277(12):10121-8.
- (163) Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J* 2002 December 2;21(23):6312-20.
- (164) Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T, Namiki H. Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox. *J Exp Med* 1996 September 1;184(3):893-902.
- (165) van der Vliet A. NADPH oxidases in lung biology and pathology: Host defense enzymes, and more. *Free Radic Biol Med* 2007.
- (166) Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999 September 2;401(6748):79-82.
- (167) Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004 March;4(3):181-9.
- (168) Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 January;22(1):21-7.
- (169) Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002 March 26;105(12):1429-35.
- (170) Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004 January 20;109(2):227-33.
- (171) Rey FE, Pagano PJ. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 December 1;22(12):1962-71.
- (172) Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001 May 11;88(9):888-94.
- (173) Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1996 October;271(4 Pt 2):H1626-H1634.

- (174) Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C, Runge MS. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999 July 9;274(28):19814-22.
- (175) Hohler B, Holzapfel B, Kummer W. NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 2000 July;114(1):29-37.
- (176) Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H. 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* 2001 October 9;104(15):1767-72.
- (177) Li JM, Shah AM. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 2002 May 31;277(22):19952-60.
- (178) Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 December 23;94(26):14483-8.
- (179) Souza HP, Laurindo FR, Ziegelstein RC, Berlowitz CO, Zweier JL. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 February;280(2):H658-H667.
- (180) Sorescu D, Somers MJ, Lassegue B, Grant S, Harrison DG, Griendling KK. Electron spin resonance characterization of the NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2001 March 15;30(6):603-12.
- (181) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994 June;74(6):1141-8.
- (182) Barry-Lane PA, Patterson C, van der MM, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, Runge MS. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest* 2001 November;108(10):1513-22.
- (183) Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998 June 29;82(12):1298-305.
- (184) Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA. Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 August;289(2):L159-L173.
- (185) Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007 January;87(1):245-313.

- (186) Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002 January;82(1):47-95.
- (187) Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998 April;10(2):248-53.
- (188) Wattanapitayakul SK, Bauer JA. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 2001 February;89(2):187-206.
- (189) De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998 February 1;329 (Pt 3):653-7.
- (190) Mohazzab KM, Wolin MS. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 1994 December;267(6 Pt 1):L815-L822.
- (191) Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 1994 June;266(6 Pt 2):H2568-H2572.
- (192) Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 2005 February;70(2):200-14.
- (193) Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005 February 25;120(4):483-95.
- (194) Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003 October 15;552(Pt 2):335-44.
- (195) Malinska D, Kudin AP, Bejtka M, Kunz WS. Changes in mitochondrial reactive oxygen species synthesis during differentiation of skeletal muscle cells. *Mitochondrion* 2011 July 20.
- (196) Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. 5. Auflage ed. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2003.
- (197) Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 1974 May 15;42(1):68-72.
- (198) Forman HJ, Kennedy JA. Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. *Biochem Biophys Res Commun* 1974 October 8;60(3):1044-50.
- (199) Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977 April 30;180(2):248-57.
- (200) Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002 March;80(5):780-7.

- (201) Huang CY, Fujimura M, Chang YY, Chan PH. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase attenuates acute activation of activator protein-1 after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001 March;32(3):741-7.
- (202) Zhou W, Zhang Y, Hosch MS, Lang A, Zwacka RM, Engelhardt JF. Subcellular site of superoxide dismutase expression differentially controls AP-1 activity and injury in mouse liver following ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2001 April;33(4):902-14.
- (203) Zhao Y, Oberley TD, Chaiswing L, Lin SM, Epstein CJ, Huang TT, St Clair D. Manganese superoxide dismutase deficiency enhances cell turnover via tumor promoter-induced alterations in AP-1 and p53-mediated pathways in a skin cancer model. *Oncogene* 2002 May 30;21(24):3836-46.
- (204) Eckert D, Buhl S, Weber S, Jager R, Schorle H. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol* 2005;6(13):246.
- (205) Xu Y, Fang F, Dhar SK, Bosch A, St Clair WH, Kasarskis EJ, St Clair DK. Mutations in the SOD2 promoter reveal a molecular basis for an activating protein 2-dependent dysregulation of manganese superoxide dismutase expression in cancer cells. *Mol Cancer Res* 2008 December;6(12):1881-93.
- (206) Hsu JL, Visner GA, Burr IA, Nick HS. Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: isolation, characterization, and species comparison. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 July 31;186(2):936-43.
- (207) Oberley LW. Anticancer therapy by overexpression of superoxide dismutase. *Antioxid Redox Signal* 2001 June;3(3):461-72.
- (208) St Clair DK, Porntadavity S, Xu Y, Kinningham K. Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene. *Methods Enzymol* 2002;349:306-12.
- (209) Zhu CH, Huang Y, Oberley LW, Domann FE. A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. *J Biol Chem* 2001 April 27;276(17):14407-13.
- (210) Huang Y, Peng J, Oberley LW, Domann FE. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radic Biol Med* 1997;23(2):314-20.
- (211) Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 2002 August 1;365(Pt 3):561-75.
- (212) Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JG, Weir EK. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 February;294(2):H570-H578.

