

# **Hypoxieabhängige Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in Zellen der pulmonalen Strombahn - die Rolle von NADPH-Oxidasen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ahmet Bal  
aus Fürth

Giessen 2010

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik II  
Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Gutachter: Prof. Dr. Susanne Rohrbach

Tag der Disputation: 09.12.2010

***Meiner Familie gewidmet***

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

Erlangen, den 09.02.2010

Ahmet Bal

## Abkürzungsverzeichnis

bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
sog.	so genannt
z.B.	zum Beispiel
u.a.	unter anderem
ca.	zirka
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
Hg	Quecksilber
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
N <sub>2</sub>	Stickstoff
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
PO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PH	pulmonale Hypertonie (Lungenhochdruck)
ROS	engl.: reactive oxygen species; Reaktive Sauerstoffspezies
PAP	engl.: pulmonary arterial pressure, pulmonalarterieller Druck
LVP	engl.: left ventricular pressure, linksventrikulärer Druck
KO	Knock-out; Defizienz für ein bestimmtes Gen
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
Phox	phagozytäre Oxidase
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PK	Proteinkinase
PK-C	Proteinkinase C
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

RNS	engl.: reactive nitroxide species; Reaktive Stickstoffspezies
NO	Stickstoffmonoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
KO	Knock-Out, Deletion eines Gens
°C	Grad Celsius
USA	United States of America
PCR	Polymerase Chain Reaktion

# Inhaltsverzeichnis

Hypoxieabhängige Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in Zellen der pulmonalen Strombahn - die Rolle von NADPH-Oxidasen .....	I
1. Einleitung .....	4
1.1. Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion .....	4
1.2. Pathophysiologie der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion .....	5
1.3. Akute hypoxische Vasokonstriktion und O <sub>2</sub> - sensing .....	6
1.4. NADP(H)-Oxidasen .....	7
1.4.1. Aufbau und Funktion .....	7
1.5. Reaktive Sauerstoffspezies .....	10
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit .....	11
2. Material und Methoden .....	13
2.1. Experimentelle Agenzien und Pharmaka .....	13
2.2. Zellkulturmaterial .....	14
2.3. Isolierung von pulmonalarteriellen und aortalen glatten Muskelzellen (PASMC/ASMC) und Fibroblasten (PAFB/AFB) .....	16
2.4. Zellkultur .....	16
2.4.1. PASMC, ASMC, PAFB und AFB .....	16
2.4.2. HL60- Zellen .....	17
2.5. Elektronenspinresonanz Spektroskopie .....	17
2.5.1. Physikalische Grundlagen .....	18
2.5.2. Apparative Grundlagen .....	28
2.6. ESR-Messungen .....	31
2.6.1. Einstellungen des ESR Spektrometers .....	31
2.6.2. Datenerfassung .....	33
2.6.3. Versuchsdurchführung .....	33
2.7. Statistik .....	36
3. Ergebnisse .....	37
3.1. Untersuchung der Superoxidfreisetzung in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration .....	37
3.1.1. HL60-Zellen .....	37
3.1.2. PASMC, ASMC, PAFB und AFB .....	39
3.2. Untersuchung der Änderung der Superoxidfreisetzung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen nach Stimulierung der NAD(P)H-Oxidasen .....	43
3.2.1. HL60-Zellen .....	43
3.2.2. PASMC, ASMC, PAFB und AFB .....	44
3.2.3. Einfluß der NAD(P)H-Oxidase auf die Superoxidfreisetzung von PASMC .....	49
4. Diskussion .....	51

4.1. Messung von ROS und die Elektronenspinresonanz Spektroskopie .....	52
4.2. Andere Methoden neben ESR .....	54
4.2.1. Cytochrom C Reduktion .....	54
4.2.2. Auf Chemilumineszenz basierende Methoden .....	56
4.2.3. Dihydroethidium .....	59
4.2.4. 2'-7'-dichlorofluorescein-diacetat .....	59
4.2.5. Amplex Red .....	60
4.3. Untersuchung der Superoxidfreisetzung in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration .....	60
4.3.1. HL60-Zellen .....	61
4.3.2. ASMC und PASMC .....	61
4.3.3. PAFB und AFB .....	62
4.4. Untersuchung der Änderung der Superoxidfreisetzung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen nach Stimulierung der NADP(H)-Oxidasen .....	63
4.4.1. HL60-Zellen .....	65
4.4.2. ASMC und PASMC .....	66
4.4.3. PAFB und AFB .....	70
4.5. Fazit .....	70
5. Zusammenfassung .....	72
6. Summary .....	73
7. Literaturverzeichnis .....	74
8. Abstracts und veröffentlichte Vorträge .....	85
9. Danksagung .....	86

## 1. Einleitung

### 1.1. Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) ist ein physiologischer Mechanismus präkapillärer pulmonalarterieller Gefäße, der das gemischt-venöse Blut von unterventilierten, hypoxischen Alveolen zu besser ventilerten Arealen der Lunge umverteilt, um so die Perfusion der Ventilation anzupassen und dadurch den Gasaustausch zu verbessern. Die HPV wurde 1946 das erste mal von **VON EULER UND LILJESTRAND** an der Katze genauestens beschrieben <sup>1</sup> und führte anschließend zu bedeutenden, grundlegenden und klinisch relevanten Kenntnissen über die pulmonale Zirkulation <sup>2, 3</sup>. Bis heute ist jedoch ungeklärt, welche Zellen als Sauerstoffsensoren fungieren, welche subzelluläre Struktur diese darstellt und wie der Mechanismus der inter- oder intrazellulären biochemischen Signaltransduktion bis hin zum Effektor, der Kontraktion der glatten Muskulatur, funktioniert.

Unter normoxischen Bedingungen stellt die pulmonale Zirkulation ein Niederdrucksystem und die systemische Zirkulation ein Hochdrucksystem dar. In der systemischen Zirkulation führt die Hypoxämie zu einer Vasodilatation, die die Sauerstoffzufuhr in die Körperperipherie erhöht. Im Vergleich hierzu führt die Hypoxie jedoch in den kleinen Widerstandsgefäßen der Lunge zu einer Vasokonstriktion <sup>4</sup>.

In dem sich entwickelnden Fetus findet der Gasaustausch über die Plazenta statt. Damit der Blutfluss von der fetalen Lunge abgeschnürt und in den Ductus arteriosus botalli (DA) umgelenkt wird, ist hierbei die HPV für die Aufrechterhaltung des hohen pulmonalarteriellen Widerstandes zuständig. Dies ändert sich jedoch post partum. Die Lunge übernimmt ihre Rolle als ein gasaustauschendes Organ und führt gleichzeitig zu einer Relaxierung der pulmonalen Gefäße und dadurch zur Perfusion der Lunge <sup>4</sup>.

Die HPV kann als ein schneller, reversibler Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes auf Hypoxie definiert werden. Eine bedeutende Rolle spielen dabei die kleinen muskulären Pulmonalarterien <sup>5</sup>.

Die HPV ist weitestgehend von dem alveolären und nicht vom gemischt-venösen  $pO_2$  abhängig<sup>6</sup> und setzt innerhalb von wenigen Sekunden als Antwort auf eine Atemwegshypoxie mit einem Abfall des Sauerstoffgehaltes unter den Grenzbereich von etwa 10% der fraktional inspirierten Sauerstoffkonzentration ( $FiO_2$ ) ein<sup>7,8</sup>.

Die HPV weist häufig einen biphasischen Charakter auf. Die erste Phase zeichnet sich durch einen innerhalb von Sekunden einsetzenden Anstieg mit anschließendem Abfall des pulmonalarteriellen Druckes aus, wobei die zweite Phase einen verlangsamten Anstieg zeigt. Diese Beobachtungen wurden sowohl an intakten Hunde<sup>9</sup>, Kaninchen<sup>8,10</sup> und Menschenlungen<sup>10</sup> als auch an isolierten Frettchenlungen<sup>11</sup> gemacht. Die erste Phase der HPV vollzieht sich unabhängig vom Endothel, wobei die zweite Phase vom Endothel abhängig ist<sup>12-23</sup>.

Wenn nur ein kleiner Bereich der Lunge hypoxisch ist, dann bewirkt die dadurch entstehende HPV keine signifikante Änderung des gesamt-pulmonalarteriellen Druckes<sup>24</sup>. Im Gegensatz dazu führt jedoch die globale Hypoxie - wie bereits bei mehreren Krankheiten und extremen Höhen beobachtet - zu einer HPV mit generellem pulmonalarteriellen Druckanstieg und kann sogar zur morphologisch fixierten pulmonalen Hypertonie und infolgedessen zum Cor pulmonale chronifizieren und schließlich zum Tode führen.

## **1.2. Pathophysiologie der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion**

Ist die HPV unter pathophysiologischen Bedingungen vermindert oder nicht existent, kann dies zu einer verminderten Oxygenierung des arteriellen Blutes führen<sup>25</sup>. Dies kann beim acute respiratory distress syndrome (ARDS)<sup>26</sup> oder beim hepatopulmonalem Syndrom<sup>27</sup> auftreten. Den genannten Syndromen steht wiederum eine Gruppe von Leiden gegenüber, die eine globale pulmonale Hypoventilation und somit alveoläre Hypoxie hervorrufen. Diese Konstellation tritt beispielsweise bei Bewohnern in extremen Höhen, bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), bei der Pneumonie und Fibrose auf. Der hierbei in allen Lungenarealen aktivierte Euler-Liljestrand-Mechanismus trägt mit zur Pathogenese bei. Die beim Gesunden notwendige und sinnvolle Vasokonstriktion im Bereich hypoxischer Alveolen führt bei diesen Patienten zu einer Verringerung des

Gesamtquerschnittes der pulmonalen Strombahn. Bei aus physiologischer Notwendigkeit abnehmendem Herzzeitvolumen ist die direkte Folge ein Anstieg des totalen pulmonalarteriellen Widerstandes mit konsekutiver Druckerhöhung im Lungenkreislauf, der sogenannten pulmonalen Hypertonie (PH). Die permanente Vasokonstriktion kann zu einem Umbau der Lungengefäße mit Hypertrophie und Hyperplasie der Gefäßmuskulatur führen<sup>28</sup>; die zunächst reversible pulmonale Hypertonie wird morphologisch fixiert. Der rechte Ventrikel hält der Druckbelastung nicht ohne Veränderungen stand und hypertrophiert bei chronischer Belastung. Dies kann schließlich zu einem Cor pulmonale führen<sup>29</sup>. Die chronische HPV und die durch Hypoxie veränderte Regulation können zu einer hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie führen<sup>25</sup>.

Wichtig in diesem Kontext ist zum einen die Aktivierung einer gestörten HPV, um den Gasaustausch zu verbessern, und zum anderen eine globale HPV zu supprimieren um eine PH abzuschwächen<sup>30</sup>.

### **1.3. Akute hypoxische Vasokonstriktion und O<sub>2</sub>-sensing**

Das Wissen über die Sauerstoffsensormechanismen und die zugrundeliegenden Signaltransduktionskaskaden der HPV hat innerhalb des letzten Jahrzehntes zugenommen. Der Sauerstoffsensor wird als initiales Glied der Signalkette der HPV betrachtet. Für die Erforschung des Sauerstoffsensors wurden verschiedene Untersuchungen wie beispielsweise an Menschen<sup>10</sup> und Tieren<sup>9, 11, 31</sup>, teil-isolierten Lungen, isolierten, artifiziell ventilerten und blutfrei perfundierten Lungen<sup>9, 11, 31</sup>, sowie isolierten Pulmonalgefäßen, Zellen und subzellulären Strukturen durchgeführt<sup>28</sup>.

Obwohl die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) der Gefäßwand weder in direktem Kontakt mit dem Blut noch mit dem Alveolarraum stehen, werden sie als Sensorzelle für die HPV diskutiert<sup>32-35</sup>. Diese These wird zudem durch die Beobachtung gestützt, dass pulmonalarterielle glatte Muskelzellen und pulmonalarterielle Gefäßringe als Reaktion auf Hypoxie kontrahieren, selbst wenn die endotheliale Zellschicht entfernt wurde<sup>36, 37</sup>. Andere Arbeitsgruppen konnten zusätzlich zeigen, dass die HPV vom Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) im Blut unabhängig ist und allein durch den pO<sub>2</sub> im Alveolarraum initiiert wird.

Als Sauerstoffsensoren in PASMC werden im wesentlichen Mitochondrien<sup>37-43</sup> und nicht-phagozytäre NAD(P)H-Oxidasen<sup>25, 44-47</sup> diskutiert.

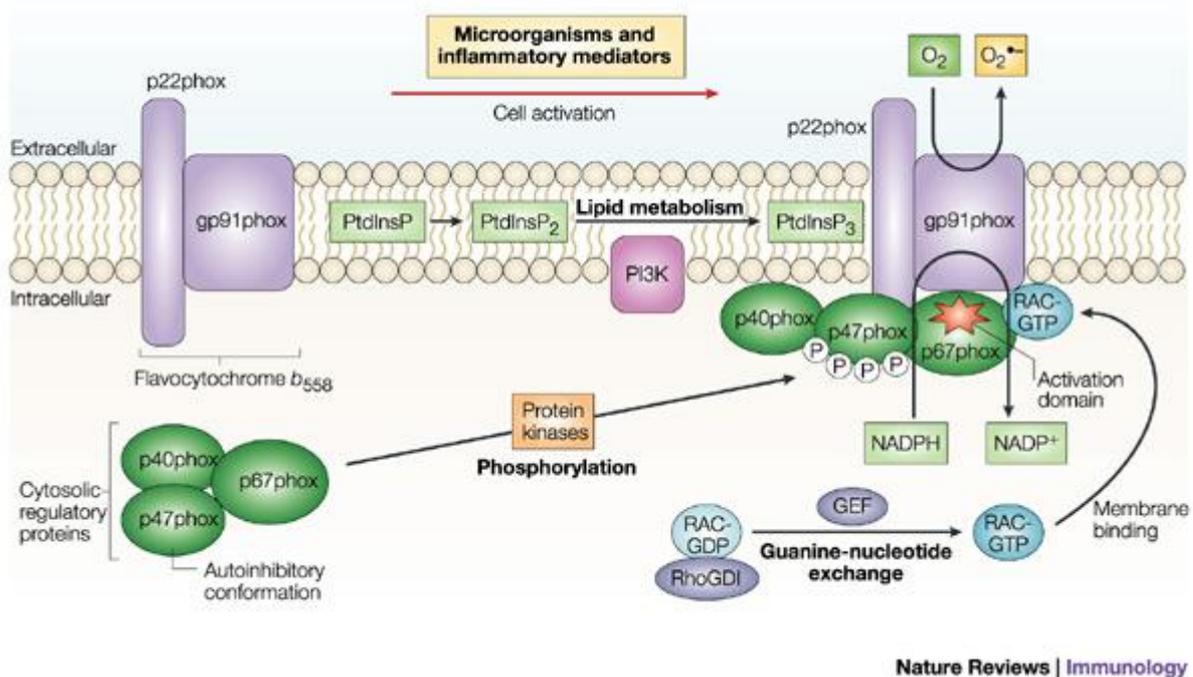
## **1.4. NADP(H)-Oxidasen**

NAD(P)H-Oxidasen wurden als reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-produzierende Systeme phagozytierender Zellen<sup>48, 49</sup> beschrieben. Diese Zellen setzen als Antwort auf eingedrungene Mikroorganismen eine hohe Menge an Sauerstoffradikalen frei, durch die der Sauerstoffverbrauch der Zelle um das über hundertfache ansteigt. Dieser Vorgang wird auch als „oxidativer/respiratorischer Burst“ bezeichnet<sup>50</sup>. Das Hauptprodukt des oxidativen Bursts ist Superoxid ( $\dot{O}_2^-$ ), das durch die Ein-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff entsteht und das Vorläufermolekül einer Vielzahl weiterer ROS ist ( $OH^-$ ,  $H_2O_2$ ). In nicht-phagozytierenden Zellen, wie beispielsweise Endothelzellen<sup>51-53</sup>, Fibroblasten<sup>45, 54, 55</sup> und glatten Muskelzellen<sup>46, 56</sup>, setzen NAD(P)H-Oxidasen ROS in geringen Mengen möglicherweise als Signalmoleküle frei. Hier können ROS wichtige Funktionen des Zellzyklus, der Aktivität von Enzymen und der Genexpression übernehmen<sup>57-62</sup>.

### **1.4.1. Aufbau und Funktion**

Nicht-phagozytäre NAD(P)H-Oxidasen sind in ihrer Struktur homolog zu phagozytären NAD(P)H-Oxidasen. Die verschiedenen Bezeichnungen für homologe Strukturen werden bei der Beschreibung der einzelnen Untereinheiten behandelt. Die aktive NAD(P)H-Oxidase ist ein Multiprotein-Komplex und setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen (Abbildung 1-1). Eine Untereinheit ist das membrangebundene Glykoprotein gp91<sup>phox</sup>, inzwischen auch Nox-2 genannt. Dieses Protein hat katalytische Funktion und beinhaltet die gesamte Redox-Maschinerie, die nötig ist, um Elektronen von NAD(P)H auf der zytoplasmatischen Seite über FAD und zwei Hämproteine auf molekularen Sauerstoff im extrazellulären Raum zu übertragen. Für Nox-2 wurden insgesamt sechs Isoformen beschrieben, die in unterschiedlichen Zelltypen vorkommen und  $\dot{O}_2^-$  intra- oder extrazellulär freisetzen.

Griendling und Mitarbeiter beschrieben 1997 die in vaskulären glatten Muskelzellen vorkommende Isoform Nox-1<sup>56</sup>. Diese Isoform soll nach Arnold et al. und Suh et al. auch an Signaltransduktionskaskaden beteiligt sein, die zu Hypertrophie und Zellproliferation führen<sup>63, 64</sup>. Neben Nox-1 wurde von Cheng et al. und Banfi et al. eine weitere Nox-Isoform, Nox-3, beschrieben<sup>65-67</sup>. Nox-3 kommt überwiegend in fetalem Nierengewebe und in der Leber vor. Die Isoform Nox-4 wurde in Nierengewebe und in kardialen Endothelzellen nachgewiesen<sup>68, 69</sup>. Die Funktion der Isoform Nox-5, ist regulatorischer Natur für das Wachstum von Krebszellen<sup>70</sup>. Neben diesen Isoformen wurden zwei weitere Ausprägungen der gp91<sup>phox</sup>-Untereinheit charakterisiert. Diese weisen eine zusätzliche Transmembrandomäne auf und wurden als Duox-1 und Duox-2 bezeichnet, wobei sich der Name aus der Abkürzung für „Dual Oxidase“ zusammensetzt<sup>71-73</sup>. Die zweite membrangebundene Untereinheit aktiver NAD(P)H-Oxidasen ist das nicht glykolysierte Protein p22<sup>phox</sup>. Zusammen mit gp91<sup>phox</sup> bildet es einen stabilen Komplex, der das Zytochrom b<sub>558</sub> mit einschließt<sup>4, 25</sup>. p22<sup>phox</sup> besitzt an seinem C-Terminus eine Bindungsstelle für das regulatorische zytoplasmatische Protein p47<sup>phox</sup> und trägt damit wesentlich zur Bildung der aktiven NAD(P)H-Oxidase bei. Zudem ist p22<sup>phox</sup> wichtig für die Regulation der katalytisch aktiven gp91<sup>phox</sup>-Untereinheit<sup>44, 47-49, 51, 55, 74</sup>. Neben den beiden erwähnten integralen Membranproteinen sind an der Bildung aktiver NAD(P)H-Oxidasen drei zytosolische Untereinheiten beteiligt, die als Komplex vorliegen (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>). Sie liegen normalerweise frei im Zytosol vor und komplexieren erst auf einen Stimulus hin, um dann an Zytochrom b<sub>558</sub> zu binden. Zu den zytosolischen Untereinheiten gehört das regulatorisch aktive Adapterprotein p47<sup>phox</sup>. Im nicht aktiviertem Zustand liegt dieses Protein in autoinhibitorischer Konfiguration vor. Nach Stimulierung bindet dieses Protein an p22<sup>phox</sup> des Zytochroms b<sub>558</sub><sup>44, 47-49, 51, 55, 74</sup>. Ein weiteres NAD(P)H-Oxidase spezifisches regulatorisches Protein ist p67<sup>phox</sup>. Es bindet an aktiviertes p47<sup>phox</sup> und wird dann als Komplex zur Zellmembran translokiert. Zusammen mit der GTPase Rac aktiviert p67<sup>phox</sup> den NAD(P)H-Oxidase Komplex. Die GTPase Rac ist bis zur Stimulation an das inhibitorische Protein RhoGDI im Zytosol gebunden. Nach Stimulation löst sich Rac von dem Inhibitor, bindet an der Zellmembran GTP und wird dadurch aktiviert. Wie bereits erwähnt, bindet es in der aktiven Form an die p67<sup>phox</sup>-Untereinheit und ist somit notwendig für die Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen<sup>44, 47-49, 51, 55, 74</sup>.



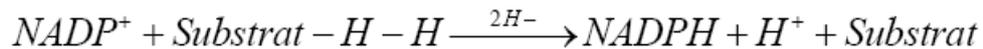
Nature Reviews | Immunology

Abbildung 1-1: Die klassische NAD(P)H-Oxidase (aus <sup>75</sup>).

Die dritte Untereinheit, die zur Bildung des Komplexes benötigt wird, ist p40<sup>phox</sup>. Das Protein funktioniert wie ein Adapter für die gp91<sup>phox</sup>-Untereinheit und reguliert folglich auch die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase. Im Zytosol bindet p40<sup>phox</sup> an p67<sup>phox</sup>, ohne dessen Bindungsfähigkeit für das p47<sup>phox</sup> Protein zu beeinträchtigen. Alle drei genannten Proteine formen im Zytosol einen trimeren Komplex, der als Ganzes zur Zellmembran wandert, wo die Interaktion von p67<sup>phox</sup> mit Rac-GTP stattfindet <sup>44, 47-49, 51, 55, 74</sup>. Die homologen Proteine zu p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup>, die in nicht-phagozytären Zellen vorkommen, wurden gemäß ihrer organisierenden bzw. aktivierenden Funktion benannt. Das organisierende Protein p47<sup>phox</sup> trägt in nicht-phagozytären NAD(P)H-Oxidasen den Namen Nox-Organizer, NoxO1, und das aktivierende Protein p67<sup>phox</sup> wird Nox-Aktivator, NoxA1, genannt <sup>67, 76-78</sup>.

Allen NAD(P)H-Oxidasen gemein ist die Umwandlung von NAD(P)H zu NAD(P)<sup>+</sup> + H<sup>+</sup>. Dabei dient NAD(P)H als Trägermolekül für Elektronen. In einer typischen Oxidations-Reduktions-Reaktion gibt ein Substrat zwei Protonen (H<sup>+</sup>) und zwei Elektronen (e<sup>-</sup>) ab. Ein H<sup>+</sup> und die zwei Elektronen werden vom oxidiertem NAD(P)<sup>+</sup>

aufgenommen.  $\text{NAD(P)}^+$  wird also reduziert und es entsteht  $\text{NAD(P)H}$ . Das zweite vom Substrat abgegebene  $\text{H}^+$  gelangt in die Reaktionslösung und wird nicht an  $\text{NAD(P)}^+$  gebunden (Formel 1–1). Das bei dieser Reaktion freigesetzte Elektron wird durch die Redoxkette der  $\text{NAD(P)H}$ -Oxidasen über verschiedene Zwischenschritte auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch letztendlich das Superoxidradikal entsteht.



**Formel 1: Redox-Reaktion: Reduktion von  $\text{NADP}^+$  in Gegenwart eines Substrates.**

### **1.5. Reaktive Sauerstoffspezies**

Als Konsequenz des  $\text{O}_2$ -sensing wird die Freisetzung von ROS diskutiert. Dabei verändern ROS, wie bspw. das Superoxidanion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), das Hydroxylradikal ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) den Redoxstatus der Signalmoleküle. Das  $\text{O}_2^{\cdot-}$  entsteht durch Reduktion des  $\text{O}_2$ . Als mögliche Quellen in vaskulären Zellen kommen die  $\text{NAD(P)H}$ -Oxidase, das Mitochondrium, die Xanthinoxidase und die Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) in Frage <sup>79</sup> (Abbildung 1-2).

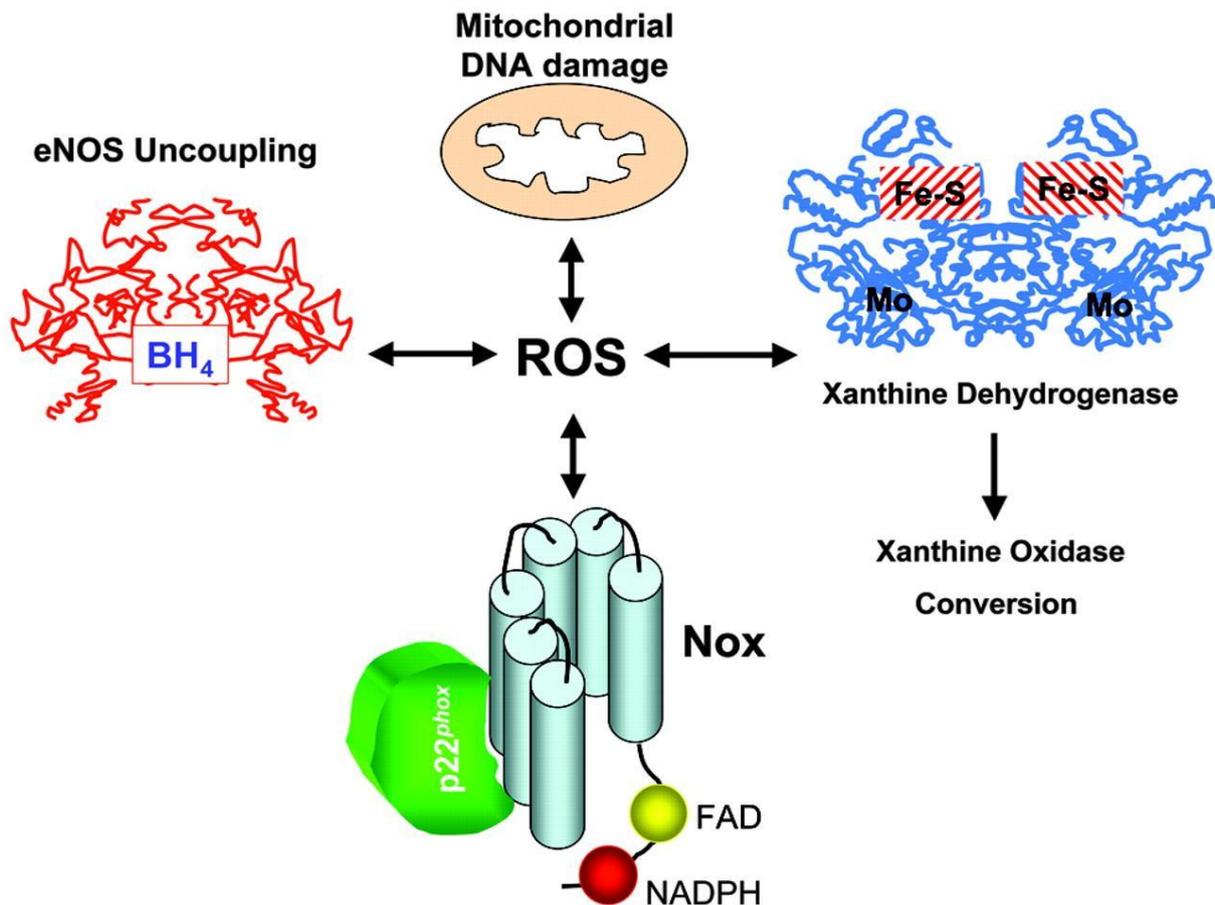


Abbildung 2-2: „Produktionsstätte“ der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle (aus<sup>79</sup>).

