

DER EINFLUSS EINES NO-DEFIZITS
AUF DIE TRANSKRIPTION
PROFIBROTISCHER PROTEINE IN DER LUNGE

Bastian Brockhoff



Der Einfluss eines NO-Defizits auf die Transkription
profibrotischer Proteine in der Lunge

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Bastian Brockhoff

aus Stadtlohn

Frankfurt 2019

**Aus dem Institut für Physiologie,
unter der Leitung von Prof. Dr. R. Schulz,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. R. Voswinckel

Tag der Disputation: 06.08.2020

Meiner Familie

***„Es gibt keine langwierige Arbeit, ausgenommen die,
mit der du nicht zu beginnen wagst“.***

Charles Baudelaire

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Stickstoffmonoxid (NO)	2
1.1.1 Bedeutung des Stickstoffmonoxids als Vasodilatator	2
1.1.2 Rolle des NO in pulmonaler Pathogenese und Homöostase	3
1.1.3 Die Familie der NO-Synthasen und die NO-Synthese	3
1.1.4 Bedeutung der eNOS und Regulation der eNOS-Aktivität	4
1.2 Das Modell des L-NAME-induzierten Hypertonus	5
1.2.1 Entstehung und Bedeutung des NO-defizitären Hypertonus	5
1.2.2 Grundlagen des NO-defizitären Hypertonus	6
1.2.3 Funktionsprinzip der Blutdruckregulation unter NO-Defizienz	7
1.3 Oxidativer Stress	10
1.3.1 Entstehung und Auswirkungen des oxidativen Stresses	10
1.3.2 Mediatoren des oxidativen Stresses	11
1.3.3 Die Enzymfamilie der NADPH-Oxidasen	13
1.3.3.1 Einfluss der NADPH-Oxidasen auf die Pathogenese des Hypertonus sowie auf die Pathogenese fibrotischer Lungenerkrankungen	13
1.3.4 Endogene Verteidigungsmechanismen zur Abwehr von oxidativem Stress	16
1.3.4.1 Die Enzymfamilie der Superoxiddismutasen	17
1.3.4.2 SOD-1 – Kupfer-Zink-enthaltende Superoxiddismutase (CuZn-SOD)	18
1.3.4.3 SOD-2 – Manganhaltige Superoxiddismutase (Mn-SOD)	18
1.3.4.4 SOD-3 – Extrazelluläre Superoxiddismutase	19
1.4 Pulmonale Anpassungsvorgänge unter NO-Defizienz	19
1.4.1 Pulmonale Adaptation – Die Rolle der EZM und des PTHrP-Systems	19
1.4.2 Das pulmonale PTHrP-System	21
1.4.2.1 PTHrP-vermittelte Effekte in Physiologie und Pathophysiologie	21
1.4.2.2 Downstream targets und Effektorzellen des PTHrP-Systems	23
1.4.2.2.1 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma (PPAR γ)	23
1.4.2.2.2 Adipocyte differentiation-related protein (ADRP)	23
1.4.2.2.3 Pulmonale Lipofibroblasten (Alveoläre interstitielle Fibroblasten)	24
1.4.2.2.4 Alveolarepithelzellen Typ II (Pneumozyten Typ II)	24
1.5 Fragestellung dieser Arbeit	26
2. Material	27
2.1 Gewebeproben	27
2.2 Geräte	27
2.2.1 Allgemeine Laborgeräte	27
2.2.2 Spezielle Laborgeräte und Gebrauchsgegenstände	28
2.3 Verbrauchsmaterialien	29

2.4 Chemikalien	29
2.4.1 Antikörper	31
2.4.2 Primer	32
2.5 EDV und Statistik	35
3. Methoden	36
3.1 Studiendesign	36
3.2 Medikamentengabe	38
3.3 Blutdruckmessung	39
3.4 real-time RT-PCR am iCycler®	41
3.4.1 RNA-Isolierung aus Lungengewebe	41
3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	41
3.4.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	42
3.4.4 real-time RT-Polymerase Kettenreaktion (real-time RT-PCR)	43
3.5 Western Blot	45
3.5.1 Proteinisolierung aus Rattenlungen	45
3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteinauftrennung)	46
3.5.3 Western Blot (Elektroblotting)	47
3.5.4 Immunologischer Proteinnachweis	48
3.5.4.1 Antigen-Antikörper-Reaktion	48
3.5.4.2 Enhanced Chemilumineszenz (ECL)-Detektion	48
3.5.5 Auswertung	49
3.6 Statistische Auswertung	49
4. Ergebnisse	50
4.1 Ergebnisse der real-time RT-PCR-Untersuchungen	50
4.1.1 Genexpression ausgewählter Marker der pulmonalen Homöostase sowie essentieller Marker des Zellwachstums und der Zellproliferation	51
4.1.1.1 Effekte des L-NAME auf die mRNA-Expression des pulmonalen PTHrP-Systems	51
4.1.1.2 Einfluss hämodynamischer Parameter auf mRNA-Expression des PTHrP-Systems ..	53
4.1.1.3 Pulmonale mRNA-Expression der Ornithindecaboxylase (ODC)	55
4.1.2 Pulmonale mRNA-Expression ausgewählter Fibrosemarker	57
4.1.2.1 Genexpression fibrotischer Markerproteine sowie des Fibrosemediators TGF- β 1	57
4.1.2.2 Hämodynamischer Einfluss auf die Genexpression der Fibrosemarker	59
4.1.3 Genexpression der Enzyme des oxidativen Stresses im Lungengewebe	60
4.1.3.1 mRNA-Expression der Marker des oxidativen Stresses	60
4.1.3.2 Genexpression der Detoxifikationsenzyme des oxidativen Stresses	62
4.1.4 Einfluss von Tempol und L-NAME auf die Genexpression oxidativer und anti-oxidativer Marker im Lungengewebe	64
4.1.5 Einfluss des Tieralters auf die Genexpression der untersuchten Marker	67

4.2 Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen	69
4.2.1 Proteinexpression von PTHrP und PTH-1-Rezeptor im Lungengewebe	69
4.2.2 Pulmonale Proteinexpression der Ornithindecaboxylase (ODC)	71
5. Diskussion	73
5.1 Das Modell des L-NAME-induzierten Hypertonus und die Rolle der eNOS-defizienten Mäuse	74
5.2 Beurteilung der real-time RT-PCR- und Western Blot-Untersuchungen des Lungengewebes	75
5.2.1 NO-Defizienz – Auswirkungen auf Expression und Aktivität des pulmonalen PTHrP-Systems	76
5.2.2 Pulmonales Remodeling – Der Einfluss hämodynamischer Faktoren auf die Regulationsmechanismen des PTHrP-Systems	78
5.2.3 Pulmonale NO-Defizienz – Anpassung des Metabolismus der Enzyme eNOS und ODC	79
5.2.4 Pulmonale NO-Defizienz – Anpassung der Expression ausgewählter Fibrosemarker	80
5.2.5 Auswirkungen des ACE-Hemmers Captopril auf die Expression ausgewählter Fibrosemarker	83
5.2.6 Auswirkungen der NO-Defizienz auf die Expression molekularer Marker des oxidativen Stresses	84
5.2.7 Auswirkungen der NO-Defizienz auf die Expression relevanter Enzyme der oxidativen Abwehr	84
5.2.8 Tempol – Einfluss auf pulmonale Anpassungsvorgänge und oxidativen Stress ..	85
5.2.8.1 Tempol – SOD-Mimetikum aus der Gruppe der Nitroxide	85
5.2.8.2 Tempol – Effekte auf die Expression von Markerproteinen des oxidativen Stresses	86
5.2.9 Altersbedingte Einflüsse auf die Expression von Markerproteinen des oxidativen Stresses	87
5.3 Schlussfolgerung	89
6. Zusammenfassung	91
7. Summary	92
8. Abkürzungsverzeichnis	93
9. Abbildungsverzeichnis	101

10. Tabellenverzeichnis	103
11. Literaturverzeichnis	104
12. Publikationsverzeichnis	119
13. Ehrenwörtliche Erklärung	120
14. Danksagung	121
15. Tabellarischer Lebenslauf	122

1. Einleitung

Die Regulation des Gefäßtonus, und daraus sich ergebend der systemisch-arterielle Blutdruck eines Organismus, unterliegt dem ausbalanciertem Zusammenspiel zweier Regelkreisläufe. Unter anderem stehen sich hierbei die neuronalen Regulationsmechanismen des sympathischen Nervensystems – in Zusammenarbeit mit dem endokrinen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) – sowie die endogenen Mechanismen des Gefäßendothels gegenüber. Im Falle einer physiologisch ausbalancierten Interaktion dieser Systeme, stellt sich ein normotensiver systemisch-arterieller Blutdruck ein. Kuneš et al. gelang in diesem Zusammenhang im Tiermodell der Nachweis, dass ein gestörtes Gleichgewicht und daraus resultierend eine vorherrschende Aktivität des sympathischen beziehungsweise des endokrinen Anteils, ebenso wie eine verminderte Aktivität der Mechanismen des Gefäßendothels, zur Manifestation eines Hypertonus führt (125).

Zur Bearbeitung der zentralen Fragestellung dieser Arbeit, richtet sich der Fokus daher auf die endothelialen Mechanismen und Faktoren, welche zur Regulation des Blutdruckes beitragen. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass die Endothelzellen der Gefäßinnenwand entscheidend an der Steuerung der Funktionen des Gefäßsystems beteiligt sind. Zu den Aufgaben dieser Zellschicht zählen die Synthese sowie die kontrollierte Freisetzung zahlreicher vasoaktiver Substanzen und Mediatoren. Mittels der, durch diese Mechanismen, vermittelten Effekte erfolgt die elementare Regulation der Gefäßhomöostase sowie des Gefäßtonus. Im Falle einer schadhafte Beeinträchtigung dieser Mechanismen kommt es jedoch zur endothelialen Dysfunktion und zur Manifestation diverser Krankheitsbilder, welche nicht selten typische Charakteristika des Gefäß- und Organremodelings aufweisen. Aus der Gruppe der vasoaktiven Mediatoren, kommt dem vasodilatatorisch-wirkenden Stickstoffmonoxid (NO) eine herausragende Schlüsselrolle in der Regulation der vaskulären Funktionen zu. Endotheliales NO unterhält den Gefäßtonus, welcher entscheidend für den Blutfluss im Gefäßsystem sowie die Regulation des arteriellen Blutdrucks ist (165). Des Weiteren dient NO, welches dem Gefäßendothel entstammt, der Begrenzung einer etwaigen Intimahypertrophie, indem es die Proliferation, Migration sowie die Collagensynthese glatter Gefäßmuskelzellen inhibiert (72, 123, 211). In der Lunge vermittelt NO u.a. Vaso- und Bronchodilatation, antiproliferative und antiinflammatorische sowie – unter bestimmten Bedingungen – auch antioxidative Effekte (107, 155, 166).

Aufgrund dieser Eigenschaften steht endothelialer Stickstoffmonoxid (NO) im Mittelpunkt, der in dieser Arbeit untersuchten Fragestellung.

1.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) wurde ursprünglich als Endothelium-derived relaxing Factor (EDRF) von Furchgott und Zawadzki identifiziert (67). Diese ursprünglich verwandte Bezeichnung beschreibt zum einen die grundlegende Funktion und zum anderen den endogenen Ursprung dieser vasoaktiven biologischen Substanz. In der gegenwärtigen Forschung ist dieses Molekül unter der Bezeichnung Stickstoffmonoxid (NO) weitläufig bekannt und fungiert als Mediator in einer Vielzahl an biologischen Prozessen (166), dabei unter anderem als Hormon, Neurotransmitter und Signalmolekül.

1.1.1 Bedeutung des Stickstoffmonoxid (NO) als Vasodilatator

Stickstoffmonoxid (NO) gehört zur Gruppe der freien Radikale und lässt sich als gasförmiger sekundärer Botenstoff charakterisieren, welcher seine vasodilatatorische Wirkung über eine cGMP-abhängige zelluläre Signalkaskade vermittelt. Endothelzellen produzieren NO: i) als Antwort auf eine Stimulation durch chemische Mediatoren wie Bradykinin und Acetylcholin oder ii) als Antwort auf mechanische Kräfte wie, die sich aus dem Blutfluss ergebende Wandschubspannung. Endotheliales NO diffundiert nach der Synthese in benachbarte glatte Gefäßmuskelzellen und führt dort in einem ersten Schritt zur Aktivierung der zytoplasmatischen löslichen Guanylatcyclase (sGC) (165). Diese Aktivierung führt dann in einem zweiten Schritt zur vermehrten Produktion von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP), welches wiederum die Protein-Kinase G aktiviert (164, 165). Über die Aktivierung dieser intrazellulären Signalkaskade kommt es letztendlich zur Vasorelaxation (169).

Unter physiologischen Bedingungen ließ sich nachweisen, dass Stickstoffmonoxid (NO) die tonische Aktivität des sympathischen Nervensystems (SNS) hemmt (252). Der endotheliale Botenstoff NO wirkt somit auf die adrenerg-vermittelten Effekte der sympathischen Neurotransmission ein und schlussendlich der vasokonstriktiven Wirkung des SNS entgegen. Dies wird belegt durch die Tatsache, dass sich in eNOS-knockout-Mäusen ein geringes Niveau an Stickstoffmonoxid (NO) nachweisen lässt und dass es in derartigen Versuchstieren zur Manifestation eines ausgeprägten Hypertonus kommt (54, 216). Ähnliche Beobachtungen wurden an Hypertonikern gemacht, die im Vergleich zur untersuchten Kontrollgruppe eine verminderte endothelial-vermittelte Vasodilatation aufweisen (185). In diesem Zusammenhang konnten Studien zeigen, dass vaskuläres Stickstoffmonoxid (NO) in der Lage ist kurzzeitige Blutdruckschwankungen abzufangen (229, 230).

1.1.2 Rolle des NO in pulmonaler Pathogenese und pulmonaler Homöostase

In der Pathogenese einer Vielzahl von Lungenerkrankungen zeigt sich die endotheliale Dysfunktion als einer der grundlegend krankheitsauslösenden bzw. krankheitsbegünstigenden Faktoren. Mit endothelialer Dysfunktion geht ein Defizit an Stickstoffmonoxid (NO) einher, welches darin begründet liegt, dass Endothelzellen nicht mehr in der Lage sind ausreichend hohe Konzentrationen an NO zu produzieren. Dieser Pathomechanismus wurde in der Lunge unter anderem im pulmonal-arteriellen Hypertonus (PAH) sowie in der COPD, des Weiteren aber auch extrapulmonal in kardiovaskulären Erkrankungen, wie z.B. dem Hypertonus, beobachtet (3, 10, 37, 112, 139). Darüber hinaus lässt sich sagen, dass zahlreiche weitere pulmonale Pathologien mit einer verminderten NO-Synthase-Aktivität einhergehen bzw. in ihrer Entstehung durch diese begünstigt werden. Für diese Fälle zeigt sich übereinstimmend, dass aus der verminderten Enzymaktivität eine oxidative Imbalance resultiert, welche die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) induziert. Als Konsequenz daraus kommt es in der Lunge schließlich zu fibrotischen Umbauvorgängen und zum Organremodeling (107, 159). Im Zusammenhang mit diesen typischen Charakteristika chronischer Lungenerkrankungen, zeigten experimentelle Studien, dass gasförmig inhaliertes Stickstoffmonoxid (NO) nicht nur zu einer Dilatation der pulmonalen Gefäße führt, sondern auch die Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) reduzieren kann (155).

1.1.3 Die Familie der NO-Synthasen und die NO-Synthese

Stickstoffmonoxid (NO) ist einer der wenigen endogenen Mediatoren, der nicht in vesikulären Strukturen gespeichert, sondern entsprechend des Bedarfs synthetisiert wird. Die Synthese von endogenem NO wird durch die verschiedenen Isoenzyme aus der Familie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert (90). Zur Synthese von endogenem Stickstoffmonoxid (NO) wird die semiessentielle Aminosäure L-Arginin als Substrat benötigt (183). Die verschiedenen Enzymisofomen aus der Familie der NO-Synthasen katalysieren die Reaktion von L-Arginin zu NO und L-Citrullin. Als Cofaktoren dieser Reaktion werden Sauerstoff und reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) benötigt (11). Es lassen sich drei unterschiedliche Isoformen der NO-Synthase beschreiben, welche grob in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können: i) konstitutive (basale) und ii) induzierbare NO-Synthasen. Sowohl die endotheliale (eNOS) als auch die neuronale (nNOS) NO-Synthase werden konstitutiv exprimiert (166) und sezernieren Stickstoffmonoxid (NO) auf basalem Niveau in nanomolaren (nM) Konzentrationen in kurzzeitigen Peaks. Trotz der geringeren NO-Produktion durch

konstitutiv exprimierte NO-Synthasen tragen diese wesentlich zur Stabilisierung des Blutdrucks bei (38). Als Gegenpol dazu fungiert die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Die Expression und Aktivität dieses Enzyms wird durch diverse Stimuli, wie z.B. inflammatorische Mediatoren induziert. iNOS produziert Stickstoffmonoxid in Konzentrationen im μM -Bereich (4, 87). Aufgrund dieser deutlichen Unterschiede in der – durch die unterschiedlichen NO-Synthase-Isoformen – produzierten Menge an Stickstoffmonoxid, wird vermutet, dass iNOS-entstammendes NO als toxisch-schädlicher Mediator (92) und eNOS-abhängig synthetisiertes NO als protektiver Mediator agiert (88). Die herausragende Bedeutung der eNOS sowohl für die endotheliale Funktion als auch für die vaskuläre Homöostase ist daher unbestritten. Dies wird weiterhin dadurch untermauert, dass die fortdauernde Produktion und Freisetzung, von eNOS-entstammendem Stickstoffmonoxid (NO), entscheidend zur Funktionalität und Integrität des Gefäßsystems sowie zur physiologischen Steuerung von Gefäßtonus und systemisch-arteriellem Blutdruck beiträgt. Swislocki et al. konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass eine unspezifische Hemmung der Aktivität der NO-Synthasen, die Funktion des Stickstoffmonoxid (NO) als parakrinen Botenstoff beeinträchtigt, was schließlich zur Entwicklung eines Bluthochdrucks führt (235).

1.1.4 Bedeutung der eNOS und Regulation der eNOS-Aktivität

Als endothelialer Ursprung des Stickstoffmonoxid (NO), besitzt die eNOS eine maßgebliche Rolle hinsichtlich der Vermittlung der Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen. Hierdurch erfährt sie wesentliche Relevanz für die Blutdruckregulation (172). Die Ergebnisse zahlreicher Forschungsarbeiten untermauern diese Relevanz zusätzlich dadurch, indem sie aufzeigen, dass die endotheliale NO-Synthase (eNOS) in einer Vielzahl an unterschiedlichen Zellen exprimiert wird, u.a. Endothelzellen (183, 184), Thrombozyten (198), glatten Gefäßmuskelzellen sowie Kardiomyozyten (9). In der Lunge – als zentrales untersuchtes Organsystem dieser Studie – wird eNOS, als Hauptquelle des Stickstoffmonoxid (NO), überwiegend in Endothel- und Epithelzellen exprimiert (166). Innerhalb der aufgelisteten Zelltypen, ist die endotheliale NO-Synthase ihrerseits innerhalb der Plasmamembran in spezialisierten Mikrodomänen (sogenannte Caveolae) lokalisiert und ihre enzymatische Aktivität wird im Allgemeinen auf zwei Wegen reguliert: i) mechanisch und ii) pharmakologisch.

Für die hier vorgelegte Studie ist primär der mechanische Weg der eNOS-Regulation von vorrangiger Bedeutung. Dieser wird getriggert über eine Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase, vermittelt durch die mechanischen Kräfte des systemisch-

arteriellen Blutdrucks sowie der Wandschubspannung, welche sich in Korrelation zum Blutfluss erhöht (133). Als gemeinsame Endstrecke sowohl der mechanischen als auch der pharmakologischen Regulationsmechanismen, kommt es durch das Second-Messenger-System des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]$, was eine Aktivitätssteigerung der eNOS induziert (90). Die vorrangige Bedeutung des bereits erwähnten mechanischen Weges, für die in der hier vorgelegten Studie untersuchten Sachverhalte, lässt sich dadurch erklären, dass sowohl Gefäßwände als auch Endothelzellen im Falle eines Hypertonus – durch die gesteigerten mechanischen Kräfte und die stärkere Wandschubspannung – eine charakteristische Dehnung erfahren. Studien haben gezeigt, dass Wandschubspannung (sog. „shear stress“) und mechanische Kräfte in den Blutgefäßen als stärkster Stimulus der endothelialen NO-Synthese fungieren. Diese Kräfte können darüber hinaus auch unabhängig von einer Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Enzymaktivierung der eNOS führen, und zwar durch direkte Phosphorylierung des Enzyms (61). In diesem Zusammenhang fungiert die Wandschubspannung als Stimulus, um die endotheliale Transportkapazität des NO-Substrats L-Arginin zu erhöhen. Die gesteigerte eNOS-Aktivität resultiert dann in einer vermehrten Bioverfügbarkeit von endotheliale Stickstoffmonoxid (NO). Zusätzlich zur Aktivität der eNOS, steigern die Wandschubspannung (145, 253) des Blutflusses sowie die mechanischen Kräfte (277) des Blutdrucks, des Weiteren noch das Niveau der Enzymexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS).

1.2 Das Modell des L-NAME-induzierten Hypertonus

1.2.1 Entstehung und Bedeutung des NO-defizitären Hypertonus

Die Hypothese der endothelialen Dysfunktion, und der damit einhergehenden unzureichenden Stickstoffmonoxidproduktion im essentiellen Hypertonus des Menschen, führte zur Entwicklung eines experimentellen Tiermodells zur Erforschung des NO-defizitären Hypertonus. Dieses Modell des L-NAME-induzierten Hypertonus ist, seit den 1990er-Jahren, eines der am häufigsten verwandten Modelle des experimentellen Bluthochdrucks in der Kreislaufforschung überhaupt (5, 187, 206). Diesem Modell zugrunde, liegt die Langzeitbehandlung der Versuchstiere mit N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) – in Dosierungen von 10, 20, 25, 40, 50, 65, 80 bzw. 100 mg pro kg Körpergewicht pro Tag – und es wird bis zum heutigen Tage genutzt, um die Rolle und Bedeutung des Stickstoffmonoxid (NO) in der Genese kardiovaskulärer Krankheitsbilder zu erforschen. Der auf diese Weise erzeugte experimentelle Bluthochdruck,

verursacht durch eine Langzeitanwendung von N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (5, 17, 206), kann als Beispiel für das o.g. Ungleichgewicht vasoaktiver Regulationsmechanismen angesehen werden. Diesem Ungleichgewicht liegt eine Verringerung der NO-Produktion durch Inhibition der NO-Synthasen zu Grunde.

1.2.2 Grundlagen des NO-defizitären Hypertonus

Die unterschiedlichen NOS-Isoformen lassen sich pharmakologisch durch L-Arginin-Abkömmlinge, wie unter anderem N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), hemmen (83, 167). L-NAME ist ein nicht-selektiver, unspezifischer Inhibitor sämtlicher NOS-Isoformen (237). Es dient der NO-Synthase als Substrat, kann aber – im Gegensatz zum physiologischen Substrat L-Arginin – nicht zu NO und Citrullin katalysiert werden. N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) wird daher für gewöhnlich zur pharmakologischen Induktion eines NO-defizitären Bluthochdruck appliziert (6, 206). Gardiner et al., Ribeiro et al. sowie Bernatova et al. zeigten in ihren Studien, dass eine in vivo Langzeitapplikation des NOS-Inhibitors L-NAME, über einen Zeitraum von 4 Wochen, einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks sowie eine Zunahme des peripheren vaskulären Widerstandes bewirkt und folglich mit funktionellen und strukturellen Veränderungen des Gefäßsystems einhergeht (24, 71, 206). Des Weiteren ließ sich in zahlreichen Forschungsarbeiten nachweisen, dass eine längerfristige pharmakologische Inhibition der Stickstoffmonoxidproduktion, durch den NOS-Inhibitor L-NAME, unter anderem einen Hypertonus sowie eine linksventrikuläre myokardiale Hypertrophie (125, 222), eine verminderte Fähigkeit zur Vasorelaxation (73, 187, 249) sowie Hypertrophie der Gefäßwände zur Folge hat (221). Unter anderem zeigten Arnal et al., Delacretaz et al. und Ferreira-Melo exemplarisch auf, dass es bei einer 4-8 Wochen andauernden Applikation von L-NAME, in Dosierungen von bereits 10-20 mg/kg/KG pro Tag, zu einem Blutdruckanstieg von 40-80% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe kommt (6, 46, 59). Dies wird unterstützt durch die Ergebnisse der Studien von Baylis et al., welche belegen, dass eine akute Blockade der endogenen NO-Synthese mittels L-NAME, zu einem dramatischen Anstieg des systemischen Blutdruckes in entsprechend vorbehandelten Versuchstieren (Ratten) führt (16).

Die Applikationsart des L-Arginin-Analogon ist für die Induktion des Hypertonus dabei nur von nachrangiger Bedeutung, da für L-NAME erwiesen ist, dass es sowohl bei kurzzeitiger intravenöser als auch bei oraler Langzeitanwendung einen stabilen Bluthochdruck induziert (35, 121, 175), welcher von einem ausgeprägten mikrovaskulären Remodeling begleitet wird (178). Für die experimentellen Studien dieser Arbeit wurde

eine Form der L-NAME-Applikation ausgewählt, die sich durch ein hohes Maß an Wirksamkeit und Praktikabilität auszeichnet. So wurde L-NAME über das Trinkwasser der Versuchstiere appliziert, da L-NAME eine veresterte Carboxylgruppe und damit gute hydrophile Eigenschaften besitzt. Hierbei war zu beachten, dass die mit L-NAME versetzte Trinkwasserlösung täglich erneuert und vor Lichteinstrahlung geschützt werden muss, da gelöstes L-NAME eine hohe Instabilität aufweist.

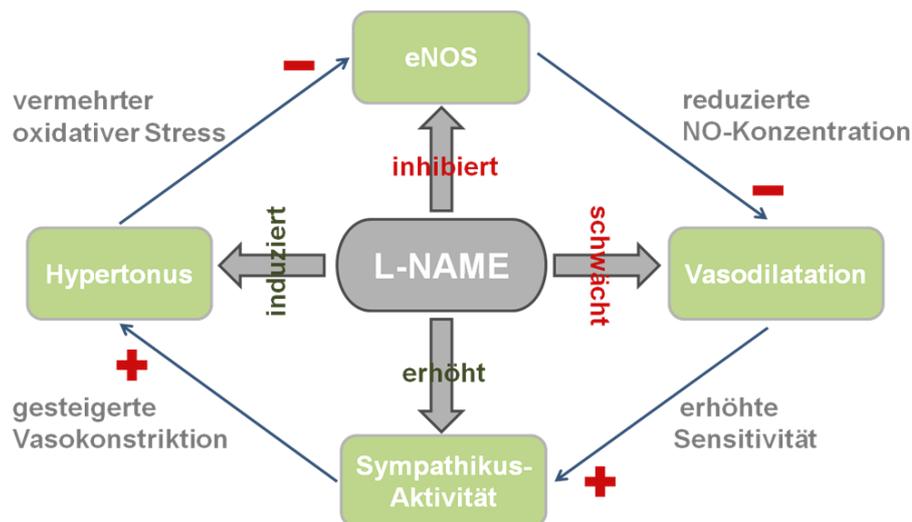


Abb. 1.1 – Zentrale Effekte von L-NAME in der Entstehung des NO-defizitären Hypertonus.

N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) fungiert u.a. als Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Durch die Hemmung der Stickstoffmonoxidproduktion reduziert es die Konzentration an frei verfügbarem NO und schwächt so dessen vasodilatatorische Effekte. Ferner erhöht L-NAME hierdurch die Sympathikusaktivität sowie die Sensitivität des Gefäßsystems gegenüber einer Stimulation durch das SNS, was zu gesteigerter Vasokonstriktion führt. Bei längerfristiger L-NAME-Anwendung resultiert aus diesen Effekten ein Hypertonus, der seinerseits mit vermehrtem oxidativen Stress einhergeht. Dieser oxidative Stress kann in der Folge zum Uncoupling der eNOS führen, sofern entsprechend hohe Konzentrationen erreicht werden (siehe: 1.3.2 Mediatoren des oxidativen Stresses).

1.2.3 Funktionsprinzip der Blutdruckregulation unter NO-Defizienz

Unter physiologischen Bedingungen reguliert endotheliales Stickstoffmonoxid (NO) die Aktivität des adrenergen Anteils der sympathischen Neurotransmission herunter. Anders ist es unter L-NAME-Einwirkung, wo es zum Blutdruckanstieg, bedingt durch einen Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) und durch Veränderungen zahlreicher blutdruckregulatorischer Mechanismen, kommt. Die Datenlage zeigt, dass auf die Hem-

mung der NO-Synthese eine sympathisch-vermittelte Überaktivität folgt, wodurch das SNS eine Hauptrolle in dem, durch langfristige NO-Hemmung, entstehenden Hypertonus erlangt (125, 189, 276). Damit übereinstimmend konnten die Arbeitsgruppen um MacLean sowie um Richer zeigen, dass NOS-Inhibitoren die Sensitivität des Blutdrucks gegenüber einer Stimulation durch das sympathische Nervensystem erhöhen (141, 207). In diesem Zusammenhang konnten diverse Forschungsgruppen – in L-NAME-vorbehandelten Versuchstieren – sowohl eine verstärkte vasokonstriktorische sowie abgeschwächte vasodilatatorische Aktivität in den verschiedensten Kompartimenten des Gefäßsystems beobachten als auch eine gesteigerte sympathische Aktivität sowie Veränderungen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) nachweisen (23, 105, 125, 208). Das RAAS ist, neben dem sympathischen Nervensystem (SNS), einer der entscheidenden Faktoren der physiologischen, aber auch der pathologischen Steuerung der arteriellen und venösen Vasokonstriktion im Gefäßsystem des Organismus. Dahingehend gelang Pollock und Polakowski der Nachweis, dass die Hemmung der NO-Synthese mittels N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) einen Hypertonus induziert, welcher sich durch geringe Plasmaspiegel an Renin und Angiotensin II auszeichnet (196). Dies lässt sich dadurch erklären, dass mit dem L-NAME-induzierten Hypertonus ein gesteigerter renaler Perfusionsdruck einhergeht, welcher eine verminderte Sezernierung und Aktivierung von Renin und Angiotensin II zur Folge hat. Dies resultiert in der Verringerung der in vivo Renin- und Angiotensin II-Plasmaspiegel in NO-defizitären Versuchstieren (218). Die verminderte Bioverfügbarkeit eines der stärksten vasodilatatorisch-wirkenden Botenstoffe (NO), resultiert in einer restriktiven Sezernierung eines der stärksten vasokonstriktorisch-wirkenden Botenstoffe (Angiotensin II) des Organismus. Das Schlüsselenzym des RAAS ist dabei ohne Zweifel das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), welches – in der Lunge lokalisiert – das inaktive Angiotensin I in die aktive und höchst vasokonstriktorisch-wirksame Form Angiotensin II umwandelt. Dies wird dadurch untermauert, dass zahlreiche Antihypertensiva, beispielsweise Captopril – aus der pharmakologischen Gruppe der ACE-Hemmer – die Manifestation eines NO-defizitären Hypertonus in L-NAME-vorbehandelten Ratten verhindern können (25, 188). Es zeigte sich weiterhin, dass eine Langzeitgabe von Captopril – neben weiteren nachgewiesenen Mechanismen – die Entwicklung eines Hypertonus in L-NAME-vorbehandelten Versuchstieren verhindern konnte. Begründet liegt dies zum einen in einer Normalisierung des vasokonstriktiven Sympathikustonus (276), welcher sich in L-NAME-hypertensiven Ratten üblicherweise erhöht zeigt (189) sowie zum anderen in der Verringerung der vorliegenden Angiotensin II-Konzentration.

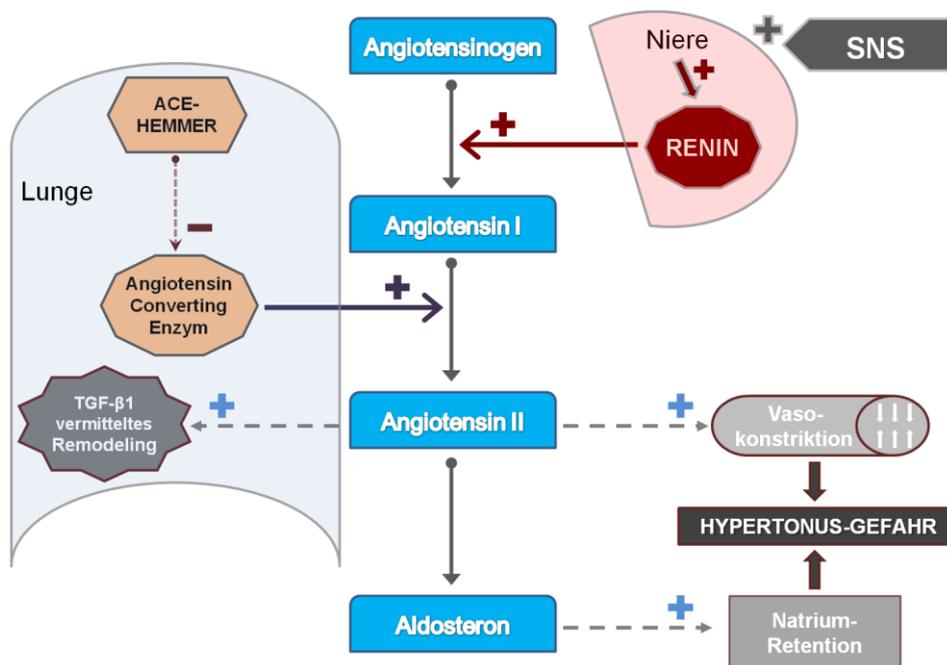


Abb. 1.2 – Zusammenhänge zwischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und sympathischem Nervensystem zur Steuerung des systemischen Blutdrucks.

Das sympathische Nervensystem (SNS) reguliert in Zusammenarbeit mit dem RAAS den systemischen Blutdruck. Eine erhöhte sympathische Aktivität bewirkt direkt an der Niere die Sekretion des Enzyms Renin und setzt somit die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade in Gang. An deren Ende kommt es, vermittelt durch die Effekte von Angiotensin II und Aldosteron, zur Blutdruckerhöhung. Bei pathologischer Überaktivität dieser Mechanismen besteht zum einen die Gefahr eines Hypertonus, zum anderen induziert Angiotensin II den profibrotischen Wachstumsfaktors TGF- β 1, welcher in zahlreichen Geweben, unter anderem auch in der Lunge, Remodelingprozesse induziert.

Neben der bereits erwähnten Bedeutung für die Regulation des Blutdrucks, besitzt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System des Weiteren noch maßgebliche Relevanz hinsichtlich der Entstehung oxidativen Stresses. Das RAAS ist ausschlaggebend an der Regulation der Aktivität der NADPH-Oxidase beteiligt. Vermittelt über Angiotensin II steuert es die Aktivität der NADPH-Oxidase und kann so die Synthese von Superoxidradikalen induzieren. Über die Mechanismen dieses Regelkreislaufes nimmt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ferner noch Einfluss auf die Aktivität des profibrotischen Wachstumsfaktors TGF- β 1 und dadurch auch auf die Manifestation pulmonaler fibrotischer Umbauprozesse (156, 204). Allesamt Aspekte, welche ebenfalls bei der Erstellung dieser Arbeit Berücksichtigung fanden.

1.3 Oxidativer Stress

Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie zum Beispiel ein Hypertonus, tragen dazu bei, dass sich der Level an oxidativem Stress in den Gefäßwänden erhöht. Wie Studien zeigen konnten, basiert dies auf einer gesteigerten vaskulären Produktion freier Radikale im Falle eines erhöhten Blutdrucks (171, 226). Der schädliche Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist dabei jedoch nicht bloß auf Gefäßwände beschränkt, er kann sich ferner auf ganze Gewebs- sowie Organstrukturen auswirken.

So verweisen zahlreiche Forschungsarbeiten darauf, dass oxidativer Stress eine ganz wesentliche Rolle in der Pathogenese zahlreicher fibrotischer Erkrankungen, insbesondere der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF), spielt. Vor diesem Hintergrund fanden Kuwano et al. in Gewebeproben von IPF-Patienten deutliche Anzeichen für Schäden solcher Art, welche sich charakteristischerweise als Konsequenz aus dem chronischen Einfluss von oxidativem Stress manifestieren (126-128). Übereinstimmend hiermit wurden, in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) von IPF-Patienten, erhöhte Mengen an oxidativ geschädigten Proteinen gemessen (134, 138, 140, 143).

Aus diesem Grund wurde in der hier vorliegenden Studie der Zusammenhang zwischen L-Name-induziertem Hypertonus und oxidativem Stress, der sich daraus ergebenden Veränderungen sowie die Auswirkungen des oxidativen Stresses auf das pulmonale Remodeling untersucht.

1.3.1 Entstehung und Auswirkungen des oxidativen Stresses

Zu oxidativem Stress führt das Missverhältnis oxidativ- bzw. antioxidativ-wirkender Mediatoren und Mechanismen. Kommt es zu einer Akkumulation freier Radikale, sei es durch eine vermehrte Synthese oxidativer Mediatoren oder durch eine Verringerung antioxidativer Puffermechanismen, so resultiert daraus oxidativer Stress (217). Im Zustand des oxidativen Stresses sind die antioxidativen Verteidigungsmechanismen des Organismus nicht mehr in der Lage die anfallenden Mengen freier Radikale zu puffern und auf ein physiologisch-verträgliches Niveau zu verringern. Es kommt folglich zur oxidativen Schädigung. Diese betrifft sowohl einzelne Zellen als auch ganze Gewebestrukturen. In erster Linie wirkt sich oxidativer Stress negativ auf biologische Makromoleküle wie Lipide und Proteine sowie die DNA aus (80). Es kommt zur oxidativen Degradation von Aminosäuren, Lipiden und Proteinen (111). Dadurch beeinflusst oxidativer Stress negativ die Funktionen, Aktivität und Struktur dieser elementaren Bausteine des Organismus, und führt unter anderem zur Inaktivierung spezifischer

Enzyme sowie zur Instabilität der DNA und zur strukturellen Schwächung der Zellmembranen. Über diese Mechanismen führt oxidativer Stress schließlich zur Beeinträchtigung elementarer zellulärer Funktionen.