- (213) Zhu C, Huang Y, Weydert CJ, Oberley LW, Domann FE. Constitutive activation of transcription factor AP-2 is associated with decreased MnSOD expression in transformed human lung fibroblasts. *Antioxid Redox Signal* 2001 June;3(3):387-95.
- (214) Baldelli S, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Glutathione and copper, zinc superoxide dismutase are modulated by overexpression of neuronal nitric oxide synthase. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(11):2660-70.
- (215) Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991 December 10;1072(2-3):129-57.
- (216) Kim YH, Yoo HY, Chang MS, Jung G, Rho HM. C/EBP alpha is a major activator for the transcription of rat Cu/Zn superoxide dismutase gene in liver cell. *FEBS Lett* 1997 January 20;401(2-3):267-70.
- (217) Yoo HY, Chang MS, Rho HM. Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. *Gene* 1999 June 24;234(1):87-91.
- (218) Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM. *Biochemie*. 5 ed. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2003.
- (219) Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001 January 15;353(Pt 2):411-6.
- (220) Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002 September 19;419(6904):316-21.
- (221) Li M, Chiu JF, Mossman BT, Fukagawa NK. Down-regulation of manganese-superoxide dismutase through phosphorylation of FOXO3a by Akt in explanted vascular smooth muscle cells from old rats. *J Biol Chem* 2006 December 29;281(52):40429-39.
- (222) Ding G, Fu M, Qin Q, Lewis W, Kim HW, Fukai T, Bacanamwo M, Chen YE, Schneider MD, Mangelsdorf DJ, Evans RM, Yang Q. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. *Cardiovasc Res* 2007 November 1;76(2):269-79.
- (223) Jeney V, Itoh S, Wendt M, Gradek Q, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Circ Res* 2005 April 15;96(7):723-9.
- (224) Qin Z, Itoh S, Jeney V, Ushio-Fukai M, Fukai T. Essential role for the Menkes ATPase in activation of extracellular superoxide dismutase: implication for vascular oxidative stress. *FASEB J* 2006 February;20(2):334-6.

- (225) Qin Z, Gongora MC, Ozumi K, Itoh S, Akram K, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. Role of Menkes ATPase in angiotensin II-induced hypertension: a key modulator for extracellular superoxide dismutase function. *Hypertension* 2008 November;52(5):945-51.
- (226) Joseph A, Li Y, Koo HC, Davis JM, Pollack S, Kazzaz JA. Superoxide dismutase attenuates hyperoxia-induced interleukin-8 induction via AP-1. *Free Radic Biol Med* 2008 October 15;45(8):1143-9.
- (227) Harris CA, Derbin KS, Hunte-McDonough B, Krauss MR, Chen KT, Smith DM, Epstein LB. Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J Immunol* 1991 July 1;147(1):149-54.
- (228) Zelko IN, Folz RJ. Myeloid zinc finger (MZF)-like, Kruppel-like and Ets families of transcription factors determine the cell-specific expression of mouse extracellular superoxide dismutase. *Biochem J* 2003 January 15;369(Pt 2):375-86.
- (229) Mittal M, Roth M, Konig P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, Selbitz AC, Schermuly RT, Ghofrani HA, Kwapiszewska G, Kummer W, Klepetko W, Hoda MA, Fink L, Hanze J, Seeger W, Grimminger F, Schmidt HH, Weissmann N. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circ Res* 2007 August 3;101(3):258-67.
- (230) Fike CD, Slaughter JC, Kaplowitz MR, Zhang Y, Aschner JL. Reactive oxygen species from NADPH oxidase contribute to altered pulmonary vascular responses in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 November;295(5):L881-L888.
- (231) Fresquet F, Pourageaud F, Leblais V, Brandes RP, Savineau JP, Marthan R, Muller B. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol* 2006 July;148(5):714-23.
- (232) Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS, Folz RJ. Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 January;290(1):L2-10.
- (233) Dennis KE, Aschner JL, Milatovic D, Schmidt JW, Aschner M, Kaplowitz MR, Zhang Y, Fike CD. NADPH oxidases and reactive oxygen species at different stages of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009 October;297(4):L596-L607.
- (234) Lu X, Dang CQ, Guo X, Molloy S, Wassall CD, Kemple MD, Kassab GS. Elevated oxidative stress and endothelial dysfunction in right coronary artery of right ventricular hypertrophy. *J Appl Physiol* 2011 June;110(6):1674-81.
- (235) Hoidal JR, Xu P, Huecksteadt T, Sanders KA, Pfeffer K, Sturrock AB. Lung injury and oxidoreductases. *Environ Health Perspect* 1998 October;106 Suppl 5:1235-9.

- (236) Yao H, Edirisinghe I, Yang SR, Rajendrasozhan S, Kode A, Caito S, Adenuga D, Rahman I. Genetic ablation of NADPH oxidase enhances susceptibility to cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *Am J Pathol* 2008 May;172(5):1222-37.
- (237) Al-Mehdi AB, Zhao G, Dodia C, Tozawa K, Costa K, Muzykantov V, Ross C, Blecha F, Dinauer M, Fisher AB. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circ Res* 1998 October 5;83(7):730-7.
- (238) Nisbet RE, Graves AS, Kleinhenz DJ, Rupnow HL, Reed AL, Fan TH, Mitchell PO, Sutliff RL, Hart CM. The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009 May;40(5):601-9.
- (239) Mitsushita J, Lambeth JD, Kamata T. The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res* 2004 May 15;64(10):3580-5.
- (240) Manoury B, Nenau S, Leclerc O, Guenon I, Boichot E, Planquois JM, Bertrand CP, Lagente V. The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2005;6:11.
- (241) Wright JM, Merlo CA, Reynolds JB, Zeitlin PL, Garcia JG, Guggino WB, Boyle MP. Respiratory epithelial gene expression in patients with mild and severe cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006 September;35(3):327-36.
- (242) Joseph BZ, Routes JM, Borish L. Activities of superoxide dismutases and NADPH oxidase in neutrophils obtained from asthmatic and normal donors. *Inflammation* 1993 June;17(3):361-70.
- (243) Weir EK, Lopez-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* 2005 November 10;353(19):2042-55.
- (244) Archer SL, Michelakis ED, Thebaud B, Bonnet S, Moudgil R, Wu XC, Weir EK. A central role for oxygen-sensitive K⁺ channels and mitochondria in the specialized oxygen-sensing system. *Novartis Found Symp* 2006;272:157-71.
- (245) Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, Limsuwan A, Krick S, Juhaszova M, Seiden JE, Rubin LJ, Yuan JX. Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 November;279(5):C1540-C1549.
- (246) Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De SD, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* 2009 November;1787(11):1342-51.
- (247) Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996 December 13;271(50):32253-9.

