

**Funktionelle Relevanz der reaktiven Sauerstoffspezies-bildenden  
Enzyme NADPH-Oxidase 4 und p66shc in kardialen Mitochondrien  
unter physiologischen und pathologischen Bedingungen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie (Dr. biol. hom.)  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Christina Hirschhäuser, geborene Kallasch  
aus Melnikowo

Gießen 2021

**Funktionelle Relevanz der reaktiven Sauerstoffspezies-bildenden  
Enzyme NADPH-Oxidase 4 und p66shc in kardialen Mitochondrien  
unter physiologischen und pathologischen Bedingungen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie (Dr. biol. hom.)  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Christina Hirschhäuser, geborene Kallasch  
aus Melnikowo

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Physiologisches Institut

Betreuerin: PD Dr. Kerstin Böngler

Gutachter: Prof. Dr. Weißmann

Tag der Disputation: 14.Dezember 2022

*Für meine Kinder Alica und Jakob*

# Inhalt

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) .....	1
1.2 Mitochondrien .....	2
1.2.1 Die Bedeutung der Mitochondrien für die ROS-Produktion im Herzen.....	3
1.3 Bedeutung von ROS für das Herz .....	5
1.4 Bedeutung von ROS im linken und rechten Ventrikel.....	8
1.4.1 Unterschiede zwischen dem rechten und linken Ventrikel.....	8
1.4.2 Rechtsherzhypertrophie und Rechtsherzinsuffizienz .....	9
1.4.3 Molekulare Mechanismen der ventrikulären Hypertrophie.....	9
1.5 Funktionelle Relevanz und Lokalisation der NOX4 in Mitochondrien des linken Ventrikels unter physiologischen Bedingungen.....	11
1.5.1 NADPH-Oxidase 4 (NOX4).....	11
1.5.2 NOX4-Varianten und enzymatische Eigenschaften .....	13
1.5.3 Regulation der NOX4-Expression.....	14
1.5.4 NOX4-vermittelte Signalwege .....	15
1.5.5 NOX4 und kardiovaskuläre Erkrankungen .....	16
1.5.6 Subzelluläre Lokalisation von NOX4.....	18
1.5.7 NOX4 und Mitochondrien.....	19
1.5.8 Zielsetzung 1.....	20
1.6 Funktionelle Relevanz von p66shc für den rechten Ventrikel bei pathologischer Druckbelastung .....	21
1.6.1 Das Adaptorprotein p66shc .....	21
1.6.2 Regulation der p66shc-Expression .....	22
1.6.3 Subzelluläre Lokalisation von p66shc.....	23
1.6.4 Phosphorylierung und mitochondriale Translokation von p66shc.....	23
1.6.5 Bedeutung von p66shc für die Hypertrophie des Herzens .....	26
1.6.6 Zielsetzung 2.....	27
<b>2. Material .....</b>	<b>28</b>
2.1 Verbrauchsmaterialien.....	28
2.2 Chemikalien, gebrauchsfertige Lösungen und Kits.....	29
2.3 Injektionslösungen/Gase.....	30
2.4 Geräte30	
2.4.1 Allgemein verwendete Geräte .....	30
2.4.2 Isolierung von Mitochondrien .....	31
2.4.3 Proteinbestimmung.....	31

---

2.4.4	Mitochondrienfunktion .....	31
2.4.5	Western Blot Analysen .....	31
2.4.6	Isolierung, Kultivierung und Kontraktionsmessungen von Kardiomyozyten .....	31
2.4.7	Pulmonalarterien Banding, Echokardiographie, Hämodynamik .....	32
2.5	Computerprogramme .....	32
2.6	Puffer und Medien .....	33
2.6.1	Isolierung von Mitochondrien .....	33
2.6.2	Respirations- und ROS-Messungen .....	33
2.6.3	Herstellung von Proteinextrakten .....	33
2.6.4	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli und Western Blot Analysen .....	34
2.6.5	Isolierung und Kultivierung adulter rechtsventrikulärer Kardiomyozyten .....	34
2.7	Antikörper .....	34
2.7.1	Primärantikörper .....	34
2.7.2	Sekundärantikörper .....	34
2.8	Versuchstiere .....	35
2.8.1	Teil 1: NOX4 .....	35
2.8.2	Charakterisierung der NOX4 knockout Mauslinie .....	35
2.8.3	Teil 2: p66shc .....	36
2.8.4	Charakterisierung der p66shc knockout Mauslinie .....	36
<b>3.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>37</b>
3.1	Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung .....	37
3.1.1	Teil 1: NOX4 .....	37
3.1.2	Teil 2: p66shc .....	37
3.2	Pulmonalarterien <i>Banding</i> (PAB)-Modell .....	38
3.3	Echokardiographie .....	40
3.4	Hämodynamische Messung .....	42
3.5	Bestimmung der Herzgewichte .....	43
3.6	Isolierung adulter rechtsventrikulärer Kardiomyozyten .....	43
3.7	Kultivierung adulter Kardiomyozyten .....	46
3.8	Messung der Kardiomyozytenkontraktion im elektrischen Feld .....	46
3.9	Isolierung von Mitochondrien .....	47
3.9.1	Für Funktionsmessungen .....	47
3.9.2	Subzelluläre Lokalisation von NOX4 .....	48
3.10	Herstellung von Proteinextrakten .....	50
3.11	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	50

3.11.1	Lowry: DC™ (detergent compatible) protein assay.....	50
3.11.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Zaman & Verwilghen .....	51
3.12	Respirationsmessung .....	51
3.13	Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies.....	53
3.14	Denaturierende SDS-PAGE und Western Blot Analyse .....	55
3.15	Statistik .....	56
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
4.1	Funktionelle Relevanz und Lokalisation der NOX4 in Mitochondrien des linken Ventrikels unter physiologischen Bedingungen.....	58
4.1.1	Qualitätskontrolle der Mitochondrienpräparation und Analysen zum Effekt der verwendeten NOX-Inhibitoren .....	58
4.1.2	Einfluss von NOX4 auf die mitochondriale ROS-Produktion ....	60
4.1.3	Untersuchungen zur Lokalisation von NOX4 unter physiologischen Bedingungen .....	65
4.2	Funktionelle Relevanz von p66shc bei der Entstehung der rechtsventrikulären Hypertrophie in Folge einer chronischen Druckbelastung (PAB) .....	70
4.2.1	p66sh-Expression in kardialem Gewebe .....	70
4.2.2	Basale Charakterisierung der Versuchstiere .....	70
4.2.3	Einfluss von p66shc auf die ROS-Produktion rechtsventrikulärer Mitochondrien nach PAB .....	71
4.2.4	Einfluss von p66shc auf die Funktion isolierter Kardiomyozyten nach PAB .....	71
4.2.5	Hämodynamische Veränderungen nach PAB .....	72
4.2.6	Rechtsventrikuläre Hypertrophie nach PAB .....	73
4.2.7	Echokardiographische Untersuchungen zur rechtsventrikulären Hypertrophie und Funktion nach PAB .....	74
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
5.1	Funktionelle Relevanz und Lokalisation der NOX4 in Mitochondrien des linken Ventrikels unter physiologischen Bedingungen.....	77
5.1.1	NOX4 im Herzen.....	77
5.1.2	NOX4 in Mitochondrien.....	81
5.1.3	NOX4-Aktivität in Mitochondrien .....	85
5.2	Funktionelle Relevanz von p66shc bei der Entstehung der rechtsventrikulären Hypertrophie in Folge einer chronischen Druckbelastung.....	92
5.2.1	Rolle von p66shc bei der linksventrikulären Hypertrophie.....	92

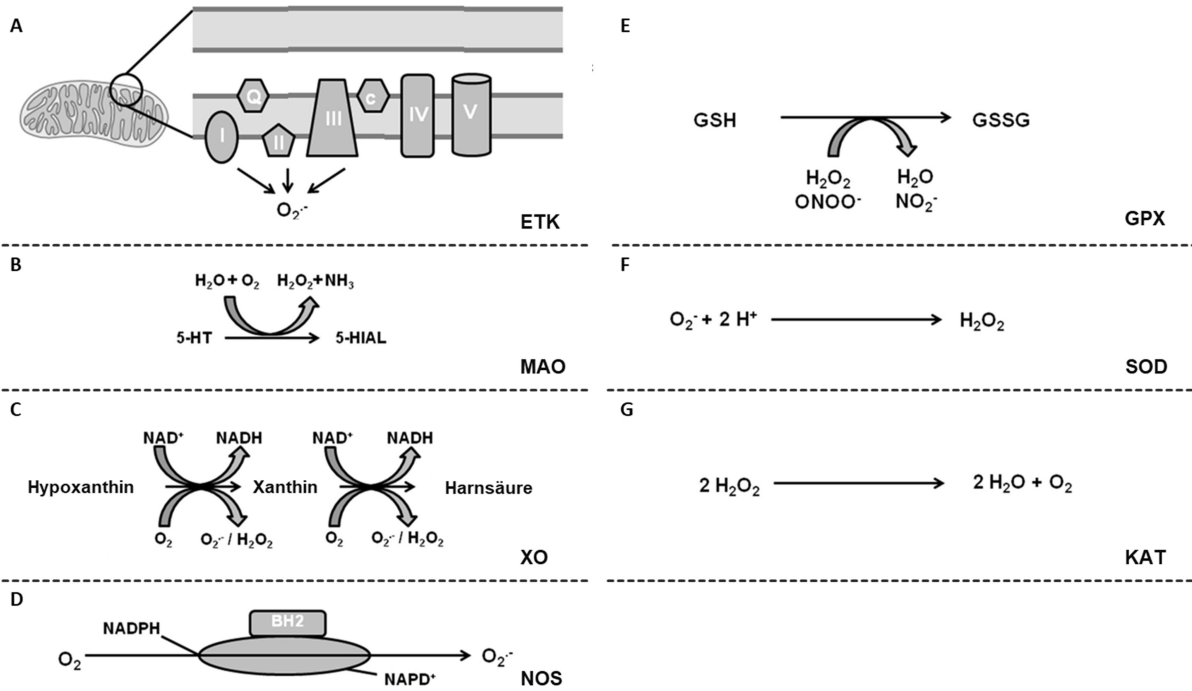
5.2.2	(p66shc-vermittelte) ROS und ihre Bedeutung für die rechtsventrikuläre Hypertrophie .....	94
5.2.3	Einfluss von p66shc auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten .....	96
5.2.4	Einfluss von p66shc auf die Herzfunktion.....	98
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>102</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>10.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>114</b>
<b>11.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>115</b>
<b>12.</b>	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>134</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>135</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>136</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Der Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beschreibt hoch reaktive Sauerstoff-Derivate, die durch normale zelluläre Prozesse in einem aeroben Stoffwechsel gebildet werden. Molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) besitzt zwei ungepaarte Elektronen, welche mit einzelnen, freien Elektronen reagieren können und dadurch zur Bildung von ROS führen. Zu den ROS zählen das Superoxid-Anionenradikal ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das Hydroxylradikal ( $OH\cdot$ ) sowie eine Vielzahl ihrer Stoffwechselprodukte [1]. Dabei dienen Superoxid und Wasserstoffperoxid meist als Vorstufen für die Bildung anderer ROS-Derivate [2, 3].

Unter physiologischen Bedingungen werden innerhalb der Zelle konstant geringe Mengen an ROS durch unterschiedliche Proteine gebildet; diese entstehen in subzellulären Kompartimenten und in kontrollierten Mengen. Dabei halten sich die Bildung und Eliminierung von ROS die Waage (Redox-Homöostase). Zu den ROS-generierenden Enzymen zählen beispielsweise die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette, die Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen, die Monoaminoxidasen (MAO) und die Xanthinoxidase (XO) sowie die entkoppelte Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (NOS) [4-6] (Abbildung 1). Um Zellschädigungen vorzubeugen, müssen die gebildeten Radikale vom antioxidativen System der Zelle abgebaut und auf einem tolerierbaren Niveau gehalten werden. Es gibt mehrere zelluläre Mechanismen, die der Produktion von ROS entgegenwirken, einschließlich enzymatischer und nicht-enzymatischer Wege [7]. Die Enzyme des antioxidativen Systems bauen  $O_2^-$  in  $H_2O_2$  und weiter zu  $H_2O$  und  $O_2$  ab, wohingegen kleine Moleküle des nicht-enzymatischen Systems direkt mit ROS reagieren und diese neutralisieren. Zu den wichtigsten zellulären Antioxidantien zählen die entgiftenden enzymatischen Systeme Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase sowie die nicht-enzymatischen Komponenten Vitamin E (alpha-Tocopherol), Betacarotin und Vitamin C (Ascorbinsäure) [5, 8].



**Abbildung 1: Quellen für ROS und ROS-Abwehrmechanismen.** (A) Mitochondriale Elektronentransportkette (ETK), bestehend aus den Komplexen I-V. Die Komplexe I, II und III generieren kontinuierlich Superoxid ( $O_2^-$ ). (B) Die Monoaminoxidase (MAO) katalysiert die Desaminierung von Monoaminen wie z.B. Serotonin (5-HT) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAL) und generiert dabei Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). (C) Die Xanthinoxidase (XO) katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure, bei der  $H_2O_2$  als Nebenprodukt entsteht. (D) Durch die enzymatische Aktivität der entkoppelten Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) wird  $O_2^-$  generiert. (E) Die Glutathion-Peroxidase (GPX) reduziert  $H_2O_2$  bei gleichzeitiger Oxidation von Glutathion (GSH zu GSSG). (F) Die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert die Umwandlung von  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$ , welches von der (G) Katalase (KAT) weiter zu Wasser ( $H_2O$ ) und molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) umgesetzt wird (modifiziert nach [9]).

## 1.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind dynamische, von einer Doppelmembran umgebene Organellen, die klassischerweise als „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet werden, da sie in erster Linie Adenosintriphosphat (ATP) durch die oxidative Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) erzeugen, und als solche in großer Zahl in Herzmuskelzellen vorkommen. Im Vergleich zu anderen Geweben besitzt das Herz als das stoffwechselaktivste Organ des Körpers den höchsten Mitochondrien-Gehalt [10], der etwa 25 % des Zellvolumens im menschlichen Myokard ausmacht [11]. Insbesondere die elektromechanische Kopplung verbraucht große Mengen an ATP, wobei bereits für einen einzelnen Herzschlag etwa 2 % des zellulären ATP-Pools verbraucht werden [12]. Um den ATP-Pool, der sich in den Herzmuskelzellen innerhalb einer Minute vollständig erneuert [13, 14], aufrecht zu erhalten, müssen fortwährend Reduktionsäquivalente in Form von Nikotinamideninukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid ( $FADH_2$ ) über den Citratzyklus in der

Mitochondrienmatrix nachgebildet und der Elektronentransportkette (ETK) zugeführt werden. Als Substrat nutzt der Citratzyklus Acetyl-CoA, welches überwiegend durch die Oxidation von Fettsäuren (60-80%) und Glukose (20%), in geringen Mengen auch von Aminosäuren, Laktat und Ketonen generiert wird. Durch die Oxidation von Acetyl-CoA zu Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) werden Elektronen an die Reduktionsäquivalente  $\text{NAD}^+$  und  $\text{FAD}^+$  gebunden, welche in Form von  $\text{NADH}$  über den Komplex I (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Dehydrogenase) und  $\text{FADH}_2$  über den Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) in die ETK eingeschleust und auf Ubichinon (Coenzym Q) übertragen werden. Dieses kleine, lipidlösliche und in der Innenmembran bewegliche Molekül überträgt die Elektronen über den Komplex III, die Cytochrom-c-Reduktase, auf Cytochrom c und schließlich auf Komplex IV, die Cytochrom-c-Oxidase. Letzterer enthält eine Bindungsstelle für Sauerstoff, welcher die Elektronen aufnimmt und anschließend zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert wird [15]. Durch diesen Elektronentransport über die mitochondrialen ETK-Komplexe werden Protonen ( $\text{H}^+$ ) aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert und so ein Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut. Die Energie dieses elektrochemischen Protonengradienten wird schließlich von der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP-Synthase durch Rückfluss der Protonen in die Mitochondrienmatrix für die Synthese von ATP genutzt.

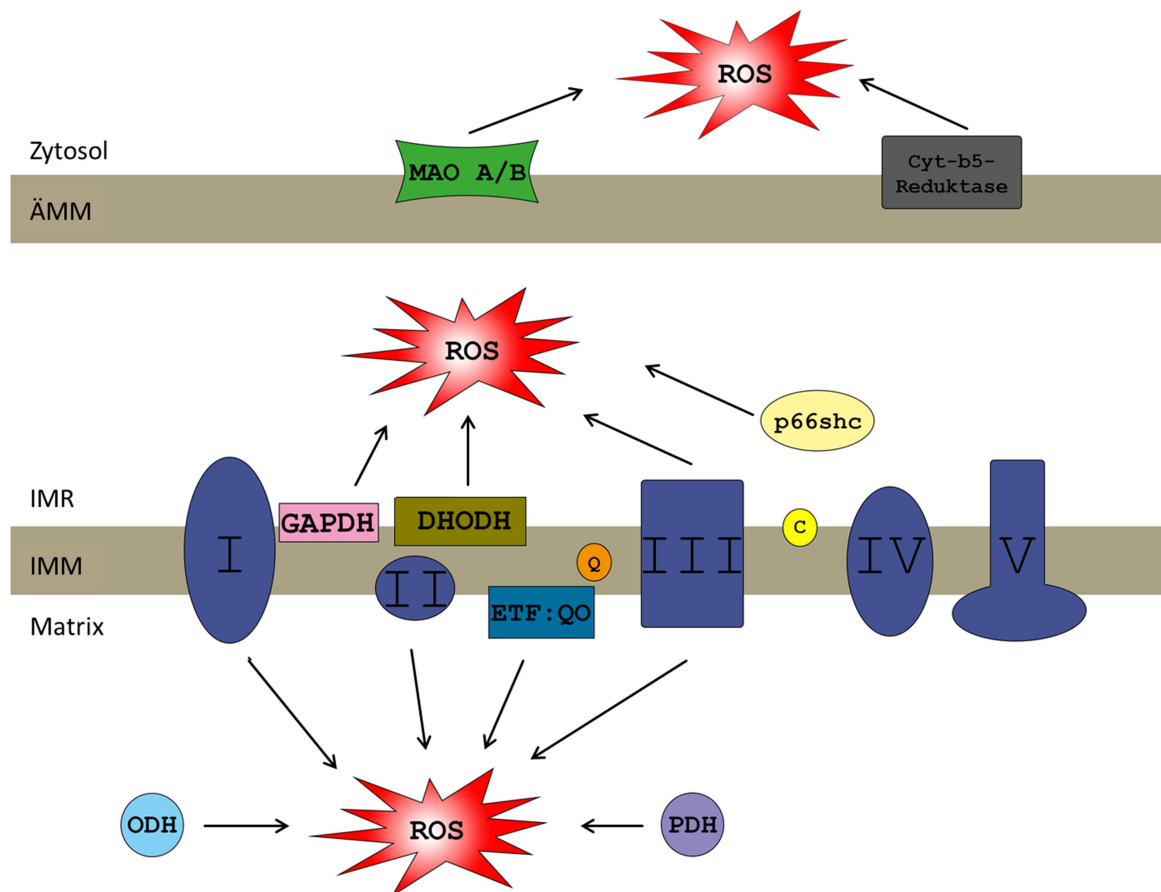
Reguliert wird der Vorgang vor allem über ADP und Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [16]. Bei hohem ATP-Verbrauch während erhöhter Arbeitsbelastung des Herzens stimuliert ADP die  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP-Synthase und damit die ATP-Synthese, sodass die ETK beschleunigt abläuft und Reduktionsäquivalente im oxidierten Zustand gehäuft anfallen. Durch größere Amplituden und höhere Frequenzen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten während erhöhter Arbeitslast wird  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol von Herzmuskelzellen vermehrt über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU) in die Mitochondrien aufgenommen und akkumuliert in der Matrix. Dort stimuliert es die Aktivität von Schlüssel-Enzymen des Citratzyklus, sodass die Reduktionsäquivalente  $\text{NADH}_2$  und  $\text{FADH}_2$  nachgebildet werden [12]. Dadurch wird ein ausgeglichenes, an die Arbeitslast des Herzens angepasstes Redoxverhältnis von  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  bzw.  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  und damit eine ausreichende Energieversorgung der Herzmuskelzellen in Form von ATP gewährleistet.

### *1.2.1 Die Bedeutung der Mitochondrien für die ROS-Produktion im Herzen*

Mitochondrien produzieren ein wichtiges ROS-Signal innerhalb der Zelle [17] und enthalten eine Vielzahl von Enzymen mit der Fähigkeit, molekularen Sauerstoff in Superoxid oder Wasserstoffperoxid zu konvertieren. Dabei stellt die ETK, die Maschinerie, aus der das Herz

ausreichend Energie bezieht, eine signifikante Quelle für intrazelluläre ROS dar. Schätzungsweise 95 % der freien Sauerstoffradikale, die von einer normalen Zelle produziert werden, werden durch den Elektronenverlust aus den Komplexen der ETK generiert [18]. Der größte Anteil des von der Zelle konsumierten Sauerstoffs wird am Ende der ETK an Komplex IV zu Wasser reduziert. Ein kleiner Teil des Sauerstoffs (0,2-2 %) kann jedoch auch im mittleren Teil der ETK durch die Übertragung von ein oder zwei Elektronen partiell reduziert werden [19, 20]. Dabei entstehen Superoxid, hauptsächlich an den Komplexen I, II und III [21, 22], und Wasserstoffperoxid als metabolische Nebenprodukte [4, 23]. Zudem besitzen die Proteine der ETK eine Vielzahl an Eisen-Schwefel-Zentren und Häm-Gruppen; wichtige Kofaktoren, die für die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid notwendig sind [24].

Neben den Komplexen der ETK enthalten die Mitochondrien noch weitere ROS produzierende Proteine. Dazu gehören die Cytochrom-b5-(Cyt-b5)-Reduktase der äußeren Mitochondrienmembran, die flavinhaltige Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) und das elektronentransferierende Flavoprotein:Ubichinon-Oxidoreduktase-System (ETF:QO) der  $\beta$ -Oxidation des Fettsäurestoffwechsels innerhalb der inneren Mitochondrienmembran sowie die Pyruvat- und 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (PDH, ODH) innerhalb der Mitochondrienmatrix [25, 26]. Darüber hinaus werden innerhalb der Mitochondrien signifikante Mengen an ROS von p66shc und MAO gebildet [26, 27] (Abbildung 2). Die MAO der äußeren Mitochondrienmembran katalysiert den Elektronentransfer von Stickstoffgruppen auf Sauerstoff, wodurch die Bildung von Wasserstoffperoxid in der mitochondrialen Matrix und im Zytosol der Zelle gefördert wird. Auf das Enzym p66shc, das im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert ist, wird im Folgenden genauer eingegangen.

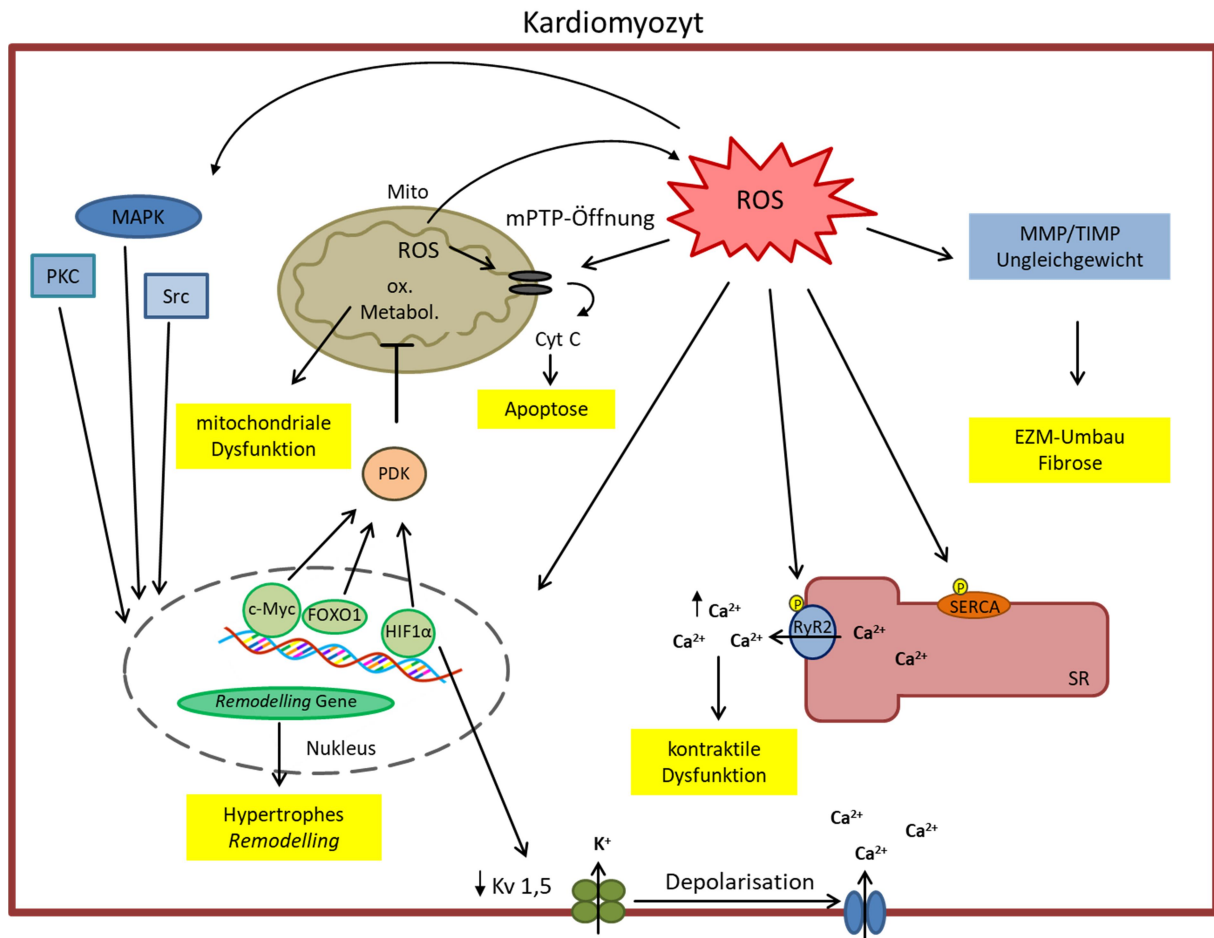


**Abbildung 2: Mitochondriale ROS-Produktion.** In der äußeren Mitochondrienmembran (ÄMM) sind die Monoaminoxidase-Isoformen A und B (MAO A/B) und die Cytochrom-b5-(Cyt-b5)-Reduktase lokalisiert. Die MAOs bauen Monoamine zu Aldehyden und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ab. Die Cyt-b5-Reduktase katalysiert die Reduktion des an das Cytochrom b5 gebundenen Eisen-Ions von der dreiwertigen in die zweiwertige Form unter gleichzeitiger Oxidation von NAD(P)H. Im mitochondrialen Intermembranraum (IMR) generiert p66shc  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die Oxidation von Cytochrom c (C). Die Elektronentransportkette (ETK)-Komplexe I-V sind in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) lokalisiert. Die Komplexe I, II und III erzeugen aus molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) und die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) befinden sich an der äußeren Oberfläche der IMM. Die DHODH katalysiert die Umwandlung von Dihydroorotat zu Orotat, wobei es in Abwesenheit des Elektronenakzeptors Ko-Enzym Q (Q) in der IMM zur Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  kommt. Die GAPDH nutzt mitochondriales Ko-Enzym Q als Elektronenakzeptor und katalysiert die Oxidation von Glycerin-3-Phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat, wobei  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Nebenprodukt entsteht. Das elektronentransferierende Flavoprotein:Ubichinon-Oxidoreduktase-System (ETF:QO) der  $\beta$ -Oxidation ist an der Matrixseite der IMM lokalisiert und ist essentiell für den Elektronentransfer von flavinhaltigen Dehydrogenasen auf Ko-Enzym Q. Die Oxidation von Palmitoyl-CoA in den Mitochondrien führt zur Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat und die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (ODH) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat und die nachfolgende Umsetzung mit Coenzym A zum Succinyl-CoA. Beide Enzyme enthalten FAD als prosthetische Gruppe und können ROS als Reaktion auf Schwankungen im NADH-Gehalt produzieren (Zusammengestellt aus [26, 28, 29]).

### 1.3 Bedeutung von ROS für das Herz

ROS sind wichtige Signalmoleküle, die sowohl unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle im Herzen spielen. Unter physiologischen

Bedingungen sind ROS an der Regulation der Herzentwicklung und der Reifung von Kardiomyozyten, dem Kalziumstoffwechsel des Herzens, der elektromechanischen Kopplung und der Regulation des Gefäßtonus beteiligt [27]. Ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und deren Abbau durch das antioxidative System führt zu einer erhöhten ROS-Menge und zur Entstehung von oxidativem Stress. Hohe Mengen an ROS können aufgrund ihres starken oxidativen Potentials zu unspezifischen Schäden von Desoxyribonukleinsäure (DNS/ DNA), Proteinen, Lipiden und anderen Molekülen führen und haben ein breites Spektrum an negativen Effekten auf die Energiegewinnung, Kontraktion und Umbauprozesse (*Remodelling*) des Herzens (Abbildung 3). Unter anderem können oxidative Modifikationen der sarkoplasmatischen Membrankanäle zu pathologischer Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors 2 (RyR2) und zu einer verringerten Aktivität der Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen/ endoplasmatischen Retikulums (SERCA) führen, was zu Störungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und der kontraktile Funktion der Kardiomyozyten führt [30]. Darüber hinaus führt ein hoher ROS-Spiegel zur Bildung von Nitrotyrosinresten in sogenannten Gewebe-Inhibitoren der Metalloproteinasen (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs) und aktivieren dadurch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), welche wiederum ventrikuläre Umbauprozesse und Fibrose induzieren [31]. Anhaltend hohe ROS-Konzentrationen verursachen darüber hinaus eine Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Übergangspore (*mitochondrial permeability transition pore*, MPTP), einer 1500 Dalton großen Pore, die unter pathologischen Bedingungen öffnet und die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran erhöht. Infolgedessen kommt es zur Entkopplung der ETK, wodurch das mitochondriale Membranpotential abfällt und die ROS-Produktion weiter ansteigt. Der Einstrom niedermolekularer Moleküle resultiert zudem in einer Mitochondrienschwellung, die schließlich zu einer Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führt und Cytochrom c und andere proapoptische Proteine aus den Mitochondrien freisetzt und den Zelltod induziert [32-34]. Darüber hinaus können ROS als sekundäre Botenstoffe für Signalmoleküle, wie Angiotensin II (Ang II), den *transforming growth factor-beta* (TGF $\beta$ 1), Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF $\alpha$ ) und Endothelin-1 (ET-1) fungieren und so hypertrophe Signalwege induzieren [35]. Dysregulierte ROS-Produktion und oxidativer Stress werden nicht nur mit der kardialen Hypertrophie, sondern auch mit einer Reihe weiterer Herzerkrankungen in Verbindung gebracht, wie der Herzinsuffizienz, der Ischämie-Reperfusionsschädigung und der diabetischen Kardiomyopathie [36-39].



**Abbildung 3: ROS-induzierte intrazelluläre Veränderungen in Kardiomyozyten.** Die erhöhten intrazellulären Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die bei einer rechtsventrikulären Druckbelastung auftreten, beeinflussen mehrere Funktionen der Kardiomyozyten. ROS können pro-hypertrophe Wege stimulieren, indem sie auf Schlüssel-moleküle in diesem Prozess abzielen, wie z.B. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), Proteinkinase C (PKC) und Src-Kinasen. Die Redox-vermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF-) 1 $\alpha$ , *v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homologue* (c-Myc) und *Forkhead-Box-Protein O1* (FOXO1) könnte für die Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK) verantwortlich sein, welche den mitochondrialen oxidativen Metabolismus hemmt, was wiederum zu einer mitochondrialen Dysfunktion führt. Hohe ROS-Konzentrationen können die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Übergangspore (mPTP) und die Depolarisierung der mitochondrialen Membran induzieren, was wiederum mehr ROS produziert und durch die Freisetzung von Cytochrom c (Cyt C) aus den Mitochondrien zur Apoptose führt. Die HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung verringert auch die Aktivität des O<sub>2</sub>-sensitiven Kv-Kanals (Kv1,5), was zu einer Membrandepolarisation und einer Erhöhung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt. Der Überschuss an zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Ionen, zusätzlich zu den aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzten überschüssigen Ca<sup>2+</sup>-Ionen, als Folge der ROS-vermittelten Öffnung des Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2)-Kanals und der Hemmung der SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA), trägt zur kontraktile Dysfunktion der Kardiomyozyten bei. ROS tragen auch zu einem Ungleichgewicht zwischen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Gewebsinhibitor-Metalloproteinasen (TIMPs) bei, das den Umbau (*Remodelling*) der extrazellulären Matrix (EZM) und die Fibrose vorantreibt. ↑ zeigt eine Zunahme an; ↓ zeigt eine Abnahme an (modifiziert nach [40]).

## 1.4 Bedeutung von ROS im linken und rechten Ventrikel

### 1.4.1 Unterschiede zwischen dem rechten und linken Ventrikel

Der rechte Ventrikel (RV) und der linke Ventrikel (LV) unterscheiden sich embryologisch, morphologisch und funktionell [41]. Während der Kardiogenese entwickelt sich der LV aus dem vom anterolateralen Mesoderm stammenden primären Herzfeld (PHF), wohingegen der RV dem sekundären Herzfeld entstammt, welches sich aus den Zellen des pharyngealen Mesoderms ableitet [42, 43]. Nach der Geburt sinkt der pulmonale Gefäßwiderstand, während gleichzeitig der systemische Widerstand zunimmt. Die rechtsventrikuläre Morphologie und Geometrie entspricht einer dünnwandigen Kammer [44], die sich im Querschnitt sichelförmig um den unter hohem Druck stehenden, kugelförmigen und muskelstarken LV legt. Das dazwischen liegende Septum ist entsprechend der Druckverhältnisse so gebogen, dass es eine konkave Form auf der Seite des RVs bzw. eine konvexe Krümmung auf der Seite des LVs aufweist. Da der rechte und der linke Ventrikel „in Serie geschaltet“ sind, muss der RV das gleiche Schlagvolumen pumpen wie der LV [45]. Aufgrund des niedrigen pulmonal vaskulären Widerstands benötigt der RV dafür jedoch nur 25 % der Energie des LVs. Außerdem ergeben sich für den RV aufgrund des geringeren Drucks ein im Vergleich zum LV geringer Sauerstoff- und Energieverbrauch [46]. Mit anderen Worten: der RV muss für das gleiche Schlagvolumen eine geringere Arbeit leisten. Auf zellulärer Ebene weisen RV- und LV-Kardiomyozyten unterschiedliche Eigenschaften auf. Im Tierversuch besitzen RV-Kardiomyozyten im Vergleich zu LV-Kardiomyozyten eine verringerte lastfreie Zellverkürzung sowie kleinere intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten [47]. Diese Befunde stimmen mit Beobachtungen überein, dass Muskelfasern aus dem RV eine geringere Kraftentwicklung haben als solche aus dem LV [48]. Darüber hinaus scheinen RV-Kardiomyozyten aufgrund von einer größeren Kalium ( $\text{K}^+$ )-Stromdichte ein kürzeres Aktionspotential zu besitzen. Da sich die Funktionen aller wichtigen, am zellulären Kalziumstoffwechsel beteiligten Komponenten zwischen den Kardiomyozyten aus dem RV und dem LV nicht unterscheiden, werden andere zugrunde liegenden Mechanismen für diese Unterschiede vermutet [47]. Aus Nagerherzen isolierte RV- und LV-Kardiomyozyten unterscheiden sich außerdem in der Größe, wobei LV-Kardiomyozyten länger, breiter und größer sind als RV-Kardiomyozyten [9]. Zudem erzeugen aus dem Rattenherz isolierte RV-Mitochondrien mehr ROS als solche aus dem LV [49]. Die Behandlung von isolierten perfundierten Rattenherzen mit dem MAO-Substrat Serotonin führt zu einer erhöhten ROS-Bildung im RV, nicht aber im LV [50].