1.3.2 Mediatoren des oxidativen Stresses

Moleküle, welche in der Lage sind oxidativen Stress auszulösen bzw. dessen Effekte zu vermitteln, werden zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gezählt. Zu dieser Gruppe zählen freie Radikale, Peroxide und Sauerstoffanionen. Innerhalb dieser Gruppe kommt den freien Sauerstoffradikalen eine besondere Bedeutung zu. Als freies Radikal zählt jedes Molekül, welches eigenständig existieren kann und mindestens ein unpaariges Elektron besitzt (79, 81). In aeroben Organismen entstehen sie als Nebenprodukte während einer Vielzahl physiologischer Stoffwechselforgänge, wie zum Beispiel innerhalb des Elektronentransportes der mitochondrialen Atmungskette, innerhalb der Cyclooxygenase sowie innerhalb des Cytochrom-P450-Systems und der Xanthin-Oxidase (101, 257). Ein weiterer bedeutender Entstehungsort reaktiver Sauerstoffspezies ist der Membran-gebundene Enzymkomplex der NADPH-Oxidase, welcher sich sowohl in Plasmamembranen als auch in Membranen von Phagosomen neutrophiler und eosinophiler Granulozyten, Monozyten und Makrophagen findet. Die NADPH-Oxidasen bekleiden eine Sonderstellung, da sie als Hauptproduzent des Superoxid-Anions angesehen werden. Aufgrund der vielfältigen Bedeutung dieses Radikals, werden die NADPH-Oxidasen im Verlauf dieser Arbeit noch ausführlicher beschrieben.

Beinahe jeder einzelne Zelltyp des Gefäßsystems, darunter aber besonders Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten, ist in der Lage reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren (104, 163, 181). In der Lunge entstammen endogene ROS hauptsächlich aus Endothelzellen, aus Alveolar- und Bronchialepithelzellen (96, 116, 117), aus Alveolarmakrophagen, aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (118) sowie aus Fibroblasten (50).

Unabhängig von ihrer zellulären Herkunft zeichnen sich ROS durch ein außerordentlich hohes Maß an Reaktionsfreudigkeit aus. Die Effekte, welche sie vermitteln stehen dabei in Korrelation zur Konzentration in welcher die jeweiligen reaktiven Sauerstoffspezies vorliegen; unter physiologischen Bedingungen fungieren ROS als Bestandteile des endogenen Second Messenger-Systems und sind somit an der Aktivierung und Steuerung einer Vielzahl an intrazellulären Prozessen, Wachstumsfaktoren und Zytoki-

nen beteiligt. In hohen Konzentrationen vermitteln sie jedoch diverse zytotoxische Effekte.

Halliwell und Gutteridge beschrieben, dass unter den reaktiven Sauerstoffspezies, u.a. das Superoxid-Anion, das Hydroxyl-Radikal, Stickstoffmonoxid und Wasserstoffperoxid die größte physiologische Bedeutung innehaben. Dabei ist zu beachten, dass in vivo vorrangig Wasserstoffperoxid und Superoxid-Anionen gebildet werden, wobei Wasserstoffperoxid durch enzymatische und nicht-enzymatische Disproportionierung von Superoxid-Anionen entsteht (82). Diese Reaktion wird katalysiert durch Enzyme aus der Familie der Superoxiddismutasen (200), welche daher in dieser Arbeit besondere Berücksichtigung finden. Laut Halliwell ist das Hydroxyl-Radikal die reaktive Sauerstoffspezies mit der stärksten zytotoxischen Wirkung. Dieses Radikal kann über mehrere Reaktionswege gebildet werden. Zum einen entsteht es aus der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Superoxid-Anionen und zum anderen entsteht es als Zerfallsprodukt des Peroxynitrit, welches bei der Reaktion von Superoxid-Anionen mit Stickstoffmonoxid entsteht (81). In diesem Reaktionsschritt erklärt sich auch die besondere Rolle der freien Sauerstoffradikale, da sie als Substrat dienen: i) für die Reaktion mit endogenem Stickstoffmonoxid (NO) zur Bildung schädlicher Stickoxide und ii) mit Superoxid zu Peroxynitrit reagieren (18). Freie Sauerstoffradikale sind also in der Lage mit ungebundenen Stickstoffmonoxid-Molekülen zu interagieren, wodurch eine weitere Gattung freier Radikale – die reaktiven Stickstoffspezies (RNS) – entsteht (31). Ähnlich wie ROS sind auch RNS höchstgradig instabil und neigen aufgrund ihrer unpaarigen Elektronen dazu Oxidationsreaktionen in Gang zu setzen. Auf biochemischem Level inaktivieren beide Gattungen reaktiver Spezies Antiproteasen, induzieren Apoptose und steuern zellproliferative Vorgänge (201).

Oxidativer Stress und nitrativer Stress werden folglich durch reaktive Sauerstoffspezies sowie durch reaktive Stickstoffspezies induziert. Reaktive Stickstoffspezies reagieren ebenfalls mit einer Vielzahl relevanter biologischer Mediatoren, wirken zytotoxisch und können insbesondere den Zelltod glatter Gefäßmuskelzellen sowie von Endothelzellen herbeiführen. Ferner spielen reaktive Stickstoffspezies noch eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Remodelingvorgängen, da sie die ERK (103, 262), die p38/MAP-Kinase (135) und die Proteinkinase C (1, 162) aktivieren. Diese steuern die Proliferation von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen. Zou et al. konnten zeigen, dass Stickstoff-vermittelter Stress wichtige Enzyme der Gefäßtonusmodulation schädigt, darunter ganz besonders die eNOS, mit einer daraus resultierenden Abschwächung der Vasodilatation (278). Im Zusammenwirken mit ROS erfährt die endotheliale NO-Synthase unter dem Einfluss der RNS eine Umprogrammierung. Liegen Superoxidan-

ionen in hohen Konzentrationen vor, so lösen sie das sogenannte Uncoupling der eNOS aus. Durch dieses entkoppeln produziert eNOS anstelle von NO weitere Superoxidationen, welche dann mit bereits vorhandenem NO reagieren und das toxische Peroxynitrit formen (63), wodurch ein Circulus vitiosus in Gang gesetzt wird. In Studien zeigte sich, dass durch Peroxynitrit-vermittelte zytotoxische Effekte zur Schädigung und zum Remodeling des pulmonalen Gefäßsystems führen (29, 108).

1.3.3 Die Enzymfamilie der NADPH-Oxidasen

Als NADPH-Oxidasen (NOX) wird eine Familie von Enzymen bezeichnet, welche dem Elektronentransport über biologische Membranen hinweg dient. Sie ermöglichen den Elektronentransfer zwischen intrazellulären und extrazellulären Kompartimenten. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Transmembranproteine, welche in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe, Zellen sowie intrazellulärer Kompartimente nachgewiesen werden konnten. Der aktuelle Forschungsstand besagt, dass in Säugetierorganismen sieben verschiedene NOX-Formen identifiziert werden konnten: NOX 1 bis 5 und Duox 1 und 2 (21, 109). Vervollständigt wird die NOX-Familie noch durch zytosolische Untereinheiten, u.a. p22^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox}, welche notwendig sind für die strukturelle Stabilität, räumliche Organisation sowie die Aktivierung der NADPH-Oxidasen (186, 260). Erst die Kombination der NOX-Isoform mit ihren spezifischen zytosolischen Untereinheiten bildet und aktiviert den funktionsfähigen Enzymkomplex.

Sämtliche NADPH-Oxidasen katalysieren die biochemische Reduktion von molekularem Sauerstoff (O₂) zum Superoxid-Anion (O₂⁻) (20, 130), was sie zu einem Hauptproduzenten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) macht.

1.3.3.1 Einfluss der NADPH-Oxidasen auf die Pathogenese des Hypertonus sowie auf die Pathogenese fibrotischer Lungenerkrankungen

Hinsichtlich pathophysiologischer Effekte finden sich in der Literatur vielfältige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen den Enzymen der NOX-Familie und der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen des kardiopulmonalen Systems, u.a. des Hypertonus sowie insbesondere fibrotischer Lungenerkrankungen. Dies macht die NADPH-Oxidasen und deren Untereinheiten zu einem zentralen Punkt, der in dieser Arbeit untersuchten Fragestellung.

NADPH-Oxidasen sind weitreichend involviert in Mechanismen und Prozesse des pulmonalen Remodelings, und zwar indem sie in der Lunge – über die sekundären Botenstoffe der ROS – unter anderem die Produktion und Freisetzung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix induzieren, ferner noch in Vorgänge der Zelldifferenzierung, Zellmigration und des Zellzyklus eingreifen sowie Proliferation und Apoptose steuern (32, 53, 77). Zur Klärung der Frage, welche NOX-Isoform hinsichtlich ihrer – für diese Arbeit relevanten – Pathogenität einer genaueren Analyse bedarf, ist es unabdingbar sich das Verteilungsmuster dieser Enzymfamilie näher anzusehen. Dabei fällt auf, dass NADPH-Oxidasen in den verschiedenen Geweben und Zellsystemen des Organismus spezifisch lokalisiert sind. Dieser Tatsache ist es geschuldet, dass in dieser Arbeit der Fokus primär auf der NADPH-Oxidase 2 (NOX 2), sowie den zytosolischen Untereinheiten p22^{phox}, p47^{phox} sowie p67^{phox} liegt. Diese sind typischerweise in Zellen des Gefäßsystems (2, 12, 76) und der Lunge sowie in Zellen des Immunsystems lokalisiert (75, 113). Bei der NOX 2 handelt es sich um den Prototyp der NADPH-Oxidase, welche zuerst entdeckt (20) und als phagozytische Oxidase beschrieben wurde. Sie trägt auch die Bezeichnung gp91^{phox} und findet sich charakteristischerweise in zur Phagozytose fähigen Zellen, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, was sie als grundlegenden Verteidigungsmechanismus des angeborenen Immunsystems identifiziert (58, 173). Diese Funktion erfüllt die NOX 2 in besonderem Maße in der Lunge, wo sie die stark umweltexponierten Atemwege und das Lungenparenchym vor dem Einfluss pathogener Keime schützt. Phagozyten produzieren mittels NADPH-Oxidase 2 hohe Level an reaktiven Sauerstoffspezies, um diese im respiratorischen Burst zur antimikrobiellen Verteidigung freizusetzen (259). Des Weiteren liegen große Mengen an NOX 2 in Epithel- und Endothelzellen der Atemwege sowie des pulmonalen Gefäßsystems vor, wo sie zur Aufrechterhaltung der immunologischen Barrierefunktion dienen. Trotz dieser unerlässlichen physiologischen Immunfunktion, kann die Aktivität der NOX 2 auch zur Manifestation ROS-vermittelter Pathologien führen. Studien zur Erforschung fibrotischer Lungenerkrankungen zeigten, dass die Auswirkungen von ROS und oxidativem Stress in Zusammenhang mit der Pathogenese der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) gesehen werden müssen (119, 134). Dies liegt darin begründet, dass NADPH-Oxidasen als physiologischer Entstehungsort reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) fungieren. Die in unserer Studie analysierte NOX 2 gehört zu den NOX-Isoformen, welchen prinzipiell – in Organsystemen wie Herz, Pankreas und Niere – profibrotische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (138, 149, 263). Daher sollte in dieser Arbeit weiterführend untersucht werden, welche Relevanz sowohl der NOX 2 als auch den untersuchten Untereinheiten hinsichtlich pulmonal-fibrotischer Umbauvorgänge zukommen. Im Zusammenhang mit pulmonalem Remodeling konnte

nämlich bereits belegt werden, dass die NADPH-Oxidase 2 an der Steuerung des Zellzyklus der Alveolarepithelzellen beteiligt ist. So aktivieren NOX 2-abhängig produzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) den nukleären Rezeptor PPAR γ , welcher seinerseits den Zellzyklus der Alveolarepithelzellen aktiviert (242). Diese Zellen werden somit zur DNA- und Proteinsynthese angeregt, um Zellteilung und Zellproliferation einzuleiten.

PPAR γ ist dabei nicht der einzige Transkriptions- beziehungsweise Wachstumsfaktor, welcher auf diese Weise aktiviert respektive induziert wird. Aus Studien von Ha und Lee geht hervor, dass die von NADPH-Oxidase produzierten ROS des Weiteren zu einer Induktion der Expression des profibrotischen Wachstumsfaktors TGF- β 1 beitragen (78), welcher als profibrotisches Zytokin ein Schlüsselement in der Pathogenese der pulmonalen Fibrose (PF) darstellt. Dies wird u.a. dadurch bestätigt, dass sich bei Patienten mit fibrotischen Lungenerkrankungen eine erhöhte TGF- β 1-Expression nachweisen ließ (7, 13, 30). Ferner gilt es als erwiesen, dass die Überexpression von TGF- β eine schwere und nicht-reversible Lungenfibrose verursacht (220). Morphologisch führt dies dazu, dass TGF- β unter pathophysiologischen Bedingungen nachweislich den Level an EZM in der Lunge erhöht (102, 240). Anders als unter physiologischen Bedingungen, wo pulmonale Fibroblasten nur geringe Level an Collagen Typ I produzieren, zeigten sich – unter dem Einfluss von TGF- β 1 – deutlich erhöhte Level dieses EZM-Proteins. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten weitere experimentelle Studien belegen, dass die Inhibition der TGF- β -Aktivität die Entstehung sowie das Fortschreiten einer pulmonalen Fibrose verhindern kann (122, 132).

Hinsichtlich der profibrotischen Eigenschaften des Wachstumsfaktors TGF- β 1 spielt ein weiteres – von uns in dieser Studie ebenfalls untersuchtes – Enzym eine entscheidende Rolle. Die Arbeiten von Tabor & Tabor sowie Pegg zeigen deutlich, dass es unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren (wie z.B. TGF- β 1) zur vorübergehenden Erhöhung der Expression der Ornithindecaboxylase (ODC) kommt (190, 236). Demgemäß geht aus diesen Studien hervor, dass die ODC-Aktivität durch entsprechende Wachstumsfaktoren induziert wird. Dieses Enzym – Ornithindecaboxylase – katalysiert den ersten Schritt der Polyaminbiosynthese und fungiert als das Geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Polyaminmetabolismus. Folgerichtig ergibt sich hieraus die zentrale Bedeutung der ODC-Expression als limitierender Faktor der Polyaminbiosynthese (191, 241). Aus der wissenschaftlichen Literatur ist ferner bekannt, dass eine Induktion der ODC für eine Erhöhung zellulärer RNA-Konzentrationen, als Vorbereitung auf zelluläre Vervielfachung bzw. Hypertrophie, spricht. Zusammenfassend erklärt dies den essentiellen Einfluss der Polyamine auf Vorgänge und Abläufe von Zellprolife-

ration (195, 231) und Zellregeneration (26, 95), welche als inhärente Bestandteile von Remodelingprozessen zu sehen sind. So nutzen zum Beispiel die bereits o.g. Fibroblasten Ornithin im Zusammenhang mit Zellproliferation und Collagensynthese.

Bezüglich des von uns untersuchten pulmonalen Remodelings, besitzen auch die NOX-Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox} ähnliche Relevanz wie die NOX 2. So geht aus Daten von Wang et al. hervor, dass sich in BALF von IPF-Patienten, Neutrophile finden lassen, welche eine erhöhte Expression eben dieser NOX-Untereinheiten (p47^{phox}, p67^{phox}) aufweisen (261). Weitere Studien belegten die Existenz dieser Untereinheiten auch in Lungenfibroblasten (50), welche unter dem Einfluss von TGF- β 1 zu Myofibroblasten transdifferenzieren (49, 238). Aktivierte Myofibroblasten treiben fibrotische Remodelingprozesse voran, indem Sie unkontrolliert Bestandteile der EZM, wie z.B. Collagen und Elastin, synthetisieren und sezernieren (239). Myofibroblasten werden daher auch als zelluläres Charakteristikum chronischer (fibrosierender) Lungenerkrankungen angesehen. Es bleibt in diesem Zusammenhang noch zu klären, ob die Höhe des Expressionsniveaus der p47^{phox}- und p67^{phox}-Untereinheiten in Lungenfibroblasten als Marker für fibrotische Umbauvorgänge des Lungenparenchyms angesehen werden kann. Darüber hinaus greifen NADPH-Oxidasen, mittels Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, in die Mechanismen der Blutdruckregulation ein. So zeigte sich in verschiedenen Tiermodellen, dass die Entstehung eines Hypertonus einhergeht mit einer Heraufregulation der NOX 2 in den Zellen der Gefäßwand (131, 223). Vor diesem Hintergrund belegen Ergebnisse weiterer Studien, dass die NOX 2 als Hauptquelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im vaskulären System fungiert (131, 163, 182). Ferner fanden sich in Tiermodellen wiederholt Hinweise darauf, dass es unter hypertensiven Bedingungen ebenfalls zur Heraufregulation der NOX-Untereinheiten kommt. Diese Feststellung wird dadurch untermauert, dass es unter einer durchgeführten Pharmakotherapie, mittels des SOD-Mimetikums Tempol, zu einer Normalisierung sowohl des Blutdrucks als auch des vaskulären Remodelings kam (131).

1.3.4 Endogene Verteidigungsmechanismen zur Abwehr von oxidativem Stress

Aerobe Organismen haben sich im Laufe der Evolution daran angepasst, dass sie unumgänglich sowohl oxidativem als auch nitrogenem Stress ausgesetzt sind und dass sie daher, um ihr eigenes Fortbestehen zu sichern, ROS und RNS etwas entgegen setzen müssen. Folglich finden sich zum heutigen Zeitpunkt in aeroben Organismen zahlreiche antioxidativ-wirkende Verteidigungsmechanismen. Diese umfassen sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Antioxidantien. Zu den nicht-enzymatischen

Antioxidantien gehören das Tripeptid Glutathion (GSH), β -Carotin sowie die Vitamine E und C. Enzymatische Antioxidantien sind in erster Linie Superoxiddismutasen, Katalasen und Glutathionperoxidasen (200). Insbesondere der postulierte Nutzen sowie die positiven Effekte der Vitamine E und C – aus der Gruppe der nicht-enzymatischen Antioxidantien – auf Inzidenz und Manifestation kardiovaskulärer Risikofaktoren und Erkrankungen werden kontrovers betrachtet, da große anerkannte Studien diesbezüglich keinen eindeutigen Nachweis erbringen konnten (27, 160, 267). Daher lag während der Erstellung dieser Studie der primäre Fokus auf der Analyse derjenigen Effekte, welche durch die antioxidative Aktivität der Superoxiddismutasen vermittelt wurden.

1.3.4.1 Die Enzymfamilie der Superoxiddismutasen

Superoxiddismutasen sind von entscheidender Relevanz für die Abwehr von oxidativem Stress (154). Sie sind daher ubiquitär im Organsystem und in zahlreichen intrazellulären Kompartimenten aerober Organismen lokalisiert. Unter Bedingungen von oxidativem Stress, regulieren Zellen und Gewebe verschiedenster Art die Transkriptionsrate der SOD-Gene herauf und schützen sich somit durch die gesteigerte Enzymaktivität vor einer weiteren oxidativen Schädigung (158, 176). Die Superoxiddismutasen gehören zu einer Reihe antioxidativ-wirkender Enzyme, welche die Umwandlung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu weniger reaktionsfreudigen und weniger zytotoxischen Produkten katalysieren. Mit den SOD beginnt der Prozess der enzymatisch-vermittelten antioxidativen Verteidigung, da sie die erste Reaktion in der Reaktionsfolge von den zytotoxischen ROS hin zu ungefährlichen Molekülen wie Wasser und Sauerstoff katalysieren. Katalasen und Peroxidasen beziehen aus der Aktivität der Superoxiddismutasen ihr Substrat – das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) – und schließen dann die entsprechende Reaktionsfolge ab (200). Superoxiddismutasen sind sogenannte Metalloenzyme (66). Es lassen sich drei verschiedene SOD-Isoformen hinsichtlich ihrer Lokalisation und des in ihrem aktiven Zentrum enthaltenen Metalls unterscheiden: i) Kupfer-/Zink-enthaltende SOD (SOD-1), welche zytosolisch lokalisiert ist, ii) Manganhaltige SOD (SOD-2), welche hauptsächlich mitochondrial vorliegt und iii) Extrazelluläre SOD (SOD-3), welche in aller Regel an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert ist (62).

Alle drei SOD-Isoformen katalysieren ausnahmslos die Reaktion von Superoxid-Anionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2) (200). Dabei liegen die Superoxiddismutasen in bis zu 10^6 -fach höheren Konzentrationen vor als ihr Sub-

strat, die Superoxid-Anionen. Durch die hohe Expressionsrate der SOD wird verhindert, dass Superoxid-Anionen zu Stickstoffmonoxid reagieren können.

1.3.4.2 SOD-1 – Kupfer-Zink-enthaltende Superoxiddismutase (CuZn-SOD)

Die CuZn-SOD besitzt ein Molekulargewicht von 32 kDa und findet sich in Säugetierzellen sowohl im Zytoplasma als auch in Strukturen des Zellkerns sowie in Lysosomen (34, 42, 110, 136). Die Kupfer-/Zink-enthaltende SOD ist induzierbar und wird in Alveolar- und Bronchialepithelzellen Typ II, Fibroblasten, Alveolarmakrophagen sowie im Endothel pulmonaler Kapillaren exprimiert (33, 40). Dies belegen zahlreiche Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass sich das Niveau der SOD-1 mRNA-Expression als Antwort auf zahlreiche mechanische, chemische und biologische Mediatoren erhöht. Dieser Effekt zeigte sich unter anderem unter dem Einfluss von Wandschubspannung (51, 99), Wasserstoffperoxid (272) und Stickstoffmonoxid (64). Des Weiteren zeigten Studien, in denen altersabhängige Unterschiede hinsichtlich des mRNA-Levels und der enzymatischen Aktivität der SOD-1 untersucht wurden, dass Ratten mit steigendem Versuchstieralter sowohl ein erhöhtes Level an SOD-1 mRNA als auch eine erhöhte enzymatische Aktivität aufweisen (36, 84, 86).

1.3.4.3 SOD-2 – Manganhaltige Superoxiddismutase (Mn-SOD)

Bei der manganhaltigen SOD handelt es sich um einen der wichtigsten antioxidativ-wirkenden Mechanismen der Zelle überhaupt. SOD-2 existiert als Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 88 kDa (65). Die Mn-SOD zeichnet für 10-15% der Gesamt-Superoxiddismutasen-Aktivität verantwortlich. Ihre besondere Bedeutung erlangt diese Isoform dadurch, dass sie mitochondrial lokalisiert ist (251), und somit direkt dort Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) abfängt, wo diese freien Radikale in hohem Maße entstehen. Die Mn-SOD soll somit der Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$) bereits ganz am Anfang der Reaktionskette entgegenwirken. Wie Tsan 2001 beschrieb, findet sich die Mn-SOD in Rattenlungen insbesondere in Mitochondrien der Pneumozyten Typ II (Alveolarepithelzellen Typ II), der Alveolarmakrophagen und der Zellen des Bronchialepithels (251). Dies wird ferner noch dadurch untermauert, dass es sich bei Pneumozyten Typ II um den Zelltyp handelt, welcher am stärksten für eine Induktion der Mn-SOD-Aktivität verantwortlich zeichnet (41, 120).

1.3.4.4 SOD-3 – Extrazelluläre Superoxiddismutase

Als tetrameres Glykoprotein besitzt die extrazelluläre SOD ein Molekulargewicht von 135 kDa, und findet sich im Übermaß in Atemwegen und Blutgefäßen der menschlichen Lunge. Zu ihrer Aktivierung benötigt SOD-3 ebenfalls die Bindung von Kupfer und Zink an ihr aktives Zentrum (146). Bei der SOD-3 handelt es sich um ein sekretorisches Protein, dessen Gesamtmenge beinahe zu 100% in der extrazellulären Matrix (EZM) lokalisiert ist (146, 180). Ihre Funktion umfasst den Schutz vor fibrotischen Remodelingprozessen, indem sie zum einen die oxidative Degradation von Bestandteilen der EZM verhindert und zum anderen Collagen Typ I und Typ IV an ihre spezifische Heparin-Domäne bindet (69). Studien belegen, dass die SOD-3 aus diesem Grund in hohem Maße in humanem Lungengewebe exprimiert wird (147, 148). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten sowohl in humanem Lungengewebe als auch in Gewebeproben von Nagetieren hohe SOD-3 Expressionen unter anderem in Alveolarepithelzellen Typ II (62), glatten Gefäßmuskelzellen (233) sowie pulmonalen Makrophagen (137) nachweisen. Des Weiteren ist die extrazelluläre Superoxiddismutase von Bedeutung hinsichtlich der Regulierung der NO-Bioverfügbarkeit sowie der NO-Konzentration (180).

1.4 Pulmonale Anpassungsvorgänge unter NO-Defizienz

Eine Vielzahl an Lungenerkrankungen zeigen Ähnlichkeiten dahingehend, dass es als Folge einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit zu pulmonalen Anpassungsvorgängen, im Sinne eines fibrotischen Umbaus des Lungengewebes, kommt. Es lässt sich eine vermehrte Deposition von EZM-Komponenten nachweisen. Am Beispiel der Lungenfibrose lässt sich exemplarisch aufzeigen, dass diese Adaptationsvorgänge unter Umständen zu weitreichenden Einschränkungen der Organeigenschaften bzw. der Organfunktionen führen können, wie zum Beispiel dem Verlust der Gewebselastizität.

1.4.1 Pulmonale Adaptation – Die Rolle der EZM und des PTHrP-Systems

Für fibrotische Anpassungsvorgänge von Geweben bzw. innerhalb von Organen gilt im Allgemeinen, dass diese typischerweise aus fehlerhaften bzw. übersteigerten epithelialen Reparaturmechanismen hervorgehen können. Unter physiologischen Bedingungen sollen diese Reparaturmechanismen die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung der regulären Gewebsarchitektur und Gewebefunktion nach einer Schädigung gewährleis-

ten. Um dies zu ermöglichen produzieren und sezernieren Zellen mesenchymalen Ursprungs Proteine sowie weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) (199). Vor dem Hintergrund pathologischer Reparatur- bzw. Anpassungsvorgänge der Lunge, spielen alveoläre Fibroblasten eine überaus entscheidende Rolle, da sie zu Myofibroblasten transdifferenzieren können (28, 245). Diese Fähigkeit ist von besonderer Bedeutung, da eine pathologisch persistierende Aktivität dieses Zelltyps, mit übermäßiger Deposition von EZM-Komponenten einhergeht, was zum fibrotischen Remodeling beziehungsweise zur Fibrose des Organparenchyms führt (115). In der Lunge hat dies eine fortschreitende Vernarbung des Gewebes zur Folge, begleitet durch einen Verlust an Gewebselastizität. Typischerweise manifestiert sich diese Gewebskontraktion als atmungsphysiologisch messbare Complianceminde rung. Auf mikroskopischer Ebene spiegelt sich dies wider in einer Störung der zellulären Homöostase des pulmonalen Epithelgewebes, mit dysregulierter Proliferation und Apoptose (85) sowie pathologischer Differenzierung der Alveolarepithelzellen Typ II, also der Effektorzellen des pulmonalen PTHrP-Systems und dessen unmittelbar nachgeordneten Rezeptoren und Proteinen, wie dem PTH-1-Rezeptor, PPAR γ und ADRP (204).

Zusammenfassend gilt daher, dass als Hauptursache für fibrotische Remodelingvorgänge des Lungenparenchyms – aber auch anderer Organe und Organsysteme – die Dysregulation, der an Reparaturmechanismen beteiligten Zelltypen, Wachstumsfaktoren und Matrixproteinen, verantwortlich gemacht werden muss (94, 239, 243). Zentrales Element dieser Mechanismen ist die Differenzierung und Aktivierung pulmonaler Myofibroblasten. Bei diesem Zelltyp handelt es sich um Fibroblasten-ähnliche Zellen, welche zusätzlich Charakteristika glatter Gefäßmuskelzellen aufweisen und als Syntheseort der extrazellulären Matrixproteine, insbesondere des Collagens, fungieren. Pathologische Expressionsmuster dieses Zelltyps, sowie der von ihnen produzierten EZM-Proteine, verursachen schwerwiegende Lungenfunktionsstörungen, welche durch die veränderte Gewebsarchitektur des betroffenen Lungenparenchyms bedingt sind (192, 219, 264, 273). Die Transdifferenzierung und Aktivierung der Myofibroblasten wird dabei sowohl durch die Aktivität des profibrotischen Zytokins TGF- β 1 als auch durch Signalkaskaden der extrazellulären Matrix (EZM) sowie durch die vorliegende biomechanische Spannung reguliert (49, 93, 214). Das pulmonale PTHrP-System ist eng mit diesen Vorgängen verknüpft, muss aber in dem hier aufgeführten Zusammenhang als natürlicher Gegenpol der erwähnten pathologischen Prozesse angesehen werden. Funktion und Rolle dieses Systems, in Bezug auf die in dieser Studie untersuchte Fragestellung, werden aufgrund ihrer Relevanz im folgenden Abschnitt ausführlicher beschrieben.

1.4.2 Das pulmonale PTHrP-System

PTHrP (Parathyroid hormone-related Protein) ist zentraler Bestandteil eines Systems aus Proteinen und Rezeptoren, welches in seiner Gesamtheit einen elementaren Regelkreis physiologischer Steuerungsmechanismen bildet. Dieser Regelkreis vermittelt Effekte, welche für eine regelhafte Lungenphysiologie sowie für grundlegende Funktionen des Lungengewebes verantwortlich sind. Das PTHrP-System steuert unter anderem jene Abläufe, welche die physiologische Organentwicklung und Parenchymreifung der juvenilen Lunge induzieren sowie die Organhomöostase der ausgereiften Lunge aufrechterhalten. So zeigte sich, dass PTHrP entwicklungsphysiologisch maßgeblich zur Ausbildung der terminalen Atemwegsstrukturen und Alveoli beiträgt (144). Darüber hinaus besitzt es aber auch umfängliche Bedeutung im Zusammenhang mit der Pathogenese und Pathophysiologie von Lungenerkrankungen. Diese kommt insbesondere dann zum Tragen, falls es zu einer negativen Beeinträchtigung bzw. Inhibition der Funktionen des PTHrP-Systems sowie der auf diesem Wege vermittelten Effekte kommt. Dies führt insbesondere zum Ausbleiben der protektiven Effekte des PTHrP-Systems. Als einleitendes Beispiel sei hier, die – durch Mangel an bzw. Abwesenheit von pulmonalem PTHrP getriggerte – Transdifferenzierung von Lipofibroblasten zu Myofibroblasten genannt (248).

1.4.2.1 PTHrP-vermittelte Effekte in Physiologie und Pathophysiologie

PTHrP wird von beinahe jedem Zelltyp und in jedem Gewebetyp des Organismus gebildet (179, 193). Geschuldet ist dies der Tatsache, dass PTHrP in den zahlreichen Gewebetypen und Organsystemen eine Vielzahl unterschiedlichster Funktionen vermittelt.

Bei der Erstellung dieser Arbeit – insbesondere im Zusammenhang mit NO-defizitärem Hypertonus und pulmonalem Remodeling – stand das PTHrP-System in erster Linie aufgrund folgender ausgewählter Funktionen und Effekte im Fokus: i) Regelung von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose, ii) Steuerung physiologischer Organogenese und Aufrechterhaltung der physiologischen Organhomöostase der Lunge (193, 269, 270) sowie iii) Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen (unter anderem in arteriellen Blutgefäßen) (124, 151). Die umfängliche Bandbreite der Funktionen des Parathyroid hormone-related Protein (PTHrP) liegt darin begründet, dass PTHrP ein sekretorisches Protein ist (45), welches seine Effekte sowohl autokrin als auch parakrin an Rezeptoren auf Zelloberflächen vermittelt (74). Betrachtet man ferner noch die

nachgeschalteten Bestandteile des PTHrP-Systems, so vermitteln diese downstream targets zusätzlich noch intrakrine Effekte an Zellkernen (91, 129). Mit Hilfe dieser intrakrinen Effekte erfolgt, in zahlreichen Zelltypen und Geweben, die Steuerung biologischer Vorgänge wie Zellproliferation und Apoptose (150, 212).

Darüber hinaus dient PTHrP in voll entwickelten Lungen als autokriner Wachstumsfaktor der Alveolarepithelzellen Typ II (85) und steuert über den korrespondierenden PTH-1-Rezeptor die Funktion und Morphologie sowie das Wachstum dieses Zelltyps; und zwar dahingehend, dass die Bindung von PTHrP an den PTH-1-Rezeptor mesodermale Lipofibroblasten induziert, welche die Surfactantproduktion durch die Alveolarepithelzellen Typ II (Pneumozyten Typ II) vermitteln (47, 209, 246). Des Weiteren wirkt PTHrP – als dehnungssensibles Protein – im Sinne eines stark wirksamen Vasodilators, indem es unter anderem die Neosynthese von Stickstoffmonoxid (NO) induziert (142). Seine vasodilatatorischen Effekte vermittelt PTHrP ebenfalls über seinen korrespondierenden PTH-Rezeptor, welcher auch auf der Oberfläche glatter Gefäßmuskelzellen exprimiert wird (142). Über diesen Signalweg kommt es lokal zur druck- und dehnungsabhängigen (151, 194) sowie mechanosensitiven Freisetzung (100) von bioaktivem PTHrP. Im Falle einer endothelialen Dysfunktion sind diese Freisetzungsmechanismen deutlich in ihrer Funktionalität eingeschränkt. Somit zeigt sich bei defizitärer NO-Bioverfügbarkeit bzw. NO-Sekretion ebenfalls eine verminderte PTHrP-Sekretion. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass als Reaktion auf die Dehnung der arteriellen Gefäßwand – bedingt durch mechanische Kräfte – eine Heraufregulation des PTHrP-Levels erfolgt. Ein ähnliches Verhalten der PTHrP-Expression zeigt sich, bei erhöhten Blutdruckwerten sowie bei erhöhten Plasmaspiegeln des Vasokonstriktors Angiotensin II (151, 194). Folglich gilt also, dass eine erhöhte PTHrP-Expression als Antwort auf einen pathologisch erhöhten Gefäßtonus folgt. In diesem Zusammenhang konnten Pirola et al. nachweisen, dass Angiotensin II – und somit das gesamte Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) – von großer Relevanz für die Induktion des PTHrP ist (194).

Vor dem Hintergrund des NO-defizitären Hypertonus bestehen folglich zahlreiche relevante Wechselwirkungen zwischen NO-Regelkreislauf, PTHrP-System und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.

1.4.2.2 Downstream targets und Effektorzellen des PTHrP-Systems

1.4.2.2.1 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma (PPAR γ)

PPAR γ ist der ausschlaggebende nukleäre Transkriptionsfaktor des pulmonalen PTHrP-Systems. Seine Relevanz spiegelt sich in seinem Expressionsmuster eindeutig wider, welches zeigt, dass PPAR γ beinahe von jedem einzelnen Zelltyp des Lungengewebes exprimiert wird. Darunter finden sich insbesondere Endothelzellen, Fibroblasten, Alveolarepithelzellen, alveoläre Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen (22, 48). In der PTHrP-abhängig gesteuerten Signalkaskade fungiert der nukleäre Rezeptor PPAR γ als entscheidender Effektor aller nachgeschalteter Mechanismen und Abläufe. So reguliert PPAR γ unter anderem die Aktivität lipogener Gene wie ADRP und Leptin (246). Ferner vermittelt dieser Rezeptor spezifische, parakrine epithelial-mesenchymale Wechselwirkungen zur Gewährleistung einer physiologischen Organhomöostase der Lunge (244). Diese sind mitunter imstande die Manifestation fibrotischer Remodelingprozesse des Organparenchyms zu verhindern (156, 204). Bei genauerer Betrachtung wird deutlich, dass seine außerordentliche Bedeutung im Kontext des pulmonalen Remodelings darin begründet liegt, dass: i) PPAR γ -Agonisten positive Effekte auf die Umbauvorgänge des Lungenparenchyms vermitteln (43, 114), und ii) sich in typischen Lungenerkrankungen wie z.B. im Asthma bronchiale, in der zystischen Fibrose (CF) oder in entzündlichen Prozesse des Lungenparenchyms ein Mangel an PPAR γ nachweisen ließ (89). Die Arbeitsgruppe um Xiong und Kollegen konnte 2005 demonstrieren, dass eine verminderte PPAR γ -Expression mit einer verstärkten Proliferation und Expression extrazellulärer Matrixproteine (EZM) einhergeht (271). Als nicht minder bedeutsames downstream target der PPAR γ -Aktivität im PTHrP-System, wurde die Triglyzeridaufnahme in Alveolarepithelzellen zur Vorbereitung der Surfactantproduktion identifiziert. So induziert die Stimulation des Transkriptionsfaktors PPAR γ die Manifestation eines lipogenen Phänotyps, welcher sowohl autokrine als auch parakrine Effekte auf interstitielle Fibroblasten (Lipofibroblasten) und Alveolarepithelzellen Typ II vermittelt.

1.4.2.2.2 Adipocyte differentiation-related protein (ADRP)

Molekulares ADRP gilt als elementarer Bestandteil physiologischer Stoffwechsellvorgänge und findet sich daher beinahe ubiquitär im tierischen sowie menschlichen Organismus. Ohne die Anwesenheit und die vermittelten Wirkmechanismen dieses Proteins würden die zelluläre Fettaufnahme sowie der physiologische Fettstoffwechsel praktisch

zum Erliegen kommen. In der Lunge ist dieses Molekül nicht minder unverzichtbar, da es zur Aufnahme und Speicherung, der für die Surfactantsynthese notwendigen Triglyzeride, benötigt wird (70). Nur in Anwesenheit von ADRP nehmen Lipofibroblasten Triglyzeride auf, speichern diese Fette intrazellulär und geben Sie anschließend zusammen mit dem ADRP an Alveolarepithelzellen Typ II ab (213). Darüber hinaus trägt ADRP bzw. tragen die von diesem Protein vermittelten Effekte zur Aufrechterhaltung der pulmonalen Homöostase bei, indem eine pathologisch übersteigerte Lipofibroblasten-zu-Myofibroblasten-Transdifferenzierung verhindert wird (248).