- (248) MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, Watson DG, Gottlieb E. Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol* 2007 May;27(9):3282-9.
- (249) Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 2002 April;109 Suppl:S67-S79.
- (250) Bushdid PB, Osinska H, Waclaw RR, Molkentin JD, Yutzey KE. NFATc3 and NFATc4 are required for cardiac development and mitochondrial function. *Circ Res* 2003 June 27;92(12):1305-13.
- (251) McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res* 2004 October 15;95(8):830-40.
- (252) Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006 June 6;113(22):2630-41.
- (253) Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN, Michelakis ED. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 July 3;104(27):11418-23.
- (254) McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Bonnet S, Puttagunta L, Michelakis ED. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2005 June;115(6):1479-91.
- (255) Weissmann N, Zeller S, Schafer RU, Turowski C, Ay M, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Grimminger F. Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006 April;34(4):505-13.
- (256) Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* 2005 January;98(1):404-14.
- (257) Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Samidurai A, Pullamsetti S, Weissmann N, Schudt C, Ermert L, Seeger W, Grimminger F. Antiremodeling effects of iloprost and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolafentrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004 April 30;94(8):1101-8.
- (258) Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* 2001 June 22;88(12):1259-66.

- (259) Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T. Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 December 12;103(50):19093-8.
- (260) Rose F, Grimminger F, Appel J, Heller M, Pies V, Weissmann N, Fink L, Schmidt S, Krick S, Camenisch G, Gassmann M, Seeger W, Hanze J. Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. *FASEB J* 2002 October;16(12):1660-1.
- (261) Fuchs B. Die essentielle Bedeutung des „Classical Transient Receptor Potential 6“ (TRPC6)-Ionenkanals für die akute vaskuläre Hypoxiereaktion der Lunge - Untersuchungen an isolierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen [Inaugural Dissertation] Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II; 2006.
- (262) Dahal BK, Kosanovic D, Pamarthi PK, Sydykov A, Lai YJ, Kast R, Schirok H, Stasch JP, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT. Therapeutic efficacy of azaindole-1 in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2010 October;36(4):808-18.
- (263) Dahal BK, Cornitescu T, Tretyn A, Pullamsetti SS, Kosanovic D, Dumitrascu R, Ghofrani HA, Weissmann N, Voswinckel R, Banat GA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 January 15;181(2):158-67.
- (264) Fink L, Kohlhoff S, Stein MM, Hanze J, Weissmann N, Rose F, Akkayagil E, Manz D, Grimminger F, Seeger W, Bohle RM. cDNA array hybridization after laser-assisted microdissection from nonneoplastic tissue. *Am J Pathol* 2002 January;160(1):81-90.
- (265) Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986;48:657-67.
- (266) Magnettech GmbH. *Detection, identification and quantification of free radicals in biological systems and fluids by electron spin resonance (ESR) spectroscopy*. Magnettech GmbH, Berlin-Adlershof; 2006.
- (267) Janzen EG. Spin trapping. *Methods Enzymol* 1984;105:188-98.
- (268) Dikalova AE, Kadiiska MB, Mason RP. An in vivo ESR spin-trapping study: free radical generation in rats from formate intoxication--role of the Fenton reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 November 20;98(24):13549-53.
- (269) Koppenol WH, van Buuren KJ, Butler J, Braams R. The kinetics of the reduction of cytochrome c by the superoxide anion radical. *Biochim Biophys Acta* 1976 November 9;449(2):157-68.

- (270) Dikalov S, Fink B, Skatchkov M, Bassenge E. Comparison of glyceryl trinitrate-induced with pentaerythrityl tetranitrate-induced in vivo formation of superoxide radicals: effect of vitamin C. *Free Radic Biol Med* 1999 July;27(1-2):170-6.
- (271) Dikalov S, Skatchkov M, Fink B, Bassenge E. Quantification of superoxide radicals and peroxynitrite in vascular cells using oxidation of sterically hindered hydroxylamines and electron spin resonance. *Nitric Oxide* 1997 October;1(5):423-31.
- (272) Dikalov S, Skatchkov M, Bassenge E. Spin trapping of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine and 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 February 24;231(3):701-4.
- (273) Dikalova A, Clempus R, Lassegue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San MA, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griendling KK. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* 2005 October 25;112(17):2668-76.
- (274) Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003 June 20;278(25):22546-54.
- (275) Dikalov SI, Kirilyuk IA, Voinov M, Grigor'ev IA. EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free Radic Res* 2011 April;45(4):417-30.
- (276) Karlsson A, Nixon JB, McPhail LC. Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* 2000 March;67(3):396-404.
- (277) Peshavariya HM, Dusting GJ, Selemidis S. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radic Res* 2007 June;41(6):699-712.
- (278) Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S. Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 October;287(4):C895-C902.
- (279) Benov L, Szejnberg L, Fridovich I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med* 1998 November 1;25(7):826-31.
- (280) Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukocyte Biol*. 47, 440-448. 1989.

- (281) Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004 May;142(2):231-55.
- (282) Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 1996 February 15;16(4):1324-36.
- (283) Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* 1994 February;55(2):253-8.
- (284) Gallop PM, Paz MA, Henson E, Latt SA. Dynamic approaches to the delivery of reporter reagents into living cells. *Biotechniques* 1:32. 1984.
- (285) Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986 December;103(6 Pt 2):2787-96.
- (286) Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbell GR. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001 July;49(3):130-45.
- (287) Dikalov S, Grigor'ev IA, Voinov M, Bassenge E. Detection of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-4-phosphonooxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine: quantification of extracellular superoxide radicals formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 July 20;248(2):211-5.
- (288) McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969 November 25;244(22):6049-55.
- (289) Wojcieszyn JW, Schlegel RA, Lumley-Sapanski K, Jacobson KA. Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes. *J Cell Biol* 1983 January;96(1):151-9.
- (290) Beckman SJ, Minor LR, White WC, Repine EJ, Rose MG, Freeman AB. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 263, No.14[May 15], 6884-6892. 3-9-1987.
- (291) Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* 2010;3(112):re3.
- (292) Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 2006;46:113-40.
- (293) Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:89-116.