### 1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Die Hypothese der vorliegenden Dissertation ist, dass sich unter Hypoxie vermehrt ROS bilden und die Quelle dieser ROS-Freisetzung NAD(P)H-Oxidasen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von NAD(P)H-Oxidasen als mögliche Quelle für die Superoxidfreisetzung unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Die von der NAD(P)H-Oxidase freigesetzten ROS könnten am Zustandekommen der akuten HPV, sowie am pulmonalvaskulärem Remodeling beteiligt sein. Diese Hypothese wird durch Publikationen sowohl unserer eigenen als auch anderer Arbeitsgruppen gestützt, in denen durch verschiedene pharmakologische Interventionen und durch den Einsatz von transgenen Mäusen, die defizient für verschiedene Untereinheiten dieses Systems waren, untersucht wurden<sup>46, 47, 80-84</sup>.

Ausgehend von der Hypothese, dass unter Hypoxie vermehrt ROS durch NAD(P)H-Oxidasen freigesetzt werden und dass die  $\cdot\text{O}_2^-$  zur Entstehung der HPV und pulmonalen Hypertonie (PH) beitragen, wurde in dieser Arbeit die hypoxieabhängige Freisetzung von  $\cdot\text{O}_2^-$  durch NAD(P)H-Oxidasen in vaskulären glatten Muskelzellen und Fibroblasten untersucht. In diesem Zusammenhang wurden sowohl aortale als auch pulmonalarterielle Zellen verwendet, um mögliche Unterschiede zwischen den pulmonalen und systemischen Gefäßen aufzeigen zu können. Zur Detektion der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung wurde die Elektronenspinresonanz Spektroskopie eingesetzt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Experimentelle Agenzien und Pharmaka

AEBSF [4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluorid]	Merck (München, Deutschland)
Apocynin	Merck (München, Deutschland)
CPH (1-hydroxy-3-carboxy-2,2,5-tetramethyl-pyrrolidin)	Alexis Corporation (San Diego, USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DTPA (Diethylenetriamine-Pentaacetic Acid)	Sigma (München, Deutschland)
Isotone Kochsalzlösung, 0,9% (NaCl)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Ketanest, 50 mg/ml (Ketaminbase)	Parke Davis (Berlin, Deutschland)
NaCl 0,9%	Fluka Chemie GmbH, (München, Deutschland)
NaHCO <sub>3</sub> , 8,4 %,	Merck (Darmstadt, Deutschland)

PMA (Phorbolmyristataacetat)	Sigma (München, Deutschland)
Rompun, 2 % (Xylazin),	Bayer Leverkusen, Deutschland)
Superoxide-Dismutase-Assay-Kit,	Calbiochem (Frankfurt, Deutschland)
Xylocain, 2% (Lidocainhydrochlorid)	ASTRA Chemicals (Wedel, Deutschland)

## **2.2. Zellkulturmaterial**

- Zellkulturflasche 75cm<sup>2</sup> „Cell Star“ mit Filterdeckel, GREINER, Frickenhausen, Deutschland
- Zellkulturflasche 75cm<sup>2</sup> „Cell Star“ mit Beschichtung zur Suspensionskultur, mit Deckel, GREINER, Frickenhausen, Deutschland
- Zellkulturflasche 25cm<sup>2</sup> mit Filterdeckel, CORNING, Schiphol-Rijk, Holland
- Zellkulturschale 100cm<sup>2</sup> mit Deckel, CORNING, Schiphol-Rijk, Holland
- Konisches Röhrchen, Polypropylen, steril, 15ml oder 50ml FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Konisches Röhrchen, Polypropylen, steril, 15 ml FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Flaschenaufsatzfilter, Porengröße 22 µm mit verschiedenen Gewindegrößen, MILLIPORE

- Serologische Pipette, steril, mit Spitze, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml  
FALCON, BD Biosciences, Heidelberg,  
Deutschland
- Spritzenaufsatzfilter, steril, Porengröße 0,2 µm, PALL
- Pipettenspitze, 1000 µl , EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitze, 100 µl, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitze, 10 µl, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Einkanalpipette, 0,5-10 µl, 10-100 µl , 100-1000 µl EPPENDORF, Hamburg,  
Deutschland
- Multipipette, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Aufsatz für Multipipette, 0,5 ml, 2,5 ml, 5 ml, 12,5 ml EPPENDORF, Hamburg,  
Deutschland
- Zellkulturschrank Hera Cell, HERAEUS, Hanau, Deutschland
- Zentrifuge Micro 22R, HETTICH, Tuttlingen, Deutschland
- Zentrifuge Rotina 46R, HETTICH, Tuttlingen, Deutschland
- Inverses Mikroskop Wilovert, HUND, Wetzlar, Deutschland

### **2.3. Isolierung von pulmonalarteriellen und aortalen glatten Muskelzellen (PASMC/ASMC) und Fibroblasten (PAFB/AFB)**

Kaninchen (Charles River Laboratorien, Sulzfeld) wurden durch eine Überdosis an Anästhetikum mit Ketamin und Xylazine getötet. Anschließend wurden sie thorakotomiert, das Herz und die Lunge exstirpiert und daraus sowohl die ersten drei Aufzweigungen der Pulmonalarterie als auch der proximale Anteil der Aorta thoracica herauspräpariert. Mit Hilfe eines Mikroskops wurde die Serosa der Gefäße entfernt, die Arterie längs aufgeschnitten, die Endothelzellschicht mit einem Skalpell abgetragen und die Muskelzellschicht von der Adventitia mechanisch getrennt. Dabei wurde ein Austrocknen der Gefäße durch das Überschichten mit dem Zellkulturgrundmedium RPMI (Sigma-Aldrich, Deutschland) verhindert. Die Muskelzellschicht und die Adventitia wurden dann separat mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und zur Gewinnung von primären Zellen in Zellkulturflaschen überführt.

### **2.4. Zellkultur**

Pulmonalarterielle und aortale Fibroblasten (PAFB und AFB) sowie pulmonalarterielle und aortale glatte Muskelzellen (PASMC und ASMC) wurden als primäre Zellen aus Kaninchen eingesetzt. HL60-Zellen wurden als permanente Zelllinie verwendet.

#### **2.4.1. PASMC, ASMC, PAFB und AFB**

Die kleingeschnittene Muskelzellschicht sowie die Adventitia der Pulmonalarterie und der Aorta wurden in folgendem Nährmedium kultiviert:

- Smooth Muscle Cell (SMC) Growth Medium 2, Low Serum, PROMO CELL, Heidelberg, Deutschland

- Supplement Mix C-39267 für SMC-Medium 2, PROMO CELL, Heidelberg, Deutschland

Zur Verhinderung von Kontaminationen wurde 1% Penicillin/Streptomycin (PAN BIOTECH, Sydney, Australien) dem Medium zugesetzt.

Innerhalb von 7-14 Tagen wuchsen aus den Gewebestückchen primäre PASM, PAFB, ASMC und AFB. Diese wurden dann weiterpassagiert. Dabei wurden sie bis zur zweiten Passage kultiviert und dann für Experimente verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C unter 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub>.

#### **2.4.2. HL60- Zellen**

Bei HL60- Zellen handelt es sich um eine permanente nicht adhärenz Zellelinie. Diese humanen akut myeloischen Leukämiezellen sind 1976 aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Frau isoliert worden. Als Kulturmedium wurde 89% RPMI 1640, 10% fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Inkubiert wurden die Zellen bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>. Beim Subkultivieren wurde darauf geachtet, dass die Quantität der Zellen in Suspension nicht 1,5-2,0 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml überstieg.

### **2.5. Elektronenspinresonanz Spektroskopie**

Die Elektronenspinresonanz (ESR) Spektroskopie dient dem Nachweis, der Quantifizierung und der Strukturaufklärung paramagnetischer Substanzen.

Chemische Moleküle sind dann paramagnetisch, wenn sie ungepaarte Elektronen besitzen. Dies trifft insbesondere auf freie Radikale zu. Bei den meisten freien Radikalen handelt es sich um sehr reaktive Teilchen mit einer kurzen Halbwertszeit, deren Radikalcharakter für eine ESR-Messung stabilisiert werden muss.

## 2.5.1. Physikalische Grundlagen

### 2.5.1.1. Elektronenspin im äußeren Magnetfeld

Elektronen besitzen neben ihrer Masse  $m$  und der elektrischen Ladung  $e$  auch einen Eigendrehimpuls, der als Spin bezeichnet wird. Der Spin hat als Vektorgröße ein magnetisches Moment  $\mu_S$ , das wegen der negativen Ladung des Elektrons dem Spin entgegengesetzt ist. Quantenmechanisch ergibt sich der Zusammenhang von Spin und magnetischem Moment aus

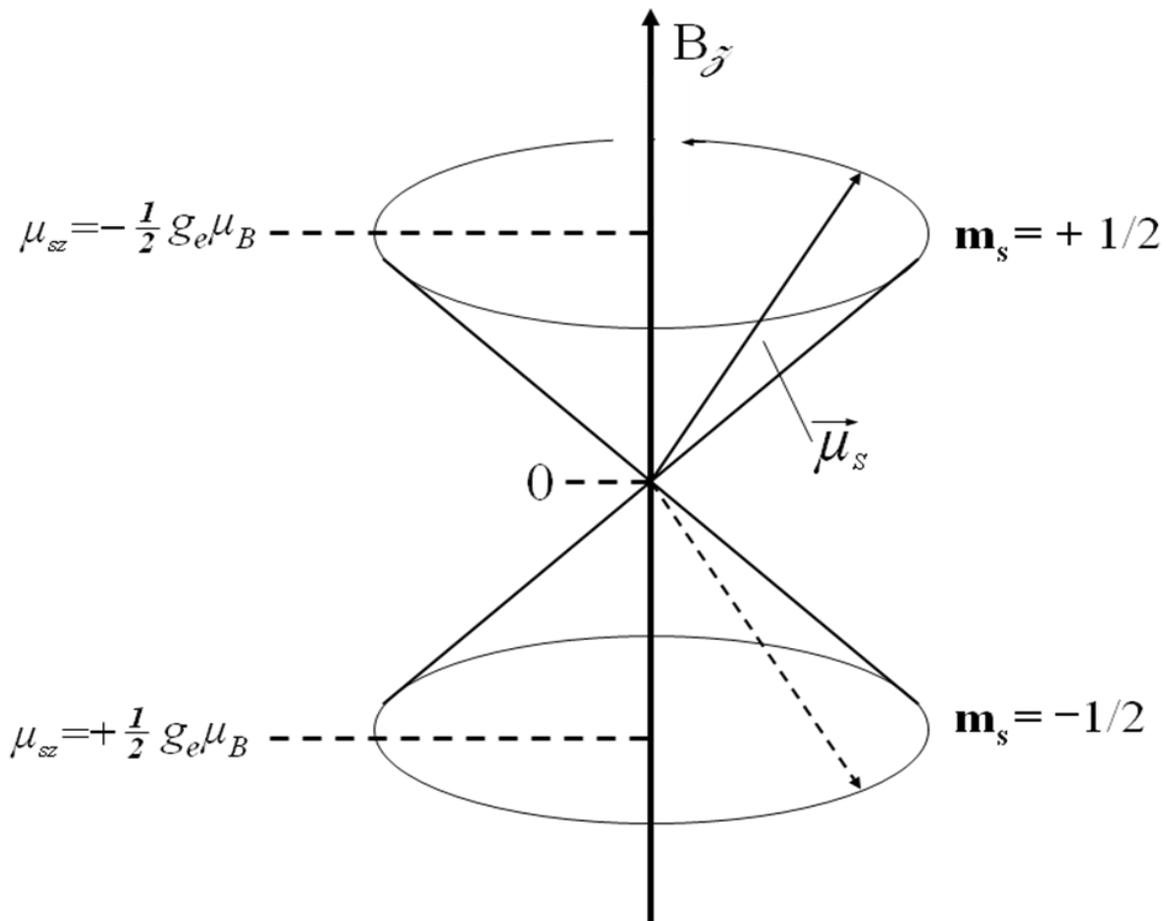
$$\mu_S = -g_e \mu_B \vec{S}, \text{ mit } \mu_B = \frac{eh}{2mc}$$

#### Formel 2-1: Zusammenhang von Spin $S$ und magnetischem Moment $\mu_S$ .

Die in der Gleichung verwendeten Variablen sind der dimensionslose g-Faktor des Elektrons,  $g_e$ , und  $\mu_B$ , welche das Bohr'sche Magneton beschreibt. Letzteres setzt sich aus der elektrischen Ladung ( $e$ ), dem Planck'schen Wirkungsquantum ( $h$ ) und der Masse des Elektrons ( $m$ ) zusammen.  $c$  beschreibt die Lichtgeschwindigkeit <sup>85</sup>.

Der g-Faktor (Landé-Faktor) für das freie Elektron gibt das Verhältnis von magnetischem Moment und Spindrehimpuls an. Für ein freies Elektron besitzt  $g$  den Wert 2,0023193 <sup>85</sup>. Wird das freie Elektron nun in ein äußeres statisches Magnetfeld  $B_z$  eingebracht, wobei  $z$  für die Richtung des Magnetfelds steht, ergeben sich nach den Gesetzen der Quantenmechanik zwei Einstellmöglichkeiten für den Spin des Elektrons, parallel oder antiparallel zur  $z$ -Achse (Abbildung 2-1). Beide Einstellungen werden durch die magnetische Quantenzahl  $m_s$  beschrieben und haben die Werte  $\pm \frac{1}{2}$ . Neben der Ausrichtung des Elektronenspins im äußeren Magnetfeld präzediert

der Spin um die Achse z des Magnetfelds <sup>86</sup>. Diese Bewegung entspricht der klassischen Kreisbewegung und hat die Frequenz  $\omega_0 = \gamma_z$  (Larmorfrequenz), die proportional zur Magnetfeldstärke ist.



**Abbildung 2-1: Das magnetische Moment  $\mu_s$  des Elektrons im äußeren Magnetfeld  $B_z$ .**

Der Spin des Elektrons richtet sich entweder parallel oder antiparallel zur z-Richtung des Magnetfeldes aus.  $g_e$  = Landé-Faktor,  $\mu_B$  = Bohr'sches Magneton,  $m_s$  = magnetische Quantenzahl (aus <sup>85</sup>).

Der Energiewert des Spins  $S_z$  kann in Richtung des Magnetfeldes  $B_z$  definiert werden.  $m_s$  kann für einen beliebigen Spin  $S$  die Werte  $-S, -S+1, \dots, S-1, S$  annehmen. Die Energie des magnetischen Moments  $\mu_s$  eines Elektrons mit einem Spin  $S = \frac{1}{2}$  im Magnetfeld  $B$  ergibt sich dann aus der Gleichung

$$E_{1,2} = \mu_s B = g_e \mu_B m_s$$

**Formel 2-2: Energie des magnetischen Moments  $\mu_s$  in einem Magnetfeld  $B$ .**

$m_s$  ist in dieser Gleichung die magnetische Quantenzahl, die die Werte  $+ \frac{1}{2}$  und  $- \frac{1}{2}$  annehmen kann.  $g_e$  = Landé-Faktor,  $\mu_B$  = Bohr'sches Magneton,  $m_s$  = magnetische Quantenzahl,  $\mu_s$  = magnetisches Moment,  $B$  = Magnetfeld<sup>86</sup>.

Aus Formel 2-2 geht hervor, dass sich die Energie des Elektrons in zwei unterschiedliche Energieniveaus aufspaltet, wenn das Magnetfeld nur eine Komponente in z-Richtung aufweist. Die Energiewerte nach der Aufspaltung hängen vom äußeren Magnetfeld ab.

Im ESR Spektroskop werden die Übergänge zwischen den beiden Energiezuständen durch Einstrahlung von elektromagnetischer Strahlung im Mikrowellenbereich senkrecht zur Richtung z des Magnetfeldes induziert. Es erfolgt eine Absorption dieser Strahlung, sobald die sog. Resonanzbedingung erfüllt ist:

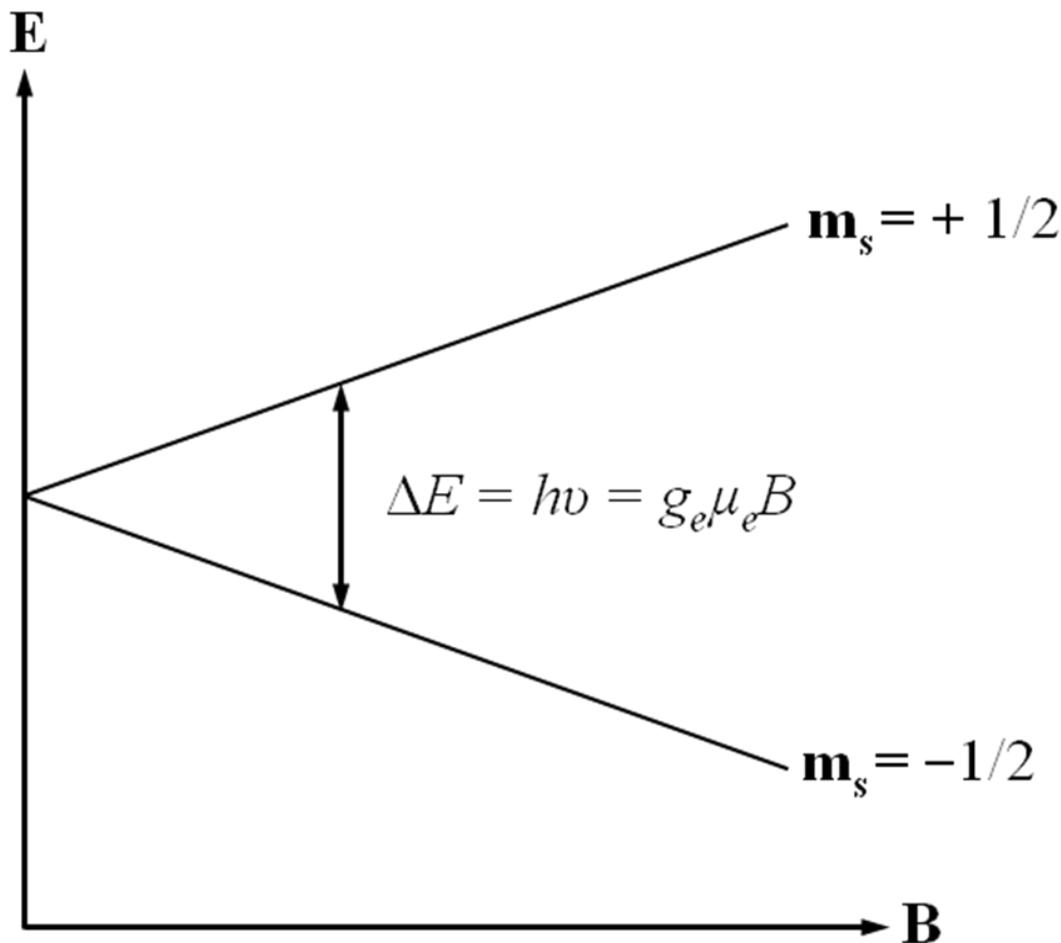
$$\Delta E = g_e \mu_B B \Delta m_s = h\nu$$

**Formel 2-3: Resonanzbedingung für den Übergang zwischen den Energieniveaus zweier Elektronen.**

$m_s$  = magnetische Quantenzahl,  $g_e$  = Landé-Faktor,  $\mu_B$  = Bohr'sches Magneton,  $\mu_s$  = magnetisches Moment,  $B$  = Magnetfeld.

Die Variable  $h$  beschreibt das Planck'sche Wirkungsquantum und  $\nu$  steht für die Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Welle<sup>86</sup>.

Das Energieniveau des Elektrons spaltet sich in einem Magnetfeld auf (Abbildung 2-2). Die Energiewerte der verschiedenen Energieniveaus sind vom äußeren Magnetfeld abhängig<sup>85</sup>.



**Abbildung 2-2: Zeeman-Aufspaltung der Energien  $E$  der beiden Spinzustände  $m_s$  im Magnetfeld  $B$ .**

$m_s$  = magnetische Quantenzahl,  $g_e$  = Landé-Faktor,  $\mu_e$  = Bohr'sches Magneton,  $B$  = Magnetfeld.

$h$  = Planck'sches Wirkungsquantum,  $\nu$  = Frequenz der eingestrahlenen elektromagnetischen Welle (aus <sup>87</sup>).

Zum Erreichen des Resonanzzustandes kann die Frequenz der elektromagnetischen Welle bei konstant gehaltenem Magnetfeld verändert werden. Alternativ kann aber auch die Frequenz der Mikrowelle konstant gehalten und das Magnetfeld variiert werden.

Der Elektronenspin ist von der sog. magnetischen Suszeptibilität ( $\chi_m$ ) einer Substanz abhängig. Diese Variable spielt eine Rolle, sobald eine Probe in ein äußeres Magnetfeld gebracht wird. In der Probe baut sich eine magnetische Induktion auf, die durch die Formel 2-4 beschrieben ist. Die in das Magnetfeld eingebrachten Substanzen teilen sich nun entsprechend ihrer magnetischen Suszeptibilität in

diamagnetische, wenn  $\chi_m > 0$ , und paramagnetische, wenn  $\chi_m < 0$ . Im ESR geben nur paramagnetische Substanzen ein Signal. Daher wird die diamagnetische Komponente von Substanzen nicht näher betrachtet. Paramagnetische Materialien haben sehr kleine positive magnetische Momente. Die Wechselwirkung untereinander ist sehr schwach. Sie können ohne Vorhandensein eines äußeren Magnetfeldes in alle Richtungen streuen. Werden sie jedoch in ein äußeres Magnetfeld eingebracht, richten sich die magnetischen Momente parallel zu diesem aus.

$$B = (1 + \chi_m) \mu_0 H$$

**Formel 2-4: Magnetische Induktion einer Substanz in einem äußeren Magnetfeld.**

$B$  ist die magnetische Induktion,  $\chi_m$  bezeichnet die magnetische Suszeptibilität und  $\mu_0$  steht für die Induktionskonstante in einem Feld  $H$ <sup>87</sup>.

**2.5.1.2 Hyperfeinwechselwirkung**

Eine weitere Aufspaltung des Energieniveaus ereignet sich durch die Wechselwirkung des magnetischen Momentes vom Elektronenspin mit dem des Kernspins. Diese Wechselwirkung wird Hyperfeinwechselwirkung genannt. Die Hyperfeinwechselwirkung besteht aus isotropen und anisotropen Anteilen.

Die isotrope Hyperfeinkopplung  $a_i$  eines Kerns  $i$  ist direkt proportional zur Aufenthaltswahrscheinlichkeit  $|\Psi(0)|^2$  des ungepaarten Elektrons am Ort des Kerns. Diese quantenmechanische Wechselwirkung wird wie folgt definiert:

$$a_i = (8\pi / 3) g_e \mu_B g_{Ni} \mu_{Ni} |\Psi(0)|^2$$

**Formel 2-5: Isotrope Hyperfeinkopplung  $a_i$  eines Kerns  $i$ .**

$g_{Ni}$  ist der Kern  $g$ -Faktor,  $\mu_{Ni}$  beschreibt das Magneton des Kerns<sup>87</sup>.