### *1.4.2 Rechtsherzhypertrophie und Rechtsherzinsuffizienz*

Eine Rechtsherzhypertrophie (rechtsventrikuläre Hypertrophie, RVH) entsteht häufig ursächlich durch eine Pulmonalklappenstenose oder sekundär als Folge von chronischem Lungenbluthochdruck (pulmonale Hypertonie, PH). Eine Erhöhung des transmuralen Drucks resultiert im dünnwandigen RV in einer deutlichen Zunahme der Wandspannung. Um die Wandspannung wieder herabzusetzen, adaptiert der RV initial kompensatorisch durch strukturelle Umbauprozesse, die eine funktionelle Anpassung und die Aufrechterhaltung der Herzfunktion gewährleisten. Diese Umbauprozesse beinhalten eine Hypertrophie der Kardiomyozyten, d.h. eine Vervielfältigung parallel liegender Sarkomere [51], die Synthese von extrazellulärer Matrix (Myokardfibrose) sowie das Wachstum des Gefäßsystems. Um eine höhere Auswurfleistung zu erzielen dilatiert der RV zusätzlich. Gleichzeitig erfolgen auf zellulärer Ebene metabolische Anpassungsprozesse, um den erhöhten Gesamtenergiebedarf zu decken. Während dieser sogenannten adaptiven rechtsventrikulären Hypertrophie bleiben Herzzeitvolumen und rechtsventrikulärer Füllungsdruck bei normalerweise minimaler Dilatation und Fibrose erhalten. Bei weiter anhaltender Druckbelastung des rechten Ventrikels reichen diese kompensatorischen Mechanismen nicht länger aus, um die pathologischen Bedingungen auszugleichen, sodass die zunehmende Myokardfibrose und rechtsventrikuläre Dilatation sowie die strukturellen und metabolischen Veränderungen der Kardiomyozyten letztendlich zum Rechtsherzversagen führen [35, 45, 52, 53]. Der Übergang von kompensierter zu dekompensierter RVH ist jedoch zum aktuellen Zeitpunkt nur unvollständig charakterisiert.

### *1.4.3 Molekulare Mechanismen der ventrikulären Hypertrophie*

Ein Großteil der Daten, die zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Herzhypertrophie und -insuffizienz beigetragen haben, basiert auf Studien des LVs. Allerdings lassen sich die bisher erlangten Erkenntnisse über die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) nicht ausnahmslos und ohne weiteres auf den RV übertragen. Dies wird besonders deutlich durch die unterschiedlichen Reaktionen der beiden Ventrikel auf Therapien der Herzinsuffizienz. Standardmedikamente gegen Linksherzversagen wie Blocker der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta$ -Blocker) und Hemmer des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (wie Hemmer des Angiotensin-konvertierenden Enzyms; ACE-Hemmer oder Angiotensin-II-Rezeptorblocker) zeigen bei Patienten mit rechtsventrikulärer Insuffizienz keine Verbesserung der Herzfunktion [54]. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist, dass die Ventrikelvergrößerung

bei PH zu einem früheren Zeitpunkt auftritt als es der Fall im druckbelasteten LV ist. Teilweise lässt sich dies durch die größere Wandspannung des RV aufgrund der geringeren Wanddicke bei vergleichbarem Druckanstieg begründen [55]. Aber auch die unterschiedlichen embryonalen Ursprünge der beiden Ventrikel spielen eine wesentliche Rolle [56], da es unter Hypertrophie oft zur Reaktivierung fetaler Genprogramme kommt [57]. Während viele von ihnen zwischen RV und LV ähnlich sind, sind einige Gene jedoch nur im druckbelasteten RV hochreguliert. Dazu zählen beispielsweise Dickkopf 3, *secreted frizzled-related protein 2* (Sfrp2) und der WNT-inhibierender Faktor 1 (Wif1); Gene, die am Wnt-Signalweg beteiligt sind [58]. Der Wnt-Signalweg reguliert Prozesse wie Zellproliferation, Migration, Entzündungsreaktionen, Glukosestoffwechsel und Apoptose [55].

Tatsächlich kommt es im kompensierten Stadium der RVH zu einem metabolischen Wechsel (*Switch*) weg von der Fettsäureoxidation hin zu einem hoch glykolytischen Stoffwechselprofil, bei dem weniger Sauerstoff pro generiertes ATP-Molekül verbraucht wird, dafür aber insgesamt weniger ATP-Moleküle produziert werden [59]. Weiterhin gibt es Hinweise auf eine verminderte mitochondriale ROS-Produktion sowie auf eine Aktivierung von HIF-1 $\alpha$ , wodurch die Angiogenese gefördert wird, um den erhöhten Blut- und Sauerstoffbedarf des hypertrophen Myokards zu decken [60].

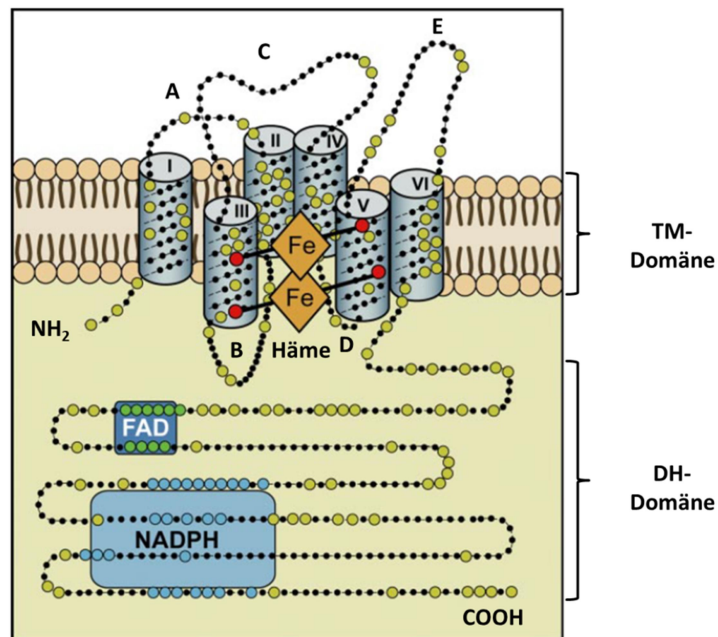
Mit dem Eintritt in die dekompenzierte Phase der RVH, die durch eine signifikante Reduktion des Herzzeitvolumens, eine Erhöhung des rechtsventrikulären Füllungsdrucks und vermehrte Fibrose definiert ist, geht dieser metabolische *Switch* verloren [52, 61]. Zudem steigt auch die Produktion mitochondrialer ROS. Weil allerdings im RV antioxidative Abwehrmechanismen nicht aktiviert werden, wird der RV bereits in einem frühen Stadium anfällig für ROS-induzierte Schäden [62, 63]. Auch die verminderte Expression von *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator* (PGC) 1 $\alpha$ , einem Schlüsselregulator bei der Expressionskontrolle zahlreicher ROS-entgiftender Enzyme, trägt zur Abnahme der zellulären oxidativen Kapazität bei, wodurch die Bildung von ROS gesteigert und oxidativer Stress begünstigt wird [64, 65]. Folglich stellt die Aktivierung des zellulären ROS-Abwehrsystems im hypertrophierten RV einen möglichen Therapieansatz dar. Tatsächlich konnte durch den Einsatz des Antioxidans EUK-134 (ein Superoxid-Dismutase- und Katalase-Mimetikum) im PH-induzierten versagenden RV der oxidative Stress und die ROS-Produktion reduziert und die systolische Funktion des RV verbessert werden [66].

---

## 1.5 Funktionelle Relevanz und Lokalisation der NOX4 in Mitochondrien des linken Ventrikels unter physiologischen Bedingungen

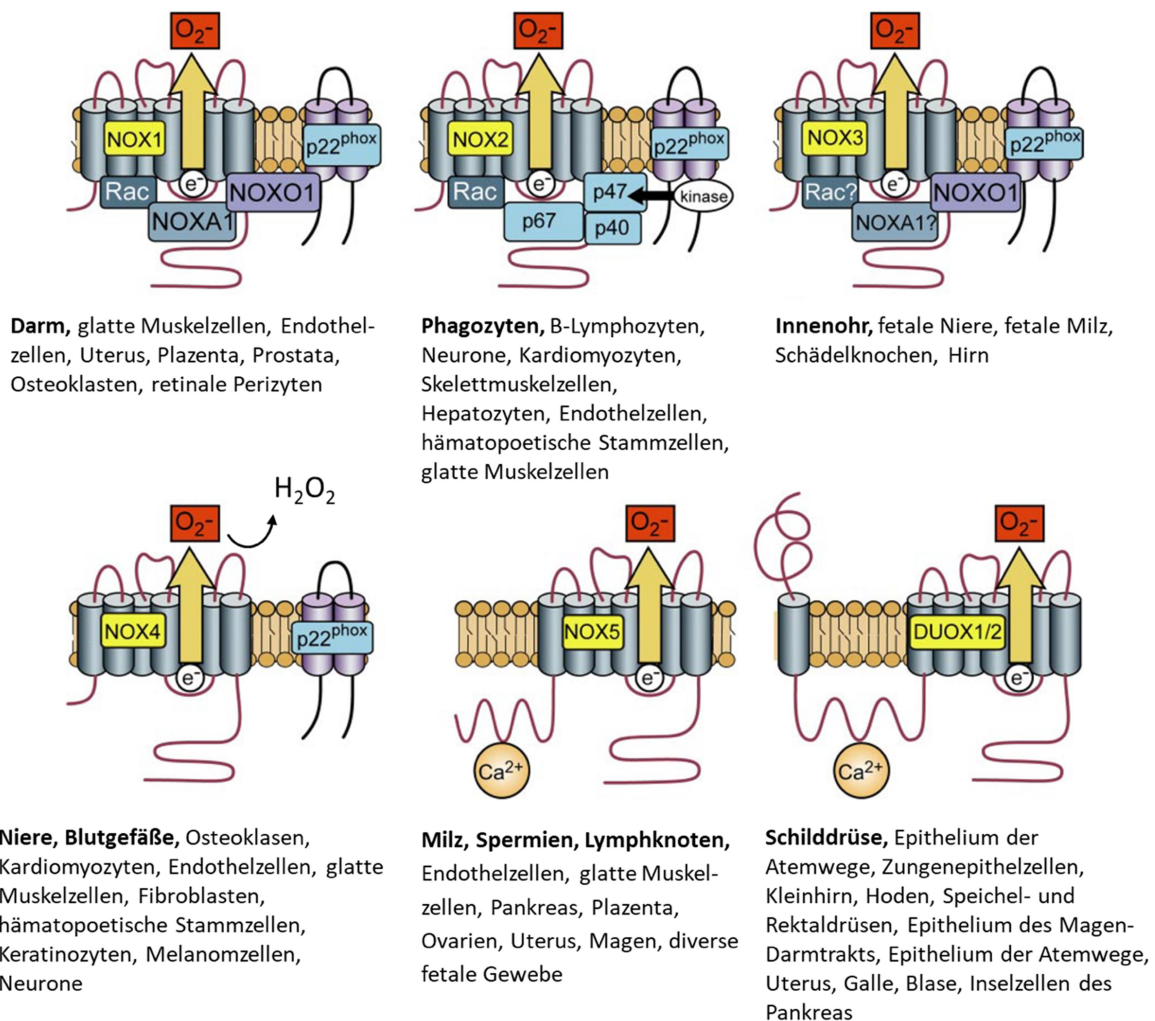
### 1.5.1 NADPH-Oxidase 4 (NOX4)

Eine signifikante Quelle für zelluläre ROS ist die Proteinfamilie der NADPH-Oxidasen (NOX). Diese umfasst sieben Mitglieder, NOX 1-5 sowie die Dual-Oxidasen Duox 1 und 2. Bei den 5 NOX-Enzymen handelt es sich um transmembranäre Oxidoreduktasen, die Elektronen über biologische Membranen transportieren und Sauerstoff zu Superoxid reduzieren [67]. Alle NOX-Isoformen weisen sechs konservierte, die Membran durchziehende Alpha-Helices auf, welche zusammen die Transmembran (TM)-Domäne bilden. Die Helices der TM-Domäne sind über fünf Schlaufen, sog. *loops*, miteinander verbunden und werden von einem zytosolischen N- und C-Terminus flankiert. Die *loops* haben die Bezeichnung A-E, wobei die *loops* A,C und E zum extrazellulären Raum hin orientiert sind und für die Sauerstoffreduktion verantwortlich sind, während die *loops* B und D ins Zytosol ragen [68-70]. Zu den weiteren konservierten funktionellen Gruppen gehören die im C-Terminus lokalisierten NADPH- und FAD-Bindungsstellen, die zusammen die Dehydrogenase (DH)-Domäne bilden sowie zwei Häm als prosthetische Gruppen. Dabei werden die Häm-Gruppen von vier hochkonservierten Histidinresten in der TM-Region koordiniert. Zwei dieser Histidinreste sind in der dritten TM-Domäne und zwei weitere in der fünften TM-Domäne lokalisiert [67, 70, 71] (Abbildung 4). Durch die Bindung eines NADPH-Moleküls am C-Terminus wird ein Elektron entlang eines elektrochemischen Gradienten von NADPH über FAD und die beiden Häm-Gruppen direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch ROS entstehen [72].



**Abbildung 4: Struktur der NADPH-Oxidase (NOX).** Die NOX-Enzyme weisen konservierte Strukturen auf, welche die für alle NOX-Isoformen gemeinsame Funktion gewährleisten. Beginnend vom zytosolischen  $\text{NH}_2$ -Terminus umfassen diese folgende konservierten Strukturen: Die Transmembran (TM) – Domäne, bestehend aus sechs konservierten Alpha-Helices, die wiederum über 5 Schleifen (*loop* A-D) miteinander verbunden sind und den vier hochkonservierten Häm-bindenden Histidinresten (rote Kreise) innerhalb der TM-Domäne. Die orangefarbenen Rauten stellen die Häm-Gruppen mit je einem Eisen-Ion (Fe) als Zentralatom dar. Im Zytosol ist die Dehydrogenase (DH) – Domäne, bestehend aus einer FAD-Bindungsstelle sowie einer NADPH-Bindungsstelle direkt am COOH-Terminus, lokalisiert. Es wird angenommen, dass NOX-Enzyme Ein-Elektron-Transporter darstellen, welche Elektronen von NADPH über FAD und die beiden Häm-Gruppen direkt auf Sauerstoff übertragen. Die grünen Kreise stellen konservierte Aminosäuren zwischen den humanen Isoformen NOX1, NOX2, NOX3 und NOX4 dar (modifiziert nach [67]).

Trotz der konservierten Kernstruktur sowie der enzymatischen Aktivität, die alle NOX-Enzyme gemeinsam haben, unterscheiden sich die jeweiligen Isoformen im Hinblick auf die gewebespezifische Verteilung und den Aktivierungsmechanismus, für den die Interaktion mit spezifischen, regulatorischen Untereinheiten erforderlich ist. Eine Übersicht aller Mitglieder der NOX-Familie ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Zusammenfassung der NOX-Isoformen, der benötigten regulatorischen Untereinheiten sowie deren Expressionsmuster.** Die Isoform NOX1 benötigt für die Aktivierung der enzymatischen Aktivität p22phox, NOXO1 (in manchen Fällen möglicherweise auch p47phox) und NOXA1 sowie die kleine GTPase Rac. Die NOX2-Aktivierung hängt von den Untereinheiten p22phox, p47phox, p67phox und Rac ab. Dabei ist die Phosphorylierung von p47phox für die Aktivierung von NOX2 notwendig. NOX3 benötigt p22phox sowie NOXO1; NOXA1 könnte speziesspezifisch relevant sein und eine Notwendigkeit von Rac wird weiterhin debattiert. NOX4 benötigt außer p22phox keine weiteren Untereinheiten. NOX5 sowie DUOX1/2 werden durch Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aktiviert und sind unabhängig von anderen Untereinheiten für ihre enzymatische Aktivität. Auf die Expression und Regulation von NOX4 wird unter 1.5.3 eingegangen. **Fett gedruckt:** Starke Expression; normal gedruckt: mittlere/geringe Expression (modifiziert nach [67]).

### 1.5.2 NOX4-Varianten und enzymatische Eigenschaften

NOX4 wird von einem Gen kodiert, das 34 Introns enthält und in 16 gespleißte Varianten transkribiert wird, von denen mindestens vier Proteine erzeugen (NOX4B-E) [73]. Die Varianten NOX4B und NOX4C enthalten die TM-Domäne, jedoch fehlt diesen Varianten ein Teil der DH-Domäne. Den kleineren Varianten NOX4D und E fehlt die TM-Domäne, wobei der Variante E zusätzlich ein Teil der DH-Domäne fehlt. Somit scheint NOX4D von den genannten Spleißvarianten als einzige enzymatisch aktiv im Sinne der ROS-Produktion zu

sein, da diese die für die Elektronentransferaktivität erforderlichen NADPH- und FAD-Bindungsdomänen enthält. Zusätzlich zu den NOX4-Varianten enthält die genomische DNA-Region von NOX4 mehr als 2300 Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP), davon 45 SNPs in der genkodierenden Region. Diese SNPs können die Genexpression, die Transkription und sogar die NOX4-Funktion beeinflussen, die den Verlauf und/oder die Entwicklung von Krankheiten bestimmen können. Beispielsweise ist im kardiovaskulären System der NOX4-Polymorphismus rs11018628 mit einem verringerten Risiko und einer besseren kurzfristigen Erholung bei ischämischem Schlaganfall in Verbindung gebracht worden [74].

Als Produkt seiner enzymatischen Aktivität generiert NOX4  $H_2O_2$  anstelle von  $O_2^-$ . Es wird angenommen, dass diese Eigenschaft auf die besondere Struktur der E-Schleife des NOX4-Proteins zurückzuführen ist, welche die schnelle Dismutation von  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$  begünstigt, bevor dieses das Enzym verlassen kann. [75]. Zudem ist bekannt, dass die enzymatische Aktivität der NOX4, im Gegensatz zu NOX1-3, unabhängig von der Interaktion mit den klassischen, zellulären NADPH-Oxidase Untereinheiten wie p47phox, p67phox und p40phox ist [76-78]. Für die NOX4-Aktivität ist lediglich die Bindung an p22phox von Bedeutung [67] (Abbildung 5).

NOX4 wird als ein konstitutiv aktives Enzym beschrieben. Dieses Merkmal ist auf die B-Schleife sowie den C-Terminus des Proteins zurückzuführen, welche für den konstitutiven Elektronentransfer von NADPH zu FAD verantwortlich sind [79]. Folglich erfolgt die Regulation der NOX4 direkt über die Expression und zelluläre Lokalisation.

### 1.5.3 Regulation der NOX4-Expression

Man geht davon aus, dass NOX4 ein induzierbares NOX-Protein (iNOX) ist und dass die NOX4-vermittelte ROS-Produktion über die Proteinmenge auf Ebene der Genexpression reguliert wird.

Eine Zunahme der NOX4-Expression durch TGF- $\beta$  ist unter anderem in kardialen Fibroblasten [80] sowie in glatten Muskelzellen der Lunge [81] und der Pulmonalarterien [82] nachgewiesen. Die *in vivo* Gabe von Ang II erhöht ebenfalls den NOX4-mRNA-Spiegel in vaskulären Zellen der Ratte. Auch von TNF- $\alpha$  ist bekannt, dass dieses die Expression von NOX4 in vaskulären glatten Muskelzellen und vaskulären Endothelzellen induziert. Zudem kann die NOX4-Expression durch andere Stimuli induziert werden, darunter durch

Endoplasmatischen Retikulum (ER)-Stress [83], physiologische Scherkräfte [84], Hypoxie und Ischämie [85, 86] sowie durch mitochondriale Dysfunktion [87] oder Aktivierung der Proteinkinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) [88]. Eine Abnahme der NOX4-Expression im Gefäßsystem ist durch die Exposition von  $\omega$ -3-Fettsäuren [89] beschrieben sowie als Reaktion auf *platelet-derived growth factor* (PDGF) und Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma (PPAR $\gamma$ )-Liganden [90, 91], auf das knochenmorphogenetische Protein 4 (*bone morphogenetic protein 4*, BMP4) [92] und auf Serumangel von kultivierten Zellen [93].

Die NOX4-Promotoraktivität kann durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (TF) reguliert werden, darunter durch den nukleären Faktor Kappa B (NF $\kappa$ B) [86], *small mothers against decapentaplegic* (SMAD) 2/3 [80], E2F [94], HIF-1 $\alpha$  [95] und *nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2* (Nrf2) [96]. Die Aktivierung dieser Signalwege ist jedoch stark von Stimulus und Zelltyp abhängig [72]. Histon-Deacetylasen (HDAC) können die NOX4-Expression ebenfalls beeinflussen, indem sie die Bindung von TF regulieren [96].

NOX4-Aktivität kann darüber hinaus durch verschiedene Proteine akut moduliert werden. Von größter Bedeutung ist sicherlich die Interaktion mit p22phox, welches die NOX4-Aktivität steigert, ohne jedoch dessen Expression zu verändern [97]. Zudem interagiert p22phox mit dem Polymerase-Delta-interagierenden Protein 2 (Poldip2), wodurch die NOX4-Aktivität ebenfalls erhöht wird [98]. Des Weiteren zeigt sich eine gesteigerte NOX4-Aktivität durch den PKC-Agonisten Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) in Endothelzellen [99], Ang II in Nierenmesangial- und Tubuluszellen [100, 101], Insulin in Adipozyten [102], und Lipopolysaccharide (LPS) in embryonalen Nierenzellen und Endothelzellen [103, 104].

#### 1.5.4 NOX4-vermittelte Signalwege

Mehrere Studien berichten über die Fähigkeit von NOX4, verschiedene Signalwege und zelluläre Funktionen zu regulieren (z. B. Proliferation [105], Apoptose [83], Angiogenese [106]), je nach Expressionsniveau, intrazellulärer Lokalisation und untersuchtem Zelltyp. Der wahrscheinlichste Mechanismus, über den NOX4-vermittelte ROS zelluläre Funktionen regulieren, ist die reversible Thioloxydation reaktiver Cysteine in regulatorischen Proteinen. Potentielle Ziele der ROS-Modifikation sind Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), Tyrosinkinasen, Ionenkanäle und TF.

Studien zeigen, dass NOX4 die Kinasen p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38MAPK), Ras/ *extracellular signal-regulated kinases* (ERK), c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und Akt

aktiviert [107-111]. Diese redox-sensitive Aktivierung könnte durch die Inaktivierung von Phosphatasen vermittelt sein. Tatsächlich vermittelt NOX4 die oxidative Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B) im ER von Endothelzellen. Dadurch wird die Dephosphorylierung des *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptors vermindert, wodurch das EGF-Rezeptorsignal verstärkt wird [108]. Nach TGF- $\beta$ -induzierter Zunahme der NOX4-Expression kommt es auch zu einer oxidativen Hemmung der SERCA in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) von Ratten mit Diabetes [112].

NOX4-generierte ROS können die Proliferationsrate vermindern und induzieren die Zellalterung in Fibroblasten und Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*; HUVECs) [113-115]. Im Gegensatz dazu kann eine erhöhte NOX4-Expression in kultivierten VSMCs abhängig von den Zellkulturbedingungen entweder die zelluläre Differenzierung oder Proliferation fördern [80, 116].

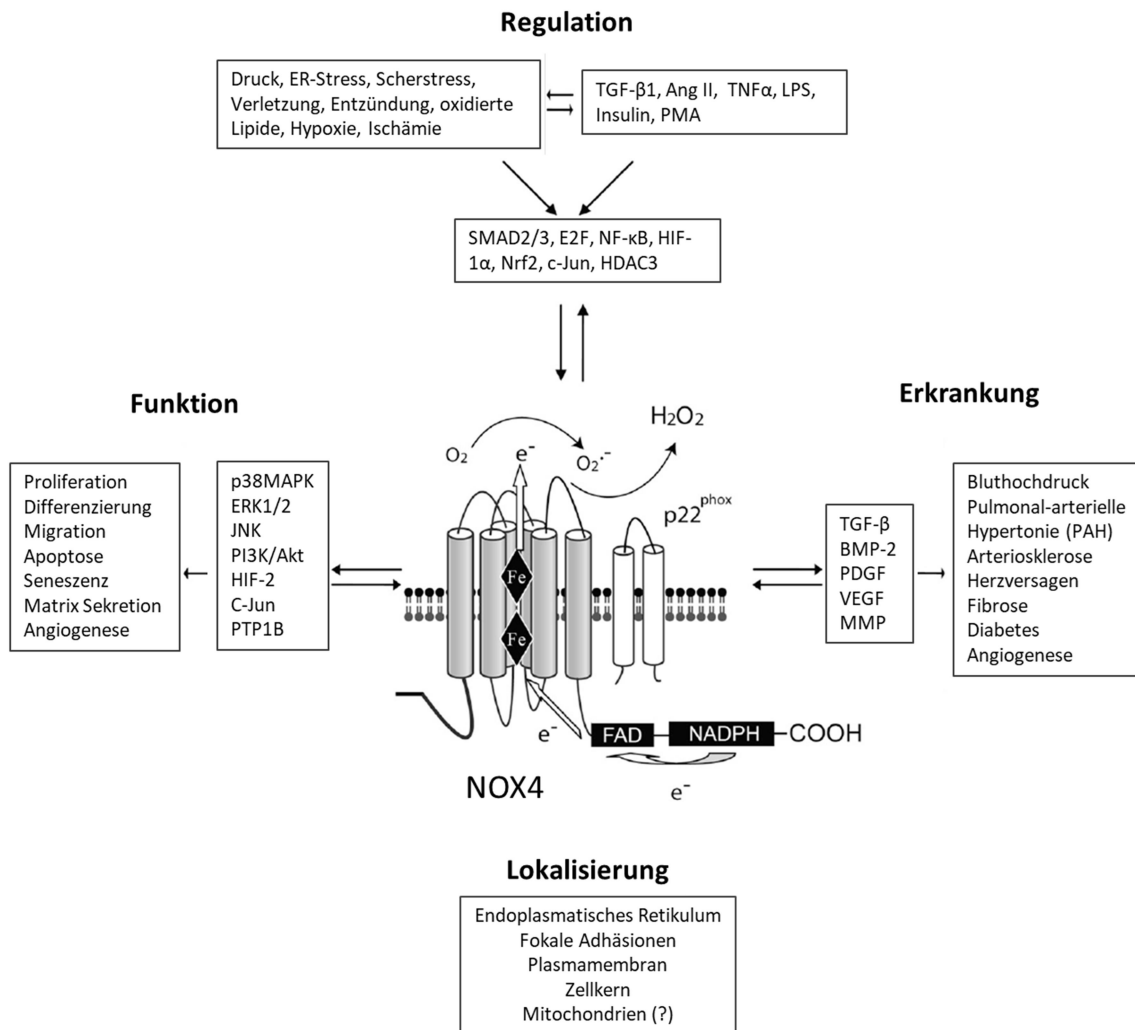
In Abhängigkeit vom Stimulus und Zelltyp können NOX4-generierte ROS pro-apoptotisch oder anti-apoptotisch wirken [83, 117]. Zum Beispiel induziert 7-Ketocholesterol die NOX4-Expression und ROS-Produktion in glatten Muskelzellen der Aorta, einhergehend mit einer Induktion der Apoptose, wohingegen das Fehlen der NOX4 sowohl die Produktion von ROS als auch die Apoptose hemmt [83]. Im Gegensatz dazu induzieren Wachstumsfaktoren die NOX4-vermittelte ROS-Produktion in Pankreas Adenokarzinom-Zellen und schützen diese vor Apoptose [117]. Des Weiteren fördern NOX4-vermittelte ROS die Zell-Migration und -Differenzierung [82, 118-121] sowie Fibrose und Angiogenese [122, 123]. NOX4 kann zudem TF wie HIF-1 $\alpha$  regulieren. In Mauserzen vermittelt die gesteigerte NOX4-Aktivität nach Abbinden der Aorta eine Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung sowie eine vermehrte Freisetzung von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), was schließlich zu einer vermehrten Kapillarisation führt [106].

### 1.5.5 NOX4 und kardiovaskuläre Erkrankungen

NOX4 wird von nahezu allen kardiovaskulären Zelltypen in unterschiedlichen Mengen exprimiert. Dazu zählen u.a. Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten [116, 124, 125]. Da NOX4 ein konstitutiv aktives Enzym ist, dessen Expression zudem induzierbar ist, lässt eine erhöhte NOX4-Expression auch eine Veränderung der gebildeten Menge an ROS vermuten. Tatsächlich werden kardiovaskuläre Erkrankungen, die mit erhöhten ROS-Spiegeln assoziiert sind, wie z.B. die myokardiale Ischämie/Reperfusionsschädigung, auch

mit einer erhöhten Expression von NOX4 in Verbindung gebracht. Matsushima und Kollegen haben demonstriert, dass der herzspezifische *knockout* von NOX4 eine Abnahme der myokardialen Schädigung nach Ischämie/Reperfusion zur Folge hat, insofern die Produktion von ROS und die Infarktgröße vermindert sind [126]. Allerdings verschlimmert der *knockout* von sowohl NOX2 als auch NOX4 die myokardiale Schädigung. Dies deutet darauf hin, dass eine gewisse ROS-Menge, die von NOX4 oder NOX2 generiert wird, für den Schutz vor Ischämie/Reperfusionsschädigung notwendig ist [126]. Tatsächlich wird NOX4 auch eine kardioprotektive Funktion zugesprochen. Insbesondere seine protektive Rolle im chronisch hämodynamisch-überlasteten Herzen ist weitestgehend akzeptiert [106, 127, 128]. Durch die Verwendung von *gain-of-function* und *loss-of-function* Mutationen ist demonstriert worden, dass NOX4 einen schützenden Effekt auf das Herz nach abdominaler Aortenkonstriktion hat. Die Ergebnisse aus dieser Studie zeigen auf, dass der Stress-induzierte Anstieg der NOX4-Konzentration in Kardiomyozyten mit erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und HIF-1 $\alpha$ -Spiegeln assoziiert ist, was wiederum zu einer VEGF-Freisetzung und einer Erhöhung der angiogenen Kapazität führt und so die funktionelle Kompensation des Herzens erleichtert [106].

In Abbildung 6 ist eine Zusammenfassung der Erkenntnisse über NOX4 basierend auf der Publikation von Chen et al. dargestellt [72].



**Abbildung 6: Regulation, Funktion und subzelluläre Lokalisation von NOX4 sowie NOX4-assoziierte Erkrankungen.** Dargestellt sind die Proteinstruktur von NOX4 und eine Zusammenfassung bislang bekannter Funktionen, Regulationsmechanismen, subzelluläre Lokalisationen sowie mit NOX4-assoziierten Erkrankungen. Modifiziert nach [72].

### 1.5.6 Subzelluläre Lokalisation von NOX4

Die räumlich begrenzte Produktion von ROS in spezifischen Kompartimenten ist für die unterschiedlichen NOX4-vermittelten Funktionen besonders bedeutsam. Tatsächlich beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation von NOX4 eine Vielzahl seiner Funktionen, darunter die enzymatische Aktivität oder die Aktivierung von bestimmten nachgeschalteten Signaltransduktionswegen [99, 129-131]. Es ist somit nicht überraschend, dass die subzelluläre NOX4-Lokalisation von großem wissenschaftlichem Interesse ist. Die exakte Lokalisation der NOX4 innerhalb der Zelle ist bislang noch ungeklärt.

Berichten zufolge ist NOX4 im Zellkern von Monozyten, Endothelzellen, VSMC und Nierenrindenzellen [119, 124, 129, 132], in fokalen Adhäsionen von vaskulären glatten

Muskelzellen [129], im ER von glatten Muskelzellen und Nierenrindenzellen [81, 133] sowie in der Plasmamembran von Lungenepithelzellen und transfizierten COS-Zellen lokalisiert [134, 135]. Zudem gibt es Hinweise, dass im ER und Zellkern jeweils unterschiedliche Spleißvarianten von NOX4 lokalisiert sind [73]. Es wird angenommen, dass im Zellkern die 28-kDa kleine NOX4-Variante NOX4D vorkommt [136]. Weiterhin berichten Studien, dass NOX4 auch in Mitochondrien isoliert aus der Nierenrinde der Ratte [137] sowie auch in Mitochondrien von Kardiomyozyten nach kardialem Stress lokalisiert ist [138, 139]. Auf die NOX4-Lokalisation in Mitochondrien wird im Folgenden noch näher eingegangen. Es wird vermutet, dass die Lokalisation von NOX4 transitorisch ist und somit abhängig von Stimulus, Interaktion oder Zelltyp sein kann [98, 140].

### *1.5.7 NOX4 und Mitochondrien*

Die NOX4 ist erstmals im Jahr 2009 in Mitochondrien der Nierenrinde beschrieben worden [137]. Dasselbe Laboratorium postuliert, dass NOX4 in der inneren Mitochondrienmembran von renalen Krebszellen lokalisiert ist und dort über den ATP-Spiegel den Energiestatus der Zelle reguliert [141]. Die Hypothese lautet, dass unter physiologischen Bedingungen das durch die oxidative Phosphorylierung produzierte ATP allosterisch an eine für NOX4 exklusive Walker-ATP-Bindungsdomäne (häufiges Motiv in ATP- und GTP-bindenden Proteinen) bindet und so die NOX4-vermittelte ROS-Produktion auf einem niedrigen Niveau hält. Wenn in den renalen Krebszellen nun ATP durch anaerobe Glykolyse im Zytosol und nicht mehr durch oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium gebildet wird, kann das dazu führen, dass der ATP-Gehalt in Mitochondrien abnimmt und dadurch die Aktivität von mitochondrialem NOX4 zunimmt [141]. Es wird außerdem berichtet, dass die verminderte Expression von NOX4 in humanen Endothelzellen Veränderungen der mitochondrialen Morphologie, des mitochondrialen Membranpotentials sowie eine Verringerung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion induziert. In diesen Zellen hemmt NOX4 spezifisch die Aktivität von Komplex I der mitochondrialen ETK [142]. Diese Daten deuten einen Signalweg an, bei welchem eine andauernde NOX4-Aktivität die mitochondriale Funktion nachhaltig vermindert [142]. Darüber hinaus deuten Befunde unseres Kooperationspartners Harald H.H.W. Schmidt, die mittels der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode erhoben wurden, darauf hin, dass die NADPH-Dehydrogenase Untereinheiten 1 und 4L der mitochondrialen ETK potentielle Bindungspartner von NOX4 sind. Weiterhin gibt es Studien, die erste Hinweise auf eine mitochondriale Lokalisation von NOX4 auch in kardialen Mitochondrien enthalten [138, 139].

### 1.5.8 Zielsetzung 1

Da die NOX-Familie die bislang einzige bekannte Enzymklasse mit der primären Aufgabe der ROS-Produktion repräsentiert, stellt sie ein wichtiges therapeutisches Ziel dar. Die NOX4 unterscheidet sich von den übrigen NADPH-Oxidasen durch die Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  anstelle von  $\text{O}_2^-$  sowie durch ihre konstitutive Aktivität. Zudem wird vermutet, dass NOX4 in kardialen Mitochondrien lokalisiert sein könnte. Dabei könnten die NADPH-Dehydrogenase Untereinheiten 1 und 4L der mitochondrialen ETK potentielle Bindungspartner von NOX4 darstellen. Folglich könnte die NOX4 eine mögliche Verbindung zwischen mitochondrialer und NOX4-vermittelter ROS-Produktion herstellen.

Ein Ziel dieser Studie ist es daher zu untersuchen, ob NOX4 unter physiologischen Bedingungen in kardialen Mitochondrien lokalisiert und dort auch enzymatisch aktiv ist. Zu diesem Zweck sollen die enzymatische Aktivität im Sinne der Produktion von ROS sowie die Proteinmenge von NOX4 in isolierten Mitochondrien aus dem LV von Wildtyp- und NOX4 *knockout* Mäusen und unter Verwendung der beiden NOX-Inhibitoren GKT136901 und VAS2780 analysiert werden. Da die NOX4-Expression in Nieren hoch ist, sollen die Experimente zusätzlich in isolierten Mitochondrien aus der Niere von Wildtyp- und NOX4 *knockout* Tieren durchgeführt werden.