1.4.2.2.3 Pulmonale Lipofibroblasten (Alveoläre interstitielle Fibroblasten)

Auf die große Rolle der Lipofibroblasten hinsichtlich Entstehung und Unterhaltung des pulmonalen Remodelings sowie der Prozesse, welche diesem Remodeling zugrunde liegen, wurde in dieser Arbeit bereits an vorangegangener Stelle hingewiesen. Ergänzend muss an dieser Stelle noch angeführt werden, dass Fallstudien, welche die Bedingungen bindegewebiger Lungenerkrankungen simulierten – und hierbei pulmonalen Bindegewebszellen PTHrP vorenthielten – nachweisen konnten, dass sich die Architektur dieser Zellen unter PTHrP-Mangel nachweislich verändert. Histopathologisch zeigte sich eine fibrotisch umgewandelte Zell- und Gewebsarchitektur (248). Begleitet werden diese Änderungen durch erhöhte Level des Wachstumsfaktors TGF- β 1 sowie einer sukzessiv verminderten Expression des downstream targets ADRP. Lipofibroblasten, als Effektorzellen des PTHrP-Systems, besitzen darüber hinaus noch weitere Relevanz, da dieser Zelltyp zum einen Schutz vor oxidativer Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bietet, sowie zum anderen die Aufnahme von Triglyzeriden in die Alveolarepithelzellen Typ II reguliert und die Proliferation dieses Zelltyps steuert (244, 247, 248). Dabei fungieren Lipofibroblasten histologisch betrachtet als Stützzellen der Alveolarepithelzellen Typ II, und versorgen diese mit Lipiden und Nährstoffen, um Synthese und Sezernierung des Surfactant zu ermöglichen (157, 254).

1.4.2.2.4 Alveolarepithelzellen Typ II (Pneumozyten Typ II)

Alveolarepithelzellen Typ II spielen eine besondere Rolle in der Aufrechterhaltung der pulmonalen Homöostase, da diese Zellen: i) Surfactant produzieren und sezernieren, und ii) Ionenpumpen exprimieren, welche die Beseitigung von Sekret und Flüssigkeiten aus den Atemwegen erleichtern (152). Im Alveolargewebe vermittelt PTHrP seine Aktivität über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an der Oberfläche benachbarter Alveo-

larzellen mesenchymalen Ursprungs und induziert somit ebenfalls die Ausbildung des lipogenen Phänotyps dieses Zelltyps.

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Als kardiovaskulärer Risikofaktor geht ein manifester Hypertonus mit einer deutlichen Verschlechterung vaskulärer Funktionen und somit auch mit endothelialer Dysfunktion einher. Als Folge dieser endothelialen Dysfunktion resultiert eine Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit. Dieses NO-Defizit lässt sich erfahrungsgemäß auch in pulmonalem Gewebe nachweisen, und wurde bereits als übereinstimmendes Charakteristikum zahlreicher Lungenerkrankungen – sowohl ähnlicher als auch unterschiedlichster Ätiologie – identifiziert.

Primäres Ziel der hier vorliegenden Studie war es daher, durch molekularbiologische Analysen den Einfluss eines NO-Defizits auf Anpassungsvorgänge der Lunge zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Zusammenhängen zwischen NO-Defizienz und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie dem Einfluss des pulmonalen PTHrP-Systems auf das Ausmaß möglicher pulmonaler Adaptation und insbesondere auf das Expressionsniveau fibrotischer Markerproteine. In diesem Zusammenhang wurden sowohl die Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) als auch die Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) – i) durch Hemmung des RAAS mittels des ACE-Hemmers Captopril sowie ii) durch Abfangen der Superoxidationen mittels des SOD-Mimetikums Tempol – besonders berücksichtigt.

Zur Bearbeitung der Fragestellung kamen zwei verschiedene Tiermodelle zum Einsatz, mit deren Hilfe sich eine Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit präzise realisieren ließ. Ansatzpunkt war dabei in beiden Fällen die negative Beeinflussung der Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS), als Hauptproduzent des Stickstoffmonoxids (NO) in der Lunge. Zum einen erfolgte eine pharmakologische Induktion des NO-Defizits mittels Applikation von N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) – einem NOS-Inhibitor – und zum anderen erfolgte der Einsatz einer Serie transgener eNOS-knockout-Mäuse.

2. Material

2.1 Gewebeproben

Im Rahmen der hier vorgelegten Untersuchungen wurden Gewebeproben analysiert, die aus unterschiedlichen experimentellen Serien stammen. Tierversuche und Tiertötungen wurden im Rahmen dieser Untersuchungen selbst nicht durchgeführt.

Die Gewebeproben aus L-NAME behandelten Tieren und deren Kontrollen stammen aus dem Projekt **GI 20/1 Nr. 58/2005 (JLU-Nummer 266)** beziehungsweise aus einer Kooperation mit Peter Ferdinandy (Semmelweis-Universität Budapest, Ungarn; **Projekt RAI-1**). Gewebeproben aus eNOS defizienten Mäusen entstammen aus der ehemaligen Zucht dieser Tiere an der JLU Gießen (**UGI 36**).

Sofern physiologische Daten und Organgewichte für die hier vorgestellten Befunde von Relevanz sind, werden diese, da von Dritten erhoben, im Material- und Methodenteil dieser Arbeit vorangestellt. Dies dient der besseren Beurteilbarkeit und der Diskussion der Befunde. In Teilen sind diese Befunde bereits in früheren Dissertationen wiedergegeben (*Rui Manuel da Costa Rebelo: Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Progredienz hochdruckvermittelter Herzinsuffizienz bei hypertensiven Ratten, 2010; Svenja Forst: TGF- β 1 induzierte Deposition extrazellulärer Matrixproteine im Tiermodell transgener eNOS+/- Mäuse, 2009*).

2.2 Geräte

2.2.1 Allgemeine Laborgeräte

Demineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Glasware	Schott, Mainz
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
MS2 Minishaker (Vortexer)	IKA-Werke, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipettierhilfen	BRAND GmbH, Wertheim
Precellys® 24 (Homogenisator)	PEQLAB, Erlangen
Schüttler	Biometra, Göttingen

Zentrifugen Beckman Coulter, USA

2.2.2 Spezielle Laborgeräte und Gebrauchsgegenstände

PCR:

Thermo-Cycler Techne, Wertheim-Bestenheid

iCycler Bio-Rad, München

Nano-Drop® ND-1000 PEQLAB, Erlangen

Western Blot:

Blot-Schwämme invitrogen™, USA

Chemilumineszenz-System PEQLAB, Erlangen

Filterpapier BIOTEC-Fischer GmbH, Reiskirchen

Gelmesser invitrogen™, USA

Hamilton-Spritze (50 µl) Hamilton, Schweiz

Klemmkeil invitrogen™, USA

Netzgerät Biometra, Göttingen

Nitrocellulose-Membran (0,2 µm) Millipore Corporation, USA

NuPage® Bis-Tris Mini Gels (10%) invitrogen™, USA

Thermoblock Dri-Block DB.2D Labtech International, UK

Ultraschallgerät (UP50H / UP100H) Hielscher Ultraschall GmbH, Teltow

XCell II™ Blot Module invitrogen™, USA

XCell SureLock™ Electrophoresis Cell invitrogen™, USA

2.3 Verbrauchsmaterialien

BD Falcons™ (10/30/50/75 ml)	BD Biosciences, USA
Einweg-Skalpelle	Feather Safety Razor Co., Ltd., Japan
iCycler iQ PCR Plates, 96 well	Bio-Rad, München
Microseal `B`-Film	Bio-Rad, München
Mikroreaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Parafilm	BEMIS® Packaging, USA
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Precellys® 24 Homogenisationstubes	PEQLAB, Erlangen

2.4 Chemikalien

Absolute QPCR SYBR® Green PCR-Mix	ABgene, Hamburg
Bovines Serum-Albumin (BSA 5%)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Captopril	Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Inc.
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylether	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen

Ethanol	Roth, Karlsruhe
5x FS-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Hydralazin-Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Laemmli-Puffer (2x) S3401	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
L-NAME	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
NaCl	B. Braun AG, Melsungen
NuPage® Antioxidant	invitrogen™, USA
NuPage® MOPS SDS Running Buffer	invitrogen™, USA
NuPage® Transfer Buffer (20x)	invitrogen™, USA
Oligo-dT	Roche, Mannheim
PBS	bioline, Luckenwalde
PeqGold TriFast™-Reagenz	PEQLAB GmbH, Erlangen
PMSF	Roth, Karlsruhe

RNA-sin	Promega, Madison
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Spectra Multicolor Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
SuperSignal™ West Pico ECL Substrate	Thermo Scientific, USA
TBS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tempol	Sigma, Taufkirchen
Transfer Buffer (1x)	invitrogen™, USA
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Tween20	AppliChem GmbH, Darmstadt

Alle zusätzlich verwendeten Chemikalien und Salze – falls hier nicht explizit aufgelistet beziehungsweise genannt – wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

Geordert wurden die Substanzen jeweils in der höchsten erhältlichen Qualität. Hinsichtlich Lösung und Aufbewahrung der Chemikalien und Salze wurden die Herstellerangaben stets befolgt. Als Lösungsmittel für Puffer, Medien und Lösungen wurde aqua bidest. verwandt, sofern nicht anders angegeben.

2.4.1 Antikörper

Primäre Antikörper:

Aktin	1:1.000 (aus Rabbit)	Sigma, Taufkirchen
ODC	1:200 (aus Goat)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PTHrP	1:100 (aus Rabbit)	Calbiochem, Darmstadt
PTHrP-Rez.	1:1.000 (aus Rabbit)	Sigma, Taufkirchen
TGF-β1	1:1.000 (aus Rabbit)	Cell Signaling, USA

Sekundäre Antikörper:

Donkey Anti-Goat IgG	1:5.000	ImmunoResearch Dianova, Hamburg
Sheep Anti-Rabbit IgG	1:2.000	Affinity Biologicals, Kanada

2.4.2 Primer

Die nachfolgende tabellarische Übersicht zeigt sämtliche Primer, die im experimentellen Teil dieser Arbeit Verwendung fanden. Die gelisteten Primer wurden von der Firma Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe bezogen. Ebenfalls angegeben sind das jeweils zu untersuchende Gen, die spezifische Annealing-Temperatur (°C), die Länge des real-time RT-PCR-Produktes (bp), die Primer-Sequenzen (obere Reihe forward, untere Reihe reverse) sowie die *NCBI Referenz Sequenz*.

Gen	Annealing	Länge	Primersequenz
<u>Ratte:</u>			
Adm	65,0	191	5`-GCA TGA ACC AGG GGT CCC GC-3`
NM_012715			5`-CAC AGT CCG GGC TCG GAG GA-3`
Adm 2	64,5	197	5`-TGC CTC AGG GTG GTG GCT CA-3`
NM_201426			5`-ACT GTG GGG GCT GCT GGG AT-3`
ADRP/Plin	65,0	111	5`-GCC CGA GTC ACA ACC CCA CG-3`
NM_017238			5`-AGA GTC GAC AGC CGC TCG GT-3`
B2M	65,0	117	5`-GCC GTC GTG CTT GCC ATT C-3`
NM_012512			5`-CTG AGG TGG GTG GAA CTG AGA C-3`
Biglycan	59,0	144	5`-TGA TTG AGA ATG GGA GCC TGA G-3`
NM_017087			5`-CCT TGG TGA TGT TGT TGG AGT G-3`
Collagen 1	62,0	154	5`-GCG AAC AAG GTG ACA GAG-3`
NM_053304			5`-CCA GGA GAA CCA GCA GAG-3`

Gen	Annealing	Länge	Primersequenz
Cyb-A	61,0	136	5`-TAA ACC CAA GGA GCG GCC GC-3` 5`-CTG GGG TCC TCC TGC CGA GG-3`
<i>NM_024160</i>			
Cyb-B	60,0	145	5`-GCT GGT GCG GTT TTG GCG ATC-3` 5`-CAC TGC GGG ACG CTT GAC GAA-3`
<i>NM_023965</i>			
Decorin	59,0	133	5`-GGC AGT CTG GCT AAT GTT C-3` 5`-CTT CGG AGA TGT TGT TGT TAT G-3`
<i>NM_024129</i>			
Elastin	56,0	140	5`-TGC TAC TGC TTG GTG GAG AAT G-3` 5`-CGT GGC TGC TGC TGT CTG-3`
<i>NM_012722</i>			
eNOS	56,0	187	5`-CCC CCG GCT TCC CCC ATG TA-3` 5`-GGG GCA GCG GAA CCA CTT CC-3`
<i>NM_021838</i>			
HPRT	63,0	132	5`-CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT-3` 5`-CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC-3`
<i>NM_012583</i>			
MMP-12	62,5	150	5`-TGC AGC TGT CTT TGA TCC AC-3` 5`-GCA TCA ATT TTT GGC CTG AT-3`
<i>NM_053963</i>			
Ncf-1	66,0	114	5`-GCA CCA CCT CGC AGG TCG AC-3` 5`-GCG CTG CTG CAG GAA TCG GA-3`
<i>NM_053437</i>			
Ncf-2	65,0	149	5`-ATG GTG CCA ACA GCT CGG CC-3` 5`-GCT GGC TGT AGG GGA GGC CA-3`
<i>NM_001100984</i>			
ODC	58,0	304	5`-GAA GAT GAG TCA AAC GAG CA-3` 5`-AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG-3`
<i>NM_012615</i>			
PPAR γ	64,0	130	5`-GCC GCA CGG ACG CAC ATT G-3` 5`-GCC TCA CAC GAC CCG GTA CC-3`
<i>NM_022708</i>			

Gen	Annealing	Länge	Primersequenz
PTHrP	64,0	131	5`-AGC TAC TCC GTG CCC TCC CG-3`
<i>NM_012636</i>			5`-AGG AAG AAA CGG CGG CGC AA-3`
PTH-1R	64,0	120	5`-GTG AGG TGC AGG CAG AGA TT-3`
<i>NM_020073</i>			5`-TCG TGT GAG ACA CCA TTG GG-3`
PTH-2R	65,0	114	5`-GGC CAC AGG TAC GGC TCG GT-3`
<i>NM_031089</i>			5`-GGC AGT CTT GGC GGG TTT GCT-3`
SOD-1	63,0	134	5`-AAG GCC GTG TGC GTG CTG AA-3`
<i>NM_017050</i>			5`-ACA TGG AAC CCA TGC TCG CCT-3`
SOD-2	63,0	169	5`-ATG TTG TGT CGG GCG GCG TG-3`
<i>NM_017051</i>			5`-TCG CGT GGT GCT TGC TGT GG-3`
SOD-3	63,0	163	5`- TGC TGC CTC CCG ATC AGC CA-3`
<i>NM_012880</i>			5`-CCC TGG CTC AGG TCC CCG AA-3`
TGF- β 1	61,0	117	5`-ATT CCT GGC GTT ACC TTG G-3`
<i>NM_021578</i>			5`-CCT GTA TTC CGT CTC CTT GG-3`
VEGF-A	65,0	274	5`-TGC CCC TAA TGC GGT GTG CG-3`
<i>NM_001110333</i>			5`-GGC TCA CAG TGA ACG CTC CAG G-3`

Tab. 2.1 – Auflistung und Spezifikationen der verwendeten Rattenprimer

Gen	Annealing	Länge	Primersequenz
<u>Maus:</u>			
ADRP/Plin2	60,0	114	5`-CCC GCA ACC TGA CCC AGC AG-3`
<i>NM_007408</i>			5`-CGC CTG CCA TCA CCC CCA AG-3`
Cyb-A	67,0	94	5`-CGC TGG CGT CTG GCC TGA TT-3`
<i>NM_007806</i>			5`-GCA GCG ATA GAG TAG GCG CCG-3`

Gen	Annealing	Länge	Primersequenz
MMP-12	61,0	130	5`-TGA TGC AGC TGT CTT TGA CC-3`
<i>NM_008605</i>			5`-TGG GAA GTG TGT GGA AAT CA-3`
PPAR γ	61,0	177	5`-GCC TTG CTG TGG GGA TGT-3`
<i>NM_001127330</i>			5`-TCA GCG GGA AGG ACT TTA TGT-3`
PTH-1R	66,0	108	5`-TTG CCT CCC TCA CCG TGG CT-3`
<i>NM_001083935</i>			5`-CGG CGC GCA GCA TAA ACG AC-3`
PTHrP	60,0	144	5`-GAG ATC CAC ACA GCC GAA AT-3`
<i>NM_008970</i>			5`-CGT CTC CAC CTT GTT GGT TT-3`
SOD-2	68,0	129	5`-GAC TAT GGC GCG CTG GAG CC-3`
<i>NM_013671</i>			5`-TCC CTT GGC CAG AGC CTC GT-3`
VEGF-A	57,0	176	5`-AGA GCA ACA TCA CCA TGC AG-3`
<i>NM_001025250</i>			5`-TTT CTT GCG CTT TCG TTT TT-3`

Tab. 2.2 – Auflistung und Spezifikationen der verwendeten Mausprimer

2.5 EDV und Statistik

ICycler™IQ Optical System Software	BioRad, München
Image Quant	Molecular Dynamics
Microsoft Office®	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Microsoft Windows® (XP, 7)	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Nano Drop 100v 3.5.1	Coleman, München
QuantityOne®	BioRad, München
Chemi-Smart 5100	PEQLAB GmbH, Erlangen
Statistik-Software	SPSS 17.0

3. Methoden

3.1 Studiendesign

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden Gewebeproben von 86 Ratten und 20 Mäusen untersucht. Zur Herkunft und Charakterisierung dieser Versuchstiere siehe Erläuterungen unter Punkt 2.1 Gewebeproben.

Die Ratten wurden anhand folgender Merkmale in 3 Gruppen unterteilt:

1. 12-Monatsgruppe (n=40):

L-NAME + Captopril	(n=10)
L-NAME + Hydralazin	(n=10)
L-NAME	(n=10)
Kontrolle	(n=10)

2. 3-Monatsgruppe (n=24):

Kontrolle	(n=6)
L-NAME	(n=6)
L-NAME + Captopril	(n=6)
L-NAME + Hydralazin	(n=6)

3. Tempol-Gruppe (n=22):

Kontrolle	(n=6)
L-NAME	(n=5)
L-NAME + Tempol	(n=6)
Tempol	(n=5)

Bei den Mäusen entstammt das untersuchte Gewebe aus eNOS-knockout Mäusen. Bei diesen Versuchstieren wurde die folgende Gruppe gebildet:

1. 6-Monatsgruppe (n=20):

Homozygote (eNOS ^{-/-})	(n=10)
Heterozygote (eNOS ^{+/-})	(n=10)

In den unter Punkt 2.1 genannten Forschungsarbeiten wurden Blutdruckmessungen an den verschiedenen aufgelisteten Versuchstieren durchgeführt. Da diese Messungen nicht primär im Zuge der hier vorgelegten Arbeit ausgeführt wurden, erfolgt die Darstellung derjenigen Messwerte, welche für die Anfertigung dieser Arbeit – und zur Beantwortung der zugrunde liegenden Fragestellung – von Relevanz sind, aus Gründen der Übersichtlichkeit an dieser Stelle (und nicht im Ergebnisteil). Die gemessenen systolischen Werte sind, entsprechend der Zugehörigkeit zu den verschiedenen Versuchsgruppen sowie im zeitlichen Verlauf, in den Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt.

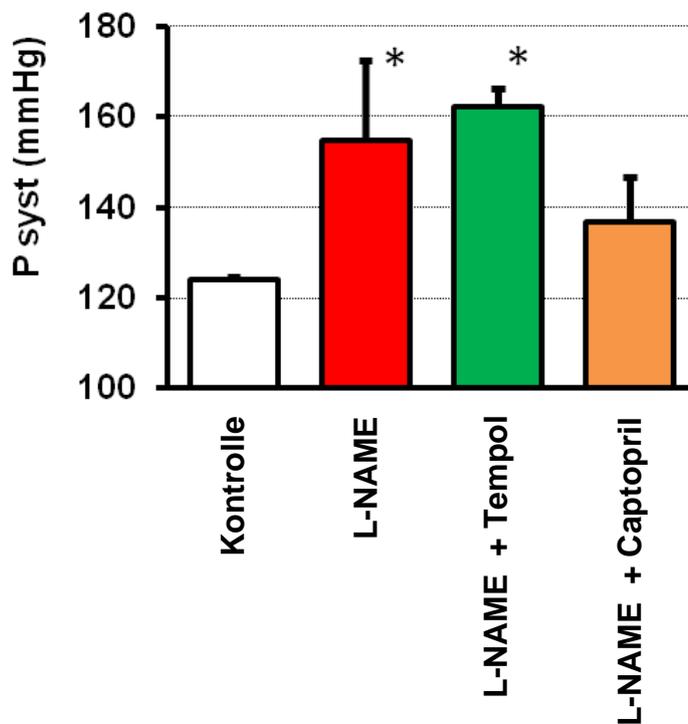


Abb. 3.1 – Darstellung der erhobenen Blutdruckwerte des Rattenkollektivs.

Dargestellt sind die systolischen Blutdruckwerte (gemessen in mmHg) der Tiere aus der Kontroll-, L-NAME-, L-NAME + Tempol- und L-NAME + Captopril-Gruppe.

Während sich in der Kontrollgruppe und der L-NAME + Captopril-Gruppe normotensive systolische Blutdruckwerte zeigten, stellten sich die systolischen Werte der Versuchstiere, welche mit L-NAME sowie mit L-NAME + Tempol behandelt wurden, als signifikant erhöht dar.

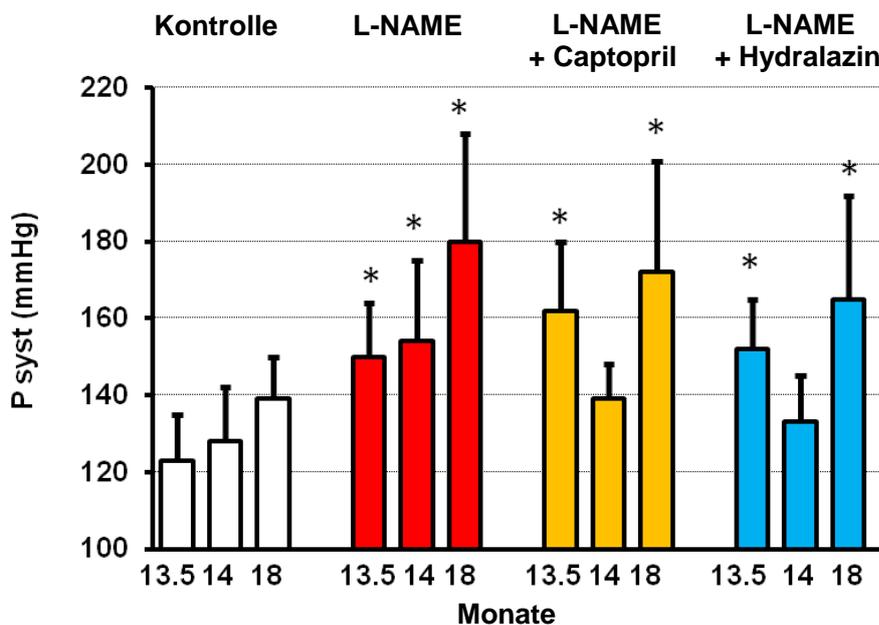


Abb. 3.2 – Darstellung der systolischen Blutdruckwerte der Versuchstiere im Zeitverlauf.

Dargestellt sind die gemessenen systolischen Werte (in mmHg) der Versuchstiere aus der Kontroll-, der L-NAME-, der L-NAME + Captopril- sowie der L-NAME + Hydralazin-Gruppe. Die Messwerte wurden überwiegend zu drei festgelegten Messzeitpunkten erhoben. Diese lagen bei einem Tieralter von 13,5, 14 und 18 Monaten. Als auffällig zeigten sich die unabhängig vom Tieralter signifikant erhöhten Werte in der L-NAME-Gruppe. Ebenso die signifikant erhöhten Werte in der L-NAME + Captopril- sowie in der L-NAME + Hydralazin-Gruppe. In letzteren zeigten sich jedoch keine signifikant erhöhten systolischen Werte bei den Messungen in einem Tieralter von 14 Monaten. Alle übrigen dargestellten Gruppen zeigten keine signifikant veränderten systolischen Blutdruckwerte.

3.2 Medikamentengabe

Um eine möglichst fehlerunanfällige Aufnahme der eingesetzten Medikamente durch die Versuchstiere zu gewährleisten, erfolgte die Applikation sämtlicher Wirkstoffe über das Trinkwasser. Aus dieser Darreichungsform ergab sich ferner noch der Vorteil, einer – über den ganzen Tag – gleichmäßig verteilten Wirkstoffaufnahme. Um die entsprechenden Tagesdosen der Medikamente festlegen zu können, wurden Körpergewicht und tägliche Wasseraufnahme der Versuchstiere bestimmt. Im Durchschnitt wogen die – für diese Arbeit eingesetzten Ratten – zwischen 220 g und 250 g. Jedes dieser Tiere nahm täglich zwischen 20 und 25 ml Wasser aus den Trinkflaschen auf.

Anhand dieser Daten wurde die Medikamentendosierung wie folgt festgelegt:

Captopril-Dosis:	300 mg/l
Hydralazin-Dosis:	125 mg/l
L-NAME-Dosis:	300 mg/l
Tempol-Dosis:	1 mmol/l

Tab. 3.3 – Medikamentendosierung im Trinkwasser der Versuchstiere

Daraus ergaben sich für die entsprechenden Versuchsgruppen eine Captopril- und L-NAME-Aufnahme von jeweils circa 30 mg/kg/KG pro 24 Stunden je Versuchstier, eine Hydralazin-Aufnahme von nahezu 12 mg/kg/KG pro 24 Stunden je Versuchstier und eine Tempol-Aufnahme von circa 0,1 mmol/kg/KG pro 24 Stunden je Versuchstier.

Die Darreichung der Medikamente erfolgte als wässrige Lösung, wodurch sich eine begrenzte Stabilität der Substanzen in dieser Lösung ergab. Daher wurden die Trinkwasser-Wirkstoff-Lösungen aller Versuchsgruppen vorsichtshalber täglich erneuert. Um das Risiko unerwünschter Lichtreaktionen der Wirkstoffe zu minimieren, wurden die – für die Medikamentenapplikation – eingesetzten Trinkflaschen mit Aluminiumfolie umwickelt.

3.3 Blutdruckmessung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Blutdruckwerte, wurden – wie unter Punkt **2.1 Gewebeproben** erwähnt – von Dritten erhoben. Dabei kam ein nicht-invasives, intermittierendes Verfahren zum Einsatz. Das eingesetzte Mess- und Aufzeichnungssystem ließ sich dabei frei programmieren. Alle Einstellungen und Abläufe wurden vorab festgelegt und anschließend vom System automatisch ausgeführt. Diese Methode wird in der Literatur als „*Tail-Cuff-Methode*“ bezeichnet und erfolgt am wachen und nicht-sedierten Versuchstier, da sie schmerzfrei verläuft. Als Vorbereitung auf die Messungen wurden die Versuchstiere im Laufe von 14 Tagen an die Messgeräte sowie die Messprozedur gewöhnt. Für die Blutdruckmessung wurden die Tiere einzeln in einen sogenannten Restrainer gebracht. Dabei handelt es sich um einen größenverstellbaren Messkäfig, welcher aus einer beidseitig verschließbaren, durchsichtigen Plexiglasröhre besteht. In der Frontplatte befindet sich eine Atemöffnung zur Oxygenierung der Versuchstiere

und in der Rückplatte befindet sich eine weitere Öffnung durch die der Tierschwanz hinausgeführt wurde. Nachdem die Versuchstiere in der Restraîner-Röhre fixiert wurden, wurde die Blutdruckmanschette von distal nach proximal über den Schwanz – also von der Schwanzspitze in Richtung Schwanzwurzel – bis an den Körper des Versuchstieres geschoben. Auf die gleiche Weise erfolgte anschließend die Befestigung des photoelektrischen Pulsmessers. Zwischen Blutdruckmanschette und Pulsnehmer wurde ein Sicherheitsabstand von mindestens einem Zentimeter eingehalten. Dann erfolgte die Einbringung des Restrainers (mit dem Versuchstier) in eine Wärmekammer, in welcher mittels vorgewärmter Raumluft eine Temperatur von konstanten 32 °C etabliert wurde. Als Folge der erhöhten Raumtemperatur kam es zur Dilatation der Arteria caudalis des Versuchstieres und dadurch zur vermehrten Gewebsperfusion im Sinne einer Hyperämisierung. Um den, für die Messgenauigkeit, positiven Effekt der Hyperämisierung voll nutzen zu können, erfolgte die erste Messung erst nach einer Verweildauer des Tieres von mindestens zehn Minuten in der Wärmekammer. Dadurch konnte der Sensor die veränderte Lichtdurchlässigkeit der Arterie, in Abhängigkeit zu ihrem Gefäßdurchmesser, störungsfrei aufnehmen und als elektrisches Signal ausgeben. Zur Blutdruckmessung wurde dann im ersten Schritt der Druck innerhalb der Manschette langsam in konstanten Schritten von 3mmHg, erhöht. Durch den ansteigenden äußeren Druck auf die Schwanzarterie verminderte sich die Perfusion der Arteria caudalis, bis hin zur Okklusion der Selbigen. Im Moment des Gefäßverschlusses, gab der photoelektrische Sensor kein pulsatile Signal mehr aus. Der zugehörige Blutdruck wurde automatisch als systolischer Blutdruck registriert. Im zweiten Schritt wurde der Druck wieder langsam und gleichmäßig aus der Blutdruckmanschette abgelaßen und die Arteria caudalis wurde entlastet. Während dieser Entlastungsphase wurden zusätzlich Pulsfrequenz und diastolischer Blutdruck erfasst und elektronisch aufgezeichnet.

Zur Gewährleistung repräsentativer und vergleichbarer Daten wurden sämtliche Messwerte unter denselben stressfreien Bedingungen, zur selben Tageszeit und bei den gleichen Einstellungen erhoben. Dies beinhaltet eine festgeschriebene Signalschwelle für die Systole von 35%, einen systolischen Korrekturfaktor von 1.0 und einen diastolischen Korrekturfaktor von 0.7. Abweichend von diesen festgeschriebenen Einstellungen müssen die Signalverstärkung (4-fach) und der Blutdruckmessbereich (80-220 mmHg) betrachtet werden. Diese wurden jeweils einzeln neu bewertet und individuell ausgewählt.

3.4 real-time RT-PCR am iCycler®

3.4.1 RNA-Isolierung aus Lungengewebe

Zur Extraktion, der in den Lungenzellen enthaltenen RNA, wurden die bei -80 °C eingefrorenen Organpräparate dem Kälteschrank entnommen und durch einen Skalpell-Schnitt halbiert (quer), da nicht das gesamte Probenmaterial benötigt wurde. Eine Hälfte des Organpräparates wurde unverzüglich wieder in den Kälteschrank verbracht und bei -80 °C eingefroren. Die andere Hälfte wurde zur Aufbereitung in Homogenisationstubes (2,0 ml) überführt. Nach diesem Schritt wurden noch 700 µl TriFast®-Reagenz zum Lungenpräparat hinzupipettiert. Die Homogenisierung erfolgte dann im Precellys 24-Homogenisator für drei Mal 20 sec bei 6.000 rpm. In diesem Schritt wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert und die darin enthaltenen Zellen freigesetzt. Nach der Homogenisation befand sich in den Tubes ein zellhaltiges Lysat, welches mit 70 µl Chloroform überschichtet und für mindestens zehn Sekunden gevortext wurde; bis eine milchig weiß-rötliche Trübung erkennbar wurde. Zur Separation der RNA von den anderen Bestandteilen dieser Lösung – wie DNA-Fragmenten und Proteinen – wurden die Tubes anschließend zentrifugiert. Dies geschah für 15 min bei 4 °C und 12.500 rpm. Nach dem Zentrifugieren enthielten die Tubes ein Gemisch aus drei Phasen, wobei die obere, klare wässrige Schicht die RNA barg. Diese wurde umgehend entnommen und in 1,0 ml Reaktionsgefäße überführt, um dann mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 aufpipettiert zu werden. Danach wurden die gekennzeichneten Einzelproben über Nacht bei -20 °C im Kälteschrank gelagert. Durch diese Lagerung kam es zur Ausfällung der RNA, so dass sich diese – nach erneutem Zentrifugieren am Folgetag (für 15 min, bei 4 °C und 12.500 rpm) – in Form eines Pellets am Boden des Reaktionsgefäßes sammelte. Der Überstand wurde abgeschüttet und 1 ml 70%iger Ethanol zum Pellet hinzupipettiert. Das RNA-Pellet wurde durch vortexen vom Boden des Reaktionsgefäßes gelöst und anschließend durch erneutes Zentrifugieren (für 15 min, bei 4 °C und 12.500 rpm) gewaschen. Im vorletzten Schritt wurde der Alkohol entfernt und das RNA-Pellet für ca. eine Stunde luftgetrocknet. Zuletzt wurde die RNA mit 20 µl aqua bidest. aufgenommen, gevortext und zum Lösen für eine Stunde im Kälteschrank auf Eis gelagert.

3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration der einzelnen Proben erfolgte mit Hilfe eines UV/Vis-Spektralphotometers. Das hierfür eingesetzte Gerät trägt die Bezeichnung

Nano Drop® ND-1000. Um Mess- beziehungsweise Verdünnungsfehler zu vermeiden musste vor der ersten Messung sichergestellt sein, dass das RNA-Pellet komplett in aqua bidest. gelöst worden war. Zur RNA-Konzentrationsbestimmung wurden dann jeweils 2 µl einer Probe luftblasenfrei auf den Sensor des Photometers pipettiert. Der Messarm wurde geschlossen und die Messung am Computer gestartet. Die, für die anschließend folgende cDNA-Synthese, erwünschte RNA-Konzentration sollte in einem Referenzbereich von 500 und 2.000 ng/µl liegen. Sofern RNA-Werte von über 2.000 ng/µl gemessen wurden, mussten diese Proben mit aqua bidest. im Mengenverhältnis von 1:1 (Probenmenge in µl zu Menge aqua bidest. in µl) verdünnt und neu gemessen werden, bis sie im Zielbereich lagen.

3.4.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Das Verfahren der real-time RT-PCR dient der Vermehrung von spezifischen DNA-Sequenzen. Dazu werden spezielle Polymerasen benötigt, welche gezielt an eine gewünschte DNA-Sequenz binden. Da es keine Polymerasen gibt, welche spezifisch die DNA-Synthese aus RNA katalysieren, war es vorab notwendig die bereits aufbereitete RNA zunächst in cDNA (complementary-DNA) zu kopieren. Dabei diente die RNA als Matrize für die RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase. Für diesen Schritt benötigte man von jeder Lungenprobe eine Menge von 1µg RNA/µl. Bei den Nano Drop®-Messungen zeigte sich jedoch, dass die vorhandenen Lungenproben jeweils unterschiedlich hohe RNA-Konzentrationen enthielten.

Zum Ausgleich der Unterschiede wurde folgende Berechnungsformel heran gezogen:

$$[1.000 / \text{Nano Drop}^{\circledast}\text{-Verdünnwert (in ng/}\mu\text{l)}] * 4 = \text{Menge RNA-Lösung (in } \mu\text{l)}$$

Tab. 3.4 - Berechnungsformel RNA-Lösung

Mithilfe dieser Formel wurde für jede Lungenprobe individuell berechnet, welche Menge verdünnte RNA-Lösung in neue Reaktionsgefäße überführt werden musste, damit sich die oben genannte Konzentrationsvorgabe von 1 µg RNA/µl einstellen ließ. Zur cDNA-Synthese wurde dann jeweils die berechnete und pipettierte Menge an Ribonukleinsäure mit aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe ergänzt. Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler. Auf die Denaturierung der RNA durch Hit-

zueinwirkung (für 15 min bei 60 °C im Thermocycler) folgte die Zugabe von 20 µl des 4-fach cDNA-Mix zu jeder Probe.

Dieser Mix wurde wie folgt zusammengestellt:

5 FS-Puffer	2,0 µl
Oligo-dt	1,0 µl (0,1 mg/ml)
dNTP`s	1,0 µl (10 mmol/l je Nukleotid)
DTT	0,5 µl (0,1 mol/l)
RNAsin	0,2 µl (25 U/µl)
M-MLV-RT	0,3 µl (200 U/µl)

Tab. 3.5 - Zusammensetzung cDNA-Reaktionsmix für einen 1-fachen Ansatz

Im nächsten Schritt erfolgte die Anlagerung der im Mix enthaltenen Reversen Transkriptase an die denaturierte RNA (für 60 min bei 37 °C im Thermocycler) und die Synthese der cDNA. Zum Abschluss der Synthese erfolgte eine erneute Hitzedenaturierung (für 5 min bei 95 °C im Thermocycler), wodurch auch die Funktion der Reversen Transkriptase zum Erliegen kam.

Die so synthetisierte cDNA lag im Verhältnis 1:1 vor. Vor der Verwendung in der Real-time PCR musste sie zunächst mit aqua bidest. auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt werden. Anschließend wurde sie bei -20 °C im Kälteschrank eingefroren und gelagert.

3.4.4 real-time RT-Polymerase Kettenreaktion (real-time RT-PCR)

In der real-time RT-PCR dient die vorab hergestellte cDNA als Matrize für die Amplifikation des zu untersuchenden Genprodukts. Dazu wurden die cDNA-Proben (1:10) zunächst aus dem Kälteschrank entnommen und auf Eis gelagert.

Danach wurde der PCR-Mix wie folgt angesetzt:

SYBR® Green PCR-Mix	10,0 µl
Primer 1:10 (fw + rev)	0,6 µl
aqua bidest.	6,4 µl

Tab. 3.6 - Zusammensetzung PCR-Reaktionsmix

Dieser Reaktionsmix kam bei allen aufgelisteten Primern zum Einsatz. Sämtliche Primer wurden entsprechend der Herstellervorgaben zunächst aufgelöst (forward und reverse getrennt), dann 1:1 miteinander gemischt (forward und reverse) und schließlich mit aqua bidest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Bei der real-time RT-PCR handelt es sich um eine quantitative Methode zur Untersuchung von Genprodukten. Daher wurden alle hier eingesetzten Proben als Doppelbestimmung erfasst. Dazu wurden je Probe zwei Mal 3 µl cDNA (1:10) in zwei benachbarten wells (einer 96-well-PCR-Platte) aufgetragen und zusätzlich je 17 µl des PCR-Mix hinzu pipettiert. Mittels einer Microseal-Folie wurde die PCR-Platte luftdicht verschlossen und in den iCycler® eingesetzt. Je nach zu untersuchendem Genprodukt wurde dann am Computer das primer-spezifische Lauf-Protokoll ausgewählt und die PCR gestartet. Die primer-spezifischen Annealing-Temperaturen waren vorab in den Lauf-Protokollen hinterlegt worden.