Die Bedingung  $|\Psi(0)|^2$  ist für die Atom-Orbitale eines Moleküls nur für das s-Orbital gegeben. Daher führt die Spinpolarisation dazu, dass ein ungepaartes Elektron in

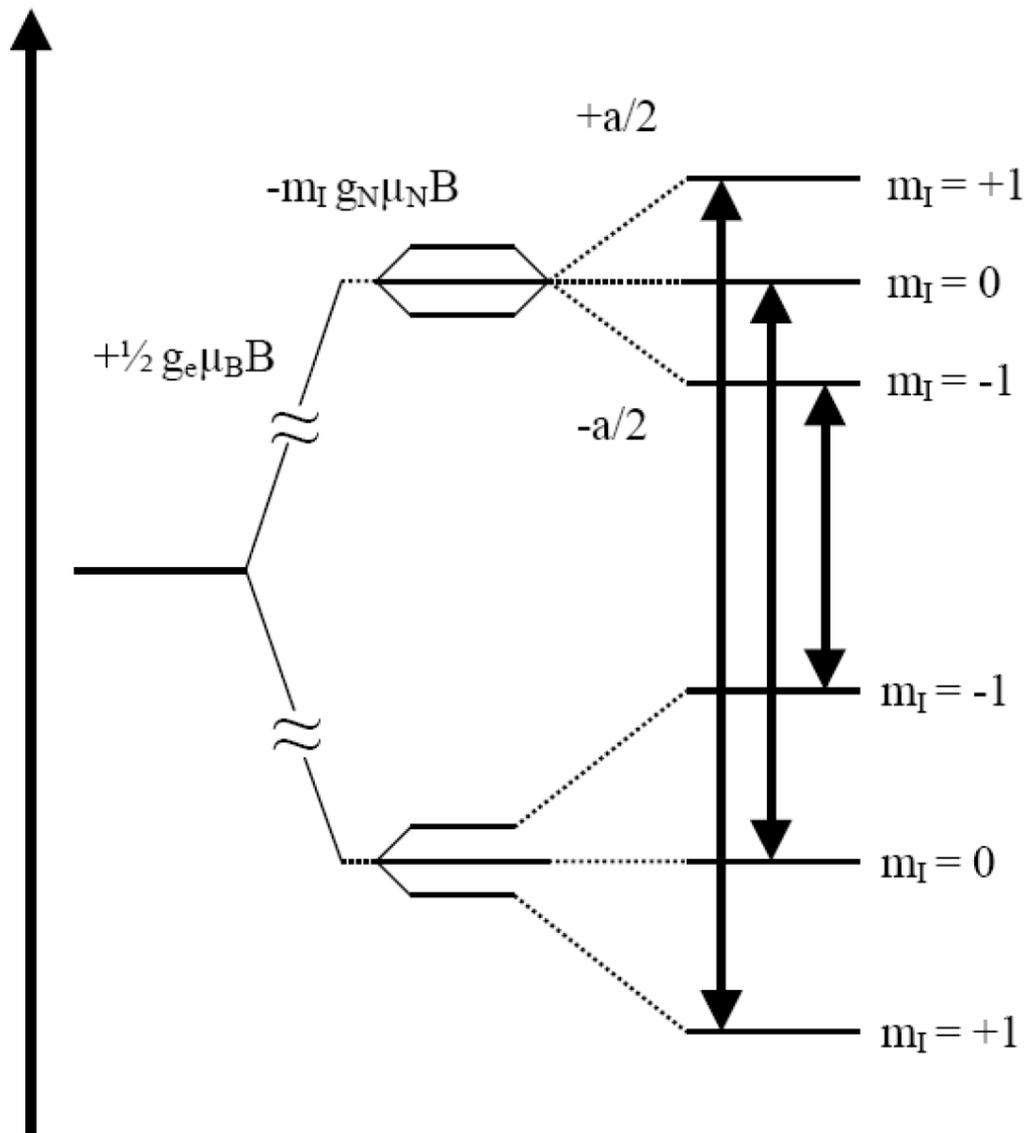
einem p-Orbital die Spinpaarung im energetisch tiefer liegenden, doppelt besetzten s-Orbital stört. Diese Störung führt zu einer geringeren Aufenthaltswahrscheinlichkeit des freien Elektrons im s-Orbital und dadurch zu der beschriebenen isotropen Hyperfeinkopplung. Als Beispiel für die isotrope Hyperfeinkopplung ist in Abbildung 2-3 die Aufspaltung eines Kerns mit einem Kernspin  $I = 1$  und einem Elektronenspin  $S = \frac{1}{2}$  dargestellt. Die Spin-Energieniveaus spalten sich durch die isotrope Hyperfeinkopplung entsprechend

$$E(m_s, m_I) = g_e \mu_B B m_s - g_N \mu_N B m_I + a m_s m_I$$

**Formel 2-6: Aufspaltung der Spin-Energieniveaus.**

Bei dem vorliegenden Fall ist der Elektronenspin  $S = \frac{1}{2}$  und der Kernspin  $I = 1$ . Die Hyperfeinkopplungskonstante wird in der Gleichung als  $a$  gegeben.  $g_N$  bezeichnet den Kern-g-Faktor,  $\mu_N$  ist das Kern-Magneton <sup>87</sup>.

auf. Der zweite Term in Formel 2-6 beschreibt die Wechselwirkung des Kernspins mit dem Magnetfeld  $B$  und der dritte Term bezieht sich auf die Hyperfeinwechselwirkung. In diesem Beispiel kann  $m_I$  die Werte  $-1, -1 + 1, \dots, 1$  annehmen. Abbildung 1-13 zeigt die Fälle für  $m_I = -1, 0$  und  $+1$ .



**Abbildung 2-3: Spin-Energieniveaus und ESR-Übergänge für den Fall  $S = \frac{1}{2}$  und  $I = 1$  (aus <sup>87</sup>, verändert).**

Für das zyklische Hydroxylamin Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin ergeben sich drei Resonanzlinien (Abbildung 2-4), wobei der energetische Abstand zweier nebeneinander liegender Linien der jeweiligen Hyperfeinkopplungskonstanten  $a$  entspricht. Die Resonanzbedingungen der drei Übergänge sind demnach

$$h\nu = \Delta E_{m_I=-1} = g_e \mu_B B - a$$

$$h\nu = \Delta E_{m_I=0} = g_e \mu_B B$$

$$h\nu = \Delta E_{m_I=+1} = g_e \mu_B B + a,$$

wenn  $\Delta m_s = 1$  und  $\Delta m_l = 0$ . Da die Feldstärken  $B_{ml}$  in der normalen ESR-Spektroskopie verändert werden und die Frequenz  $\nu$  konstant gehalten wird, ergeben sich die Resonanzfeldstärken  $B_{ml=-1}$ ,  $B_{ml=0}$  und  $B_{ml=+1}$  aus

$$B_{m_I=-1} = h\nu / g_e \mu_B + a / g_e \mu_B$$

$$B_{m_I=0} = h\nu / g_e \mu_B \text{ und}$$

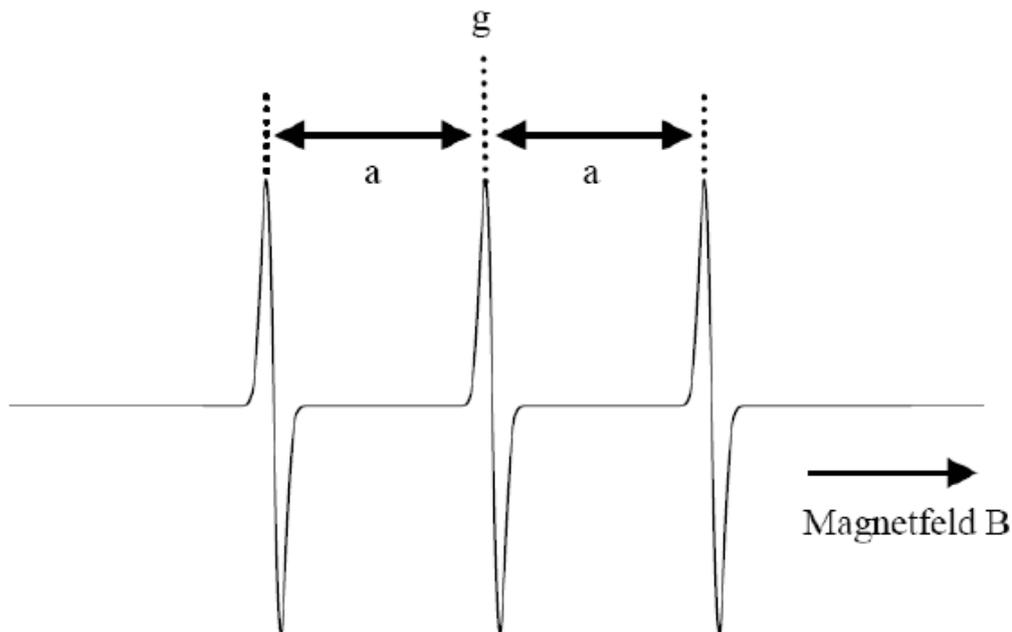
$$B_{m_I=+1} = h\nu / g_e \mu_B - a / g_e \mu_B.$$

Durch Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons freier Radikale mit mehreren Kernen  $i$  und entsprechendem Kernspins  $I_i$  ergeben sich weitere Aufspaltungen, die sich nach Formel 2-6 auflösen zu

$$E(m_s, m_I) = g_e \mu_B B m_s - \sum_i g_{Ni} m_{Ni} B m_{Ii} + \sum_i a_i m_s m_{Ii}$$

**Formel 2-7: Hyperfeinwechselwirkung eines freien Elektrons mit mehreren Kernen  $i$  mit dem jeweiligen Kernspin  $I_i$ .**

Der anisotrope Anteil der Hyperfeinwechselwirkung besteht in der dipolaren Kopplung von Elektronen- und Kernspin. Da die Konstante in flüssiger Lösung, d. h. in Proben mit schneller rotatorischer Diffusion, nicht einget, wird sie an dieser Stelle nicht näher beschrieben.



**Abbildung 2-4: ESR-Spektrum von Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin HCl bei einer isotropen Hyperfeinkopplung  $a$  (aus <sup>87</sup>, verändert).**

### **2.5.1.3. Relaxationsprozesse**

Resonanzlinien werden beobachtet, wenn durch die eingestrahlte Mikrowelle die Resonanzbedingungen nach Formel 2–3 erfüllt werden und wenn zwischen verschiedenen Energieniveaus der Unterschied in den Besetzungszahlen erhalten bleibt. Damit die letzte Bedingung erfüllt ist, werden in der ESR-Spektroskopie Mikrowellen geringer Intensität eingestrahlt. Die Nettoabsorption hängt dann nur noch von der Differenz der Energiezustände ab.

Werden paramagnetische Substanzen einer starken Mikrowellenstrahlung ausgesetzt, sättigt sich das Spinsystem, d.h. die Energieabsorption geht gegen Null und die Magnetisierung verschwindet. Wenn ein biologisches System aus seinem Gleichgewichtszustand gebracht wird, versucht es diesen durch einen als Relaxation bezeichneten Prozess wieder herzustellen. Die Relaxation ist ein Mechanismus, der es dem Spinsystem ermöglicht, aus einem Zustand hoher Energie in einen Zustand geringerer Energie zurückzukehren, also Energie an die Umgebung abzugeben, wodurch die fortlaufende Energieaufnahme gewährleistet wird. In der ESR Spektroskopie sind zwei Formen der Energieübertragung möglich. Zum einen spielt

die longitudinale Relaxation eine Rolle, bei der Energie an die Umgebung des Spins abgegeben wird. Da die Umgebung des Spins auch als Gitter bezeichnet wird, spricht man auch von Spin-Gitter-Relaxation. Die Zeit, die benötigt wird, um von einem energiereichen in einen energieärmeren Zustand zurückzukehren, wird als Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxationszeit  $T_1$  bezeichnet. Die Definition der Spin-Gitter-Relaxationszeit ist

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{(M_z - M_{z,e})}{T_1}$$

### Formel 2-8: Definition der Spin-Gitter-Relaxationszeit

Die Formel gibt die longitudinale Relaxationszeit an.  $M_x$  beschreibt die Magnetisierung parallel zum statischen Feld  $B$ .  $T_1$  steht für die longitudinale Relaxationszeit und der Index  $e$  steht für den Gleichgewichtszustand<sup>88</sup>.

Neben der longitudinalen Relaxationszeit spielt auch die transversale Relaxationszeit  $T_2$  für den Energietransfer eine Rolle. Die transversale Relaxationszeit wird auch Spin-Spin-Relaxationszeit genannt<sup>89</sup>. Sie tritt dann auf, wenn Energie an andere Elektronen abgegeben wird und diese dadurch ein höheres Energieniveau erreichen. Die Spin-Spin-Relaxation führt zu einer zeitlichen Energieschwankung und nicht zur Änderung der Energie im gesamten Spinsystem.

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{(M_x)}{T_2}$$

### Formel 2-9: Definition der Spin-Spin-Relaxationszeit

Die Formel gibt die transversale Relaxationszeit an.  $M_x$  beschreibt die Magnetisierung antiparallel zum statischen Feld  $B$ .  $T_1$  steht für die transversale Relaxationszeit<sup>88</sup>.

## 2.5.2. Apparative Grundlagen

Das ESR-Spektroskop besteht aus drei Bauteilen:

1. dem Elektromagneten zur Schaffung eines homogenen Magnetfeldes,
2. der Mikrowelleneinheit zur Erzeugung der Mikrowelle und Messung der Resonanzabsorption der Probe, die sich in einem Hohlraumresonator zwischen den Polen des Elektromagneten befindet,
3. dem Detektionssystem und der Magnetfeldmodulation zur Registrierung und Verarbeitung des Resonanzsignals<sup>90</sup>.

Für die Messung wird eine Probe in den Hohlraumresonator im Spalt zwischen den beiden Polschuhen des Elektromagneten eingeführt. Die Mikrowelleneinheit erzeugt eine elektromagnetische Welle, die senkrecht zum äußeren Magnetfeld steht. Im Resonanzfall wird Energie absorbiert und die dadurch induzierte Änderung der Mikrowellenleistung durch eine Detektordiode registriert.

### 2.5.2.1 Magnetsystem

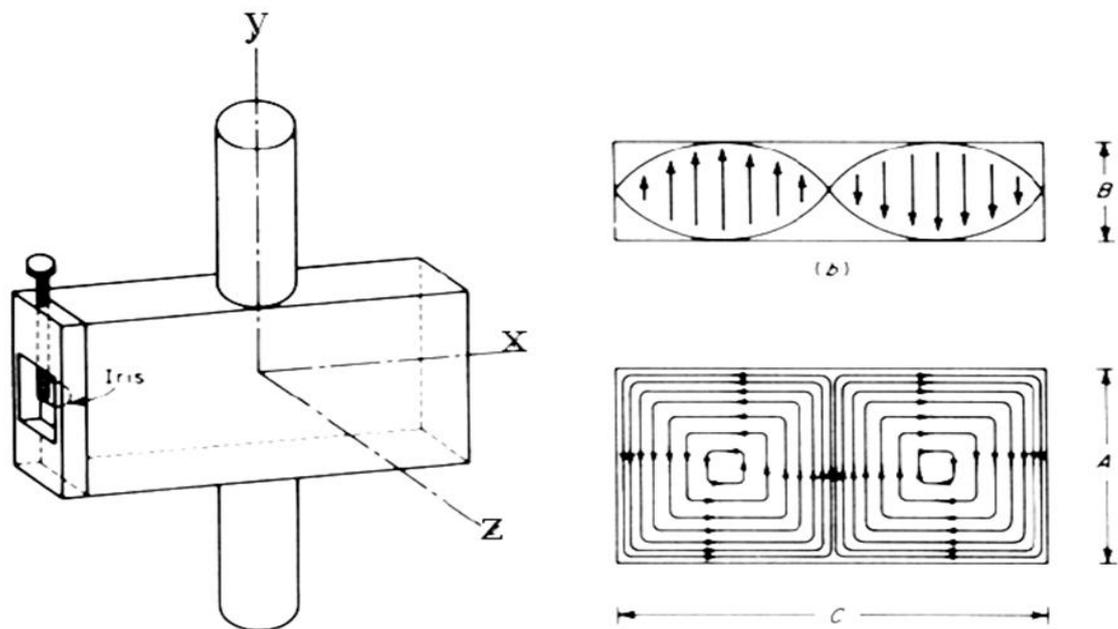
Bei den meisten ESR Spektroskopen wird aus technischen Gründen die Stärke des Magnetfeldes variiert, während die eingestrahlte Mikrowellenfrequenz konstant bleibt. Die Variation des magnetischen Feldes wird durch das Anlegen einer Sägezahnspannung an die Spulen des Elektromagneten erreicht. Bei dieser Feld-Sweep-Methode wird die Resonanzkurve als Funktion der magnetischen Flussdichte dargestellt.

### 2.5.2.2 Mikrowellenbrücke

Als Mikrowellenquelle dient bei dem im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten MS 100 Spektrometers ein Halbleiterbauteil. Dieses besteht aus einer Diode und einem Hohlraumresonator, der in Abhängigkeit von seiner Geometrie die Mikrowellenfrequenz, die von der Diode abgestrahlt werden muss, bestimmt.

Die Mikrowelle wird in einen Hohlleiter eingespeist und über einen so genannten Zirkulator ausschließlich in den Meßresonator geleitet, in dem sich die Probe

befindet. Die Mikrowelle, die vom Resonator reflektiert wird, gelangt zurück zum Zirkulator und von dort zur Nachweisdiode. Der Resonator wird mittels eines variablen Kopplungselementes (Iris) derart an den Hohlleiter angekoppelt, dass nur soviel Mikrowelle in den Hohlleiter zurück reflektiert wird, wie zur Vorbelastung der Diode benötigt wird. Ist für die Spins in der Probe die ESR-Resonanzbedingung erfüllt, so absorbieren sie Mikrowellenenergie, was zu einer Änderung der vom Resonator reflektierten Mikrowellenleistung führt. Diese Änderung wird mit der Nachweisdiode gemessen.



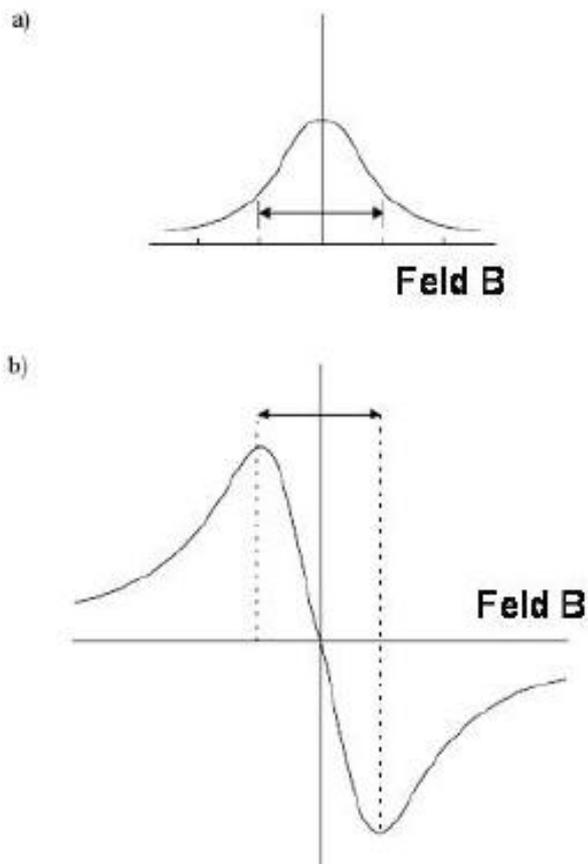
**Abbildung 2-5: Rechteckiger Hohlraumresonator.**

Auf der linken Seite des Schemas ist der Probenraum mit Iris-Kopplung gezeigt. Rechts oben (b) ist die elektrische Feldkomponente der Mikrowelle in x-z-Ebene dargestellt und darunter (c) ist die magnetische Feldkomponente der Mikrowelle in der x-y-Ebene zu sehen. Das statische Magnetfeld ist parallel zur z-Achse (aus <sup>85</sup>).

Der Hohlraumresonator (Abbildung 2-5) dient zum einen zur Verstärkung des Mikrowellenfeldes am Ort der Probe, zum anderen entsteht durch die stehende Welle im Resonator eine räumliche Trennung der Maxima von elektrischer und magnetischer Feldstärke der Mikrowelle. Die Probe wird an den Ort des Maximums der magnetischen Feldstärke der Mikrowelle gebracht.

### 2.5.2.3 Detektionssystem

Der am Detektor registrierte Strom ist mit der gleichen Frequenz wie das äußere Magnetfeld moduliert. Seine Amplitude ist proportional zur Änderung der Energieabsorption  $\Delta S$ . Durch die Magnetfeldmodulation  $\Delta B$  erhält man als Signal die erste Ableitung des Absorptionssignals  $\Delta S/\Delta B$ , wenn die Modulationsamplitude im Verhältnis zur Linienbreite klein genug ist (Abbildung 2-6). Die Linienbreite ist als Abstand zwischen Maximum und Minimum des abgeleiteten Absorptionssignals definiert und abhängig von der Größe der Modulationsamplitude. Die Linienbreite nimmt bei Verkleinerung der Modulationsamplitude nicht weiter ab, aber bei optimaler Linienbreite ist die Amplitude des Signals am größten.



**Abbildung 2-6: Zusammenhang zwischen Absorptions- und ESR-Signal.**

(a) zeigt das Absorptionssignal. (b) ist die erste Ableitung des Absorptionssignals als ESR-Signal nach phasenempfindlicher Gleichrichtung.

Die Linienbreite ist als Abstand zwischen Maximum und Minimum des abgeleiteten Absorptionssignals definiert und abhängig von der Größe der Modulationsamplitude (aus <sup>85</sup>).

## 2.6. ESR-Messungen

Die Bestimmung der Radikalkonzentration erfolgte indirekt durch Zuhilfenahme von sogenannten Spin Probes, da das Superoxidanion aufgrund der kurzen Halbwertszeit (~ 1 Millisekunde) nicht direkt gemessen werden kann. Als Spin Probe wurde das zyklische Hydroxylamin 1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-HCl (CP-H, L-Optik, Berlin, Deutschland) verwendet. Diese Substanz reagiert mit Radikalen und wird dadurch selbst zum Radikal (CPH•), das stabiler ist und dadurch mit dem ESR Spektrometer gemessen werden kann.

### 2.6.1. Einstellungen des ESR Spektrometers

Die Bestimmung der ROS-Freisetzung wurde mit dem MiniScope MS100 (Magnettech, Berlin-Adlershof, Deutschland) durchgeführt. Alle Geräteparameter für die CP-H-Messungen wurden über die zugehörige Software (MiniScopeControl, Version 2.4.1, ©Dmitri Vashkevich) auf folgende Werte eingestellt.

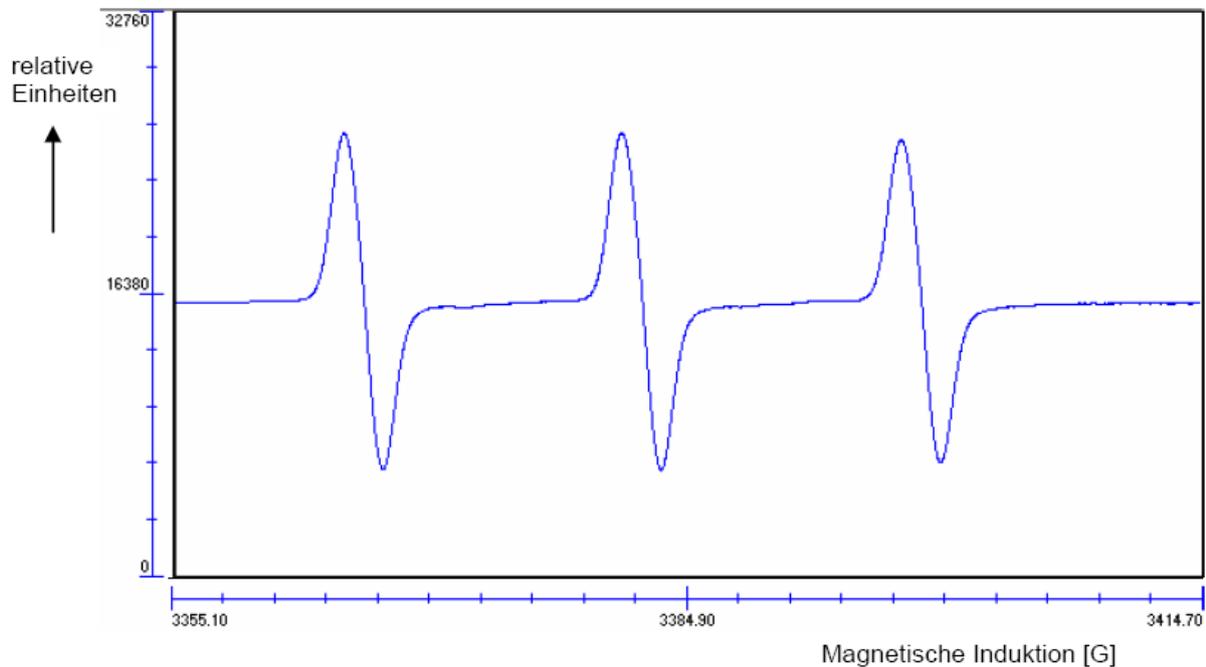
Die Stärke des Magnetfeldes betrug 3379,40 G und die Scan-Weite 58,52 G. Ein Messdurchlauf dauerte 15 Sekunden und wurde zur Steigerung des Signal-Rauschverhältnisses nochmals zweimal direkt hintereinander wiederholt, so dass eine komplette Messung 45 Sekunden dauerte. Während eines Messdurchlaufes wurden 4096 Messpunkte des Spektrums analysiert. Die Modulationsamplitude der Mikrowelle betrug 2000 mG und die Abschwächung der Mikrowellenleistung 10 dB. Das erhaltene Signal wurde um den Faktor 500 verstärkt und das Messsignal invertiert. Alle Einstellparameter sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst. Die Einstellung und der Abgleich der Sensoren erfolgte automatisch. Die Anzeigen für die Abweichung des Diodenstroms und des Feldwertes vom Sollwert sowie die Regelabweichung der automatischen Frequenzregelung wurden visuell kontrolliert. Die Messung erfolgte, nachdem die Mikrowellenleistung auf die jeweils zu messende Probe abgeglichen war.

**Tabelle 2-1: Verwendete Parameter für die CP-H Messungen**

<b>Parameter</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Wert</b>
B0-Field	Zentrum des Magnetfeldes	3379,4 G
Sweep	Scan-Weite	58,52 G
Sweep Time	Messzeit	15 sek.
Number	Anzahl Messdurchläufe	3
Smooth	Tiefpassfilter	0 sek. (inaktiv)
Steps	Anzahl Messpunkte im Spektrum	4096
Modulation	Modulationsamplitude	2000 mG
MW atten	Mikrowellenleistung	10 dB
Gain	Vertstärkung des Signals	500
Phase	Phasenempfindliche Gleichrichtung des Verstärkers	180 (Phase invertiert)

### 2.6.2. Datenerfassung

Die Abbildung 2.7. zeigt ein typisches Spektrum der spin probe CP-H<sup>•</sup>.



**Abbildung 2-7: Typisches Spektrum der verwendeten spin probe CP-H<sup>•</sup> (aus 85).**

Das ESR-Signal wurde nach der phasenempfindlichen Gleichrichtung A/D-gewandelt und in einem temporären Speicher gespeichert, bevor die Daten auf einen PC übertragen wurden. Entsprechend der Anzahl der Speicherplätze (12-Bit-Speicher) bestand ein Scan aus 4096 Werten. Auf der y-Achse waren relative Einheiten aufgetragen.

### 2.6.3. Versuchsdurchführung

Die ROS-Produktion der Zellen wurde mittels ESR Spektroskopie und dem Einsatz der spin probe CP-H<sup>•</sup> bestimmt. Da CP-H<sup>•</sup> durch alle Radikale oxidiert wird, aber im

Speziell die Rolle der Superoxidradikale untersucht werden sollte, wurde der Anteil der Superoxidradikale am Gesamtsignal durch Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) in parallelen Versuchen ermittelt. Das Enzym SOD katalysiert spezifisch die Umsetzung von Superoxid in  $H_2O_2$ , das nicht mit CPH reagieren kann, da es kein Radikal ist. Bei Vorhandensein von Superoxidradikalen bewirkt die Zugabe von SOD folglich eine Abschwächung des Signals. Durch einen Vergleich der Versuche mit und ohne SOD-Zugabe konnte so die Menge an freigesetztem Superoxid quantifiziert werden.