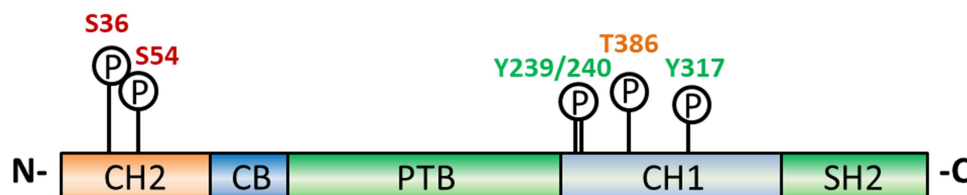
## 1.6 Funktionelle Relevanz von p66shc für den rechten Ventrikel bei pathologischer Druckbelastung

### 1.6.1 Das Adaptorprotein p66shc

Die *rous sarcoma virus* (Src) Homologie und Kollagen (*Src homology and collagen*, Shc) Familie der Adaptorproteine ist eine Gruppe von bislang sieben identifizierten Proteinen, die von vier Genen (ShcA/Shc1, ShcB/Shc2, ShcC/Shc3 und ShcD/Shc4) kodiert werden [143, 144] und durch die Verwendung alternativer Startcodons und mRNA-Spleißvarianten entstehen [145].

ShcA ist das am meisten untersuchte Gen der Shc-Proteinfamilie und kodiert für die Proteine p46shc, p52shc und p66shc. Die drei Isoformen entstehen durch die Verwendung von alternativen Startcodons und werden entsprechend ihres Molekulargewichts benannt [146].

p66shc weist die typische Domänenorganisation aller Shc-Mitglieder von Adaptorproteinen auf. Dazu zählen eine N-terminale Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (PTB), eine angrenzende Kollagen-Homologie 1 (CH1)-Domäne und eine C-terminale Src-Homologie 2 (SH2)-Domäne (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von p66shc.** p66shc besteht aus einer Amino (N)-terminalen Kollagen-Homologie (CH2)-Domäne, einer Cytochrom c-Bindungsdomäne (CB), einer Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (PTB), einer weiteren CH1-Domäne und einer Carboxy (C)-terminalen Src-Homologie 2 (SH2)-Domäne. Innerhalb der CH1 Domäne befinden sich Tyrosinreste (Y239/240 und Y317), die nach Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen phosphoryliert werden. Die Phosphorylierungsstellen (P) Serin (S) 36 und 54, Threonin (T) 386 und die Tyrosine (Y) 239/240 und 317 werden während der Signaltransduktion durch Rezeptor-Tyrosinkinasen phosphoryliert (modifiziert nach [147]).

Die PTB- und SH2-Domänen sind stark konservierte Regionen, die an Phosphotyrosin-Motive binden und die Rekrutierung von Shc-Proteinen an aktivierte Rezeptoren, wie Rezeptor-Tyrosinkinasen, Antigen-Rezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Zytokin-Rezeptoren ermöglichen [148-152]. Darüber hinaus kann über die PTB-Domäne auch eine Interaktion mit zytosolischen Tyrosinkinasen vermittelt werden [153]. Die CH1-Domäne besitzt Prolin- und Glycin-reiche Regionen, die als Andockstellen für Proteine mit

SH3-Domänen fungieren [154]. Außerdem enthält die CH1-Domäne konservierte Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (Y239/240 und Y317), die nach Phosphorylierung durch Tyrosinkinase Bindungsstellen für Proteine darstellen [155-157]. Das Adaptorprotein *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2), ein wichtiger Mediator des MAPK-Wegs, enthält sowohl zwei SH3-Domänen, die an die Prolin-reiche Region binden als auch eine SH2-Domäne, welche die Phosphotyrosinreste der CH1-Domäne bindet. p66shc besitzt im Gegensatz zu den beiden kürzeren Isoformen eine zusätzliche N-terminale CH-Domäne (CH2), die aus 110 Aminosäuren besteht [146] sowie eine N-terminale Cytochrom c-Bindungsdomäne [158]. Im Gegensatz zur CH1-Domäne wird die CH2-Domäne jedoch eher an Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Am besten untersucht ist die Phosphorylierung von p66shc an Serin 36 (S36). Aufgrund der Unterschiede in der Struktur von p46shc, p52shc und p66shc üben die Isoformen unterschiedliche Funktionen aus: während p46shc und p52shc an der Regulation der Proliferation beteiligt sind, spielt p66shc in der Apoptose und der Regulation der zellulären ROS-Konzentration eine Rolle [143].

### 1.6.2 Regulation der p66shc-Expression

Die Proteinexpression von p66shc variiert zwischen verschiedenen Geweben bzw. Organen [159]; Organe wie Herz, Muskeln und Nieren exprimieren geringe Mengen an p66shc [160, 161]; adulten Gehirnzellen fehlt es völlig [162, 163]. Dies deutet auf ein transkriptionelles/posttranslationales Kontrollsystem hin, das den p66shc-Gehalt reguliert [164]. Erste Hinweise darauf, dass die p66shc-Expression durch Hemmung des p66shc-Promotors in zellspezifischer Weise reguliert wird, liefert eine Studie in Zellen ohne endogene p66shc-mRNA und Protein-Expression, in der die p66shc-Expression durch transiente Transfektion von p66shc-Konstrukten induziert wird [165]. Der Einsatz von Deacetylase-Inhibitoren und demethylierenden Substanzen führt zu einer Zunahme der p66shc-Proteinexpression in einer dosisabhängigen Weise, was auf eine epigenetische Regulation des p66shc-Promotors durch Histon-Acetylierung und Cytosin-Methylierung hinweist [164]. Des Weiteren ist eine Transkriptionsregulation von p66shc durch den Tumorsuppressor p53 beschrieben, der die Expression von p66shc nach Stimulation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder UV-Licht hochreguliert, indem p53 die Proteinstabilität von p66shc erhöht [160, 166].

### 1.6.3 Subzelluläre Lokalisation von p66shc

Studien zur subzellulären Lokalisation von p66shc zeigen, dass das Protein im Zytosol, im ER und in Mitochondrien lokalisiert ist [167]. Innerhalb der Mitochondrien ist das Protein größtenteils mit der inneren Membran assoziiert und im Intermembranraum lokalisiert, aber auch eine Lokalisation in der mitochondrialen Matrix ist beschrieben [158]. Mitochondriales p66shc ist mit dem mitochondrialen Hitzeschockprotein mtHsp70 und den Translokasen der inneren und äußeren Membran TIM (*translocase of the inner membrane*) und TOM (*translocase of the outer membrane*) innerhalb eines hochmolekularen Komplexes von etwa 670 kDa assoziiert [168]. Man geht davon aus, dass p66shc innerhalb dieses Komplexes inaktiv vorliegt. Unter oxidativem Stress jedoch dissoziiert p66shc von diesem Komplex und wird dadurch in aktiver Form in den Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt [168].

### 1.6.4 Phosphorylierung und mitochondriale Translokation von p66shc

Die Translokation von p66shc aus dem Zytosol in die Mitochondrien ist vom Phosphorylierungsstatus des Proteins abhängig. Neben der Tyrosin-Phosphorylierung nach Wachstumsfaktor-Stimulation wird p66shc unter Stressbedingungen (z.B. UV-Bestrahlung oder Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) auch am S36 in der CH2-Domäne phosphoryliert [167, 169]. Die Phosphorylierung an dieser Stelle spielt eine entscheidende Rolle bei der Interaktion zwischen p66shc und der Prolyl-Isomerase (Pin1), einem Enzym, das die Isomerisierung von phosphorylierten Serin/Threonin-Prolin-Bindungen in Substratproteinen katalysiert [170]. Da in Pin1-defizienten embryonalen Fibroblasten (*mouse embryonal fibroblasts*; MEFs) der mitochondriale Gehalt an p66shc reduziert ist, geht man davon aus, dass diese Protein-Protein-Wechselwirkung zum mitochondrialen Import von p66shc beiträgt [169]. Auch der Pin1-Inhibitor Juglon reduziert die mitochondriale Translokation von p66shc in HUVECs [171] und Darmzellen [172]. Bezüglich des Mechanismus des mitochondrialen Imports von p66shc wird postuliert, dass S36-phosphoryliertes p66shc durch Pin1 erkannt wird, was zu einer Isomerisierung von p66shc und anschließender Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) führt. Dadurch soll der Import in den mitochondrialen Intermembranraum ermöglicht werden [173] und tatsächlich ist gezeigt, dass mitochondriales p66shc dort in nicht-phosphorylierter Form vorliegt [158].

Während es weitgehend akzeptiert ist, dass die PKC  $\beta$  die S36-Phosphorylierung von p66shc reguliert [169], gibt es auch Hinweise, dass p66shc an S36 auch durch JNK1/2 und ERK

phosphoryliert werden kann [174, 175]. Studien zeigen, dass bspw. oxidativer Stress die PKC  $\beta$  aktiviert [176], während UV-Strahlung die S36-Phosphorylierung von p66shc durch JNK induziert [177]. Darüber hinaus ist auch beschrieben, dass p38 MAP-Kinasen die p66shc-Stabilität durch Phosphorylierung an Serin 54 und Threonin 386 stromabwärts von Rac1-induziertem oxidativen Stress regulieren [178]. Auch Wnt3a, ein Mitglied des Wnt-Signalwegs, induziert die Phosphorylierung von p66shc an S36 in Endothelzellen [179].

#### 1.6.4.1 *p66shc* und ROS

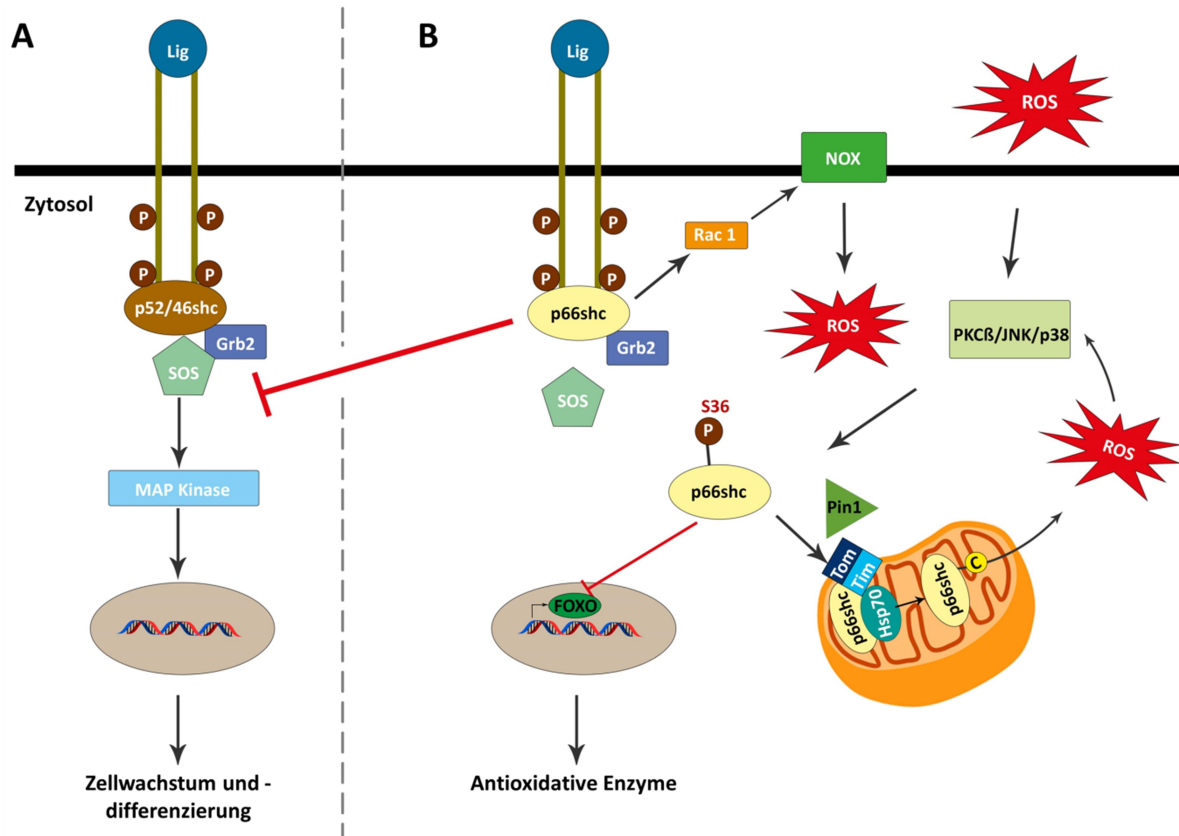
p66shc wird wie p46shc/p52shc von Rezeptor-Tyrosinkinase (z.B. EGF-Rezeptor; EGFR) an Tyrosinresten innerhalb der CH1-Domäne phosphoryliert. Eine solche Phosphorylierung induziert die Bildung eines Komplexes zwischen dem Adaptorprotein Grb2 und Nukleotidaustauschfaktor *Son of Sevenless* (SOS). Es kommt allerdings nicht wie bei p46shc und p52shc zur Aktivierung des MAPK-Wegs [146], welcher an der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung beteiligt ist (Abbildung 8A). Vielmehr konkurriert p66shc mit p52shc um die Bindung mit Grb2 [180] und verdrängt dadurch SOS aus dem Komplex mit Grb2 [181, 182]. Dadurch besitzt p66shc eine anti-mitogene Wirkung und vermittelt als Gegenspieler zu p46shc/p52shc die Zellalterung (Abbildung 8B). Der Verlust von p66shc führt zu einer dauerhaften Aktivierung von Rattensarkomvirus (Ras)-Proteinen und einer unkontrollierten Zellproliferation, welche beispielsweise für die Entstehung von Lungenkrebs und Metastasen verantwortlich gemacht wird [183].

p66shc wird darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären ROS-Konzentration sowie der durch oxidativen Stress vermittelten Apoptose zugeschrieben [166]. Hierbei gibt es drei Mechanismen, über die p66shc die zelluläre ROS-Konzentration reguliert: (1) durch die Aktivierung membrangebundener NOX, (2) der verminderten Synthese antioxidativer Enzyme und (3) der Erzeugung von ROS in den Mitochondrien.

p66shc kann durch die Ausübung seiner Funktion als Adaptorprotein oxidativen Stress in der Zelle auslösen [173]. Die Verdrängung von SOS aus dem Komplex mit Grb2 kann zu einer SOS-abhängigen Aktivierung der kleinen GTPase *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac-1) führen, welche daraufhin die Aktivierung membrangebundener NOX und die Produktion von ROS fördert [181]. In Makrophagen, in denen NOX die Hauptquelle für ROS ist, hemmt die Deletion des p66shc-Gens die Bildung des aktiven NOX-Komplexes, was in einer 40 %igen Abnahme der ROS-Bildung resultiert [173].

Oxidativer Stress induziert die Phosphorylierung der Serin/Threonin Protein-Kinase Akt, welche wiederum den *Forkhead*-Typ TF Foxo-3a durch Phosphorylierung inaktiviert. Dies erfordert die Anwesenheit und Phosphorylierung von p66shc an S36 in der Zelle [184, 185]. Die p66shc-vermittelte verringerte Aktivität von Foxo-3a führt dann zu einer verminderten Expression von antioxidativen Enzymen wie GPX [186]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass p66shc im Komplex mit *p21-activated kinase (PAK)-interacting exchange factor  $\beta$*  ( $\beta$ Pix), einem Nukleotidaustauschfaktor für die kleinen G-Proteine Rac-1 und *cell division cycle 42* (Cdc42), eine Akt-unabhängige Phosphorylierung und Inaktivierung von Foxo3a verursachen kann [187]. Allerdings gibt es auch Publikationen, in denen argumentiert wird, dass p66shc keinen Einfluss auf die Protein-Expression antioxidativer Enzyme hat [158, 167, 188, 189].

Schließlich wird p66shc als Redoxenzym beschrieben, dass die mitochondriale ROS-Produktion reguliert [190]. Für die Ausübung seiner oxidativen Funktion muss p66shc allerdings in den mitochondrialen Intermembranraum translozieren, wo es direkt mit Cytochrom c interagiert und dieses oxidiert, was zur Sauerstoffreduktion und zur Bildung von  $H_2O_2$  führt [158]. Die Zugabe von rekombinantem p66shc zu isolierten Mitochondrien führt zur Bildung von ROS, der Öffnung der mPTP, zum Anschwellen der Mitochondrien und schließlich zum Zelltod [158].



**Abbildung 8: Signalwege von p52/p46shc und p66shc.** (A) Nach Liganden (Lig)-Stimulation werden die Shc-Proteine durch die zytosolische Tyrosinkinase phosphoryliert (P) und damit rekrutiert, um einen Komplex mit Grb2 und SOS zu bilden, der anschließend den MAP-Kinase-Signalweg aktiviert. (B) Durch die Beteiligung von p66shc an der Komplexbildung kommt es zur Zellalterung anstelle von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. p66shc reguliert die zelluläre ROS-Konzentration durch die Aktivierung membrangebundener NOX, der verminderten Synthese antioxidativer Enzyme und der Erzeugung von ROS in den Mitochondrien (modifiziert nach [164]).

### 1.6.5 Bedeutung von p66shc für die Hypertrophie des Herzens

p66shc wird, wie viele andere Signalproteine, die mit der Entwicklung herunterreguliert werden, während einer kardialen Hypertrophie reexprimiert [191]. Das Pasteurella multocida Toxin (PMT), ein direkter Aktivator der endogenen Gαq-Untereinheit, die die Hypertrophie in Kardiomyozyten durch einen PKC- und ERK-abhängigen Signalweg fördert [192], induziert eine signifikante Erhöhung der p66shc-Expression, ERK-Aktivierung und p66shc-S36-Phosphorylierung in Kardiomyozyten [193]. Auch Thrombin, ein Aktivator von Signalwegen die für das Wachstum und Überleben von Kardiomyozyten sowie für den Umbau der extrazellulären Matrix relevant sind, erhöht die S36-Phosphorylierung von p66shc in kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten [193]. Die *in vitro* Behandlung mit Ang II induziert Apoptose in Kardiomyozyten, die aus Wildtyp, nicht aber aus p66shc *knockout* Mausherzen isoliert wurden [194]. In Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen führt

eine nicht Blutdruck-steigernde Konzentration von Ang II zur LV-Hypertrophie (LVH) und Apoptose in Kardiomyozyten und Endothelzellen in Wildtyp -, nicht aber in p66shc *knockout* Mäusen [194]. In einem Hundemodell, in dem eine LV-Dysfunktion durch Steigerung der Herzfrequenz mittels Schrittmacher induziert wird, steigt die Expression von p66shc in den Kardiomyozyten mit der Stimulationsdauer an und ist mit Apoptose und Herzversagen assoziiert [195]. Darüber hinaus demonstriert eine aktuelle Studie, dass p66shc an der Regulation der kardialen Dysfunktion und der Entstehung von oxidativem Stress im Mausmodell der LV-Hypertrophie und -Insuffizienz durch Druck nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) beteiligt ist [196]. Alle genannten Studien stammen von Tiermodellen der LVH. Zu einer Beteiligung von p66shc an der Entwicklung der RVH gibt es bislang keine Daten. Die Erkenntnisse über die Rolle von p66shc bei der Entstehung der LVH lassen sich jedoch aufgrund der zahlreichen Unterschiede zwischen den beiden Ventrikeln nicht ohne weiteres auf den RV übertragen.

#### 1.6.6 Zielsetzung 2

Bei der kardialen Hypertrophie kommt es beim Übergang von Kompensation zur Dekompensation zu einer massiv gesteigerten Produktion von ROS. Dies ist im LV mit der Aktivierung von p66shc assoziiert, welches wiederum nach Translokation in die Mitochondrien zur weiteren Produktion von ROS beitragen kann.

Ziel des zweiten Projekts ist es, die Relevanz von p66shc bei der Entstehung und Progression der RVH zu untersuchen. Als Modell wird das Pulmonalarterien *Banding* (PAB) gewählt, welches durch Anbringen eines Titan-Clips an die Pulmonalarterie eine selektive Druckbelastung des RV induziert. Um die Rolle von p66shc untersuchen zu können, sollen p66shc *knockout* Mäuse sowie C57BL/6 Mäuse als Wildtyp Kontrollen einer PAB- bzw. einer Scheinoperation unterzogen werden. Anschließend sollen hämodynamische und funktionelle Parameter des RV bestimmt sowie die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten und die Produktion von mitochondrialen ROS ermittelt werden.

## 2. Material

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 10x	Sigma-Aldrich, Heidenheim, Deutschland
Greiner <i>Microplate</i> 96-Well, U-Shape	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
96F Nunclon Delta White Microwell	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Automatische Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
BD Microlance™ 3 Kanülen: 27 G ¾, 0.40 x 19 mm, grau; 20 G 1½, 0.9 x 40 mm, gelb; 26 G 1½, 0.45 x 13 mm, braun; 25 G 1, 0,5 x 25 mm, orange; 30 G ½, 0.30 x 13 mm, gelb	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Blotting grade blocker non-fat dry milk</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
Saugpapier für Western Blot	Biotec Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland
Cellstar Pipetten (5 ml, 10 ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
<i>Chemiluminescent substrate Pico und Femto</i>	Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Cryo Pure Gefäße, 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Dexpanthenol Augensalbe	Bayer AG Leverkusen, Deutschland
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co, Ltd, Osaka, Japan
Einmalspritzen Inject Luer®, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen, AG Melsungen, Deutschland
Einmalzellkulturschalen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen mit konischem oder rundem Boden	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland oder Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius Group, Göttingen, Deutschland
Medizinisches Klebeband	3M Deutschland GmbH Neuss, Deutschland
Mikro-Nadelhalter, gerade, w/Lock 9 cm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
NuPAGE® Novex® 10 % Bis-Tris Protein Gele, 1.0 mm	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pinzetten: Moria MC31 Forceps gebogen; Graefe - 0.8 mm, gebogen und gerade	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Prolene 6-0, steriles, monofiles, nicht resorbierbares, chirurgisches Nahtmaterial	Ethicon, Lidingö, Schweden
Protran® Nitrocellulose Transfermembran (0,2 µm)	Whatman, GE Healthcare, Deutschland
Reaktionsgefäße <i>safe seal</i>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rundbodenröhrchen, 14 ml	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Seraflex Nahtmaterial	Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila
Teflongefäß	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tupfer	Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Vasofix® Safety 14 Gx2", 2.2x50 mm, Brauntüle, 20 Gx1¼", 1.1x33 mm Brauntüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
WECK Hemoclip® <i>small titanium ligating clips</i>	Edward Weck, Research, Triangle Park, NC, USA
Zentrifugenröhrchen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

## 2.2 Chemikalien, gebrauchsfertige Lösungen und Kits

Chemikalie	Firma
1 x PhosphoStop	Roche, Basel, Schweiz
20 x XT <i>Reducing Agent</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
2-Mercaptoethanol	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
4 x XT <i>Sample Buffer</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
Adenosindiphosphat (ADP)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Amplex Ultra Red <i>reagent</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Ascorbat	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenyl-hydrazone (FCCP)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>Complete</i> Inhibitoren	Roche, Basel, Schweiz
Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G-250	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DC Protein Assay (Lowry)	Bio-Rad, München, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
GKT136901	Institut für Organische Chemie, Universität Leipzig, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Callbiochem, La Jolla, CA, USA
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Malat	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> , HRP)	Roche Diagnostics, Grenzach, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mitochondrienisolierungskit	Miltenyi Biotec B.V. Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-1,4-phenylendiamin (TMPD)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE® Transfer Buffer (20 X)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20 X)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Perchloressigsäure (HClO <sub>4</sub> ) (20 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Percoll	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland
Ponceau S Lösung	Serva, Heidelberg, Deutschland
<i>Precision Plus Protein Dual Color</i> Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
<i>Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Rotenon	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Sucrose	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Tris-Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland t
VAS2870	Vasopharm GmbH, Würzburg, Deutschland
Wasserstoffchlorid (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 2.3 Injektionslösungen/Gase

Substanz	Firma
Buprenorphin	Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
Isofluran	Forene® Abbott, Wiesbach, Deutschland
Physiologische Kochsalzlösung	DeltaSelect GmbH, Dreieich, Deutschland
Ventilationsgas 50 % O <sub>2</sub> , 50 %N <sub>2</sub> ,	Air Liquid, Siegen, Deutschland
Ventilationsgas, 100 % O <sub>2</sub> ,	Air Liquid, Siegen, Deutschland

## 2.4 Geräte

### 2.4.1 Allgemein verwendete Geräte

Gerätename	Firma
AB104 (Feinwaage)	Mettler Toledo GmbH, Gießen
ABS	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Bauchdeckenschere gebogen, 160 mm	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Exsikkator	Duran Group, Wertheim, Deutschland
Gefäßclip nach Biemer, Maulöffnung 5 mm	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Grill-Arruga-Kolibri Kapselpinzette	Eickenmeyer, Tuttlingen, Deutschland
Hamilton® Microliter™, 25 µl Spritze	Hamilton Germany GmbH, Planegg-Martinried, Deutschland
HeraSafe Sterilbank	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Krokodilklemme	Eickenmeyer, Tuttlingen, Deutschland
M60 Stereomikroskop	Leica, Frankfurt a.M., Deutschland
PB3001 (Waage)	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
pH 211R Microprosser pH metern	Hanna Instruments, Vöhringen, Deutschland
Pinzette, Semken, gebogen, 1,3 x 1 mm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen, blau, gelb, weiß	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Präparierschere klein und groß, 170 mm	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Schere	Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen, Deutschland
Schere, klein, spitz, gerade , 9,5 cm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Springschere, 8mm Schneidekante	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Student Vannas Spring Schere, 5 mm Schneidekante	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

### 2.4.2 Isolierung von Mitochondrien

Gerät	Firma
Allegra™ 64R Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Centrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heraeus Biofuge Primo R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
IKA® T25 digital Ultra-Turrax (Dispergiergerät)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Microfuge® 18 Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Optima™ MAX Ultracentrifuge 130,000 RPM	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Potter-Elvehjem tissue homogenizer (1 ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Potter-Elvehjem tissue homogenizer (5 ml)	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland

### 2.4.3 Proteinbestimmung

Gerät	Hersteller
Infinite® M200 Pro Multimode Microplate reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz

### 2.4.4 Mitochondrienfunktion

Geräte	Hersteller
Cary Eclipse Spektrophotometer	Agilent, Santa Clara, USA
Mini-Vac eco	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Mitocell MT200 Respirationskammer	Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Schottland
MS200/ Ms200A System	Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Schottland
Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ	Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Schottland
Wasserbad und Pumpe	Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Würth, Deutschland

### 2.4.5 Western Blot Analysen

Gerät	Firma
Biometra™ Taumelschüttler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
ChemiSMART	Peqlab Technologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Digital sonifier 450 D Branson	Emerson Technologies, Dietzenbach, Deutschland
Dri-Block® Heater DB-2D	Techne Inc, Burlington Township, USA
Electrophoresis power supply – EPS 601	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Homogeniser ROTILABO für 1,5 ml Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe, Deutschland
X Cell Blot Module	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
X Cell SureLock Novex mini-Cell Electrophoresis System	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

### 2.4.6 Isolierung, Kultivierung und Kontraktionsmessungen von Kardiomyozyten

Gerät	Hersteller
Allegra 21 Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Aqualine AL 18 Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland

Büchnertrichter	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
C6 Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Kanüle (iØ 1,8 mm)	Eigenbau des Physiologischen Instituts, JLU Gießen
Mc Ilwain tissue chopper	Cavey laboratory Engineering Co.Ltd., Goomshall
Nylongaze Polyamid monofil (Maschenweite 200 µm)	Neolab, Berlin, Deutschland
Perfusionsanlage (Apparatur nach Langendorff)	Eigenkonstruktion des Physiologischen Instituts, JLU Gießen
Peristaltikpumpe	Ismatec, Grevenbroich, Deutschland
Plastikscheibe	Cavey laboratory Engineering Co.Ltd., Goomshall, UK
Silikonringe flexiPERM (iØ 1,5 cm.)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Interface INT4	SI Heidelberg, Deutschland
Mikroskop	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Oszilloskop OS 90204 20 MHz	GoldStar, Korea, Japan
Philips Observation Monitor	Philips, Hamburg, Deutschland
Stimulator T	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Videokamera	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Zeilenkamera	Scientific Instruments GmbH, Gilching

#### 2.4.7 Pulmonalarterien Banding, Echokardiographie, Hämodynamik

Gerät	Hersteller
1.4F Mikronanometer Druckkatheter	Millar Instruments, Houston, USA
Heizplatte	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Heizplatte ML295/M-220	AD Instruments, Spechbach, Deutschland
Kaltlichtlampe KL-200	Fiber Optics Schott, Mainz, Deutschland
Leica M50 Operationsmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mini Vent Type 845	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatur GmbH, March, Deutschland
MPVS-Ultra Single Segment Foundation System	AD Instruments, Spechbach, Deutschland
Rektalthermometer	AD Instruments, Spechbach, Deutschland
Schwebekörper Durchflussmesser PMR1-012148	Aalborg Instruments & Controls, Inc., Orangeburg, USA
Table Top Laboratory Animal Anesthesia System	VetEquip Inc, Pleasanton, USA
Vevo2100 High-Resolution Imaging System mit 30 MHz Schallkopf	VisualSonics, Toronto, Kanada

## 2.5 Computerprogramme

Gerät	Hersteller
MUCELL	Scientific Instruments GmbH Gilching
Strathkelvin 782 Firmware	Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Schottland
PowerLab Data Aquisitions Systems	VisualSonics, Toronto, Kanada
Labchart 7 MPVS-Ultra Single Segment Foundation System	AD Instruments, Spechbach, Deutschland

ChemiCapt 5000	Vilber Lourmant Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
SigmaStat 3.5	Systat, Software GmbH, Erkrath, Deutschland

## 2.6 Puffer und Medien

### 2.6.1 Isolierung von Mitochondrien

Puffer	Zusammensetzung
Homogenisationspuffer	100 mM KCl; 50 mM MOPS; 5 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1 mM EGTA; mit 1 M Tris pH auf 7,4 einstellen
Puffer A	Homogenisationspuffer + 1 mM ATP
Puffer B	0,04 % BSA in Puffer A
Mitoisolierungspuffer	250 mM Sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, mit Tris pH auf 7,4 einstellen
30 %ige Percoll-Lösung	30 % Percoll (steril filtriert) in Mitoisolierungspuffer

### 2.6.2 Respirations- und ROS-Messungen

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Elektrolytlösung	300 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 200 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 140 mM KCl; AgCl gesättigt; 0,1 % NaN <sub>3</sub>
Glutamat/Malat Inkubationspuffer	125 mM KCl; 10 mM Tris-MOPS; 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 µM EGTA; 5 mM Glutamat; 2,5 mM Malat; mit 0,5 M Tris pH auf 7,4 einstellen
Succinat Inkubationspuffer	125 mM KCl; 10 mM Tris-MOPS; 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 µM EGTA; 5 mM Succinat; mit 0,5 M Tris pH auf 7,4 einstellen
HRP Working Solution	5 µl HRP (500 U/ ml in 1 x PBS) + 45 µl Glutamat/Malat Inkubationspuffer (50 U/ ml)
Amplex Ultra Red Working Solution	970 µl Glutamat/Malat Inkubationspuffer + 20 µl HRP Working Solution + 10 µl Amplex Ultra Red reagent (1 mg in 60 µl DMSO)

### 2.6.3 Herstellung von Proteinextrakten

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Lämmli-Auftragungspuffer (4 x)	250 mM Tris-HCl pH 6,8; 8 % SDS; 20 % 2-Mercaptoethanol; 40 % Glycerol; 0,002 % Bromphenol Blau
Lämmli-Auftragungspuffer (4 x) farblos	250 mM Tris-HCl pH 6,8; 8 % SDS; 20 % 2-Mercaptoethanol; 40 % Glycerol
Zaman & Verwilghen BSA-Standard	0-1,4 mg/ ml BSA gelöst in farblosem 1 x Lämmli
Zaman & Verwilghen Färbelösung	0,05 % Coomassie Brilliant Blue Lösung; 0,5 M HClO <sub>4</sub>
Zaman & Verwilghen Kalium-Phosphat-Puffer	100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH auf 7,4 einstellen
1 x Zelllysepuffer	25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 5 % Glycerol, pH 7 + 1 x PhosStop und Complete Inhibitoren

### 2.6.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli und Western Blot Analysen

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Ladepuffer	1 x XT <i>Sample Buffer</i> , 1 x XT <i>Reducing Agent</i>
1 x MOPS Laufpuffer	20 x NuPage MOPS Puffer in ddH <sub>2</sub> O
Blocking Lösung/ Milch	5 % (w/v) <i>blotting grade blocker non-fat dry milk</i> in TBST-Puffer
TBS	10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6
TBST	0,1 % Tween-20 in TBS
NuPAGE Transferpuffer	1 x NuPage, 20 % (v/v) Methanol

### 2.6.5 Isolierung und Kultivierung adulter rechtsventrikulärer Kardiomyozyten

Puffer	Zusammensetzung
Powell- Medium	110 mM NaCl, 2,5 mM KCl; 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 25 mM HEPES, 10 mM Glukose Monohydrat D <sup>+</sup> , gelöst in ddH <sub>2</sub> O, pH auf 7,4 eingestellt, steril filtriert
Creatin-Carnitin-Taurin Medium (CCT)	9,8 g/l Medium M199 with Earle's salts, 15 mM HEPES, 5 mM Creatin, 2 mM Carnitin, 5 mM Taurin, 10 µM Cytosin-Arabinofuranosid, gelöst in ddH <sub>2</sub> O, pH auf 7,4 eingestellt, steril filtriert
Vorplattiermedium	CTT Medium mit 2 % Penicillin/Streptomycin und 10 µl/ml Laminin, pH 7,4
Zellkulturmedium	2,5 mM CaCl <sub>2</sub> · x 2 H <sub>2</sub> O, 5 mM Glukose Monohydrat D <sup>+</sup> , 10 mM HEPES, 4,7 mM KCL, 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,8 mM MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 118 mM NaCl, 1,9 mM Natriumpyruvat, gelöst in ddH <sub>2</sub> O, pH auf 7,4 eingestellt, steril filtriert
Ausplattier- / Waschmedium	Zellkulturmedium mit 2 % Penicillin/Streptomycin, pH 7,4

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Calnexin	Kaninchen	1:1000 in 5 % Milch	Abcam, Cambridge, UK
GAPDH	Maus	1:2500 in 5 % Milch	Hyttest, Turku, Finnland
HDAC2	Kaninchen	1:1000 in 5 % Milch	Abcam, Cambridge, UK
MnSOD	Kaninchen	1:5000 in 5 % Milch	Upstate, Lake Placid, USA
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Maus	1:5000 in 5 % Milch	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
NADPH Oxidase 4 (NOX4)	Kaninchen	1: 500 in 5 % Milch	Kings College, London, UK
NADPH-Oxidase 4 (NOX4)	Kaninchen	1: 250 in 5 % Milch	Abcam, Cambridge, UK
p22phox	Kaninchen	1: 500 in 4 % BSA	Santa Cruz, Kalifornien, USA
SERCA2	Maus	1:1000 in 5 % Milch	Sigma-Aldrich, Heidenheim, Deutschland
SHC	Kaninchen	1:1000 in 4 % BSA	BD Biosciences

### 2.7.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Firma
Anti-Kaninchen IgG	1:5000-1:10000 in 5 % Milch	Cell Signaling Technology, ZA Leiden, Niederlande
Anti-Maus IgG	1:5000 in 5 % Milch	Cell Signaling Technology, ZA Leiden, Niederlande

## 2.8 Versuchstiere

Die Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen sowie die Haltung der Tiere erfolgte nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und den Richtlinien des *NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publikation Nr. 85-23, 1996) und waren vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Aktenzeichen: GI 20/1 Nr. 91/2017 and GI 20/10 Nr. 40/2011). Die Meldung über die geplante Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken erfolgte gemäß §4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes bei den Tierschutzbeauftragten der Justus-Liebig-Universität Gießen (Tiertötungsnummern: 467\_M, 461\_M und 488\_M). C57BL/6 Mäuse wurden von Janvier Lab (Frankreich) bezogen. Die NOX4 *knockout* (NOX4 KO) Mäuse wurden uns von unserem Kooperationspartner Harald H.H.W. Schmidt zur Verfügung gestellt (Abteilung Pharmakologie und personalisierte Medizin der Universität Maastricht, Niederlande) [197]. Die p66shc *knockout* (p66shc KO, im Folgenden abgekürzt als p66 KO) Tiere wurden von Marco Giorgio im Europäischen Institut für Onkologie in Mailand, Italien generiert [166]. Alle Tiere wurden im hauseigenen Tierstall in einem 12 Stunden Tag/ Nacht Rhythmus gehalten. Die Raumtemperatur (RT) von 21 °C sowie die Luftfeuchtigkeit waren konstant und die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Im Folgenden ist eine Übersicht über die in den Experimenten verwendeten Tiere dargestellt:

### 2.8.1 Teil 1: NOX4

Genotyp	Herkunft
C57BL/6 (WT)	Janvier SAS, CS 4105, Le Genest Saint Isle, F-53941 St Berthevin Cedex
NOX4 KO	Pharmakologie und personalisierte Medizin, Universität Maastricht, Niederlande
Wildtyp Wurfgeschwister (WT)	Pharmakologie und personalisierte Medizin, Universität Maastricht, Niederlande

### 2.8.2 Charakterisierung der NOX4 *knockout* Mauslinie

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete NOX4 KO-Mauslinie wurde von Kleinschnitz und Kollegen 2010 durch Deletion von Exon 14 und 15 generiert [197]. Dies führt zum Verlust der NADPH-Bindungsdomäne und folglich zu einem Aktivitätsverlust des Proteins, ohne die Aktivität oder Expression der anderen NOX-Isoformen zu beeinflussen [197]. Zudem führt der systemische *knockout* des NOX4-Proteins zu keinem abnormalen oder veränderten vaskulären Phänotyp. Sowohl systemischer als auch pulmonaler Blutdruck, Herzfrequenz sowie die Nierenfunktion unterscheiden sich nicht zwischen NOX4 KO- und WT-Mäusen.