Kennzeichnend für einen PCR-Lauf ist folgender dreiphasiger Ablauf:

1. Schritt (1x):	Enzymaktivierung	(bei 95 °C für 15 Minuten)
2. Schritt (45x):	Denaturierung der cDNA	(bei 95 °C für 30 Sekunden)
	Annealing der Primer	(bei XX °C für 30 Sekunden)
	<i>(Annealing-Temperaturen zeigen sich Primer-spezifisch)</i>	
	Elongation der DNA	(bei 72 °C für 30 Sekunden)
3. Schritt (100x):	Schmelzkurve	(bei 50 °C für 10 Sekunden)
	<i>(Temperaturerhöhung in Schritten von 0,5 °C bis 100 °C)</i>	

Tab. 3.7 – Ablauf eines real-time RT-PCR-Laufes

Während dieser Schritte erfolgt die Aktivierung der Taq-Polymerase, das Auftrennen der beiden komplementären cDNA-Stränge durch Hitzedenaturierung, ferner das Annealing der Primer an die Einzelstrang-cDNA sowie die polymerase-vermittelte Neusynthese der DNA. Auf diese Weise verdoppelt sich in jedem PCR-Zyklus die Menge an dsDNA (exponentielles Wachstum).

Zur Kontrolle der ermittelten Ct-Werte (cycle threshold) der analysierten Gene – also der Schwellenwerte, welche abhängig sind von der Konzentration der zu Anfang der

Reaktion eingesetzten DNA-Menge – erfolgte ihre Normierung anhand zweier Haushaltsgene. Diese ubiquitär vorkommenden Gene wurden durch das Studiendesign in ihrer Expression nicht beeinflusst. Zum Einsatz kamen hier β 2-Mikroglobulin (B2M) und Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Diese Vorgehensweise erlaubt eine weitgehend quantitativ vergleichende Erfassung der Expressionshöhen.

3.5 Western Blot

3.5.1 Proteinisolierung aus Rattenlungen

Als Western Blot wird eine biochemische Methodik bezeichnet, welche dem gezielten immun-detektorischen Nachweis von Proteinen dient. Zur Durchführung dieser Methodik mussten die Proteine zunächst aus dem zu untersuchendem Probenmaterial eluiert werden. Dazu wurden jeweils 0,1 g eingefrorenes Lungengewebe einer jeden Probe abgewogen und mit 500 μ l Lysis-Puffer versetzt. Zur Lyse wurde dieses Gewebe-Puffer-Gemisch in Homogenisationstubes (2,0 ml) überführt, dann in den Precellys 24-Homogenisator verbracht und für 2 mal 20 sec bei 6.000 rpm homogenisiert.

<i>Tris-HCl (pH 7,5)</i>	20 mM	Na_2EDTA	1 mM
<i>NaCl</i>	150 mM	Na_3VO_4	1 mM
<i>Sodium Phosphate</i>	2.5 mM	EGTA	1 mM
<i>β-glycerophosphate</i>	1 mM	Triton	1 %
<i>PMSF</i>	1 mM	Leupeptin	1 μ g/ml

Tab. 3.8 - Zusammensetzung Zell-Lysis-Puffer

Das entstandene Homogenisat wurde für zehn Minuten auf Eis inkubiert, anschließend mittels Ultraschall-Zerkleinerer dispergiert und für zehn Minuten bei 4 °C und 14.000 rcf (relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde entnommen und in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt. Danach wurden 10 μ l Überstand mit 190 μ l aqua bidest. im Verhältnis 1:20 verdünnt. Von den so entstandenen 200 μ l Gesamtvolumen je Lungenprobe, wurden jeweils 100 μ l entnommen, mit 40 μ l zweifach Laemmli-Puffer gemischt und fünf Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert.

SDS	4,0 %
Glycerol	20,0 %
2-Mercaptoethanol	10,0 %
Bromphenolblau	0,004 %
Tris HCl	0,125 M
pH 6,8	

Tab. 3.9 - Zusammensetzung Laemmli-Puffer

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteinauftrennung)

Bei der Gelelektrophorese werden die bereits vorbereiteten Proteinproben anhand der Proteingröße in einer Trägermatrix aufgetrennt. Diese Auftrennung erfolgt dabei durch das Anlegen einer Spannung an die Polyacrylamid-Matrix. Die physikalischen Proteineigenschaften – Molekulargewicht und elektrische Ladung – geben die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in dem angelegten elektrischen Feld vor. Darüber hinaus wird die Wanderungsfähigkeit der Proteine durch die Beschaffenheit der verwendeten Gelmatrix mehr oder minder stark beeinträchtigt. Die Matrix wirkt dabei verlangsamernd auf die Proteine ein, und zwar umso stärker je größer das Molekulargewicht der vorliegenden Proteine. Große Proteine werden stärker verlangsamt, wohingegen Proteine mit geringerem Molekulargewicht eine größere Distanz zurücklegen können, was in der Größenauftrennung der Proteine resultiert. Da für die hier vorliegenden Untersuchungen die Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes (Größe) erfolgte, enthielten sowohl der Laufpuffer als auch die Proben das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS).

Durchführung

Zunächst wurden die Proben durch erneutes Erhitzen denaturiert (5 min bei 95 °C), danach herunter zentrifugiert und für zehn Sekunden gevortext. Während des Kochens erfolgte die Herstellung des 1x SDS Laufpuffers (Running Buffer) für die untere Kammer; dazu wurden 50 ml 20x MOPS SDS Running Buffer mit 950 ml aqua bidest. versetzt und gründlich gemischt. Des Weiteren wurde der Laufpuffer für die obere Kammer hergestellt; dazu wurden 200 ml neu angesetzter 1x Laufpuffers mit 500 µl NuPage[®] Antioxidant versetzt und gründlich gemischt. Im nächsten Schritt erfolgte der Zusammenbau der Gelkammer und die Vorbereitung der Fertiggele (NuPage[®] Bis-Tris

Mini Gels, 10%, 15 wells). Dazu wurden die Gele mit aqua bidest. gewaschen und sowohl Gel-Taschen als auch untere Gelöffnung gründlich mit Laufpuffer gespült. Danach wurden die Gele in die Gelkammer eingesetzt. Die obere Kammer wurde anschließend mit circa 180 ml 1x SDS-Laufpuffer (mit Antioxidant) und die untere Kammer mit circa 600 ml 1x SDS-Laufpuffer (ohne Antioxidant) gefüllt. Danach wurden die einzelnen Geltaschen mittels einer Kanüle mit Laufpuffer gespült, so dass dann die Proben und der Größenmarker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder von 10 bis 260 kDa) mittels einer Hamilton-Mikroliter-Spritze in die Geltaschen pipettiert werden konnten. In die erste Tasche wurden 15 µl Marker hineingegeben und in die folgenden 12 Geltaschen 15 µl Probenmaterial je Tasche. Abschließend wurde die Gelkammer mittels Deckel verschlossen und eine Spannung von 200 V für 50 min angelegt. In dieser Zeit erfolgte die Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese.

3.5.3 Western Blot (Elektroblotting)

In der Gelelektrophorese wurden die in den Lungenproben enthaltenen Proteine anhand ihres Molekulargewichtes bereits aufgetrennt. Mithilfe des Elektroblotting-Verfahrens erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (0,2 µm) und zwar in identischer Anordnung wie auf dem Gel vorliegend, um anschließend mithilfe eines proteinspezifisch bindenden Antikörpers identifiziert zu werden. Zum Transfer der Proteine wurde an die Blotkammer eine elektrische Spannung angelegt; wodurch die – durch das Natriumdodecylsulfat (SDS) – negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertraten.

Durchführung

Zunächst wurde der 1x Transfer-Puffer (mit 20% Methanol) hergestellt. Dazu wurden 375 ml aqua bidest. mit 25 ml NuPAGE[®] Transfer Buffer (20x) sowie 100 ml Methanol und 500 µl NuPage[®] Antioxidant versetzt und durchmischt. Danach wurden die Blot-Sandwiches vorbereitet. Dazu wurden zunächst Filterpapiere und Nitrocellulose-Membranen (0,2 µm) auf die entsprechende Größe (ca. 9,0 x 7,5 cm) zugeschnitten. Die Filterpapiere dienen zum einen der Immobilisation der Proteine und zum anderen als Schutz vor Austrocknung des Gels und der Membranen. Die Nitrocellulose-Membranen dienen der Bindung der zu untersuchenden Proteine. Für die Blot-Sandwiches wurden vier Filterpapiere, zwei Nitrocellulose-Membranen und fünf Blot-

Schwämme zunächst in 1x Transfer-Puffer eingetaucht und dann luftblasenfrei mit zwei Gelen – direkt in der Puffer-Lösung – zusammengesetzt. Anschließend wurden die Gel-Sandwiches in die Blotkammer verbracht, die Blotkammer in die Gelkammer eingesetzt und mittels Klemmkeil eingespannt. Dann wurde die Blotkammer innen mit circa 40 ml 1x Transfer-Puffer und die Außenkammer zur Kühlung mit 600 ml aqua bidest. gefüllt. Der Boden der Blotkammer diente als Kathode (-) und der Deckel als Anode (+). Es wurde eine gleichmäßige Spannung von 30 V für einen Zeitraum von 60 min angelegt, in welchem die Proteine auf die Nitrocellulose-Membranen transferiert wurden.

Nach dem Protein-Transfer wurden die restlichen freien Bindungsstellen der Membranen gesättigt und blockiert. Dies geschah durch Zugabe von 20 ml 1x TBS mit 5% BSA (Rinderalbumin, engl. bovine serum albumin) für 60 min unter permanenter Bewegung.

3.5.4 Immunologischer Proteinnachweis

3.5.4.1 Antigen-Antikörper-Reaktion

Nachdem die Proteine auf die Nitrocellulose-Membran (0,2 µm) übertragen wurden, erfolgte die indirekte Protein-Detektion mittels eines speziellen Nachweisverfahrens, der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dieses Verfahren basiert auf der spezifischen Bindung eines hinzugefügten Antikörpers an das – auf der Membran gebundene – zu untersuchende Protein. Dabei entsteht ein spezifischer Antigen-Antikörper-Komplex (Immunkomplex). Hierzu wurde die Membran zunächst mit einem primären Antikörper (in 5% BSA in 1x TBS + 0,1% Tween20) über Nacht inkubiert. Dies erfolgte im Kühlraum und bei permanenter Bewegung auf dem Schüttler. Dabei band der Primär-Antikörper spezifisch an das antigene Epitop des zu untersuchenden Proteins.

Am nächsten Tag wurden die noch ungebundenen Primär-Antikörper in drei Waschschritten entfernt. Dazu wurden die einzelnen Membranen jeweils drei mal 10 min in 1x TBS plus 0,1% Tween20 gewaschen.

3.5.4.2 Enhanced Chemilumineszenz (ECL)-Detektion

Die ECL dient der Visualisierung der zu untersuchenden Proteine, nachdem diese mit dem Primär-Antikörper die Antigen-Antikörper-Reaktion eingegangen waren. Nachdem sich der Immunkomplex gebildet hatte wurde die Nitrocellulose-Membran für eine

Stunde mit einem HRP (Horseradish Peroxidase)-konjugierten Sekundär-Antikörper inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper (in 5% BSA in 1x TBS + 0,1% Tween20) war spezifisch gegen den primären Antikörper gerichtet. Um Reste ungebundenen Sekundär-Antikörpers zu entfernen wurde die Membran abschließend erneut gewaschen, und zwar wie folgt:

1. Waschschrift:	in 1x TBS plus 0,1% Tween20	(für 10 Minuten)
2. Waschschrift:	in 1x TBS plus 0,1% Tween20	(für 10 Minuten)
3. Waschschrift:	in 1x TBS	(für 10 Minuten)

Tab. 3.10 – Waschvorgang der Nitrocellulose-Membran bei der ECL-Detektion

Bei der hier eingesetzten Methodik handelt es sich um ein Chemilumineszenz-Verfahren, bei dem Luminol in einer mehrstufigen Reaktion oxidiert wurde. Die zugehörige Reaktion wird als Meerrettichperoxidase (HRP)-katalysierte Oxidation von Luminol bezeichnet. Infolge dieser Reaktion wurden, nach zweiminütiger Inkubation in ECL-Lösung, Lichtimpulse emittiert. Diese wurden mithilfe eines Detektorsystems aufgezeichnet und so die markierte Antigenbande sichtbar gemacht.

3.5.5 Auswertung

Die in der ECL-Detektion erstellten Bilder wurden unter Verwendung der Quantity One[®] Analyse-Software ausgewertet. Als Referenzprotein diente Aktin.

3.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der durchgeführten Studien wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die erhobenen Daten wurden durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit nachfolgendem Student-Neumann-Test analysiert. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Datenanalyse erfolgte mittels der Statistik-Software SPSS (Version 17.0).

4. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse, der zur Erstellung dieser Arbeit durchgeführten wissenschaftlichen Untersuchungsverfahren, vorgestellt.

Zunächst erfolgt die Beschreibung jener Daten, welche mittels real-time RT-PCR erhoben wurden. Diese Daten identifizieren solche Gene, welche differentiell reguliert wurden. Anschließend erfolgt die Darstellung der Ergebnisse aus den Western Blot-Untersuchungen. Diese Befunde haben das Ziel die funktionelle Relevanz der mittels real-time RT-PCR erhobenen Befunde zu verifizieren.

4.1 Ergebnisse der real-time RT-PCR-Untersuchungen

Zunächst werden hier die Ergebnisse der real-time RT-PCR-Läufe vorgestellt. Untersucht wurden Gewebeproben aus den Lungenpräparaten der eingesetzten Versuchstiere. Von essentieller Bedeutung war dabei die Genexpression des PTHrP und seines korrespondierenden PTH-1-Rezeptors sowie der PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ sowie abschließend die Genexpression der Ornithindecaboxylase (ODC).

Ebenfalls zentraler Gegenstand der Untersuchungen war das Expressionsniveau der endothelialen NO-Synthase (eNOS) sowie des Fibrosemediators TGF- β 1 und ausgewählter Fibrosemarker (Elastin, Collagen-1).

Weiterführend erfolgte die molekulargenetische Analyse des Expressionsniveaus mehrerer NADPH-Oxidase-assoziiierter Marker des oxidativen Stresses (p22phox, NOX2, p47phox und p67phox) sowie des Expressionsniveaus der Detoxifikationsenzyme für oxidativen Stress, aus der Gruppe der Superoxiddismutasen (SOD-1, SOD-2 und SOD-3).

4.1.1 Genexpression ausgewählter Marker der pulmonalen Homöostase sowie essentieller Marker des Zellwachstums und der Zellproliferation

4.1.1.1 Effekte des L-NAME auf die mRNA-Expression des pulmonalen PTHrP-Systems

In den nachfolgenden Graphiken (Abb. 4.1a und Abb. 4.1b) wird ein Teil der Ergebnisse der real-time RT-PCR-Analysen der einzelnen Versuchstiergruppen dargestellt. Die Zuordnung der einzelnen Versuchstiere zu den entsprechenden Gruppen wurde zuvor bereits – unter dem Punkt 3.1 – beschrieben. Dargestellt sind hier die Daten der mRNA-Expression für die Gene des PTHrP-Systems.

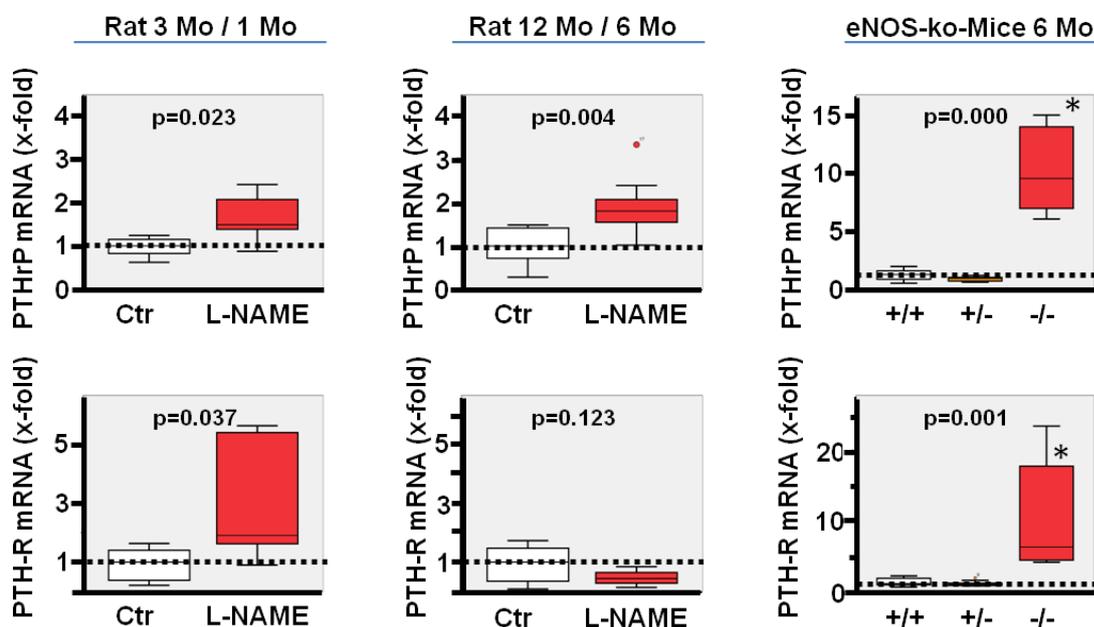


Abb. 4.1a – Auswirkungen der Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz auf die pulmonale Expression von PTHrP und des korrespondierenden PTH-1-Rezeptors in den untersuchten Versuchsguppen. * = $p < 0,05$

Im Rattenkollektiv zeigten die L-NAME-Tiere der Jungtiergruppe (Alter: 3 Monate) eine gesteigerte Expression des PTHrP und des korrespondierenden PTH-1-Rezeptor im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. In der Alttiergruppe (Alter: 12 Monate) war eine gesteigerte Expression nur für PTHrP nachweisbar. Das Expressionsniveau des PTH-1-Rezeptors war vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe. In den eNOS-defizienten Mäuse zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression sowohl des PTHrP als auch des korrespondierenden PTH-1-Rezeptors.

In den Jungtieren des Rattenkollektivs kam es unter dem Einfluss von L-NAME zu einer vermehrten NO-Defizienz. Dadurch zeigte sich in diesen Tieren eine deutlich

gesteigerte Expression des PTHrP und des korrespondierenden PTH-1-Rezeptors, verglichen mit den Tieren der Kontrollgruppe. Die Proben aus der Alttiergruppe zeigten, unter L-NAME-Einfluss, nur teilweise identische Veränderungen hierzu. So ließ sich in den L-NAME-Tieren, lediglich eine gesteigerte Expression des PTHrP nachweisen. Das Expressionsniveau des PTH-1-Rezeptors war in diesen Tieren vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe. Am deutlichsten waren die Veränderungen in der Gruppe der eNOS-defizienten Mäuse. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression für PTHrP und PTH-1-Rezeptor, welche sich in den Kontrollgruppen nicht fand.

In Abbildung 4.1a sind die Veränderungen der Genexpression für einen Teil des PTHrP-Systems dargestellt. Am deutlichsten waren Veränderungen in den eNOS-defizienten Mäusen nachweisbar. In geringerem Ausmaß, aber mit ähnlicher Tendenz, ließen sich die beobachteten Veränderungen auch in den Gewebeproben aus der Ratten-Jungtiergruppe nachweisen. Die Auswirkungen einer L-NAME-vermittelten NO-Synthesehemmung auf das pulmonale Expressionsniveau der PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ , werden in Abbildung 4.1b dargestellt.

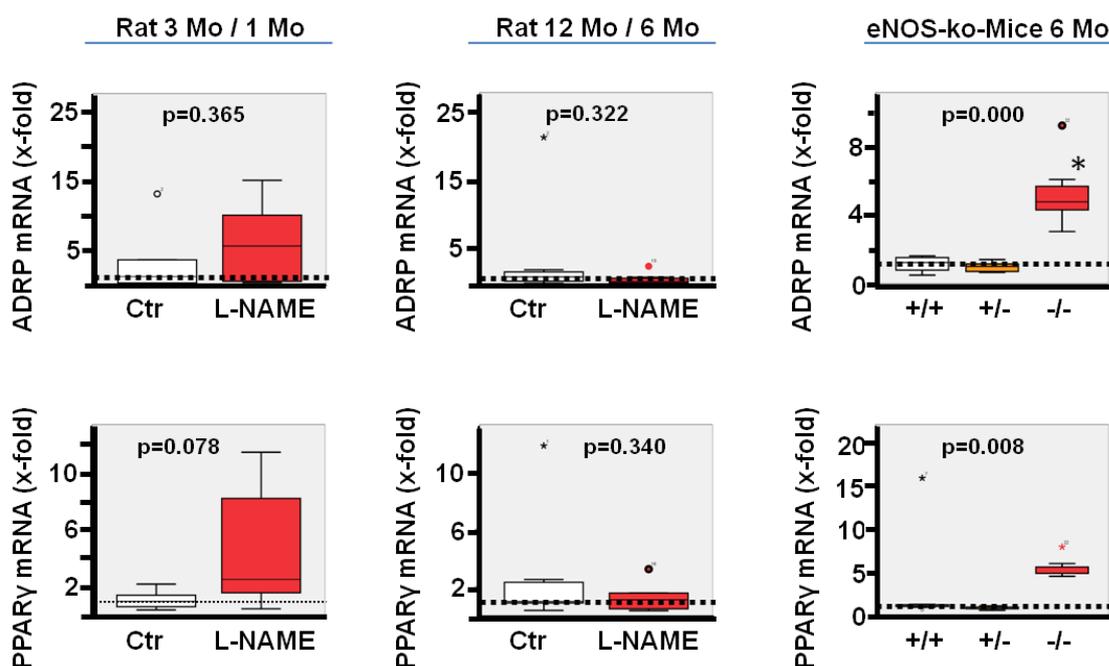


Abb. 4.1b – Einfluss der Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz auf die pulmonale Expression der PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ . * = $p < 0,05$

Bei den Ratten zeigte sich in der 3-Monatsgruppe eine deutliche Induktion der PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ , im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der 12-Monatsgruppe war keine Induktion erkennbar, die mRNA-Niveaus des ADRP und des PPAR γ lagen in vergleichbarer Größenordnung vor, wie in der Kontrollgruppe. In den eNOS-defizienten Mäusen war eine signifikant erhöhte Induktion von ADRP und PPAR γ nachweisbar. In den vergleichbaren Kontrolltieren dieser Versuchsgruppe zeigten sich diese Veränderungen nicht.

Die PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ zeigten eine deutlich erkennbare Induktion der Genexpression, unter dem NO-Synthese hemmenden Einfluss von L-NAME. Die stärkste Steigerung des Expressionsniveaus fand sich auch hier in den Gewebeproben der eNOS-defizienten Mäuse. In dem analysierten Material dieser Versuchstiere lag eine signifikant erhöhte Induktion der Gene ADRP und PPAR γ vor.

Im Rattenkollektiv war eine Induktion auch hier wieder nur in abgeschwächtem Ausmaß erkennbar und zwar beschränkt auf die Gewebeproben der Rattenjungtiere. In den älteren Tieren und den Kontrollgruppen ergaben sich keinerlei entsprechende Veränderungen.

4.1.1.2 Einfluss hämodynamischer Parameter auf die mRNA-Expression des PTHrP-Systems

Um zu ermitteln welchen Einfluss der systemische Blutdruck auf die Genexpression der Marker des pulmonalen PTHrP-Systems ausübte, wurde im Rattenkollektiv eine Versuchsreihe unter der Bedingung einer medikamentösen Blutdruckregulation durchgeführt. Zur Normalisierung der Blutdruckwerte wurden beide L-NAME-Versuchsgruppen aus dem Rattenkollektiv sowohl mit Captopril als auch mit Hydralazin behandelt.

In der 3-Monatsgruppe zeigte sich, dass durch eine Blutdrucknormalisierung in L-NAME-Tieren keine Normalisierung der pulmonalen Expression des PTHrP und des PTH-1-Rezeptors erreicht werden konnte. Ebenso vermochte die medikamentöse Blutdrucksenkung es nicht, die Genexpression der PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ – innerhalb dieser Versuchsgruppe – auf Normwerte zu reduzieren.

In den Gewebeproben der 12-Monatsgruppe ließ sich jedoch eine Normalisierung des pulmonalen Expressionsniveaus für alle hier untersuchten Gene des PTHrP-Systems nachweisen. Sowohl Captopril als auch Hydralazin erreichten hier, durch die Normalisierung des systemischen Blutdrucks, regelhafte Expressionsniveaus für PTHrP und den PTH-1-Rezeptor sowie für ADRP und PPAR γ (siehe Abb. 4.2).

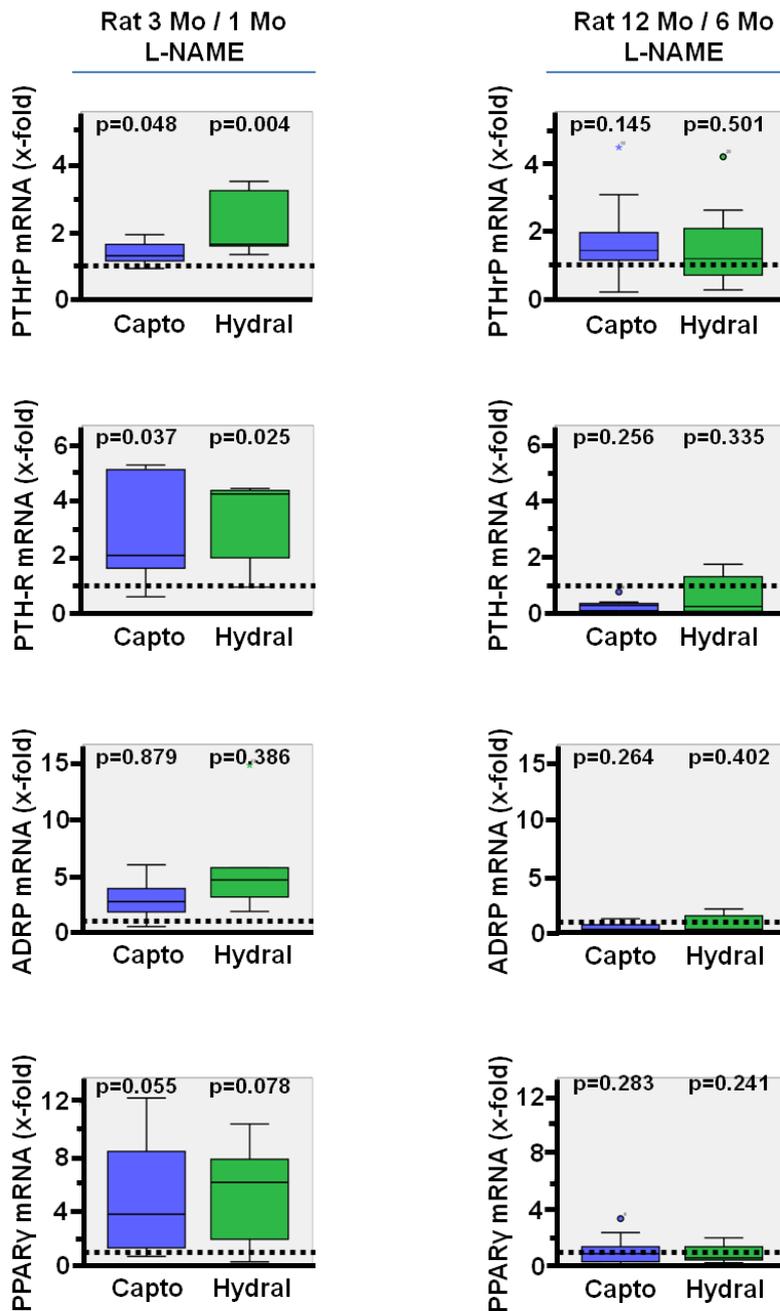


Abb. 4.2 – Einfluss des systemischen Blutdrucks auf die pulmonale Expression des PTHrP und des PTH-1-Rezeptors sowie auf die PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ in L-NAME-Tieren.

Unter medikamentöser Blutdrucknormalisierung mittels Captopril und Hydralazin war zu erkennen, dass in der 3-Monatsgruppe der L-NAME-Ratten, weder Captopril noch Hydralazin eine Normalisierung der pulmonalen Expression des PTHrP oder des PTH-1-Rezeptors erreichen konnten. Ebenso ließ sich die Expression der PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ in den Jungtieren (Alter: 3 Monate) durch die Blutdrucksenkung nicht auf Normwerte reduzieren. In den Tieren der L-NAME-12-Monatsgruppe war jedoch zu beobachten, dass sowohl Captopril als auch Hydralazin in der Lage waren, das pulmonale Expressionsniveau von PTHrP, PTH-1-Rezeptor sowie von ADRP und PPAR γ auf Normwerte zu regulieren.

4.1.1.3 Pulmonale mRNA-Expression der Ornithindecaboxylase (ODC)

Die nachfolgend aufgeführte Graphik (Abb. 4.3) stellt den Einfluss der L-NAME vermittelten Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz und der medikamentösen Blutdruckregulation auf die Genexpression der Ornithindecaboxylase (ODC) gegenüber.

Unter dem Einfluss von L-NAME offenbarte sich, dass ein verminderter Level an Stickstoffmonoxid (NO), in den jungen Ratten der 3-Monatsgruppe, die ODC-Expression signifikant in eNOS-abhängiger Weise induzierte. Dies zeigte sich ferner darin, dass die Induktion am stärksten in den Gewebeproben der eNOS-defizienten Mäuse zu beobachten war. In den Gewebeproben aus Lungen dieser Tiere, ließ sich eine signifikant erhöhte ODC-Expression aufzeigen (Abb. 4.3).

Eine Blutdruckregulation mittels Hydralazin löste bei den Ratten in der Jungtiergruppe ähnliche Effekte auf das pulmonale Expressionsniveau von ODC aus. Wohingegen Captopril keine deutlichen Veränderungen hervorrufen konnte. In älteren Versuchstieren vermochten sowohl NO-Defizienz als auch medikamentöse Blutdruckeinstellung keinerlei relevante Veränderungen des ODC-Expressionsniveaus hervorzurufen.

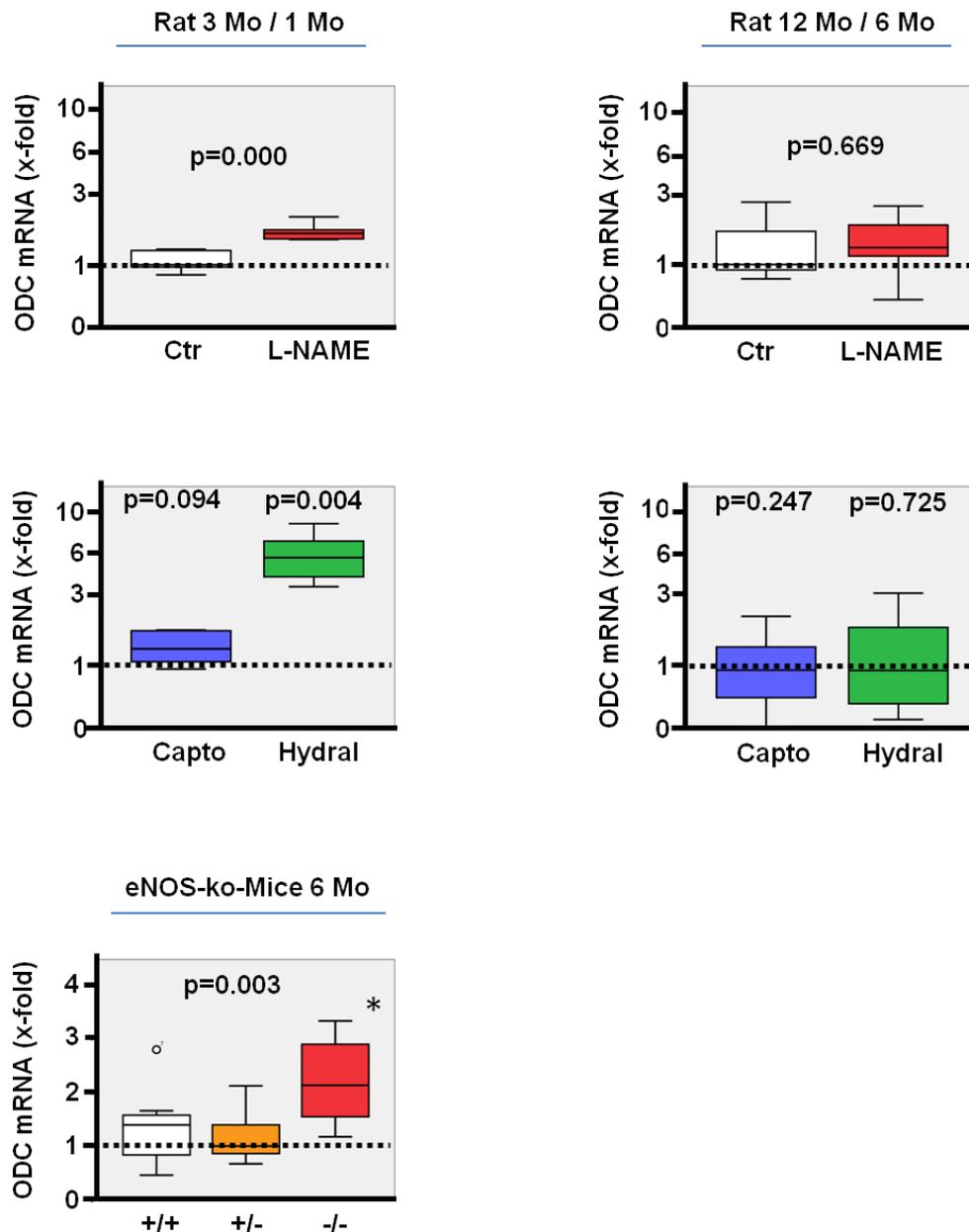


Abb. 4.3 - Effekte von Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz und Blutdruckregulation auf die pulmonale Ornithindecaboxylase-(ODC)-Expression. * = $p < 0,05$

In der Gruppe der Rattenjungtiere zeigte sich bei den mit L-NAME behandelten Tieren eine signifikant erhöhte ODC-Induktion, im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrollgruppe. Unter Blutdruckregulation mittels Hydralazin zeigte sich in der 3-Monatsgruppe ebenfalls eine statistisch relevante Induktion der ODC-Expression, was unter Captoprileinwirkung nicht zu beobachten war. Bei den Versuchstieren aus der Versuchsgruppe der älteren Ratten (Alter: 12 Monate) waren sowohl unter L-NAME-Einfluss als auch unter Blutdruckregulation mittels Captopril und Hydralazin, keinerlei statistisch relevanten Veränderungen der ODC-Induktion nachweisbar. In der Versuchsgruppe der eNOS-defizienten Mäuse konnte für die homozygot eNOS-defizienten Mäuse ebenfalls eine signifikant erhöhte ODC-Induktion nachgewiesen werden.

4.1.2 Pulmonale mRNA-Expression ausgewählter Fibrosemarker

4.1.2.1 Genexpression fibrotischer Markerproteine sowie des Fibrosemediators TGF- β 1

Abgebildet (siehe Abb. 4.4) sind die Auswirkungen der NO-Synthesehemmung – zum einen durch L-NAME und zum anderen durch genetisches Deaktivieren der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) – auf das Expressionsniveau des Fibrosemediators TGF- β 1 sowie der Fibrosemarker Elastin und Collagen-1.

Die Daten repräsentieren zum einen die Ergebnisse aus den Versuchsgruppen unterschiedlichen Alters des Rattenkollektivs und zum anderen die Ergebnisse der eNOS-defizienten Mäuse. Bei den Ratten zeigte sich in der 3-Monatsgruppe, dass eine NO-Defizienz die Expression von Elastin in eNOS-abhängiger Weise beeinflusst.

Am stärksten zeigte sich ein Zusammenhang zwischen NO-Defizienz und pulmonaler Expression eines Fibrosemarkers in den eNOS-defizienten Mäusen. Hier kam es zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der pulmonalen Elastinexpression. Die anderen untersuchten Marker lagen in dieser Versuchsgruppe auf dem Niveau der Vergleichsgruppen.

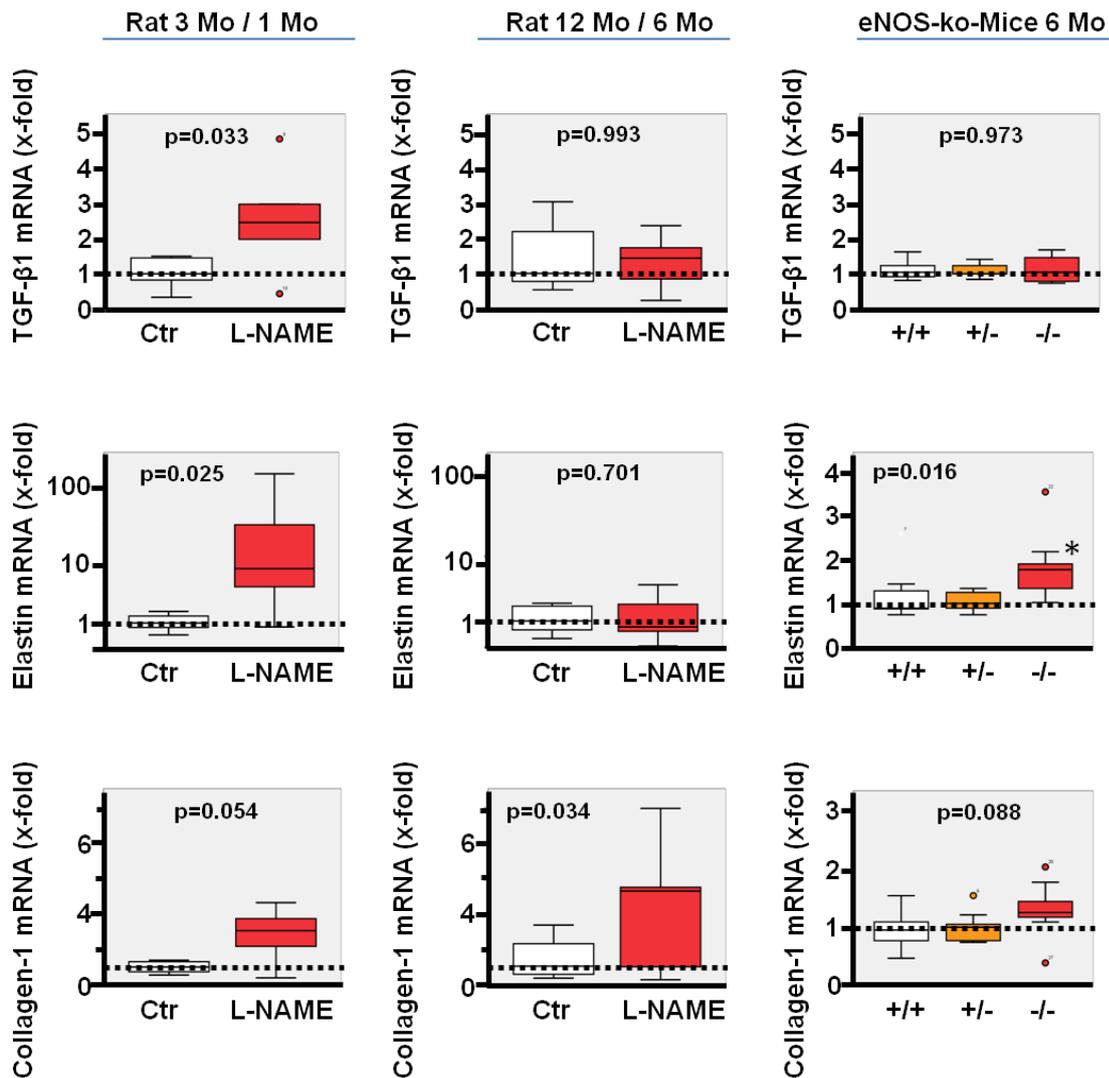


Abb. 4.4 – Einfluss von Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz auf die pulmonale Expression ausgewählter fibrotischer Parameter sowie auf die Expression des Fibrosemediators TGF-β1. * = $p < 0,05$

Im Rattenkollektiv zeigte sich in den L-NAME-Tieren der 3-Monatskohorte ein erhöhtes pulmonales Expressionsniveau des Fibrosemediators TGF-β1 sowie der Fibrosemarker Collagen-1 und Elastin, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für Elastin zeigte sich in diesem Probenmaterial eine besonders deutliche Induktion. In den L-NAME-Tieren der 12-Monatsgruppe zeigte sich nur die Expression von Collagen-1 statistisch relevant erhöht. TGF-β1 und Elastin fanden sich hier auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Bei den eNOS-defizienten Mäusen zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte Expression des Fibrosemarkers Elastin, wohingegen es zu keiner vermehrten Induktion von TGF-β1 und Collagen-1 kam.