Die verwendete spin probe CP-H gehört zu der Gruppe der Hydroxylamine. Bei Hydroxylaminen besteht prinzipiell die Möglichkeit der Autoxidation. Zur Reduktion der Autoxidation von Hydroxylaminen wurde Diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA) in einer Endkonzentration von 1mM, gelöst in 0,9% NaCl, eingesetzt. In dieser Lösung wurde anschließend 10mM CP-H gelöst. Diese Stammlösung wurde jeden Tag neu angesetzt und zur Durchführung der Experimente mit Stickstoff (Air Liquide) begast. CP-H wurde in den Experimenten in einer Konzentration von 1mM verwendet. Um die Autoxidation von CP-H bestimmen zu können, wurden auch Versuche im zellfreien System durchgeführt. Dieses „Hintergrundssignal“ wurde dann vom Versuchsergebnis subtrahiert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach Fertigstellung der Stammlösung zur Durchführung der Versuche folgendermaßen vorbereitet.

Bei den PASM, PAFB, ASMC und AFB handelt es sich um adhärenz Zellen. Zunächst wurden die Zellen mit phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Dann wurde 1ml Trypsinlösung appliziert, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Die Inkubation der Zellen mit Trypsin erfolgte bei  $37^{\circ}C$ . Nach einer Minute Inkubationszeit wurden die Zellen in eine Falcontube überführt und die Wirkung von Trypsin durch FCS inaktiviert. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde den Zellen erneut PBS zugegeben und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Zur Durchführung der Versuche mit adhärenz Zellen wurden 250.000 Zellen in 1ml PBS überführt.

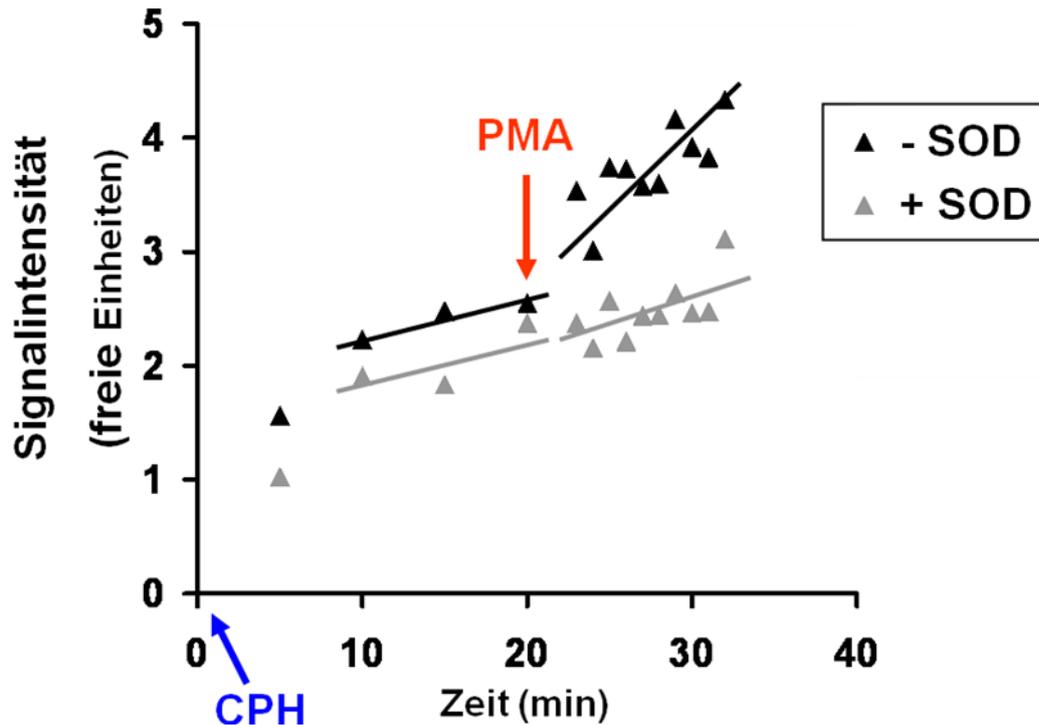
Bei den HL60-Zellen handelt es sich um eine permanente nicht-adhärenz Zelllinie. Für die Versuche wurden 5 Millionen HL60-Zellen in 1ml PBS gegeben. Den Proben in 2ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH) wurde schließlich CP-H in der o.g. Konzentration hinzugegeben. Die Probe kam dann in ein Wasserbad und wurde dann zunächst 10 Minuten lang je nach Versuchsreihe normoxisch oder

hypoxisch direkt begast. Die Prozent-Angaben der  $O_2$ -Konzentration beziehen sich auf normobare Werte.

Für jede der gewählten  $O_2$ -Konzentrationen wurde die basale ROS-Produktion in den ersten 20 Minuten alle 5 Minuten gemessen. Zur Aktivierung der NAD(P)H-Oxidasen wurde anschließend Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) appliziert. Dafür wurde vor Einsatz des PMA zunächst eine 16mM PMA-Stamm-Lösung angesetzt, wofür 10mg PMA in 1ml DMSO gelöst wurde. Diese Lösung wurde durch Zugabe von NaCl auf eine Konzentration von 100 $\mu$ M gebracht und dann zu 10 $\mu$ l in Reaktionsgefäßen aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert und direkt vor Gebrauch aufgetaut. PMA wurde in einer Konzentration von 1 $\mu$ M verwendet. Die Messungen mit PMA begannen drei Minuten nach Applikation dieser Substanz und erfolgten dann in einem Ein-Minuten-Intervall für die folgenden 10 Minuten. Für die Kontrollen erfolgte die Zugabe des PMA-Lösungsmittels.

Die Messungen erfolgten in 50 $\mu$ l- Quarzkapillaren (Blaubrand, Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland) und ergaben für die Auswertung ein Drei-Linien-Spektrum. Die Ergebnisse wurden in Form von Balkendiagrammen dargestellt, die die Differenz der Steigung des ESR-Signals zwischen den Versuchen mit SOD und den Versuchen ohne SOD zur Quantifizierung der  $\dot{O}_2^-$ -Freisetzung/min zeigen (siehe Abbildung 2-8).

Die gemessenen freien Einheiten in der vorliegenden Arbeit stellen die ESR-Signalintensität dar, die durch das Programm Analysis (Magnettech GmbH, Berlin) nach Messung der Amplitude des ESR-Signals bestimmt wurden. Dadurch wurde es möglich, die Ergebnisse miteinander zu vergleichen.



**Abbildung 2-8: Beispiel für ESR Signalintensität („freie Einheiten“) über Zeit.**

Für die Quantifizierung von Superoxid wurden Versuche in der An- und Abwesenheit von 75 mU SOD durchgeführt. Die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung/min wurde vor und nach Zugabe von  $1\mu\text{M}$  PMA berechnet.

## 2.7. Statistik

Die Daten wurden in Mittelwerten  $\pm$  SEM („Standard error of mean“) angegeben. Der statistische Vergleich mehrerer experimenteller Reihen basierte auf einer Varianzanalyse mit dem Student-Newman-Keuls *post hoc*-Test bei Signifikanz. Auswertungen nur zweier Datenreihen wurden mit zweiseitigem t-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für alle Vergleiche bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  angenommen.

## 3. Ergebnisse

### **3.1. Untersuchung der Superoxidfreisetzung in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration**

Zur Untersuchung der ROS-Bildung unter Hypoxie auf zellulärer Ebene, wurde PASMC und PAFB mit verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%) begast und die Freisetzung von Radikalen mittels ESR-Spektroskopie gemessen. Zur Ermittlung des  $\cdot\text{O}_2^-$ -Anteils am Signal wurden Experimente unter Zugabe von SOD in parallelen Versuchen durchgeführt. Zum Vergleich zu systemischen Zellen wurden auch ASMC und AFB untersucht. Als positive Kontrollzellen, für die die Freisetzung von  $\cdot\text{O}_2^-$  zelltypisch ist, wurden HL60-Zellen verwendet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen Zelltypen gezeigt.

#### **3.1.1. HL60-Zellen**

Normoxisch und mit 10% O<sub>2</sub>-Konzentration inkubierte HL60-Zellen zeigten keine signifikante Superoxidfreisetzung. Bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 5% ergab sich eine tendenziell höhere Superoxidfreisetzung, die sich jedoch nicht als signifikant erwies. Einen signifikanten Anstieg der Superoxidfreisetzung sah man schließlich bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 3%.

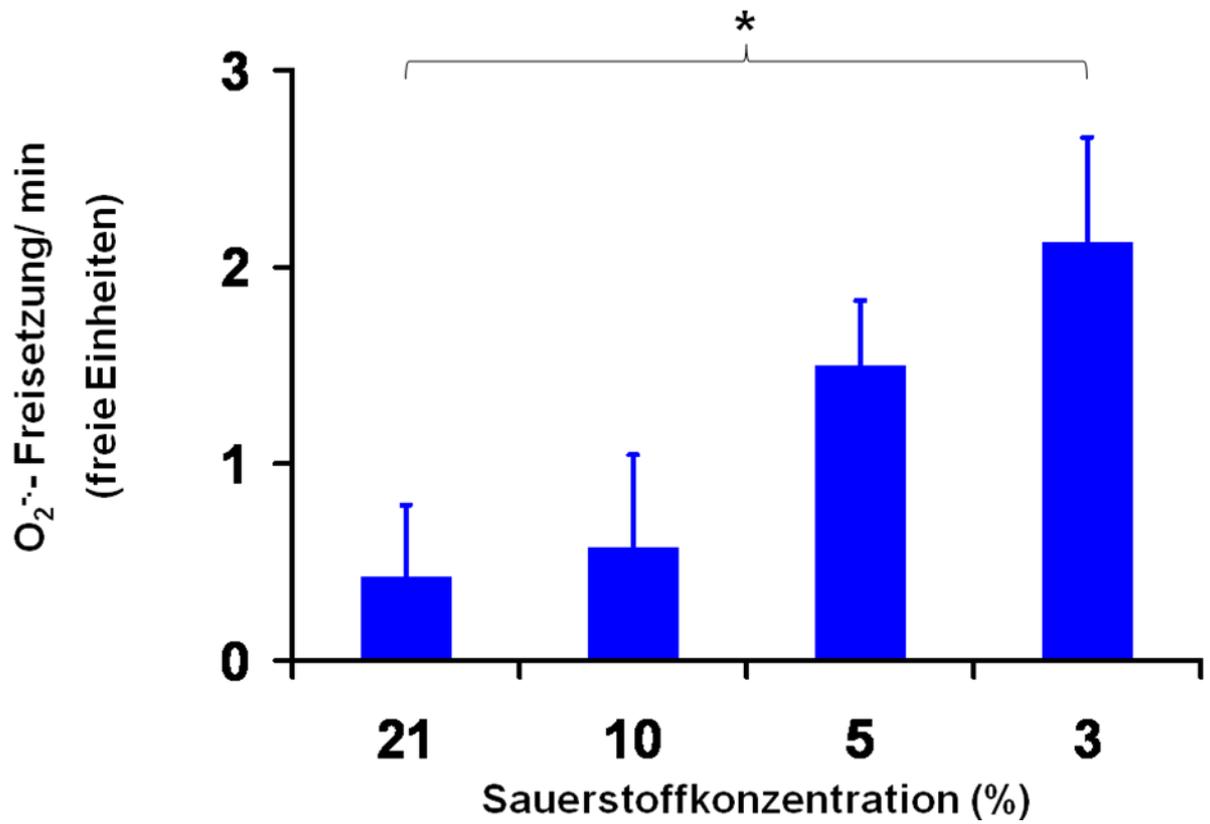


Abbildung 3-1: Vergleich der  $\text{O}_2^-$ -Freisetzung/min von HL60-Zellen bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%), n=4 in jeder Gruppe. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM). \*=p<0,05.

### 3.1.2. PASC, ASMC, PAFB und AFB

Bei den PASC und ASMC zeigte sich ohne PMA-Stimulierung bei allen vier O<sub>2</sub>-Konzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%) keine  $\dot{O}_2$ -Freisetzung. Somit war kein Unterschied zwischen den verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen vorhanden (siehe Abbildung 3-2, 3-3).

Bei den PAFB und AFB war zwar die  $\dot{O}_2$ -Freisetzung bei 21% und 10% O<sub>2</sub>-Konzentration tendenziell leicht erhöht, allerdings nicht signifikant im Vergleich zu 5% und 3% (siehe Abbildung 3-4, 3-5).

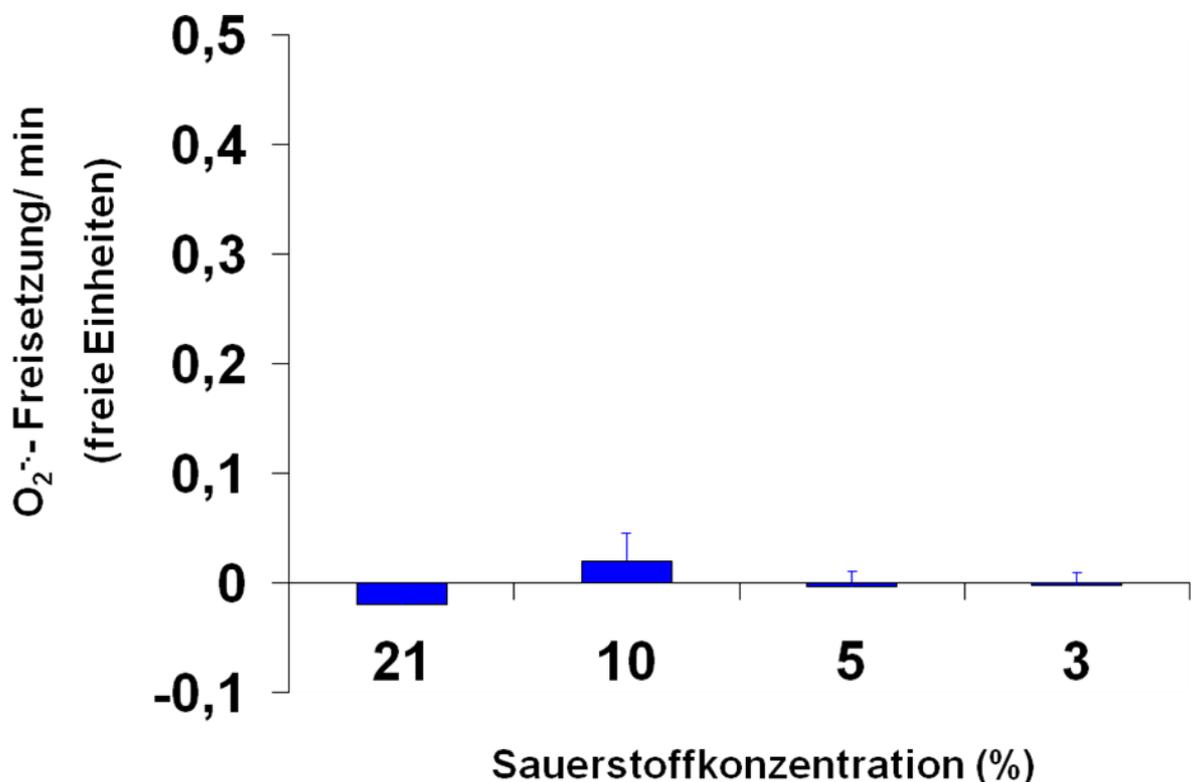


Abbildung 3-2: Vergleich der  $\dot{O}_2$ -Freisetzung/min von PASC bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%), n=4 in jeder Gruppe. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM). Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen.

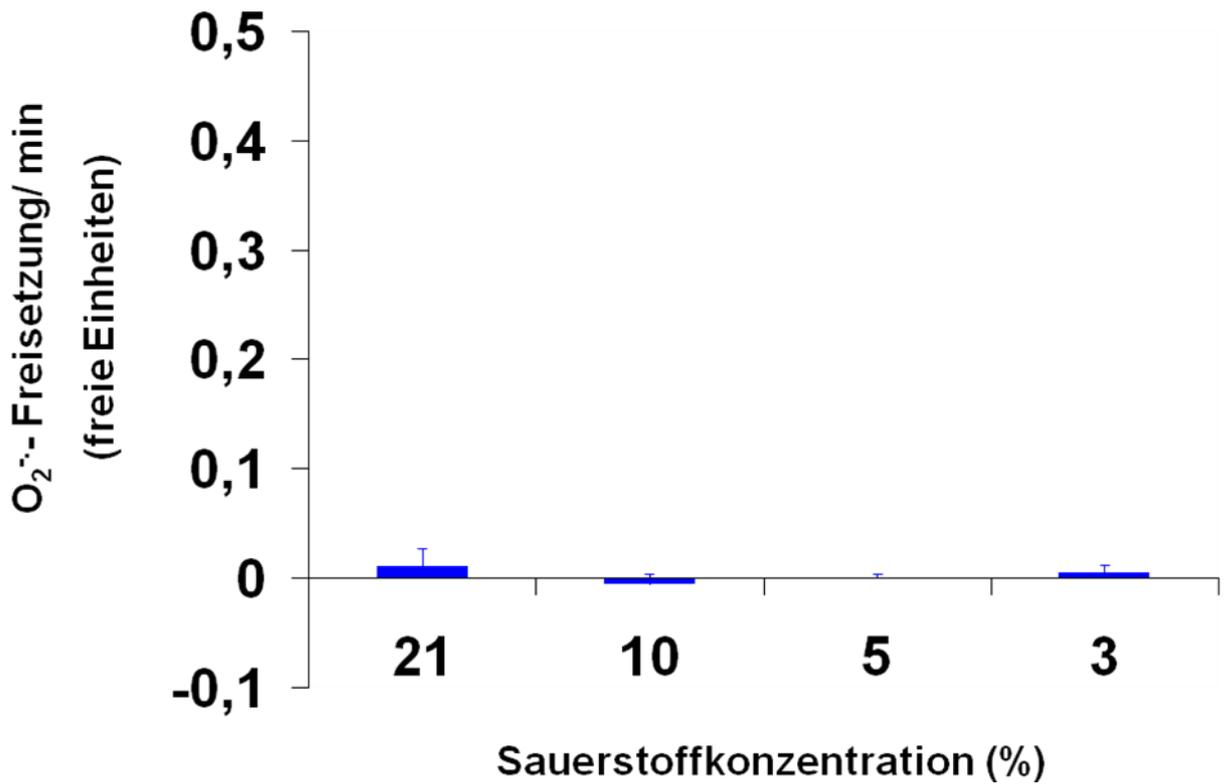


Abbildung 3-3: Vergleich der O<sub>2</sub>-Freisetzung/min von ASMC bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%), n=4 in jeder Gruppe. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM). Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen.

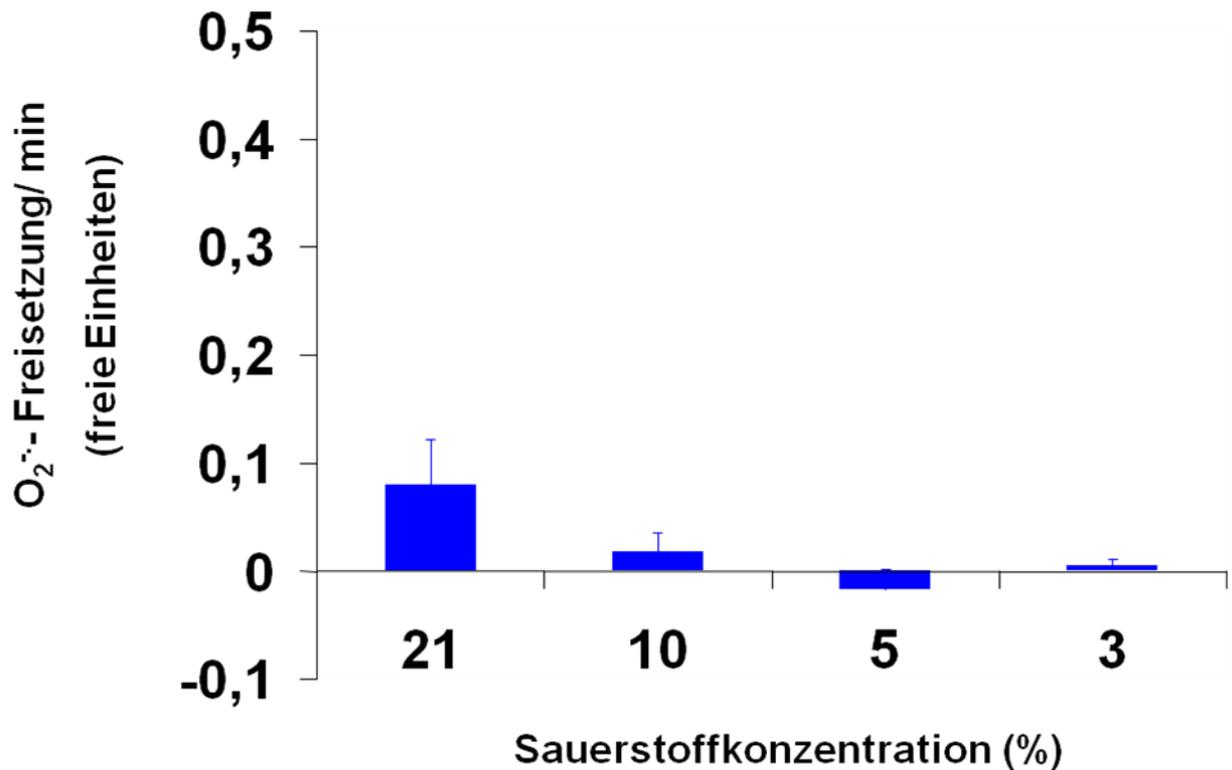


Abbildung 3-4: Vergleich der O<sub>2</sub>-Freisetzung/min von PAFB bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%), n=4 in jeder Gruppe. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM). Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen.

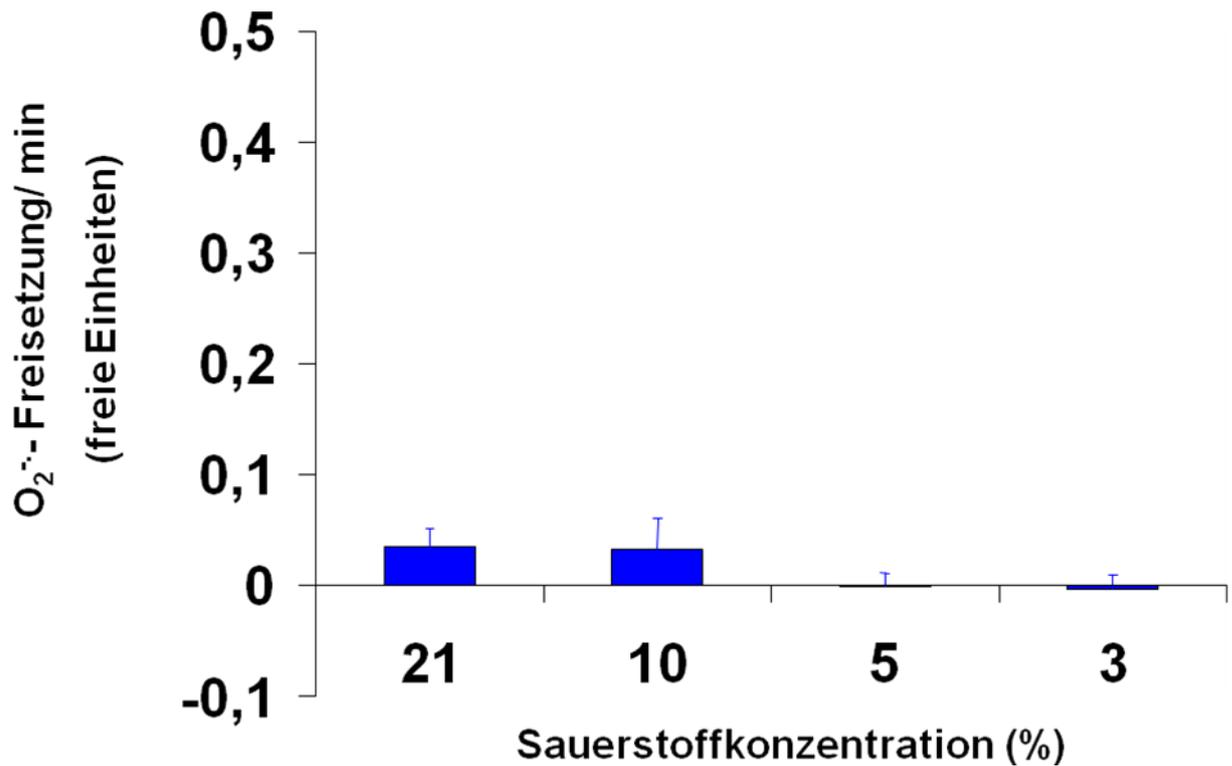


Abbildung 3-5: Vergleich der  $\text{O}_2^-$ -Freisetzung/min von AFB bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%), n=4 in jeder Gruppe. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM). Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen.

### **3.2. Untersuchung der Änderung der Superoxidfreisetzung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen nach Stimulierung der NAD(P)H-Oxidasen**

Es wurde keine vermehrte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung der PASMIC, PAFB, ASMC, AFB unter hypoxischen  $\text{O}_2$ -Konzentrationen gemessen. Dies kann daran liegen, dass Hypoxie keinen Einfluss auf die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung hat oder aber es sind so geringe Mengen, dass die hier verwendete Methode nicht sensitiv genug ist, um mögliche Unterschiede zu detektieren. Die Messungen erfolgten unter den verschiedenen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bedingungen um die  $\text{O}_2$ -abhängige  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung nach PMA-Stimulierung erfassen zu können. Im Folgenden ist die Änderung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung nach PMA-Zugabe für die verschiedenen  $\text{O}_2$ -Konzentrationen für jeden untersuchten Zelltyp dargestellt.

#### **3.2.1. HL60-Zellen**

HL60-Zellen zeigten keinen Anstieg der Superoxidfreisetzung nach Stimulierung mit PMA für die untersuchten  $\text{O}_2$ -Konzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%). Es bestand auch kein Unterschied zwischen den verschiedenen  $\text{O}_2$ -Konzentrationen (siehe Abbildung 3-6).