Die Tiere haben zudem einen normalen zerebralen Blutfluss und auch die zerebralen Gefäße sowie die Hirnstruktur weisen keine Veränderungen im Vergleich zu WT-Tieren auf [197].

### 2.8.3 Teil 2: *p66shc*

Genotyp	Herkunft
C57BL/6 (WT)	Janvier SAS, CS 4105, Le Genest Saint Isle, F-53941 St Berthevin Cedex
p66 KO	Europäisches Institut für Onkologie (Mailand, Italien)

### 2.8.4 Charakterisierung der *p66shc* knockout Mauslinie

Migliaccio und Kollegen generierten 1999 durch die Deletion von Exon2a des *p66shc*-Gens eine *p66shc knockout* (p66 KO)-Mauslinie. Diese Mäuse entwickeln sich normal und der *knockout* zeigt keine Auswirkungen auf die Fertilität. Auch das Körpergewicht, die Nahrungsaufnahme und die Histologie verschiedener Organe sind zwischen p66 KO- und WT-Mäusen vergleichbar. Obwohl einige Lungenanomalien beobachtet werden, ist die Lungenfunktion nicht beeinträchtigt [166]. Die Analyse kardiovaskulärer Parameter zeigt keine Unterschiede zwischen WT- und p66 KO-Mäusen hinsichtlich systolischem Blutdruck, Herzfrequenz, rechts- und linksventrikulärem Gewicht und linksventrikulärer Wanddicke [194]. Dagegen weisen die p66 KO-Mäuse in der Kolonie des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität im Vergleich zu WT-Mäusen erhöhte enddiastolische und endsystolische Volumina auf, ohne jedoch das Schlag- und das Herzzeitvolumen zu beeinflussen [194]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen sind aus p66 KO-Herzen isolierte LV-Kardiomyozyten länger als isolierte WT-Kardiomyozyten, wobei die lastfreie Zellverkürzung vergleichbar ist zwischen den Genotypen [170]. *p66shc* wird auch eine Rolle bei der durch oxidativen Stress induzierten Alterung zugeschrieben, da p66 KO-Mäuse eine um 30 % verlängerte Lebensspanne und MEFs aus diesen Mäusen eine Resistenz gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und UV-Licht-induzierte Apoptose zeigen [166]. Dieser lebensverlängernde Effekt in p66 KO-Mäusen tritt jedoch nur unter Laborbedingungen auf. Unter natürlichen Haltungsbedingungen versterben die p66 KO-Mäuse sogar früher als WT-Tiere [198].

### 3. Methoden

#### 3.1 Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung

##### 3.1.1 Teil 1: NOX4

Für die Versuche der ersten Studie wurden männliche C57BL/6 WT-Mäuse sowie NOX4 KO-Mäuse und ihre WT-Wurfgeschwister im Alter von 8 Wochen und einem Gewicht von 25-30 g verwendet. Da in dieser Studie die funktionelle Relevanz und Lokalisation der NOX4 in Mitochondrien unter physiologischen Bedingungen untersucht wurde, wurden die Tiere vor Durchführung der Experimente keiner Behandlung unterzogen. Von diesen Tieren wurden Mitochondrien aus LV und Nieren isoliert und anschließend Funktionsmessungen (Respiration und ROS-Produktion) unter Einsatz von NOX-Inhibitoren oder proteinbiochemische Untersuchungen zur mitochondrialen Lokalisation von NOX4 durch Einsatz von spezifischen anti-NOX4-Antikörpern durchgeführt (Western Blot) (Tabelle 1).

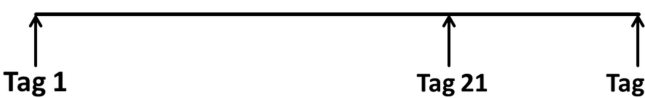
**Tabelle 1: Studiendesign NOX4-Projekt.** (I) Messungen des Sauerstoffverbrauchs von isolierten linksventrikulären Mitochondrien (LV-Mito) von C57BL/6 Mäusen (WT) zwecks Testung möglicher Eigeneffekte der NOX-Inhibitoren GKT136901 und VAS2870. Messungen der ROS-Produktion von GKT136901- oder VAS2870-behandelten Mitochondrien isoliert aus (II) LV von C57BL/6 (WT) sowie aus (III) LV und Nieren von NOX4 KO-Mäusen und WT-Wurfgeschwistern. (IV) Western Blot Analysen zwecks Ermittlung der NOX4-Proteinexpression in Gesamtextrakten, Mitochondrien sowie in Zytosol- und Membranfraktionen von NOX4 KO-Mäusen und WT-Wurfgeschwistern. n.b. = nicht bestimmt.

	NOX4	Genotyp	LV-Mito	Nieren-Mito	Messung	Inhibitor
I.	Funktion	C57BL/6 (WT)	n=5	n.b.	O <sub>2</sub> -Verbrauch	GKT136901 VAS2870
II.	Funktion	C57BL/6 (WT)	n=5	n.b.	ROS-Produktion	GKT136901 VAS2870
III.	Funktion	WT-Wurfgeschwister	n=5	n=5	ROS-Produktion	GKT136901 VAS 2870
		NOX4 KO	n=5	n=5	ROS-Produktion	GKT136901 VAS 2870
IV.	Lokalisation	WT-Wurfgeschwister	n=4	n=4	Western Blot	
		NOX4 KO	n=4	n=4		

##### 3.1.2 Teil 2: p66shc

Für den zweiten Teil dieser Arbeit wurden männliche p66 KO- und C57BL/6 WT-Mäuse in einem Alter von 15-43 Wochen und einem Gewicht von 25-30 g untersucht.

Das Studiendesign ist in Abbildung 9 dargestellt. Am Tag 1 wurden die Tiere einer PAB- oder einer Scheinoperation unterzogen. Drei Wochen nach der Operation wurden alle Tiere echokardiographisch untersucht (Tag 21). Am Tag 22 wurden die Tiere hämodynamisch untersucht mit anschließender Organentnahme zur Bestimmung der Herzgewichte. Alternativ erfolgte eine Organentnahme für die Isolierung von entweder RV-Kardiomyozyten oder RV-Mitochondrien.



Genotyp	PAB-OP/ Schein-OP		Messung	Messung
WT	n=4			Western Blot
p66 KO	n=4			
WT	n=4	n=6	Echo	ROS
p66 KO	n=5	n=5	Echo	
WT	n=4	n=4	Echo	KM-Funktion
p66 KO	n=4	n=4	Echo	
WT	n=7	n=6	Echo	Hämo/ Herzgewicht
p66 KO	n=9	n=6	Echo	

**Abbildung 9: Studiendesign p66shc-Projekt.** Die Bestätigung des Genotyps erfolgte in Proteinextrakten von p66 KO- und WT-LV mittels Western Blot Analysen. Insgesamt 35 WT- und 37 p66 KO-Mäuse wurden einer PAB- oder Scheinoperation (PAB-OP/Schein-OP) unterzogen (Tag 1). Nach drei Wochen (Tag 21) wurden alle Tiere echokardiographisch (Echo) untersucht. Am darauffolgenden Tag (Tag 22) wurden die Tiere entweder einer hämodynamischen Messung (Hämo) unterzogen mit anschließender Bestimmung des Herzgewichts oder es erfolgte die Herzentnahme zwecks Isolierung von RV-Kardiomyozyten (KM) oder RV-Mitochondrien mit anschließender Messung der KM-Funktion bzw. ROS-Produktion.

### 3.2 Pulmonalarterien *Banding* (PAB)-Modell

Das Pulmonalarterien *Banding* (PAB) ist ein Modell für die RVH. Bei diesem standardisierten Verfahren wird ein Ligaturclip (Hemoclip®) aus Titan um die Pulmonalarterie gelegt, wodurch ihr Lumen auf 0,3 mm verengt wird. Dies entspricht einem Stenosegrad von 65-70 % und das Herz muss dauerhaft gegen einen erhöhten Widerstand arbeiten. Die Durchführung der Operation erfolgte durch unsere Kooperationspartner vom *Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System* (ECCPS) der Justus-Liebig-Universität oder im Physiologischen Institut durch geschultes Personal.

Vor dem operativen Eingriff wurde jedes Tier gewogen und der Gesundheitszustand dokumentiert. Anschließend erfolgte die analgetische Versorgung aller Tiere mit

Buprenorphinhydrochlorid 0,1 mg/ kg) sowie die Narkoseeinleitung mit 3-4 % Isofluran in 100 %igem Sauerstoff mit einer Flussrate von 2 L/ min in einer Plexigaskammer. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurden die Tiere intubiert und über ein Beatmungsgerät mechanisch ventiliert. Die Beatmungseinstellungen (Tidalvolumen und Ventilationsrate) für die Mäuse wurden, abhängig vom Gewicht der Tiere, nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Tidalvolumen} = 0,0062 \times \text{Körpergewicht [kg]}^{1,01};$$

$$\text{Ventilationsrate} \left( \frac{\text{Atemzüge}}{\text{Minute}} \right) = 53,5 \times \text{Körpergewicht [kg]}^{-0,26}$$

Die Narkose wurde dabei mit einem 2 % Isofluran-/Sauerstoffgemisch aufrechterhalten. Der Eingriff fand unter einem Operationsmikroskop mit 8-facher Vergrößerung und einer Kaltlichtlampe statt. Um ein narkosebedingtes Auskühlen zu verhindern, wurden die Tiere während des Eingriffs auf eine Wärmeplatte gelegt, deren Temperatur auf 38 °C eingestellt war. Nach Fixation der Tiere mittels Klebestreifen wurde das Operationsareal rasiert und mit Braunoderm® desinfiziert. Um Zugang zum Thorax zu erlangen, wurde zunächst die Haut zwischen Sternum und Achselhöhle auf einer Länge von 5 mm durchtrennt und vom darunter liegenden Gewebe gelöst. Anschließend wurden die Muskelschichten auseinander geschoben und der zweite Interkostalraum mit einer Schere eröffnet. Mit Hilfe von Wundhaken wurde das Operationsareal offen gehalten. Das Perikard wurde daraufhin eröffnet, die Pulmonalarterie lokalisiert und vom umliegenden Bindegewebe befreit. Mit Hilfe einer speziellen, dafür vorgesehenen Zange wurde der Ligaturclip um die Pulmonalarterie gelegt. Anschließend wurde der Thorax mit 6-0 Polypropylene Nahtmaterial zwischen der ersten und zweiten Rippe wieder verschlossen, die Thoraxmuskeln zurückgeschoben und die Haut ebenfalls mit 6-0 Polypropylene vernäht. Anschließend wurde die Wunde mit Braunoderm® behandelt. Kontrolltiere wurden derselben Operation unterzogen, jedoch ohne Platzieren eines Ligaturclips und wurden deshalb als scheinoperierte (Schein-OP) Gruppe bezeichnet. Unmittelbar nach der Operation wurden 0,5 ml 37 °C warm Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht. Das Analgetikum Buprenorphinhydrochlorid (0,1 mg/ kg) wurde subkutan nach Aufwachen aus der Narkose und dann alle 8 h für die nächsten 48 h verabreicht. Sobald die Spontanatmung wieder einsetzte, wurden die Tiere extubiert, unter eine Wärmelampe gelegt und 6 h

beobachtet, um eine vollständige Erholung von der Narkose sicherzustellen. Die Mäuse wurden dann in einem Standard-Nagerkäfig mit freiem Zugang zu Futter und Wasser in einem Raum mit einer Temperatur von 25 °C untergebracht.

### 3.3 Echokardiographie

Im Verlauf der zweiten Studie wurde die Entwicklung einer RVH mittels Doppler-Echokardiographie untersucht. Dabei handelt es sich um ein nicht invasives bildgebendes Verfahren, welches die Untersuchung der Herzgröße und -funktion mittels Ultraschallwellen und folglich die Beurteilung der morphologischen und funktionellen Veränderungen des Herzens erlaubt. Die Durchführung der Echokardiographie erfolgte bei sämtlichen Tieren der zweiten Studie einundzwanzig Tage nach dem chirurgischen Eingriff. Die Durchführung der Echokardiographie erfolgte im ECCPS oder Physiologischen Institut durch geschultes Personal.

Vor Beginn der Echokardiographie wurden die Körpergewichte der Tiere ermittelt. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Plexiglaskammer mit 3-4 % Isofluran in 100 %igem Sauerstoff mit einer Flussrate von 2 L/ min. Anschließend wurden die Tiere vorsichtig in Rückenlage auf einer Wärmeplatte mit integrierten EKG-Elektrodenplättchen fixiert, sodass eine kontinuierliche Aufzeichnung der Herzfrequenz und des EKGs für die Dauer der Untersuchung erfolgen konnte. Die Narkose wurde über eine Beatmungsmaske für die Dauer der Untersuchung (2-3 % Isofluran gemischt mit 1 L/ min 100 % O<sub>2</sub>) aufrechterhalten. Die Wärmeplatte hielt die Körpertemperatur konstant bei 37 °C, indem die Körpertemperatur der Tiere mittels Rektalthermometer bestimmt und die Temperatur der Wärmeplatte automatisch angepasst wurde. Dadurch wurde ein narkosebedingtes Auskühlen der Tiere vermieden. Die Augen der Tiere wurden mit Dexpanthenol-Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Zur Verbesserung der Bildqualität wurde der Brustkorb und der kraniale Bauchbereich mit Hilfe von Enthaarungscreme enthaart und der Brustkorb mit vorgewärmtem Ultraschallgel bedeckt. Das Gel diente dabei als Schallfenster und als Abstandhalter zur optimalen Fokussierung. Anschließend wurden mittels Ultraschallgerät und 30 MHz Schallkopf folgende echokardiographischen Parameter bestimmt:

Dicke der rechtsventrikulären freien Wand (*right ventricular wall thickness, RVWT*)

Die Dicke der freien rechtsventrikulären Wand gibt Auskunft über den Grad der Hypertrophie und wird in Millimeter angegeben.

Rechtsventrikulärer innerer Durchmesser (RVID)

Der RVID wird definiert als maximaler Abstand zwischen der freien Wand des rechten Ventrikels und dem Septum. Dieser Parameter gibt Auskunft über den Grad der Dilatation des rechten Ventrikels und wird in Millimeter angegeben.

*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion (TAPSE)*

TAPSE erlaubt die quantitative Beurteilung der systolischen Funktion des rechten Ventrikels, indem die Auslenkung des Trikuspidalklappenannulus in der Enddiastole bis zur Endsystole in Millimeter gemessen wird.

Herzminutenvolumen (HMV oder *Cardiac Output, CO*)

Das Herzminutenvolumen gibt an, welches Blutvolumen innerhalb einer Minute über die Aorta in den Körperkreislauf gepumpt wird und lässt sich aus dem Schlagvolumen und der Herzfrequenz berechnen:

$HMV = \text{Herzfrequenz (HF)} \times \text{Schlagvolumen}$ . Das Schlagvolumen und die Herzfrequenz werden aus der Echokardiographie abgeschätzt. Dabei wird der Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstraktes (LVOT) im 2D-Bild gemessen und daraus die Aortenklappenöffnungsfläche mit Hilfe der Kreisfläche berechnet und mit der Umfahrung der *pulsed-wave* (PW)-Doppler-Kurve im LVOT, dem Integral der systolischen Strömungsgeschwindigkeit (Velocity Time Integral, VTI) sowie der Herzfrequenz multipliziert.  $HMV = \pi \times LVOT^2/4 \times VTI \times HF$ .

Wird der CO auf das Körpergewicht bezogen, kann der Herzindex (*Cardiac Index, CI*) anhand folgender Formel berechnet werden:  $CI = CO \div \text{Körpergewicht}$

Nach Abschluss der Bildgebung wurde die Anästhesie ausgeschaltet und die Tiere durften sich auf dem beheizten EKG-Pad erholen bevor sie in ihre Käfige zurückgebracht wurden. Alle echokardiographischen Parameter wurden offline mit der PowerLab Software berechnet.

### 3.4 Hämodynamische Messung

Die Erhebung hämodynamischer Parameter erfolgte mittels invasiver Katheterisierung und wurde im ECCPS von geschultem Personal durchgeführt. Vor Beginn der hämodynamischen Messung wurden die Körpergewichte der Tiere ermittelt. Die Anästhesie wurde in einer Plexiglaskammer mit 3-4 % Isofluran/Sauerstoffgemisch eingeleitet. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde durch kontinuierliche Inhalation eines 2 % Isofluran/ Sauerstoffgemischs gewährleistet. Die chirurgischen Eingriffe zur Katheterisierung wurden mit Hilfe eines chirurgischen Stereomikroskops bei 8-facher Vergrößerung durchgeführt. Zur Beleuchtung wurde eine Kaltlichtlampe verwendet. Nach der endotrachealen Intubation wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte in Rückenlage fixiert und an ein Beatmungsgerät angeschlossen. Über den gesamten Messzeitraum wurden die Körpertemperatur sowie die Herzfrequenz mittels EKG aufgezeichnet. Die Beatmungseinstellungen für die Mäuse wurden, abhängig vom Gewicht der Tiere, berechnet (siehe 3.2).

Zu Beginn wurde im rechten Halsbereich der Tiere die Jugularvene freipräpariert, durch die ein High-Fidelity 1,4F-Mikromanometerkatheter eingeführt und bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben wurde. Sobald der Katheter richtig positioniert war, was anhand der Druckkurven auf dem Monitor verifiziert werden konnte, wurde dieser in der entsprechenden Position fixiert. Im Anschluss an eine Äquilibrationsphase erfolgte die Aufzeichnung der Druckkurven. Nach Abschluss der Aufzeichnungen wurde der Katheter vorsichtig entfernt und die Vene abgebunden, um Blutungen zu verhindern. Im Anschluss wurde der systemische Blutdruck in ähnlicher Weise in der rechten Karotisarterie gemessen. Die Daten wurden mittels des PowerLab Data Aquisitions Systems und der Labchart 7 Software gesammelt und ausgewertet. Folgende Parameter wurden im Verlauf der Messung erfasst:

#### Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP)

Der RVSP ist definiert als der größte gemessene Druck innerhalb des rechten Ventrikels über den Zeitraum der Systole. Dieser Parameter gibt somit Aufschluss über die systolische Funktion des rechten Ventrikels.

### Systolischer arterieller Druck

Die Messung in der Arteria carotis dient dazu, eventuelle Einflüsse der Ligatur auf die systemische Zirkulation zu erfassen.

### Herzfrequenz

Die Herzfrequenz, welche die Herzschläge pro Minute angibt, wird mit Hilfe des angelegten EKG bestimmt.

## **3.5 Bestimmung der Herzgewichte**

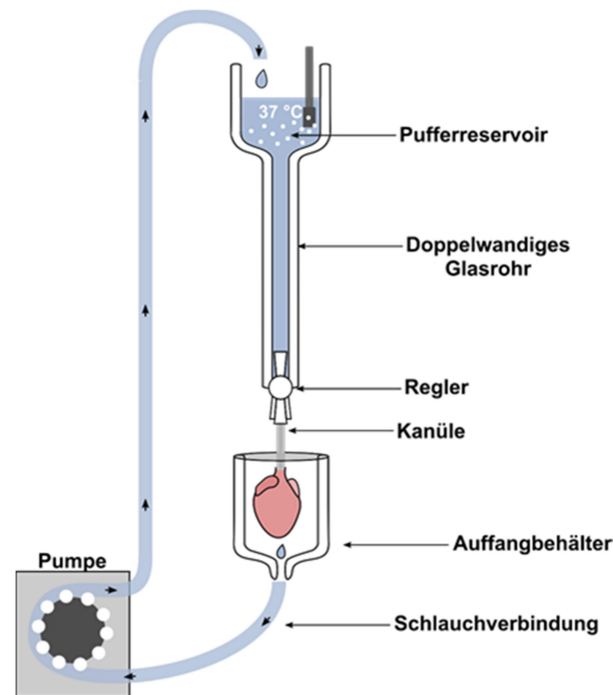
Nach Abschluss der hämodynamischen Messungen wurde die Narkose auf 5 % Isofluran eingestellt und die Mäuse durch Ausbluten schmerzfrei getötet. Die Herzen wurden vom umliegenden Gewebe abgetrennt und aus dem Thorax entnommen. Nach Entfernen der beiden Vorhöfe sowie der großen Gefäße wurde der rechte Ventrikel entlang des Septums vom linken Ventrikel getrennt. Die Proben wurden in PBS gespült, um Rückstände von koaguliertem Blut zu entfernen. Anschließend wurden die rechten Ventrikel (RV) und die linken Ventrikel inklusive Septum (LV+S) separat auf einer Analysewaage gewogen. Dadurch konnte das Verhältnis von RV/ LV+S (*Heart Ratio*) ermittelt und Rückschlüsse auf den Hypertrophie-Grad des rechten Ventrikels gezogen werden.

## **3.6 Isolierung adulter rechtsventrikulärer Kardiomyozyten**

Die im Folgenden beschriebene Methode zur Isolierung adulter Kardiomyozyten wurde erstmals von Piper (1982) etabliert und von Nippert et al. (2017) modifiziert [199, 200]. Die Isolierung und Kultivierung rechtsventrikulärer Kardiomyozyten erfolgte durch geschultes Personal der Arbeitsgruppe von Prof. Schlüter.

Zur Gewinnung isolierter Kardiomyozyten wurde das Herz mit Kollagenase-haltigem Medium perfundiert. Die Perfusionsanlage nach Langendorff (Abbildung 10) bestand aus einem ca. 1 m langen, doppelwandigen Glasrohr. Das Perfusionsmedium im Inneren wurde über das im Glasmantel zirkulierende Wasser auf 37 °C temperiert. Eine am unteren Ende des Glasrohrs befindliche Kanüle ermöglichte die retrograde Perfusion des Herzens über die Aorta. Unterhalb des Glasrohrs konnte das austretende Perfusat durch einen beweglichen Auffangbehälter aufgefangen und über eine

Peristaltikpumpe zum Glasrichter am oberen Ende des Glasrohrs befördert werden. So konnte der Perfusionskreislauf geschlossen werden. Zu Beginn jeder Präparation wurde die Anlage mit ddH<sub>2</sub>O und dann mit dem Perfusionsmedium (Powell-Medium) gespült. Anschließend wurde der Regelhahn der Kanüle geschlossen und die Anlage mit 45 ml Powell-Medium luftblasenfrei befüllt.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Perfusionsanlage nach Langendorff zur Isolierung adulter Maus Kardiomyozyten.** Die Anlage besteht aus einem doppelwandigen Glasrohr, welches das Perfusionsmedium im Inneren auf 37 °C temperiert. Das Herz wird über die Aorta mit Hilfe einer Kanüle am unteren Ende der Anlage retrograd perfundiert. Darunter befindet sich ein Auffangbehälter, woraus das aus dem Herz austretende Perfusat mit Hilfe einer Peristaltikpumpe zum Glasrichter am oberen Ende des Glasrohrs transportiert wird. Die Tropfgeschwindigkeit wird mit Hilfe des Reglers auf ca. 1 Tropfen/Sekunde eingestellt.

Die Gewinnung von rechtsventrikulären Kardiomyozyten erfolgte aus adulten C57BL/6 oder p66 KO-Mäusen, drei Wochen nachdem diese einer PAB- oder Scheinoperation unterzogen wurden. Die Tiere wurden mittels einer Inhalationsnarkose mit 5 % Isofluran in einem Exsikkator anästhesiert, bis keine Stellreflexe mehr vorhanden waren. Anschließend erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Die Bauchhöhle wurde geöffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Lunge, Herz und Thymus wurden mittels einer Kapselpinzette und einer Schere gemeinsam aus der Brusthöhle gelöst und in 4 °C kalte Kochsalzlösung (0,9 %) überführt. Die Lungenflügel sowie Thymus und anhängendes Bindegewebe wurden entfernt, sodass die Aorta vor dem ersten Abgang im Aortenbogen (*Truncus brachiocephalicus*) eingekürzt und auf die Kanüle der Perfusionsanlage (Innendurchmesser 1 mm) gestülpt werden konnte.

Daraufhin wurde die Aorta an der Kanüle zuerst mittels einer Krokodilklemme und dann mit Hilfe eines speziellen Fadens (Seraflex) fixiert. Diese Schritte erfolgten alle unter Verwendung eines Stereomikroskops.

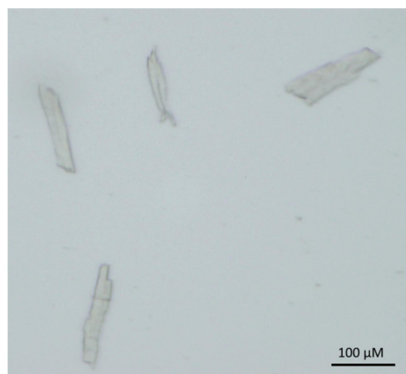
Die Perfusion erfolgte zu Beginn bei offenem Perfusionskreislauf, bis etwa 5 ml des Powell- Mediums das Herz passiert hatten und so mögliche Blutreste weitestgehend entfernt wurden. In dieser Zeit wurden 20 mg Kollagenase (Kollagenase Typ 2, 265 U/ mg) in 5 ml vorgewärmten Powell-Medium gelöst sowie 12,5 µl einer 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben. Der Perfusionskreislauf wurde geschlossen und die Perfusionsgeschwindigkeit wurde auf ca. 1 Tropfen/ Sekunde eingestellt. Über eine Peristaltikpumpe wurde eine konstante Flussrate ermöglicht. Die Kollagenaselösung wurde dem Pufferreservoir zugeführt und das Herz für 25 min enzymatisch verdaut (Perfusionsvolumen 45 ml). Das digestierte Herz wurde anschließend unterhalb der Vorhöfe mit einer Schere von der Kanüle abgetrennt und in ein Uhrglasschälchen überführt. Der rechte Ventrikel wurde vom linken Ventrikel und Septum getrennt und auf die Plastikscheibe eines Gewebsschneiders gegeben. Die Zerkleinerung mittels Gewebsschneider erfolgte sowohl in Längs- als auch in Querrichtung mit einer Schnittbreite von 0,7 mm sowie anschließend manuell mit Hilfe zweier Skalpelle. Im Folgenden wurden 5 ml des Kollagenase-haltigen Perfusionsmediums mit einem 50 ml Zentrifugationsgefäß aufgefangen und die Gewebesuspension darin in einem Wasserbad bei 37 °C für 5 min nachverdaut. Um grobe Gewebereste zu entfernen, wurde die Suspension anschließend durch eine Nylongaze (Porengröße: 200 µm) gefiltert. In der nachfolgenden Zentrifugation bei RT und 400 rpm wurde ein Großteil der Kardiomyozyten von den Geweberesten sowie Fibroblasten und Endothelzellen getrennt.

Um die Kardiomyozyten wieder an physiologische Kalziumkonzentrationen zu gewöhnen, wurde der Überstand entfernt und das Zellsediment zunächst vorsichtig in 2 ml des erwärmten und mit Carbogen-begasteten Powell-Mediums, dem 125 µM CaCl<sub>2</sub> zugefügt wurden, gelöst und für 1 min bei 400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und durch 2 ml des nun mit 250 µM CaCl<sub>2</sub> angereicherten Powell-Mediums ersetzt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 300 rpm wurde das Sediment in 2 ml einer diesmal 500 µM CaCl<sub>2</sub>-Powell-Lösung gelöst. Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 300 rpm wurde das Sediment in einem letzten Schritt in 1 ml einer 1 mM

CaCl<sub>2</sub>-Powell-Lösung und ein letztes Mal für 1 min bei 300 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden die sedimentierten Kardiomyozyten in warmes Ausplattiermedium überführt.

### 3.7 Kultivierung adulter Kardiomyozyten

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle folgenden Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt. Am Vortag wurden die Zellkulturschalen mit 1 % Laminin vorinkubiert, um ein Anheften der isolierten Kardiomyozyten zu ermöglichen. Dazu wurden pro Schale 1 ml des Vorplattiermediums gegeben und bei 37°C im Brutschrank inkubiert (Wasserdampf 95 %). RV-Kardiomyozyten wurden auf 4 Schalen verteilt. Hierbei wurde zusätzlich ein Silikonring (Innendurchmesser 1,5 cm) in die Mitte der Schale gesetzt, um die Fläche zu verringern und somit eine größere Zelldichte pro Fläche zu ermöglichen. Wie in Abbildung 11 exemplarisch gezeigt, wurde die Qualität der Präparation mit Hilfe eines Lichtmikroskops beurteilt, wobei überwiegend (ca. 65 %) stäbchenförmige Herzmuskelzellen zu finden sein mussten.



**Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen frisch isolierter Kardiomyozyten aus einem rechten Ventrikel der Maus.** Nach der Isolierung befinden sich überwiegend stäbchenförmige Kardiomyozyten auf der Zellkulturschale. 200-fache Vergrößerung.

### 3.8 Messung der Kardiomyozytenkontraktion im elektrischen Feld

Um die funktionelle Bedeutung von p66shc für das Kontraktionsverhalten von Herzmuskelzellen nach einer chronischen Druckbelastung zu untersuchen, wurde die lastfreie Zellverkürzung isolierter Kardiomyozyten drei Wochen nach einer PAB- oder Scheinoperation bestimmt. Bei dieser Methode wurden die Herzmuskelzellen elektrisch stimuliert und die daraus resultierende isotonische Kontraktion anhand des Hell-

Dunkel-Kontrasts der Zellmembran gemessen [201, 202]. Die Durchführung der Messungen erfolgte durch geschultes Personal aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schlüter.

Die Bestimmung der lastfreien Zellverkürzung erfolgte bei RT mit Hilfe eines Lichtmikroskops, dessen Objektisch mit einer Videokamera und einer Zeilenkamera ausgestattet war. Die Zeilenkamera registrierte die Zellgrenzen einer einzelnen Herzmuskelzelle anhand des Hell-Dunkel-Kontrasts, wenn diese durch Verschieben des Objektischs mit Hilfe der Videokamera genau in den Messbereich der Zeilenkamera positioniert wurde. Anschließend konnte mit dem Programm MUCCELL die Veränderung der Zelllänge während der Kontraktion und Relaxation, in Abhängigkeit der Zeit, mit einer Frequenz von 500 Hz aufgezeichnet werden. Die elektrische Stimulation erfolgte mit einer Frequenz von 2 Hz durch zwei parallel angebrachte Silberchlorid-Drähte, welche an den Deckel einer Kulturschale angebracht waren und direkt ins Zellkulturmedium ragten. Diese generierten zwei gegenläufige Rechteckspannungen von 20 mV für die Dauer von 0,5 ms. Die Kontraktion einer einzelnen Zelle wurde viermal im Abstand von 15 s gemessen und gemittelt. Von jeder Zellkulturschale wurden 9 Zellen gemessen, jedoch wurden nur stäbchenförmige und sich rhythmisch kontrahierende Kardiomyozyten ausgewählt. Daraus wurden die Parameter Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (in  $\mu\text{m/s}$ ) sowie diastolische (maximale) Zelllänge (in  $\mu\text{m}$ ) und die relative Zellverkürzung ( $\Delta L/L$ , in %, berechnet aus Amplitude  $\times 100$ / diastolische Länge in  $\mu\text{m}$ ) bestimmt.

### **3.9 Isolierung von Mitochondrien**

#### *3.9.1 Für Funktionsmessungen*

Die Tiere wurden mittels einer Inhalationsnarkose mit 5 % Isofluran in einem Exsikkator anästhesiert, bis keine Stellreflexe mehr vorhanden waren. Die Tiertötung erfolgte durch zervikale Dislokation. Die Bauchhöhle wurde geöffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Lunge, Herz und Thymus sowie Nieren wurden mittels einer Pinzette und einer Schere aus der Bauchhöhle gelöst und in 4 °C kalte Kochsalzlösung (0,9 %) überführt. Die Lungenflügel sowie Thymus und anhängendes Bindegewebe wurden vom Herzen entfernt. Auch die Nieren wurden von umliegendem Gewebe befreit. Für die Isolierung von kardialen Mitochondrien wurden rechte und linke

Ventrikel (inkl. Septen) und für die Isolierung von renalen Mitochondrien ganze Nieren der Maus verwendet. Alle Schritte erfolgen bei 4 °C, um die Integrität und Funktionalität der Mitochondrien zu gewährleisten.

Der linke Ventrikel und die Niere wurden separat in 5 ml eiskaltem Puffer A gewaschen und in 5 ml Puffer B (Puffer A mit 0,4 % BSA) mit einer Schere zerkleinert. Anschließend erfolgte der Gewebeaufschluss in einem Volumen von 5 ml durch fünfmaliges (für LV) bzw. zweimaliges (für Nieren) Pottern mit einem Teflon-Pistill in einem 5 ml Potter-Elvehjem Gewebhomogenisator. Der rechte Ventrikel wurde in 2 ml eiskaltem Puffer A gewaschen und anschließend gewogen. Daraufhin wurde das Gewebe auf einem Objektträger platziert, ein Tropfen Puffer A darauf gegeben und mit einem Skalpell grob zerkleinert. Anschließend erfolgte der Gewebeaufschluss des RV in einem Volumen von 1 ml durch sechsmaliges Pottern in einem 1 ml Potter-Elvehjem-Gewebhomogenisator. Die Homogenate wurde für 10 min bei 800 g zentrifugiert und die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation für weitere 10 min bei 8000 g sedimentiert. Nach einmaligem (RV) bzw. zweimaligem (LV und Niere) Waschen mit Puffer A und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 8000 g wurden die sedimentierten Mitochondrien in 250-300 µl (LV-Mitochondrien), 30-70 µl (RV-Mitochondrien) oder 600-800 µl (renale Mitochondrien) Homogenisationspuffer resuspendiert. Mit dieser Methode wurden funktionell aktive Mitochondrien isoliert.