4.1.2.2 Hämodynamischer Einfluss auf die Genexpression der Fibrosemarker

Eingangs wurde bereits der Einfluss des systemischen Blutdrucks auf die Expression der Gene des PTHrP-Systems untersucht. Dies wurde in der Folge auch für ausgewählte relevante Fibrosemarker sowie den Fibrosemediator TGF- β 1 nachgeprüft. In der nachfolgend aufgeführten Graphik (Abb. 4.5) sind die entsprechenden, mittels real-time RT-PCR erhobenen, Daten abgebildet.

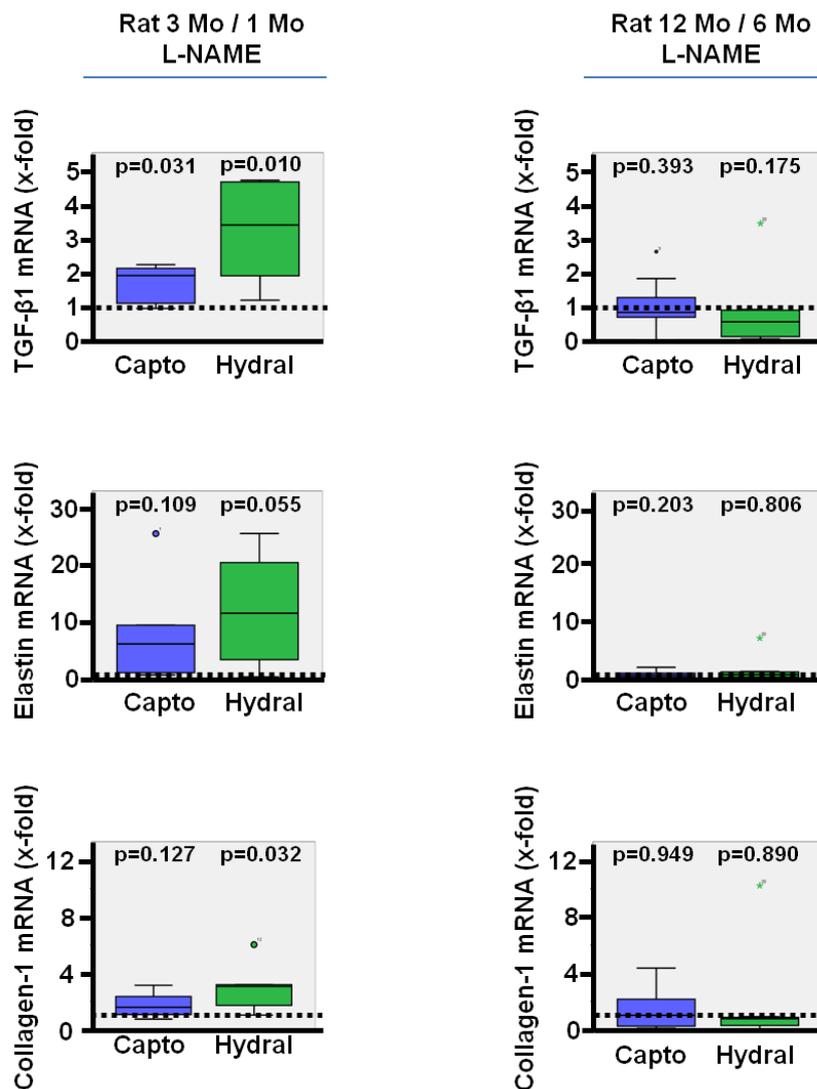


Abb. 4.5 – Effekte der Blutdruckregulation auf die pulmonale Expression ausgewählter fibrotischer Marker und des TGF- β 1 in L-NAME-vorbehandelten Versuchstieren.

In den mit Captopril behandelten Jungtieren der 3-Monatsgruppe war ein deutlich geringeres Expressionsniveau von TGF-1, Elastin und Collagen-1 nachweisbar gewesen, als in den mit Hydralazin behandelten Vergleichstieren. In den älteren Versuchstieren der 12-Monatsgruppe waren diese Effekte nicht nachweisbar. Hier zeigte sich für Captopril kein stärkerer Reduktionseffekt des Expressionsniveaus der untersuchten Gene (TGF- β 1, Elastin und Collagen-1), im Vergleich mit der Wirkung des Hydralazins auf die Expression dieser Gene.

Die Einstellung des systemischen Blutdruckes erfolgte, in den unterschiedlich alten und mit L-NAME-vorbehandelten Versuchsgruppen des Rattenkollektivs, einerseits mittels Captopril sowie andererseits mittels Hydralazin. Dabei zeigte sich, dass in der L-NAME 3-Monatsgruppe eine Blutdrucksenkung mittels des ACE-Hemmers Captopril einen stärkeren Einfluss auf die pulmonale Expression fibrotischer Marker ausübt, als die reine Blutdrucksenkung vermittelt durch den direkten Vasodilatator Hydralazin.

In der 12-Monatsgruppe konnte nicht nachgewiesen werden, dass eine Blutdrucksenkung mittels Captopril einen stärkeren Effekt auf die Verminderung des Expressionsniveaus der untersuchten Gene ausüben konnte. Für beide medikamentösen Blutdrucksenker zeigten sich in den untersuchten Gewebeproben grundsätzlich vergleichbare mRNA-Expressions-Niveaus der hier ausgewählten Gene.

4.1.3 Genexpression der Enzyme des oxidativen Stresses im Lungengewebe

4.1.3.1 mRNA-Expression der Marker des oxidativen Stresses

Beim Vergleich der mit L-NAME-vorbehandelten Versuchstiere aus dem Rattenkollektiv untereinander, zeigte sich, besonders in den Jungtieren der 3-Monatsgruppe, dass eine akute Hemmung der Stickstoffmonoxid-(NO)-Synthese durch L-NAME, zu einer Heraufregulation der drei NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX2, p47phox und p67phox führte. Die Vorbehandlung mit L-NAME induzierte eine Zunahme des oxidativen Stresslevels. Diese wurde vermittelt durch die Heraufregulation der NADPH-Oxidase und ihrer Untereinheiten, welche im Allgemeinen als Marker des oxidativen Stresses fungieren. Im Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe, war dieser Effekt zum Teil auch in Gewebeproben der älteren Tiere aus der 12-Monatsgruppe nachweisbar. Verglichen aber mit dem Niveau der Genexpression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten in den Lungen der Jungtiere, lag die Genexpression insgesamt auf einem geringeren Niveau. Dies zeigte sich besonders für die Untereinheit p67phox. In diesem speziellen Fall lag das Expressionsniveau nochmals unterhalb des Niveaus der anderen analysierten Untereinheiten (siehe Abb. 4.6).

Bei der Behandlung der Jungtiere mit Captopril und Hydralazin zeigte sich insgesamt, dass eine medikamentöse Blutdrucksenkung kaum Einfluss auf die Expression der oxidativen Marker ausüben konnte. So zeigten sich Nox-2 und p47phox weitgehend unverändert. Einzig der mRNA-Gehalt für p67phox konnte durch die Applikation von Captopril signifikant reduziert werden.

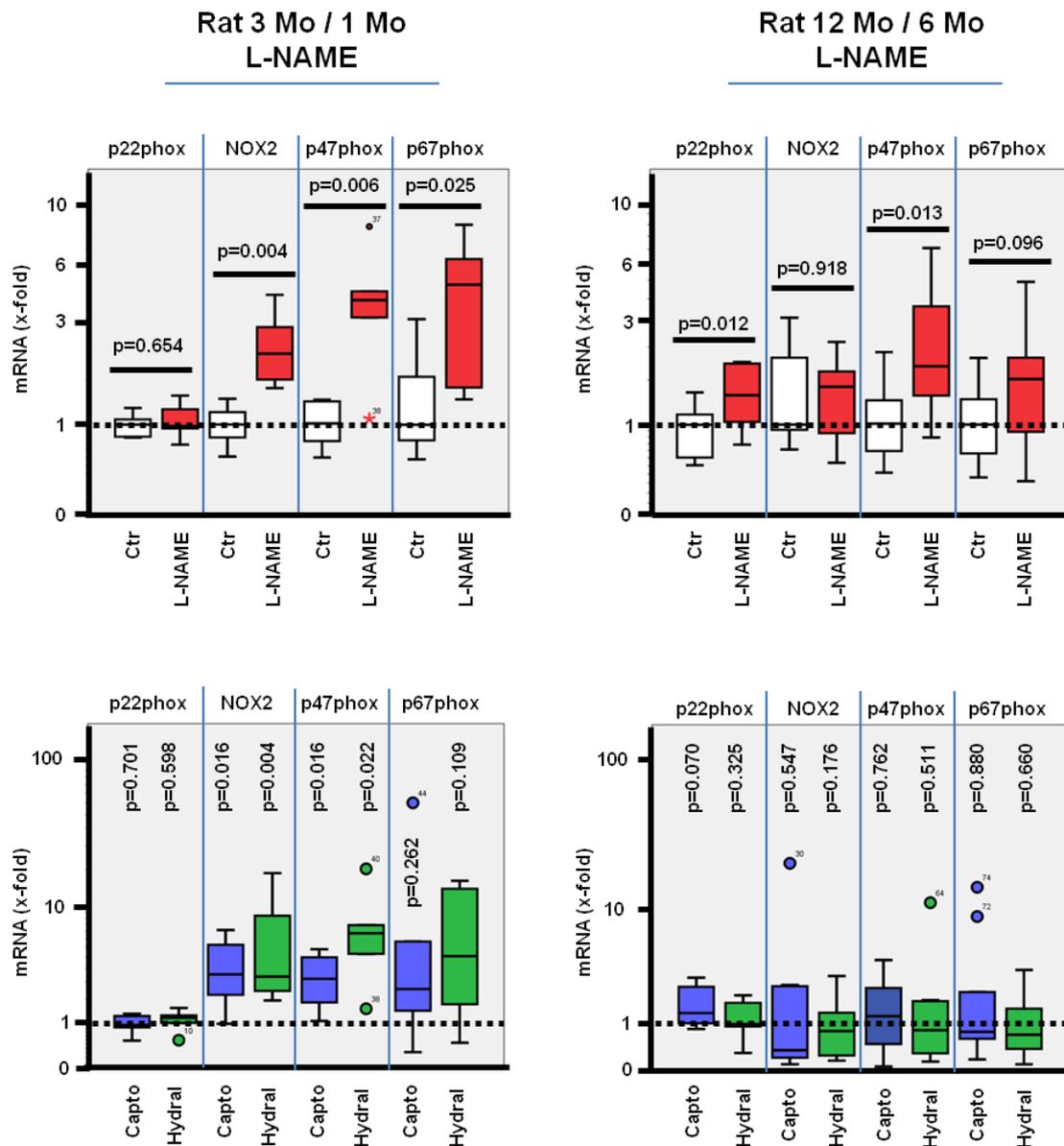


Abb. 4.6 – Zusammenhang zwischen L-NAME-vermittelter NO-Synthesehemmung und gemessener mRNA-Menge der einzelnen NADPH-Oxidase-Untereinheiten, als Marker des oxidativen Stresses. * = $p < 0,05$

Im Lungengewebe der Ratten (Jungtiere) fanden sich – in L-NAME-Tieren – deutlich höhere mRNA-Werte der NADPH-Oxidase-Untereinheiten p47phox und p67phox sowie signifikant erhöhte mRNA-Werte der Untereinheit NOX2, im Vergleich zur untersuchten Kontrollgruppe. Bei den Altieren (Ratten) lagen die – in L-NAME-Tieren – gemessenen mRNA-Werte der Untereinheiten p22phox, p47phox und p67phox ebenfalls über dem Niveau der Kontrollgruppe. Allerdings lagen die gefundenen Erhöhungen insgesamt in geringerem Ausmaß vor, als in den Tieren der 3-Monatsgruppe. In der 3-Monatsgruppe hatte die zusätzliche Behandlung mit Blutdrucksenkern nur für die Expression von p67phox einen nennenswerten Einfluss. Unter Captoprilapplikation wurde der mRNA-Gehalt von p67phox signifikant verringert.

4.1.3.2 Genexpression der Detoxifikationsenzyme des oxidativen Stresses

In der folgenden Graphik (Abb. 4.7) werden ebenfalls Daten vorgestellt, die beim Vergleich von Gewebeproben aus den verschiedenen Altersgruppen der L-NAME-Tiere des Rattenkollektivs entstanden sind. Darüber hinaus wurden zusätzlich Gewebeproben aus Lungen der eNOS-knockout Mäuse analysiert.

Untersucht wurde das mRNA-Expressionsniveau relevanter Detoxifikationsenzyme des oxidativen Stresses, unter L-NAME induziertem oxidativen Stress. Die hierbei untersuchten Enzyme gehören zur Gruppe der Superoxiddismutasen. In einem weiteren Untersuchungsschritt wurde dann noch geprüft, welchen Einfluss der systemische Blutdruck auf die Genexpression der erwähnten Enzymklasse hat. Auch in diesem Fall erfolgte die Regulation des Blutdruckes – wie schon zuvor – durch Applikation von Captopril und Hydralazin.

In den mit L-NAME behandelten Tieren, zeigte sich – vor allem in den Jungtieren – eine starke Zunahme der mRNA-Expression der Detoxifikationsenzyme SOD-1, SOD-2 und SOD-3. Diese gesteigerte Expression der pulmonalen Superoxiddismutasen war in gleicher Weise in den Gewebeproben der eNOS-knockout Mäuse zu erkennen.

Eine Normalisierung des Expressionsniveaus mittels Blutdrucksenkung war in den Jungtieren nur partiell möglich, genauer gesagt nur für die Enzyme SOD-1 und SOD-3. Aus der Analyse der Gewebeproben der älteren Versuchstiere der 12-Monatsgruppe war erkennbar, dass die mRNA-Bildung nur für die SOD-2 blutdruckabhängig reguliert wurde. Für die Enzyme SOD-1 und SOD-3 galt, dass die Blutdrucksenkung – in der älteren Versuchsgruppe – keine normalisierende Wirkung auf die Enzymexpression ausüben konnte.

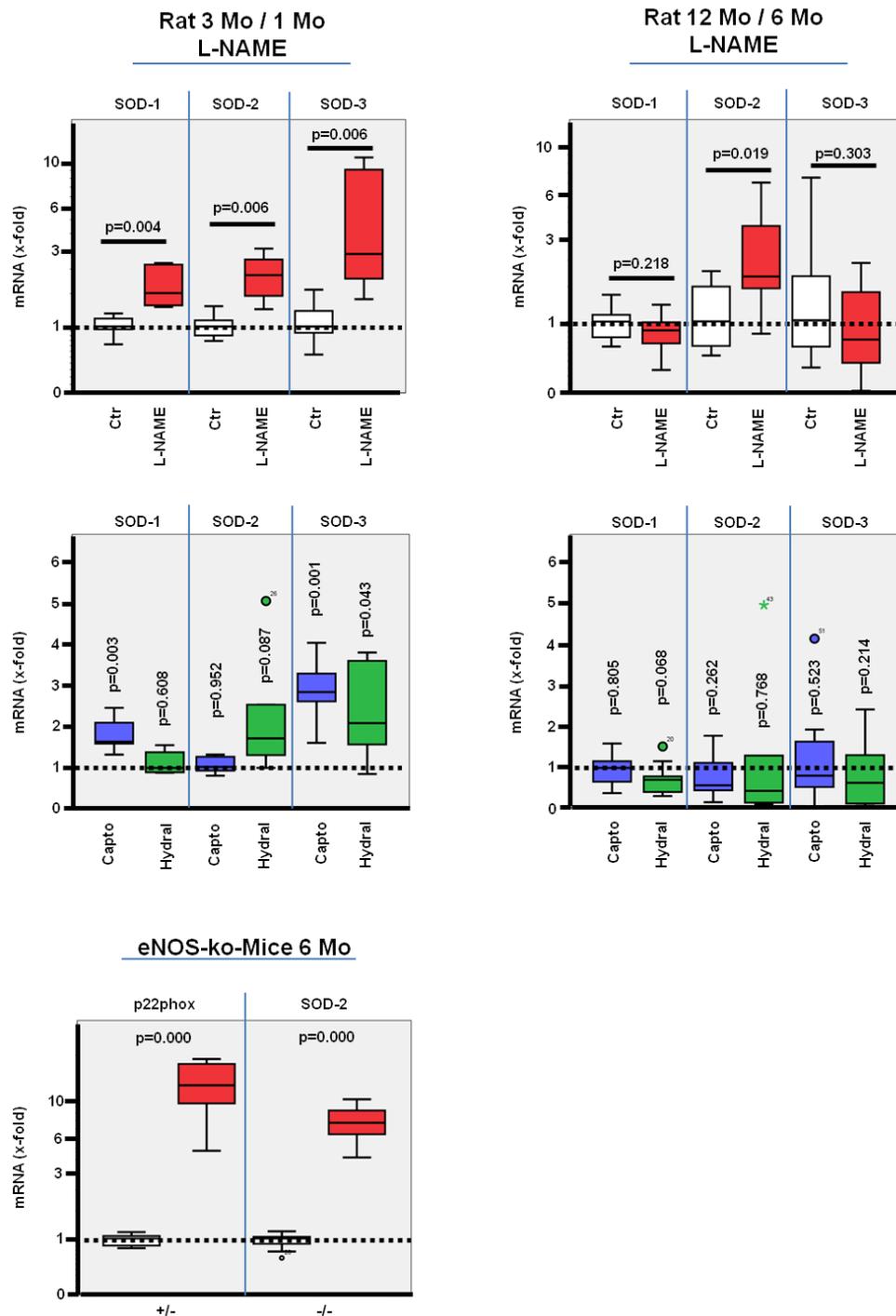


Abb. 4.7 – Zusammenhang zwischen L-NAME-verursachtem oxidativem Stress und dem Expressionsniveau der oxidativen Detoxifikationsenzyme SOD-1, SOD-2 und SOD-3.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Jungtiere eine statistisch relevante mRNA-Zunahme der Enzyme SOD-1, SOD-2 und SOD-3. In älteren Versuchstieren lag die Expression von SOD-1 und SOD-3 auf dem Niveau der vergleichbaren Kontrollgruppe. In der 12-Monatsgruppe (L-NAME) lag die Expression des Detoxifikationsenzym SOD-2 über dem Niveau der gleichaltrigen Kontrollgruppe. In der Gruppe der eNOS-defizienten Mäuse zeigten die Ergebnisse ebenfalls eine gesteigerte pulmonale SOD- und p22phox-Expression. Unter Blutdruckeinstellung mittels Captopril und Hydralazin zeigte sich bei den L-NAME-Tieren, in der 3-Monatsgruppe, eine Normalisierung des Expressionsniveaus nur für die Enzyme SOD-1 und SOD-3; in der 12-Monatsgruppe nur für das Detoxifikationsenzym SOD-2.

4.1.4 Einfluss von Tempol und L-NAME auf die Genexpression oxidativer und antioxidativer Marker im Lungengewebe

Die Abbildung 4.8 zeigt die Ergebnisse der untersuchten Effekte des SOD-Mimetikums Tempol und des Stickstoffmonoxid-(NO)-Synthase-Inhibitors L-NAME auf die pulmonale Expression der untersuchten relevanten Marker und Enzyme aus dem Regelkreis des oxidativen Stresses.

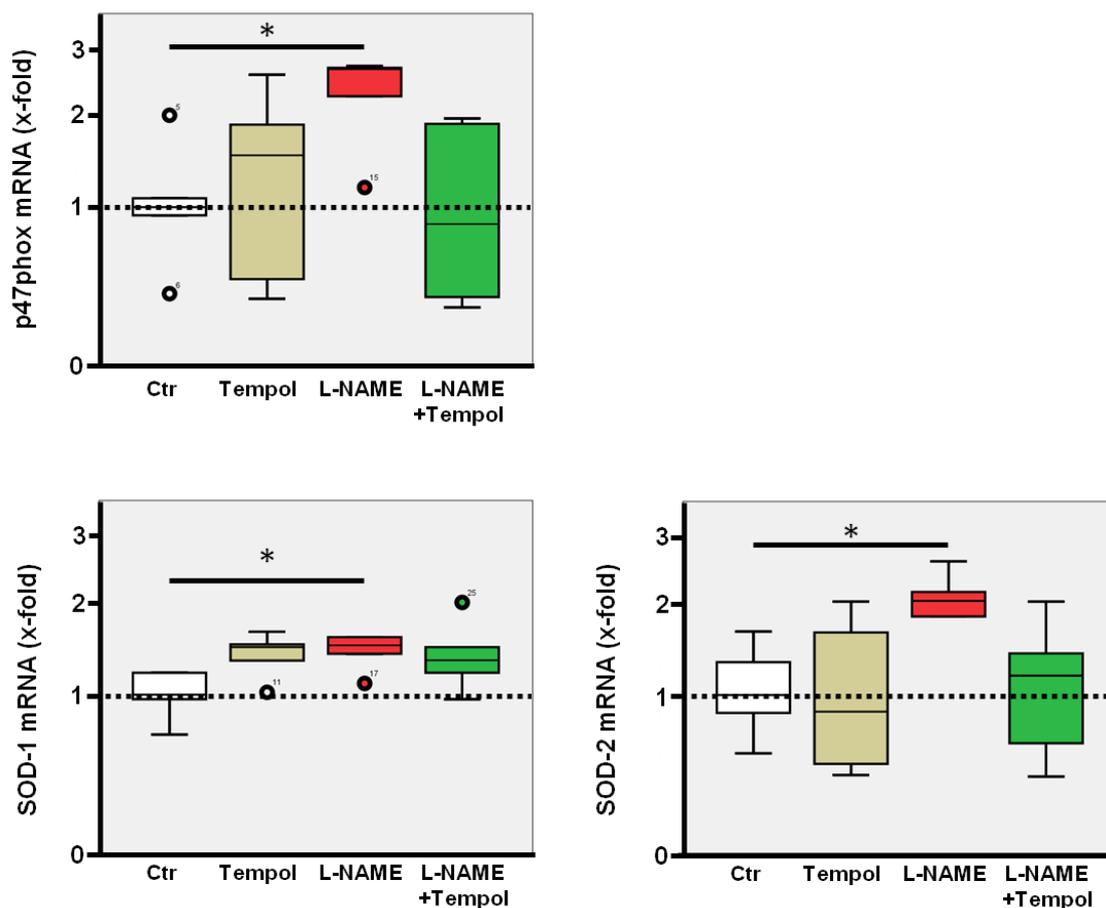


Abb. 4.8 – Auswirkungen von Tempol und L-NAME auf die Induktion von Enzymen des oxidativen Stresses und der korrespondierenden Detoxifikationsenzyme des oxidativen Stresses. * = $p < 0,05$

In den Gewebeproben der Versuchstiere aus dem Rattenkollektiv zeigte sich in den L-NAME-Gruppen – verglichen mit den Kontrollgruppen – eine deutliche Induktion der NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox und eine deutliche Induktion der Detoxifikationsenzyme SOD-1 und SOD-2. Gewebeproben solcher Tiere, welche mit dem SOD-Mimetikum Tempol behandelt wurden, zeichneten sich durch eine signifikante Senkung des mRNA-Expressionsniveaus der NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox, sowie des Expressionsniveaus der Superoxiddismutasen 1 und 2 aus. Dieser Tempol-bedingte Effekt ließ sich auch in den analysierten Gewebeproben der L-NAME+Tempol-Gruppe nachweisen.

Aus den dargestellten Daten wird deutlich, dass es unter L-NAME-Einwirkung zu einer Zunahme des oxidativen Stresses kam. Dies zeigte sich in einer Induktion der NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox sowie in einer Induktion der Superoxiddismutasen 1 und 2 (SOD-1 und SOD-2). Die vorliegende mRNA-Menge dieser Marker – als Zeichen des oxidativen Stresses – war in der L-NAME-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Das SOD-Mimetikum Tempol, welches die Detoxifikation von oxidativem Stress katalysiert, war in der Lage die Induktion von p47phox, SOD-1 und SOD-2 zu beeinflussen, und zu einer signifikanten Senkung der mRNA-Expression dieser Marker zu führen.

Diese Tempol-vermittelten Effekte zeigten sich ebenso in Gewebeproben solcher Versuchstiere, die zusätzlich mit dem NO-Synthese-Inhibitor L-NAME behandelt worden waren.

Ebenfalls untersucht wurden die Effekte des SOD-Mimetikums Tempol auf das Expressionsniveau der übrigen pulmonalen Marker unter L-NAME-vermittelter Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz. Die Gewebeproben stammten dabei auch aus Lungenpräparaten des Rattenkollektivs. Die Ergebnisse aus diesen Analysen sind in der Graphik Abb. 4.9 wiedergegeben.

Abbildung 4.9 zeigt, dass es unter dem SOD-mimetischen Einfluss von Tempol, in Gewebeproben der L-NAME+Tempol-Gruppe, zu einer signifikanten Verringerung des pulmonalen mRNA-Expressionsniveaus des PTH-1-Rezeptors sowie des Fibrosemediators TGF- β 1 und des Fibrosemarkers Collagen-1 kam. Die mRNA-Expression in der reinen L-NAME-Vergleichsgruppe lag auf einem höheren Niveau.

Für die übrigen untersuchten pulmonalen Marker (PTHrP, Elastin und ODC) konnten vergleichbare Tempol-induzierte Effekte in diesem Ausmaß nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.9).

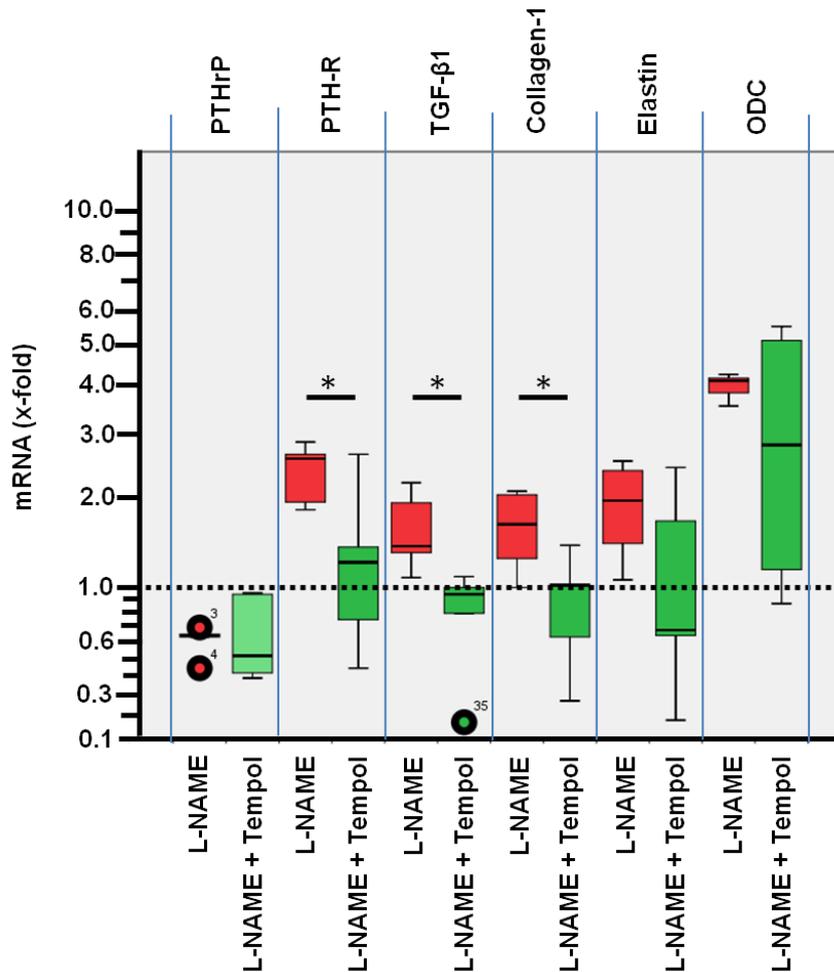


Abb. 4.9 – Effekte des SOD-Mimetikums Tempol auf das Expressionsniveau der untersuchten pulmonalen Marker unter L-NAME-vermittelter Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz. * = $p < 0,05$

Die PCR-Untersuchungen, der mit L-NAME behandelten Tiere aus dem Rattenkollektiv, zeigten insgesamt deutlich erhöhte pulmonale Expressionsniveaus des PTH-1-Rezeptors, des Fibrosemediators TGF-β1, und der Fibrosemarker Collagen-1 und Elastin sowie des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms des Polyaminstoffwechsels ODC. In der L-NAME+Tempol-Gruppe zeigte sich, unter dem Einfluss von Tempol, eine signifikante Verringerung des mRNA-Expressionsniveaus des PTH-1-Rezeptors sowie des Fibrosemediators TGF-β1 und des Fibrosemarkers Collagen-1, im Vergleich zur reinen L-NAME-Gruppe. Das Expressionsniveau der ebenfalls untersuchten Marker PTHrP, Elastin und ODC konnte unter Tempolwirkung nachweislich nicht signifikant gesenkt werden.

4.1.5 Einfluss des Tieralters auf die Genexpression der untersuchten Marker

Beim direkten Vergleich der Ratten-Versuchstiere aus der jungen (Alter: 3 Monate) und der alten (Alter: 12 Monate) Kontrollgruppe miteinander, zeigte sich, dass es nur in der 12-Monats-Kontrollgruppe zu ähnlichen Veränderungen des pulmonalen Expressionsniveaus der untersuchten Marker kam, wie unter dem Einfluss L-NAME-vermittelter NO-Defizienz in den Jungtieren der L-NAME-Gruppe (siehe Abb. 4.7 - Zusammenhang zwischen L-NAME-verursachtem oxidativem Stress und des Expressionsniveaus der Detoxifikationsenzyme für oxidativen Stress SOD-1, SOD-2 und SOD-3.). Die gezeigten Veränderungen entsprechen dabei weitestgehend den Veränderungen, welche unter L-NAME-vermittelter Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz in der L-NAME-3-Monatsgruppe nachgewiesen werden konnten.

Im Gegensatz dazu, war für das PTHrP-System, mit seinem korrespondierenden PTH-1-Rezeptor und den PTHrP-abhängig regulierten Genen ADRP und PPAR γ , keine altersbedingte Heraufregulation des pulmonalen Expressionsniveaus, in den untersuchten Gewebeproben, erkennbar.

Dargestellt ist eine, am ehesten altersbedingte, signifikante Veränderung des Expressionsniveaus für die untersuchten Marker SOD-2, Elastin und insbesondere für ODC im Probenmaterial der Versuchstiere aus der 12-Monats-Kontrollgruppe (Abb. 4.10).

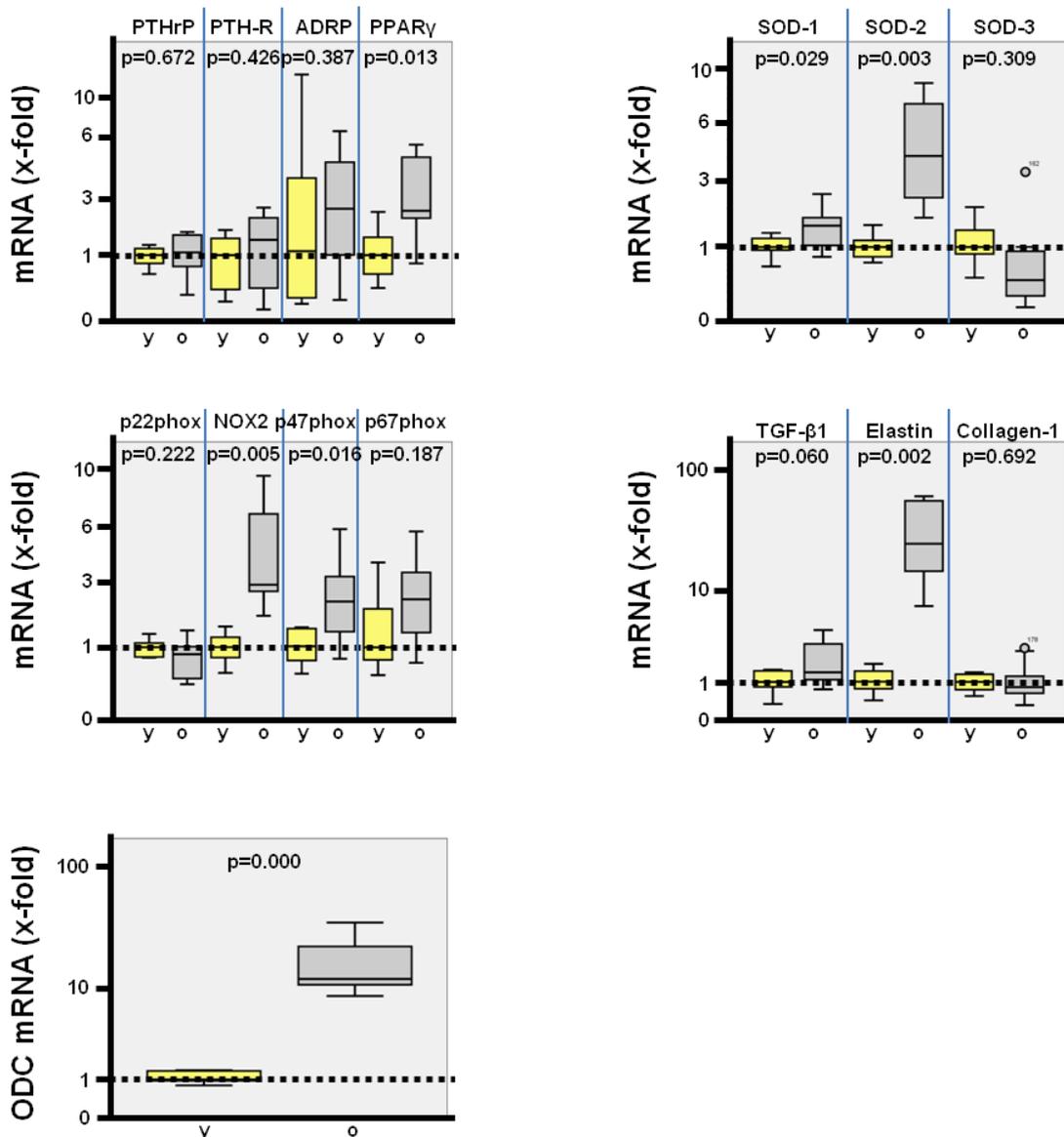


Abb. 4.10 – Zusammenhang zwischen dem Alter der Versuchstiere und dem pulmonalen Expressionsniveau der untersuchten Marker in den Kontrollgruppen des Rattenkollektivs [Jungtiere (= young) vs. Alttiere (= old)].

Bei der Analyse der Daten aus den real-time RT-PCR-Versuchen zeigte sich, in dem untersuchten Gewebe der Ratten aus der 12-Monats-Kontrollgruppe, eine signifikante Heraufregulation des Expressionsniveaus der Marker SOD-2, des Fibrosemarkers Elastin und besonders deutlich für ODC. In den vergleichbaren Jungtieren konnte eine solche Heraufregulation dieser Marker nicht nachgewiesen werden. Für die übrigen untersuchten Marker PTHrP, PTH-1-Rezeptor, ADRP und PPAR γ waren keine statistisch relevanten Unterschiede des pulmonalen Expressionsniveaus in den unterschiedlichen Altersgruppen beobachtbar gewesen.

4.2 Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen

Mittels real-time RT-Polymerasekettenreaktion wurden die unter 4.1 beschriebenen Veränderungen der pulmonalen Genexpression auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Nachdem diese Daten erhoben und ausgewertet worden waren, galt es aufzuzeigen, inwiefern die Veränderungen der Genexpression, sich auch in einer Veränderung der Proteinexpression auf zellulärer Ebene, in den untersuchten Gewebeproben widerspiegeln. Dazu wurden relevante Marker ausgewählt und hinsichtlich ihrer Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Von besonderer Bedeutung war dabei zum einen die Ornithindecaboxylase (ODC), als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym des Polyaminstoffwechsels – folglich stellvertretend für Zellwachstum und Zellproliferation – und zum anderen PTHrP sowie dessen korrespondierender PTH-1-Rezeptor, als Marker für physiologische Lungenentwicklung und alveoläre Homöostase.

Der Nachweis einer aussagekräftigen Proteinexpression erfolgte mittels Actin, da sich dieses Protein ubiquitär in allen Gewebeproben nachweisen ließ.

Bei dem hier untersuchten Probenmaterial handelte es sich, wie im Vorfeld auch, um Lungengewebe. Unter 2.1 wurde bereits erläutert woher die entsprechenden Gewebeproben stammten. Ein Teil dieses Probenmaterials wurde bereits – wie unter 3.4.1. beschrieben – für die real-time RT-PCR-Untersuchungen verwendet. Für die Western Blot-Analysen wurde nur solches Probenmaterial berücksichtigt, welches zuvor noch an keiner anderen Stelle zum Einsatz gekommen war (siehe auch 3.4.1. RNA-Isolierung aus Lungengewebe).

4.2.1 Proteinexpression von PTHrP und PTH-1-Rezeptor in Lungengewebe

Mittels Western Blot-Analyse wurde die PTHrP- und PTH-1-Rezeptor-Proteinexpression in den unterschiedlichen Versuchsgruppen des Rattenkollektives – unter dem Einfluss des NO-Synthese-Inhibitors L-NAME – erfasst.