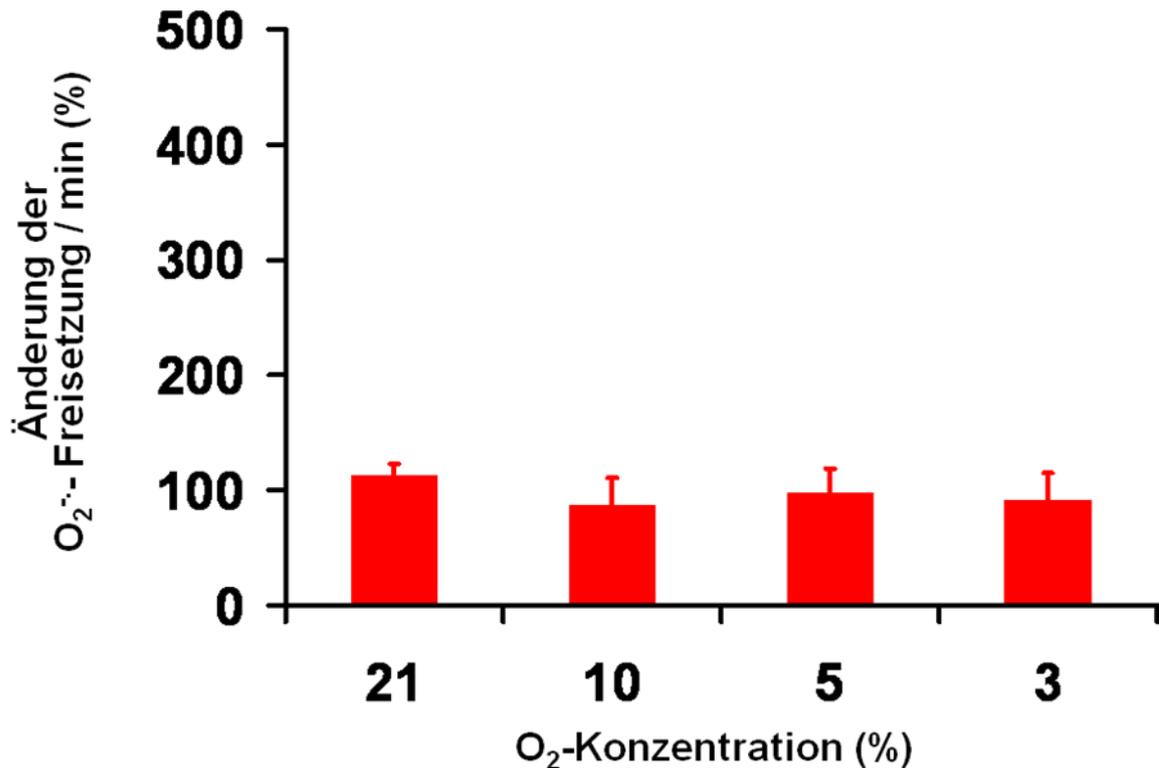


Abbildung 3-6: Änderung der  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Freisetzung/min (%) von HL60-Zellen nach PMA-Zugabe bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%) bezogen auf den Wert vor PMA-Zugabe (=100%), n=4 in jeder Gruppe. Die Konzentration von PMA betrug  $1\mu\text{M}$ . Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM).

### 3.2.2. PASC, ASC, PAFB und AFB

Die Superoxidfreisetzung der PASC war nach Stimulierung mit PMA bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 5% im Vergleich zu den anderen Konzentrationsverhältnissen (21%, 10%, 3%) signifikant erhöht (siehe Abbildung 3-7).

ASC, PAFB und AFB zeigten weder unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>-Konzentration) noch unter Hypoxie (10%, 5% und 3% O<sub>2</sub>-Konzentration) eine signifikant erhöhte Superoxidfreisetzung nach Stimulierung mit PMA (siehe Abbildung 3-8 bis 3-10).

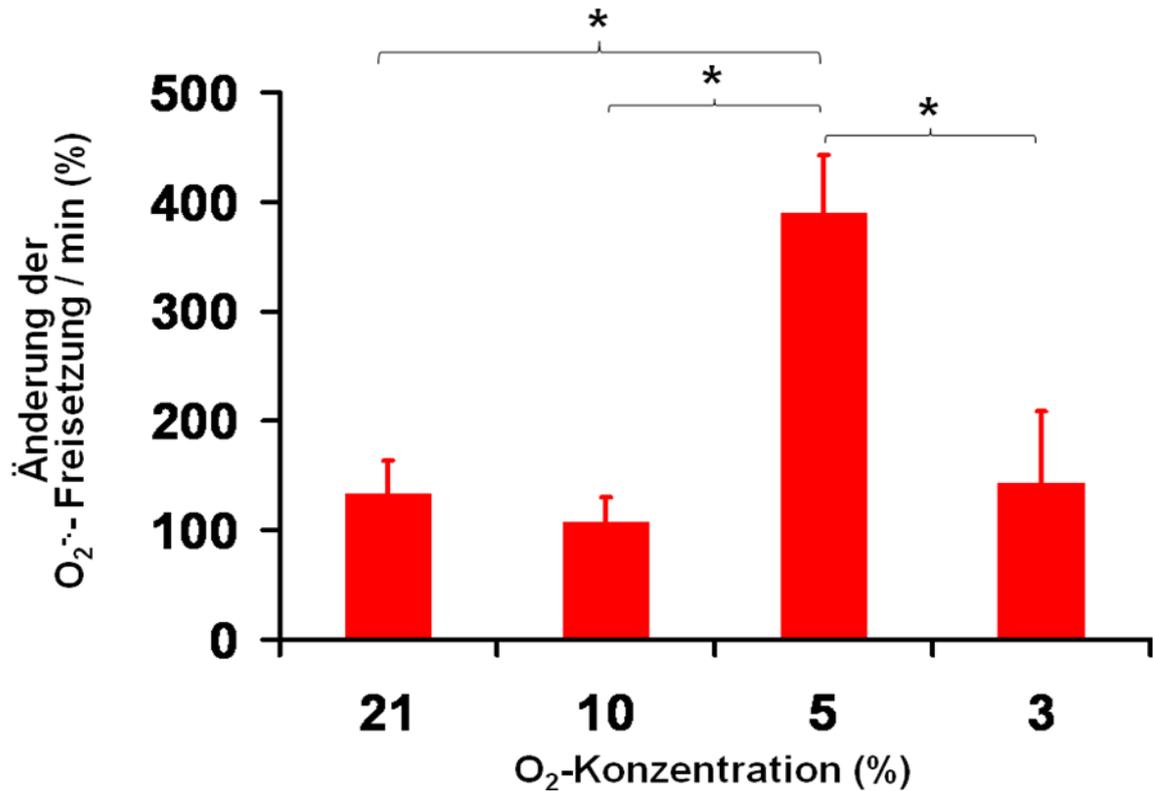


Abbildung 3-7: Änderung der  $\text{O}_2^-$ -Freisetzung/min (%) von PASMC nach PMA-Zugabe bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%) bezogen auf den Wert vor PMA-Zugabe (=100%), n=4 in jeder Gruppe. Die Konzentration von PMA betrug  $1\mu\text{M}$ . Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM). \* = signifikanter Unterschied.

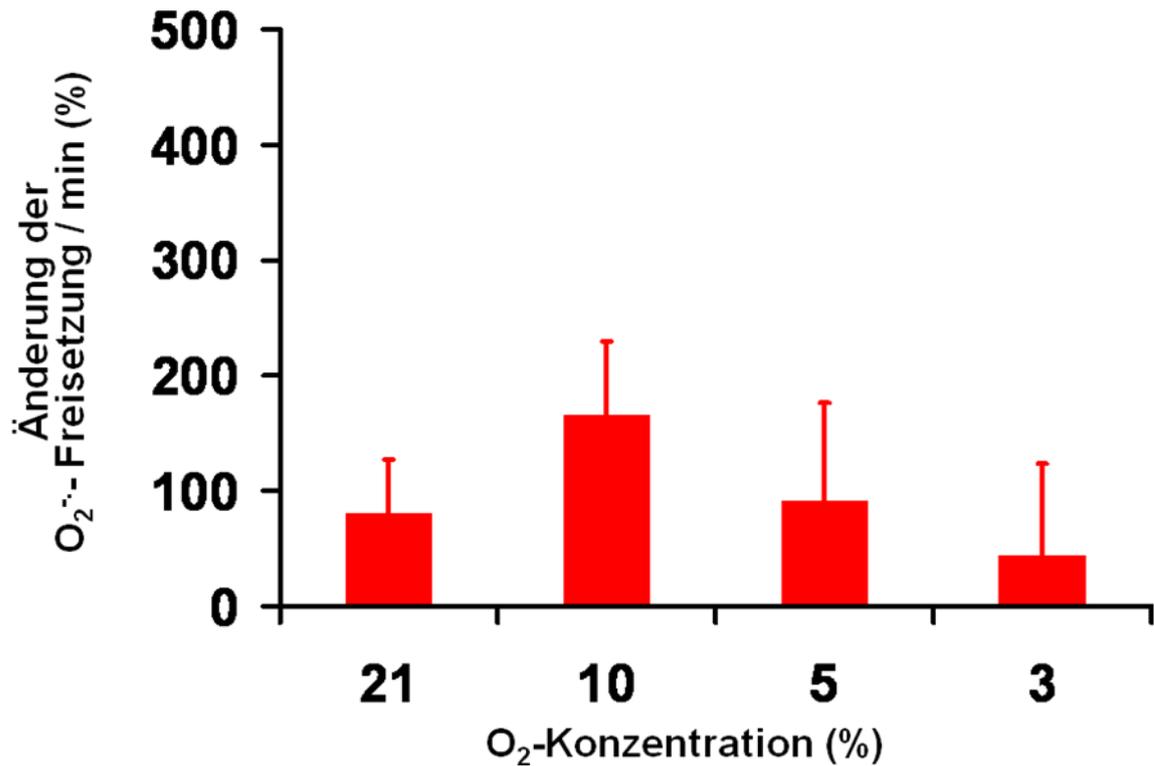


Abbildung 3-8: Änderung der  $\dot{O}_2$ -Freisetzung/min (%) von ASMC nach PMA-Zugabe bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%) bezogen auf den Wert vor PMA-Zugabe (=100%), n=4 in jeder Gruppe. Die Konzentration von PMA betrug 1 $\mu$ M. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM).

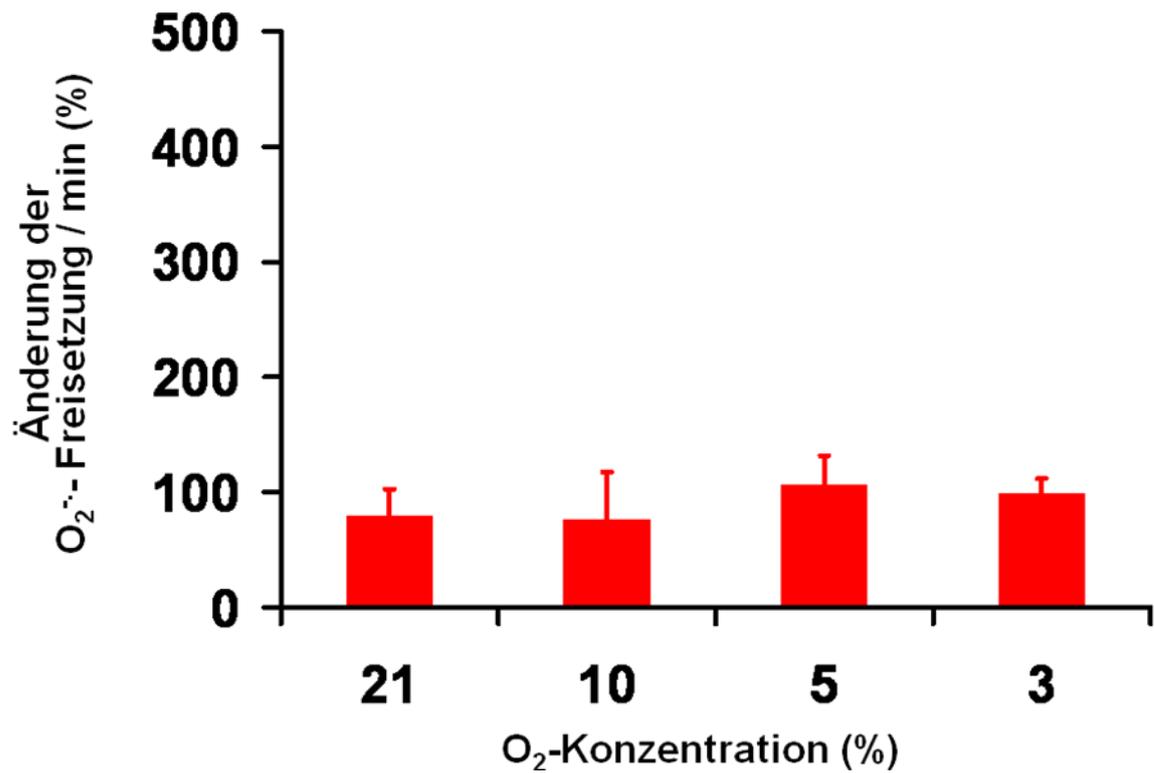


Abbildung 3-9: Änderung der  $\dot{O}_2$ -Freisetzung/min (%) von PAFB nach PMA-Zugabe bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%) bezogen auf den Wert vor PMA-Zugabe (=100%), n=4 in jeder Gruppe. Die Konzentration von PMA betrug 1  $\mu$ M. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM).

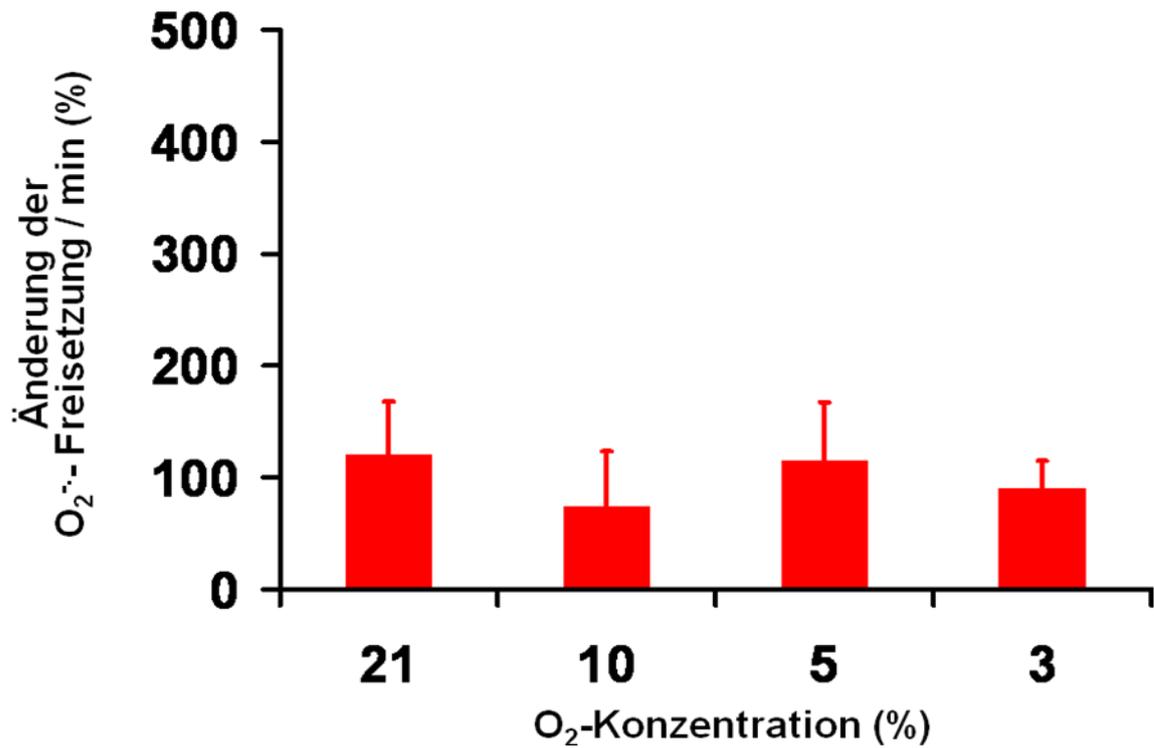


Abbildung 3-10: Änderung der  $\text{O}_2^-$ -Freisetzung/min (%) von AFB nach PMA-Zugabe bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21%, 10%, 5%, 3%) bezogen auf den Wert vor PMA-Zugabe (=100%), n=4 in jeder Gruppe. Die Konzentration von PMA betrug  $1\mu\text{M}$ . Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM).

### 3.2.3. Einfluß der NAD(P)H-Oxidase auf die Superoxidfreisetzung von PASMC

Die Rolle der NAD(P)H-Oxidase von PASMC in Zusammenhang mit der Superoxidfreisetzung wurde in einer weiteren Versuchsreihe eingehend untersucht. Da sich bei 5% O<sub>2</sub> unter PMA-Stimulation eine signifikant erhöhte Superoxidfreisetzung gezeigt hatte, wurde die Superoxidproduktion von PASMC sowohl unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>-Konzentration) als auch unter diesen hypoxischen (5% O<sub>2</sub>-Konzentration) Bedingungen unter Hemmung der NAD(P)H-Oxidase erneut gemessen. Dazu wurde der NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF) verwendet. Durch die Inhibierung der NAD(P)H-Oxidase mittels AEBSF war bei der O<sub>2</sub>-Konzentration von 5% die Änderung der Superoxidfreisetzung der PASMC nach PMA-Stimulierung signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 3-11). Die Änderung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung sank dabei auf das gleiche Niveau wie bei 21% O<sub>2</sub> unter sonst gleichen Versuchsbedingungen.

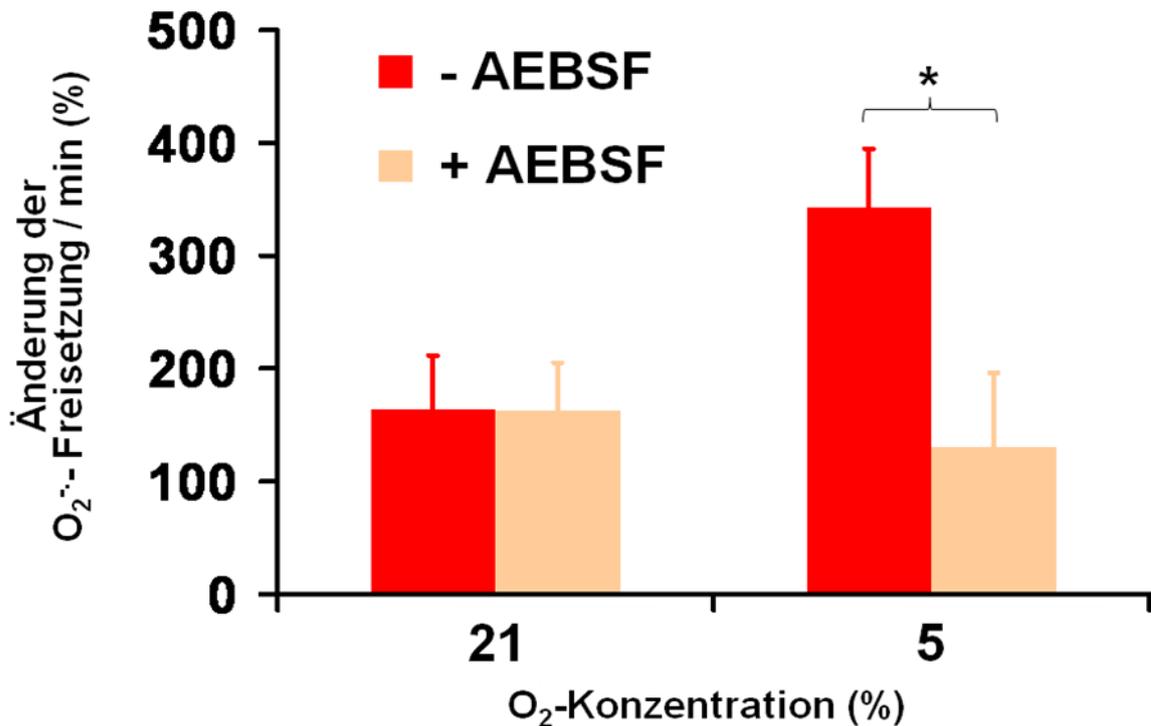


Abbildung 3-11: Effekt des NAD(P)H-Oxidase-Inhibitors AEBSF auf die Änderung der  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Freisetzung/min (%) von PASMC nach PMA-Zugabe bei 21% und 5%  $\text{O}_2$ -Konzentration bezogen auf den Wert vor PMA-Zugabe (=100%), n=4 in jeder Gruppe. Die Konzentration von PMA betrug  $1\mu\text{M}$ . Zur Inhibierung der NAD(P)H-Oxidase wurde 1mM AEBSF verwendet. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+SEM). \*= signifikanter Unterschied.

## 4. Diskussion

ROS erfüllen im Organismus sehr unterschiedliche Aufgaben und sind somit für den Körper von großer Bedeutung. Beim Menschen reguliert die zu den ROS zählende Verbindung  $H_2O_2$  das Wachstum vaskulärer Zellen durch die Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) und extrazellulärer signal-regulierter Kinase (ERK), die die Phosphorylierung von Effektorproteinen steuern<sup>58</sup>. Sim et al. zeigten, dass ROS ebenfalls für die Apoptose von neutrophilen Granulozyten durch die Aktivierung des ERK-Weges verantwortlich sind<sup>91</sup>. In beiden Fällen konnten NAD(P)H-Oxidasen als Quelle der ROS-Produktion nachgewiesen werden. Neben NAD(P)H-Oxidasen gibt es zahlreiche andere Enzyme oder Organellen, die ROS produzieren und so das zelluläre Redoxpotential beeinflussen können. Unter anderem gehören das Xanthin/Xanthin-Oxidase-System<sup>92, 93</sup> sowie die Mitochondrien dazu<sup>41, 94, 95</sup>. In dieser Arbeit wurde die Rolle von NAD(P)H-Oxidasen als mögliche Quelle für die Superoxidfreisetzung unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Die von diesem Enzym produzierten ROS könnten am Zustandekommen der akuten HPV ebenso beteiligt sein wie am pulmonalvaskulärem Remodeling, das unter chronisch hypoxischen Verhältnissen stattfindet<sup>28, 30, 55, 96-101</sup>. Diese Annahme wird durch Publikationen sowohl unserer eigenen als auch anderer Arbeitsgruppen gestützt, in denen zum einen durch verschiedene pharmakologische Interventionen die akute HPV als abgeschwächt oder nicht mehr vorhanden gezeigt wurde und zum anderen die Rolle von durch NAD(P)H-Oxidasen produzierten ROS durch den Einsatz von transgenen, für verschiedene Untereinheiten dieses Systems defizienten Mäusen, untersucht wurden<sup>46, 47, 80-84</sup>.

Ausgehend von der Hypothese, dass unter Hypoxie vermehrt ROS durch NAD(P)H-Oxidasen freigesetzt werden und die  $\cdot O_2^-$  zur Entstehung der HPV und pulmonalen Hypertonie (PH) beitragen, wurde in dieser Arbeit die hypoxieabhängige Freisetzung von  $\cdot O_2^-$  durch NAD(P)H-Oxidasen in vaskulären glatten Muskelzellen und Fibroblasten untersucht. In diesem Zusammenhang wurden sowohl aortale als auch pulmonalarterielle Zellen verwendet, um mögliche Unterschiede zwischen den pulmonalen und systemischen Gefäßen aufzeigen zu können. Die Analyse der  $\cdot O_2^-$ -Freisetzung wurde mit der Elektronenspinresonanz Spektroskopie durchgeführt.

## **4.1. Messung von ROS und die Elektronenspinresonanz Spektroskopie**

Mittels ESR Spektroskopie werden entweder direkt oder indirekt Radikale nachgewiesen. Für den direkten Nachweis werden Moleküle in der Gasphase oder in Lösung direkt in das Spektroskop eingebracht, um Art und Konzentration der ROS zu bestimmen. Für die Messung von  $\cdot\text{O}_2^-$  ergibt sich die Schwierigkeit, dass diese Radikale eine sehr kurze Halbwertszeit haben. Zudem ist dieses Radikal in sehr geringer Konzentration vorhanden ( $\sim 1 \text{ nM}$ ) und zeigt bei Raumtemperatur kein ESR Spektrum<sup>102</sup>. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine indirekte Methode angewandt, die nicht die Radikale selbst analysiert. Vielmehr wird eine Reaktion mit einer entsprechenden Substanz zwischengeschaltet, aus der ein stabiles und langlebiges Produkt entsteht, das mittels ESR analysiert werden kann<sup>102</sup>.

Die ältere der beiden indirekten Nachweismethoden ist das sog. „Spin-Trapping“<sup>103, 104</sup>, was bedeutet, dass in einer Reaktionslösung ein kurzlebige Radikal mit einer diamagnetischen Substanz, die sich in Lösung befindet, reagiert und so ein langlebigeres Radikal gebildet wird. Dieses Produkt akkumuliert in der Lösung, bis es schließlich eine Konzentration erreicht, bei der es möglich ist, das Radikal mittels ESR Spektroskopie zu identifizieren<sup>103, 104</sup>. Die Reaktion ist üblicherweise eine Addition, bei der die diamagnetische Komponente als „Spin-Trap“ und das langlebigere Endprodukt als „Spin-Addukt“ bezeichnet wird. Typische Spin-Traps sind z.B. C-nitroso-Komponenten und Nitrone, an die sich das reaktive Radikal schnell bindet und so Nitryl-Radikale bildet. Die gebräuchlichsten Spin-Traps sind 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-Oxide (DMPO) oder 2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxid (EMPO)<sup>103, 104</sup>.

Aber diese Methode hat auch Nachteile. So ist die Reaktionsgeschwindigkeit sehr langsam und wird deshalb durch intrinsische Antioxidantien beeinflusst. Zudem können sich Hydroxyl-Radikal-Addukte oder Hydroxylamine bilden, von denen letztere kein Spektrum bei der Analyse mittels ESR Spektroskopie ergeben<sup>103, 104</sup>.

Alternativ zu der Reaktion der Radikale mit Spin-Traps gibt es das sog. Spin-Labeling<sup>103, 104</sup>. Ein Spin-Label ist eine paramagnetische Substanz, typischerweise ein Nitryl-Radikal oder, wie im Falle dieser Arbeit, ein zyklisches Hydroxylamin, das von dem Radikal das freie Elektron übernimmt, dadurch selbst zum Radikal wird und

mittels ESR Spektroskopie analysiert werden kann <sup>103, 104</sup>. Eine solche paramagnetische Komponente, die sich nicht-kovalent an das Radikal bindet, wird auch als „Spin-Probe“ bezeichnet <sup>103, 104</sup>. Für die Quantifizierung von Superoxid unter Zuhilfenahme von „Spin-Probes“ sind die zyklischen Hydroxylamine am besten geeignet <sup>102, 104, 105</sup>, da die Geschwindigkeitskonstante ca. hundertmal höher liegt als bei einer Reaktion mit Spin-Traps, und es den Spin-Probes deshalb weitaus besser möglich ist, mit intrinsischen Antioxidationsmechanismen zu konkurrieren <sup>102</sup>. Zudem hat das Endprodukt der Reaktion, ein stabiles Nitroxid, eine sehr viel längere Halbwertszeit verglichen mit dem aus Spin-Traps gebildeten Spin-Addukt. Demnach erlaubt die Verwendung zyklischer Hydroxylamine die quantitative Bestimmung von Superoxid mit erhöhter Sensibilität, so dass auch geringere Konzentrationen des Superoxidanions nachgewiesen werden können <sup>102</sup>.