### 3.9.2 Subzelluläre Lokalisation von NOX4

Das mit der Schere zerkleinerte linksventrikuläre und renale Gewebe wurde mittels Dispergiergerät zweimal für 10 s auf Stufe 1,5 und einmal für 5 s auf Stufe 2 homogenisiert und anschließend bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch erneutes zweimaliges (für Herz) bzw. sechsmaliges (für Niere) Pottern mit einem Teflon-Pistill in einem 5 ml Potter-Elvehjem Gewebhomogenisator weiter homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurden die Proben für 10 min bei 1000 g zentrifugiert und die im Überstand enthaltenen Mitochondrien bei 8000 g (für Herz) bzw. 10780 g (für Niere) für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet dreimal mit BSA-freiem Mitoisolierungspuffer für 10 min bei 8000 g (für Herz) bzw. 7650 g (für Niere) gewaschen. Der zuvor gesammelte Überstand wurde daraufhin durch Ultrazentrifugation bei 252000 g für 2 h bei 4 °C in Zytosolfraktion (Überstand)

und Membranfraktion (Pellet) aufgetrennt. Die in der Zytosolfraction enthaltenen Proteine wurden anschließend mit Hilfe von Vivaspin® *concentrators* Röhrchen bei 5000 g für 1 h bei 4 °C aufkonzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Um die erhaltenen Mitochondrien weiter aufzureinigen und eine reine Mitochondrienfraktion zu erhalten, wurden die zuvor isolierten Herz- und Nierenmitochondrien vorsichtig auf einen 30 %igen Percollgradienten geschichtet. Durch Ultrazentrifugation bei 35000 g für 30 min bei 4 °C wurden intakte Mitochondrien von Mitochondrientrümmern und anderen Zellbestandteilen befreit. Die angereicherten Mitochondrienfraktionen wurden gesammelt und dreimal durch Zentrifugation in Mitoisolierungspuffer für 5 min bei 10200 g gewaschen.

Da die Nierenmitochondrien nach Ultrazentrifugation in Western Blot Analysen Immunoreaktivität für Markerproteine der Plasmamembran, des ER und des Zytosols zeigten und daher kontaminiert waren, wurden diese einem weiteren Aufreinigungsschritt mittels anti-TOM22 *MicroBeads* und dem MACS® *Separator* Kit unterzogen. Bei dieser Methode wurden die renalen Mitochondrien mit Hilfe von magnetischen Antikörpern, die gegen das Protein *translocase of outer mitochondrial membrane 22* (TOM22), einem Protein der äußeren Mitochondrienmembran, gerichtet waren, in einem Magnetfeld angereichert. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurden die Mitochondrien magnetisch markiert, indem die Mitochondrien in 1x Separationspuffer aufgenommen und dieser Mischung 50 µl anti-TOM22 *MicroBeads* hinzu pipettiert wurden. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C unter schwenken wurden die magnetisch markierten Mitochondrien schrittweise auf eine MACS-Säule, die zuvor in den MACS-Separator (Magnet) eingespannt wurde, aufgetragen und in dem dort herrschenden Magnetfeld fixiert. Die fixierten Mitochondrien wurde dreimal mit 1x Separationspuffer gewaschen, bevor die MACS-Säule aus dem MACS-Separator genommen und die Mitochondrien durch Zugabe von 1,5 ml Mitoisolierungspuffer eluiert wurden. Die eluierten Mitochondrien wurden für 2 min bei 13000 g und 4 °C sedimentiert und anschließend einmal mit 1 ml Mitoisolierungspuffer gewaschen. Die Mitochondrienpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.10 Herstellung von Proteinextrakten

Frisch entnommene LV, RV und Nieren wurden in NaCl von Blutrückständen gereinigt, in kleinen Stücken in Kryogefäße überführt und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für die Untersuchung des NOX4-Proteins wurden Proteinextrakte aus RV und Gewebestücken der Niere von WT- und NOX4 KO-Mäusen hergestellt. Ein Stück Gewebe wurde in einem Mörser unter ständiger Zufuhr von flüssigem Stickstoff pulverisiert. Anschließend wurde das Gewicht des Gewebepulvers bestimmt. Aufgereinigte Mitochondrien und ~30 mg Gewebepulver wurden durch die Zugabe von 95 °C heißem 1 x Lämmli-Puffer (100 µl/ mg) ohne Bromphenolblau für 10 min bei 65 °C denaturiert. Darauffolgend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und in drei Zyklen à 15 s mit einer Amplitude von 30 % bei RT sonifiziert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 16100 g wurden die Überstände in frischen 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und der Proteingehalt nach der Methode von Zaman & Verwilghen bestimmt. Da NOX4 ein transmembranäres Protein ist, war dieses Protokoll für den Nachweis des NOX4-Proteins erforderlich.

Für den Nachweis des p66shc-Proteins in kardialen Gewebe wurden Gewebeextrakte aus dem LV hergestellt. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C. LV-Gewebestücke wurden in 1 x Zelllysepuffer (Volumen abhängig von der Gewebegröße) aufgenommen und sechsmal mit einem Pistill in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß grob homogenisiert. Durch das Aufziehen des Homogenats durch eine 25 G Kanüle wurde der Extrakt feiner homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 13000 g für 10 min erfolgte die Proteinbestimmung des Überstandes nach der Lowry Methode.

### 3.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

#### 3.11.1 Lowry: DC<sup>TM</sup> (*detergent compatible*) protein assay

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des *Lowry: DC<sup>TM</sup> (detergent compatible) protein assay* Kits nach Anleitung des Herstellers. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde Rinder-Serumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 0-1,4 mg/ml verwendet. Es wurde von jeder Probe und von jedem BSA-Standard eine

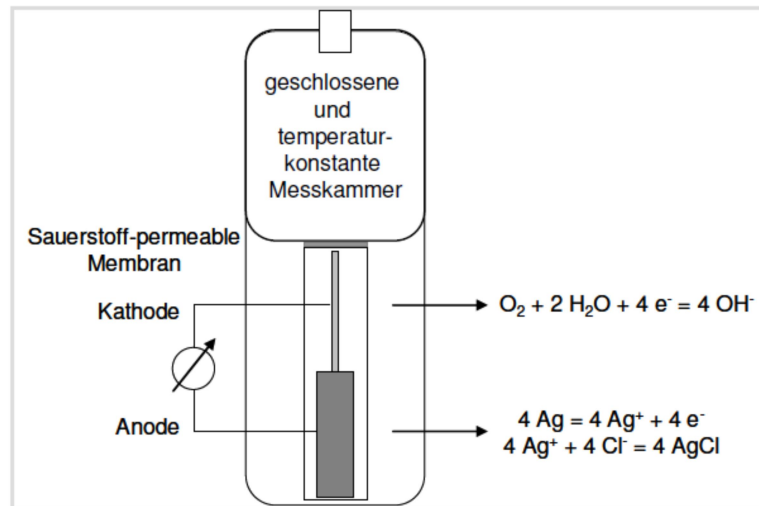
Doppelbestimmung in einer 96-Loch-Platte durchgeführt. Dabei wurden jeweils 5 µl der zuvor mit ddH<sub>2</sub>O verdünnten Proben zunächst mit 25 µl Lösung A' und anschließend mit 200 µl Lösung B versetzt. Ebenso wurde mit dem BSA-Standard verfahren. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit erfolgte die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 650 nm in einem Mikroplatten-Spektrophotometer.

### 3.11.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Zaman & Verwilghen

Diese von Zaman und Verwilghen 1979 etabliert Methode [203] diente der Konzentrationsbestimmung von Mitochondrien- und Gewebeextrakten, die in Lämmli-Puffer lysiert wurden. Für die Eichgerade wurde Rinder-Serumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 0-1,4 mg/ml verwendet. Je 4 µl Proteinextrakt oder Standard wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und mit 90 µl des 100 mM Kalium-Phosphat-Puffers versetzt. Nach einer 5-10-minütigen Inkubation wurden die Proben bei 5000 g bei RT für 10 min zentrifugiert. Pro Loch einer 96-Lochplatte wurden jeweils 19 µl des klaren Überstands überführt und mit 209 µl Coomassie *brilliant blue* G-250 Färbelösung versehen, wobei von jeder Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Ebenso wurde mit dem BSA-Standard verfahren. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit erfolgte die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 620 nm in einem Mikroplatten-Spektrophotometer.

## 3.12 Respirationsmessung

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs isolierter Mitochondrien erfolgte unter Verwendung von Substraten für den Respirationskomplex I (5 mM Glutamat/ 2,5 mM Malat) oder für den Respirationskomplex II (5 mM Succinat unter gleichzeitiger Hemmung von Komplex I durch Rotenon) mit einer Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ in einem geschlossenen System bei konstanten 25 °C. Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12: Prinzip einer Clark-Elektrode.** Der Sauerstoff aus der Messkammer gelangt durch eine Sauerstoff-permeable Membran zur Kathode, an welcher die eigentliche Reaktion stattfindet. Durch die Reduktion von Silber an der Anode wird ein Elektron frei, das wiederum für die Reduktion von Sauerstoff benötigt wird. Nimmt der Sauerstoffgehalt in der Messkammer ab, gelangt weniger Sauerstoff zur Kathode und es fließt weniger Strom.

Vor der Zugabe von Mitochondrien wurden 0,5 ml Glutamat/Malat Inkubationspuffer oder Succinat Inkubationspuffer plus 2  $\mu$ M Rotenon in die Respirationkammer vorgelegt. Sobald sich ein stabiler Wert für den Sauerstoffgehalt in der Kammer eingestellt hatte, wurde die Messung begonnen. Nach einer Minute wurden 50  $\mu$ g/ 0,5 ml isolierte Mitochondrien in die Messkammer gegeben und der Sauerstoffverbrauch kontinuierlich für 3 min gemessen. Anschließend wurden 40  $\mu$ M ADP zugegeben und der Sauerstoffverbrauch kontinuierlich für weitere 3 min gemessen. Dies diente der Detektion der ADP-stimulierten Atmung, welche später zur Berechnung der *Respiratory Control Ratio* (RCR) als Qualitätskontrolle der Mitochondrienpräparation diente. Der RCR wurde aus dem Quotienten der Steigung des ADP-stimulierten Sauerstoffverbrauchs (mittlerer Wert) und der Steigung des basalen Sauerstoffverbrauchs (niedrigster Wert) gebildet ( $RCR = \text{ADP-stimulierter } O_2\text{-Verbrauch} / \text{basaler } O_2\text{-Verbrauch}$ ). Man ging von einer guten Mitochondrienqualität aus, wenn der RCR im Bereich von ungefähr 3 für den Komplex I und bei mindestens 2 für den Komplex II lag [204]. Durch die aufeinanderfolgende Zugabe von 3 mM Ascorbat und 300  $\mu$ M TMPD wurde die Komplex IV-Atmung in beiden Messkammern gemessen und nach Zugabe von 100  $\mu$ M FCCP wurden die Mitochondrien schließlich entkoppelt, was zu einem verstärkten Protonen-Transport über die innere Mitochondrienmembran und damit zum vollständigen Verbrauch des enthaltenen Sauerstoffs führte. Die Werte für die Komplex IV-Atmung sowie die Entkopplung sollten sich zwischen den

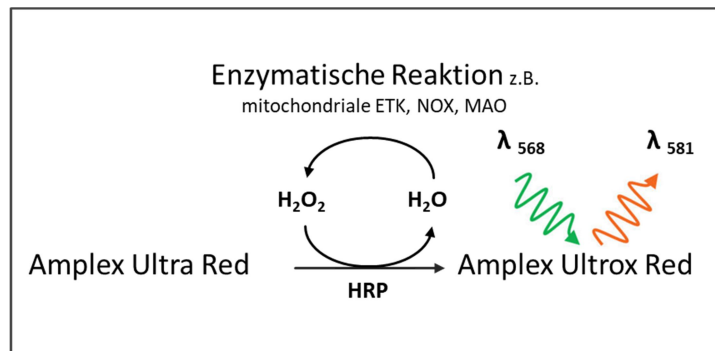
Kammern, aber auch zwischen den einzelnen Messungen eines Versuchs, nicht wesentlich unterscheiden und dienten der Kontrolle, dass gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. Für die Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs wurden die Steigungen des Sauerstoffabfalls in 0,5 min Schritten ermittelt und auf die eingesetzte Proteinmenge normiert. Da es sich um eine Abnahme der Sauerstoffmenge in der Messkammer handelte, waren die Werte für die ermittelte Steigung negativ und mussten deshalb mit -1 multipliziert werden.

$$\text{Sauerstoffverbrauch [nmol O}_2\text{/min *mg Protein]} = \frac{\text{Sauerstoffmenge [nmol O}_2\text{]}}{\text{Zeit[min]*Proteinmenge [mg]}} = \frac{(-)\text{Steigung [nmol O}_2\text{]}}{0,5 \text{ [min]*0,05 mg Protein}}$$

Um den Einfluss der verwendeten NOX-Inhibitoren auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zu bestimmen, wurden 50 µg isolierte Mitochondrien aus dem LV mit 1 µM oder 10 µM des NOX1/4-Inhibitors GKT136901 bzw. mit 0,1 µM oder 1 µM des pan NOX-Inhibitors VAS2780 oder mit 1 % DMSO als Kontrolle für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die vorinkubierten Mitochondrien in die Messkammer gegeben und der Sauerstoffverbrauch wie oben beschrieben gemessen. Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch wurde innerhalb von 2 h nach der Isolierung der Mitochondrien bestimmt.

### 3.13 Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Detektion erfolgte unter Verwendung der Amplex Ultra Red Methode (Invitrogen). Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 13 dargestellt. Amplex Ultra Red ist ein farbloses, fluorogenes Substrat für die Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP), welches mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einem 1:1 Verhältnis reagiert und dabei das stark fluoreszierende Produkt Amplex Ultrox Red bildet. Amplex Ultra Red eignet sich daher für die Detektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches beispielsweise von Zellen oder Mitochondrien abgegeben wird oder aus einer enzymatischen Reaktion stammt.



**Abbildung 13: Prinzip der Amplex Ultra Red Methode.** Das farblose Amplex Ultra Red wird gemeinsam mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  von der Peroxidase HRP zu dem stark fluoreszierenden Produkt Amplex Ultrox Red umgesetzt, dessen Excitations-/ Emissionsmaximum bei 568 nm ( $\lambda_{568}$ )/ 581 nm ( $\lambda_{581}$ ) liegt.

50  $\mu\text{g}$  frisch isolierte linksventrikuläre Herz- oder Nierenmitochondrien wurden in Glutamat/Malat-Puffer überführt und mit 1 % DMSO, mit 1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  des NOX-Inhibitors GKT136901 oder mit 1  $\mu\text{M}$  des pan NOX-Inhibitors VAS2870 für 10 min bei RT behandelt.

Aufgrund der geringeren Mitochondrienausbeute aus dem rechten Ventrikel wurden 25  $\mu\text{g}$  rechtsventrikuläre Mitochondrien in Glutamat/Malat-Puffer überführt und auf ein Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  eingestellt.

Nach vorsichtigem Resuspendieren wurden je 50  $\mu\text{l}$  Probe in ein Well einer 96-Wellplatte gegeben. Die Messung erfolgte im Falle der LV und renalen Mitochondrien in Duplikaten unter basalen Bedingungen oder in Anwesenheit des Komplex I-Inhibitors Rotenon (2  $\mu\text{M}$ ). Durch die Zugabe von Rotenon wurde der mitochondriale Atmungsketten-Komplex I gehemmt, wodurch die ROS-Produktion signifikant anstieg. Im Fall der RV-Mitochondrien wurde die Rotenon-Konzentration angepasst, um eine signifikante Steigerung der ROS-Produktion zu erzielen. Außerdem erfolgte je eine Messung unter basalen Bedingungen (Well 1) und eine Messung in Anwesenheit von Rotenon (6,25  $\mu\text{M}$ ) (Well 2).

Durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Amplex Ultra Red *Working Solution* pro Well, welche sowohl das Fluorogen als auch die HRP enthielt, wurde die Reaktion in Gang gesetzt und die Zunahme der Fluoreszenzintensität in Echtzeit über einen Zeitraum von 10 min (LV- und Nierenmitochondrien) bzw. 5 min (RV-Mitochondrien) im Cary Eclipse Spektrophotometer bei einer Extinktions-/ Emissionswellenlänge von 565 nm/ 581 nm gemessen. Die Hintergrundfluoreszenz des Puffers ohne zugesetzte Mitochondrien

wurde subtrahiert und die Steigung des Amplex Ultra Red Signals für 3 min (LV- und Nierenmitochondrien) bzw. 1,5 min (RV-Mitochondrien) bestimmt.

### 3.14 Denaturierende SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Der Nachweis von NOX4, p66shc und Markerproteinen für spezifische Kompartimente erfolgte mittels denaturierender SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Analyse. Dafür wurden 10 µg LV-Proteinextrakte (in 1 x Zellysepuffer) mit Ladepuffer oder 40 µg RV Protein- sowie Zytosol-, Membran- und Mitochondrienextrakte (in 1 x Lämmli-Puffer, farblos) mit Bromphenolblau versehen. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde das NuPAGE™ System von Novex® sowie NuPAGE™ mini Gele (10 % Bis-Tris) verwendet. Die Gele wurden in der dafür vorgesehenen Gelkammer befestigt und das innere sowie die äußeren Reservoirs wurden mit 1 x MOPS Laufpuffer befüllt. Die vorgefertigten Geltaschen wurden mit 1 x MOPS gespült und anschließend mit den Proteinproben beladen. *Precision Plus Protein Dual Color* wurde als Proteinstandard verwendet. Durch das Anlegen einer Spannung von 90 V für 20 min wurden die Proben im Sammelgel gesammelt. Im Anschluss wurde eine Spannung von 200 V für 50 min angelegt, um die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufzutrennen.

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulosemembran mit 0,2 µm Porengröße erfolgte mittels der *Wet Blot* oder Tankblot Technik. Zu diesem Zweck wurde die Membran kurz in ddH<sub>2</sub>O aktiviert und anschließend mit 1 x NuPAGE Transferpuffer äquilibriert. Außerdem wurden zwei Filterpapiere und sechs Schwämme in 1 x NuPAGE Transferpuffer eingelegt. Das Gel wurde anschließend mit den anderen Bestandteilen luftblasenfrei in folgender Anordnung zu einem „Gelsandwich“ zusammengesetzt: drei Schwämme, ein Filterpapier, Gel, Membran, ein Filterpapier, drei Schwämme. Nachdem die Blotkammer in die dafür vorgesehene Kammer gesetzt wurde, wurde das innere Reservoir der Blotkammer mit 1 x NuPAGE Transferpuffer und die äußeren Reservoirs mit Wasser zum Kühlen befüllt. Der Transfer erfolgte für 2 h bei 30 V. Zur Überprüfung eines erfolgreichen Proteintransfers wurde die Membran für 10 min in 0,1 %iger Ponceau S -Färbelösung unter Schwenken inkubiert, anschließend mit ddH<sub>2</sub>O zur Entfernung von überschüssigen Ponceau-Rückständen gewaschen und zu Dokumentationszwecken fotografiert. Nach Zuschneiden und

Beschriften der Membran erfolgte das Entfärben in TBST. Im Anschluss wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in 5 % Magermilchpulver in TBST für 1 h bei RT blockiert. Daraufhin folgte die immunochemische Markierung der gewünschten Proteine mit Hilfe zweier Antikörper, wobei der erste Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Antigen bindet (Primärantikörper) und der zweite Antikörper Spezies- oder Subklassen-Immunglobulinspezifität für den Primärantikörper besitzt. Zudem ist an den zweiten Antikörper eine HRP gekoppelt, welche die Umsetzung des Substrats *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) katalysiert und dabei Energie in Form von Licht abgibt. Die Membran wurde mit einer Antikörperlösung aus 5 ml TBS, 4 % BSA oder 5 % Milch, 0,1 % Tween und dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran viermal für je 5 min in TBST gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h unter Schwenken bei RT. Wie zuvor wurde die Membran viermal für je 5 min in TBST gewaschen. Abschließend konnte, nach Zugabe von ECL-Reagenz, die Detektion der gewünschten Proteine indirekt über die Peroxidaseaktivität des gebundenen Sekundärantikörpers mit Hilfe des ChemiDoc Gerätes, einer speziellen Kamera, erfolgen. Die Dauer der Exposition lag je nach Antikörper und Verdünnung des Sekundärantikörpers zwischen 1 s und 5 min.

Bei Bedarf (Nachweis von Proteinen mit vergleichbarem Molekulargewicht oder unterschiedliche Antikörper für den Nachweis eines Proteins) wurde die Membran mittels *Restore<sup>TM</sup> PLUS Western Blot Stripping Buffer* von Primär- und Sekundärantikörpern befreit, indem diese dreimal für 5 min in PBS gewaschen, für 4 min bei RT und ohne Schwenken mit *Restore<sup>TM</sup> PLUS Western Blot Stripping Buffer* inkubiert und erneut dreimal für 5 min in PBS gewaschen wurde. Anschließend konnte die Membran mit dem gewünschten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert werden.

### 3.15 Statistik

Die Daten wurden als Boxplots mit Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker den gesamten Bereich, die Punkte die einzelnen Datenpunkte und das Kreuz den Mittelwert darstellten. Die Daten in den Tabellen wurden als Mittelwerte

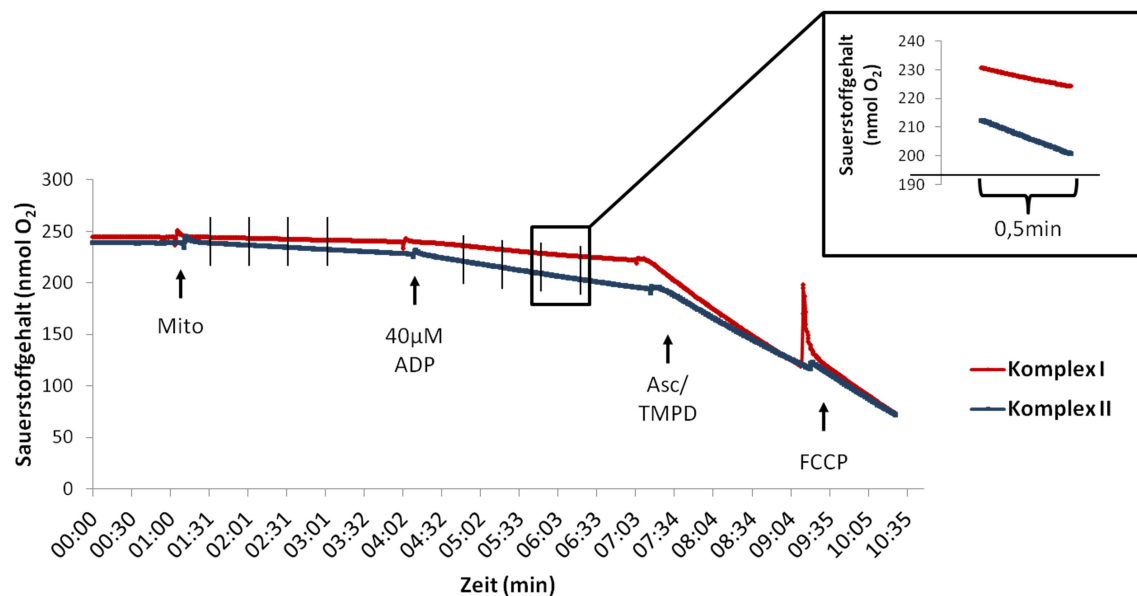
± Standardfehler gezeigt. Für die statistische Analyse zwischen Inhibitor-behandelten (GKT136901 oder VAS2780) und Kontroll-inkubierten Mitochondrien (DMSO) wurde die Ein-Wege-ANOVA und der *post hoc Fisher's* Vergleichstest verwendet. Für die statistische Analyse mehrerer Faktoren wurden die Zwei-Wege-ANOVA gefolgt von Bonferroni-Korrekturen verwendet. Für die statistische Analyse wurde das Programm SigmaStat 3.5 verwendet. Das Signifikanzniveau wurde als  $p < 0,05$  definiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Funktionelle Relevanz und Lokalisation der NOX4 in Mitochondrien des linken Ventrikels unter physiologischen Bedingungen

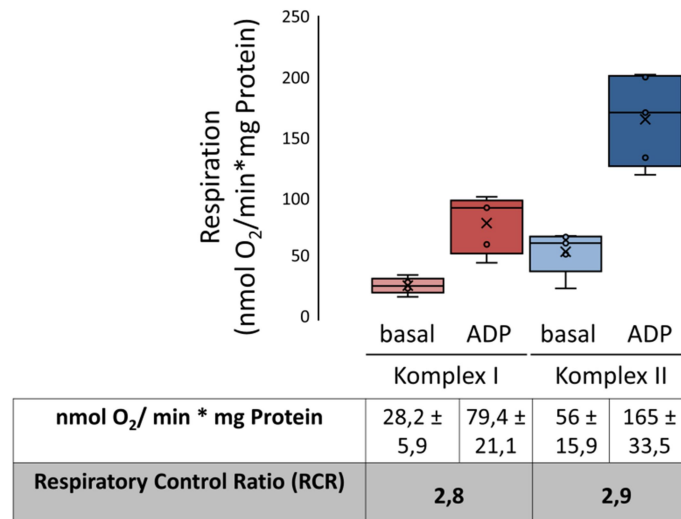
#### 4.1.1 Qualitätskontrolle der Mitochondrienpräparation und Analysen zum Effekt der verwendeten NOX-Inhibitoren

Um die Funktionalität der isolierten Mitochondrien zu überprüfen, wurde der Sauerstoffverbrauch (in 0,5 min Schritten) von linksventrikulären WT-Mitochondrien gemessen und auf die eingesetzte Proteinmenge normiert. In Abbildung 14 ist eine repräsentative Respirationsmessung dargestellt.



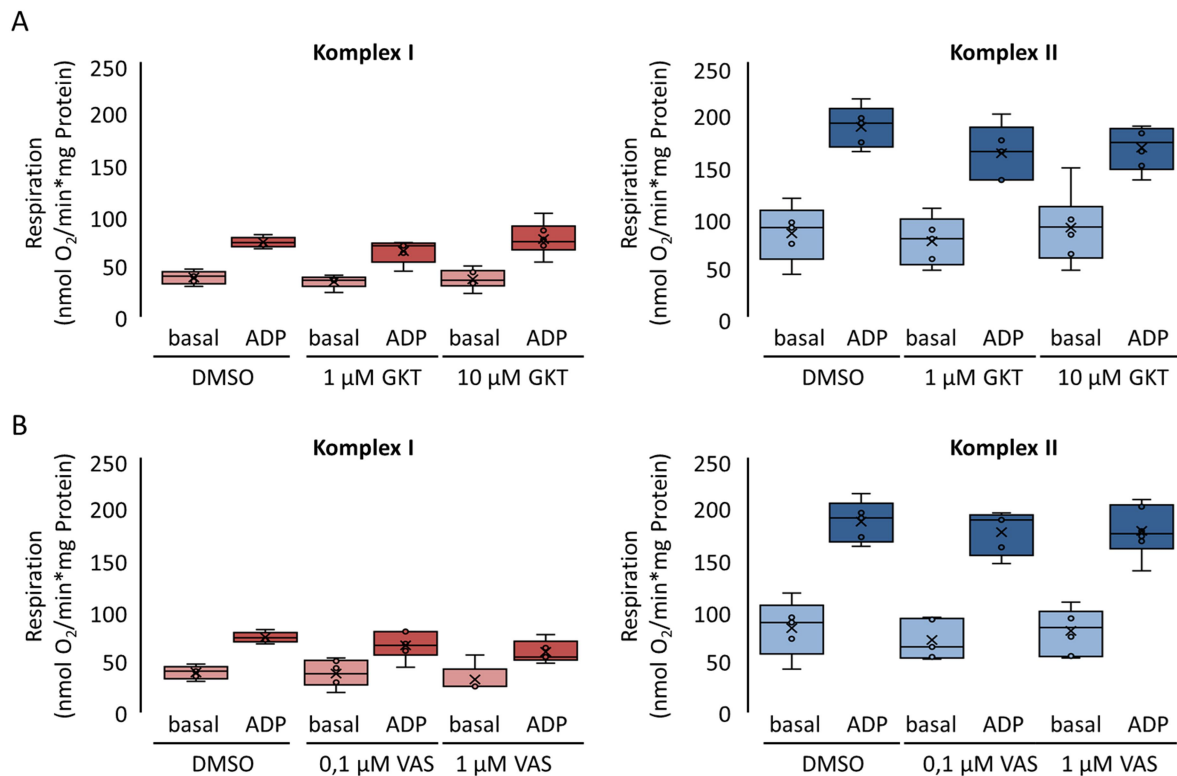
**Abbildung 14: Repräsentative Respirationsmessung.** Ermittlung des basalen und ADP-stimulierten Sauerstoffverbrauchs isolierter Herzmitochondrien unter Verwendung von Komplex I- und Komplex II-Substraten (Glutamat/Malat bzw. Succinat und Rotenon) durch Messung des Sauerstoffabfalls in der Messkammer in 0,5 min Schritten (schwarze, senkrechte Linien).

Die basale Respiration der Mitochondrien lässt sich sowohl in Anwesenheit von Komplex I-Substraten (Glutamat und Malat) als auch von Komplex II-Substrat (Succinat in Anwesenheit von Rotenon) durch die Zugabe von 40  $\mu$ M ADP deutlich steigern. Dieser ADP-stimulierte Anstieg der Respirationsrate wird als Quotient aus der ADP-stimulierten und basalen Respiration (RCR) ausgedrückt. Die Abbildung 15 zeigt, dass der durchschnittliche RCR der Mitochondrienpräparationen aus dem LV bei einem Wert von etwa 3 lag, sodass die nachfolgenden Experimente mit funktionsfähigen Mitochondrien durchgeführt wurden.



**Abbildung 15: Sauerstoffverbrauch von isolierten, linksventrikulären WT-Mitochondrien.** Für die Qualitätskontrolle der Mitochondrienpräparation wurde der basale Sauerstoffverbrauch für den Respirationskomplex I mit Glutamat und Malat bzw. für den Respirationskomplex II mit Succinat unter gleichzeitiger Hemmung des Respirationskomplex I mit Rotenon gemessen. Nach Zugabe von 40  $\mu\text{M}$  ADP wurde die ADP-stimulierte Respiration gemessen. In der Tabelle sind der mitochondriale Sauerstoffverbrauch in  $\text{nmol O}_2/\text{min} * \text{mg Protein} \pm$  Standardabweichung sowie der Quotient aus der ADP-stimulierten und basalen Respiration (RCR) aufgelistet. Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messpunkte dar, das Kreuz den Mittelwert von  $n = 5$  Tieren.

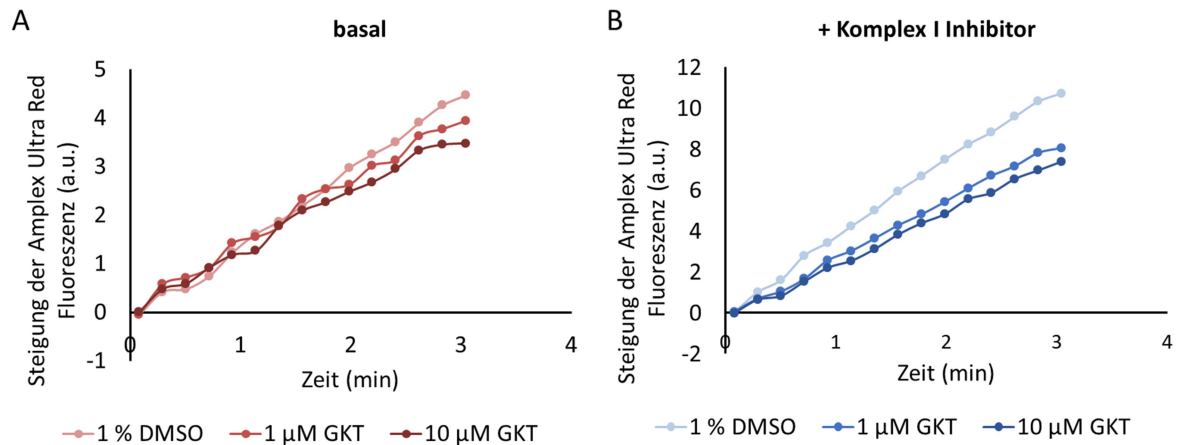
Es wurde untersucht, ob die verwendeten NOX-Inhibitoren die mitochondriale Respiration beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde der Sauerstoffverbrauch frisch isolierter linksventrikulärer Mitochondrien von WT-Mäusen gemessen, welche entweder mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren GKT136901 (1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) und VAS2870 (0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ ) oder mit DMSO (1 %) als Kontrolle behandelt wurden. Abbildung 16 zeigt, dass der basale Sauerstoffverbrauch von GKT136901-behandelten Mitochondrien (A) oder VAS2870-behandelten Mitochondrien (B) mit dem Sauerstoffverbrauch von Kontroll-Mitochondrien vergleichbar war, sowohl bei Verwendung der Substrate für den Respirationskomplex I (rot) als auch für den Respirationskomplex II (blau). Die Zugabe von ADP führte in allen Gruppen zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, jedoch war die ADP-stimulierte Respiration von Komplex I und II vergleichbar zwischen DMSO-behandelten Mitochondrien und Mitochondrien, die mit verschiedenen Konzentrationen der NOX-Inhibitoren behandelt wurden. Damit konnte ein Einfluss der NOX-Inhibitoren auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch von Komplex I und II ausgeschlossen werden.



**Abbildung 16: Einfluss der NOX-Inhibitoren auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch.** Aus WT-Mäusen isolierte linksventrikuläre Mitochondrien wurden mit 1 % DMSO, mit 1 µM oder 10 µM des NOX1/4-Inhibitors GKT136901 (GKT, **A**) bzw. mit 0,1 µM oder 1 µM des pan NOX-Inhibitors VAS2780 (VAS, **B**) behandelt. Der basale Sauerstoffverbrauch wurde für den Respirationskomplex I (rot) mit Glutamat und Malat bzw. für den Respirationskomplex II (blau) mit Succinat unter gleichzeitiger Hemmung des Respirationskomplex I mit Rotenon gemessen. Nach Zugabe von 40 µM ADP wurde die ADP-stimulierte Respiration (ADP) gemessen. Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messpunkte dar, das Kreuz den Mittelwert von n = 5 Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Ein-Wege-ANOVA, p = n.s. vs. DMSO.

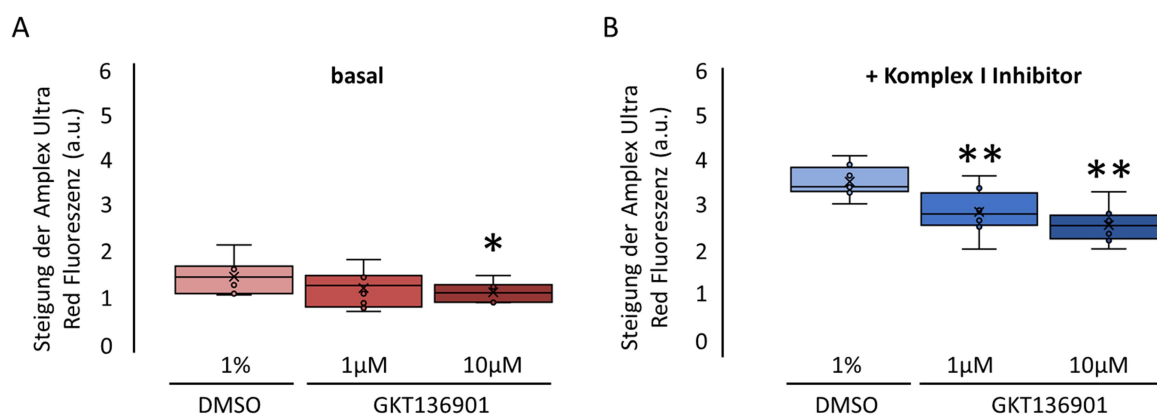
#### 4.1.2 Einfluss von NOX4 auf die mitochondriale ROS-Produktion

Um die NOX4-Aktivität im Sinne der Produktion von ROS in Mitochondrien zu untersuchen, wurden isolierte, linksventrikuläre Mitochondrien von WT-Mäusen mit 1 µM oder 10 µM des NOX1/4-Inhibitors GKT136901 oder mit 1 % DMSO als Kontrolle behandelt. Die ROS-Produktion wurde basal oder in Anwesenheit des Komplex I-Inhibitors Rotenon gemessen und die Steigung der Fluoreszenzzunahme innerhalb der ersten drei Minuten berechnet. Abbildung 17 zeigt eine repräsentative ROS-Messung von DMSO und GKT136901 behandelten Mitochondrien.