- (294) Calkins MJ, Johnson DA, Townsend JA, Vargas MR, Dowell JA, Williamson TP, Kraft AD, Lee JM, Li J, Johnson JA. The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal* 2009 March;11(3):497-508.
- (295) Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, Laurindo FR. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 December 9;280(49):40813-9.
- (296) de APA, Verissimo-Filho S, Guimaraes LL, Silva AC, Takiuti JT, Santos CX, Janiszewski M, Laurindo FR, Lopes LR. Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *J Leukoc Biol* 2011 October;90(4):799-810.
- (297) Liu H, Liu ZY, Guan Q. Oral sildenafil prevents and reverses the development of pulmonary hypertension in monocrotaline-treated rats. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007 October;6(5):608-13.
- (298) Takuwa N, Takuwa Y, Yanagisawa M, Yamashita K, Masaki T. A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1989 May 15;264(14):7856-61.
- (299) Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, Weber DS, Alexander RW, Griendling KK. Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 August;287(2):C494-C499.
- (300) Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996 September 20;271(38):23317-21.
- (301) Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999 August 6;274(32):22699-704.
- (302) Lee MY, San MA, Mehta PK, Dikalova AE, Garrido AM, Datla SR, Lyons E, Krause KH, Banfi B, Lambeth JD, Lassegue B, Griendling KK. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 April;29(4):480-7.
- (303) Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M, Kovacic H. Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration. *Biochim Biophys Acta* 2008 January;1783(1):23-33.
- (304) Schroder K, Helmcke I, Palfi K, Krause KH, Busse R, Brandes RP. Nox1 mediates basic fibroblast growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 August;27(8):1736-43.

- (305) Weber DS, Taniyama Y, Rocic P, Seshiah PN, Dechert MA, Gerthoffer WT, Griendling KK. Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Circ Res* 2004 May 14;94(9):1219-26.
- (306) Yamamoto M, Nagata-Ohashi K, Ohta Y, Ohashi K, Mizuno K. Identification of multiple actin-binding sites in cofilin-phosphatase Slingshot-1L. *FEBS Lett* 2006 March 20;580(7):1789-94.
- (307) Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA, Lambeth JD. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 May 8;98(10):5550-5.
- (308) Burch PM, Heintz NH. Redox regulation of cell-cycle re-entry: cyclin D1 as a primary target for the mitogenic effects of reactive oxygen and nitrogen species. *Antioxid Redox Signal* 2005 May;7(5-6):741-51.
- (309) Kim YS, Morgan MJ, Choksi S, Liu ZG. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell* 2007 June 8;26(5):675-87.
- (310) Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2009 November 1;47(9):1239-53.
- (311) Lassegue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 April;30(4):653-61.
- (312) Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005 October;115(10):2811-21.
- (313) Reindel JF, Roth RA. The effects of monocrotaline pyrrole on cultured bovine pulmonary artery endothelial and smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1991 March;138(3):707-19.
- (314) Altieri RJ, Olson JW, Gillespie MN. Altered pulmonary vascular smooth muscle responsiveness in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 1986 February;236(2):390-5.
- (315) Hoorn CM, Wagner JG, Roth RA. Effects of monocrotaline pyrrole on cultured rat pulmonary endothelium. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993 June;120(2):281-7.
- (316) Dony E, Lai YJ, Dumitrascu R, Pullamsetti SS, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Schudt C, Flockerzi D, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Partial reversal of experimental pulmonary hypertension by phosphodiesterase 3/4 inhibition. *Eur Respir J* 2007 November 21.
- (317) Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 2001 October;92(1):1-20.

- (318) Lee YS, Byun J, Kim JA, Lee JS, Kim KL, Suh YL, Kim JM, Jang HS, Lee JY, Shin IS, Suh W, Jeon ES, Kim DK. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung. *Exp Mol Med* 2005 February 28;37(1):27-35.
- (319) Meyrick B, Reid L. Development of pulmonary arterial changes in rats fed *Crotalaria spectabilis*. *Am J Pathol* 1979 January;94(1):37-51.
- (320) Ghodsi F, Will JA. Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol* 1981 February;240(2):H149-H155.
- (321) Crnkovic S, Hrzenjak A, Marsh LM, Olschewski A, Kwapiszewska G. Origin of neomuscularized vessels in mice exposed to chronic hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 2011 December 15;179(2-3):342-5.
- (322) Meyrick BO, Reid LM. *Crotalaria*-induced pulmonary hypertension. Uptake of 3H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls. *Am J Pathol* 1982 January;106(1):84-94.
- (323) Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Habibi J, Dellsperger KC. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol* 2010 October 26;2(10):316-24.
- (324) Perez-Vizcaino F, Lopez-Lopez JG, Santiago R, Cogolludo A, Zaragoza-Arnez F, Moreno L, Alonso MJ, Salaices M, Tamargo J. Postnatal maturation in nitric oxide-induced pulmonary artery relaxation involving cyclooxygenase-1 activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002 October;283(4):L839-L848.
- (325) Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep* 2010 April;12(2):135-42.
- (326) Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. 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* 2001 December 1;31(11):1456-64.
- (327) Diebold I, Petry A, Hess J, Gorchach A. The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Mol Biol Cell* 2010 June 15;21(12):2087-96.
- (328) Katsuyama M. NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. *J Pharmacol Sci* 2010 October;114(2):134-46.
- (329) Brandes RP. Role of NADPH oxidases in the control of vascular gene expression. *Antioxid Redox Signal* 2003 December;5(6):803-11.
- (330) Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* 2006 August;21:269-80.
- (331) Ellmark SH, Disting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* 2005 February 1;65(2):495-504.