Die zugehörigen Western Blot-Banden sowie die Daten der quantitativen Auswertung sind in Abbildung 4.11 dargestellt.

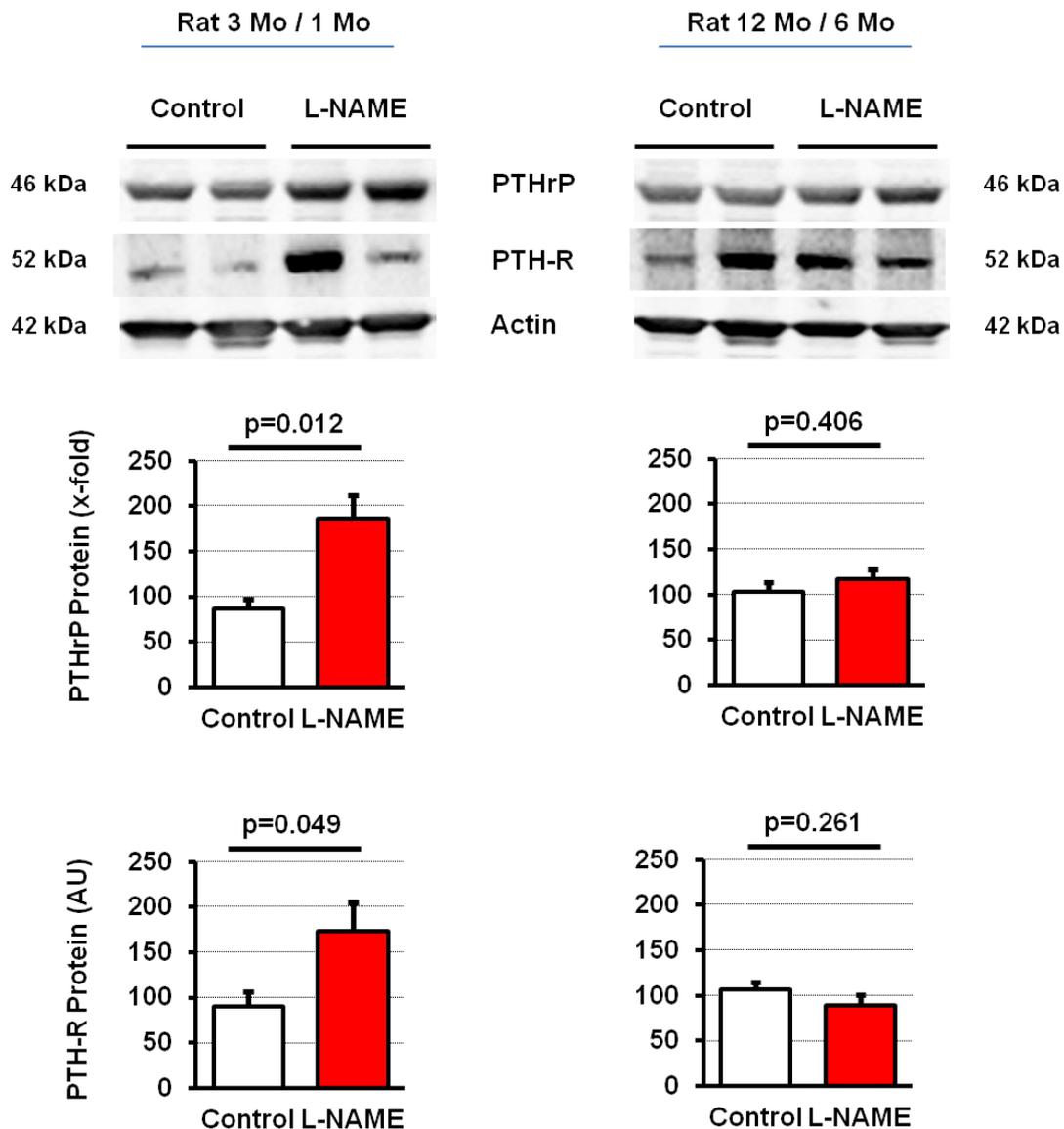


Abb. 4.11 – Western Blot-Banden und quantitative Daten der PTHrP- und PTH-1-Rezeptor-Proteinexpression unter dem Einfluss von L-NAME.

Untersucht wurde die Proteinexpression von PTHrP und des korrespondierenden PTH-1-Rezeptors in den unterschiedlichen Altersgruppen des Rattenkollektivs. Dargestellt sind die Ergebnisse der Kontrollgruppen und der mit L-NAME behandelten Gruppen. Unter dem Einfluss von L-NAME zeigten sich in den Jungtieren der 3-Monatsgruppe deutlich erhöhte Werte der PTHrP- und PTH-1-Rezeptor-Proteinexpression. In der 12-Monatsgruppe entsprach das Ausmaß der Proteinexpression der untersuchten Marker (PTHrP und PTH-1-Rezeptor) in den L-NAME-Tieren, dem in der Kontrollgruppe.

Wie den dargestellten Banden entnehmbar ist, offenbarte sich in den Gewebeproben der Jungtierkohorte eine deutlich erhöhte PTHrP- und PTH-1-Rezeptor-Proteinexpression. Die, unter dem Einfluss von L-NAME, erhobenen quantitativen

Werte in der 3-Monatsgruppe lagen zum einen deutlich über den Werten der Kontrollgruppe und zum anderen auch deutlich über den Werten der 12-Monatsgruppe. In der Gruppe der älteren Versuchstiere hingegen, zeigte sich unter dem Einfluss von L-NAME keine maßgebliche Veränderung der PTHrP- und PTH-1-Rezeptor-Proteinexpression, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Insgesamt war in dieser Altersgruppe das Niveau der Proteinexpression deutlich geringer als in der Gruppe der jüngeren Tiere.

4.2.2 Pulmonale Proteinexpression der Ornithindecaboxylase (ODC)

Zur Darstellung der altersspezifischen Ornithindecaboxylase-Proteinexpression auf zellulärer Ebene, wurden die Gewebeproben der Ratten-Kontrollgruppen anhand des Versuchstieralters aufgeteilt – teils in eine Jungtiergruppe (young), teils in eine Alttiergruppe (old) – und anschließend mittels Western Blot-Verfahren untersucht.

Die Graphik 4.12a stellt die entsprechenden Western Blot-Banden für beide Altersgruppen vergleichend dar. In der nachfolgend aufgeführten Graphik 4.12b findet sich die zugehörige quantitative Auswertung dieser Banden.

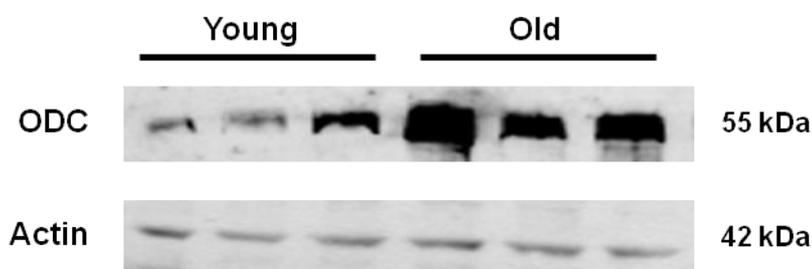


Abb. 4.12a – Nachweis der altersspezifischen ODC-Proteinbiosynthese in den Kontrollgruppen des Rattenkollektivs mittels Western Blot-Verfahren.

Dargestellt sind die Western Blot-Banden der ODC-Proteinexpression in Gewebeproben aus unterschiedlich alten Versuchsgruppen des Rattenkollektivs. Die Tiere entstammten allesamt den Kontrollgruppen und waren hinsichtlich ihres Alters in eine Jungtiergruppe (young) und eine Alttiergruppe (old) eingeteilt worden. Als Referenzprotein diente Actin. Es zeigte sich eine deutlich gesteigerte ODC-Proteinexpression in der 12-Monatsgruppe (old) im Vergleich zur 3-Monatsgruppe (young).

Die Western Blot-Banden zeigten eine deutlich gesteigerte pulmonale ODC-Proteinexpression in den Gewebeproben der untersuchten Versuchstiere aus der Alttiergruppe (old). Die quantitative Auswertung ergab, dass die – mittels real-time RT-PCR – für die ODC-mRNA nachgewiesene Induktion im Lungengewebe der älteren Versuchstiere, auch auf Proteinebene nachweisbar war. Insgesamt war die ODC-Proteinexpression in den Gewebeproben der Versuchstiere aus der älteren Kohorte signifikant gesteigert. Die Expression war um den Faktor 1,3 erhöht. Damit lag die, mittels Western Blot, nachgewiesene ODC-Proteinexpression auf zellulärer Ebene etwas abgeschwächt vor, im Vergleich zum Niveau der ODC-Genexpression auf molekularer Ebene.

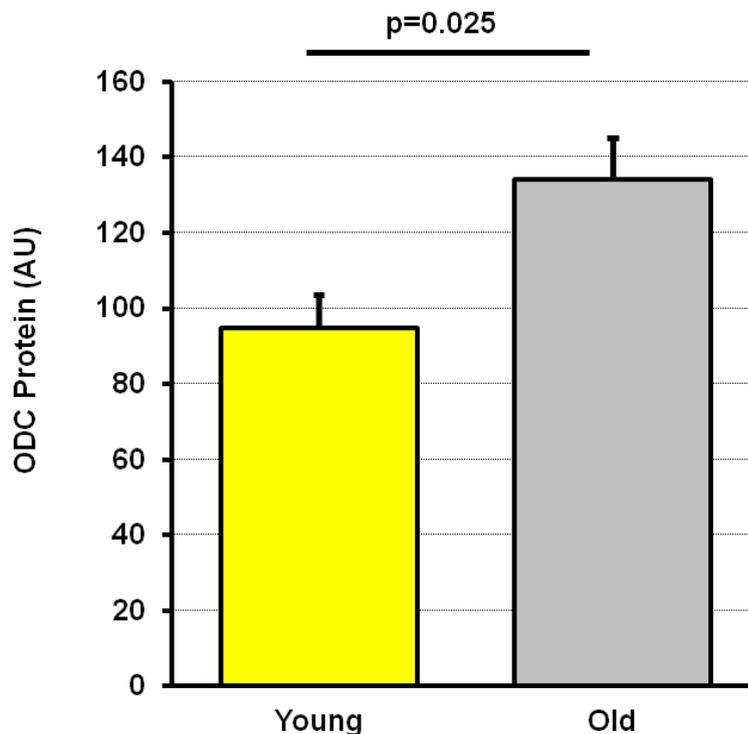


Abb. 4.12b – Nachweis der ODC-Proteinbiosynthese mittels Western Blot und Vergleich der erhobenen altersspezifischen Werte in den Kontrollgruppen des Rattenkollektivs.

Dargestellt sind die Daten der quantitativen Auswertung der ODC-Proteinexpression. Verglichen wurden Gewebeproben der Kontrollgruppen aus dem Rattenkollektiv. Untersucht wurde das Ausmaß der ODC-Proteinbiosynthese in den unterschiedlichen Altersgruppen dieser Tiere. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ODC-Expression auf Proteinebene – um den Faktor 1,3 – in der 12-Monatsgruppe (old) im Vergleich zur 3-Monatsgruppe (young).

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, welche Effekte ein induziertes NO-Defizit zum einen auf strukturelle Bestandteile des Lungengewebes sowie zum anderen auf den pulmonalen Level an oxidativem Stress vermittelt. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit zu transkriptioneller Veränderung in der Lunge führt. Darüber hinaus wurde analysiert in welchem Ausmaß diese Prozesse durch den in höheren Konzentrationen vorliegenden oxidativen Stress begünstigt werden. Zur Klärung der Frage, in welchem Maße das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) Einfluss auf diese Prozesse ausübt, erfolgten zusätzlich Versuchsreihen unter medikamentöser Therapie mittels des ACE-Hemmers Captopril. Im Zuge dieser Untersuchungen bedienten wir uns: i) des Modells des L-NAME-induzierten Hypertonus sowie ii) eines Versuchsaufbaus, welcher eine Serie transgener eNOS-defizienter Mäuse (sog. knockout-Mäuse) berücksichtigte.

In diesem Zusammenhang wurde mittels der hier vorgestellten Studie vor allem nachgewiesen, dass ein eNOS-abhängiges NO-Defizit unmittelbar die pulmonale Expression des Parathyroid hormone-related Protein (PTHrP) sowie des PTH-1-Rezeptors erhöht. Dadurch konnte diese Studie eNOS-abhängig entstandenes Stickstoffmonoxid (NO) als endogenen Inhibitor des pulmonalen PTHrP-Systems identifizieren. Darüber hinaus gelang indirekt auch der Nachweis, dass NO als Inhibitor der pulmonalen Surfactantproduktion fungiert, indem es direkt einen inhibitorischen Einfluss auf die pulmonale Expression von ADRP und PPAR γ ausübt. Da es sich bei beiden um Targetproteine des PTHrP handelt, unterstreicht dieser Befund nachhaltig die Rolle des Stickstoffmonoxids (NO) für die Expression und Aktivität des PTHrP. Wir konnten des Weiteren beweisen, dass L-NAME – via Aktivierung des RAAS – i) die Expression profibrotischer Proteine in der Lunge begünstigt sowie ii) molekulare Marker des oxidativen Stresses induziert.

Im Folgenden sollen nun die zugrunde liegenden Modelle sowie die einzelnen Ergebnisse kritisch beleuchtet und diskutiert werden.

5.1 Das Modell des L-NAME-induzierten Hypertonus und die Rolle der eNOS-defizienten Mäuse

Das Modell des L-NAME-induzierten Hypertonus ist in der experimentellen Kreislauforschung aus zahlreichen Versuchsreihen hinlänglich bekannt (5, 187, 206). Diesbezüglich hat es sich vielfach als sehr verlässlich erwiesen, um die Rolle und Bedeutung des Stickstoffmonoxids (NO) hinsichtlich Ätiologie und Genese kardiovaskulärer Krankheitsbilder zu erforschen. Wie in diesem Zusammenhang aus Studien von Baylis et al. hervorgeht, verursacht die akute Hemmung der endogenen NO-Synthese durch Applikation von L-Arginin-Analoga – wie z.B. N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) – bei Ratten einen deutlichen Anstieg des systemischen Blutdrucks (17). Dies deckt sich weitestgehend mit unseren Beobachtungen. So ergaben die Ergebnisse der Blutdruckmessungen, dass die Behandlung mit L-NAME zu einer signifikanten Erhöhung des systolischen Blutdrucks der Versuchstiere führt. Hierbei zeigt sich, dass sich L-NAME-vermittelte Blutdruckeffekte – unabhängig vom Versuchstieralter – grundsätzlich sowohl in Jung- als auch in Alttieren manifestieren, wobei sich Hinweise finden lassen, dass der Ausprägungsgrad dieser Effekte durchaus altersabhängig ist. Des Weiteren fällt auf, dass die durch L-NAME-induzierte signifikante Erhöhung des systolischen Blutdrucks, weder durch eine zusätzliche Therapie der entsprechenden Versuchstiere mit dem ACE-Hemmer Captopril noch durch den Vasodilatator Hydralazin normalisiert werden konnte. Interessanterweise fanden sich hierbei keinerlei relevanten altersspezifischen Effekte. Dies deutet insgesamt darauf hin, dass die blutdrucksenkenden Effekte der medikamentösen Therapie mittels Captopril und Hydralazin nicht weitreichend genug sind, um die blutdrucksteigernden Effekte einer L-NAME-Langzeitapplikation zu normalisieren. Mutmaßlich lässt sich hieraus ableiten, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System durch L-NAME insgesamt in stärkerem Ausmaß aktiviert wird, als es durch den ACE-Hemmer Captopril in seiner Funktion inhibiert wird. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass die Gültigkeit dieser Aussage nur für die von uns eingesetzte konstante Dosierung des Captoprils und innerhalb eines zeitlich begrenzten Rahmens anzunehmen ist. Ob sich die o.g. Hypothese auch auf die möglichen Auswirkungen des L-NAME und des RAAS auf das pulmonale Remodeling übertragen lässt, soll im weiteren Verlauf dieses Kapitels diskutiert werden.

Aus vorangegangenen Studien wissen wir, dass die Applikation von L-Arginin-Analoga nicht nur bei Tieren (203, 266) sondern auch beim Menschen zur Erhöhung des Blutdruckes bzw. des peripheren Gefäßwiderstandes führt (255, 256). Diese Beobachtungen weisen auf einen entscheidenden Vorteil dieses Modells hin: Die im Tierversuch

erhobenen Daten und Ergebnisse sowie sich daraus ableitende Schlussfolgerungen, lassen sich – zumindest in Ansätzen – auf den menschlichen Organismus übertragen.

Trotz dieser Vorteile darf eine kritische Auseinandersetzung mit den vorhandenen Schwächen dieses Modells nicht ausbleiben. Ein ganz wesentlicher Mangel ergibt sich daraus, dass L-NAME zur Gruppe der nicht-spezifischen NO-Synthase-Inhibitoren gehört und demnach sämtliche Isoformen der NO-Synthase inhibiert (106, 170). Dies beinhaltet sowohl die konstitutiven NO-Synthasen (eNOS und nNOS) als auch die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Durch den Einsatz von L-NAME lassen sich somit lediglich generelle Aspekte eines induzierten NO-Defizits beurteilen. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass keine spezifischen Aussagen dahingehend getroffen werden können, inwiefern und in welchem Maße die endotheliale NO-Synthase (eNOS) im Einzelnen an eventuellen Veränderungen beteiligt bzw. für diese verantwortlich ist. Daher haben wir in der vorliegenden Studie zusätzlich einen molekulargenetischen Ansatz verfolgt, und uns für den Einsatz eNOS-defizienter Mäuse entschieden. Mithilfe dieser Versuchstiere war es bereits an anderer Stelle mehrfach möglich die Bedeutung des eNOS-abhängig synthetisierten Stickstoffmonoxids (NO) für das kardiovaskuläre System sowie für dessen inhärente Funktionen zu beschreiben. So konnten z.B. Huang et al. in ihren Studien nachweisen, dass eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit bzw. ein NO-Defizit letztendlich den entscheidenden Auslöser zur Entstehung derjenigen vaskulären Funktionseinschränkungen darstellt, welche im Allgemeinen als endotheliale Dysfunktion charakterisiert werden. Der Nachweis dieser Zusammenhänge gelang explizit am Modell der eNOS-defizienten Mäuse. Charakteristisch für diese Versuchstiere ist eine deutliche Verminderung: i) des mRNA-Gehalts für eNOS sowie ii) der eNOS-Enzymaktivität im Gewebe. Diese Veränderungen fanden sich so auch in den oben bereits erwähnten Studien (97).

5.2 Beurteilung der real-time RT-PCR- und Western Blot-Untersuchungen des Lungengewebes

Durch das hier gewählte Studiendesign lag der methodische Schwerpunkt auf – in Forschung und Wissenschaft anerkannten und etablierten – molekularbiologischen Analyseverfahren. Dementsprechend wurden zur Erstellung dieser Studie sowohl Gen- als auch Proteinexpression untersucht und im Ergebnisteil dieser Arbeit bereits dargestellt.

5.2.1 Pulmonale NO-Defizienz – Auswirkungen auf Expression und Aktivität des PTHrP-Systems

In der Lunge vermittelt NO – als gasförmiger Botenstoff – eine Vielzahl verschiedenster biologischer Prozesse. Hierzu gehören u.a. Vasodilatation, Bronchodilatation, anti-proliferative und anti-inflammatorische sowie – unter bestimmten Bedingungen – antioxidative Effekte (107, 155, 166). Infolgedessen besitzt ein beeinträchtigtes pulmonales NO-System bzw. eine pulmonale NO-Defizienz große Signifikanz in der Pathogenese diverser Lungenerkrankungen. Diese Signifikanz wird unter physiologischen Bedingungen vorwiegend durch die hohe Expressionsrate der konstitutiven Isoform der NO-Synthase – der eNOS – in den Epithel- sowie Endothelzellen des Lungengewebes repräsentiert. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, lassen sich in Säugetierlungen alle drei Isoformen der NO-Synthase nachweisen. Daher war es zur Erstellung dieser Arbeit unumgänglich an eNOS-defizienten Mäusen zu forschen, um gezielt die Aktivität sowie die spezifisch-vermittelten Effekte der endothelialen NO-Synthase beurteilen zu können. Betrachtet man die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen, so zeigt sich in der Gruppe der Rattenjungtiere, dass die Behandlung mit L-NAME zu einer Erhöhung der Expression der Gene des pulmonalen PTHrP-Systems führt. So wurden PTHrP und der PTH-1-Rezeptor insgesamt zwar deutlich, jedoch nicht-signifikant herauf reguliert. In den Ratten, welche als Alttiere klassifiziert wurden, fand sich ebenfalls – induziert durch einen Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) – eine gesteigerte Expression des pulmonalen PTHrPs, was jedoch zu keiner Erhöhung der Expression des PTH-1-Rezeptors über Normwerte führt. Es findet sich folglich eine Diskrepanz zwischen vermehrter mRNA-Expression und unveränderter Proteinexpression, welche sich am ehesten als Ausdruck einer höheren Umsatzrate erklären lässt. Insbesondere für PTHrP konnte in diesem Zusammenhang schon mehrmals gezeigt werden, dass die Expressionsregulation nicht zwingenderweise auf der Ebene der Transkription erfolgen muss, worauf die hier vorliegenden Daten ebenfalls hindeuten. Bei weiterer Betrachtung der Datenlage stechen besonders die Ergebnisse der eNOS-defizienten Mäuse heraus. In dieser Gruppe kommt es zu einer noch stärker gesteigerten Expression der Gene für PTHrP und den PTH-1-Rezeptor. So liegen diese Gene nur in den Proben der eNOS-defizienten Mäuse insgesamt signifikant erhöht vor. Daraus lässt sich mutmaßen, dass ein eNOS-abhängig entstandenes NO-Defizit unmittelbar die pulmonale Expression des Parathyroid hormone-related Protein (PTHrP) sowie des PTH-1-Rezeptors erhöht. Im Umkehrschluss lässt dies die Vermutung zu, dass eNOS-abhängig entstandenes Stickstoffmonoxid (NO) als endogener Inhibitor des pulmonalen PTHrP-Systems fungiert. Die Richtigkeit dieser Vermutung wird in unserer Studie

durch die PCR-Daten für die PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ noch weiter bekräftigt. In Übereinstimmung mit den o.g. Ergebnissen, werden diese Gene – durch die Behandlung mit L-NAME – sowohl in den Proben der Rattenjungtiere als auch in den Proben der eNOS-defizienten Mäuse stärker exprimiert. In den Gewebeproben der Mäuse liegt der mRNA-Gehalt des ADRP sogar signifikant erhöht vor. Diese Effekte sind in den Alttieren aus dem Rattenkollektiv nicht nachweisbar, hier liegen ADRP und PPAR γ normwertig vor, was dadurch erklärt werden kann, dass in den Jungtieren die eNOS-Expression grundsätzlich höher ist als im Vergleich zu den Alttieren. Dadurch fallen in Jungtieren L-NAME-vermittelte Effekte insgesamt stärker aus. Im Umkehrschluss lässt sich hierdurch ebenfalls nachweisen, dass Alttiere – aufgrund der bereits unter physiologischen Bedingungen geringeren eNOS-Expression – im Vergleich über weniger eNOS-abhängig entstandenes Stickstoffmonoxid (NO) verfügen. Demzufolge sind die NO-spezifischen inhibitorischen Effekte auf das pulmonale PTHrP-System in den Alttieren schwächer ausgeprägt, so dass eine zusätzliche – mittels L-NAME induzierte – NO-Synthesehemmung, keinen relevanten negativen Einfluss auf die Aktivität bzw. das Expressionsniveau des pulmonalen PTHrP-Systems und der PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ vermitteln kann.

Insgesamt zeigt dieser Teil der Studie, dass gezieltes Deaktivieren von eNOS-Allelen, die deutlichsten hier beobachteten Veränderungen der Genexpression für pulmonales PTHrP und den korrespondierenden PTH-1-Rezeptor induziert. Die stärkste Genexpression findet sich dementsprechend in den Gewebeproben der eNOS-defizienten Mäuse. Es zeigt sich, dass eNOS-abhängig synthetisiertes Stickstoffmonoxid (NO) die Aktivität pulmonalen PTHrPs und des korrespondierenden PTH-1-Rezeptors reduziert. Zusätzlich steuert NO – über nachgeschaltete Regulationsmechanismen – direkt die pulmonale Expression der Gene für ADRP und PPAR γ . Uns ist ferner bekannt, dass beide Moleküle (ADRP und PPAR γ) große Relevanz für eine intakte Surfactantsynthese besitzen. Die uns nun vorliegenden Daten bestätigen somit auch die Hypothese der Arbeitsgruppe um Sun, welche mutmaßte, dass ein hoher NO-Level zur Abschwächung der Surfactant-Sekretion führt (234). Berücksichtigt man außerdem, welche herausragende Rolle pulmonaler Surfactant für eine physiologische Lungenreifung (68), Lungenfunktion (250, 265) sowie Lungengewebsarchitektur spielt (274), so ist davon auszugehen, dass ein NO-Defizit nicht von einer Veränderung derjenigen Parameter begleitet wird, welche die Zusammensetzung der pulmonalen extrazellulären Matrix (EZM) widerspiegeln. Gestützt wird diese Aussage durch Studien der Arbeitsgruppe um Torday, welche nahelegen, dass eine Aktivierung des pulmonalen PTHrP-Systems

vor einer gesteigerten alveolären Transdifferenzierung von Lipofibroblasten zu Myofibroblasten und somit auch vor einer pulmonalen Fibrose schützt (248).

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass es unter dem Einfluss eines eNOS-abhängig entstandenen NO-Defizits zur Induktion des pulmonalen PTHrP-Systems auf Genebene kommt, welche sich in einer gesteigerten Genexpression widerspiegelt. Es stellt sich somit die Frage, ob diese Induktion auf Genebene auch Einfluss auf die Proteinexpression des PTHrP-Systems nimmt. Die Daten der Western Blot-Analysen bestätigen, dass auch die Proteinexpression des PTHrPs und des korrespondierenden PTH-1-Rezeptors im Lungengewebe der Jungtiere – durch L-NAME – maßgeblich erhöht wird. Die gemessene Proteinmenge liegt zum einen deutlich über der Expression der vergleichbaren Kontrollgruppe und zum anderen auch deutlich über der Proteinexpression in der Gruppe der Alttiere (Ratten). Wie sich aus den Daten der PCR-Untersuchungen der Alttiere schon vermuten lässt, führt die Behandlung mit L-NAME zu keiner statistisch relevanten Veränderung der Proteinexpression für pulmonales PTHrP und des korrespondierenden PTH-1-Rezeptors.

5.2.2 Der Einfluss des RAAS auf die Regulationsmechanismen des PTHrP-Systems

Zur Klärung der Frage, in welchem Maße das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) Einfluss auf Prozesse des pulmonalen Remodelings ausübt, erfolgte im weiteren Verlauf unserer Versuche die Gabe des ACE-Hemmers Captopril. Die Auswertung der entsprechenden PCR-Analysen zeigt, dass man in Jungtieren die Induktion der Expression des pulmonalen PTHrP-Systems durch Captopril nicht aufheben kann. Weder eine Normalisierung der pulmonalen Expression von PTHrP sowie des PTH-1-Rezeptors noch eine Normalisierung der Expression der downstream targets ADRP und PPAR γ können durch diese Maßnahme erreicht werden. Hiervon abweichend zeigt sich in der Versuchsgruppe mit den älteren Tieren erwartungsgemäß eine Expression des PTHrP-Systems auf normalem Niveau.

Insgesamt lässt sich aus diesen Erkenntnissen ableiten, dass der vorab erwähnte Einfluss eines NO-Defizits auf die Expression pulmonalen PTHrPs und des korrespondierenden PTH-1-Rezeptors zwar abhängig vom Einfluss des Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt wird, dies aber alles in allem unabhängig vom Einfluss des RAAS geschieht. Da Einflüsse von Captopril auf den systemischen Blutdruck erwartet werden dürfen, wurde die Spezifität der RAAS-Hemmung auf die PTHrP-Expression durch den Einsatz

von Hydralazin – vermittelt eine RAAS-unabhängige Blutdrucksenkung durch direkt vasodilatatorische Wirkung – überprüft. Die entsprechenden Befunde sprechen für eine direkte Wirkung des RAAS in diesem Zusammenhang.

5.2.3 Pulmonale NO-Defizienz – Anpassung des Metabolismus der Enzyme eNOS und ODC

Die semi-essentielle Aminosäure L-Arginin koppelt die beiden Enzyme eNOS und ODC in ihrer metabolischen Funktion aneinander. Beiden Enzymen dient Arginin – entweder direkt (im Falle der eNOS) oder zumindest indirekt über das Zwischenprodukt Ornithin (im Falle der ODC) – als Substrat zur Synthese ihrer Endprodukte. Aufgrund der begrenzten biologischen Verfügbarkeit des gemeinsamen Substrats, stellten wir uns die Frage, ob und inwieweit diese beiden Enzyme um Arginin als Grundlage für ihre Stoffwechselforgänge konkurrieren. Daher sollte die vorliegende Studie unter anderem klären, ob und inwieweit diese beiden Enzyme um Arginin als Grundlage für ihre Stoffwechselforgänge konkurrieren. Daher sollte die vorliegende Studie unter anderem klären, ob ein pulmonales NO-Defizit, getriggert: i) durch die Behandlung mit L-NAME (eNOS-Inhibitor) bzw. ii) durch eine genetisch induzierte eNOS-Defizienz, zu einer kompensatorischen Induktion der Ornithindecaboxylase (ODC) führt. Die erhobenen Daten der pulmonalen ODC-Expression spiegeln wider, dass ODC sowohl als Folge der L-NAME-Behandlung (Rattenjungtiere) aber insbesondere unter kompletter eNOS-Defizienz vermehrt exprimiert wird. Die stärkste Zunahme erfährt die Expression dabei in der Gruppe der eNOS-knockout Mäuse. In den Proben dieser Versuchstiere liegt der mRNA-Gehalt der ODC insgesamt signifikant erhöht vor. Diese Ergebnisse bestätigen somit die vorab geäußerte Theorie zu den metabolischen Zusammenhängen zwischen eNOS- und ODC-Aktivität. Interessanterweise liegt das Niveau der ODC-Expression in den Tieren der Kontrollgruppe der Alttiere (Ratten) deutlich über dem der Jungtiergruppe (Ratten). Bei der Untersuchung auf Proteinebene und dem anschließenden Vergleich der Versuchstiere aus den altersspezifischen Kontrollgruppen miteinander, konnten die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen insgesamt bestätigt werden. So ist ein abgeschwächter, aber dennoch signifikanter Effekt auch auf Proteinebene nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass dieser Teil unserer Studie zeigt, dass es im Falle einer verminderten eNOS-Aktivität zu einer kompensatorischen Steigerung der ODC-Expression kommt. Die Höhe der Expressionssteigerung korreliert dabei mit dem Ausmaß der eNOS-Funktionseinschränkung. In den jungen Tieren induziert das NO-Defizit die Expression der ODC somit in eNOS-abhängiger Weise. Dies ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass eine verminderte eNOS-

Aktivität in einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit resultiert. In der Kreislaufforschung gilt es im Allgemeinen als erwiesen, dass eine vermehrte NO-Synthase-Aktivität bzw. die Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit – bedingt durch endogene oder exogene Mechanismen – zellproliferative Mechanismen inhibiert. Wie vorangegangene Studien bereits zeigen konnten, werden diese sogenannten zytostatischen Effekte unabhängig von einer gesteigerten cGMP-Produktion – also unabhängig von der eigentlichen NO-Aktivierungskaskade – vermittelt. Daher wird u.a. vermutet, dass der Schlüssel hierfür in einer NO-vermittelten Hemmung der Polyaminbiosynthese zu finden ist (98). Durch Studien der Arbeitsgruppen um Bauer ist bekannt, dass die Ornithindecaboxylase (ODC) sowohl in vitro als auch in vivo durch Stickstoffmonoxid (NO) inaktiviert wird, was NO somit als potenten Inhibitor der Polyaminbiosynthese identifiziert (14, 15). Eine potentielle Erklärung für diese Beobachtung liegt möglicherweise darin, dass bestimmte chemische Bestandteile der Ornithindecaboxylase – sogenannte Cystinreste – sehr leicht chemische Reaktionen mit Stickstoffmonoxid (NO) eingehen. Dies deutet darauf hin, dass Stickstoffmonoxid (NO) einige seiner o.g. antiproliferativen Effekte über die Inhibition, der an der Polyaminbiosynthese beteiligten Enzyme, vermittelt. Unsere eigenen Befunde zeigen diesbezüglich, dass eine Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit zur Stärkung des Polyaminstoffwechsels führt. Dadurch könnten zelluläres Wachstum sowie zelltransformative Prozesse in stärkerem Maße stattfinden (8, 168). Ebenfalls erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang bereits veröffentlichte Studien, welche unter hypoxischen Bedingungen nachweisen konnten, dass sich Zellen aus dem pulmonalen Gefäßbett an veränderte Stoffwechselbedingungen anpassen, indem sie u.a. die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) modifizieren. Histologisch spiegelte sich dies in veränderten Konzentrationen der EZM-Proteine und Wachstumsfaktoren wider (55, 56, 232). Die dazu vorab erfolgte Erhöhung der Konzentration zellulärer Polyamine, wurde in weiterführenden Studien schließlich als entscheidende Voraussetzung für diese Anpassungsvorgänge identifiziert (153). Diese Beobachtungen könnten – in Bezug auf die Daten der hier vorgestellten Studie – erneut von Relevanz sein.

5.2.4 Pulmonale NO-Defizienz – Anpassung der Expression ausgewählter Fibrosemarker

Wie uns bereits bekannt ist, fanden sich bei der Erforschung zahlreicher Lungenerkrankungen weitreichende Übereinstimmungen dahingehend, dass bei nicht wenigen dieser Erkrankungen eine verminderte Enzymaktivität der NO-Synthasen auffiel. Ein-

gangs wurde bereits erwähnt, dass dieser Faktor im Speziellen die Entstehung pulmonaler Pathologien begünstigt. Studien der Arbeitsgruppen um Kalk sowie um Michaeloudes weisen diesbezüglich noch auf weitere Veränderungen hin, welche sich aus einer verminderten NO-Synthasen-Aktivität ergeben. So induziert dieser Umstand zusätzlich oxidativen Stress sowie Prozesse eines fibrotischen Umbaus der Lunge. Als Konsequenz kommt es in der Lunge schließlich zu Anpassungsvorgängen im Sinne eines Organremodelings (107, 159). Zentraler Bestandteil ist dabei u.a. die vermehrte Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM). Das Ausmaß dieser Vorgänge lässt sich dementsprechend anhand sogenannter Fibrosemarker untersuchen.

In der hier vorliegenden Studie haben wir uns, bezüglich der zu analysierenden Fibrosemarker, auf den Wachstumsfaktor TGF- β 1 sowie die EZM-Komponenten Elastin und Collagen-1 konzentriert. Elastin und Collagen stellen zwei der wichtigsten Makromoleküle der extrazellulären Matrix (EZM), vor dem Hintergrund der regelhaften Lungenarchitektur und Lungenfunktion, dar. So vermittelt Elastin u.a. die Elastizität des Lungengewebes bei der Atmung physiologischer Atemzugvolumina (215). Ferner ist Elastin zentraler Bestandteil pulmonaler Reparaturmechanismen. Die herausragende Rolle – sowohl qualitativ als auch quantitativ – kommt jedoch Collagen zu, da es zum einen in besonderem Maße die strukturelle Integrität der EZM gewährleistet und zum anderen den mengenmäßig größten Anteil der Makromoleküle der EZM stellt. Im Lungenparenchym finden sich insbesondere Collagen-1 und Collagen-3. Sie bilden hier im Interstitium das Grundgerüst der alveolären Strukturen (224). Interessanterweise konnten bereits vielfach Veränderungen des pulmonalen Collagengehalts unter fibrotischen Bedingungen beobachtet werden (52). So kommt es in der Lunge, im Falle einer Fibrosierung, zu einer deutlich gesteigerten Collagendeposition, welche zu einem Elastizitätsverlust des Gewebes führt (57). Dies geschieht selbst dann, wenn sich die messbare Menge an Elastin in ähnlichem Ausmaß wie die Menge an Collagen erhöht. Daraus lässt sich ableiten, dass das Ausmaß des Elastizitätsverlustes des Lungenparenchyms mit dem vorliegenden Collagengehalt korreliert (52). Dies lässt insbesondere Rückschlüsse auf die große Relevanz dieser EZM-Komponente für die Elastizität und physiologische Funktionalität des Lungenparenchyms zu. Pulmonaler Elastizitätsverlust ist mit einer Compliancemindeung gleichzusetzen, also mit einem der zentralen Pathomechanismen restriktiver bzw. fibrotischer Lungenerkrankungen. TGF- β 1, welcher als profibrotisches Zytokin einen bedeutenden Mediator in der Pathogenese der Lungenfibrose darstellt (7, 13, 30), vermittelt im Falle einer Überexpression eine schwere und nicht-reversible Lungenfibrose (220). Dabei induziert TGF- β 1 unter anderem die Pro-

duktion und Ablagerung von EZM-Komponenten (102, 240) und erhöht nachweislich, die im Lungengewebe messbare Menge an Collagen-1.

Betrachtet man die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen für die mit L-NAME vorbehandelten Jungtiere (Ratten), so fällt auf, dass in dieser Versuchsgruppe alle untersuchten Fibrosemarker in stärkerem Maße exprimiert werden. Die Expression von TGF- β 1, Collagen-1 sowie insbesondere Elastin wird, durch den NO-defizitären Einfluss des L-NAME, deutlich herauf reguliert. Damit decken sich unsere Ergebnisse mit dem aktuellen Stand der Forschung.