Aus den genannten Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit das „Spin-Labeling“ bevorzugt. Dazu wurde als Spin-Probe das zyklische Hydroxylamin 1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin<sup>•</sup>HCl (CP-H) verwendet, das spezifisch mit Superoxid und Peroxynitrit reagiert und das stabile Spin-Addukt CP• bildet <sup>31, 102-104</sup>. Das Spin-Addukt ist ein Nitroxid-Derivat, das seine Stabilität durch die Abwesenheit eines β-Protons erhält. β-Protonen sind eine der Hauptangriffspunkte im oxidativen Verfall von radikalischen Addukten <sup>103, 104</sup>. Zur größtmöglichen Reduzierung der Autoxidation der Spin Probe wurde vor Versuchsbeginn die Lösung auf Eis angesetzt, Metall-Chelatoren wie DTPA hinzugefügt und der Puffer mit Stickstoff begast. Diese Maßnahmen wurden für alle in dieser Arbeit eingesetzten Lösungen berücksichtigt.

Andererseits birgt auch die Verwendung von Spin-Probes gewisse Nachteile. Das aus der Reaktion des Spin-Probes mit einem Radikal entstehende Nitroxid-Radikal hat kein spezifisches Spektrum im ESR. Zudem können sich Spin-Addukte durch unspezifische Oxidation ergeben, die zu einem falsch-positiven Signal führen <sup>102-104</sup>. Dieser relativen Unspezifität kann aber durch den Einsatz von Superoxiddismutase oder durch Inhibitoren für radikalproduzierende Systeme, wie NAD(P)H-Oxidasen, Xanthin-Oxidasen oder Mitochondrien, entgegengewirkt werden <sup>102, 106-108</sup>.

## 4.2. Andere Methoden neben ESR

In Anbetracht der Vor- und Nachteile der gegenwärtig eingesetzten Messverfahren zur Detektion von ROS wurde in der vorliegenden Arbeit die ESR Spektroskopie eingesetzt. Nachfolgend sollen noch die Besonderheiten anderer Messmethoden vorgestellt werden.

### 4.2.1. Cytochrom C Reduktion

Cytochrom c wird durch  $\cdot\text{O}_2^-$  reduziert, was über die Änderung der spektralen Eigenschaften gemessen werden kann. Der Reaktionsmechanismus der Reduktion von Cytochrom c besteht in der Übertragung eines Elektrons vom Superoxidradikal auf das Häm-Eisen des Cytochroms. Die Reduktion von Cytochrom c in biologischen Systemen ist jedoch nicht immer die Folge der Superoxidbildung. So kann Cytochrom c neben den Superoxidradikalen auch durch bestimmte zelluläre Enzyme reduziert werden <sup>109</sup>. Da Cytochrom c auch eine elektronenübertragende Funktion in der mitochondrialen Atmungskette hat, können Elektronen der Atmungskette das als Nachweissubstanz zugesetzte Cytochrom c auch direkt reduzieren, so dass es zu einem Anstieg der Absorption auch ohne Vorhandensein von Superoxidradikalen kommt <sup>110</sup>.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht, die enzymatische Reduktion des Cytochrom c durch Derivatisierung des Moleküls zu verhindern. Succinylierung der Lysin-Reste von Cytochrom c macht dieses unempfindlicher gegenüber Redoxsystemen der mikrosomalen Elektronentransportkette <sup>111</sup>, während Acetylierung der Lysin-Reste das Cytochrom unanfälliger gegen Oxidation oder Reduktion durch mitochondriale Enzyme macht <sup>112</sup>. Der Versuch, die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung an intakten Mitochondrien mit acetyliertem Cytochrom c nachzuweisen, hat jedoch ergeben, dass die mitochondriale Atmungskette auch acetyliertes Cytochrom c direkt reduziert, so dass der Beitrag der durch  $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale vermittelten Reduktion mit diesem Nachweissystem nicht meßbar war.

Obwohl der Umsatz des Cytochroms durch mitochondriale Enzyme mit der Zunahme seines Acetylierungsgrades sinkt [94], ist seine Anwendbarkeit zum  $\cdot\text{O}_2^-$ -Nachweis

aus Mitochondrien auf diese Weise nicht zu verbessern, da die reduzierte Form des Cytochroms mit Acetylierung  $\geq 60\%$  instabil ist und autoxydiert <sup>112</sup>.

Ob die Reduktion von Cytochrom c in einem System durch  $\cdot\text{O}_2^-$  erfolgt, lässt sich mit Hilfe des Enzyms Superoxid Dismutase (SOD) überprüfen. SOD katalysiert die Dismutation von Superoxidradikalen, so dass der über  $\cdot\text{O}_2^-$  reduzierte Anteil des Cytochrom c durch SOD voll hemmbar wird. Daher kann eine SOD-hemmbar Reduktion des Cytochrom c als Beweis für die Bildung der  $\cdot\text{O}_2^-$  in einem zu untersuchenden System gelten.

Ist die Reduktion des Cytochrom c nicht meßbar oder SOD-insensitiv, dann kann dennoch eine Superoxidbildung in dem System nicht ausgeschlossen werden, da die am Elektronentransport beteiligten Enzyme direkt mit Cytochrom c in Wechselwirkung treten können <sup>109, 110, 113</sup>.

Das durch  $\cdot\text{O}_2^-$  reduzierte Cytochrom c kann enzymatisch sowie nicht-enzymatisch oxidiert werden, was zu einer Verminderung bis hin zur völligen Beseitigung des nachweisbaren Reaktionsproduktes führen kann. Wasserstoffperoxid kann beispielsweise reduziertes Cytochrom c oxidieren <sup>114</sup>, die hierfür erforderliche Konzentration ist jedoch viel höher, als sie unter physiologischen Bedingungen erzeugt werden kann <sup>115</sup>. Hydroxylradikale, Stickstoffmonoxid und Peroxinitrit können ebenfalls zur nicht-enzymatischen Oxidation des reduzierten Häm-Eisens des Cytochroms beitragen <sup>116, 117</sup>.

Somit kann die  $\cdot\text{O}_2^-$ -vermittelte Reduktion von Cytochrom c durch eine gleichzeitig ablaufende Oxidation kompensiert werden, so dass trotz vorhandener Superoxidbildung kein reduziertes Cytochrom c nachweisbar ist.

Die Cytochrom c Reduktion ist zudem keine so sensitive Methode wie die ESR-Spektroskopie <sup>118</sup>. Die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung von vaskulären Zellen ist sehr niedrig, so dass diese Methode im Bereich der unteren Nachweisbarkeitsgrenze für  $\cdot\text{O}_2^-$  arbeitet. Geringste Fehler in der Versuchsdurchführung führen somit zu wesentlichen Unterschieden der Endergebnisse <sup>118</sup>.

## 4.2.2. Auf Chemilumineszenz basierende Methoden

Chemilumineszenz (CL) als Nachweismethode der Radikalbildung wird häufig zur Untersuchung von radikalfreisetzenden Enzymen eingesetzt. Als eine hochempfindliche Methode hat die Chemilumineszenz eine weite Verbreitung in der Erforschung radikalischer Prozesse gefunden, obwohl die Ergebnisse nicht immer eine eindeutige Interpretation zulassen.

Gegenwärtig werden hauptsächlich zwei verschiedene Chemilumineszenzfarbstoffe zur ROS-Detektion eingesetzt.

### 4.2.2.1. Luminol

Luminol wird seit langem als lumineszente Probe zum Nachweis der Radikalbildung an stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen eingesetzt<sup>119</sup>. Eine andere verbreitete Applikation der Luminol-Chemilumineszenz ist die Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Substanzen. Das Meßprinzip beruht darauf, dass die Radikale enzymatisch<sup>120, 121</sup>, thermolytisch<sup>122</sup> oder photochemisch<sup>123</sup> in Anwesenheit des Luminols produziert werden, wobei die Chemilumineszenz registriert wird. Bei der Zugabe von Radikalfängern wird die Chemilumineszenz konzentrationsabhängig gemessen, was als Maß für die antioxidative Wirkung angesehen wird. Nach neueren Erkenntnissen ist die Oxidation des Luminols (LH<sup>-</sup>) zum Luminol-Radikal (LH<sup>·</sup>) der erste Schritt in dem zur Chemilumineszenz führenden Prozeß<sup>124</sup>. Enzyme<sup>125</sup>, Radikale (OH<sup>·</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sowie komplexierte Übergangsmetalle<sup>124</sup> sind in der Lage, Luminol zum Luminolradikal zu oxidieren. Da das Superoxidradikal weder ein starkes Oxidans noch ein starker Reduktans ist, ist eine effektive Oxidation des Luminols durch <sup>·</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> nicht zu erwarten<sup>124</sup>. Tatsächlich ist die Quantenausbeute der lumineszenten Reaktion zwischen Luminol und Superoxid mit 4·10<sup>-8</sup> Photonen pro <sup>·</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Molekül zu gering, um die Superoxidradikale als effiziente Oxidantien des Luminols ansehen zu können<sup>124</sup>.

Peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>) wird aus Superoxid und Stickstoffmonoxid gebildet<sup>126</sup>. Da die NO-Synthase und NAD(P)H-Oxidase eine gemeinsame Aktivierungsstufe über die Proteinkinase C bei der PMA-Stimulierung von Zellen aufweisen<sup>127</sup>, ist die Bildung von ONOO<sup>-</sup> durch PMA-stimulierte Zellen zu erwarten. ONOO<sup>-</sup> ist in der Lage, Luminol zum Luminolradikal zu oxidieren<sup>128</sup> und hierdurch eine zur

Chemilumineszenz führende Reaktionssequenz zu starten. Die Beteiligung von ONOO<sup>-</sup> an der Luminol-Chemilumineszenz von stimulierten PMN wurde über die hemmende Wirkung von Inhibitoren der zellulären NO-Synthase auf die Intensität der Chemilumineszenz abgeleitet<sup>129</sup>. Hydroxylradikale<sup>130</sup> könnten ebenfalls zur Oxidation des Luminols über den emissiven Weg beitragen.

Die unerwünschten Nebenreaktionen, welche die Chemilumineszenz des Luminols beeinflussen können, sind jedoch nicht nur auf der Stufe der Luminolradikalbildung möglich. Die entstehenden Zwischenprodukte der von Lumineszenz begleiteten Oxidation des Luminols wie Luminolradikal und Diazachinon könnten durch Nebenreaktionen aus dem System entfernt werden. Dies würde eine Verringerung der Chemilumineszenz-Intensität mit sich bringen, ohne dass es einen Bezug zur <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung gäbe. So wird eine Hemmung der Luminol-Chemilumineszenz in Anwesenheit von Stickstoffmonoxid durch die Nebenreaktionen der Oxidationszwischenprodukte erklärt<sup>131</sup>.

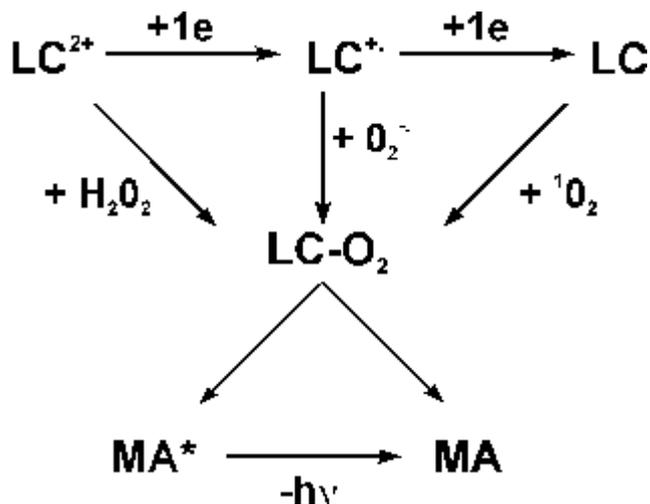
Somit ist die Konzentration der <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> weitgehend nicht der einzige und entscheidende Faktor, welcher die Intensität der Luminol-Chemilumineszenz bestimmt. Umgekehrt kann diese nicht als Maß der Superoxidbildung dienen.

Zusammenfassend gesprochen ist ein selektiver <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Nachweis über die Luminol-Chemilumineszenz bei vaskulären Zellen nicht möglich.

#### **4.2.2.2. Lucigenin**

Im Gegensatz zum Luminol wird Lucigenin als ein <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>-spezifisches lumineszierendes Agens angesehen. Am häufigsten wird die Lucigenin-Methode zum <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Nachweis an stimulierten Zellen verwendet<sup>132</sup>, obwohl Lucigenin auch zum Nachweis der Radikalbildung aus Mitochondrien<sup>133</sup> sowie von isolierten Enzymen<sup>134</sup> zunehmend Anwendung findet.

Mögliche Reaktionswege des Lucigenins, die zur Chemilumineszenz führen, sind in Abbildung-1 dargestellt.



**Abbildung 2-1:** Schematische Darstellung zur Entstehung der Lucigenin-Chemilumineszenz.  $\text{LC}^{2+}$  - Lucigenin;  $\text{LC}^{\cdot+}$  -Lucigenin-Kationradikal;  $\text{LC-O}_2$  - Dioxetan, MA- N-Methylacridon (aus <sup>132</sup>).

Die Reaktion zwischen dem Lucigenin-Kationradikal  $\text{LC}^{\cdot+}$  und dem Superoxidradikal führt zur Bildung von Dioxetan  $\text{LC-O}_2$ . Dieses ist instabil und zerfällt in zwei Moleküle N-Methylacridon (MA), wobei eines aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand übergeht und dabei die als Chemilumineszenz beobachtete Strahlung verursacht. Die primäre Reduktion des Lucigenins  $\text{LC}^{2+}$  zum Lucigenin-Kationradikal  $\text{LC}^{\cdot+}$  kann durch  $\text{}^{\cdot}\text{O}_2^-$  sowie durch manche Enzyme erfolgen. Obwohl das Wasserstoffperoxid als divalent reduzierter Sauerstoff die stöchiometrischen Anforderungen der Chemilumineszenzreaktion erfüllt, wird Lucigenin nur bei alkalischen pH-Werten durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert. Das divalent reduzierte Lucigenin kann auch mit Singulett-Sauerstoff reagieren <sup>118</sup>.

Es wurde berichtet, dass Lucigenin in manchen biologischen Systemen selbst die Bildung der  $\text{}^{\cdot}\text{O}_2^-$  vermitteln kann <sup>135</sup>. Dies geschieht, wenn Lucigenin nicht durch Superoxidradikale, sondern durch ein Enzym reduziert wird, dann autoxydiert, wobei ein Elektron auf den Sauerstoff übergeht und  $\text{}^{\cdot}\text{O}_2^-$  gebildet wird.

Das gebildete Superoxidradikal kann Lucigenin weiter reduzieren und dadurch zu einer SOD-sensitiven Chemilumineszenz in einem System führen, in dem ursprünglich kein  $\text{}^{\cdot}\text{O}_2^-$  vorhanden waren.

In der Arbeit von Li et al. <sup>136</sup>, welche die Redoxzyklisierung des Lucigenins beim  $\text{}^{\cdot}\text{O}_2^-$ -Nachweis an manchen biologischen Systemen bestätigt, wurde vorgeschlagen, dieses Problem durch den Einsatz niedrigerer Konzentrationen Lucigenins zu lösen.

Ob Lucigenin zu einer zusätzlichen Radikalbildung beiträgt, wurde aus der Zunahme des Sauerstoffverbrauchs in Anwesenheit des Lucigenins geschlossen<sup>136</sup>. Nachdem unter einer bestimmten Konzentration des Lucigenins keine meßbare Zunahme des Sauerstoffverbrauchs registriert wurde, während die Chemilumineszenz unter den gleichen Bedingungen noch detektierbar blieb, sind die Autoren zu dem Schluß gekommen, dass die Redoxzyklisierung des Lucigenins nur bei seiner Anwendung in hohen Konzentrationen geschieht.

Somit ist die Anwendung der Lucigenin-Chemilumineszenz zum  $\cdot\text{O}_2^-$ -Nachweis an biologischen Systemen wegen einer möglichen Redoxzyklisierung des Lucigenins, welche zu einer zusätzlichen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung beitragen kann und schwer nachvollziehbar ist, beschränkt. Ein quantitativer Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  ist in Zellen unter diesen Umständen nicht möglich.

#### 4.2.3. Dihydroethidium

Vorteil dieser Methode ist, dass das 2-Hydroxyethidium spezifisch die Reaktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  mit Dihydroethidium widerspiegelt. Das Detektieren von  $\cdot\text{O}_2^-$  gestaltet sich dadurch ziemlich einfach. Diese Methode kann auch ganz einfach bei Gefäßen eingesetzt werden. Die ermittelten Werte mit 2-Hydroxyethidium liegen im Bereich des Detektionslimits<sup>118</sup>.

Nachteilig bei dieser Methode ist die Lichtsensitivität des Farbstoffs Dihydroethidium. Die Versuche müssten daher in verdunkelten Räumen stattfinden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Dihydroethidium direkt mit  $\text{O}_2$  in der Lösung reagiert<sup>118</sup>.

#### 4.2.4. 2'-7'-dichlorofluorescein-diacetat

Das 2'-7'-dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) wurde in vielen Studien zur Detektion von ROS eingesetzt. DCFH-DA ist zellpermeabel. Nach Aufnahme in die Zelle wird DCFH-DA durch Esterasen in 2'-7'-dichlorofluorescein (DCFH) umgewandelt. Tritt eine Reaktion zwischen ROS und DCFH auf, so geht DCFH in das fluoreszierende Molekül 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) über<sup>118</sup>.

DCFH-DA wird als ein genereller Indikator für ROS akzeptiert. Es reagiert mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ , Lipidhydroperoxiden und in einem geringeren Ausmaß mit  $\cdot\text{O}_2^-$ <sup>118</sup>.

DCFH ist nicht zellpermeabel und wird daher für die Detektion von intrazellulären ROS eingesetzt. Eine weitere Stärke dieser Methode ist die Möglichkeit, den zellulären Bildungsort von ROS zu lokalisieren <sup>118</sup>.

Die DCFH-DA-Methode wird von Fachleuten jedoch sehr oft kritisiert. Die Photoreduktion von ROS bspw. führt zu einer artifiziellen Bildung von Semiquinoneradikalen, die wiederum  $O_2$  zu  $\cdot O_2^-$  reduzieren können. Zusätzlich kann die Oxidation von DCFH zu DCF durch Peroxidasen katalysiert werden. Die Redox-Reaktion von DCF und DCFH kann zur Bildung von DCF-freien Radikalen führen. Diese bilden nicht nur  $\cdot O_2^-$ , sondern reagieren auch mit Antioxidantien. Die Dismutation von  $\cdot O_2^-$  zu  $H_2O_2$  kann zu einer Selbstampfifikation der DCF-Fluoreszenz führen <sup>118</sup>.

Letzendlich ist die Oxidation von DCFH durch  $H_2O_2$  eine indirekte Reaktion und bedarf der zusätzlichen Aktivität von Peroxidasen, Übergangsmetallen und Hämenzymen. Daher würden Veränderungen des Peroxidase-Niveaus in den Zellen auch die DCF-Fluoreszenz unabhängig von ROS beeinflussen <sup>118</sup>.

#### 4.2.5. Amplex Red

Amplex Red ist ein Fluoreszenzfarbstoff und wird zur Detektion von  $H_2O_2$  eingesetzt. Die Amplex-Red-Methode ist sehr spezifisch und sensitiv und hat ein Detektionslimit bis in den pikkomolaren Bereich <sup>118</sup>.

Der Nachteil dieser Methode ist, dass dieser Farbstoff autoxidieren und somit  $\cdot O_2^-$  und  $H_2O_2$  bilden kann. Zudem kann aufgrund der Zellimpermeabilität dieses Farbstoffes  $H_2O_2$  nur extrazellulär messen <sup>118</sup>.

Diese Methode wird zur Detektion von  $H_2O_2$  in zellfreien Systemen eingesetzt <sup>118</sup>.

### **4.3. Untersuchung der Superoxidfreisetzung in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration**

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob es unter akuter Hypoxie zu einer vermehrten oder verminderten  $\cdot O_2^-$ -Freisetzung in pulmonalarteriellen und aortalen glatten Muskelzellen bzw. Fibroblasten kommt und

ob es diesbezüglich Unterschiede zwischen den systemischen und pulmonalarteriellen Zellen gibt.

#### 4.3.1. HL60-Zellen

HL60-Zellen haben kein vollständig ausgeprägtes NAD(P)H-Oxidase-System. Durch Northern- und Western-Blot-Analysen konnten hohe mRNA- und Protein-Level von p22<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, rac-2, gp91<sup>phox</sup> (NOX2) und dessen Splice-Variante NOX-2S nachgewiesen werden<sup>137, 138</sup>. Der Unterschied zwischen der klassischen NAD(P)H-Oxidase der neutrophilen Granulozyten und die der HL60-Zellen ist das Fehlen der wasserlöslichen, zytosolischen Proteine p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup><sup>137</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter basalen Bedingungen Superoxidanionen freigesetzt werden können und dass diese Freisetzung unter Hypoxie ansteigt. Durch die Versuche mit den HL60-Zellen konnte somit gezeigt werden, dass prinzipiell vermehrt Superoxidanionen auf Zellebene unter Hypoxie gebildet werden können. Als wahrscheinliche Quelle dieser erhöhten  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung kommen NAD(P)H-Oxidasen in Betracht, da es sich bei den HL60-Zellen um neutrophilähnliche Zellen handelt. Die HL60-Zellen dienen insbesondere auch zur Validierung der verwendeten ESR-Technologie.

#### 4.3.2. ASMC und PASMIC

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass ROS bei der HPV eine wichtige Rolle spielen<sup>4, 8, 25, 30, 31, 36, 37, 45, 47, 51, 74, 77, 82, 84, 98, 99, 139-143</sup>.

Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie konnte man bei den ASMC keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Superoxidfreisetzung feststellen.

Eine Untersuchung zur Superoxidfreisetzung von ASMC wurde von De Champlain et al. gemacht. Sie fanden heraus, dass die ASMC von Ratten mit systemischer arterieller Hypertonie eine höhere ROS-Freisetzung zeigen als die von gesunden Ratten. Die Quelle von ROS wurde in dieser Studie nicht genauer eruiert<sup>144</sup>.

Eine weitere Studie mit ASMC wurde von Dikalov et al. durchgeführt. Die Freisetzung von  $\cdot\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in intakten aortalen glatten Muskelzellen wurde mittels

Dihydroethidium und Amplex Red bestimmt. Dihydroethidium kombiniert mit der „high performance liquid chromatography“ ist inzwischen bei der Detektion von  $\cdot\text{O}_2^-$  in Geweben als Standard anerkannt. Mit Amplex Red, ein Fluoreszenzfarbstoff, kann  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Geweben nachgewiesen werden. Dabei gilt dieser Farbstoff als hoch sensitiv und spezifisch. Die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase wurde mittels ESR und der spin probe CPH gemessen. Unter Baseline-Bedingungen zeigten die ASMC ohne Anwendung einer Stimulation eine etwa fünffach höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung als  $\cdot\text{O}_2^-$  <sup>145</sup>.

In Anbetracht dieser Datenlage und basierend auf den eigenen Daten sind die Aussagen bzgl. der Superoxidfreisetzung der ASMC unter Normoxie konsistent. Zugleich zeigte sich in meinem Versuchsansatz, dass sich unter hypoxischen Bedingungen (10%, 5%, 3%  $\text{O}_2$ ) im Vergleich zur Normoxie keine signifikant erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung ergibt.

Es gibt unterschiedliche Evidenz zu der Frage, ob ROS unter Hypoxie – im Vergleich zur Normoxie – bei den PASMC vermehrt oder vermindert gebildet werden <sup>101, 146</sup>.

In den Versuchen mit PASMC ergab sich wie bei den ASMC unter normoxischen (21%  $\text{O}_2$ ) sowie verschiedenen hypoxischen Bedingungen (10%, 5%, 3%  $\text{O}_2$ ) keine signifikante  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung. Ein Zusammenhang mit dem unteren Detektionslimit des ESR Spektroskopes wurde als ursächlich vermutet. Zur Klärung dieser Frage wurde PMA eingesetzt, das die NAD(P)H-Oxidase stimuliert, um dadurch die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung der Zellen zu steigern und für unser Messverfahren nachweisbar zu machen. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

### 4.3.3. PAFB und AFB

Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie (10%, 5% und 3%  $\text{O}_2$ ) konnte bei PAFB und AFB keine signifikante  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung beobachtet werden. Diese Zellen sezernieren auch laut anderen Studien konstitutiv ROS in sehr geringen Mengen <sup>147</sup>. In einer Studie mit aortalen Fibroblasten von Ratten konnte gezeigt werden, dass ROS in der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten eine Rolle spielen <sup>148</sup>. Ob ROS unter Normoxie oder Hypoxie vermehrt gebildet werden, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Als Quelle der ROS wurde durch molekularbiologische Verfahren jedoch die NAD(P)H-Oxidase nachgewiesen. Die Bedeutung der PAFB in

Zusammenhang mit ROS liegt vielmehr in der Ausprägung des „Remodeling“ der Pulmonalarterie bei chronischer Hypoxie in vivo <sup>100, 149-151</sup>.

#### ***4.4. Untersuchung der Änderung der Superoxidfreisetzung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen nach Stimulierung der NADP(H)-Oxidasen***

Das Wissen über die Sauerstoffsensormechanismen und die zugrundeliegenden Signaltransduktionskaskaden, die die zelluläre Antwort auf Hypoxie regulieren, hat innerhalb des letzten Jahrzehnts drastisch zugenommen. Das O<sub>2</sub>-sensing wird als initiales Glied der Signalkette der HPV betrachtet.

Als mögliche Kandidaten für das O<sub>2</sub>-sensing werden das Mitochondrium und die NAD(P)H-Oxidase in Erwägung gezogen <sup>25</sup>.

Mitochondrien haben in den Zellen diverse Funktionen und spielen im Allgemeinen bei der Konservierung von Energie, der Induktion von Apoptose, beim Kalzium-Stoffwechsel und bei intrazellulären Signalmechanismen <sup>152</sup> eine Rolle. Das Mitochondrium erzeugt einen Protonengradienten über die mitochondriale Membran und transferiert dadurch die notwendige Energie für die Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese. Die Elektronen werden über einen Redoxgradienten übertragen und treffen am Ende dieser Kette auf molekularen Sauerstoff.

Die Elektronen der Elektronentransportkette können aber auch schon auf dem Weg durch die Elektronentransportkette auf molekularen O<sub>2</sub> treffen und für die Produktion von <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> verantwortlich sein. Durch das Enzym SOD kann <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konvertiert werden, das dann durch die mitochondriale Membran in das Zytosol diffundieren kann. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> durch einen Anionenkanal des intermembranären Raumes das Extramitochondriale erreicht <sup>41, 153, 154</sup>.