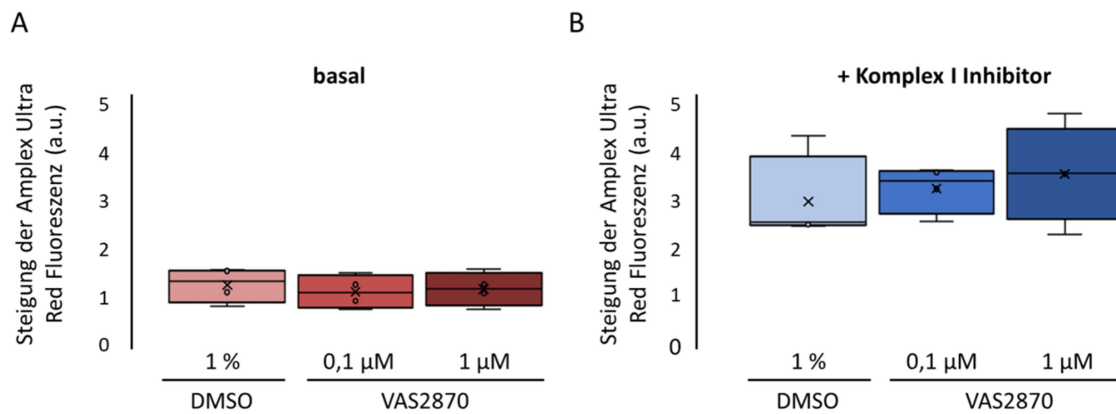
**Abbildung 17: Repräsentative ROS-Messung von GKT136901-inkubierten Mitochondrien mittels der Amplex Ultra Red Methode.** Dargestellt sind die Fluoreszenzzunahmen der einzelnen Ansätze (mit 1 % DMSO, 1 µM und 10 µM GKT136901 inkubierte LV-Mitochondrien) über einen Zeitraum von drei Minuten. Die Hintergrundfluoreszenz des Puffers ohne zugesetzte Mitochondrien wurde subtrahiert.

Durch die Zugabe von Rotenon kommt es zu einem deutlichen Anstieg der ROS-Produktion. Nach einer Inkubation der Mitochondrien mit GKT136901 konnte sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Hemmung von Komplex I eine dosisabhängige Abnahme der ROS-Produktion beobachtet werden (Abbildung 18).



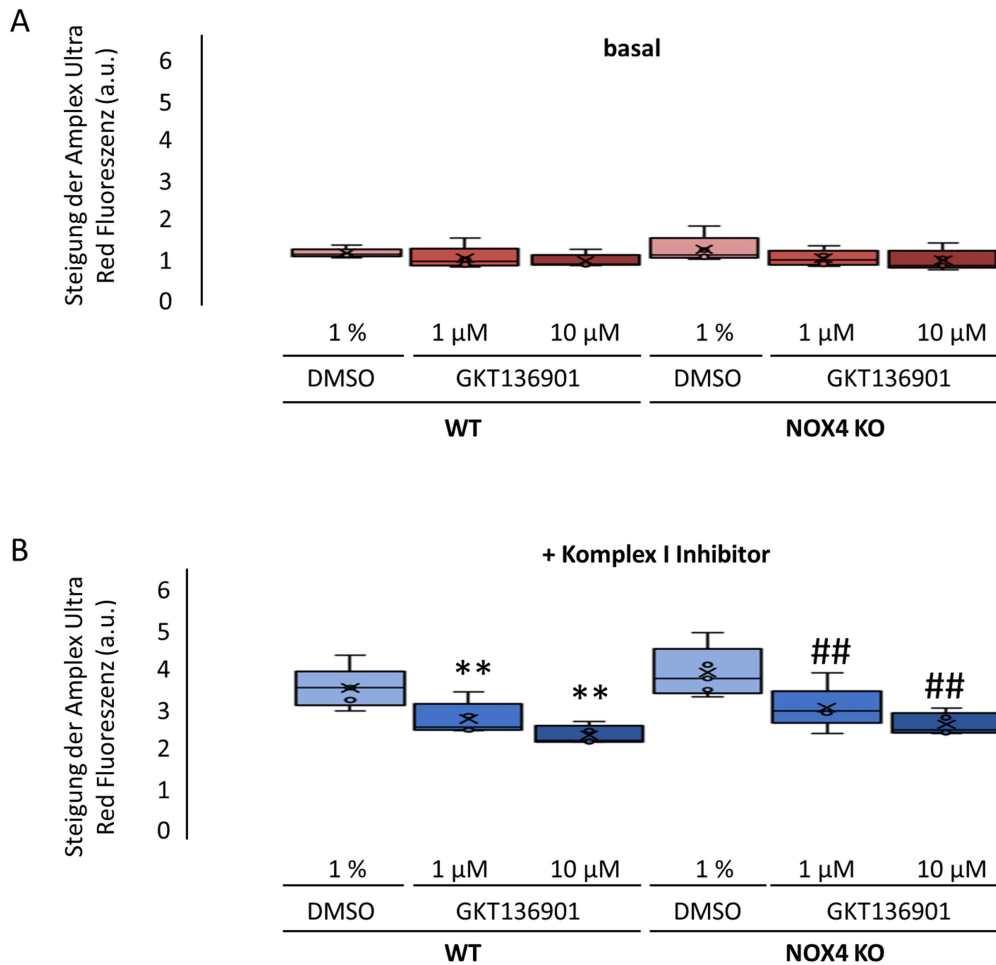
**Abbildung 18: Der Inhibitor GKT136901 hemmt die mitochondriale ROS-Produktion.** Aus WT-Mäusen isolierte linksventrikuläre Mitochondrien wurden mit 1 % DMSO, mit 1 µM oder 10 µM des NOX1/4-Inhibitors GKT136901 behandelt. Die Produktion von ROS wurde basal (**A**) sowie in Anwesenheit des Komplex I-Inhibitors Rotenon (**B**) und unter Verwendung von Komplex I-Substraten mithilfe von Amplex Ultra Red gemessen. Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messpunkte dar, das Kreuz den Mittelwert von n = 5 Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Ein-Wege-ANOVA \*: p < 0,05 vs. DMSO, \*\*: p < 0,05 vs. DMSO + Rotenon.

Anschließend wurde der Effekt des pan-Inhibitors VAS2780 auf die mitochondriale ROS-Bildung untersucht. Die Behandlung von isolierten Mitochondrien mit 0,1  $\mu\text{M}$  oder 1  $\mu\text{M}$  VAS2780 hatte keinen Einfluss auf die ROS-Produktion, weder unter basalen Bedingungen, noch nach Komplex I-Hemmung (Abbildung 19).



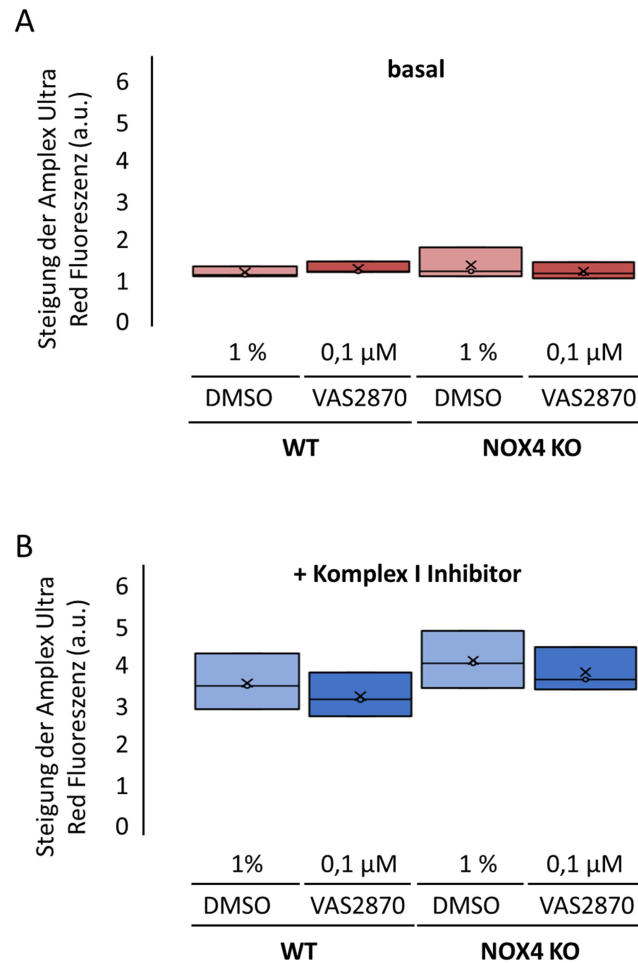
**Abbildung 19: Der pan NOX-Inhibitor VAS2780 hat keinen Einfluss auf die mitochondriale ROS-Produktion.** Aus WT-Mäusen isolierte linksventrikuläre Mitochondrien wurden mit 1 % DMSO, mit 0,1  $\mu\text{M}$  oder 1  $\mu\text{M}$  des pan NOX-Inhibitors VAS2780 behandelt. Die Produktion von ROS wurde basal (**A**) sowie in Anwesenheit des Komplex I-Inhibitors Rotenon (**B**) und unter Verwendung von Komplex I-Substraten mithilfe von Amplex Ultra Red gemessen. Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messpunkte dar, das Kreuz den Mittelwert von  $n = 4$  Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Ein-Wege-ANOVA.  $p = \text{n.s.}$

Um zu überprüfen, ob die GKT136901-vermittelte Abnahme in der mitochondrialen ROS-Produktion auf die Aktivität von NOX4 zurück zu führen war, wurden die Experimente in isolierten WT- und NOX4 *knockout* (NOX4 KO)-Herzmitochondrien unter Verwendung von 1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  GKT136901 wiederholt. Nach einer Inkubation der Mitochondrien mit GKT136901 konnte erneut sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach Hemmung von Komplex I eine dosisabhängige Abnahme der ROS-Produktion beobachtet werden, wobei keine statistische Signifikanz unter basalen Bedingungen erreicht wurde. Allerdings reduzierte der Inhibitor GKT136901 die ROS-Produktion in WT- und NOX4 KO-Herzmitochondrien und auch unter beiden Bedingungen (basal und nach Komplex I-Hemmung) gleichermaßen (Abbildung 20), was auf einen NOX4-unabhängigen inhibitorischen Effekt von GKT136901 auf die ROS-Produktion schließen lässt.



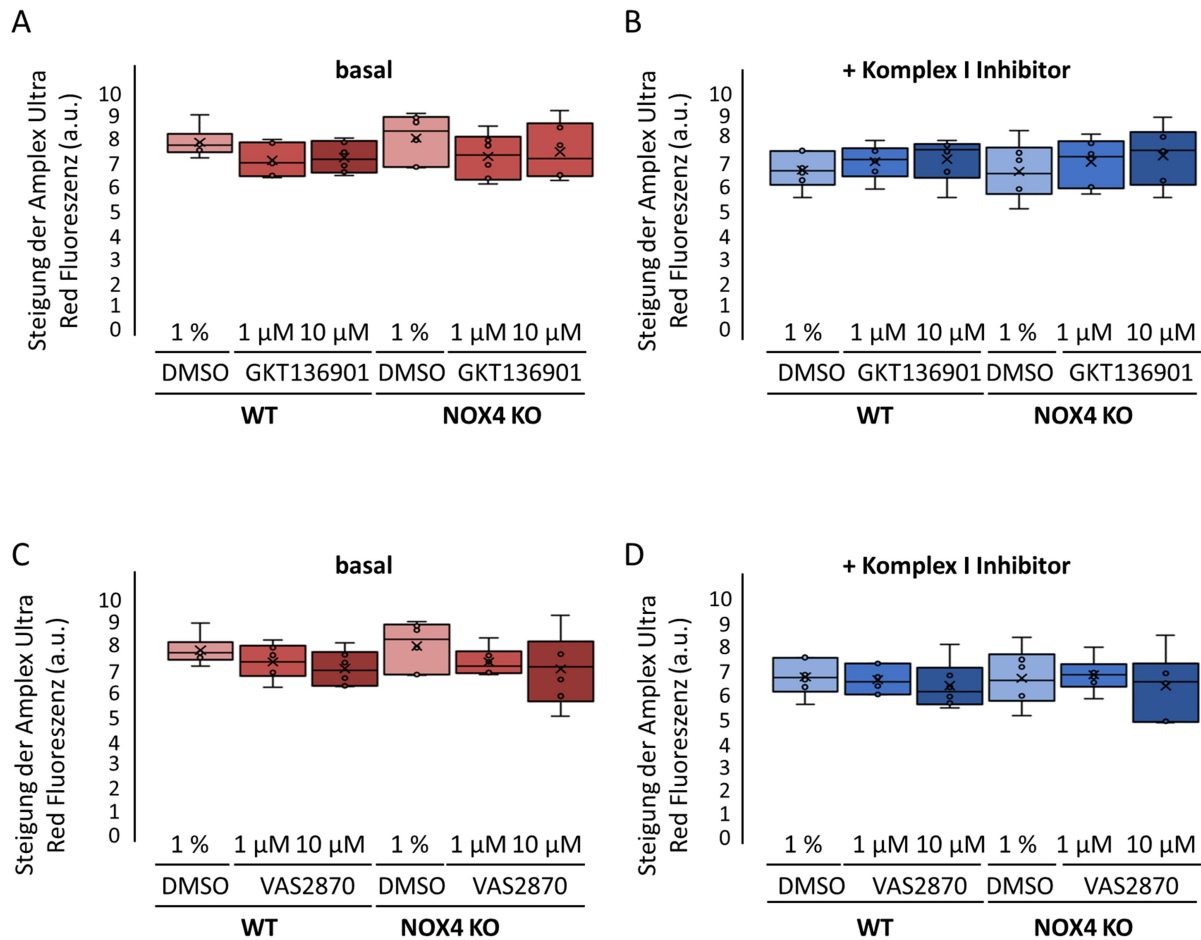
**Abbildung 20: Der NOX1/4-Inhibitor GKT136901 hemmt die ROS-Produktion von WT- und NOX4 KO-Mitochondrien.** Aus linken Ventrikeln von WT- und NOX4 KO-Mäusen isolierte Mitochondrien wurden mit 1 % DMSO, mit 1 μM und 10 μM des NOX1/4-Inhibitors GKT136901 behandelt. Die Produktion von ROS wurde basal (**A**) sowie in Anwesenheit des Komplex I-Inhibitors Rotenon (**B**) und unter Verwendung von Komplex I-Substraten mithilfe von Amplex Ultra Red gemessen. Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messpunkte dar, das Kreuz den Mittelwert von  $n = 5$  Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA \*\*:  $p < 0,05$  vs. WT DMSO + Rotenon, ##:  $p < 0,05$  vs. NOX4 KO DMSO + Rotenon.

Weiterhin wurde die ROS-Produktion in WT- und NOX4 KO-Mitochondrien in Anwesenheit des pan NOX-Inhibitors VAS2870 (0,1 μM) ermittelt. VAS2870 induzierte weder in WT- noch in NOX4 KO-Mitochondrien eine Änderung der ROS-Produktion (Abbildung 21).



**Abbildung 21. Der pan NOX-Inhibitor VAS2780 hat keinen Effekt auf die ROS-Produktion von WT- und NOX4 KO-Mitochondrien.** Von WT- und NOX4 KO-Mäusen isolierte linksventrikuläre Mitochondrien wurden mit 1 % DMSO oder mit 0,1 μM des pan NOX-Inhibitors VAS2780 behandelt. Die Produktion von ROS wurde basal (**A**) sowie in Anwesenheit des Komplex I-Inhibitors Rotenon (**B**) und unter Verwendung von Komplex I-Substraten mithilfe von Amplex Ultra Red gemessen. Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messpunkte dar, das Kreuz den Mittelwert von n = 3 Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. p = n.s.

Da die Niere eine hohe Menge des NOX4-Proteins exprimiert, wurde die ROS-Produktion in isolierten Nierenmitochondrien untersucht. Zudem wurde die Konzentration von VAS2780 auf 10 μM erhöht. In Nierenmitochondrien zeigte weder der NOX1/4-Inhibitor GKT136901 noch der pan-Inhibitor VAS2780 einen Effekt auf die ROS-Produktion unter basalen Bedingungen oder nach Hemmung von Komplex I durch Rotenon. Und ähnlich wie bei den LV-Mitochondrien wurden keine Unterschiede zwischen renalen WT- und NOX4 KO-Mitochondrien festgestellt (Abbildung 22).

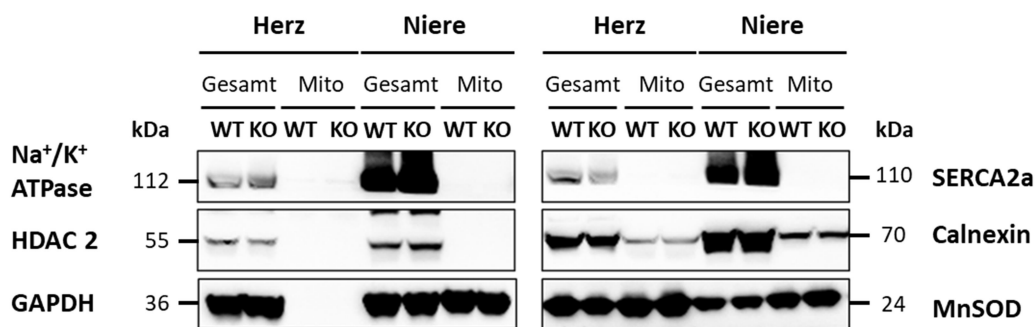


**Abbildung 22: Die NOX-Inhibitoren GKT136901 und VAS2870 haben keinen Effekt auf die ROS-Produktion von Mitochondrien isoliert aus Nieren von WT- und NOX4 KO-Mäusen.** Isolierte Mitochondrien aus der Niere von WT- und NOX4 KO-Mäusen wurden mit 1 % DMSO oder mit 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M des NOX1/4-Inhibitors GKT136901 (**A und B**) sowie mit 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M des pan NOX-Inhibitors VAS2870 (**C und D**) behandelt. Die Produktion von ROS wurde basal (rot) sowie in Anwesenheit des Komplex I-Inhibitors Rotenon (blau) und unter Verwendung von Komplex I-Substraten mithilfe von Amplex Ultra Red gemessen. Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messpunkte dar, das Kreuz den Mittelwert von n = 6 Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. p = n.s.

#### 4.1.3 Untersuchungen zur Lokalisation von NOX4 unter physiologischen Bedingungen

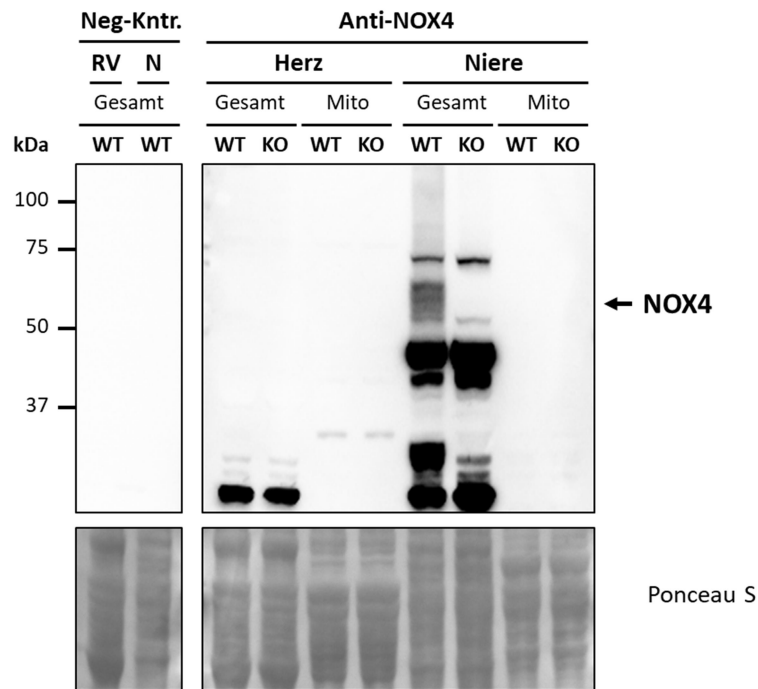
Da keine NOX4-Aktivität in Herz- und Nierenmitochondrien messbar war, wurde mittels Western Blot Analysen charakterisiert, ob das NOX4-Protein in Mitochondrien nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien aus dem LV und der Niere von WT- und NOX4 KO-Mäusen isoliert und aufgereinigt. Die Reinheit der Mitochondrienpräparation wurde bestätigt durch die Abwesenheit einer Immunreaktion von Antikörpern, die gegen Markerproteine der Plasmamembran ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), des Zellkerns (Histon-Deacetylase 2, HDAC2), des Zytosols (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) sowie des

sarkoplasmatischen Retikulum (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA2a, im Falle der kardialen Mitochondrien) bzw. des endoplasmatischen Retikulums (Calnexin, im Falle der renalen Mitochondrien) gerichtet waren (Abbildung 23). Die Immunreaktion von Antikörpern gegen Calnexin zeigte eine leichte Kontamination der linksventrikulären Mitochondrienpräparation bzw. eine stärkere Verunreinigung der isolierten renalen Mitochondrien. Des Weiteren wurde für die renalen Mitochondrien eine starke zytosolische Kontamination, gezeigt durch die Immunreaktion von anti-GAPDH Antikörper, festgestellt. Die Isolierung mitochondrialer Proteine wurde anhand der Anreicherung des mitochondrialen Markers MnSOD dargestellt.



**Abbildung 23: Analyse zum Nachweis der Reinheit isolierter Mitochondrien.** Es wurden Western Blot Analysen mit Proteinextrakten von WT-RV (Herz Gesamt) und -Nieren (Nieren Gesamt) sowie mit aufgereinigten Mitochondrien (Mito), isoliert aus WT- und NOX4 KO (KO)-LV und -Nieren unter Verwendung von Antikörpern gegen Marker der Plasmamembran (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase), des Zytosols (GAPDH), des Zellkerns (HDAC 2), des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2a), des endoplasmatischen Retikulums (Calnexin) und der Mitochondrien (MnSOD) durchgeführt.

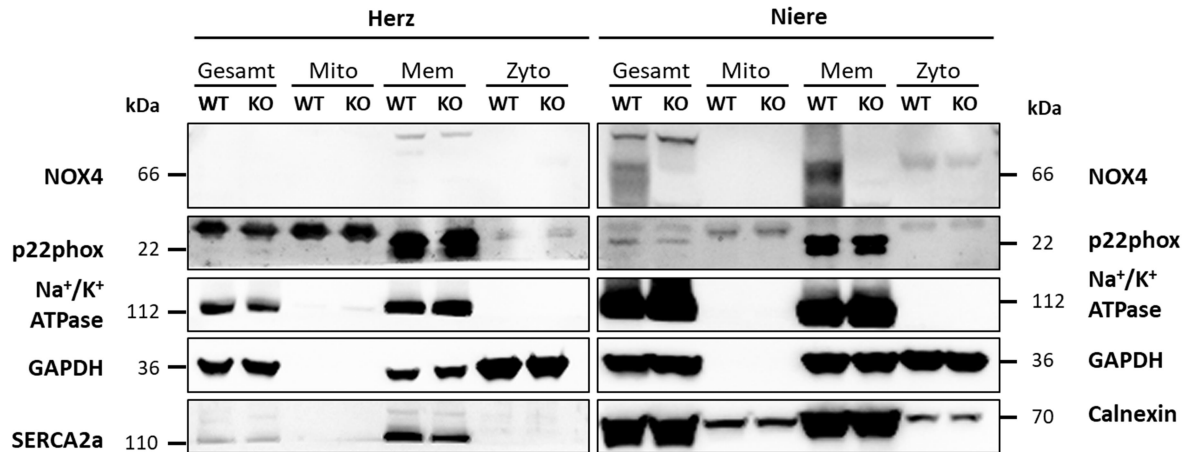
Eine 67 kDa Proteinbande, welche dem Molekulargewicht von NOX4 entspricht, wurde in WT-Nierenlysaten, nicht aber in NOX4 KO-Nierenlysaten (Negativkontrolle) detektiert (Abbildung 24). Dies bestätigte die Spezifität der verwendeten anti-NOX4 Antikörper. In Proteinextrakten von WT-Herzen sowie in WT-Herz- oder Nierenmitochondrien erfolgte keine Immunreaktion mit dem anti-NOX4 Antikörper. Als Negativkontrolle diente ein Western Blot mit Proteinextrakten von WT-RV und -Nieren ohne Verwendung des anti-NOX4 Antikörpers. Anhand der Ponceau S-Färbung im relevanten kDa-Bereich wurde demonstriert, dass die Membran luftblasenfrei war und in den einzelnen Spuren vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden (Abbildung 24).



**Abbildung 24: NADPH-Oxidase 4 ist unter physiologischen Bedingungen nicht in Mitochondrien detektierbar.** Western Blot Analyse zur NOX4-Lokalisation in Proteinextrakten (Gesamt) und in isolierten Mitochondrien (Mito) aus WT- und NOX4 KO (KO)-LV und -Nieren. Als Negativ-Kontrolle (Neg-Kntr.) wurde ein Western Blot mit Proteinextrakten aus rechten Ventrikeln (RV) und Nieren (N) von WT-Mäusen ohne Verwendung von anti-NOX4 Antikörpern durchgeführt.

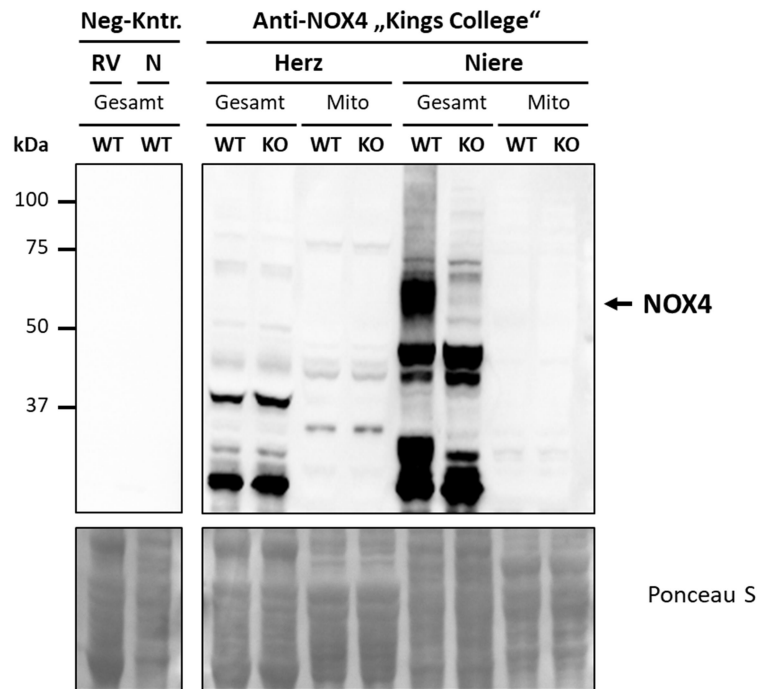
Da NOX4 nicht in Herz- und Nierenmitochondrien detektiert werden konnte, wurden weitere zelluläre Subfraktionen (Membran- und Zytosolfraktion) auf die Lokalisation des NOX4-Proteins im Western Blot untersucht. Zusätzlich wurde auch die Expression des Kofaktors p22phox überprüft, da NOX4 als Dimer mit p22phox vorliegt. Die 67 kDa NOX4-Proteinbande wurde erneut in Gesamt-Nierenextrakten, aber auch in der Membranfraktion aus WT-Niere detektiert (Abbildung 25). Die Spezifität des verwendeten anti-NOX4 Antikörpers wurde wiederholt durch das Fehlen der NOX4-Proteinbande in den entsprechenden Extrakten aus NOX4 KO-Tieren bestätigt. In der Membranfraktion von WT-Ventrikeln konnte keine Immunoreaktion mit dem anti-NOX4 Antikörper nachgewiesen werden. In den Zytosolfractionen von WT-Ventrikeln und WT-Nieren wurde erwartungsgemäß keine Proteinbande für NOX4 detektiert, da es sich bei NOX4 um ein transmembranäres Enzym handelt. Eine Doppel-Proteinbande für den NOX4 Interaktionspartner p22phox, welche im Bereich von 22 kDa lag, wurde in Membranfraktionen aus der Niere und dem Herz sowie in Gesamt-Nierenextrakten aus WT- und NOX4 KO-Mäusen detektiert, nicht jedoch in Extrakten aus dem RV. Zudem erfolgte auch keine anti-p22phox Immunoreaktion in Mitochondrien, welche aus dem Herz oder der Niere isoliert wurden. Die Anreicherung Membran- und Zytosol-spezifischer Proteine wurde durch die Immunoreaktion von

Antikörpern, die gegen Marker der Plasmamembran ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2a) für das Herz bzw. des endoplasmatischen Retikulums (Calnexin) für die Niere und des Zytosols (GAPDH) gerichtet waren, bestätigt.



**Abbildung 25: Subzelluläre Lokalisation von NOX4 und seines Kofaktors p22phox.** Western Blot Analyse der subzellulären Lokalisation von NOX4 und p22phox in Proteinextrakten (Gesamt), in isolierten Mitochondrien (Mito), in Membranfraktionen (Mem) und Zytosolfraktionen (Zyto) von WT- und NOX4 KO (KO)-Herzen und -Nieren unter Verwendung von Antikörpern gegen NOX4, p22phox sowie Markern der Plasmamembran ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), des Zytosols (GAPDH), des Zellkerns (HDAC 2), des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2a), des endoplasmatischen Retikulums (Calnexin) und der Mitochondrien (MnSOD).

Aufgrund der Schwierigkeiten das NOX4-Protein in Mitochondrien oder auch in Gesamt-Herzextrakten zu detektieren, wurde ein weiterer, bereits gut dokumentierter anti-NOX4 Antikörper verwendet. Dieser wurde uns vom Kings College (Prof. Shah) zur Verfügung gestellt und wird daher im Folgenden anti-NOX4 „Kings College“ genannt. Mit dem anti-NOX4 „Kings College“ Antikörper konnten die oben beschriebenen Ergebnisse validiert werden. Die Immunoreaktion für NOX4 in Proteinextrakten aus der WT-Niere fiel zwar deutlich stärker aus, allerdings wurden vermehrt unspezifische Banden detektiert. Das NOX4-Protein wurde auch unter Verwendung dieses Antikörpers nicht in Mitochondrien nachgewiesen (Abbildung 26).

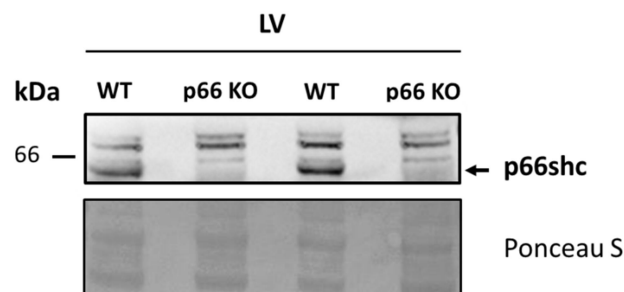


**Abbildung 26: Validierung des Befundes, dass NOX4 unter physiologischen Bedingungen nicht in Herzmitochondrien detektierbar ist.** Western Blot Analyse zur NOX4-Lokalisation in Proteinextrakten (Gesamt) und in Mitochondrien (Mito) isoliert aus WT- und NOX4 KO (KO)-LV und -Nieren (s. Abb. 24). Das NOX4-Protein wurde nach „strippen“ der Membran unter der Verwendung des gut dokumentierten anti-NOX4 Antikörpers vom Kings College detektiert. Als Kontrolle (Neg-Kntr.) wurde eine Western Blot Analyse mit Proteinextrakten (Gesamt) aus rechten Ventrikeln (RV) und Nieren (N) von WT-Mäusen ohne Verwendung des anti-NOX4 Antikörpers durchgeführt.

## 4.2 Funktionelle Relevanz von p66shc bei der Entstehung der rechtsventrikulären Hypertrophie in Folge einer chronischen Druckbelastung (PAB)

### 4.2.1 p66sh-Expression in kardialem Gewebe

Zu Beginn der Studie wurde der Genotyp der Mäuse mit globalem p66shc *knockout* (p66 KO) überprüft (Abbildung 27), indem linksventrikuläre Gewebeextrakte von WT- und p66 KO-Mäusen mit Hilfe von Western Blot Analysen charakterisiert wurden. Anhand einer Ponceau S-Färbung der Membran im relevanten kDa-Bereich konnte eine einheitliche Beladung des Gels demonstriert werden. Eine 66 kDa Proteinbande, die dem Molekulargewicht von p66shc entspricht, wurde in LV von WT-Mäusen, nicht aber von p66 KO-Mäusen, detektiert.



**Abbildung 27: p66shc-Proteinexpression.** Es wurden Western Blot Analysen mit Proteinextraten von Wildtyp (WT, n = 4) und p66shc *knockout* (p66 KO, n = 4) linken Ventrikeln (LV) durchgeführt. Die Färbung mit Ponceau S demonstrierte eine einheitliche Proteinbeladung des Gels.

### 4.2.2 Basale Charakterisierung der Versuchstiere

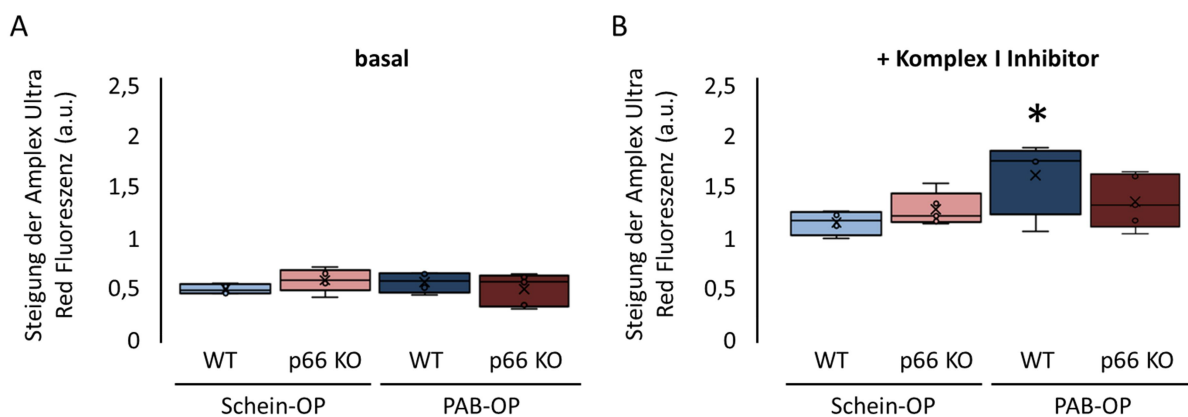
Zum Zweck der basalen Charakterisierung der Versuchstiere wurden das Körpergewicht (KG) und die Herzfrequenz (HF) von WT- und p66 KO-Mäusen nach Schein- oder PAB-Operation dokumentiert. Beide Parameter waren zwischen WT- und p66 KO-Mäusen nach PAB- oder Scheinoperation vergleichbar (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Körpergewicht und Herzfrequenz.** Die Daten zeigen das Körpergewicht (KG) in Gramm (g) sowie die Herzfrequenz (HR) in Schlägen pro Minute (bpm) von Mäusen drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB-OP) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 16 (WT Schein-OP), n = 15 (WT PAB-OP), n = 15 (p66 KO Schein-OP) bzw. von n = 18 (p66 KO PAB-OP) Tieren dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. p = n.s.