- (332) Haurani MJ, Cifuentes ME, Shepard AD, Pagano PJ. Nox4 oxidase overexpression specifically decreases endogenous Nox4 mRNA and inhibits angiotensin II-induced adventitial myofibroblast migration. *Hypertension* 2008 July;52(1):143-9.
- (333) Miller FJ, Jr., Filali M, Huss GJ, Stanic B, Chamseddine A, Barna TJ, Lamb FS. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ Res* 2007 September 28;101(7):663-71.
- (334) Schneider D, Ganesan S, Comstock AT, Meldrum CA, Mahidhara R, Goldsmith AM, Curtis JL, Martinez FJ, Hershenson MB, Sajjan U. Increased cytokine response of rhinovirus-infected airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 August 1;182(3):332-40.
- (335) Carneseccchi S, Deffert C, Pagano A, Garrido-Urbani S, Metrailler-Ruchonnet I, Schappi M, Donati Y, Matthay MA, Krause KH, Barazzone AC. NADPH oxidase-1 plays a crucial role in hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 November 15;180(10):972-81.
- (336) Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett* 2008 July 18;266(1):37-52.
- (337) Privratsky JR, Wold LE, Sowers JR, Quinn MT, Ren J. AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase. *Hypertension* 2003 August;42(2):206-12.
- (338) Lin D, Takemoto DJ. Oxidative activation of protein kinase Cgamma through the C1 domain. Effects on gap junctions. *J Biol Chem* 2005 April 8;280(14):13682-93.
- (339) Saito S, Frank GD, Mifune M, Ohba M, Utsunomiya H, Motley ED, Inagami T, Eguchi S. Ligand-independent trans-activation of the platelet-derived growth factor receptor by reactive oxygen species requires protein kinase C-delta and c-Src. *J Biol Chem* 2002 November 22;277(47):44695-700.
- (340) Li WG, Miller FJ, Jr., Zhang HJ, Spitz DR, Oberley LW, Weintraub NL. H(2)O(2)-induced O(2) production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem* 2001 August 3;276(31):29251-6.
- (341) Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2004 January 1;61(1):159-68.
- (342) Katsuyama M, Ozgur CM, Arakawa N, Kakehi T, Nishinaka T, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Yabe-Nishimura C. Myocyte enhancer factor 2B is involved in the inducible expression of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme. *FEBS J* 2007 October;274(19):5128-36.

- (343) Esposito F, Chirico G, Montesano GN, Posadas I, Ammendola R, Russo T, Cirino G, Cimino F. Protein kinase B activation by reactive oxygen species is independent of tyrosine kinase receptor phosphorylation and requires SRC activity. *J Biol Chem* 2003 June 6;278(23):20828-34.
- (344) Saito Y, Haendeler J, Hojo Y, Yamamoto K, Berk BC. Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cell Biol* 2001 October;21(19):6387-94.
- (345) Kalmes A, Daum G, Clowes AW. EGFR transactivation in the regulation of SMC function. *Ann N Y Acad Sci* 2001 December;947:42-54.
- (346) Tanimoto T, Lungu AO, Berk BC. Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2004 April 30;94(8):1050-8.
- (347) Cunnick JM, Dorsey JF, Standley T, Turkson J, Kraker AJ, Fry DW, Jove R, Wu J. Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1998 June 5;273(23):14468-75.
- (348) Goldkorn T, Balaban N, Matsukuma K, Chea V, Gould R, Last J, Chan C, Chavez C. EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H₂O₂ redox stress. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998 November;19(5):786-98.
- (349) Dikalov S, Kirilyuk I, Grigor'ev I. Spin trapping of O-, C-, and S-centered radicals and peroxy-nitrite by 2H-imidazole-1-oxides. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 January 17;218(2):616-22.
- (350) Wyche KE, Wang SS, Griendling KK, Dikalov SI, Austin H, Rao S, Fink B, Harrison DG, Zafari AM. C242T CYBA polymorphism of the NADPH oxidase is associated with reduced respiratory burst in human neutrophils. *Hypertension* 2004 June;43(6):1246-51.
- (351) Dikalov SI, Li W, Mehranpour P, Wang SS, Zafari AM. Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochem Pharmacol* 2007 April 1;73(7):972-80.
- (352) Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassegue B, Griendling KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 January;27(1):42-8.
- (353) Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol* 1999 March;65(3):337-40.
- (354) Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 2010 February 9;49(5):835-42.

- (355) Rajasekaran NS, Connell P, Christians ES, Yan LJ, Taylor RP, Orosz A, Zhang XQ, Stevenson TJ, Peshock RM, Leopold JA, Barry WH, Loscalzo J, Odelberg SJ, Benjamin IJ. Human alpha B-crystallin mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Cell* 2007 August 10;130(3):427-39.
- (356) Itoh K, Ishii T, Wakabayashi N, Yamamoto M. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic Res* 1999 October;31(4):319-24.
- (357) Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 September 2;94(18):9866-8.
- (358) Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, Dyck JR, Gombert-Maitland M, Thebaud B, Husain AN, Cipriani N, Rehman J. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 2010 June 22;121(24):2661-71.
- (359) Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2008 April 22;51(16):1527-38.
- (360) Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2003 August 1;35(3):236-56.
- (361) Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 2006 October 30;25(51):6706-16.
- (362) Xu Y, Kiningham KK, Devalaraja MN, Yeh CC, Majima H, Kasarskis EJ, St Clair DK. An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol* 1999 September;18(9):709-22.
- (363) DiSilvestre D, Kleeberger SR, Johns J, Levitt RC. Structure and DNA sequence of the mouse MnSOD gene. *Mamm Genome* 1995 April;6(4):281-4.
- (364) Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991 March;4(3):278-86.
- (365) Meyrick B, Magnuson MA. Identification and functional characterization of the bovine manganous superoxide dismutase promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994 January;10(1):113-21.
- (366) Eastgate J, Moreb J, Nick HS, Suzuki K, Taniguchi N, Zucali JR. A role for manganese superoxide dismutase in radioprotection of hematopoietic stem cells by interleukin-1. *Blood* 1993 February 1;81(3):639-46.
- (367) Minc E, de CP, Masson P, Thiery L, Dutertre S, Amor-Gueret M, Jaulin C. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem* 1999 January 1;274(1):503-9.