Die Ergebnisse der Alttiergruppe (Ratten) zeigen interessanterweise ein hiervon abweichendes Bild. Zunächst einmal fällt beim Vergleich der Proben, aus den beiden altersspezifischen Kontrollgruppen (Ratten), eine Tendenz dahingehend auf, dass fibrotische Gene mit steigendem Versuchstieralter insgesamt stärker exprimiert werden. So liegt der Gehalt an mRNA für TGF- β 1, Elastin und Collagen-1 in den Alttieren in relevantem Maße über dem der Jungtiere, wobei speziell TGF- β 1 am stärksten herauf reguliert wird. Diese Beobachtung kann mutmaßlich als Anzeichen für eine mögliche beginnende bzw. sich aufgrund des höheren Alters bereits manifestierende physiologische pulmonale Fibrosierung angesehen werden. Des Weiteren zeigt sich auch hier unter der Behandlung der Alttiere mit L-NAME erneut, dass L-NAME-vermittelte Effekte in dieser Altersgruppe schwächer ausfallen. Wie zu erwarten war, konnten wir nur limitierte Auswirkungen auf die messbare pulmonale Expression der Fibrosemarker TGF- β 1 und Elastin nachweisen. Lediglich der mRNA-Gehalt für Collagen-1 zeigt sich hier deutlich erhöht. Vermutlich liegt die Ursache für diese Beobachtungen ebenfalls in der konstitutiv geringeren eNOS-Expression der Alttiere begründet. Alternativ kann gemutmaßt werden, dass ein altersbedingter, sich unabhängig vom L-NAME manifestierender, fibrotischer Umbau des Gewebes zum Untersuchungszeitpunkt bereits eingesetzt hatte und die Effekte einer L-NAME-vermittelten Fibrosierung – zumindest für die Gene TGF- β 1 und Elastin – dadurch mutmaßlich überlagert werden. Der genauere Mechanismus bedarf aber in jedem Fall weiterer Untersuchung.

In der Gruppe der eNOS-defizienten Mäuse sprechen die Daten für tendenziell ähnliche Veränderungen wie in der Jungtiergruppe (Ratten). In den Mäusen erfährt Elastin eine Induktion in statistisch signifikantem Ausmaß, Collagen-1 zeigt sich nur geringfügig erhöht. Man kann hieraus schließen, dass die NO-Defizienz die Expression von Elastin in den Jungtieren in eNOS-abhängiger Weise beeinflusst.

5.2.5 Auswirkungen des ACE-Hemmers Captopril auf die Expression ausgewählter Fibrosemarker

Im Verlauf unserer Studie stellte sich die Frage, welche Effekte das RAAS auf die Expression der profibrotischen Gene TGF- β 1, Elastin und Collagen-1 ausübt. Die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen zeigen, dass die zusätzliche Behandlung der L-NAME-Jungtiere mit dem ACE-Hemmer Captopril die pulmonale Expression der untersuchten profibrotischen Gene insgesamt verringert. Captopril führt in den Proben dieser Gruppe insbesondere zur Abschwächung, der in den reinen L-NAME-Proben bereits beobachteten signifikanten Steigerung des Expressionsniveaus der Gene für Elastin und Collagen-1. Auf der anderen Seite zeigt sich erneut, dass sich, unter der Behandlung mit dem direkten Vasodilatator Hydralazin, die Effekte der Therapie mit einem ACE-Hemmer in den Jungtieren größtenteils gar nicht (TGF- β 1 und Collagen-1) beziehungsweise nur tendenziell (Elastin) reproduzieren lassen. Vergleicht man diese Daten mit den Ergebnissen der L-NAME-Alttiere, so kann die zusätzliche Behandlung mithilfe des ACE-Hemmers Captopril nur begrenzt die Genexpression beeinflussen. Lediglich die Expression des Gens für Collagen-1 kann dabei in relevantem Maße herunter reguliert werden. Dies gelingt jedoch sowohl mit Captopril als auch mit Hydralazin, was daher nicht für einen spezifischen Effekt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems spricht. Zur besseren Einordnung dieser Erkenntnisse, muss daher ein Blick auf die mRNA-Expression der Gene für die Fibrosemarker TGF- β 1, Elastin und Collagen-1 in den Proben derjenigen Alttiere geworfen werden, welche lediglich mit L-NAME behandelt wurden. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, sieht man hier eine – im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe – nur unwesentlich herauf regulierte Expression der Gene für TGF- β 1 und Elastin, und nur für Collagen-1 eine statistisch relevante Heraufregulation des Expressionsniveaus. Dies scheint die nahe liegendste Erklärung für das stärkere Ausmaß der Reduktion in den L-NAME+Captopril-Tieren zu sein. Folglich lässt sich insbesondere aus den Ergebnissen der Jungtiergruppe ableiten, dass die beobachteten Veränderungen der pulmonalen Expression der Fibrosemarker Elastin und Collagen-1 sowie des profibrotischen Zytokins TGF- β 1 hauptsächlich auf den Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zurück zu führen sind.

Zusammenfassend legt dieser Teil der Studie nahe, dass L-NAME – via Aktivierung des RAAS – zur Induktion der Expression fibrotischer Marker führt. Die Richtigkeit dieser Hypothese wird dadurch untermauert, dass eine zusätzliche Applikation des direkten Vasodilatators Hydralazin – anders als der ACE-Hemmer Captopril – keinen positiven Effekt auf die Induktion der gemessenen fibrotischen Marker vermitteln konnte, sondern lediglich hämodynamische Effekte vermittelte.

5.2.6 Auswirkungen der NO-Defizienz auf die Expression molekularer Marker des oxidativen Stresses

Sofern Stickstoffmonoxid (NO) im Gewebe in physiologischen Konzentrationen vorliegt, vermittelt es – neben zahlreichen weiteren biologischen Funktionen – auch antioxidative Effekte. Es steht somit zytotoxischen Einflüssen freier Radikale sowohl oxidativer als auch nitrativer Herkunft gegenüber. In diesem Zusammenhang konnte bereits an anderer Stelle nachgewiesen werden, dass NO auf zellulärer Ebene die Fähigkeit besitzt, oxidativen Stress abzufangen (174). Aus dieser Beobachtung lässt sich ableiten, dass eine eNOS-Defizienz – u.a. Voraussetzung für eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit – zu erhöhten Superoxidkonzentrationen führt (39). Da die Expressionsrate bzw. die Steigerung der Expression des NADPH-Oxidase-Systems einen sehr spezifischen Marker für oxidativen Stress darstellt, sollte durch unsere Versuchsreihen geklärt werden, ob sich die erhöhten Superoxidkonzentrationen durch eine Heraufregulation der NADPH-Oxidase ergeben. Die Ergebnisse der entsprechenden Untersuchungen bestätigen diese Annahme. So zeigen die Daten der PCR-Untersuchungen, dass die Behandlung mit L-NAME (NOS-Inhibitor), bei den Versuchstieren aus dem Rattenkollektiv, zu einer generellen Steigerung der Expression molekularer Marker des oxidativen Stresses führt. Bekanntermaßen korreliert die L-NAME-vermittelte Zunahme des oxidativen Stresses mit einer Induktion der Superoxiddismutasen 1 und 2 (SOD-1 und SOD-2). Aus diesem Grund erfolgte an dieser Stelle eine zusätzliche Versuchsreihe unter dem Einfluss des SOD-Mimetikums Tempol. Dies geschah, um darzustellen inwiefern Tempol die Detoxifikation von L-NAME-vermitteltem oxidativem Stress katalysiert.

5.2.7 Auswirkungen der NO-Defizienz auf die Expression relevanter Enzyme der oxidativen Abwehr

Wie bereits eingangs dieser Arbeit erwähnt, führt das Missverhältnis oxidativ- und antioxidativ-wirkender Mediatoren und Mechanismen zu oxidativem Stress, im Sinne einer vermehrten Bildung und Akkumulation freier Radikale (217). Als physiologische Reaktion darauf versucht jeder Organismus, jedes Gewebe die daraus resultierende oxidative Schädigung mittels endogener antioxidativer Puffermechanismen abzuwehren. Dies zeigt sich vor allem daran, dass Zellen und Gewebe unterschiedlichster Art und unterschiedlichsten Ursprungs die Transkriptionsrate der Gene für Superoxiddismutasen unter oxidativer Belastung herauf regulieren. Durch die, auf diese Weise, gesteigerte Aktivität antioxidativ-wirkender Enzyme soll eine oxidative Schädigung

abgewendet werden (158, 176). Dass es durch eine Behandlung mit L-NAME im Lungengewebe zur Induktion von oxidativem Stress kommt, konnten wir bereits nachweisen (siehe 5.2.5.1). Vor diesem Hintergrund liefern die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen zumindest für junge Tiere (Ratten) eindeutige Hinweise darauf, dass der beobachtbare Anstieg der oxidativen Belastung begleitet wird von einer kompensatorischen Induktion antioxidativ-wirkender Mechanismen des Lungengewebes. Das L-NAME-vermittelte NO-Defizit führt in den jungen Ratten zu einer starken Zunahme des mRNA-Gehalts der Enzyme SOD-1, SOD-2 und SOD-3. Hier zeigt sich weiterhin, dass Captopril nur partiell zur Normalisierung des Expressionsniveaus dieser Enzyme führt. So lässt sich nur die SOD-2 durch Captopril herunter regulieren. Davon abweichend zeigt sich die Expression antioxidativer Gene in den Alttieren, wo einzig die SOD-2 in relevantem – jedoch insgesamt nicht-signifikantem – Ausmaß herauf reguliert wurde.

Ähnlich wie dies auch schon in den Jungtieren zu beobachten war, zeigt sich ebenfalls in den eNOS-defizienten Mäuse eine starke Zunahme der SOD-Expression. Die absolute eNOS-Defizienz führt in den Proben dieser Versuchstiere zu einer gemeinsamen Induktion von pulmonalem p22phox und SOD-2. Aufgrund dieser Beobachtungen, lässt sich mutmaßen, dass es als Reaktion auf ein eNOS-abhängig entstandenes pulmonales NO-Defizit, zur Induktion der pulmonalen Superoxiddismutase 2 (SOD-2) kommt. Der genaue Mechanismus ist dabei noch ungeklärt und scheint alles in allem überaus komplex. Eine genauere Untersuchung der involvierten Mechanismen sollte auf jeden Fall erfolgen. Zum jetzigen Zeitpunkt und bei jetzigem Wissensstand liegt jedoch die Vermutung nahe, dass die Induktion der SOD-2 indirekt erfolgt und über eine Aktivierung des RAAS vermittelt wird.

5.2.8 Tempol – Einfluss auf pulmonale Anpassungsvorgänge und oxidativen Stress

5.2.8.1 Tempol – SOD-Mimetikum aus der Gruppe der Nitroxide

Bei Tempol handelt es sich um ein wasserlösliches Superoxiddismutase-Mimetikum aus der Gruppe der Nitroxide. Es zeichnet sich u.a. durch die Fähigkeit zur Membranpermeabilität aus, wodurch es im Stande ist seine zentralen Wirkmechanismen sowohl in intrazellulären als auch in extrazellulären Kompartimenten zu vermitteln. Zu diesen Wirkmechanismen gehören vor allem die Abwehr sowie das Entgiften freier Radikale (177), insbesondere des Superoxidanions und des Hydroxyl-Radikals. Es gilt ferner als erwiesen, dass eine Behandlung mit Tempol – als exogenes SOD-Mimetikum – Säuge-

tierzellen vor dem zytotoxischen Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies schützt (161, 210). Die antioxidative Wirkung kommt dabei am stärksten in solchen Zellen zum Tragen, welche in besonderem Maße oxidativem Stress ausgesetzt sind. Aufgrund seiner Wasserlöslichkeit haben wir uns bei der Erstellung dieser Arbeit für eine Verabreichung von Tempol über das Trinkwasser der Versuchstiere entschieden; was in der experimentellen Kreislaufforschung eine anerkannte und weit verbreitete Methodik darstellt. Die Wirksamkeit des Tempols ist dabei für Konzentrationen zwischen 1 bis 6 mmol/l belegt (268), und zeigt sich in einer sichtbaren Erhöhung der Gesamt-SOD-Aktivität in den Gewebeproben der so vorbehandelten Versuchstiere. Eine solche Aktivitätssteigerung lässt sich auch in unserer Studie beobachten, und zwar bei einer gewählten Tempol-Konzentration von 1mmol/l. Des Weiteren haben wir darauf geachtet die Tempollösung vor direkter Lichteinstrahlung zu schützen sowie diese täglich zu erneuern, um zu verhindern, dass die Wirksamkeit des Präparats in irgendeiner Form negativ beeinflusst wird.

5.2.8.2 Tempol – Effekte auf die Expression von Markerproteinen des oxidativen Stresses

Das Ausmaß oxidativen Stresses lässt sich insgesamt nur sehr schwer präzise bestimmen. Dies kann zum einen an methodischen Problemen liegen, zum anderen auch daran, dass die vorliegenden Konzentrationen reaktiver Spezies im zeitlichen Verlauf der Untersuchungen gegebenenfalls erheblichen Schwankungen unterliegen können. Um dennoch eine größtmögliche Zuverlässigkeit zu gewährleisten, haben wir in dieser Studie Gewebeproben, hinsichtlich der Genexpression sowie der Proteinmenge bzw. auf die Aktivität diverser Enzyme des oxidativen Stresses hin, untersucht. Dabei stand die Beantwortung der Frage im Vordergrund, ob die Induktion sowohl von Enzymen des oxidativen Stresses als auch der antioxidativen Abwehr, durch die Behandlung mit einem SOD-Mimetikum (Tempol) beeinflusst wird. Zunächst sei jedoch erwähnt, dass sich in unseren Daten eindeutige Hinweise auf eine Erhöhung der Gesamt-SOD-Expression – ausgelöst durch Tempol – finden lassen. So sind in den Proben aus der Tempol-Gruppe deutlich gesteigerte mRNA-Mengen für die Enzyme SOD-1 und SOD-2 messbar.

Bei der Auswertung der PCR-Daten wird deutlich, dass es aufgrund der L-NAME-Applikation zu einem NO-Defizit kam, welches in der Folge eine deutlich messbare Steigerung der Marker des oxidativen Stresses auslöste. Dies spiegelt sich in einer signifikanten Induktion des Expressionsniveaus für p47phox, SOD-1 und SOD-2 wider.

Ferner zeigen die Daten, dass die zusätzliche Behandlung mit Tempol den Level an oxidativem Stress merklich beeinflusst. So ist im Einzelnen zu beobachten, dass Tempol die Induktion von p47phox, SOD-1 und SOD-2 nachweislich senkt. Dies bestätigt zum einen, dass NO vor oxidativem Stress schützt sowie zum anderen, dass Tempol im intrazellulären Milieu SOD-mimetische Effekte vermittelt, und somit der schädlichen Wirkung oxidativen Stresses entgegen wirkt. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob bzw. unter welchen Umständen Tempol auch die Expressionssteigerung der weiteren Lungenmarker unter NO-Defizienz beeinflusst. Falls die zusätzliche Behandlung der Versuchstiere mit Tempol zu einer Senkung des Expressionsniveaus im Lungengewebe führt, so liefert dies Rückschlüsse darauf, inwiefern die Expression dieser Marker tatsächlich durch oxidativen Stress moduliert wird. Diesbezüglich zeigt sich in unserer Studie unter NO-Defizienz (L-NAME), dass nur die Expressionssteigerung des PTH-1-Rezeptors, des Fibrosemediators TGF- β 1 sowie des Fibrosemarkers Collagen-1 tatsächlich durch oxidativen Stress bedingt sind. Nur für diese Marker wird durch die SOD-mimetischen Effekte des Tempols eine signifikante Reduktion der Expression vermittelt und Normwerte erreicht. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten, aus denen bekannt ist, dass diverse Zytokine, speziell aber TGF- β 1, durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert und zur Induktion fibrotischer Prozesse beziehungsweise zelltransformativer Vorgänge angeregt wird. So zeigten Versuche an Ratten, in welchen der Level an ROS durch Infusion von Angiotensin II erhöht wurde, dass dies zu einer vermehrten Expression des profibrotischen Zytokins TGF- β 1, zur Induktion der Collagen-1-Synthese sowie zur Erhöhung der Myofibroblasten-Menge in renalem und kardialem Gewebe führte. Durch ergänzende Behandlung mit dem SOD-Mimetikum Tempol, konnten diese beobachteten Effekte aufgehoben und die Expression wieder auf Normwerte reduziert werden (275). Die Arbeitsgruppe um Qi konnte 2009 bei ihren Studien an Zellkulturen von Lungenfibroblasten nachweisen, dass eine vermehrte Synthese von Superoxidanionen die intrazelluläre Superoxidanionen-Konzentration sowie die Freisetzung von TGF- β 1 und Collagen erhöht, und dass diese Effekte durch Tempol aufgehoben werden können (197).

5.2.9 Altersbedingte Einflüsse auf die Expression von Markerproteinen des oxidativen Stresses

Betrachtet man die zahlreichen wissenschaftlichen Veröffentlichungen, welche sich mit der Frage beschäftigen, inwiefern oxidativer Stress Einfluss auf die Prozesse des Alterns von Zellen, Geweben und Organismen ausübt, so zeigt sich als allgemeiner Konsens, dass die intrazelluläre Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zum

einen Zellschäden verursacht und zum anderen Prozesse aktiviert bzw. begünstigt, welche sowohl zur funktionellen Beeinträchtigung als auch zur Alterung von Geweben und Organismen beitragen. Dies wird mit großer Wahrscheinlichkeit dadurch gefördert, dass: i) oxidativer Stress – hervorgehend aus steigenden Konzentrationen reaktiver Spezies – mit zunehmendem Alter in exponentiellem Maße zunimmt sowie ii) es im Alter zu einem beachtlichen Rückgang der Aktivität zellreparativer und zellprotektiver Mechanismen kommt (225). Diese Mechanismen, welche Zellen sowie Zellbestandteile vor Alterungsprozessen schützen sollen, werden schrittweise durch vermehrte oxidative Schädigung in ihrer Funktion gestört bzw. beeinträchtigt (19, 227). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen diverser Studien, welche nachweisen konnten, dass oxidativer Stress als einer der zentralen Pathomechanismen in der Entstehung verschiedenster Erkrankungen des älteren Menschen, unter anderem kardiovaskulärer sowie pulmonaler Ätiologie, fungiert (44, 60, 228). Speziell für pulmonales Gewebe besitzen diese Prozesse vermehrte Relevanz, da sich die Lunge – insbesondere beim Menschen – nicht nur endogenen sondern auch vermehrt exogenen Quellen oxidativer Spezies ausgesetzt sieht (202, 205). Dies zieht beinahe zwangsläufig eine massive Schädigung der Zellen des Lungengewebes nach sich.

Diese altersbezogenen Effekte auf Gewebe und Zellen des kardiovaskulären und kardiopulmonalen Systems, spiegeln sich molekularbiologisch vor allem darin wider, dass die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) sowie die produzierte Menge an verfügbarem Stickstoffmonoxid (NO) mit steigendem Alter abnehmen (258). Wie bereits erwähnt, werden reaktive Sauerstoffspezies im Zuge sich manifestierender Alterungsprozesse jedoch vermehrt produziert, was die Imbalance zwischen oxidativen und antioxidativen Mechanismen sowie, die sich daraus ergebenden Folgen und Schäden, zusätzlich forciert. Die von uns erhobenen Daten, unterstützen diese Aussagen weitestgehend. So zeigen die PCR-Ergebnisse aus den Kontrollgruppen, dass es altersbedingt in mancher Hinsicht zu ähnlichen Veränderungen des Expressionsniveaus kommt, wie unter NO-Defizienz. Es findet sich eine, am ehesten altersbedingte, signifikante Veränderung des Expressionsniveaus für die untersuchten Marker SOD-2, Elastin und insbesondere für ODC. Interessanterweise verdeutlichen unsere Daten, dass dies aber nicht für das pulmonale PTHrP-System – mit seinem korrespondierenden PTH-1-Rezeptor und den PTHrP-abhängig regulierten Genen ADRP und PPAR γ – gilt. Für diese Marker ist eine solche altersbedingte Heraufregulation des pulmonalen Expressionsniveaus nicht erkennbar.

5.3 Schlussfolgerung

Die hier vorliegende Studie brachte die neue Erkenntnis hervor, dass L-NAME: i) zur Induktion des pulmonalen Parathyroid hormone-related Protein (PTHrP) und des PTH-1-Rezeptors sowie ii) zur Induktion der pulmonalen Expression profibrotischer Marker und Marker des oxidativen Stresses führt. Dies geschieht unter der Beteiligung des RAAS. Ferner konnten wir Stickstoffmonoxid (NO) in diesem Zusammenhang als endogenen Inhibitor des pulmonalen PTHrP-Systems identifizieren. Es zeigte sich darüber hinaus, dass der Ausprägungsgrad der L-NAME vermittelten Effekte einer gewissen Altersspezifität zu unterliegen scheint. So sinkt mit steigendem Alter (der von uns untersuchten Versuchstiere) der Einfluss des via L-NAME-vermittelten NO-Defizits und es fanden sich in diesem Zusammenhang deutliche Hinweise darauf, dass die oxidative Imbalance – zwischen oxidativem Stress und antioxidativ-wirkenden Puffermechanismen – eine zunehmende Bedeutung für die Manifestation der pulmonalen Veränderungen gewinnt. Als Schlüsselement für profibrotische Veränderungen könnte das Zytokin TGF- β 1 wirken. TGF- β 1 führt zu fibrotischem Umbau, indem es neben weiteren EZM-Komponenten insbesondere die Synthese und Deposition von Collagen-1 induziert.

L-NAME-vermittelte Effekte auf die untersuchten Marker und Parameter	
	eNOS NO
	TGF- β 1, Collagen-1, Elastin, ODC ROS, SOD RAAS

Tab. 5.1 – Schematische Zusammenfassung der L-NAME-vermittelten Effekte auf die in dieser Studie untersuchten Marker und Proteine.

L-NAME induzierte in unserer Studie eine Reduktion der eNOS-Aktivität, was zu einer nachweisbaren Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit führte. Auf der anderen Seite kam es unter dem Einfluss von L-NAME zu einer Zunahme der Expression profibrotischer Marker sowie Marker des oxidativen Stresses und der entsprechenden kompensatorischen Abwehrmechanismen. Das Aktivitätsniveau des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zeigte sich ebenfalls gesteigert.

Begleitend hierzu fanden wir Hinweise darauf, dass ein NO-Defizit Stoffwechselbedingungen induziert, welche als Voraussetzung zur Steigerung der Polyaminbiosynthese fungieren. Dies begünstigt in der Folge eine deutliche Steigerung proliferativer bzw. profibrotischer Mechanismen. Es fanden sich insgesamt deutliche Hinweise darauf, dass biologische Organismen bzw. deren Gewebe, aufgrund des Eingangs bereits erwähnten oxidativen Ungleichgewichtes, vermehrt bestrebt sind die entsprechenden Kompensationsmechanismen des oxidativen Stresses zu verstärken, um dennoch möglichst eine oxidative Balance aufrechtzuerhalten. Im Falle unserer Studie zeigte sich, dass Stickstoffmonoxid (NO) pulmonales Gewebe vor oxidativem Stress bzw. oxidativer Schädigung schützt und folglich die Entstehung und den Ausprägungsgrad – der zuvor beschriebenen – pulmonalen Anpassungsvorgänge begrenzen beziehungsweise abschwächen kann.

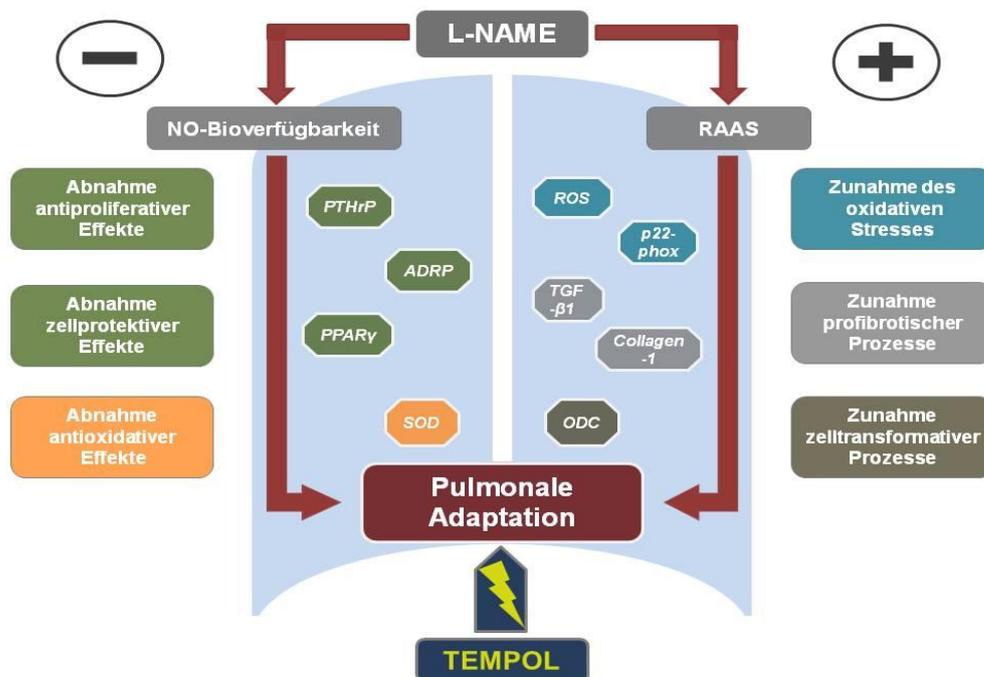


Abb. 5.1 – Überblick der Wechselwirkungen zwischen L-NAME, NO-Defizienz und der Aktivität des RAAS hinsichtlich pulmonaler Adaptation; sowie der protektiven Wirkung des SOD-Mimetikums Tempol in diesem Zusammenhang.

L-NAME führt u.a. über eine Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit sowie eine Aktivitätssteigerung des RAAS zur Induktion pulmonaler Anpassungsvorgänge. Das SOD-Mimetikum Tempol kann, in pulmonalem Gewebe, diesen Umbauprozessen entgegen wirken.

6. Zusammenfassung

Im Vorfeld dieser Studie war bereits bekannt, dass die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen im Allgemeinen sowie diverser Lungenerkrankungen im Speziellen, durch einen Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) begünstigt wird. Die exakte Rolle einer vorliegenden NO-Defizienz ist in diesem Kontext jedoch noch umstritten.

Daher wurden in der hier vorliegenden Arbeit die Zusammenhänge zwischen NO-Defizienz, oxidativem Stress, Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), Zusammensetzung der EZM sowie der Funktionen des pulmonalen PTHrP-Systems eingehend untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche Tiermodelle der NO-Defizienz miteinander verglichen. Die Effekte einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit mittels medikamentöser Applikation von L-NAME in Ratten wurden denen in eNOS-defizienten Mäusen (eNOS-knockout) gegenübergestellt.

Im Fokus standen insbesondere die Gen- und Proteinexpression: i) der endothelialen NO-Synthase (eNOS), ii) NADPH-Oxidase-assoziiierter Marker des oxidativen Stresses (p22phox, NOX2, p47phox und p67phox) sowie entsprechender Detoxifikationsenzyme aus der Gruppe der Superoxiddismutasen (SOD-1, SOD-2, SOD-3), iii) des Fibrosemediators TGF- β 1 und ausgewählter Fibrosemarker (Elastin, Collagen-1), iv) der Ornithindecaboxylase (ODC) als Marker für Zellproliferation sowie v) spezifischer Marker des PTHrP-Systems als Marker für physiologische Lungenentwicklung und alveoläre Homöostase (PTHrP, PTH-1-Rezeptor, ADRP, PPAR γ). Die molekularbiologischen Analysen wurden mittels real-time RT-Polymerasekettenreaktion und Western Blot durchgeführt.

Es zeigte sich, dass das L-Arginin-Analogon L-NAME ein NO-Defizit induziert, welches zu Expressionsveränderungen in pulmonalem Gewebe führt, die wiederum auf Proteine des oxidativen Stresses (SOD-2) und der EZM (TGF- β 1) einwirken. Dies scheint unter Beteiligung des RAAS zu erfolgen.

Wir konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass eine Induktion des pulmonalen PTHrP-Systems, unter L-NAME vermittelter NO-Defizienz, pulmonales Gewebe nicht vor der Induktion profibrotischer Proteine schützt. Dies erscheint als Neuentdeckung, da im Vorfeld dieser Studie bereits mehrfach für das pulmonale PTHrP-System ein protektiver Effekt in Bezug auf fibrotische Anpassungsvorgänge der Lunge beschrieben wurde. Profibrotische Prozesse in der Lunge wurden in unserer Studie dagegen wirksam durch das SOD-Mimetikum Tempol begrenzt.

7. Summary

In previous studies nitrogen monoxide (NO) deficiency has been demonstrated to be a substantial contributive factor in the development of cardiovascular diseases in general and pulmonary diseases in particular. However, the precise effect of an existing NO deficiency in this context is still discussed controversially.

The aim of the study at hand was to investigate the connection between NO deficiency, oxidative stress, activity of the renin-angiotensin system, the composition of the extracellular matrix as well as the function of the PTHrP system. On that point we examined and compared two different animal models of NO deficiency, in which NO bioavailability in rats was reduced by drug administration (L-NAME) and compared to eNOS-deficient mice. The focus of the investigation was set on i) the endothelial NO-Synthase (eNOS), ii) NADPH-Oxidase associated markers of oxidative stress (p22phox, NOX2, p47phox and p67phox) as well as enzymes of detoxification belonging to the group of superoxide-dismutase (SOD-1, SOD-2, SOD-3), iii) the profibrotic cytokine TGF- β 1 and further selected mediators of fibrosis (elastin, collagen-1), iv) the ornithine decarboxylase (ODC) as marker of cell proliferation, v) the PTHrP system as indicator of physiological lung development and alveolar homeostasis (PTH-1, PTH-1R, ADRP, PPAR γ). The analysis of the gen and protein expression was performed by real-time quantitative PCR and Western Blot.

This study revealed that the L-arginine-analog L-NAME induces a NO deficiency, which leads to an alteration of the gene expression in the pulmonary tissue causing an impact on the proteins of oxidative stress (SOD-2) and of the extracellular matrix (TGF- β 1). This process further seems to involve the RAS (renin-angiotensin-system).

In this context we demonstrated, that an induction of the pulmonary PTHrP system, under L-NAME mediated NO deficiency does not prevent the induction of profibrotic proteins in pulmonary tissue. The perception of a protective effect of the PTHrP system on the lung as described in previous studies was not substantiated in our study. However, profibrotic processes in the lung were diminished effectively by the SOD-mimetic Tempol.

8. Abkürzungsverzeichnis

AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
a.b.	aqua bidest., zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Adm	Adrenomedullin
Adm 2	Adrenomedullin 2
ADRP/Plin	Adipose Differentiation Related Protein
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	analysis of variance
B2M	β2-Mikroglobulin
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	zystische Fibrose (=Mukoviszidose), <i>engl. cystic fibrosis</i>

cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung, <i>engl. chronic obstructive pulmonary disease</i>
Ct-Wert	Schwellenwert Zyklus, <i>engl. cycle-treshold</i>
CuZn-SOD	Kupfer-Zink-enthaltende Superoxiddismutase, <i>SOD-1</i>
Cyb-A	siehe p22 ^{phox}
Cyb-B	siehe gp91 ^{phox}
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
Duox	Dual-Oxidase (<i>1 und 2 kennzeichnet die jeweilige Isoform</i>)
EDRF	Endothelium-derived relaxing Factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
fw	forward

g	Gramm
gp91 ^{phox}	91-kDa schwere membrangebundene Untereinheit der NADPH-Oxidase, <i>ebenfalls bezeichnet als NOX2 bzw. Cytochrome b-245, beta polypeptide (Cyb-B)</i>
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein, <i>GTP-bindendes Protein</i>
GSH	Glutathion
h	Stunde
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose, <i>idiopathische Lungenfibrose</i>
l	Liter
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginine methyl ester
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

μM	Mikromol
M	mol/l
mA	Milliampere
MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
mg/kg/KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
mg/l	Milligramm pro Liter
Mg_2SO_4	Magnesiumsulfat
MgCl_2	Magnesium-Chlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mmol	Millimol
mmol/l	Millimol pro Liter
MMP-12	Matrix-Metalloproteinase 12
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
Mn-SOD	Manganhaltige Superoxiddismutase, <i>SOD-2</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
mw	Molekulargewicht, <i>engl. molecular weight</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid

NAD	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (<i>reduzierte Form</i>)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ncf-1	siehe p47 ^{phox}
Ncf-2	siehe p67 ^{phox}
ng	Nanogramm
ng/μl	Nanogramm pro Mikroliter
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO-Synthasen	Stickstoffmonoxid-Synthasen
NOX	NADPH-Oxidase (<i>1 bis 5 kennzeichnet die jeweilige Isoform</i>)
o.g.	oben genannt
ODC	Ornithindecaboxylase
Oligo-dT	Oligo-desoxy-Thymidin
%	Prozent
p	Signifikanzwert, <i>engl. p-Value</i>
p22 ^{phox}	22-kDa schwere zytosolische Untereinheit der NADPH-Oxidase, auch bezeichnet als <i>Cytochrom b, alpha polypeptide (Cyb-A)</i>
P38/MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

p47 ^{phox}	47-kDa schwere zytosolische Untereinheit der NADPH-Oxidase, <i>auch bezeichnet als Neutrophil cytosolic factor 1 (Ncf-1)</i>
p67 ^{phox}	67-kDa schwere zytosolische Untereinheit der NADPH-Oxidase, <i>auch bekannt als Neutrophil cytosolic factor 2 (Ncf-2)</i>
PAH	pulmonal-arterieller Hypertonus, <i>engl. pulmonary hypertension</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>engl. phosphate buffered saline</i>
PCR [®]	Polymerasekettenreaktion
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus d. Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma
PTH	Parathormon
PTH-1R	Parathyroid hormone-related peptide receptor
PTH-2R	Parathyroid hormone 2 receptor
PTHrP	Parathyroid hormone-related Protein
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rcf	Relative Centrifugal Force, Relative Zentrifugalbeschleunigung
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-sin	RNase-Inhibitor-Lösung
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>engl. reactive oxygen species</i>

rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real Time Polymerasekettenreaktion
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat, <i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>
sGC	zytoplasmatische lösliche Guanylatcyclase
SNS	Sympathisches Nervensystem
SOD	Superoxiddismutase (<i>1 bis 3 kennzeichnet die jeweilige Isoform</i>)
SOD-1	siehe CuZn-SOD
SOD-2	siehe Mn-SOD
SOD-3	extrazelluläre Superoxiddismutase
Sodium Phosphate	Natriumphosphat
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered saline, dreifach gepufferte Kochsalzlösung
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
TL	Tibiallänge
TNF	Tumor necrosis factor

Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Tween20	Polysorbat 20
u.a.	unter anderem
UV	Ultra Violett
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Zentrale Effekte von L-NAME in der Entstehung des NO-defizitären Hypertonus	7
Abb. 1.2	Zusammenhänge zwischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und sympathischem Nervensystem zur Steuerung des systemischen Blutdrucks	9
Abb. 3.1	Darstellung der erhobenen Blutdruckwerte des Rattenkollektivs	37
Abb. 3.2	Darstellung der systolischen Blutdruckwerte der Versuchstiere im Zeitverlauf	38
Abb. 4.1a	Auswirkungen der Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz auf die pulmonale Expression von PTHrP und des korrespondierenden PTH-1-Rezeptors in den untersuchten Versuchstiergruppen	51
Abb. 4.1b	Einfluss der Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz auf die pulmonale Expression der PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ	52
Abb. 4.2	Einfluss des systemischen Blutdrucks auf die pulmonale Expression des PTHrP und des PTH-1-Rezeptors sowie auf die PTHrP-abhängig regulierten Gene ADRP und PPAR γ in L-NAME-Tieren	54
Abb. 4.3	Effekte von Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz und Blutdruckregulation auf die pulmonale Ornithindecaboxylase-(ODC)-Expression	56
Abb. 4.4	Einfluss von Stickstoffmonoxid-(NO)-Defizienz auf die pulmonale Expression ausgewählter fibrotischer Parameter sowie auf die Expression des Fibrosemidiators TGF- β 1	58
Abb. 4.5	Effekte der Blutdruckregulation auf die pulmonale Expression ausgewählter fibrotischer Marker und des TGF- β 1 in L-NAME-vorbehandelten Versuchstieren	59
Abb. 4.6	Zusammenhang zwischen L-NAME-vermittelter NO-Synthesehemmung und gemessener mRNA-Menge der einzelnen NADPH-Oxidase-Untereinheiten als Marker des oxidativen Stresses	61

Abb. 4.7	Zusammenhang zwischen L-NAME-verursachtem oxidativem Stress und dem Expressionsniveau der oxidativen Detoxifikationsenzyme SOD-1, SOD-2 und SOD-3	63
Abb. 4.8	Auswirkungen von Tempol und L-NAME auf die Induktion von Enzymen des oxidativen Stresses und der korrespondierenden Detoxifikations-Enzyme des oxidativen Stresses	64
Abb. 4.9	Effekte des SOD-Mimetikums Tempol auf das Expressionsniveau der untersuchten pulmonalen Marker unter L-NAME-vermittelter Stick-Stoffmonoxid-(NO)-Defizienz	66
Abb. 4.10	Zusammenhang zwischen dem Alter der Versuchstiere und dem pulmonalen Expressionsniveau der untersuchten Marker in den Kontroll-Gruppen des Rattenkollektivs	68
Abb. 4.11	Western Blot-Banden und quantitative Daten der PTHrP- und PTH-1-Rezeptor-Proteinexpression unter dem Einfluss von L-NAME	70
Abb. 4.12a	Nachweis der altersspezifischen ODC-Proteinbiosynthese in den Kontrollgruppen des Rattenkollektivs mittels Western Blot-Verfahren	71
Abb. 4.12b	Nachweis der ODC-Proteinbiosynthese mittels Western Blot und Vergleich der erhobenen altersspezifischen Werte in den Kontroll-Gruppen des Rattenkollektivs	72
Abb. 5.1	Überblick der Wechselwirkungen zwischen L-NAME, NO-Defizienz und der Aktivität des RAAS hinsichtlich des pulmonalen Remodelings; sowie der protektiven Wirkung des SOD-Mimetikums Tempol in diesem Zusammenhang	90

10. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Auflistung und Spezifikationen der verwendeten Rattenprimer	32
Tab. 2.2	Auflistung und Spezifikationen der verwendeten Mausprimer	34
Tab. 3.3	Medikamentendosierung im Trinkwasser der Versuchstiere	39
Tab. 3.4	Berechnungsformel RNA-Lösung	42
Tab. 3.5	Zusammensetzung cDNA-Reaktionsmix für einen 1-fachen Ansatz	43
Tab. 3.6	Zusammensetzung PCR-Reaktionsmix	43
Tab. 3.7	Ablauf eines real-time RT-PCR-Laufes	44
Tab. 3.8	Zusammensetzung Zell-Lysis-Puffer	45
Tab. 3.9	Zusammensetzung Laemmli-Puffer	46
Tab. 3.10	Waschvorgang der Nitrocellulose-Membran bei der ECL-Detektion	49
Tab. 5.1	Schematische Zusammenfassung der L-NAME-vermittelten Effekte auf die in dieser Studie untersuchten Marker und Proteine	89

11. Literaturverzeichnis

1. Agbani EO, Coats P, Mills A, and Wadsworth RM. Peroxynitrite stimulates pulmonary artery endothelial and smooth muscle cell proliferation: involvement of ERK and PKC. *Pulm Pharmacol Ther* 24: 100-109.
2. Al-Mehdi AB, Zhao G, Dodia C, Tozawa K, Costa K, Muzykantov V, Ross C, Blecha F, Dinauer M, and Fisher AB. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circ Res* 83: 730-737, 1998.
3. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, and Yeghiazarians Y. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 1268-1275, 2008.
4. Andrew PJ, and Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 521-531, 1999.
5. Arnal JF, el Amrani AI, Chatellier G, Menard J, and Michel JB. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 22: 380-387, 1993.
6. Arnal JF, Warin L, and Michel JB. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90: 647-652, 1992.
7. Asakura S, Kato H, Fujino S, Konishi T, Tezuka N, and Mori A. Role of transforming growth factor-beta1 and decorin in development of central fibrosis in pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol* 30: 195-198, 1999.
8. Auvinen M, Paasinen A, Andersson LC, and Holttä E. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360: 355-358, 1992.
9. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, and Michel T. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 270: 14582-14586, 1995.
10. Barbera JA, Riverola A, Roca J, Ramirez J, Wagner PD, Ros D, Wiggs BR, and Rodriguez-Roisin R. Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationships in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 423-429, 1994.
11. Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 10: 227-238, 1986.
12. Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, and Runge MS. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest* 108: 1513-1522, 2001.
13. Bartram U, and Speer CP. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest* 125: 754-765, 2004.
14. Bauer PM, Buga GM, and Ignarro LJ. Role of p42/p44 mitogen-activated-protein kinase and p21waf1/cip1 in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12802-12807, 2001.
15. Bauer PM, Fukuto JM, Buga GM, Pegg AE, and Ignarro LJ. Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase by S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 355-358, 1999.
16. Baylis C, Harton P, and Engels K. Endothelial derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 1: 875-881, 1990.
17. Baylis C, Mitruka B, and Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90: 278-281, 1992.
18. Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, and Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 233: 229-240, 1994.