	RV	KG [g]	HF [bpm]
Schein-OP	WT	28,6 $\pm$ 3,3	513 $\pm$ 45
Schein-OP	p66 KO	27,2 $\pm$ 3,2	486 $\pm$ 57
PAB-OP	WT	28,9 $\pm$ 3,1	502 $\pm$ 48
PAB-OP	p66 KO	26,6 $\pm$ 2,2	470 $\pm$ 50

#### 4.2.3 Einfluss von p66shc auf die ROS-Produktion rechtsventrikulärer Mitochondrien nach PAB

Um die Bedeutung von p66shc-vermittelten ROS für die Entstehung einer RVH in Folge einer chronisch erhöhten Druckbelastung zu untersuchen, wurde ein Pulmonalarterien *Banding* (PAB) oder eine Scheinoperation in WT- sowie in p66 KO-Mäusen durchgeführt. Nach 22 Tagen wurde die Produktion von ROS in isolierten rechtsventrikulären p66 KO- bzw. WT-Mitochondrien mittels Amplex Ultra Red gemessen. Die Charakterisierung der ROS-Produktion erfolgte ohne (basal) sowie mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon. Unter basalen Messbedingungen unterschied sich die ROS-Produktion zwischen den Genotypen nicht, weder nach Schein-, noch nach PAB-Operation (Abbildung 28 A). Die Behandlung der isolierten Mitochondrien mit Rotenon erhöhte die ROS-Produktion in allen Gruppen. Allerdings war die Rotenon-induzierte ROS-Bildung in RV-Mitochondrien, die von PAB-operierten WT-Mäusen isoliert wurden, signifikant höher als nach Scheinoperation, während dieser Effekt in Mitochondrien, die von PAB-operierten p66 KO-RV isoliert wurden, nicht beobachtet wurde (Abbildung 28 B).



**Abbildung 28: Einfluss von p66shc auf die ROS-Produktion isolierter rechtsventrikulärer Mitochondrien.** Basale (A) und Rotenon-stimulierte (B) ROS-Produktion in isolierten rechtsventrikulären Mitochondrien von WT- und p66 KO-Mäusen drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB-OP) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, das Kreuz den Mittelwert von n = 4 (WT Schein-OP), n = 6 (WT PAB-OP), n = 5 (p66 KO Schein-OP) bzw. von n = 5 (p66 KO PAB-OP) Tieren. \*: p < 0,05 vs. WT Schein-OP, analysiert mittels Zwei-Wege-ANOVA.

#### 4.2.4 Einfluss von p66shc auf die Funktion isolierter Kardiomyozyten nach PAB

Anschließend wurde untersucht, ob die Deletion von p66shc die Funktion von RV-Kardiomyozyten nach dreiwöchiger Druckbelastung oder Scheinoperation beeinträchtigte.

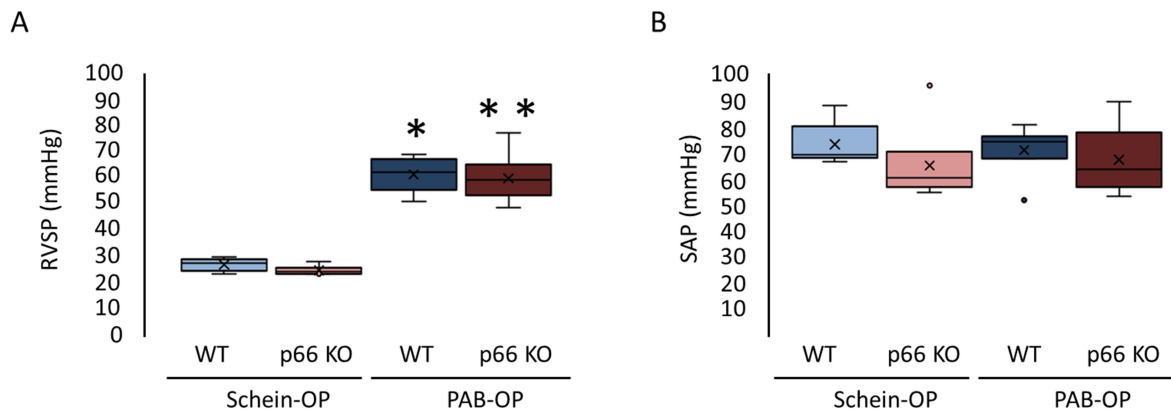
Hierzu wurden die diastolische Zelllänge (L diast), die lastfreie Zellverkürzung (quantifiziert als prozentuale Verkürzungsamplitude normiert auf die diastolische Zelllänge einzelner Zellen, dL/L) sowie die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten (*contraction velocity*, Con Vel und *relaxation velocity*, Rel Vel) charakterisiert. Die diastolische Zelllänge der RV-Kardiomyozyten wurde weder durch die Druckbelastung noch durch den Genotyp der Mäuse verändert. Ebenso wenig wurden die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten von WT- und p66 KO-Kardiomyozyten durch PAB beeinflusst. Allerdings war die lastfreie Zellverkürzung von p66 KO-Kardiomyozyten im Vergleich zu WT-Zellen drei Wochen nach PAB signifikant reduziert (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Funktion isolierter rechtsventrikulärer Kardiomyozyten.** Die Daten zeigen die diastolische Zelllänge (Ldiast in  $\mu\text{m}$ ), die Kontraktionsgeschwindigkeit (Con Vel in  $\mu\text{m/s}$ ), die Relaxationsgeschwindigkeit (Rel Vel in  $\mu\text{m/s}$ ) und die lastfreie Zellverkürzung (dL/L in %) von isolierten rechtsventrikulären (RV) Kardiomyozyten drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 101 Zellen (WT Schein-OP), 153 Zellen (p66 KO Schein-OP), 106 Zellen (WT PAB) bzw. 131 Zellen (p66 KO PAB) dargestellt (4 Mäuse pro Gruppe). #:  $p < 0,05$  vs. WT PAB-OP, analysiert mittels Zwei-Wege-ANOVA.

	RV	Ldiast [ $\mu\text{m}$ ]	Con Vel [ $\mu\text{m/s}$ ]	Rel Vel [ $\mu\text{m/s}$ ]	dL/L [%]
	Schein-OP WT	115,5 $\pm$ 6,8	265 $\pm$ 59	207 $\pm$ 46	10,7 $\pm$ 2,0
	Schein-OP p66 KO	111,6 $\pm$ 8,9	259 $\pm$ 34	242 $\pm$ 32	9,7 $\pm$ 1,2
	PAB-OP WT	113,2 $\pm$ 9,6	288 $\pm$ 67	240 $\pm$ 61	11,3 $\pm$ 1,8
	PAB-OP p66 KO	113,7 $\pm$ 8,6	256 $\pm$ 80	255 $\pm$ 92	9,4 $\pm$ 2,1 #

#### 4.2.5 Hämodynamische Veränderungen nach PAB

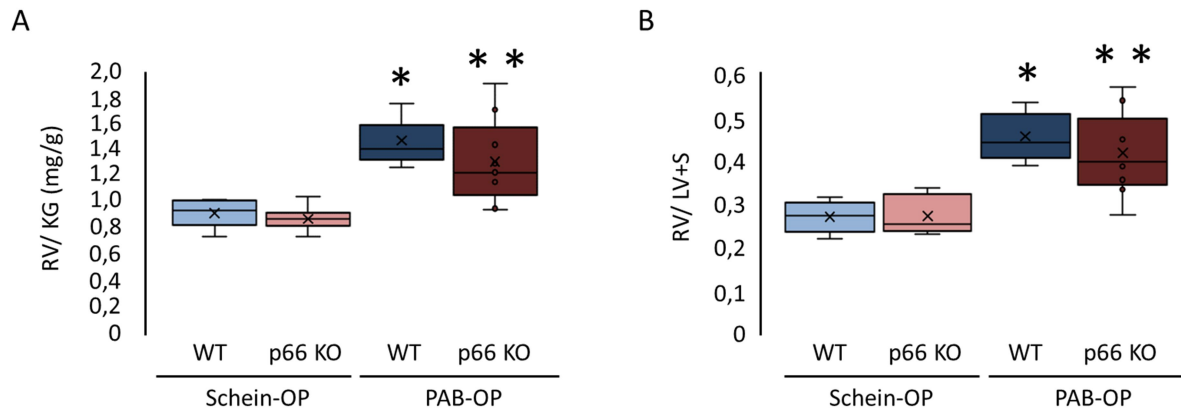
Zur Charakterisierung der Reaktion des RVs auf die Druckbelastung wurden drei Wochen nach PAB- bzw. Scheinoperation der systemische arterielle Druck (SAP) sowie der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) gemessen. Die PAB-Operation induzierte im Vergleich zu der Scheinoperation einen signifikanten und zwischen beiden Mauslinien vergleichbaren Anstieg des RVSP (Abbildung 29 A). Der RVSP von scheinoperierten p66 KO-Tieren war im Vergleich zu scheinoperierten WT-Tieren tendenziell niedriger, statistisch jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Der SAP wurde durch die PAB-Operation nicht beeinflusst und war zwischen den Genotypen vergleichbar (Abbildung 29 B). Auch beim SAP war erneut in der scheinoperierten Gruppe ein tendenziell niedrigerer Druck in p66 KO-Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen erkennbar, der keine statistische Signifikanz erreichte.



**Abbildung 29: Hämodynamische Parameter.** Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP, **A**) und systemischer arterieller Blutdruck (SAP, **B**) von WT- und p66 KO-Mäusen drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB-OP) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, die Kreuze den Mittelwert von  $n = 6$  (WT Schein-OP),  $n = 7$  (WT PAB-OP),  $n = 6$  (p66 KO Schein-OP) bzw. von  $n = 9$  (p66 KO PAB-OP) Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. \*:  $p < 0,05$  vs. WT Schein-OP, \*\*:  $p < 0,05$  vs. p66 KO Schein-OP.

#### 4.2.6 Rechtsventrikuläre Hypertrophie nach PAB

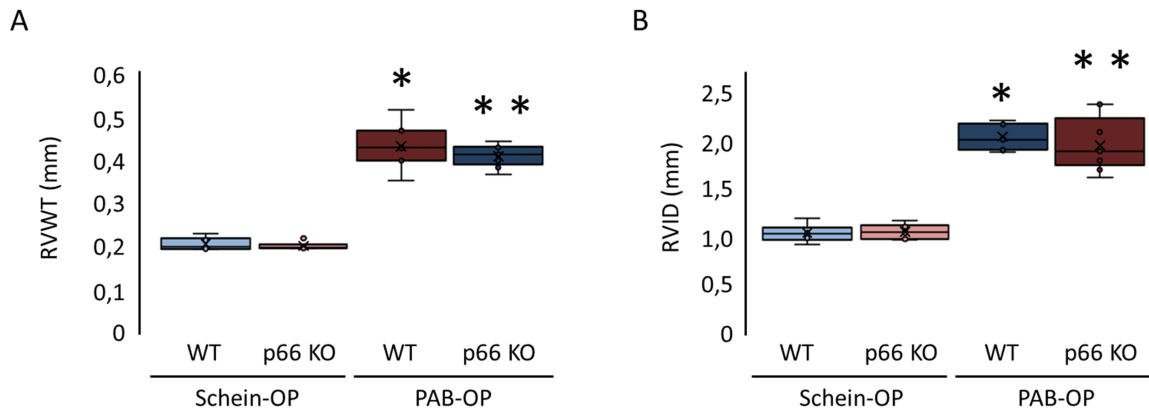
Sowohl der Quotient von rechtem Ventrikel zu Körpergewicht (RV/ KG) als auch von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum (RV/ LV+S) gibt Auskunft über die Größe des RVs und kann somit Hinweise auf den Grad der RV-Hypertrophie liefern. Wie in Abbildung 30 gezeigt, resultierte die chronische Druckbelastung des RVs bei beiden Genotypen gleichermaßen in einem signifikant erhöhten RV/ KG (A) und RV/ LV+S (B) im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolltieren.



**Abbildung 30: Rechtventrikuläre Hypertrophie drei Wochen nach PAB.** Darstellung der Gewichtsverhältnisse des rechten Ventrikels zum Körpergewicht (RV/ KG, **A**) und des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel plus Septum (RV/ LV+S, **B**) von WT- und p66 KO-Mäusen drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB-OP) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, die Kreuze den Mittelwert von n = 6 (WT Schein-OP), n = 7 (WT PAB-OP), n = 6 (p66 KO Schein-OP) bzw. von n = 9 (p66 KO PAB-OP) Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. \*: p < 0,05 vs. WT Schein-OP, \*\*: p < 0,05 vs. p66 KO Schein-OP.

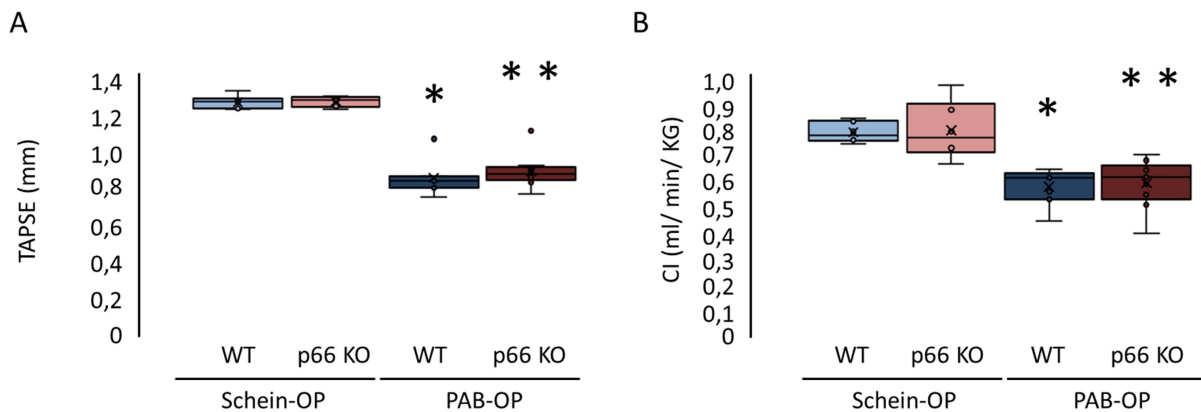
#### 4.2.7 Echokardiographische Untersuchungen zur rechtsventrikulären Hypertrophie und Funktion nach PAB

Um die RVH sowie die Herzfunktion beurteilen zu können, wurden drei Wochen nach erfolgter PAB- oder Scheinoperation echokardiographische Messungen durchgeführt. In Abbildung 31 A ist die rechtsventrikuläre Wanddicke (*right ventricular wall thickness*; RVWT), ein Parameter für die Hypertrophie des RVs, dargestellt. PAB operierte WT- und p66 KO-Mäuse wiesen im Gegensatz zu scheinoperierten Tieren eine signifikante Verdickung der rechtsventrikulären freien Wand auf. Zwischen den beiden Genotypen bestand im Hinblick auf die RVWT kein Unterschied, weder in der scheinoperierten noch in der PAB-operierten Gruppe. Der rechtsventrikuläre innere Durchmesser (RVID), ein Indikator für die Dilatation des RVs, war in RV von PAB-operierten Mäusen im Vergleich zu RV von scheinoperierten Tieren signifikant vergrößert, wobei erneut keine Unterschiede zwischen den Genotypen in beiden Gruppen (PAB-OP vs. Schein-OP) nachgewiesen wurden (Abbildung 31 B).



**Abbildung 31: Echokardiographische Messungen zur rechtsventrikulären Hypertrophie und Dilatation.** Rechtsventrikuläre Wanddicke (RVWT, **A**) und rechtsventrikulärer innerer Durchmesser (RVID, **B**) von WT- und p66 KO-Mäusen drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB-OP) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, die Kreuze den Mittelwert von  $n = 6$  (WT Schein-OP),  $n = 7$  (WT PAB-OP),  $n = 6$  (p66 KO Schein-OP) bzw. von  $n = 9$  (p66 KO PAB-OP) Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. \*:  $p < 0,05$  vs. WT Schein-OP, \*\*:  $p < 0,05$  vs. p66 KO Schein-OP.

Die Funktion des RVs kann durch den Parameter TAPSE (*tricuspid annular plane systolic excursion*) ausgedrückt werden. Wie in Abbildung 32 A zu sehen ist, wiesen die PAB-operierten Tiere signifikant niedrigere Werte auf als scheinoperierte Tiere. Die Werte zwischen WT- und p66 KO-Tieren waren in beiden OP-Gruppen vergleichbar. Ein weiterer wichtiger Parameter für die Herzfunktion ist das Herzzeitvolumen im Verhältnis zum Körpergewicht (CI, *cardiac index*). Aus Abbildung 32 B ist ersichtlich, dass der CI in PAB-operierten WT- und p66 KO-Tieren im Vergleich zu scheinoperierten Tieren signifikant abnahm. Statistisch wurde kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt.



**Abbildung 32: Echokardiographische Messungen zur rechtsventrikulären Herzfunktion.** *Tricuspid annular plane systolic excursion* (TAPSE, **A**) und Herzzeitvolumen bezogen auf das Körpergewicht (*cardiac index*, CI, **B**) von WT- und p66 KO-Mäusen drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB-OP) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind in Quartilen von 25 %, 50 % und 75 % dargestellt, wobei die Whisker das gesamte Spektrum der Datenverteilung repräsentieren. Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, die Kreuze den Mittelwert von n = 6 (WT Schein-OP), n = 7 (WT PAB-OP), n = 6 (p66 KO Schein-OP) bzw. von n = 9 (p66 KO PAB-OP) Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. \*: p < 0,05 vs. WT Schein-OP, \*\*: p < 0,05 vs. p66 KO Schein-OP.

Um mögliche Effekte der p66shc-Deletion auf die Funktion des RVs besser erfassen zu können, wurden die echokardiographisch gewonnenen Daten der Tiere aller Studiengruppen (ROS, Kardiomyozyten-Funktion, Hämodynamik) zusammengefasst und so ein höherer n-Wert für die statistische Analyse erreicht (Tabelle 4). Es wurden jedoch auch bei dieser Analyse keine Unterschiede in der Entwicklung der RVH und der Beeinträchtigung der RV-Funktion zwischen WT- und p66 KO-Mäusen drei Wochen nach PAB- oder Scheinoperation gefunden.

**Tabelle 4: Echokardiographische Messungen zur rechtsventrikulären Hypertrophie und Funktion.** Die Daten zeigen die rechtsventrikuläre Wanddicke (RVWT), die *tricuspid annular plane systolic excursion* (TAPSE) und das Herzzeitvolumen im Verhältnis zum Körpergewicht (*cardiac index*, CI) von WT- und p66 KO-Mäusen drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB-OP) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 16 (WT Schein-OP), n = 15 (WT PAB-OP), n = 15 (p66 KO Schein-OP) bzw. von n = 18 (p66 KO PAB-OP) Tieren dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. \*: p < 0,05 vs. WT Schein-OP, \*\*: p < 0,05 vs. p66 KO Schein-OP.

	RV	RVWT (mm)	TAPSE (mm)	CI (ml/min/g BW)
Schein-OP	WT	0,22 $\pm$ 0,02	1,21 $\pm$ 0,1	0,80 $\pm$ 0,1
Schein-OP	p66 KO	0,21 $\pm$ 0,01	1,25 $\pm$ 0,1	0,79 $\pm$ 0,1
PAB-OP	WT	0,46 $\pm$ 0,04*	0,79 $\pm$ 0,1*	0,59 $\pm$ 0,1*
PAB-OP	p66 KO	0,45 $\pm$ 0,04**	0,82 $\pm$ 0,1**	0,55 $\pm$ 0,1**

## 5. Diskussion

### 5.1 Funktionelle Relevanz und Lokalisation der NOX4 in Mitochondrien des linken Ventrikels unter physiologischen Bedingungen

Für NOX4 wurden bislang verschiedene subzelluläre Lokalisationen beschrieben, darunter die Plasmamembran, der Zellkern, das endoplasmatische Retikulum sowie die Mitochondrien [135, 139, 205]. Passend dazu konnte unser Kooperationspartner H.H.W. Schmidt NOX4 als einen potentiellen neuen Interaktionspartner für mitochondriale Proteine wie die Komplex I-Komponenten NADH-Dehydrogenase Untereinheiten 1 und 4L identifizieren. Zu Beginn der Studien lagen jedoch keine eindeutigen Evidenzen vor, ob NOX4 unter physiologischen Bedingungen in kardialen Mitochondrien lokalisiert und dort auch funktionell aktiv ist.

#### 5.1.1 NOX4 im Herzen

NOX4 wurde ursprünglich in der Niere als Renox, ein stark exprimiertes Homolog der NADPH-Oxidasen, identifiziert [113, 114]. Die Untersuchung verschiedener Organe der Maus auf die Expression von NOX4-mRNA mittels Northern Blot ergab, dass NOX4-mRNA ausschließlich in der Niere, nicht aber im Herzen oder anderen Organen wie Lunge, Leber oder Gehirn transkribiert wird [113, 114]. Dies zeigte eindeutig, dass die Niere das Organ mit der höchsten NOX4-Expression ist und diese diente seither in den meisten Studien als Positivkontrolle. Allerdings konnte mit Hilfe der wesentlich sensitiveren PCR-Methode NOX4-mRNA auch im Herzen nachgewiesen werden [106, 206, 207].

Darüber hinaus wurde NOX4-Expression im Herzen auch auf Proteinebene mittels Western Blot demonstriert [125, 139, 208, 209]. Im Gegensatz zu diesen Studien konnte das NOX4-Protein im Rahmen dieser Arbeit in Proteinextrakten aus dem Herzen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 24). Die Tatsache, dass wir im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen NOX4 immunoreaktiv nicht im Herzen detektieren konnten, könnte durch die Verwendung von unterschiedlichen anti-NOX4 Antikörper herrühren. Die Auflistung verschiedener anti-NOX4 Antikörper zeigte [71], dass für NOX4 verschiedene Proteingrößen im Bereich von 55-90 kDa durch unterschiedliche Antikörper in denselben Geweben nachgewiesen wurden. Dies könnte, zumindest teilweise, auf die Unspezifität einiger Antikörper zurückzuführen sein. Die in dieser Arbeit verwendeten anti-NOX4 Antikörper waren gegen den C-Terminus

von NOX4 (Abcam: Aminosäurereste 564-578, „Kings College“: Aminosäurereste 556-568) gerichtet, gut validiert und detektieren eine Bande im Bereich des vorhergesagten Molekulargewichts von NOX4 (67 kDa) in der WT-Niere, nicht aber in der NOX4 KO-Niere. Dies stimmte mit den Befunden in der Literatur überein [106, 137, 138, 210] und entsprach den Erwartungen, da die im Rahmen dieser Arbeit verwendete NOX4 KO-Mauslinie durch Deletion von Exon 14 und 15 generiert wurde [197] und die Deletion dieser Exons zum Verlust der im C-Terminus lokalisierten NADPH-Bindungsdomäne führte. Folglich kam es in NOX4 KO-Geweben zu keiner Immunreaktion mit den verwendeten Antikörpern. Im Gegensatz dazu detektierten Ago und Kollegen eine NOX4-Proteinbande im Bereich zwischen 50 und 75 kDa in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte sowie in Gesamtextrakten aus dem Herzen und der Niere der Maus mit einem anti-NOX4 Antikörper, der gegen die Aminosäurereste 307-578 in der C-terminalen Region von NOX gerichtet war und von der Arbeitsgruppe selbst hergestellt wurde [139]. Mit demselben Antikörper detektierten auch Kuroda et al. und Matsushima et al. eine NOX4-Proteinbande in WT-Herzen der Maus, die deutlich vermindert in Kardiomyozyten-spezifischen NOX4 KO-Herzen sowie verstärkt in transgenen NOX4-Herzen erkennbar war [138, 209]. Auch wenn dieser Antikörper keine Kreuzreaktionen mit NOX2 aufwies, zeigte keine der genannten Studien einen Nachweis über die allgemeine Spezifität des Antikörpers (ungeschnittene Membranen, um die Menge an unspezifisch gebundenem Antikörper beurteilen zu können). Auch die Angabe des Molekulargewichts der detektierten NOX4-Proteinbande fehlte in letzteren beiden Studien, sodass dieses nicht mit der Literatur verglichen werden konnte. Zhang und Kollegen sowie eine aktuelle Studie verwendeten den in dieser Arbeit ebenfalls eingesetzten „Kings College“-Antikörper [211]. Dieser detektierte eine prominente NOX4-Proteinbande in WT-Nieren, nicht jedoch in NOX4 KO-Nieren sowie eine relativ schwache NOX4-Proteinbande im adulten WT-Mauser Herzen unter basalen Bedingungen [106, 208], was unsere Ergebnisse weitestgehend unterstützt. Die Tatsache, dass das NOX4-Protein in der vorliegenden Arbeit im Herzen nicht nachweisbar war, könnte an einer zu geringen Proteinmenge bei der Western Blot Analyse liegen. Die entsprechende Information ist in der Literatur oft nicht angegeben, sodass der Vergleich der hier erhobenen Daten mit denen anderer Studien [138, 139, 209] nicht möglich ist. Dennoch gaben zwei Studien [208, 211] an, 40 µg Proteinextrakt für Western Blot Analysen eingesetzt zu haben; eine Proteinmenge, die im Rahmen dieser Studie ebenfalls verwendet wurde. Jedoch untersuchten Anilkumar und Kollegen Extrakte von NOX4-überexprimierenden humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen), sodass die untersuchten 40 µg einen deutlich höheren NOX4-Proteinanteil aufwiesen [211]. Die Studie

von Schnelle und Kollegen hingegen untersuchte scheinoperierte WT-Herzen der Maus, sodass in diesem Fall endogenes NOX4 untersucht und nachgewiesen wurde [208].

Auch die untersuchte Spezies könnte bei dem Nachweis des NOX4-Proteins unter basalen Bedingungen eine Rolle spielen. Studien, die NOX4-Proteinexpression in primären Kardiomyozyten zeigten, stammten überwiegend aus der Ratte [139, 209, 212]. Maus und Ratte könnten sich jedoch hinsichtlich der NOX4-Expression im Herzen unterscheiden. Ein Beispiel für solch einen Spezies-Unterschied ist die MAO, deren Isoform A vor allem im Herzen der Ratte und die Isoform B im Herzen der Maus exprimiert wird [213]. Die Aminosäuresequenz des NOX4-Proteins ist zwischen Ratte und Maus zu 97 % identisch, sodass die Spezies-Unterschiede in dem Bereich der Aminosäuresequenz, die von zwei der oben beschriebenen Antikörpern (Abcam und Ago/Kuroda) erkannt wurden, potentiell zu einer unterschiedlichen Antikörperbindung an das NOX4-Protein bei der Maus und der Ratte führen (Aminosäuresubstitutionen in Position 400, 476 und 558) und so die Unterschiede zwischen den vorliegenden Befunden und den Daten zumindest einiger Studien erklären könnten [139, 209, 212]. Der „Kings College“-Antikörper hingegen detektierte einen Bereich der NOX4-Aminosäuresequenz, der zwischen Mensch, Ratte und Maus konserviert ist [211], sodass die Spezies bei diesem Antikörper keine Rolle spielte. Ein Vergleich zur Proteinexpression von NOX4 im Herzen der Ratte und der Maus unter Einsatz dieses Antikörpers wurde nach aktuellem Kenntnisstand jedoch noch nicht durchgeführt.

Darüber hinaus kann auch das Alter der Versuchstiere für die endogene Proteinexpression von NOX4 relevant sein. Berichten zufolge, war die NOX4-Proteinmenge in neonatalen Herzen geringer als in adulten Herzen und nahm mit dem Alter zu (3-6-12 Monate) [139]. Andere hingegen demonstrierten, dass die NOX4-mRNA-Spiegel im fetalen Herzen höher waren als im adulten Mausherzen, und dass die mRNA-Menge mit zunehmendem Alter (3 und 12 Monate) sogar abnahm [106]. Letzteres passt auch zu den Beobachtungen, dass NOX4 im adulten, gesunden Herzen in geringer Menge vorliegt. Tatsächlich demonstrierten Brewer und Kollegen, dass die NOX4-mRNA-Konzentration innerhalb von 1-2 Wochen nach der Geburt im Mäuseherzen stark abnahm. Das NOX4-Protein war in dieser Studie zwei Wochen nach Geburt bei einer eingesetzten Proteinmenge von 50 µg nur schwach nachweisbar [214]. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit eine vergleichbare Proteinmenge von 40 µg im Western Blot untersucht wurde, waren die untersuchten Tiere mit 8 Wochen deutlich älter. Dies könnte unsere Schwierigkeiten, NOX4 im Herzen der adulten Maus unter physiologischen

Bedingungen nachzuweisen, erklären. Allerdings muss erwähnt werden, dass das Alter der Versuchstiere mit 7-12 Wochen in der Studie von Schnelle und Kollegen durchaus mit dem Alter der in dieser Arbeit verwendeten Tiere vergleichbar war. Zusammen mit den Übereinstimmungen der verwendeten Antikörper und der eingesetzten Proteinmenge zwischen erwähnter Studie und der hier vorliegenden Arbeit könnte schließlich die eingesetzte Antikörperkonzentration sowie die Lysebedingungen ausschlaggebend für die Unterschiede im Nachweis von endogenem NOX4 unter physiologischen Bedingungen sein. Vor Beginn der Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Antikörperkonzentrationen getestet und schließlich die höchste gewählt, bei der der Antikörper lediglich 1:250 verdünnt wurde. Auch wenn Angaben zur eingesetzten anti-NOX4 Antikörperkonzentration in der Literatur fehlen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Andere eine noch größere Antikörpermenge für den Nachweis von NOX4 verwendet haben. Da NOX4 ein transmembranäres Protein ist, könnte der Erfolg der NOX4-Extraktion aus zellulären Membranen vom verwendeten Lysepuffer bzw. der Extraktionsmethode abhängen. Während in vielen Studien die Proteinextraktion aus Geweben durch RIPA-Lysepuffer vorgenommen wurde, erfolgte die Gewebelyse im Rahmen dieser Arbeit mittels Lämmli-Puffer in Kombination mit Ultraschallwellen. Beide Puffer enthielten SDS als ionisches Detergens, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen (2 % in Lämmli- und 0,1 % in RIPA-Puffer). Trotz der höheren Detergensenkonzentration und dem Einsatz von Ultraschallwellen war das NOX4-Protein in Extrakten aus dem Herzen der Maus im Western Blot nicht nachweisbar. Als möglicher Kritikpunkt könnte eine zu „aggressive“ Lyse des Gewebes in Betracht gezogen werden, die möglicherweise eine Degradation des Proteins verursacht haben könnte, allerdings erzielte die Proteinextraktion mit der hier gewählten Methode ein deutliches und stärkeres NOX4-Signal in der WT-Niere. Im Vergleich dazu konnte NOX4 nach „milderer“ Extraktion mittels konventionell erhältlichem Lysepuffer, welcher Triton als nicht-ionisches Tensid enthielt, und ohne Ultraschallbehandlung nicht in Nierenextrakten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Da NOX4 ein konstitutiv aktives Enzym ist, dessen Aktivität hauptsächlich durch dessen Expression reguliert wird [215] berichten Studien, dass die Proteinmenge von NOX4 im gesunden Herzen (unter physiologischen Bedingungen) sehr gering zu sein scheint [106, 214]. Durch verschiedene Stressoren wie Hypoxie, Ischämie und hämodynamische Belastung kann die Proteinmenge von NOX4 jedoch gesteigert werden [106]. Eine aktuelle Studie demonstrierte, dass die kardiale NOX4-mRNA- und Protein-Expression auch nach akuter,

mäßiger sportlicher Aktivität induziert wurde, während die NOX4-Expression im kardialen Gewebe von sitzenden Kontrolltieren sehr gering war [216].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Daten aus der Literatur darauf hin deuten, dass NOX4 im Herzen exprimiert wird. Unter den von uns gewählten Bedingungen lag das NOX4-Protein im Gesamtextrakt aus Mäuseherzen jedoch unterhalb der Detektionsgrenze. Dennoch schließen unsere Ergebnisse nicht aus, dass NOX4 unter physiologischen Bedingungen in einer geringen Menge im adulten Mäuseherzen vorliegt und dass die Expression unter pathologischen Bedingungen soweit gesteigert werden kann, dass ein Nachweis von NOX4 im Herzen möglich wird.

### 5.1.2 NOX4 in Mitochondrien

Die exakte Lokalisation der NOX4 innerhalb der Zelle ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Die konfokale Mikroskopie deutete darauf hin, dass NOX4 in der Plasmamembran (PM), im ER- und der perinukleären Region lokalisiert sein könnte [217]. Andere Studien berichteten, dass NOX4 spezifisch in fokalen Adhäsionen, entlang von Stressfasern und im Nukleus lokalisiert war [98, 129]. Darüber hinaus sind verschiedene Spleißvarianten von NOX4 beschrieben worden, die Zelltyp-spezifisch in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sein können [73]. Die 28 kDa Variante NOX4D, der die putative TM-Domäne fehlt, wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie im Zellkern verschiedener Zelltypen identifiziert. [136]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigten Studien mit fluoreszierenden Fusionsproteinen in lebenden Zellen ebenfalls ER- oder PM-Färbung [97, 135]. Ebenso zeigten Epitop-markierte Formen von NOX4 und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)-Färbung von NOX4 in transfizierten Zellen eine Endomembran/ER-Lokalisation [108, 130, 205]. Der Lebendzell-Ansatz ist frei von potenziellen Antikörper-Problemen (unspezifische oder schlechte Antikörperbindung) oder Fixierungs- und Permeabilisierungs-Artefakten, ist aber wie die Epitop-Markierung von der korrekten Faltung und dem korrekten zielgerichteten Transport (*Targeting*) des chimären Transgens abhängig und auf Zelltypen beschränkt, die sich für eine Transfektion eignen. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass die Lokalisation von überexprimiertem NOX4 nicht zwangsläufig die physiologische Lokalisation von endogenem NOX4 reflektiert. Es gibt Berichte über die irrtümliche Zuordnung von Proteinen in Kern- oder Mitochondrienkompartimenten, die in diesen Organellen eindeutig nicht vorhanden oder funktionell sind [218].

Dass NOX4 in so vielen verschiedenen Kompartimenten beschrieben wurde, kann unterschiedliche Gründe haben. Ein möglicher Faktor könnte der Zelltyp sein, wobei der Mechanismus für eine Zelltyp-spezifische Lokalisation nicht bekannt ist [72]. Außerdem wird vermutet, dass NOX4 von einem intrazellulären Kompartiment in ein anderes wandern kann, sodass einige Lokalisationen möglicherweise zeitlich begrenzt sein können [98, 135].

Eine aktuelle Studie demonstrierte mittels Elektronenmikroskopie, konfokaler Mikroskopie sowie mit Hilfe des *proximity in situ ligation* Assays zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen, dass NOX4 mit Markern der Mitochondrien-assoziierten ER-Membran (MAM) wie der Langkettigen-Fettsäure-CoA-Ligase 4 (FACL4) und dem Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor (InsP3R) kolokalisiert bzw. in räumlicher Nähe zu diesen lokalisiert zu sein scheint [212]. Die MAM reguliert verschiedene zelluläre Funktionen, indem sie die Kommunikation zwischen dem ER und den Mitochondrien, z. B. durch den Transfer von Kalzium vermittelt [219-221]. Ein wichtiger Kanal für die Kalziumfreisetzung aus dem ER ist der InsP3R, während die Kalziumaufnahme in die Mitochondrien durch den spannungsabhängigen Anionen-Kanal (VDAC) an der äußeren Mitochondrienmembran und den mitochondrialen Kalzium-Uniporter-Komplex (MCU) an der inneren Mitochondrienmembran vermittelt wird [222]. Interessanterweise wurde zuvor berichtet, dass NOX4 mit dem ER-Chaperon Calnexin interagiert [223], das ebenfalls an der MAM angereichert ist. Die Studie von Beretta und Kollegen, in der Kardiomyozyten der Ratte sowie Extrakte aus dem Gesamtherz und der Niere der Ratte in Zytosol, ER, grobe und reine Mitochondrienfraktion sowie in MAM subfraktioniert wurden, berichtete, dass NOX4 in der ER- und der MAM-Fraktion stark angereichert vorlag. In der Mitochondrienfraktion von Kardiomyozyten, die unter NOX4-stimulierenden Bedingungen kultiviert wurden, wurde keine NOX4-Proteinbande detektiert, während in der Mitochondrienfraktion aus den Gesamtextrakten aus Herz und Niere eine schwache NOX4-Proteinbande im Western Blot sichtbar war [212]. Eine naheliegende Begründung dafür, dass unter Bedingungen von erhöhter NOX4-mRNA- und Proteinexpression keine Proteinbande in Mitochondrien aus Kardiomyozyten detektiert wurde, ist die deutlich reinere Mitochondrienpräparation in dieser Versuchsgruppe. Im Gegensatz dazu war in der Mitochondrienpräparation, die aus den Gesamtorganen (ohne induzierte NOX4-Expression) stammte, eine deutliche Kontamination mit Markern des ER und der MAM erkennbar. Beretta et al. postulierten in dieser Studie einen neuen NOX4-abhängigen Signalweg, der Zellen vor dem regulierten Zelltod (*regulated cell death*, RCD) durch ein räumlich begrenztes Redox-Signal an der MAM schützt. Indem in der MAM

lokalisiertes NOX4  $H_2O_2$  generiert, kommt es durch die Hemmung der PP2a zur Aktivitätssteigerung der Akt, die wiederum die Kalziumfreisetzungsaktivität vom InsP3R hemmt [212]. Dadurch kann die durch Kalziumüberladung induzierte Öffnung der mPTP verhindert werden. Dieser Signalweg deutet darauf hin, dass NOX4-Aktivität mitochondriale Funktionen indirekt regulieren könnte. Dafür müsste NOX4 nicht zwangsläufig innerhalb der Mitochondrien, sondern lediglich in räumlicher Nähe zu diesen Organellen lokalisiert sein.