- (368) Mingatto FE, Dorta DJ, dos Santos AB, Carvalho I, da Silva CH, da S, V, Uyemura SA, dos Santos AC, Curti C. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. *Toxicol* 2007 October;50(5):724-30.
- (369) Abid MR, Tsai JC, Spokes KC, Deshpande SS, Irani K, Aird WC. Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulated NADPH oxidase-dependent mechanism. *FASEB J* 2001 November;15(13):2548-50.
- (370) Sagar S, Kallo IJ, Kaul N, Ganguly NK, Sharma BK. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem* 1992 April;111(1-2):103-8.
- (371) Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Dominiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 2000 May 9;101(18):2206-12.
- (372) Kim JS, Huang TY, Bokoch GM. Reactive oxygen species regulate a slingshot-cofilin activation pathway. *Mol Biol Cell* 2009 June;20(11):2650-60.
- (373) Burch PM, Heintz NH. Redox regulation of cell-cycle re-entry: cyclin D1 as a primary target for the mitogenic effects of reactive oxygen and nitrogen species. *Antioxid Redox Signal* 2005 May;7(5-6):741-51.
- (374) Dai YP, Bongalon S, Tian H, Parks SD, Mutafova-Yambolieva VN, Yamboliev IA. Upregulation of profilin, cofilin-2 and LIMK2 in cultured pulmonary artery smooth muscle cells and in pulmonary arteries of monocrotaline-treated rats. *Vascul Pharmacol* 2006 May;44(5):275-82.
- (375) Agnew BJ, Minamide LS, Bamburg JR. Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem* 1995 July 21;270(29):17582-7.
- (376) Moriyama K, Iida K, Yahara I. Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1996 January;1(1):73-86.
- (377) Mouneimne G, Soon L, Desmarais V, Sidani M, Song X, Yip SC, Ghosh M, Eddy R, Backer JM, Condeelis J. Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. *J Cell Biol* 2004 August 30;166(5):697-708.
- (378) Song X, Chen X, Yamaguchi H, Mouneimne G, Condeelis JS, Eddy RJ. Initiation of cofilin activity in response to EGF is uncoupled from cofilin phosphorylation and dephosphorylation in carcinoma cells. *J Cell Sci* 2006 July 15;119(Pt 14):2871-81.
- (379) Gainé SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998 August 29;352(9129):719-25.

- (380) Szanto I, Rubbia-Brandt L, Kiss P, Steger K, Banfi B, Kovari E, Herrmann F, Hadengue A, Krause KH. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2005 October;207(2):164-76.
- (381) Rokutan K, Kawahara T, Kuwano Y, Tominaga K, Sekiyama A, Teshima-Kondo S. NADPH oxidases in the gastrointestinal tract: a potential role of Nox1 in innate immune response and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2006 September;8(9-10):1573-82.
- (382) Tominaga K, Kawahara T, Sano T, Toida K, Kuwano Y, Sasaki H, Kawai T, Teshima-Kondo S, Rokutan K. Evidence for cancer-associated expression of NADPH oxidase 1 (Nox1)-based oxidase system in the human stomach. *Free Radic Biol Med* 2007 December 15;43(12):1627-38.
- (383) Lambeth JD. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* 2007 August 1;43(3):332-47.
- (384) Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989 February 9;320(6):365-76.
- (385) Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J* 2003 August;17(11):1502-4.
- (386) Dhaunsi GS, Paintlia MK, Kaur J, Turner RB. NADPH oxidase in human lung fibroblasts. *J Biomed Sci* 2004 September;11(5):617-22.
- (387) Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009 December;297(6):L1013-L1032.
- (388) Zielonka J, Kalyanaraman B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med* 2010 April 15;48(8):983-1001.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Gasaustausch in einer Säugerlunge.....	9
Abb. 1.2: Lungen- und Körperkreislauf des Blutes.....	10
Abb. 1.3: Vasculäres <i>Remodeling</i> bei pulmonalarterieller Hypertonie.....	14
Abb. 1.4: Anlagerung der zytosolischen Untereinheiten an die membrangebundenen Komponenten zur Bildung einer funktionellen NADPH-Oxidase.	26
Abb. 2.1: Lunge von <i>Rattus norvegicus</i> mit Eisenpartikeln (Pfeile) in den pulmonalarteriellen Gefäßen für die Isolierung von PASMC aus der Ratte.	44
Abb. 2.2: Fluoreszenzmikroskopische Abbildung von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen auf einer Zellkulturplatte kurz nach der Aussaat.....	45
Abb. 2.3: Oxidation der <i>spin probes</i> CMH und CPH durch ROS zu einem stabilen Nitroxid-Radikal.	63
Abb. 2.4: Zeitachse des Versuchsablaufs für die einzelnen Ansätze.	66
Abb. 2.5: ESR-Spektrum der <i>spin probes</i> CMH bzw. CPH in gefrorenen Proben.....	67
Abb. 2.6: Oxydation von Dihydroethidium zu dem fluoreszierenden Ethidium durch ROS.....	68
Abb. 2.7: Schematische Übersicht des experimentellen Ablaufs.	71
Abb. 3.1: Hämodynamische und vaskuläre Veränderungen durch MCT-Behandlung.....	73
Abb. 3.2: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer direkten Immunfluoreszenz-Färbung von <i>α-sma</i> in isolierten PASMC der Passage 2.....	74
Abb. 3.3: Erhöhte intrazelluläre Superoxidproduktion in MCT-PASMC.....	78
Abb. 3.4: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der DHE-Färbung intrazellulärer Superoxidradikale.	79
Abb. 3.5: Mitochondriale ROS-Produktion.	80
Abb. 3.6: Nrf2 ist in MCT-PASMC hochreguliert.....	81
Abb. 3.7: Expression der antioxidativen Sod1, Sod2, Katalase, Gpx1 und Sod-Aktivität in PAMSC... ..	84
Abb. 3.8: Expression von Nox1 und PDI in Ratten-PASMC bzw. im Lungenhomogenat.....	85
Abb. 3.9: Expression von Nox1 in humanen PASMC und Lungengewebe.	86
Abb. 3.10. Lokalisation von Nox1 in Rattenlungenschnitten.....	87
Abb. 3.11: Einfluss von Nox1 siRNA auf die Superoxidproduktion nach PMA-Stimulation der PASMC.....	89
Abb. 3.12: Nox1-Signalwege.....	90
Abb. 3.13: Einfluss von MCT und Nox1 <i>knockdown</i> auf Proliferation, Migration und Apoptose der PASMC.....	91
Abb. 3.14: Expression von Cyclin D1, Cofilin und Phosphorylierung von Cofilin.....	92
Abb. 3.15: Expression und Phosphorylierung von Akt, PAK1 und JNK 1/2/3.....	93
Abb. 3.16: Einfluss der Nox1 siRNA-Behandlung auf die Expression von Cyclin D1, Sod2, Nrf2 und die Phosphorylierung von Cofilin.....	94
Abb. 3.17: Effekt der PDGF-Stimulation auf die Nox1-Expression in MCT- und Kontroll-PASMC... ..	95