Archer et al. vermuten eine durch Hypoxie verminderte Produktion der mitochondrialen ROS, die einen eher reduzierten zellulären Redoxstatus verursachen und dadurch das Schliessen von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bewirken. Die Mediatoren GSH/GSSG und NADH/NAD werden für diesen Prozess verantwortlich gemacht <sup>40, 155</sup>.

Die Gruppe um Schumacker und Chandel *et al.* haben im Gegensatz dafür Evidenz, dass unter Hypoxie die vermehrte ROS-Freisetzung gleichermaßen die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium fördert und dadurch die HPV bewirkt <sup>41, 156</sup>.

Inhibitoren der ETC verhinderten in drei verschiedenen Studien spezifisch die HPV <sup>41, 157, 158</sup>.

Weiterhin zeigten PASMC ohne eine funktionstüchtige Atmungskette keine spezifischen Veränderungen als Antwort auf Hypoxie <sup>42</sup>.

Einen Anhalt für die NAD(P)H-Oxidase als Sauerstoffsensor der HPV bieten insbesondere auch Studien, die zeigen konnten, dass neuroepitheliale Zellen der Lunge Sauerstoffsensoren darstellen, weil in diesen Zellen das hypoxiesensitive Kaliumpotential durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder durch die direkte Aktivierung der Oxidasen mit Phorbolestern potenziert wird <sup>159, 160</sup> und die Kaliumkanäle der NEB-Zellen von gp91<sup>phox</sup>-defizienten Mäusen keine Hypoxiesensitivität aufzeigen <sup>161</sup>.

In einer weiteren Studie wurde in den Pulmonalarterien von Schafen eine mikrosomale NAD(P)H-Oxidase als Sauerstoffsensor dadurch beschrieben, dass Veränderungen der O<sub>2</sub>-Konzentration, der ROS-Produktion und der cGMP-Bildung den vaskulären Relaxationszustand beeinflusst haben <sup>162</sup>.

Thomas *et al.* und Weissmann *et al.* konnten zeigen, dass der NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor DPI die HPV inhibiert <sup>81, 163</sup>.

Schließlich fanden Marshall *et al.* heraus, dass die der Pulmonalarterie entstammende <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>-freisetzende NAD(P)H-Oxidase ein ungewöhnlich niedriges Redoxpotenzial hat <sup>99</sup>.

In Anbetracht der o.g. Ergebnisse traten die NAD(P)H-Oxidase als Sauerstoffsensor und ROS als Mediator der HPV immer weiter in den Vordergrund.

In der vorliegenden Studie wurde zur Untersuchung der <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung der NAD(P)H-Oxidasen PMA als Stimulator verwendet.

Durch PMA-Stimulation werden in lebenden Zellen Proteinkinasen des Typs Cα und Cδ aktiviert, welche die Untereinheiten p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes phosphorylieren <sup>44, 74</sup>. Durch diesen Prozess wird die Zusammenlagerung der verschiedenen Proteine induziert und es bildet sich die funktionelle NAD(P)H-Oxidase, die hauptverantwortlich für den oxidativen Burst aus neutrophilen Granulozyten ist und die entscheidende Reaktion für die Abwehr invasiver Pathogene darstellt. NAD(P)H-Oxidasen kommen aber nicht nur in phagozytierenden Zellen vor, sondern werden als Homologe auch in nicht-phagozytierenden Zellen

exprimiert<sup>54, 164</sup>. Diese Zellen sind z. B. glatte Muskelzellen und Fibroblasten, die in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht wurden.

Aktivierte Proteinkinasen können aber auch zu einer Steigerung der mitochondrialen ROS-Freisetzung führen<sup>165</sup>. Um sicherzugehen, dass die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung tatsächlich aus den NAD(P)H-Oxidasen resultiert, wurden zusätzliche Experimente in der Anwesenheit des spezifischen NAD(P)H-Oxidase-Inhibitors AEBSF durchgeführt. Erst mit der Durchführung dieser Versuche konnte die NAD(P)H-Oxidase als die wahrscheinlichste Quelle der gebildeten  $\cdot\text{O}_2^-$  definiert werden.

#### 4.4.1. HL60-Zellen

HL60-Zellen setzten in den Versuchen weder unter Normoxie noch unter Hypoxie vermehrt Superoxidradikale nach PMA-Stimulation frei.

In einer Studie von Ahmed et al. wurde gezeigt, dass HL60-Zellen durch die Zugabe von PMA keinen signifikanten Anstieg der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung boten. Es wurden bei dieser Untersuchung keine unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen gewählt. Die Methode, mit der die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung bestimmt wurde, belief sich auf die Chemilumineszenzmethode mittels Luminol und die Cytochrom C-Reduktion<sup>166</sup>. Mögliche Fehlerquellen durch diese Messmethoden wurden in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert. Die in dieser Studie erarbeiteten Daten stimmen mit den hier erarbeiteten Daten unter Normoxie überein. Im Unterschied zu dieser Studie wurden hier jedoch zusätzlich Versuche unter Hypoxie durchgeführt, um einen möglichen pO<sub>2</sub>-abhängigen Anstieg der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung nach PMA-Stimulation nachweisen zu können. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung für die o.g. Ergebnisse könnte das Fehlen der p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> sein<sup>137</sup>. In dieser Studie wurde das Fehlen dieser Untereinheiten lediglich auf mRNA-Ebene nachgewiesen.

Die HL60-Zellen besitzen jedoch die zwei Isoformen der p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup>, das NOXO1 und NOXA1. Diese interagieren mit der auch in den HL60-Zellen vorhandenen Isoform NOX1 und sorgen so für eine gesteigerte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung<sup>76-78</sup>. Dies würde auch zugleich die Daten dieser Arbeit unter akuter Hypoxie bestätigen.

#### 4.4.2. ASMC und PASMC

ASMC zeigten nach Stimulation mit PMA keine spezifische, erhöhte Superoxidfreisetzung. Die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung nahm mit abnehmender  $\text{O}_2$ -Konzentration ab. Wichtig für die Durchführung dieser Versuche war das Erkennen von möglichen Unterschieden zwischen den glatten Muskelzellen der systemischen Zirkulation und derer in der pulmonalarteriellen Zirkulation.

Andere Arbeitsgruppen, die auch an der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität der systemischen glatten Muskelzellen interessiert waren, untersuchten dies bspw. mit der Anwendung von Angiotensin II. Es ist bekannt, dass Angiotensin II zu einer Expressionserhöhung der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> führt und dadurch eine verstärkte Generierung von Superoxiden bewirkt <sup>141</sup>. Weiterhin führt Angiotensin II zu erhöhten Plasmaspiegeln von Endothelin-1, welches zu den potentesten Vasokonstriktoren gehört. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II unter Hypoxie über Stimulation von vaskulären NAD(P)H-Oxidasen eine Vasokonstriktion ausübt. Hierbei wird erhöhter oxidativer Streß induziert. Dieser Mechanismus ist vermutlich für die Regulation der protahierten HPV von Bedeutung <sup>84, 141, 167-171</sup>. Es muss jedoch auch bemerkt werden, dass diese Studien zum Großteil basierend auf die Chemilumineszenzmethode oder die Cytochrom C-Reduktion durchgeführt wurden.

Eine weitere Studie mit ASMC wurde von Dikalov et al. durchgeführt. Er wies nach, dass das NOX4 der ASMC von Ratten hauptsächlich  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die NOX1  $\cdot\text{O}_2^-$  bilden. Die NOX1- und NOX4-Expression dieser Zellen wurde durch short interfering RNA gegen das NOX4 und die der NOX1 durch „antisense“ NOX1-Adenovirus reduziert. Somit konnte ziemlich zuverlässig die ROS-Quelle bestimmt werden. Zum Einsatz kamen in dieser Studie mehrere Methoden. Die Freisetzung von  $\cdot\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in intakten aortalen glatten Muskelzellen wurde mittels Dihydroethidium und Amplex Red bestimmt. Dihydroethidium kombiniert mit der „high performance liquid chromatography“ ist inzwischen für die Detektion von  $\cdot\text{O}_2^-$  in Geweben und Zellen als Standard anerkannt. Mit Amplex Red, einem Fluoreszenzfarbstoff, kann man  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Zellen nachweisen. Dabei gilt dieser Farbstoff als hoch sensitiv und spezifisch. Die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase wurde mittels ESR und der spin probe CPH gemessen. Unter Baseline-Bedingungen zeigten die ASMC ohne Anwendung einer Stimulation eine etwa fünffach höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung als  $\cdot\text{O}_2^-$ . Durch die Anwendung

von Angiotensin II wurde jedoch die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung verdoppelt, wobei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung nur um 15-30% gesteigert werden konnte<sup>145</sup>. In diesem Zusammenhang sollte auch auf eine Proteinkinase C unabhängige Stimulation der NAD(P)H-Oxidasen verwiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde eine pulmonalarterielle NAD(P)H-Oxidase als möglicher Sauerstoffsensoren und die durch diesen Multienzymkomplex erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung als grundlegende Mechanismen der HPV postuliert.

Die Stimulation der NAD(P)H-Oxidasen der PASMC mit PMA, einem unspezifischen Stimulator der NAD(P)H-Oxidasen,<sup>31</sup> resultierte bei einer  $\text{O}_2$ -Konzentration von 5% in einer massiven Zunahme der Superoxidfreisetzung. Es stellt sich jedoch die Frage, ob es sich hierbei um extra- oder intrazellulär gebildete Radikale handelt. In der Literatur wird CPH zum Abfangen von Radikalen vermehrt aus dem extrazellulären Bereich diskutiert<sup>31, 102, 145, 172</sup>. Es ist möglich, dass durch die Verwendung von CPH die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung intrazellulär nicht detektierbar ist aber doch noch eine wesentliche Rolle bei der HPV spielt. Eine Erklärung dafür wäre die Möglichkeit, dass das extrazelluläre  $\cdot\text{O}_2^-$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt wird, dieses in die Zelle diffundiert und somit die HPV auslöst. Zu dem damaligen Zeitpunkt gab es keine alternative ESR-Technik, um dieser Frage gezielt nachzugehen. Gegenwärtig kann intrazelluläres  $\cdot\text{O}_2^-$  mit der Spin Probe CMH nachgewiesen werden. Diese ist zellpermeabel und sehr sensitiv bei der Detektion von  $\cdot\text{O}_2^-$ <sup>107</sup>.

Wurden die Experimente jedoch bei geringeren Sauerstoffkonzentrationen als 5% durchgeführt, so sah man wiederum einen starken Abfall der Superoxidfreisetzung. Konsistent mit den erarbeiteten Daten sind auch die Daten von Marshall et al.<sup>99</sup>. Sie beschrieben in ihrer Studie NAD(P)H-Oxidasen mit einem ungewöhnlich niedrigen Redoxpotential, die sie in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie nachgewiesen haben. Ein Nachteil in dieser Studie war der Einsatz des sehr unspezifischen NAD(P)H-Oxidase-Inhibitors DPI<sup>99</sup>. DPI hat die Eigenschaft, alle FAD-abhängigen Enzyme, die mitochondriale Elektronentransportkette und einige Kaliumkanäle zu inhibieren<sup>171, 173, 174</sup>. Dies war in vorangehenden Studien auch der Grund für den Einsatz von verschiedenen NAD(P)H-Oxidasen-Inhibitoren wie bspw. Apocynin und AEBSF in dem Modell der isoliert ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge<sup>81, 143</sup>. AEBSF verhinderte spezifisch die durch Hypoxie induzierte pulmonalarterielle Vasokonstriktion, wohingegen Apocynin aus unerklärlichen Gründen den Vasotonus der Pulmonalarterie beeinflusste<sup>81, 143</sup>.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass ROS-Messungen an isolierten Rattenlungen mit Hilfe der Chemilumineszenzmethode unter Hypoxie auf einen Abfall der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung hindeuteten<sup>139, 140</sup>. In einer weiteren Studie, in der drei verschiedene Farbstoffe (amplex red, lucigenin, 2',7'- dichlorfluoresceindiacetat (DCFH)) zur Detektion von ROS eingesetzt wurden, konnte in den hypoxisch gehaltenen Pulmonalarterien von Ratten ein Abfall der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung festgestellt werden<sup>157</sup>. Im Gegensatz dazu wiesen aber wiederum Chemilumineszenz- und DCFH-Messungen an Pulmonalarterien von Schweinen auf einen Anstieg der ROS unter Hypoxie hin, die auch durch ESR-Daten bekräftigt wurden<sup>36</sup>. Messungen von ROS an PASMC von Kalb<sup>99</sup>, Ratte<sup>41, 142</sup> und Kaninchen<sup>175</sup> deuteten auch auf einen Anstieg hin. Letztere Ergebnisse wurden auch erst vor kurzem durch eine neue Methode, die Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) genannt wird, wiederholt belegt<sup>176</sup>.

Liu et al. beschrieben in Experimenten mit isolierten pulmonalarteriellen Ringen, dass die Antwort auf Hypoxie ausbleibt, wenn die gp91<sup>phox</sup>-Untereinheit von NAD(P)H-Oxidasen ausgeknockt ist<sup>82</sup>. Hierbei handelte es sich jedoch um pulmonalarterielle Ringe von Mäusen, die chronisch hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren<sup>82</sup>. Die Gruppe von Weissmann et al. wies eine weniger ausgeprägte Antwort auf akute alveoläre Hypoxie in p47<sup>phox</sup>-Knock-Out-Mäusen nach, wohingegen die Tiere mit einer Deletion der gp91<sup>phox</sup>-Untereinheit von NAD(P)H-Oxidasen keinen Unterschied zum Wildtyp zeigten<sup>84</sup>.

Aus den o.g. Versuchen lässt sich ableiten, dass NAD(P)H-Oxidasen womöglich eine Schlüsselrolle bei der HPV spielen.

Weiterhin beschrieben Archer und Mitarbeiter eine verringerte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung in gp91<sup>phox</sup>-Knock-out-Mäusen, zeigten aber gleichzeitig, dass die vaskuläre Reaktion dieser Tiere auf alveoläre Hypoxie identisch zu der in Wildtypmäusen ist<sup>141</sup>.

In einer Studie von Weissmann et al. wurde die Abhängigkeit der ESR-Signalintensität von der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration bei der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge untersucht. Hierzu wurden verschiedene inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen verwendet (1%, 2,5%, 5%, 10%, 16%, 21%). Die Zusammensetzung des inspiratorischen Gases wurde alle 30 Minuten verändert. Die niedrigste ESR-Signalintensität zeigte sich bei 2,5%. Bei 1% kam es zu einem Anstieg der ESR-Signalintensität. Durch Zugabe von SOD konnte bei allen Sauerstoffkonzentrationen die ESR-Signalintensität signifikant gesenkt

werden. Extrazelluläres SOD, welches zur Quantifizierung von  $\text{}^{\bullet}\text{O}_2^-$  herangezogen wurde und die Zellmembran nicht passieren kann, katalysierte die intravaskuläre Dismutation von Superoxidradikalen<sup>177, 178</sup>. Dies deutete darauf hin, dass ein Anteil des ESR-Signals durch intravaskulär freigesetztes Superoxid zustande kam.

Die NAD(P)H-Oxidase ist ein Flavozytochrom, das in  $\text{O}_2$ -sensitiven Geweben lokalisiert ist, wie bspw. in den neuroepithelialen Körperchen (NEB), pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen, pulmonalarteriellen Fibroblasten und Endothelzellen<sup>99, 179-182</sup>.

Die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase erfolgt durch die Phosphorylierung des  $\text{p47}^{\text{phox}}$  und durch die bereits aktivierte Rac GTPase<sup>51</sup>. Verschiedene nichtphagozytäre  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ -Isoformen wurden in verschiedenen Zellen oder Geweben identifiziert, wie bspw. NOX1, NOX3, NOX4 und Duox<sup>25</sup>. Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind die in den Gefäßen vorkommenden NOX-Isoformen.

Diese NOX-Isoformen haben ähnliche Eigenschaften: sie bilden  $\text{}^{\bullet}\text{O}_2^-$  in einer geringeren Quantität als die phagozytischen Oxidasen und geben diese vermehrt in das intrazelluläre Milieu ab<sup>74, 183</sup>. Weitere zwei Isoformen von  $\text{p47}^{\text{phox}}$  und  $\text{p67}^{\text{phox}}$ , NOXO1 und NOXA1, interagieren mit NOX1 um höhere Mengen an Superoxid zu produzieren<sup>76-78</sup>. Diese Interaktion bedarf auch keiner Phosphorylierung des  $\text{p47}^{\text{phox}}$ <sup>25</sup>. Die Proteinkinase C und die Phospholipase A2 haben im Allgemeinen die Aufgabe, die Aktivität der NAD(P)H-Oxidasen zu regulieren<sup>184, 185</sup>. Die NAD(P)H-Oxidasen können aber auch durch die Depolarisation der Zelle aktiviert werden oder sogar selbst die Zelle depolarisieren<sup>186, 187</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnten auf zellulärer Ebene durch den Einsatz eines sehr spezifischen NAD(P)H-Oxidase-Inhibitors, AEBSF, die NAD(P)H-Oxidasen der PASMC als die hypoxieabhängige Quelle von ROS detektiert werden. Diese Daten legen nahe, dass die NAD(P)H-Oxidasen als Sensor der Hypoxie und Superoxidanionen als Mediatoren der HPV in Betracht kommen. Derselben Auffassung bezüglich der NAD(P)H-Oxidasen der PASMC als Sauerstoffsensoren und ROS als Mediatoren der HPV ist auch die Gruppe von Wolin und Burke-Wolin. Der Unterschied in ihrer Hypothese liegt jedoch darin, dass sie einen Abfall von Superoxidanionen unter Hypoxie vermuten<sup>35, 162, 179, 180</sup>.

Die Tatsache, dass hypoxieabhängige Veränderungen der  $\text{}^{\bullet}\text{O}_2^-$ - Freisetzung nur nach PMA-Stimulation gefunden wurden, ist wahrscheinlich auf die geringe Sensitivität der ESR Spektroskopie zurückzuführen.

#### 4.4.3. PAFB und AFB

Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie (10%, 5% und 3% O<sub>2</sub>) konnten bei PAFB und AFB nach Stimulation der NAD(P)H-Oxidase mit PMA keine signifikante  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung beobachtet werden. Diese Zellen sezernieren ROS konstitutiv in sehr geringen Mengen<sup>147</sup>. Als eine Quelle von ROS wurde zudem auch die NAD(P)H-Oxidase beschrieben. Wahrscheinlich spielen ROS in der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten eine Rolle<sup>148</sup>. Die Bedeutung der PAFB in Zusammenhang mit ROS liegt vielmehr in der Ausprägung des „Remodeling“ der Pulmonalarterie bei chronischer Hypoxie in vivo<sup>100, 149-151, 188</sup>.

Die nicht-hypoxieabhängige  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung in diesen Zellen bestätigt die Spezifität der O<sub>2</sub>-Abhängigkeit der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in PASMC.

#### 4.5. Fazit

Ziel dieser Arbeit war es, die mögliche Rolle von  $\cdot\text{O}_2^-$  bei akuter Hypoxie zu untersuchen. Wichtig in diesem Zusammenhang war es herauszufinden, ob  $\cdot\text{O}_2^-$  unter Hypoxie vermehrt oder vermindert gebildet wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die ESR Spektroskopie angewendet. Diese hat den Vorteil, dass ROS mit einer sehr hohen Spezifität in Zellen nachgewiesen werden können, auch wenn nicht zwischen intra- und extrazellulärem  $\cdot\text{O}_2^-$  unterschieden werden kann.

Weiterhin war es wichtig nachzuweisen, ob eine hypoxieabhängige  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung spezifisch für PASMC ist und aus welchen Quellen sie stammt.

Als eine mögliche Quelle von  $\cdot\text{O}_2^-$  wurde, gestützt auf vorangehende Untersuchungen, die NAD(P)H-Oxidase untersucht. Durch die Versuche mit den HL60-Zellen konnte primär gezeigt werden, dass prinzipiell vermehrt  $\cdot\text{O}_2^-$  auf Zellebene unter Hypoxie gebildet werden kann. Zur Detektion der Quelle der  $\cdot\text{O}_2^-$  wurden dann Versuche mit systemischen und pulmonalarteriellen Zellen durchgeführt. Bei diesen Versuchen zeigte sich bei den PASMC im Gegensatz zu den ASMC, PAFB und AFB eine erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung nach Stimulation mit PMA unter Hypoxie. Diese Ergebnisse deuten auf eine NAD(P)H-Oxidase als mögliche  $\cdot\text{O}_2^-$ -Quelle bei der Ausprägung der HPV hin. Gestärkt wurde diese Annahme durch eine zusätzliche Versuchsreihe

in der Anwesenheit des NAD(P)H-Oxidase-Inhibitors AEBSF. Bei diesen Versuchen konnte die Hypoxie-induzierte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung vollständig inhibiert werden.

Durch die vorliegende Arbeit konnten Unterschiede zwischen systemischen und pulmonalarteriellen Zellen in Bezug auf die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung unter Hypoxie nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte die Hypothese, dass NAD(P)H-Oxidasen der PASMC als eine wahrscheinliche Quelle der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale in Frage kommen, gestützt werden.

## 5. Zusammenfassung

Superoxidradikale gelten als Mediatoren der HPV, einem essentiellen Mechanismus der Lunge, der die Blutperfusion an die alveoläre Ventilation anpasst. Es ist unklar, ob die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung während einer Hypoxie ansteigt oder abfällt und woher die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale stammen. Diese gegensätzlichen Hypothesen hängen nicht zuletzt auch mit technischen Schwierigkeiten bei der Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies zusammen.

Die Hypoxieabhängige  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung wurde an PASMC, ASMC sowie den entsprechenden PAFB und AFB aus Kaninchen durch einen Vergleich normoxischer und hypoxischer Exposition über einen Messzeitraum von jeweils 30 Minuten untersucht. Die Detektion von ROS wurde mit Hilfe der ESR Spektroskopie unter Verwendung des sogenannten spin probes CP-H durchgeführt. Die Quantifizierung von  $\cdot\text{O}_2^-$  erfolgte mittels paralleler Durchführung der Experimente in An- und Abwesenheit von SOD.

Unter normoxischen (21%  $\text{O}_2$ ) sowie verschiedenen hypoxischen Bedingungen (10%, 5%, 3%  $\text{O}_2$ ) wurde keine  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung detektiert, was mit dem unteren Detektionslimit des ESR Spektroskopiegerätes in Zusammenhang stehen kann. Eine Stimulierung der Zellen mit Phorbolmyristataacetat löste jedoch eine signifikant erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung der PASMC bei 5%  $\text{O}_2$  verglichen mit 21%  $\text{O}_2$  aus. Die ASMC, PAFB und AFB zeigten allerdings keine hypoxieabhängige  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung. Die Hypoxie-induzierte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung aus den PASMC konnte durch den NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor AEBSF vollständig inhibiert werden.

Diese Daten legen nahe, dass in der pulmonalen Strombahn eine hypoxieabhängige vermehrte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Freisetzung aus NAD(P)H-Oxidasen stammt und es die Spezifität glatter pulmonalarterieller Muskelzellen ist, als Sauerstoffsensoren der akuten HPV zu fungieren.

## 6. Summary

Superoxide radicals play a pivotal role in the regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. They are suspected to be the mediators of HPV, an essential mechanism of the lung that adapts the lung perfusion to the alveolar ventilation. It is not evident, whether  $\cdot\text{O}_2^-$ -release is increased or decreased under hypoxia. And the source of  $\cdot\text{O}_2^-$  remains unknown. These controversial hypotheses are not only dependent on technical difficulties in the detection of reactive oxygen species.

I investigated the hypoxia dependent release of  $\cdot\text{O}_2^-$  on PASMC, ASMC, PAFB and AFB of rabbits and compared the  $\cdot\text{O}_2^-$ -Levels over a time period of 30 minutes. ROS were detected using the electron spin resonance spectroscopy and the spin probe CP-H. To quantify  $\cdot\text{O}_2^-$ , SOD in parallel experiments was used.

No significant  $\cdot\text{O}_2^-$  release could be detected under normoxia or different grades of hypoxia. The reason was probably the low detection limit of the ESR spectroscopy. However, the stimulation of the cells with PMA showed a significant increase of  $\cdot\text{O}_2^-$ -release of the PASMC at 5%  $\text{O}_2$  compared to 21%  $\text{O}_2$ . The ASMC, PAFB and AFB showed no significant changes in  $\cdot\text{O}_2^-$ -release under hypoxic conditions.

Additionally, the hypoxia-induced release of  $\cdot\text{O}_2^-$  could be fully reversed with the NAD(P)H oxidase inhibitor AEBSF.

These data support the notion of an increased superoxide release as a specific feature of pulmonary artery smooth muscle cells in the pulmonary vasculature and support the concept that such mechanisms contribute to the regulation of HPV.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Von Euler US LG. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand.* 1946;12.
2. Fishman A. Pulmonary diseases and disorders. *Mc Graw-Hill Book-Company.* 1998.
3. Crystal RG JW. The Lung. *Raven Press New York.* 1991.
4. Weissmann N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Hanze J, Goyal P, Grimminger F, Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction--triggered by an increase in reactive oxygen species? *Novartis Found Symp.* 2006;272:196-208; discussion 208-117.
5. Shirai M, Sada K, Ninomiya I. Effects of regional alveolar hypoxia and hypercapnia on small pulmonary vessels in cats. *J Appl Physiol.* 1986;61(2):440-448.
6. Marshall C, Marshall BE. Influence of perfusate on hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Circ Res.* 1983;52(6):691-696.
7. Jensen KS, Micco AJ, Czartolomna J, Latham L, Voelkel NF. Rapid onset of hypoxic vasoconstriction in isolated lungs. *J Appl Physiol.* 1992;72(5):2018-2023.
8. Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol.* 1995;100(2):159-169.
9. Welling KL, Sanchez R, Ravn JB, Larsen B, Amtorp O. Effect of prolonged alveolar hypoxia on pulmonary arterial pressure and segmental vascular resistance. *J Appl Physiol.* 1993;75(3):1194-1200.
10. Vejlstrup NG, Dorrington KL. Intense slow hypoxic pulmonary vasoconstriction in gas-filled and liquid-filled lungs: an in vivo study in the rabbit. *Acta Physiol Scand.* 1993;148(3):305-313.
11. Wiener CM, Sylvester JT. Effects of glucose on hypoxic vasoconstriction in isolated ferret lungs. *J Appl Physiol.* 1991;70(1):439-446.
12. McMurtry IF. BAY K 8644 potentiates and A23187 inhibits hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *Am J Physiol.* 1985;249(4 Pt 2):H741-746.
13. McMurtry IF, Davidson AB, Reeves JT, Grover RF. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ Res.* 1976;38(2):99-104.
14. Robertson TP, Hague D, Aaronson PI, Ward JP. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol.* 2000;525 Pt 3:669-680.
15. Salvaterra CG, Goldman WF. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol.* 1993;264(3 Pt 1):L323-328.
16. Tolins M, Weir EK, Chesler E, Nelson DP, From AH. Pulmonary vascular tone is increased by a voltage-dependent calcium channel potentiator. *J Appl Physiol.* 1986;60(3):942-948.
17. Tucker A, McMurtry IF, Grover RF, Reeves JT. Attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction by verapamil in intact dogs. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1976;151(3):611-614.
18. Urena J, Franco-Obregon A, Lopez-Barneo J. Contrasting effects of hypoxia on cytosolic Ca<sup>2+</sup> spikes in conduit and resistance myocytes of the rabbit pulmonary artery. *J Physiol.* 1996;496 ( Pt 1):103-109.
19. Woodmansey PA, Zhang F, Channer KS, Morice AH. Effect of the calcium antagonist amlodipine on the two phases of hypoxic pulmonary vasoconstriction in rat large and small isolated pulmonary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;25(2):324-329.
20. Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Ionic currents in rat pulmonary and mesenteric arterial myocytes in primary culture and subculture. *Am J Physiol.* 1993;264(2 Pt 1):L107-115.

21. Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Deoxyglucose and reduced glutathione mimic effects of hypoxia on K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> conductances in pulmonary artery cells. *Am J Physiol.* 1994;267(1 Pt 1):L52-63.
22. Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxic and metabolic regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Exp Physiol.* 1995;80(5):803-813.
23. Zhang F, Woodmansey PA, Morice AH. Acute hypoxic vasoconstriction in isolated rat small and large pulmonary arteries. *Physiol Res.* 1995;44(1):7-18.
24. Nakanishi K, Tajima F, Osada H, Nakamura A, Yagura S, Kawai T, Suzuki M, Torikata C. Pulmonary, vascular responses in rats exposed to chronic hypobaric hypoxia at two different altitude levels. *Pathol Res Pract.* 1996;192(10):1057-1067.
25. Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res.* 2006;71(4):620-629.
26. Naeije R, Brimiouille S. Physiology in medicine: importance of hypoxic pulmonary vasoconstriction in maintaining arterial oxygenation during acute respiratory failure. *Crit Care.* 2001;5(2):67-71.
27. Carter EP, Hartsfield CL, Miyazono M, Jakkula M, Morris KG, Jr., McMurtry IF. Regulation of heme oxygenase-1 by nitric oxide during hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283(2):L346-353.
28. Emery CJ. Vascular remodelling in the lung. *Eur Respir J.* 1994;7(2):217-219.
29. Riede UN HS. Allgemeine und spezielle Pathologie. *Thieme, Stuttgart.* 1993.
30. Marshall BE. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 1990;94:37-41.
31. Weissmann N, Kuzkaya N, Fuchs B, Tiyerili V, Schafer RU, Schutte H, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schudt C, Sydykov A, Egemnazarow B, Seeger W, Grimminger F. Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy. *Respir Res.* 2005;6:86.
32. Lopez-Barneo J, del Toro R, Levitsky KL, Chiara MD, Ortega-Saenz P. Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J Appl Physiol.* 2004;96(3):1187-1195; discussion 1170-1182.
33. Michelakis ED, Archer SL, Weir EK. Acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: a model of oxygen sensing. *Physiol Res.* 1995;44(6):361-367.
34. Weir EK, Hong Z, Porter VA, Reeve HL. Redox signaling in oxygen sensing by vessels. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002;132(1):121-130.
35. Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA. Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(2):L159-173.
36. Liu JQ, Sham JS, Shimoda LA, Kuppusamy P, Sylvester JT. Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285(2):L322-333.
37. Michelakis ED, Thebaud B, Weir EK, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> channels by a mitochondrial O<sub>2</sub>-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(6):1119-1136.
38. Archer SL, Michelakis ED, Thebaud B, Bonnet S, Moudgil R, Wu XC, Weir EK. A central role for oxygen-sensitive K<sup>+</sup> channels and mitochondria in the specialized oxygen-sensing system. *Novartis Found Symp.* 2006;272:157-171; discussion 171-155, 214-157.

39. Archer SL, Wu XC, Thebaud B, Moudgil R, Hashimoto K, Michelakis ED. O<sub>2</sub> sensing in the human ductus arteriosus: redox-sensitive K<sup>+</sup> channels are regulated by mitochondria-derived hydrogen peroxide. *Biol Chem*. 2004;385(3-4):205-216.
40. Michelakis ED, Rebeyka I, Wu X, Nsair A, Thebaud B, Hashimoto K, Dyck JR, Haromy A, Harry G, Barr A, Archer SL. O<sub>2</sub> sensing in the human ductus arteriosus: regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor. *Circ Res*. 2002;91(6):478-486.
41. Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res*. 2001;88(12):1259-1266.
42. Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res*. 2002;91(8):719-726.
43. Zwicker K, Dikalov S, Matuschka S, Mainka L, Hofmann M, Khramtsov V, Zimmer G. Oxygen radical generation and enzymatic properties of mitochondria in hypoxia/reoxygenation. *Arzneimittelforschung*. 1998;48(6):629-636.
44. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(1):42-47.
45. Brennan LA, Steinhorn RH, Wedgwood S, Mata-Greenwood E, Roark EA, Russell JA, Black SM. Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase. *Circ Res*. 2003;92(6):683-691.
46. Ellmark SH, Dusting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*. 2005;65(2):495-504.
47. Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS, Folz RJ. Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(1):L2-10.
48. Babior BM. The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J*. 2002;4(11):1023-1024.
49. Babior BM. The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4(1):35-38.
50. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005;53(3):199-206.
51. Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci*. 2003;28(9):502-508.
52. Hohler B, Holzappel B, Kummer W. NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Histochem Cell Biol*. 2000;114(1):29-37.
53. Li JM, Shah AM. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(22):19952-19960.
54. Bengtsson SH, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(11):849-854.
55. Chamseddine AH, Miller FJ, Jr. Gp91phox contributes to NADPH oxidase activity in aortic fibroblasts but not smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(6):H2284-2289.
56. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):366-373.
57. Berasi SP, Xiu M, Yee AS, Paulson KE. HBP1 repression of the p47phox gene: cell cycle regulation via the NADPH oxidase. *Mol Cell Biol*. 2004;24(7):3011-3024.

58. Frank GD, Eguchi S, Yamakawa T, Tanaka S, Inagami T, Motley ED. Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology*. 2000;141(9):3120-3126.
59. Martins Chaves M, Prates Rodrigues AL, Pereira dos Reis A, Gerzstein NC, Nogueira-Machado JA. Correlation between NADPH oxidase and protein kinase C in the ROS production by human granulocytes related to age. *Gerontology*. 2002;48(6):354-359.
60. Potashkin JA, Meredith GE. The role of oxidative stress in the dysregulation of gene expression and protein metabolism in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(1-2):144-151.
61. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2001;11(4):173-186.
62. Yoshimoto T, Gochou N, Fukai N, Sugiyama T, Shichiri M, Hirata Y. Adrenomedullin inhibits angiotensin II-induced oxidative stress and gene expression in rat endothelial cells. *Hypertens Res*. 2005;28(2):165-172.
63. Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA, Lambeth JD. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5550-5555.
64. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999;401(6748):79-82.
65. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*. 2004;279(44):46065-46072.
66. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demareux N, Krause KH. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*. 2001;276(40):37594-37601.
67. Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem*. 2004;279(33):34250-34255.
68. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 2001;269(1-2):131-140.
69. Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem*. 2001;276(2):1417-1423.
70. Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarius B, Arnold RS, Whorton AR, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Krenitsky K, Ardie KG, Lambeth JD, Hoidal JR. NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(2):C353-369.
71. Donko A, Peterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. Dual oxidases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005;360(1464):2301-2308.
72. Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res*. 2006;71(2):289-299.
73. Geiszt M, Leto TL. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem*. 2004;279(50):51715-51718.
74. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(2):R277-297.
75. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):181-189.

76. Kim JS, Diebold BA, Babior BM, Knaus UG, Bokoch GM. Regulation of Nox1 activity via protein kinase A-mediated phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 binding. *J Biol Chem.* 2007;282(48):34787-34800.
77. Mittal M, Roth M, Konig P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, Selbitz AC, Schermuly RT, Ghofrani HA, Kwapiszewska G, Kummer W, Klepetko W, Hoda MA, Fink L, Hanze J, Seeger W, Grimminger F, Schmidt HH, Weissmann N. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circ Res.* 2007;101(3):258-267.
78. Valente AJ, El Jamali A, Epperson TK, Gamez MJ, Pearson DW, Clark RA. NOX1 NADPH oxidase regulation by the NOXA1 SH3 domain. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(3):384-396.
79. Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(2):274-278.
80. Fresquet F, Pourageaud F, Leblais V, Brandes RP, Savineau JP, Marthan R, Muller B. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol.* 2006;148(5):714-723.
81. Grimminger F, Weissmann N, Spriestersbach R, Becker E, Rosseau S, Seeger W. Effects of NADPH oxidase inhibitors on hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Am J Physiol.* 1995;268(5 Pt 1):L747-752.
82. Liu JQ, Erbynn EM, Folz RJ. Chronic hypoxia-enhanced murine pulmonary vasoconstriction: role of superoxide and gp91phox. *Chest.* 2005;128(6 Suppl):594S-596S.
83. Roy A, Rozanov C, Mokashi A, Daudu P, Al-mehdi AB, Shams H, Lahiri S. Mice lacking in gp91 phox subunit of NAD(P)H oxidase showed glomus cell [Ca(2+)](i) and respiratory responses to hypoxia. *Brain Res.* 2000;872(1-2):188-193.
84. Weissmann N, Zeller S, Schafer RU, Turowski C, Ay M, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Grimminger F. Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34(4):505-513.
85. Mayer-Kuckuk. *Atomphysik.* Stuttgart: Teubner-Verlag; 1977.
86. Bartholome B. *Ullmanns Encyklopadie der technischen Chemie.* Weinheim: Verlag Chemie; 1980.
87. Weil J.A. BJR, Wertz J.E. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications;* 1994.
88. IUPAC. IUPAC Compendium of Chemical Terminology.
89. Atherton N. *Electron Spin Resonance.* New York; 1993.
90. Spieß HW. *Einführung in die ESR-Spektroskopie.* Mainz; 1998.
91. Sim S, Yong TS, Park SJ, Im KI, Kong Y, Ryu JS, Min DY, Shin MH. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by Entamoeba histolytica. *J Immunol.* 2005;174(7):4279-4288.
92. Dudley SC, Jr., Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, Harrison DG, Dikalov SI, Langberg J. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation.* 2005;112(9):1266-1273.
93. Griguer CE, Oliva CR, Kelley EE, Giles GI, Lancaster JR, Jr., Gillespie GY. Xanthine oxidase-dependent regulation of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(4):2257-2263.
94. Comellas AP, Dada LA, Lecuona E, Pesce LM, Chandel NS, Quesada N, Budinger GR, Strous GJ, Ciechanover A, Sznajder JJ. Hypoxia-mediated degradation of Na,K-

- ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system. *Circ Res.* 2006;98(10):1314-1322.
95. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002;80(5):780-787.
  96. Castier Y, Brandes RP, Leseche G, Tedgui A, Lehoux S. p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res.* 2005;97(6):533-540.
  97. Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, Stasch JP, Gnoth MJ, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation.* 2006;113(2):286-295.
  98. Hoshi T, Lahiri S. Cell biology. Oxygen sensing: it's a gas! *Science.* 2004;306(5704):2050-2051.
  99. Marshall C, Marmar AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;15(5):633-644.
  100. Mecham RP, Whitehouse LA, Wrenn DS, Parks WC, Griffin GL, Senior RM, Crouch EC, Stenmark KR, Voelkel NF. Smooth muscle-mediated connective tissue remodeling in pulmonary hypertension. *Science.* 1987;237(4813):423-426.
  101. Sylvester JT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a radical view. *Circ Res.* 2001;88(12):1228-1230.
  102. Dikalov S, Jiang J, Mason RP. Characterization of the high-resolution ESR spectra of superoxide radical adducts of 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO) and 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). Analysis of conformational exchange. *Free Radic Res.* 2005;39(8):825-836.
  103. Dikalov S, Skatchkov M, Bassenge E. Spin trapping of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine and 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;231(3):701-704.
  104. Dikalov S, Skatchkov M, Fink B, Bassenge E. Quantification of superoxide radicals and peroxynitrite in vascular cells using oxidation of sterically hindered hydroxylamines and electron spin resonance. *Nitric Oxide.* 1997;1(5):423-431.
  105. Fink B, Dikalov S, Bassenge E. A new approach for extracellular spin trapping of nitroglycerin-induced superoxide radicals both in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(1):121-128.
  106. Dikalov S, Tordo P, Motten A, Mason RP. Characterization of the high resolution ESR spectra of the methoxyl radical adducts of 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO). *Free Radic Res.* 2003;37(7):705-712.
  107. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22546-22554.
  108. Sorescu D, Somers MJ, Lassegue B, Grant S, Harrison DG, Griendling KK. Electron spin resonance characterization of the NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(6):603-612.
  109. O'Brien PJ. Superoxide production. *Methods Enzymol.* 1984;105:370-378.
  110. Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* 1984;105:429-435.
  111. Kuthan H, Ullrich V, Estabrook RW. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem J.* 1982;203(3):551-558.
  112. Azzi A, Montecucco C, Richter C. The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975;65(2):597-603.

113. Mishin V, Pokrovsky A, Lyakhovich VV. Interactions of some acceptors with superoxide anion radicals formed by the NADPH-specific flavoprotein in rat liver microsomal fractions. *Biochem J*. 1976;154(2):307-310.
114. Florence TM. The degradation of cytochrome c by hydrogen peroxide. *J Inorg Biochem*. 1985;23(2):131-141.
115. Turrens JF, McCord JM. How relevant is the reoxidation of ferrocytochrome c by hydrogen peroxide when determining superoxide anion production? *FEBS Lett*. 1988;227(1):43-46.
116. Seki H, Imamura M. The oxidation of ferrocytochrome c by Br<sub>2</sub><sup>-</sup>, (SCN)<sub>2</sub><sup>-</sup>, N<sub>3</sub> and OH radicals studied by pulsed-electron and gamma-ray radiolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1981;635(1):81-89.
117. Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R. Kinetics of cytochrome c<sup>2+</sup> oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys*. 1995;319(2):491-497.
118. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 2007;49(4):717-727.
119. Allen RC, Yevich SJ, Orth RW, Steele RH. The superoxide anion and singlet molecular oxygen: their role in the microbicidal activity of the polymorphonuclear leukocyte. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974;60(3):909-917.
120. Bagchi D, Prasad R, Das DK. Direct scavenging of free radicals by captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;158(1):52-57.
121. Robinson EE, Maxwell SR, Thorpe GH. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radic Res*. 1997;26(3):291-302.
122. Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(2):153-158.
123. Popov IN, Lewin G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity: II. Testing of nonenzymic water-soluble antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1994;17(3):267-271.
124. Merenyi G, Lind J, Eriksen TE. Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter. *J Biolumin Chemilumin*. 1990;5(1):53-56.
125. Nakamura M, Nakamura S. One- and two-electron oxidations of luminol by peroxidase systems. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(4):537-544.
126. Saran M, Michel C, Bors W. Reaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup>. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic Res Commun*. 1990;10(4-5):221-226.
127. Carreras MC, Riobo NA, Pargament GA, Boveris A, Poderoso JJ. Effects of respiratory burst inhibitors on nitric oxide production by human neutrophils. *Free Radic Res*. 1997;26(4):325-334.
128. Radi R, Cosgrove TP, Beckman JS, Freeman BA. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J*. 1993;290 ( Pt 1):51-57.
129. Catz SD, Carreras MC, Poderoso JJ. Nitric oxide synthase inhibitors decrease human polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(6):741-748.
130. Radi R. Kinetic analysis of reactivity of peroxynitrite with biomolecules. *Methods Enzymol*. 1996;269:354-366.
131. Castro L, Alvarez MN, Radi R. Modulatory role of nitric oxide on superoxide-dependent luminol chemiluminescence. *Arch Biochem Biophys*. 1996;333(1):179-188.
132. Allen RC. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol*. 1986;133:449-493.

133. Rembish SJ, Trush MA. Further evidence that lucigenin-derived chemiluminescence monitors mitochondrial superoxide generation in rat alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med.* 1994;17(2):117-126.
134. Laihia JK, Jansen CT, Ahotupa M. Lucigenin and linoleate enhanced chemiluminescent assay for superoxide dismutase activity. *Free Radic Biol Med.* 1993;14(5):457-461.
135. Vasquez-Vivar J, Hogg N, Pritchard KA, Jr., Martasek P, Kalyanaraman B. Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett.* 1997;403(2):127-130.
136. Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, Roubaud V, Zweier JL, Trush MA. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem.* 1998;273(4):2015-2023.
137. Heidari Y, Shah AM, Gove C. NOX-2S is a new member of the NOX family of NADPH oxidases. *Gene.* 2004;335:133-140.
138. Hua J, Hasebe T, Someya A, Nakamura S, Sugimoto K, Nagaoka I. Evaluation of the expression of NADPH oxidase components during maturation of HL-60 cells to neutrophil lineage. *J Leukoc Biol.* 2000;68(2):216-224.
139. Archer SL, Huang J, Henry T, Peterson D, Weir EK. A redox-based O<sub>2</sub> sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res.* 1993;73(6):1100-1112.
140. Archer SL, Nelson DP, Weir EK. Simultaneous measurement of O<sub>2</sub> radicals and pulmonary vascular reactivity in rat lung. *J Appl Physiol.* 1989;67(5):1903-1911.
141. Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, Puttagunta L, Waite R, Nelson DP, Dinauer MC, Weir EK. O<sub>2</sub> sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):7944-7949.
142. Killilea DW, Hester R, Balczon R, Babal P, Gillespie MN. Free radical production in hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(2):L408-412.
143. Weissmann N, Tadic A, Hanze J, Rose F, Winterhalder S, Nollen M, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(4):L683-690.
144. de Champlain J, Wu R, Girouard H, Karas M, A ELM, Laplante MA, Wu L. Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2004;26(7-8):593-601.
145. Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(9):1340-1351.
146. Sham JS. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: ups and downs of reactive oxygen species. *Circ Res.* 2002;91(8):649-651.
147. Meier B. Superoxide generation of phagocytes and nonphagocytic cells. *Protoplasma.* 2001;217(1-3):117-124.
148. Shen WL, Gao PJ, Che ZQ, Ji KD, Yin M, Yan C, Berk BC, Zhu DL. NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species regulate angiotensin-II induced adventitial fibroblast phenotypic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339(1):337-343.
149. McKenzie JC, Clancy J, Jr., Klein RM. Autoradiographic analysis of cell proliferation and protein synthesis in the pulmonary trunk of rats during the early development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Blood Vessels.* 1984;21(2):80-89.
150. Meyrick B, Reid L. Endothelial and subintimal changes in rat hilar pulmonary artery during recovery from hypoxia. A quantitative ultrastructural study. *Lab Invest.* 1980;42(6):603-615.

151. Riley DJ, Poiani GJ, Tozzi CA, Rosenbloom J, Pierce RA, Deak SB. Collagen and elastin gene expression in the hypertensive pulmonary artery of the rat. *Trans Assoc Am Physicians*. 1986;99:180-188.
152. Duchen MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol*. 1999;516 ( Pt 1):1-17.
153. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C817-833.
154. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem*. 2003;278(8):5557-5563.
155. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol*. 2005;98(1):390-403.
156. Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol*. 2005;98(1):404-414.
157. Michelakis ED, Hampl V, Nsair A, Wu X, Harry G, Haromy A, Gurtu R, Archer SL. Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circ Res*. 2002;90(12):1307-1315.
158. Weissmann N, Ebert N, Ahrens M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Hanze J, Fink L, Rose F, Conzen J, Seeger W, Grimminger F. Effects of mitochondrial inhibitors and uncouplers on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(6):721-732.
159. O'Kelly I, Lewis A, Peers C, Kemp PJ. O<sub>2</sub> sensing by airway chemoreceptor-derived cells. Protein kinase c activation reveals functional evidence for involvement of NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 2000;275(11):7684-7692.
160. Wang D, Youngson C, Wong V, Yeger H, Dinauer MC, Vega-Saenz Miera E, Rudy B, Cutz E. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K<sup>+</sup> channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):13182-13187.
161. Fu XW, Wang D, Nurse CA, Dinauer MC, Cutz E. NADPH oxidase is an O<sub>2</sub> sensor in airway chemoreceptors: evidence from K<sup>+</sup> current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):4374-4379.
162. Wolin MS, Burke-Wolin TM, Mohazzab HK. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir Physiol*. 1999;115(2):229-238.
163. Thomas HM, 3rd, Carson RC, Fried ED, Novitch RS. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by diphenyleneiodonium. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(7):R9-12.
164. Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(1):677-686.
165. Costa AD, Garlid KD. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(2):H874-882.
166. Ahmed N, Weidemann MJ. Interaction of reactive nitrogen and oxygen intermediates in HL60 and dimethylsulphoxide-differentiated HL60 cells. *Leuk Res*. 1996;20(3):271-279.
167. Bailey SR, Mitra S, Flavahan S, Flavahan NA. Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(1):H243-250.
168. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986;320(6061):454-456.

169. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2153-2157.
170. Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(11):1845-1851.
171. Weir EK, Lopez-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med.* 2005;353(19):2042-2055.
172. Dikalov S, Grigor'ev IA, Voinov M, Bassenge E. Detection of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-4-phosphonooxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine: quantification of extracellular superoxide radicals formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;248(2):211-215.
173. Majander A, Finel M, Wikstrom M. Diphenyleneiodonium inhibits reduction of iron-sulfur clusters in the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Biol Chem.* 1994;269(33):21037-21042.
174. Weir EK, Reeve HL, Cornfield DN, Tristani-Firouzi M, Peterson DA, Archer SL. Diversity of response in vascular smooth muscle cells to changes in oxygen tension. *Kidney Int.* 1997;51(2):462-466.
175. Paddenberg R, Ishaq B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, Braun-Dullaeus RC, Kummer W. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284(5):L710-719.
176. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 2005;1(6):401-408.
177. Britigan BE, Roeder TL, Buettner GR. Spin traps inhibit formation of hydrogen peroxide via the dismutation of superoxide: implications for spin trapping the hydroxyl free radical. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1075(3):213-222.
178. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1974;41(0):35-97.
179. Mohazzab KM, Fayngersh RP, Kaminski PM, Wolin MS. Potential role of NADH oxidoreductase-derived reactive O<sub>2</sub> species in calf pulmonary arterial PO<sub>2</sub>-elicited responses. *Am J Physiol.* 1995;269(5 Pt 1):L637-644.
180. Mohazzab KM, Wolin MS. Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO<sub>2</sub> sensor. *Am J Physiol.* 1994;267(6 Pt 1):L823-831.
181. Youngson C, Nurse C, Yeager H, Cutz E. Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature.* 1993;365(6442):153-155.
182. Zulueta JJ, Yu FS, Hertig IA, Thannickal VJ, Hassoun PM. Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(1):41-49.
183. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494-501.
184. Shmelzer Z, Haddad N, Admon E, Pessach I, Leto TL, Eitan-Hazan Z, Hershfinkel M, Levy R. Unique targeting of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes. *J Cell Biol.* 2003;162(4):683-692.
185. Weissmann N, Voswinckel R, Hardebusch T, Rosseau S, Ghofrani HA, Schermuly R, Seeger W, Grimminger F. Evidence for a role of protein kinase C in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol.* 1999;276(1 Pt 1):L90-95.

- 186.** Henderson LM, Chappell JB, Jones OT. The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H<sup>+</sup> channel. *Biochem J.* 1987;246(2):325-329.
- 187.** Matsuzaki I, Chatterjee S, Debolt K, Manevich Y, Zhang Q, Fisher AB. Membrane depolarization and NADPH oxidase activation in aortic endothelium during ischemia reflect altered mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(1):H336-343.
- 188.** Tozzi CA, Christiansen DL, Poiani GJ, Riley DJ. Excess collagen in hypertensive pulmonary arteries decreases vascular distensibility. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149(5):1317-1326.

## 8. Abstracts und veröffentlichte Vorträge

1. Bal A., Roth M., Schermuly R.T., Ghofrani H.A., Seeger W., Grimminger F., Weissmann N. Hypoxieabhängige Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in der pulmonalen Strombahn- die Rolle von NAD(P)H-Oxidasen. *DGIM 2006*
2. Bal A., Roth M., Schermuly R.T., Ghofrani H.A., Seeger W., Grimminger F., Weissmann N. Hypoxieabhängige Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in der pulmonalen Strombahn- die Rolle von NAD(P)H-Oxidasen. *Medizinische Klinik 2006*
3. Bal A., Roth M., Schermuly R.T., Ghofrani H.A., Seeger W., Grimminger F., Weissmann N. Hypoxieabhängige Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in der pulmonalen Strombahn- die Rolle von NAD(P)H-Oxidasen. *Pneumouupdate 2006*
4. Fuchs B.\*, Bal A.\*, Egemnazarov B., Roth M., Sommer N., Schermuly R.T., Ghofrani H.A., Seeger W., Grimminger F., Weissmann N. Generierung von Superoxidradikalen pulmonaler und systemischer arterieller glatter Muskelzellen und Fibroblasten unter Hypoxie. *Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie in der DGP*

## 9. Danksagung

Besten Dank an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Norbert Weißmann, für das entgegengebrachte Vertrauen. Er gab mir die Möglichkeit, seiner Forschungsgruppe beizutreten um wissenschaftlich tätig zu werden. Seine fachliche und menschliche Kompetenz sind mir stets ein Vorbild.

Weiterhin danke ich Fr. Dr. Beate Fuchs, Karin Quanz und Fr. Carmen Homberger, deren wissenschaftliche und technische Unterstützung mir von großer Hilfe war.

Ich möchte mich auch besonders bei Dr. Rio Dumitrascu bedanken, der mir als Freund und Kollege stets zur Seite stand und mich in jeder Hinsicht unterstützte.

Meinen lieben Eltern danke ich sehr für ihre Unterstützung, ohne die ein erfolgreiches Studium und vor allem die vorliegende Arbeit sehr viel schwieriger zu realisieren gewesen wäre.