19. Beckman KB, and Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547-581, 1998.
20. Bedard K, and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313, 2007.
21. Bedard K, Lardy B, and Krause KH. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie* 89: 1107-1112, 2007.
22. Benayoun L, Letuve S, Druilhe A, Boczkowski J, Dombret MC, Mechighel P, Megret J, Leseche G, Aubier M, and Pretolani M. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human asthmatic airways: relationship with proliferation, apoptosis, and airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1487-1494, 2001.
23. Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvrtina S, and Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H942-948, 2002.
24. Bernatova I, Pechanova O, and Kristek F. Mechanism of structural remodeling of the rat aorta during long-term NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment. *Jpn J Pharmacol* 81: 99-106, 1999.
25. Bernatova I, Pechanova O, and Simko F. Captopril prevents NO-deficient hypertension and left ventricular hypertrophy without affecting nitric oxide synthase activity in rats. *Physiol Res* 45: 311-316, 1996.
26. Beyer HS, and Zieve L. Effects of partial and sham hepatectomy on ornithine decarboxylase and thymidine kinase activities and mRNA contents. *Biochem Int* 20: 761-765, 1990.
27. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, and Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297: 842-857, 2007.
28. Boros LG, Torday JS, Paul Lee WN, and Rehan VK. Oxygen-induced metabolic changes and transdifferentiation in immature fetal rat lung lipofibroblasts. *Mol Genet Metab* 77: 230-236, 2002.
29. Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tuder RM, Hopken MW, Flores SC, and Voelkel NF. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 764-769, 2004.
30. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, and McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6642-6646, 1991.
31. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* 26: 3-31, 2005.
32. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18: 775-794, 1995.
33. Chang LY, Kang BH, Slot JW, Vincent R, and Crapo JD. Immunocytochemical localization of the sites of superoxide dismutase induction by hyperoxia in rat lungs. *Lab Invest* 73: 29-39, 1995.
34. Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, and Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* 107: 2169-2179, 1988.
35. Chaswal M, Das S, Prasad J, Katyal A, Mishra AK, and Fahim M. Effect of losartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist on cardiac autonomic functions of rats during acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Physiol Res* 61: 135-144.
36. Clerch LB, and Massaro D. Rat lung antioxidant enzymes: differences in perinatal gene expression and regulation. *Am J Physiol* 263: L466-470, 1992.
37. Coggins MP, and Bloch KD. Nitric oxide in the pulmonary vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1877-1885, 2007.
38. Cooke JP, and Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 48: 489-509, 1997.

39. Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, and Luscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* 101: 1530-1537, 1998.
40. Coursin DB, Cihla HP, Oberley TD, and Oberley LW. Immunolocalization of antioxidant enzymes and isozymes of glutathione S-transferase in normal rat lung. *Am J Physiol* 263: L679-691, 1992.
41. Coursin DB, Cihla HP, Sempf J, Oberley TD, and Oberley LW. An immunohistochemical analysis of antioxidant and glutathione S-transferase enzyme levels in normal and neoplastic human lung. *Histol Histopathol* 11: 851-860, 1996.
42. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, and Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10405-10409, 1992.
43. Crossno JT, Jr., Garat CV, Reusch JE, Morris KG, Dempsey EC, McMurtry IF, Stenmark KR, and Klemm DJ. Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L885-897, 2007.
44. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50: 279-289, 2000.
45. Deftos LJ, Burton DW, and Brandt DW. Parathyroid hormone-like protein is a secretory product of atrial myocytes. *J Clin Invest* 92: 727-735, 1993.
46. Delacretaz E, Hayoz D, Osterheld MC, Genton CY, Brunner HR, and Waeber B. Long-term nitric oxide synthase inhibition and distensibility of carotid artery in intact rats. *Hypertension* 23: 967-970, 1994.
47. Demayo F, Minoo P, Plopper CG, Schuger L, Shannon J, and Torday JS. Mesenchymal-epithelial interactions in lung development and repair: are modeling and remodeling the same process? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L510-517, 2002.
48. Denning GM, and Stoll LL. Peroxisome proliferator-activated receptors: potential therapeutic targets in lung disease? *Pediatr Pulmonol* 41: 23-34, 2006.
49. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, and Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122: 103-111, 1993.
50. Dhaunsi GS, Paintlia MK, Kaur J, and Turner RB. NADPH oxidase in human lung fibroblasts. *J Biomed Sci* 11: 617-622, 2004.
51. Dimmeler S, Hermann C, Galle J, and Zeiher AM. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 656-664, 1999.
52. Dolhnikoff M, Mauad T, and Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1750-1757, 1999.
53. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.
54. Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, and Scherrer U. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 104: 342-345, 2001.
55. Durmowicz AG, Parks WC, Hyde DM, Mecham RP, and Stenmark KR. Persistence, re-expression, and induction of pulmonary arterial fibronectin, tropoelastin, and type I procollagen mRNA expression in neonatal hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 145: 1411-1420, 1994.
56. Durmowicz AG, and Stenmark KR. Alterations in extracellular matrix protein expression in neonatal pulmonary hypertension: implications for vascular function. *J Perinatol* 16: S11-18, 1996.

57. Ebihara T, Venkatesan N, Tanaka R, and Ludwig MS. Changes in extracellular matrix and tissue viscoelasticity in bleomycin-induced lung fibrosis. Temporal aspects. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1569-1576, 2000.
58. Faurischou M, and Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5: 1317-1327, 2003.
59. Ferreira-Melo SE, Yugar-Toledo JC, Coelho OR, De Luca IM, Tanus-Santos JE, Hyslop S, Irigoyen MC, and Moreno H, Jr. Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. *Eur J Pharmacol* 542: 141-147, 2006.
60. Finkel T, and Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247, 2000.
61. Fleming I, and Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1-12, 2003.
62. Folz RJ, Guan J, Seldin MF, Oury TD, Enghild JJ, and Crapo JD. Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 393-403, 1997.
63. Forstermann U, and Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113: 1708-1714, 2006.
64. Frank S, Kampfer H, Podda M, Kaufmann R, and Pfeilschifter J. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J* 346 Pt 3: 719-728, 2000.
65. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44: 147-159, 1975.
66. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112, 1995.
67. Furchgott RF, and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
68. Gahlot L, Green FH, Rigaux A, Schneider JM, and Hasan SU. Role of vagal innervation on pulmonary surfactant system during fetal development. *J Appl Physiol* (1985) 106: 1641-1649, 2009.
69. Gao F, Kinnula VL, Myllarniemi M, and Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 10: 343-354, 2008.
70. Gao J, and Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem* 274: 16825-16830, 1999.
71. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, and Moncada S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol* 101: 10-12, 1990.
72. Garg UC, and Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1774-1777, 1989.
73. Gerova M, Torok J, Pechaoova O, and Matuskova J. Rilmenidine prevents blood pressure increase in rats with compromised nitric oxide production. *Acta Pharmacol Sin* 25: 1640-1646, 2004.
74. Goltzman D, Hendy GN, and Banville D. Parathyroid hormone-like peptide: molecular characterization and biological properties. *Trends Endocrinol Metab* 1: 39-44, 1989.
75. Grandvaux N, Grizot S, Vignais PV, and Dagher MC. The Ku70 autoantigen interacts with p40phox in B lymphocytes. *J Cell Sci* 112 (Pt 4): 503-513, 1999.
76. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, and Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 1141-1148, 1994.
77. Griendling KK, Sorescu D, and Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501, 2000.

78. Ha H, and Lee HB. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology (Carlton)* 10 Suppl: S7-10, 2005.
79. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-724, 1994.
80. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1: 358-364, 1987.
81. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91: 14S-22S, 1991.
82. Halliwell B, and Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford New York: Clarendon Press ; Oxford University Press, 1989, p. xvi, 543 p.
83. Hampf V, and Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* 80: 1337-1372, 2000.
84. Hass MA, and Massaro D. Developmental regulation of rat lung Cu,Zn-superoxide dismutase. *Biochem J* 246: 697-703, 1987.
85. Hastings RH, Summers-Torres D, Yaszay B, LeSueur J, Burton DW, and Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein, an autocrine growth inhibitor of alveolar type II cells. *Am J Physiol* 272: L394-399, 1997.
86. Hayashibe H, Asayama K, Dobashi K, and Kato K. Prenatal development of antioxidant enzymes in rat lung, kidney, and heart: marked increase in immunoreactive superoxide dismutases, glutathione peroxidase, and catalase in the kidney. *Pediatr Res* 27: 472-475, 1990.
87. Hecker M, Cattaruzza M, and Wagner AH. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 32: 9-16, 1999.
88. Heeringa P, Steenbergen E, and van Goor H. A protective role for endothelial nitric oxide synthase in glomerulonephritis. *Kidney Int* 61: 822-825, 2002.
89. Heikkinen S, Auwerx J, and Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta* 1771: 999-1013, 2007.
90. Hemmens B, and Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol* 100: 1-32, 1998.
91. Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, Biasotto D, Lanske BM, Goltzman D, and Karaplis AC. Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 15: 4064-4075, 1995.
92. Hernandez-Pando R, Schon T, Orozco EH, Serafin J, and Estrada-Garcia I. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol* 53: 257-265, 2001.
93. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, and Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 159: 1009-1020, 2001.
94. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, and Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170: 1807-1816, 2007.
95. Hirvonen A. Ornithine decarboxylase activity and the accumulation of its mRNA during early stages of liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1007: 120-123, 1989.
96. Holland JA, Pritchard KA, Pappolla MA, Wolin MS, Rogers NJ, and Stemerman MB. Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol* 143: 21-25, 1990.
97. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, and Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242, 1995.
98. Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G, and del Soldato P. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4202-4208, 2001.

99. Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, and Harrison DG. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res* 79: 32-37, 1996.
100. Jansen J, Gres P, Umschlag C, Heinzel FR, Degenhardt H, Schluter KD, Heusch G, and Schulz R. Parathyroid hormone-related peptide improves contractile function of stunned myocardium in rats and pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H49-55, 2003.
101. Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, and Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 69: 261-274, 1993.
102. Jeffery TK, and Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 45: 173-202, 2002.
103. Jernigan NL, Walker BR, and Resta TC. Endothelium-derived reactive oxygen species and endothelin-1 attenuate NO-dependent pulmonary vasodilation following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L801-808, 2004.
104. Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, and Jones OT. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 271: H1626-1634, 1996.
105. Jover B, Herizi A, Casellas D, and Mimran A. Influence of irbesartan and enalapril on changes of renal function associated with the established phase of I-NAME hypertension. *J Hypertens* 19: 2039-2046, 2001.
106. Just A, Wittmann U, Nafz B, Wagner CD, Ehmke H, Kirchheim HR, and Persson PB. The blood pressure buffering capacity of nitric oxide by comparison to the baroreceptor reflex. *Am J Physiol* 267: H521-527, 1994.
107. Kalk P, Mach A, Thone-Reineke C, Godes M, Heiden S, Sharkovska Y, von Websky K, Relle K, and Hocher B. Pulmonary fibrosis in L-NAME-treated mice is dependent on an activated endothelin system. *Can J Physiol Pharmacol* 86: 541-545, 2008.
108. Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, Tsutsui M, Koide S, Nakata S, Tanimoto A, Okazaki M, Sasaguri Y, Adachi T, and Otsuji Y. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 219-226, 2008.
109. Kawahara T, Quinn MT, and Lambeth JD. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol Biol* 7: 109, 2007.
110. Keller GA, Warner TG, Steimer KS, and Hallewell RA. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7381-7385, 1991.
111. Kelly FJ, and Mudway IS. Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids* 25: 375-396, 2003.
112. Kerem A, Yin J, Kaestle SM, Hoffmann J, Schoene AM, Singh B, Kuppe H, Borst MM, and Kuebler WM. Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization. *Circ Res* 106: 1103-1116.
113. Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, and Fukumoto M. NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 254: 237-243, 2000.
114. Kim EK, Lee JH, Oh YM, Lee YS, and Lee SD. Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Respirology* 15: 659-668.
115. King TE, Jr., Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA, Jr., Flint A, Thurlbeck W, and Cherniack RM. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1025-1032, 2001.
116. Kinnula VL, Chang L, Everitt JI, and Crapo JD. Oxidants and antioxidants in alveolar epithelial type II cells: in situ, freshly isolated, and cultured cells. *Am J Physiol* 262: L69-77, 1992.

117. Kinnula VL, Chang LY, Ho YS, and Crapo JD. Hydrogen peroxide release from alveolar macrophages and alveolar type II cells during adaptation to hyperoxia in vivo. *Exp Lung Res* 18: 655-673, 1992.
118. Kinnula VL, Crapo JD, and Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* 73: 3-19, 1995.
119. Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, and Oury TD. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 417-422, 2005.
120. Kinnula VL, Yankaskas JR, Chang L, Virtanen I, Linnala A, Kang BH, and Crapo JD. Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have significant antioxidative capacity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 568-576, 1994.
121. Klahr S. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 1: 60-62, 2001.
122. Kolb M, Margetts PJ, Galt T, Sime PJ, Xing Z, Schmidt M, and Gauldie J. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 770-777, 2001.
123. Kolpakov V, Gordon D, and Kulik TJ. Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 76: 305-309, 1995.
124. Kramer S, Reynolds FH, Jr., Castillo M, Valenzuela DM, Thorikay M, and Sorvillo JM. Immunological identification and distribution of parathyroid hormone-like protein polypeptides in normal and malignant tissues. *Endocrinology* 128: 1927-1937, 1991.
125. Kunes J, Hojna S, Kadlecova M, Dobesova Z, Rauchova H, Vokurkova M, Loukotova J, Pechanova O, and Zicha J. Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. *Physiol Res* 53 Suppl 1: S23-34, 2004.
126. Kuwano K, Hagimoto N, Maeyama T, Fujita M, Yoshimi M, Inoshima I, Nakashima N, Hamada N, Watanabe K, and Hara N. Mitochondria-mediated apoptosis of lung epithelial cells in idiopathic interstitial pneumonias. *Lab Invest* 82: 1695-1706, 2002.
127. Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M, Nomoto Y, Hagimoto N, Nakanishi Y, and Hara N. P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 477-483, 1996.
128. Kuwano K, Nakashima N, Inoshima I, Hagimoto N, Fujita M, Yoshimi M, Maeyama T, Hamada N, Watanabe K, and Hara N. Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 21: 232-240, 2003.
129. Lam MH, Briggs LJ, Hu W, Martin TJ, Gillespie MT, and Jans DA. Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J Biol Chem* 274: 7391-7398, 1999.
130. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181-189, 2004.
131. Lassegue B, and Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 653-661.
132. Leask A, and Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18: 816-827, 2004.
133. Lehoux S, Castier Y, and Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* 259: 381-392, 2006.
134. Lenz AG, Costabel U, and Maier KL. Oxidized BAL fluid proteins in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 9: 307-312, 1996.
135. Li S, Tabar SS, Malec V, Eul BG, Klepetko W, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Rose F, and Hanze J. NOX4 regulates ROS levels under normoxic and hypoxic conditions, triggers proliferation, and inhibits apoptosis in pulmonary artery adventitial fibroblasts. *Antioxid Redox Signal* 10: 1687-1698, 2008.
136. Liou W, Chang LY, Geuze HJ, Strous GJ, Crapo JD, and Slot JW. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic Biol Med* 14: 201-207, 1993.

137. Loenders B, Van Mechelen E, Nicolai S, Buysens N, Van Osselaer N, Jorens PG, Willems J, Herman AG, and Slegers H. Localization of extracellular superoxide dismutase in rat lung: neutrophils and macrophages as carriers of the enzyme. *Free Radic Biol Med* 24: 1097-1106, 1998.
138. Looi YH, Grieve DJ, Siva A, Walker SJ, Anilkumar N, Cave AC, Marber M, Monaghan MJ, and Shah AM. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 51: 319-325, 2008.
139. Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Flores-Hernandez J, Monjaraz E, Cogolludo A, and Perez-Vizcaino F. Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L727-732, 2008.
140. Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW, and Aaronson SA. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J* 21: 2180-2188, 2002.
141. MacLean MR, Graham J, and McGrath JC. Endogenous nitric oxide modulates vaso-pressor responses, but not depressor responses, to spinal sympathetic nerve stimulation in pithed rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 23: 319-325, 1994.
142. Maeda S, Wu S, Juppner H, Green J, Aragay AM, Fagin JA, and Clemens TL. Cell-specific signal transduction of parathyroid hormone (PTH)-related protein through stably expressed recombinant PTH/PTHrP receptors in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 137: 3154-3162, 1996.
143. Maier K, Leuschel L, and Costabel U. Increased levels of oxidized methionine residues in bronchoalveolar lavage fluid proteins from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 143: 271-274, 1991.
144. Maina JN. Structure, function and evolution of the gas exchangers: comparative perspectives. *J Anat* 201: 281-304, 2002.
145. Malek AM, Izumo S, and Alper SL. Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Neurosurgery* 45: 334-344; discussion 344-335, 1999.
146. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 74: 1398-1403, 1984.
147. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7634-7638, 1982.
148. Marklund SL, Holme E, and Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 126: 41-51, 1982.
149. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh K, and Shimosegawa T. NADPH oxidase plays a crucial role in the activation of pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G99-G108, 2008.
150. Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig JJ, and Stewart AF. Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13630-13635, 1997.
151. Massfelder T, Helwig JJ, and Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein as a cardiovascular regulatory peptide. *Endocrinology* 137: 3151-3153, 1996.
152. Matthay MA, Folkesson HG, and Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 82: 569-600, 2002.
153. McCann PP, and Pegg AE. Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacol Ther* 54: 195-215, 1992.
154. McCord JM, and Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055, 1969.
155. McCurnin DC, Pierce RA, Chang LY, Gibson LL, Osborne-Lawrence S, Yoder BA, Kerecman JD, Albertine KH, Winter VT, Coalson JJ, Crapo JD, Grubb PH, and Shaul PW. Inhaled NO improves early pulmonary function and modifies lung growth and elas-

- tin deposition in a baboon model of neonatal chronic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L450-459, 2005.
156. McDowell SA, Gammon K, Zingarelli B, Bachurski CJ, Aronow BJ, Prows DR, and Leikauf GD. Inhibition of nitric oxide restores surfactant gene expression following nickel-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 188-198, 2003.
 157. McGowan SE, and Torday JS. The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development. *Annu Rev Physiol* 59: 43-62, 1997.
 158. McMillian M, Nie AY, Parker JB, Leone A, Bryant S, Kemmerer M, Herlich J, Liu Y, Yieh L, Bittner A, Liu X, Wan J, and Johnson MD. A gene expression signature for oxidant stress/reactive metabolites in rat liver. *Biochem Pharmacol* 68: 2249-2261, 2004.
 159. Michaeloudes C, Sukkar MB, Khorasani NM, Bhavsar PK, and Chung KF. TGF-beta regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300: L295-304.
 160. Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, and Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142: 37-46, 2005.
 161. Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, DeGraff WG, Ahn MS, Samuni U, and Russo A. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry* 29: 2802-2807, 1990.
 162. 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, and Weissmann N. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circ Res* 101: 258-267, 2007.
 163. Mohazzab KM, and Wolin MS. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 267: L815-822, 1994.
 164. Moncada S, and Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993.
 165. Moncada S, and Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S193-201, 2006.
 166. Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38: 1709-1715, 1989.
 167. Moore PK, and Handy RL. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase--is no NOS really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol Sci* 18: 204-211, 1997.
 168. Moshier JA, Dosesescu J, Skunca M, and Luk GD. Transformation of NIH/3T3 cells by ornithine decarboxylase overexpression. *Cancer Res* 53: 2618-2622, 1993.
 169. Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 355: 2003-2011, 2006.
 170. Nafz B, Wagner CD, and Persson PB. Endogenous nitric oxide buffers blood pressure variability between 0.2 and 0.6 Hz in the conscious rat. *Am J Physiol* 272: H632-637, 1997.
 171. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, and Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10045-10048, 1991.
 172. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064, 1992.
 173. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 219: 88-102, 2007.
 174. Nediani C, Raimondi L, Borchini E, and Cerbai E. Nitric oxide/reactive oxygen species generation and nitroso/redox imbalance in heart failure: from molecular mechanisms to therapeutic implications. *Antioxid Redox Signal* 14: 289-331.

175. Nguelefack TB, Mekhfi H, Dongmo AB, Dimo T, Watcho P, Zoheir J, Legssyer A, Kamanyi A, and Ziyayat A. Hypertensive effects of oral administration of the aqueous extract of *Solanum torvum* fruits in L-NAME treated rats: evidence from in vivo and in vitro studies. *J Ethnopharmacol* 124: 592-599, 2009.
176. Nilakantan V, Zhou X, Hilton G, Roza AM, Adams MB, Johnson CP, and Pieper GM. Hierarchical change in antioxidant enzyme gene expression and activity in acute cardiac rejection: role of inducible nitric oxide synthase. *Mol Cell Biochem* 270: 39-47, 2005.
177. Nilsson UA, Olsson LI, Carlin G, and Bylund-Fellenius AC. Inhibition of lipid peroxidation by spin labels. Relationships between structure and function. *J Biol Chem* 264: 11131-11135, 1989.
178. Numaguchi K, Egashira K, Takemoto M, Kadokami T, Shimokawa H, Sueishi K, and Takeshita A. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. *Hypertension* 26: 957-962, 1995.
179. Orloff JJ, Reddy D, de Papp AE, Yang KH, Soifer NE, and Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev* 15: 40-60, 1994.
180. Oury TD, Day BJ, and Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic Biol Med* 20: 957-965, 1996.
181. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, and 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* 94: 14483-14488, 1997.
182. Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, and Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol* 268: H2274-2280, 1995.
183. Palmer RM, Ashton DS, and Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666, 1988.
184. Palmer RM, Ferrige AG, and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
185. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., and Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27, 1990.
186. Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, and Orkin SH. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3319-3323, 1988.
187. Paulis L, Zicha J, Kunes J, Hojna S, Behuliak M, Celec P, Kojsova S, Pechanova O, and Simko F. Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. *Hypertens Res* 31: 793-803, 2008.
188. Pechanova O, Bernatova I, Pelouch V, and Simko F. Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. *J Mol Cell Cardiol* 29: 3365-3374, 1997.
189. Pechanova O, Dobesova Z, Cejka J, Kunes J, and Zicha J. Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. *J Hypertens* 22: 167-173, 2004.
190. Pegg AE. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 234: 249-262, 1986.
191. Pegg AE, and McCann PP. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 243: C212-221, 1982.
192. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 122: 286S-289S, 2002.
193. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, and Stewart AF. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76: 127-173, 1996.

194. Pirola CJ, Wang HM, Kamyar A, Wu S, Enomoto H, Sharifi B, Forrester JS, Clemens TL, and Fagin JA. Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 268: 1987-1994, 1993.
195. Pohjanpelto P, Holtta E, and Janne OA. Mutant strain of Chinese hamster ovary cells with no detectable ornithine decarboxylase activity. *Mol Cell Biol* 5: 1385-1390, 1985.
196. Pollock DM, Polakowski JS, Divish BJ, and Opgenorth TJ. Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension* 21: 660-666, 1993.
197. Qi S, den Hartog GJ, and Bast A. Superoxide radicals increase transforming growth factor-beta1 and collagen release from human lung fibroblasts via cellular influx through chloride channels. *Toxicol Appl Pharmacol* 237: 111-118, 2009.
198. Radomski MW, Palmer RM, and Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5193-5197, 1990.
199. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, and Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 810-816, 2006.
200. Rahman I, Biswas SK, and Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 533: 222-239, 2006.
201. Rahman I, and MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med* 21: 669-681, 1996.
202. Rahman I, Marwick J, and Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 68: 1255-1267, 2004.
203. Rees DD, Palmer RM, and Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 3375-3378, 1989.
204. Rehan VK, Sakurai R, Wang Y, Santos J, Huynh K, and Torday JS. Reversal of nicotine-induced alveolar lipofibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation by stimulants of parathyroid hormone-related protein signaling. *Lung* 185: 151-159, 2007.
205. Repine JE, Bast A, and Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 341-357, 1997.
206. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, and Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20: 298-303, 1992.
207. Richer C, Domergue V, Vincent MP, and Giudicelli JF. Involvement of nitric oxide, but not prostaglandins, in the vascular sympathoinhibitory effects of losartan in the pithed spontaneously hypertensive rat. *Br J Pharmacol* 117: 315-324, 1996.
208. Rossoni G, Manfredi B, De Gennaro Colonna V, Berti M, Guazzi M, and Berti F. Sildenafil reduces L-NAME-induced severe hypertension and worsening of myocardial ischaemia-reperfusion damage in the rat. *Br J Pharmacol* 150: 567-576, 2007.
209. Rubin LP, Kifor O, Hua J, Brown EM, and Torday JS. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein stimulate surfactant phospholipid synthesis in rat fetal lung, apparently by a mesenchymal-epithelial mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1223: 91-100, 1994.
210. Samuni AM, DeGraff W, Krishna MC, and Mitchell JB. Cellular sites of H₂O₂-induced damage and their protection by nitroxides. *Biochim Biophys Acta* 1525: 70-76, 2001.
211. Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, and Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 78: 225-230, 1996.
212. Schorr K, Taimor G, Degenhardt H, Weber K, and Schluter KD. Parathyroid hormone-related peptide is induced by stimulation of alpha 1A-adrenoceptors and improves resistance against apoptosis in coronary endothelial cells. *Mol Pharmacol* 63: 111-118, 2003.

-
213. Schultz CJ, Torres E, Londos C, and Torday JS. Role of adipocyte differentiation-related protein in surfactant phospholipid synthesis by type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L288-296, 2002.
214. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, and Gabbiani G. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 142: 873-881, 1998.
215. Setnikar I. [Origin and significance of the mechanical property of the lung]. *Arch Fisiol* 55: 349-374, 1955.
216. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, and Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13176-13181, 1996.
217. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291-295, 1997.
218. Sigmon DH, Carretero OA, and Beierwaltes WH. Endothelium-derived relaxing factor regulates renin release in vivo. *Am J Physiol* 263: F256-261, 1992.
219. Sime PJ, and O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol* 99: 308-319, 2001.
220. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, and Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 100: 768-776, 1997.
221. Simko F, Matuskova J, Luptak I, Pincikova T, Krajcovicova K, Stvrtina S, Pomsar J, Pelouch V, Paulis L, and Pechanova O. Spironolactone differently influences remodeling of the left ventricle and aorta in L-NAME-induced hypertension. *Physiol Res* 56 Suppl 2: S25-32, 2007.
222. Simko F, and Simko J. The potential role of nitric oxide in the hypertrophic growth of the left ventricle. *Physiol Res* 49: 37-46, 2000.
223. Sirker A, Zhang M, and Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol* 106: 735-747.
224. Sobin SS, Fung YC, and Tremmer HM. Collagen and elastin fibers in human pulmonary alveolar walls. *J Appl Physiol* (1985) 64: 1659-1675, 1988.
225. Sohal RS, and Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63, 1996.
226. Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS, and Harrison DG. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation* 101: 1722-1728, 2000.
227. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-1224, 1992.
228. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928: 22-38, 2001.
229. Stauss HM, Godecke A, Mrowka R, Schrader J, and Persson PB. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension* 33: 1359-1363, 1999.
230. Stauss HM, and Persson PB. Role of Nitric Oxide in Buffering Short-Term Blood Pressure Fluctuations. *News Physiol Sci* 15: 229-233, 2000.
231. Steglich C, Grens A, and Scheffler IE. Chinese hamster cells deficient in ornithine decarboxylase activity: reversion by gene amplification and by azacytidine treatment. *Somat Cell Mol Genet* 11: 11-23, 1985.
232. Stenmark KR, and Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 59: 89-144, 1997.
233. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, and Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 2032-2036, 1995.
234. Sun P, Wang J, Mehta P, Beckman DL, and Liu L. Effect of nitric oxide on lung surfactant secretion. *Exp Lung Res* 29: 303-314, 2003.
-

-
235. Swislocki A, Eason T, and Kaysen GA. Oral administration of the nitric oxide biosynthesis inhibitor, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), causes hypertension, but not glucose intolerance or insulin resistance, in rats. *Am J Hypertens* 8: 1009-1014, 1995.
236. Tabor CW, and Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749-790, 1984.
237. Talarek S, Listos J, and Fidecka S. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on benzodiazepine withdrawal in mice and rats. *Pharmacol Rep* 63: 680-689.
238. Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, and Thomas PE. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278: 12384-12389, 2003.
239. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, 3rd, and Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 55: 395-417, 2004.
240. Thomas M, Docx C, Holmes AM, Beach S, Duggan N, England K, Leblanc C, Lebreton C, Schindler F, Raza F, Walker C, Crosby A, Davies RJ, Morrell NW, and Budd DC. Activin-like kinase 5 (ALK5) mediates abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells from patients with familial pulmonary arterial hypertension and is involved in the progression of experimental pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline. *Am J Pathol* 174: 380-389, 2009.
241. Thomas T, and Thomas TJ. Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* 7: 113-126, 2003.
242. Tickner J, Fan LM, Du J, Meijles D, and Li JM. Nox2-derived ROS in PPARgamma signaling and cell-cycle progression of lung alveolar epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 51: 763-772.
243. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, and Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 349-363, 2002.
244. Torday J, Hua J, and Slavin R. Metabolism and fate of neutral lipids of fetal lung fibroblast origin. *Biochim Biophys Acta* 1254: 198-206, 1995.
245. Torday JS, and Rehan VK. Mechanotransduction determines the structure and function of lung and bone: a theoretical model for the pathophysiology of chronic disease. *Cell Biochem Biophys* 37: 235-246, 2003.
246. Torday JS, and Rehan VK. Stretch-stimulated surfactant synthesis is coordinated by the paracrine actions of PTHrP and leptin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L130-135, 2002.
247. Torday JS, Torday DP, Gutnick J, Qin J, and Rehan V. Biologic role of fetal lung fibroblast triglycerides as antioxidants. *Pediatr Res* 49: 843-849, 2001.
248. Torday JS, Torres E, and Rehan VK. The role of fibroblast transdifferentiation in lung epithelial cell proliferation, differentiation, and repair in vitro. *Pediatr Pathol Mol Med* 22: 189-207, 2003.
249. Torok J, and Kristek F. Beneficial effect of pentaerythryl tetranitrate on functional and morphological changes in the rat thoracic aorta evoked by long-term nitric oxide synthase inhibition. *Vascul Pharmacol* 38: 177-182, 2002.
250. Trapnell BC, Whitsett JA, and Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 349: 2527-2539, 2003.
251. Tsan MF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice (Review). *Int J Mol Med* 7: 13-19, 2001.
252. Tseng CJ, Liu HY, Lin HC, Ger LP, Tung CS, and Yen MH. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension* 27: 36-42, 1996.
253. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, and Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 269: C1371-1378, 1995.
254. Vaccaro C, and Brody JS. Ultrastructure of developing alveoli. I. The role of the interstitial fibroblast. *Anat Rec* 192: 467-479, 1978.
-

-
255. Vallance P, Collier J, and Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2: 997-1000, 1989.
256. Vallance P, Collier J, and Moncada S. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc Res* 23: 1053-1057, 1989.
257. Vallyathan V, and Shi X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 1: 165-177, 1997.
258. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, and Taddei S. The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man. *Exp Physiol* 94: 317-321, 2009.
259. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59: 1428-1459, 2002.
260. Volpp BD, Nauseef WM, and Clark RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 242: 1295-1297, 1988.
261. Wang CL, Kang J, and Li ZH. [Increased expression of NADPH oxidase p47-PHOX and p67-PHOX factor in idiopathic pulmonary fibrosis]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 30: 265-268, 2007.
262. Wanstall JC, Kaye JA, and Gambino A. The in vitro pulmonary vascular effects of FK409 (nitric oxide donor): a study in normotensive and pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 121: 280-286, 1997.
263. Whaley-Connell A, Habibi J, Nistala R, Cooper SA, Karuparthi PR, Hayden MR, Rehmer N, DeMarco VG, Andresen BT, Wei Y, Ferrario C, and Sowers JR. Attenuation of NADPH oxidase activation and glomerular filtration barrier remodeling with statin treatment. *Hypertension* 51: 474-480, 2008.
264. White ES, Lazar MH, and Thannickal VJ. Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 201: 343-354, 2003.
265. Whitsett JA, Wert SE, and Weaver TE. Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. *Annu Rev Pathol* 10: 371-393.
266. Whittle BJ, Lopez-Belmonte J, and Rees DD. Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. *Br J Pharmacol* 98: 646-652, 1989.
267. Widder JD, and Harrison DG. Can vitamin E prevent cardiovascular events and cancer? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2: 510-511, 2005.
268. Wilcox CS, and Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev* 60: 418-469, 2008.
269. Wysolmerski JJ, Broadus AE, Zhou J, Fuchs E, Milstone LM, and Philbrick WM. Overexpression of parathyroid hormone-related protein in the skin of transgenic mice interferes with hair follicle development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1133-1137, 1994.
270. Wysolmerski JJ, McCaughern-Carucci JF, Daifotis AG, Broadus AE, and Philbrick WM. Overexpression of parathyroid hormone-related protein or parathyroid hormone in transgenic mice impairs branching morphogenesis during mammary gland development. *Development* 121: 3539-3547, 1995.
271. Xiong C, Mou Y, Zhang J, Fu M, Chen YE, Akinbami MA, and Cui T. Impaired expression of PPAR gamma protein contributes to the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 77: 3037-3048, 2005.
272. Yoo HY, Chang MS, and Rho HM. The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem* 274: 23887-23892, 1999.
273. Zhang HY, and Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 658-665, 1999.
274. Zhang X, Zhang Y, Tao B, Teng L, Li Y, Cao R, Gui Q, Ye M, Mou X, Cheng H, Hu H, Zhou R, Wu X, Xie Q, Ning W, Lai M, Shen H, Feng GS, and Ke Y. Loss of Shp2 in al-

- veoli epithelia induces deregulated surfactant homeostasis, resulting in spontaneous pulmonary fibrosis. *FASEB J* 26: 2338-2350.
275. Zhao W, Chen SS, Chen Y, Ahokas RA, and Sun Y. Kidney fibrosis in hypertensive rats: role of oxidative stress. *Am J Nephrol* 28: 548-554, 2008.
276. Zicha J, Dobesova Z, and Kunes J. Antihypertensive mechanisms of chronic captopril or N-acetylcysteine treatment in L-NAME hypertensive rats. *Hypertens Res* 29: 1021-1027, 2006.
277. Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, and Hayoz D. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 32: 351-355, 1998.
278. Zou MH, Cohen R, and Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium* 11: 89-97, 2004.

12. Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Originalarbeiten:

- a) **„Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Progredienz hochdruckvermittelter Herzinsuffizienz bei hypertensiven Ratten“**

Rui Manuel da Costa Rebelo, (2010)

- b) **„TGF- β 1 induzierte Deposition extrazellulärer Matrixproteine im Tiermodell transgener eNOS \pm Mäuse“**

Svenja Forst, (2009)

Abstracts:

1. **„Effect of nitric oxide deficiency on the pulmonary PTHrP system“**

Brockhoff, B., Schreckenberger, R., Forst, S., Heger, J., Bencsik, P., Kiss, K., Ferdinandy, P., Schulz, R. and Schlüter, K.-D., (2016)

J. Cell. Mol. Med.. doi:10.1111/jcmm.12942

Journal of Cellular and Molecular Medicine

13. Ehrenwörtliche Erklärung

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

Frankfurt, im Juni 2019

Bastian Brockhoff

14. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Schlüter vielmals, für die Überlassung des Themas und die umfassende sowie stets hervorragende wissenschaftliche Betreuung im Rahmen der Dissertationsanfertigung. Ebenso möchte ich mich ausdrücklich, für die mir entgegengebrachte Geduld während des gesamten Betreuungszeitraumes bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des Physiologischen Instituts, insbesondere bei Frau Nadine Woitasky sowie bei Herrn Dr. Rolf Schreckenbergr für die tatkräftige Unterstützung sowie die zahlreichen Anregungen bedanken. Ohne diese Hilfestellungen wäre mir die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, welche in persönlich schweren und angespannten Zeiten immer dafür gesorgt hat, dass ich mich voll und ganz auf mein Studium und die Fertigstellung meiner Dissertation konzentrieren konnte. Für die tatkräftige Unterstützung meiner Geschwister – die in den letzten Jahren so manches Mal ohne Weiteres für mich eingesprungen sind und ihre Zeit geopfert haben, wenn ich nicht vor Ort sein konnte – bin ich selbstverständlich nicht minder dankbar. Meinem Vater möchte ich dafür danken, dass er so war, wie er war und mir stets vorgelebt hat, dass man sich nicht verbiegen lassen sollte.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Rosanna bedanken, die mir in den letzten Jahren immer wieder gezeigt hat, wie wichtig und – vor allem – lohnenswert es ist, sich auf Neues und Unbekanntes einzulassen. Ohne deine Aufgeschlossenheit und deine stetige Motivation, wären mir die schönsten Momente und Erfahrungen meines Lebens verschlossen geblieben.