Abb. 4.1: Schematische Darstellung des postulierten pathologischen Nox1-Signalweges bei MCT-induzierter PH	109
--	-----

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. 1: Zusammenfassung der verschiedenen Nox-Enzyme und deren regulatorische Untereinheiten, Aktivierungsmechanismen und Expressionsmuster in den Zellen der Lunge.	25
Tab. 2. 1: Auflistung der verwendeten Primer-Paare.	54
Tab. 2. 2: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion.	56
Tab. 2. 3: Temperaturprofil der Real-Time PCR.	56
Tab. 2. 4: Auflistung der verwendeten <i>in situ</i> -Hybridisierungssonden	57
Tab. 2. 5: Auflistung der verwendeten Antikörper.	59
Tab. 2. 6: Verwendete Einstellungen der modifizierbaren Parameter des ESR-Spektrometers: High Sensitive Benchtop ESR Spektrometer MiniScope MS200 (Magnettech, Berlin).	65
Tab. 2. 7: Auflistung der für die ESR-Spektroskopie vorbereiteten Ansätze.	65

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen:

A. lat.	Arteria (Arterie)
Abb.	Abbildung
ACF	Autokorrelation
AD	Aktivator-Domäne
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AngII	Angiotensin II
APAH	assoziierte pulmonalarterielle Hypertonie
AU	<i>arbitrary units</i>
-sma	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
B	Magnetfeld
BSA	<i>bovines serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAH	chronische alveoläre Hypoxie
C-Terminus	Carboxyl-Terminus eines Peptides
CIC	Chlorid-Kanal 3
CMH	1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CPH	1-hydroxy-3-carboxy-2,2,5-tetramethyl-pyrrolidinhydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPMPO	5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid
d.h.	das heißt
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's verändertes Adler Medium
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenylen Iodonium
E	Energie der ungepaarten Elektronen

EDTA	Ethylendiamintetraessigäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EPR	Elektronenparamagnetischeresonanz
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESR	Elektronenspinresonanz
et al.	und andere
evtl.	eventuell
FAD	Flavin-Adenindinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
g	Landé-Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
1N HCl	1 normale Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
h _v	Mikrowellenenergie
IF	integrierte Fluoreszenzdichte
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
KG	Körpergewicht
LV	linker Ventrikel
M	molar
MAP-Kinase	mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)
MCT	Monocrotalin
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MW	Mittelwert
mPAP	mittlerer pulmonalerterieller Druck
n	Anzahl der Messungen

N	Anzahl der verwendeten Tiere/Proben (humane Daten)
N-Terminus	Amino-Terminus eines Peptides
NAD	Nikotinamid-Adenindinukleotid
NADH	reduzierte Form von NAD
NADP	Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat
NADPH	reduzierte Form von NADP
NO	Stickstoffmonoxid
Nox	NADPH-Oxidase
NoxA	NADPH-Oxidase-Aktivator
NoxO	NADPH-Oxidase-Organisator
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzelle
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Personal Computer
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDGF-A	<i>Platelet derived growth factor A</i> (Ligand)
PDGF-B	<i>Platelet derived growth factor B</i> (Ligand)
PDGFR-	<i>Platelet derived growth factor-receptor alpha</i>
PDGFR- β	<i>Platelet derived growth factor-receptor beta</i>
PEG/p	Polyethylenglycol
PH	pulmonale Hypertonie
phox	phagozytäre Oxidase
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol Myristat Acetat
P/S	Penicillin / Streptomycin
PTK	Protein-Tyrosin Kinase
PTP	Protein-Tyrosin Phosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
RTK	Rezeptor-Tyrosin Kinase

RV	rechter Ventrikel
S	Süd/Septum
s.	siehe
s.c.	subkutan
SD (CD)	Sprague Dawley
SEM	<i>standard error of mean</i>
SH3	Src-Homologie-Domäne 3
siRNA	<i>small interference ribonukleinsäure</i>
Sod	Superoxiddismutase
sog.	sogenannt
SPH	sekundäre pulmonale Hypertonie
Src	ein Onkogen
Tab.	Tabelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor alpha
TPR	Tetracopeptid-Repeat
U	Spannung
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnliches
v.a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
WHO	<i>world health organization</i>
z.B.	zum Beispiel
/d	Delta
μ_B	Bohr-Magneton-Konstante

Größenordnungen:

c	centi (10^{-2})
k	kilo (10^3)
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})

Einheiten:

A	Ampere
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
g	Gramm
G	Gauss
h	Stunde
Hz	Hertz
kg	Kilogramm
L	Liter
M	Molar
m	Meter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
m ²	Quadratmeter
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
pH	Oxoniumionenkonzentration
s	Sekunde
V	Volt
W	Watt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
%	Prozent

6.4 Wissenschaftliche Beiträge

6.4.1 Veröffentlichungen

Cell. 2011 Oct 14;147(2):293-305.

"Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice."

Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Veit F, Kwapiszewska G, Weisel FC, Milger K, Egemnazarov B, Turowska A, Fuchs B, Nikam S, Roth M, Sydykov A, Medebach T, Klepetko W, Jaksch P, Dumitrascu R, Garn H, Voswinckel R, Kostin S, Seeger W, Schermuly RT, Grimminger F, Ghofrani HA, Weissmann N.

University of Giessen Lung Center, Excellence Cluster Cardiopulmonary System, Giessen, Germany.

Nature Communications 3, Article number: 649 / doi:10.1038/ncomms1660

"Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia–reperfusion induced oedema in mice."

Norbert Weissmann, Akylbek Sydykov, Hermann Kalwa, Ursula Storch, Beate Fuchs, Michael Mederos y Schnitzler, Ralf P. Brandes, Friedrich Grimminger, Marcel Meissner, Marc Freichel, Stefan Offermanns, Florian Veit, Oleg Pak, Karl-Heinz Krause, Ralph T. Schermuly, Alison C Brewer, Harald H.H.W. Schmidt, Werner Seeger, Ajay M. Shah, Thomas Gudermann, Hossein A. Ghofrani & Alexander Dietrich

6.4.2 Kongressbeiträge

"ROS detection by ESR-Spectroscopy" (Area E meeting des Excellence Cluster Cardio Pulmonary System (ECCPS), Frankfurt, 2008), **Vortrag**

"Impact of monocrotaline on generation of reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle cells of *Rattus norvegicus*" (Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Freiburg, 2008), **Vortrag**

"Increased generation of reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle cells from monocrotaline-treated rats" (Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Borstel, 2009), **Vortrag**

"Increased generation of reactive oxygen species in PASMC from monocrotaline-treated rats" (7th MBML Annual Retreat, Rauschholzhausen, 2009), **Vortrag**

"Potential role of NADPH oxidase 1 derived ROS in vascular remodeling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension of rats" (8th MBML Annual Retreat, Rauschholzhausen, 2010), **Vortrag**

"Increased generation of reactive oxygen species by Nox1 in pulmonary arterial smooth muscle cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats" (ECCPS Retreat, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, 2010), **Vortrag**

"Nox1 contributes to pulmonary vascular remodeling in monocrotaline-induced pulmonary hypertension" (9th MBML Annual Retreat, Rauschholzhausen, 2011), **Vortrag**

"Einfluss von Monocrotalin auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen von *Rattus norvegicus*" (Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Freiburg, 2008), **Poster**

"Increased intracellular amount of reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle cells from monocrotaline treated rats." (ECCPS Retreat, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, 2009), **Poster**

"Increased generation of reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle cells, isolated from monocrotaline-treated rats." (ERS Annual Congress, Vienna, 2009),

Poster

"Increased intracellular generation of reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle cells from monocrotaline-treated rats." (SRRBM 16th Annual Meeting, San Francisco, 2009), **Poster**

"Increased generation of reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle cells in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats." (ATS 2010, New Orleans, 2010), **Poster**

"Increased generation of reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle cells in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats." (Gordon Research Conference, Les Diablerets, 2010), **Poster**

"Nox1 derived generation of reactive oxygen species in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension of rats." (PH-DACH-Herbstsymposium, Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg, 2010), **Poster**

"Nox1 derived generation of reactive oxygen species in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension of rats." (ERS Annual Congress, Barcelona, 2010), **Poster**

"Superoxide generation by Nox1 contributes to abnormal migration and proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells in rats." (SRRBM 17th Annual Meeting, Orlando, 2010), **Poster**

"Vascular remodeling in MCT induced pulmonary hypertension is partially driven by elevated Nox1 activity." (ECCPS Retreat, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, 2011), **Poster**

6.4.3 Preise

Posterpreis (2. Preis), Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V., Arbeitsgruppe „Pulmonale Hypertonie“, 2010, Heidelberg

„*ERS Young Scientist Sponsorship*“ der European Respiratory Society, 2010, Barcelona

„*Travel Award*“ der Society for Free Radical Biology and Medicine, 2009,
San Francisco

6.5 Versicherung

„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, Februar 2012

Florian Veit

6.6 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die auf unterschiedlichste Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei...

...Herrn Prof. Dr. Weissmann für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

...Herrn Prof. Dr. Clauss für die Betreuung und die Begutachtung der Arbeit.

...Herrn Prof. Dr. Ralph T. Schermuly und Herrn Prof. Dr. Alfred Pingoud für die Bewertung meiner Disputation.

...Herrn Oleg Pak und Herrn Dr. Djuro Kosanovic für die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in allen Fragen, den freundschaftlichen Umgang, die guten Ratschläge, die aufbauenden Gespräche und für Kaffee in großen Mengen.

...Frau Ingrid Breitenborn-Müller für die aufopfernde Hilfsbereitschaft, ihr Vertrauen und die Geduld mich in allen Launen zu ertragen.

...Frau Carmen Homberger, Frau Miriam Wessendorf und Frau Karin Quanz für technische Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre.

...Frau Christine Veith und Frau Friederike Weisel für den freundschaftlichen Umgang, sowie für den Gedanken- und Meinungs Austausch.

...Herrn Dr. Michael Seimetz, Herrn Dr. Markus Roth, Frau Alexandra Pichel sowie allen anderen Mitarbeitern die mich während dieser Arbeit begleitet haben.

Der größte Dank, für den es keine Worte gibt, gilt jedoch Johanna und meiner Tochter Svea, sowie meinen Eltern, meinen Brüdern und Großeltern, die mir bedingungslos Halt, Vertrauen, Motivation und Liebe geschenkt haben, wodurch ich alle Hindernisse überwinden konnte.