NOX4 besitzt jedoch, wie andere Proteine, die innerhalb von Mitochondrien lokalisiert sind, eine putative Mitochondrien-Lokalisationssequenz [224]. Außerdem wurde durch die Verwendung des MitoProt II 1.0a4 Prognoseprogramms für NOX4 eine 97%ige Wahrscheinlichkeit vorhergesagt, dass NOX4 in Mitochondrien lokalisiert ist. Daten, die von unserem Kooperationspartner Harald H.H.W. Schmidt mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System erhoben wurden, deuten darauf hin, dass NOX4 ein mögliches, neues Bindeprotein für den mitochondrialen Atmungsketten-Komplex I ist und somit potentiell innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist. Hinweise aus der Literatur deuten ebenfalls darauf hin, dass NOX4 in Mitochondrien von Skelettmuskelzellen [225], Kardiomyozyten und Nierenzellen lokalisiert sein könnte [137, 139]. Die Studie von Block et al. untersuchte erstmals, ob NOX4 in renalen Mitochondrien der Ratte vorliegt. Dabei zeigte die konfokale Mikroskopie eine Ko-Lokalisation des mitochondrialen Markers Mitotraker Green und NOX4 in renalen glomerulären Mesangiumzellen (MZ) und -Endothelzellen sowie in nicht-renalen Zellen, wie Endothelzellen der Aorta und VSMC [137]. Ago und Kollegen zeigten darüber hinaus eine Ko-Lokalisation von NOX4 mit der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP-Synthase und mit p22phox in kultivierten Kardiomyozyten der Ratte [139]. In fokalen Adhäsionen, entlang von Stressfasern, im Nukleus und im ER kolokalisierte NOX4 ebenfalls mit der p22phox-Untereinheit [97, 98, 129]. Mit Hilfe der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-Technik und von Ko-Immunoprecipitationsexperimenten wurde außerdem eine direkte Wechselwirkung von NOX4 und p22phox demonstriert [97, 226]. Tatsächlich ist die Interaktion von NOX4 mit p22phox für die NOX4-Aktivität erforderlich [97, 98, 129], da der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von p22phox in NOX4-überexprimierenden HEK293-Zellen zwar keinen Einfluss auf die NOX4-Expression zeigte, jedoch die NOX4-vermittelte ROS-Produktion in p22phox-defizienten Zellen vollständig inhibierte. Die Transfektion der Zellen mit p22phox-kodierenden Plasmiden stellte die  $H_2O_2$ -Produktion wieder her [227]. Umgekehrt benötigt auch p22phox die Interaktion mit NOX4, um stabilisiert zu werden [97, 226]. Daher wird angenommen, dass NOX4 und p22phox nur als Heterodimere stabil sind,

während Monomere durch das Proteasom abgebaut werden [228]. Im Gegensatz zu NOX4 ergab die Analyse mit dem MitoProt II 1.0a4 Prognoseprogramm jedoch lediglich eine 0,02 %ige Wahrscheinlichkeit, dass p22phox in Mitochondrien lokalisiert ist und schließt diese Möglichkeit weitestgehend aus [141]. Auch im Western Blot wurde demonstriert, dass p22phox nicht in der Mitochondrienfraktion von renalen Krebszellen [141] und Endothelzellen [229] lokalisiert war. Diese Befunde, zusammen mit der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Abwesenheit des p22phox-Proteins in isolierten Mitochondrien aus dem Herzen und der Niere, untermauern auch die hier demonstrierte Abwesenheit des NOX4-Proteins in diesen Organellen unter den von uns gewählten Bedingungen (Abbildung 25). Neben der 65 kDa großen Variante, könnte potentiell eine alternative Spleißvariante in Mitochondrien lokalisiert sein. Da NOX4D die im C-Terminus lokalisierten NADPH- und FAD-Bindungsdomänen enthält [73], konnte diese Variante potentiell mit den von uns verwendeten Antikörpern immunoreaktiv detektiert werden (Aminosäurereste 556-568 im C-Terminus [211]). Tatsächlich wurde eine 28 kDa Bande in der Positivkontrolle, nicht aber in der Negativkontrolle festgestellt, die jedoch weder in renalen, noch in kardialen WT-Mitochondrien vorhanden war (Abbildung 24).

Andere Studien hingegen konnten die mittels indirekter Immunfluoreszenz erbrachten Hinweise auf die mitochondriale Lokalisation von NOX4 mittels Western Blot Analysen verifizieren, indem diese das NOX4-Protein in isolierten, Percoll-gereinigten Mitochondrien aus der Nierenrinde der Ratte und aus glomerulären MZ [137] sowie in der mitochondrialen und mikrosomalen Fraktion von transgenen und nicht-transgenen NOX4-Herzen der Maus [139] detektierten. Eine weitere Studie berichtete außerdem, dass NOX4 in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert zu sein scheint [230]. Ein falsch-positiver Befund könnte durch Kontamination der Mitochondrien mit Kompartimenten, die NOX4 enthalten, hervorgerufen werden, weshalb der Nachweis über die Reinheit der mitochondrialen Präparation von fundamentaler Bedeutung ist. Ein solcher Nachweis wurde in manchen Studien nicht oder nur unvollständig erbracht [141, 231]. Andere Gruppen untersuchten jedoch saubere Mitochondrienpräparationen [137, 139]. Dort wurden Mitochondrien aus relativ alten (12 Monate) Mäuseherzen isoliert, die den Daten der Studie zu Folge eine deutlich höhere NOX4-Expression aufwiesen als jüngere Tiere [139], oder sie stammten aus der Niere von Ratten [137], einer Spezies von der nicht bekannt ist, ob diese im Vergleich zu Mäusen möglicherweise mehr NOX4 exprimiert oder in der NOX4 in anderen subzellulären Kompartimenten lokalisiert ist. Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass aus bislang nicht

bekannten Gründen, bestimmte Motive wie die putative Mitochondrien-Lokalisationssequenz nicht von allen Zelltypen genutzt werden [72]. Die Translokation von NOX4 in Mitochondrien könnte somit auch vom Stimulus abhängig sein, wie es z.B. bei p66shc der Fall ist, sodass nach einem Stimulus, der die NOX4-Expression erhöht, auch die mitochondriale NOX4-Proteinmenge zunehmen könnte. Dies würde auch die Diskrepanz erklären, wieso einige Gruppen mitochondriales NOX4 nachweisen konnten und andere nicht.

Es lässt sich schlussfolgern, dass viele Indizien vorliegen, die eine Lokalisation von NOX4 innerhalb von bzw. in räumlicher Nähe zu Mitochondrien vermuten lassen. Die Hypothese, dass NOX4 innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist, wurde jedoch bislang durch das Fehlen von Daten über mitochondriales p22phox, welches für die enzymatische Aktivität unabdingbar ist, nicht bestätigt. Unsere Daten schließen eine solche Lokalisation von NOX4 auch nicht vollends aus, da die Schwierigkeiten, NOX4 in kardialen Gesamtproteinextrakten sowie kardialen und renalen Mitochondrien zu detektieren, von einer zu geringen NOX4-Proteinmenge, den gewählten Lysebedingungen oder einer nicht ausreichenden Sensitivität der verwendeten Antikörper in diesen Geweben herrühren könnten.

### 5.1.3 NOX4-Aktivität in Mitochondrien

Parallel zur mitochondrialen Lokalisation von NOX4 mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde eine mitochondriale NOX4-Aktivität unter Verwendung zweier pharmakologischer NOX-Inhibitoren, dem NOX1/4-Inhibitor GKT136901 und dem pan Inhibitor VAS2780, untersucht. Der Wirkmechanismus von GKT136901 ist zwar bislang nicht bekannt, dennoch sind GKT136901 und sein Derivat GKT137831 zur Zeit die am besten charakterisierten NOX-Inhibitoren auf dem Markt, da kaum *off-target* Effekte bekannt sind und die Substanzen pharmakokinetisch gut charakterisiert sind [232]. Eine Konzentrations-Wirkungskurve von GKT136901 auf NOX4, NOX1, NOX2 und die Xanthinoxidase demonstrierte, dass GKT136901 im Konzentrationsbereich von 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M NOX4 sowie NOX1 zu ca. 80 % hemmte und mit einer geringeren Wirkung von 60 % auch NOX2. Die Hemmungskonstante  $K_i$  betrug für NOX4 ca. 1,6  $\mu$ M, für NOX1 1,5  $\mu$ M und für NOX2 ca. 15  $\mu$ M. Der  $K_i$ -Wert von GKT136901 für die Xanthinoxidase war mit  $>100$   $\mu$ M deutlich höher [210]. VAS2780 ist ein Triazolopyrimidin, welches ursprünglich als NOX2-Inhibitor entwickelt wurde. Es handelt sich um einen gut validierten Inhibitor ohne intrinsische antioxidative Aktivität, der auch keine anderen Flavoproteine inhibiert. VAS2780 hemmte die

NOX-vermittelte Produktion von ROS im zellfreien System, in Zellen, Geweben und *in vivo*, jedoch nicht NOX-Isoform-spezifisch [71]. Es wird vermutet, dass VAS2780 die Assemblierung des NOX-Komplexes verhindert, indem der Inhibitor mit NOX und seinen Interaktionspartnern interferiert. Interessanterweise wurden aber auch NOX4 und NOX5 durch VAS2780 gehemmt; Isoformen, von denen man ausgeht, dass sie unabhängig sind von zytosolischen Interaktionspartnern. Diese Hinweise stammten sowohl aus *in vitro* Untersuchungen mit A7r5-Zellen, welche hauptsächlich NOX4 exprimierten, und NOX4-überexprimierenden HEK-293 Zellen, als auch aus *in vivo* Studien in einem ischämischen Schlaganfall-Modell bei der Maus, in welchem VAS2780 in WT-Tieren denselben protektiven Effekt hatte wie in NOX4 KO-Tieren [197]. Nicht publizierte Daten von R.P. Brandes hingegen zeigten, dass VAS2780 nicht die NOX4 hemmte, wenn dieses in HEK-293 Zellen überexprimiert wurde, sondern stattdessen die Isoformen NOX1 und NOX2, wenn diese gemeinsam mit ihren zytosolischen Interaktionspartnern transfiziert wurden [233]. Diese Beobachtung stimmt wiederum mit dem beschriebenen Wirkmechanismus von VAS2780 überein. Für VAS2780 wurde ein  $IC_{50}$ -Werte von 2  $\mu$ M und eine 100 %ige Hemmung der *low-density* Lipoprotein (oxLDL)-vermittelten ROS-Bildung bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M in humanen Endothelzellen beschrieben [234]. Andere hingegen demonstrierten, dass VAS2780 bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M die PDGF-vermittelte Steigerung der NOX4-Aktivität im zellfreien System mit Membranen und Zytosol aus humanen Neutrophilen vollständig hemmte [235].

Im Rahmen dieser Arbeit reduzierte GKT136901 die ROS-Bildung dosisabhängig in isolierten Herzmitochondrien von WT- und NOX4 KO-Mäusen gleichermaßen und hatte somit keinen NOX-spezifischen Effekt auf die ROS-Produktion (Abbildung 20). Da die von uns gewählten GKT136901-Konzentrationen im maximalen inhibitorischen Bereich für die NOX4 lagen und es bislang keine Berichte über die Lokalisation von anderen NOX-Isoformen in Mitochondrien gibt, ist es eher unwahrscheinlich, dass die konzentrationsabhängige Abnahme der ROS-Produktion nach Inkubation der Mitochondrien mit GKT136901 durch die Hemmung anderer NOX-Isoformen vermittelt war. Auch mit dem pan NOX-Inhibitor VA2780 wurde kein Effekt auf die mitochondriale ROS-Produktion detektiert, weder in linksventrikulären WT- noch in NOX4 KO-Mitochondrien (Abbildung 21). Da die ROS-Messungen in kardialen Mitochondrien nach Inkubation mit 0,1  $\mu$ M und 1  $\mu$ M VA2780 erfolgte, könnte der fehlende Effekt möglicherweise auf eine zu geringe Inhibitor-Konzentration zurückzuführen sein. Allerdings wurde die Konzentration in renalen

Mitochondrien auf 10  $\mu\text{M}$  erhöht, um diesen Aspekt zu überprüfen. Somit war die 10  $\mu\text{M}$  Konzentration von VAS2780 ausreichend hoch gewählt, um einen Effekt auf die NOX4-Aktivität in Nierenmitochondrien erwarten zu können.

Altenhöfer und Kollegen erwähnten in einem Übersichtsartikel unpublizierte Beobachtungen über eine GKT136901-vermittelte dosisabhängige Hemmung der Amplex Ultra Red Fluoreszenz [232]. Kürzlich publizierten die Autoren ein Studie zur Isoform-spezifischen NOX4-Hemmung durch verschiedene Inhibitoren, in der ebenfalls eine Assay-Interferenz von GKT136901 und Amplex Ultra Red beschrieben wurde. Dort hemmten 1  $\mu\text{M}$  GKT136901 die Amplex Ultra Red Fluoreszenz im zellfreien System sowohl in Ab- als auch (deutlich stärker) in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Letzteres deutet auf einen antioxidativen Effekt des Inhibitors hin [236]. Dies könnte unseren Befund in isolierten kardialen WT- und NOX4 KO-Mitochondrien erklären. Allerdings wurde dieser Effekt in renalen Mitochondrien nicht festgestellt.

Insgesamt war die ROS-Produktion der Nierenmitochondrien jedoch im Vergleich zu den linksventrikulären Mitochondrien deutlich höher und die Gabe von Rotenon induzierte keine weitere Zunahme der ROS-Bildung (Abbildung 22). Dieses Phänomen wurde auch bei Lebermitochondrien festgestellt, bei denen trotz ähnlicher experimenteller Bedingungen und ähnlichen Sauerstoffverbrauchsraten die Bildung von ROS viel höher war als bei Mitochondrien aus anderen Geweben [237]. Der Grund hierfür war eine HRP-unabhängige Umwandlung von Amplex Red zu Resorufin, und zwar auch in Abwesenheit von respiratorischem Substrat (d. h. mit vernachlässigbarem Sauerstoffverbrauch). Miwa und Kollegen identifizierten die Carboxylesterase als ein Enzym, das Amplex Red in Resorufin umwandelte, ohne dass dafür Sauerstoff, Wasserstoffperoxid oder eine Peroxidase benötigt wurde [237]. Dabei beschrieb diese Studie auch andere Gewebe, darunter die Niere, welche die HRP-unabhängige Umwandlung von Amplex Red zu Resorufin mit unterschiedlichen Raten katalysierten. Im Herzen hingegen war die HRP-unabhängige Umwandlung von Amplex Red zu Resorufin nicht vorhanden [237]. Die Autoren fanden auch heraus, dass die Carboxylesterase durch Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in Dosen gehemmt werden kann, die weder die mitochondriale Funktion noch die Kinetik der HRP-katalysierten Oxidation von Amplex Red durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  beeinträchtigen und schlagen daher den Einsatz von PMSF in ihrem modifizierten Protokoll zur Quantifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die Amplex Red Methode in Geweben, Zellen und Mitochondrien mit hohem Carboxylesterase-Gehalt vor [237]. Diese Erkenntnisse wurden nach Abschluss der in dieser Arbeit durchgeführten

Experimente veröffentlicht, sodass der Einsatz von PMSF in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt werden konnte. Es bleibt daher die Frage, ob ein Beitrag von NOX4-generierten ROS, sofern NOX4 in ausreichend großer Menge in Mitochondrien lokalisiert wäre, ohne die Hemmung der Carboxylesterase hätte detektiert werden können. Wenn man davon ausgeht, dass das NOX4-Protein in ausreichender Menge in Mitochondrien lokalisiert ist und dort konstitutiv aktiv ist, wäre zumindest ein Unterschied in der basalen ROS-Produktion zwischen WT- und KO-Nierenmitochondrien denkbar, da NOX4-generiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Oxidation von Amplex Red hätte beitragen können. Einen solchen Unterschied konnten wir jedoch nicht feststellen. Da uns allerdings die Kinetik, mit der die potentiell von mitochondrialem NOX4-vermittelte Umwandlung von Amplex Red zu Resorufin nicht bekannt ist, müssen die ROS-Messungen, die von renalen Mitochondrien stammen, aus heutiger Sicht kritisch betrachtet werden. Darüber hinaus hatten die Inhibitoren GKT136901 und VAS2780 keinen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien (Abbildung 16), sodass der fehlende Effekt auf die mitochondriale ROS-Produktion nicht auf eine durch die Inhibitoren-vermittelte Hemmung des Elektronenflusses zurückgeführt werden kann.

Da NOX4 ein konstitutiv aktives Enzym ist, produziert es im Vergleich zu den anderen NOX-Isoformen relativ geringe Mengen an ROS und hält dadurch unter physiologischen Bedingungen den zellulären Redoxzustand aufrecht [233]. Somit besteht die Möglichkeit, dass unter basalen Bedingungen die von NOX4-generierten ROS in Herzmitochondrien unterhalb der Detektionsgrenze des von uns gewählten Assays lagen. Für diese Hypothese spricht auch, dass die basale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion zwischen WT- und NOX4 KO-Mitochondrien vergleichbar war. Unsere Beobachtungen, dass weder die Hemmung noch der *knockout* von NOX4 Einfluss auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion unter unstimulierten Bedingungen nahm, stimmt mit Berichten aus der Literatur überein [106, 138, 210]. In diesen Studien reduzierte weder die pharmakologische Hemmung mittels GKT136901 noch der *knockout* von NOX4 die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in proximalen Tubuluszellen oder im Herzen der Maus.

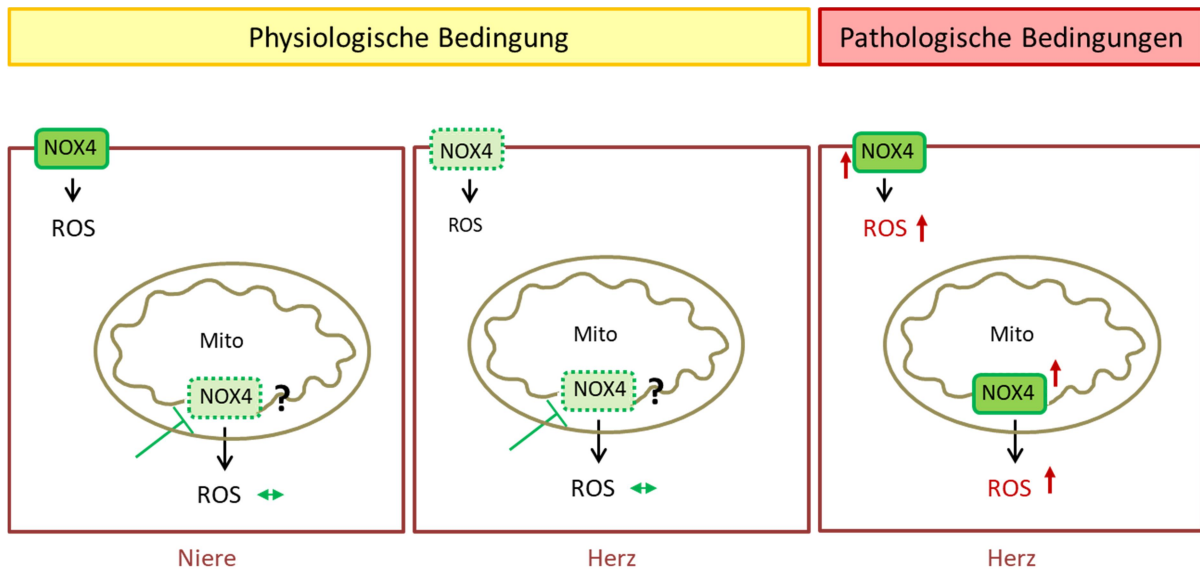
Die Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit selbst in Nierenmitochondrien kein Effekt auf die ROS-Produktion in WT- und NOX4 KO-Mäusen detektiert werden konnte, weder mit GKT136901 noch mit VAS2870, stimmt nicht mit Beobachtungen anderer Studien überein, welche sich für eine funktionelle Signifikanz von NOX4 bei der mitochondrialen ROS-Produktion aussprechen [137-139]. Kuroda und Block et al. berichteten, dass Hemmung,

*knockdown* sowie *knockout* der NOX4 die NADPH-abhängige Superoxid-Bildung in isolierten Mitochondrien signifikant reduzierte [137, 138]. Weiterhin demonstrierten Ago und Kollegen, dass Cysteinreste von mitochondrialen Proteinen in NOX4-transgenen Mäusen stärker oxidiert waren und dass die NOX4-Expression mit der Dihydroethidium-Färbung für Superoxid und kardiale Schäden korrelierte [139]. Diese Studien sind jedoch umstritten, da sie keine direkte NOX4-Aktivität nachwiesen, sondern eine reine NADH-abhängige ROS-Produktion zeigten, welche bekanntlich auch durch den mitochondrialen Komplex I vermittelt wird. Außerdem beruhte die Beurteilung der NOX4-Aktivität in diesen Studien auf der Messung von  $O_2^-$  anstelle von  $H_2O_2$ , dem Hauptprodukt von NOX4 [75, 238], oder der Verwendung von Diphenyleneiodonium (DPI) als Inhibitor, bei welchem es sich eindeutig nicht um einen NOX-spezifischen, sondern einen generellen Flavoprotein-Inhibitor handelt. Darüber hinaus hemmt DPI auch andere ROS-Quellen, einschließlich der Mitochondrien [239], sodass dieser Inhibitor inkompatibel mit Assays zur Detektion von mitochondrialen ROS ist.

Zudem darf die Tatsache, dass der obligatorische NOX4-Interaktionspartner p22phox nicht in Mitochondrien lokalisiert zu sein scheint und somit gegen die enzymatische Aktivität von NOX4 in diesen Organellen spricht, nicht außer Acht gelassen werden. Allerdings postulierte eine Studie einen p22phox-unabhängigen Mechanismus der NOX4-Regulation innerhalb der Mitochondrien. Die Hypothese zu diesem Mechanismus schlägt vor, dass NOX4 über die allosterische Bindung von ATP reguliert wird, da die Autoren ein Walker A ATP-bindendes Motiv innerhalb der NOX4-Aminosäuresequenz identifizierten, welches ATP direkt binden kann. Die Walker-ATP-Bindungsstelle ist dabei innerhalb des C-Terminus in der Nähe der NADPH-Bindungsstelle von NOX4 lokalisiert, sodass die Bindung des Ko-Faktors NADPH die Walker-ATP-Bindungsstelle und umgekehrt die Walker-ATP-Bindungsstelle die NADPH-Bindungsstelle hemmen könnte. Tatsächlich demonstrierte die Studie, dass ATP die NOX4-Aktivität, welche jedoch als NADPH-abhängige Superoxid-Bildung definiert wurde, negativ regulierte [141]. Unabhängig von der Methode, die in der Studie für die Bestimmung der NOX4-Aktivität verwendet wurde (das wurde bereits weiter oben diskutiert), stellt sich die Frage, ob NOX4 bei niedrigen ATP-Spiegeln, aber in Abwesenheit von p22phox, tatsächlich aktiv (im Sinne der ROS-Produktion) ist. Es ist nicht ausgeschlossen, dass NOX4 in unterschiedlichen Kompartimenten durch unterschiedliche Mechanismen in seiner Aktivität reguliert werden kann. Die Identifizierung von (Mitochondrien-spezifischen) Interaktionspartnern wäre bei der Aufklärung eines alternativen Aktivierungsmechanismus

von NOX4 innerhalb der Mitochondrien von besonderem Interesse. Berichten von Koziel und Kollegen zu Folge konnte NOX4 die Aktivität des mitochondrialen Atmungskomplex I in humanen Endothelzellen (HUVEC) reduzieren. Diese Studie demonstrierte mittels hochauflösender Respirometrie in permeabilisierten Zellen in Kombination mit nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese, dass die mitochondriale respiratorische Aktivität, welche mit ADP (Komplex I-gekoppelte Respiration) oder Rotenon (Komplex I gehemmt) stimuliert wurde, in NOX4 *knockdown* Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen erhöht war. Die Zugabe von Glutamat und Malat alleine führte jedoch zu keinen Unterschieden in der Respirationsrate zwischen den Gruppen [142]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde kein Unterschied in der ROS-Produktion zwischen WT- und NOX4 KO-Mitochondrien unter basalen Bedingungen detektiert (Glutamat/Malat alleine) (Abbildung 20). Zwar resultierte die Zugabe des Komplex I-Inhibitors Rotenon in einem tendenziell höheren ROS-Signal in NOX4 KO-Herzmitochondrien im Vergleich zu WT-Mitochondrien, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 20). Des Weiteren berichteten Koziel und Kollegen, dass die NOX4-vermittelte Abnahme der Komplex I-Aktivität der ETK mit einer verminderten Proteinmenge der Komplex I-Untereinheiten einherging [142]. Diese Daten deuten einen neuen Signalweg an, bei welchem eine andauernde NOX4-Aktivität die mitochondriale Funktion nachhaltig vermindert [142].

**Fazit und Ausblick:** Evidenzen aus der Literatur, gemeinsam mit den Befunden unserer Kooperationspartner sowie das Vorhandensein der Mitochondrien-Lokalisationssequenz weisen darauf hin, dass NOX4 potentiell in Mitochondrien lokalisiert sein kann. Die Lokalisation von NOX4 in Mitochondrien könnte vom Zelltyp und/ oder der Bedingung/ dem Stimulus abhängen. Ob NOX4 unter basalen Bedingungen in Herzmitochondrien lokalisiert ist, kann weder mit dieser Arbeit noch mit dem aktuellen Wissensstand abschließend geklärt werden. Dafür fehlen bislang eindeutige Nachweise über die funktionelle Aktivität und die Lokalisation von endogenem NOX4 in kardialen Mitochondrien. Auch die potentiellen Interaktionspartner innerhalb der Mitochondrien bedürfen weiterer Validierung, z.B. durch Ko-Immunopräzipitationsexperimente. Allerdings könnte das NOX4-Protein in Situation von gesteigerter NOX4-Expression oder -Aktivität (z.B. bei Hypoxie, niedrige ATP-Konzentration) den Kalziumeinstrom in die Mitochondrien an der MAM regulieren oder in die Mitochondrien translozieren und dort, vor allem unter Stressbedingungen [137, 139], zu einer erhöhten mitochondrialen ROS-Produktion führen und die Aktivität des ETK-Komplex I regulieren.



**Abbildung 33: Bedeutung von NOX4 unter physiologischen Bedingungen in Herz und Niere.** Unter physiologischen Bedingungen ist die Niere das Organ mit der höchsten Expression der NADPH-Oxidase 4 (NOX4) (durchgezogene Linie), wohingegen die NOX4-Proteinmenge im Herzen deutlich geringer ist und im Rahmen dieser Arbeit unterhalb der Detektionsgrenze lag (gestrichelte Linie). Weder die mitochondriale Lokalisation noch die enzymatische Aktivität von NOX4 innerhalb des Mitochondriums (Mito) konnte in dieser Studie gezeigt werden, da die mitochondriale ROS-Produktion sowohl nach pharmakologischer Hemmung als auch nach *knockout* ( $\perp$ ) der NOX4 unverändert ( $\leftrightarrow$ ) blieb. Somit bleibt unklar (?), ob die Proteinmenge und somit auch der NOX4-vermittelte Beitrag zur mitochondrialen ROS-Produktion unterhalb der Detektionsgrenze liegt oder ob NOX4 unter physiologischen Bedingungen nicht innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist. Allerdings könnte die NOX4-Expression unter pathologischen Bedingungen im Herzen zunehmen, was nicht nur eine Steigerung ( $\uparrow$ ) der intrazellulären ROS-Produktion, sondern auch eine verstärkte Translokation von NOX4 in die Mitochondrien zur Folge haben könnte. In letzterem Fall wäre nicht nur eine Steigerung der intrazellulären ROS-Produktion, sondern auch eine gesteigerte mitochondriale ROS-Bildung zu erwarten.

## 5.2 Funktionelle Relevanz von p66shc bei der Entstehung der rechtsventrikulären Hypertrophie in Folge einer chronischen Druckbelastung

Das Adaptorprotein p66shc transloziert nach Stimulation durch Stresssignale, wie z.B. hypertrophe Stimuli, in die Mitochondrien. Dort steigert es die mitochondriale ROS-Bildung, indem es die Oxidation von Cytochrom c und die Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid katalysiert [158]. p66shc-vermittelte ROS spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der LVH und könnten auch bei der Entstehung der RVH bedeutsam sein. Daher wurde in dieser Studie erstmals die Beteiligung von p66shc an der Pathogenese der RVH im PAB-Modell untersucht.

### 5.2.1 Rolle von p66shc bei der linksventrikulären Hypertrophie

Wie bei vielen anderen Signalproteinen, die Wachstum und Apoptose regulieren, ist die Expression von p66shc in neonatalen Kardiomyozyten hoch und wird während der weiteren Entwicklung herunterreguliert [193]. Da einige dieser Signalmoleküle während einer kardialen Hypertrophie reexprimiert werden [191], wurde in den letzten Jahren untersucht, ob die p66shc-Expression in Kardiomyozyten ebenfalls durch hypertrophe Stimuli induziert wird [147]. In der Studie von Obreztschikova und Kollegen wurde berichtet, dass das *Pasteurella multocida* Toxin (PMT), ein direkter Aktivator der endogenen Gαq-Untereinheit, welche die Hypertrophie in Kardiomyozyten durch einen PKC- und ERK-abhängigen Signalweg fördert [192], eine signifikante Erhöhung der p66shc-Expression, ERK-Aktivierung und p66shc-S36-Phosphorylierung in Kardiomyozyten induzierte [193]. Durch die Hemmung der Kinasen MEK oder PKC wurde die PMT-induzierte Zunahme der p66shc-Expression wieder aufgehoben, was darauf schließen ließ, dass die p66shc-Expression in Kardiomyozyten über den MEK-ERK-Signalweg reguliert sein könnte. Thrombin ist ein weiterer Aktivator von Signalwegen, der über die Aktivierung des Proteinase-aktivierten Rezeptors-1 (PAR-1) für das Wachstum und Überleben von Kardiomyozyten sowie für den Umbau der extrazellulären Matrix durch kardiale Fibroblasten relevant ist. Thrombin erhöhte ebenfalls die S36-Phosphorylierung von p66shc in kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten, wobei dies in Kardiomyozyten erneut durch PKC und MAPK /ERK vermittelt war [193].

Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems spielt ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der Progression der LVH und dem Herzversagen. Es wurde demonstriert,

dass Ang II als initialer Mediator der dehnungsinduzierten hypertrophen Antwort fungierte [240]. Graiani und Kollegen wiesen nach, dass die kontinuierliche *in vivo* Gabe von Ang II in einer Konzentration ohne Pressor-Aktivität LVH und Apoptose in WT-Mäusen induzierte [194]. Die genetische Deletion von p66shc schützte den LV vor Ang II-induzierter Hypertrophie und Apoptose [194], was die Rolle von p66shc als Mediator der LVH weiter stützte. Interessanterweise wurde gezeigt, dass der LV von p66shc-defizienten Mäusen unter basalen Bedingungen eine im Vergleich zu WT höhere Anzahl an kardialen Vorläuferzellen aufwies. Obwohl Ang II sowohl in WT- als auch in p66 KO-Mäusen die Anzahl an sich teilenden Kardiomyozyten erhöhte, überstieg die Apoptoserate die Proliferationsrate in WT, nicht aber in p66shc-defizienten LV [194]. Darüber hinaus ist in der Literatur beschrieben, dass Ang II über die Aktivierung des AT1-Rezeptors die Bildung von ROS induzieren kann [241]. Rota und Kollegen demonstrierten, dass die Ang II-vermittelte Bildung von ROS in diabetischen p66 KO-Mäusen, die einer hohen Glukosekonzentration ausgesetzt wurden, vermindert war und dass in diesen Mäusen die Replikation von kardialen Vorläuferzellen überwog [242]. Diese Befunde lassen die Vermutung zu, dass die p66shc-Deletion die Ang II-vermittelte ROS-Bildung hemmen könnte und dadurch das Verhältnis von Proliferation zu Apoptose in Richtung Zellüberleben beeinflussen könnte.

All diese Befunde stimmen mit früheren Beobachtungen überein, dass oxidativer Stress und p66shc entscheidend für die Aktivierung der Apoptose in Herzen unter pathophysiologischen Bedingungen sein könnten. In einem Hundemodell, in dem durch eine Erhöhung der Herzfrequenz eine LV-Dysfunktion induziert wurde, korrelierte die Expression von p66shc mit der Stimulationsdauer und die Zunahme der p66shc-Expression war mit einer Zunahme der Apoptose und einer Reduktion der kardialen Funktion assoziiert [195]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass p66shc an der Regulation der kardialen Dysfunktion und der Entstehung von oxidativem Stress im Mausmodell der LVH und LV-Insuffizienz durch chronische Druckbelastung mittels transverser Aortenkonstriktion (TAC) beteiligt ist [196]. In dieser Studie reduzierte die Deletion von p66shc signifikant den durch TAC induzierten kardialen Umbauprozess (*Remodelling*), der durch eine erhöhte LV-Masse, die Dilatation des LV und eine reduzierte LV-Funktion gekennzeichnet war, wohingegen die Überexpression von p66shc den kardialen Umbauprozess nach der TAC-Operation förderte. Nach TAC-Operation waren darüber hinaus Marker von oxidativem Stress (erhöhte Spiegel von NADPH, Superoxid, myokardialen Lipidperoxidationsprodukte und GSH) in p66shc-defizienten Mäusen vermindert und in p66shc-Überexpressionsmäusen erhöht [196]. Die Autoren postulierten,

dass p66shc oxidativen Stress und kardiale Dysfunktion in der TAC-induzierten LVH fördert, indem es die SOD-Aktivität hemmt und die Expression der Phosphodiesterase Typ 5 (PDE5), einem inhibitorischen Regulator des cGMP-PKG-Signalwegs, der im Herzen u.a. anti-hypertroph wirkt, erhöht [196].

Allerdings gilt es zu beachten, dass TAC-induzierte Signalwege im PAB-Modell im RV nicht aktiviert wurden [243]. Weiterhin war nach systemischer Gabe von Ang II die hypertrophe Wirkung auf den LV beschränkt [194]. Unter Berücksichtigung, dass sich RV und LV hinsichtlich ihres embryonalen Ursprungs, der Morphologie und Geometrie sowie der ventrikulären Drücke unterscheiden, ist es wahrscheinlich, dass sich die Mechanismen, die Hypertrophie vermitteln, zwischen LV und RV ebenfalls unterscheiden. Dies beinhaltet möglicherweise auch die Rolle von p66shc.

### 5.2.2 *(p66shc-vermittelte) ROS und ihre Bedeutung für die rechtsventrikuläre Hypertrophie*

Unter basalen Bedingungen ist p66shc überwiegend im Zytosol lokalisiert. Das Protein konnte unter physiologischen Bedingungen jedoch auch im ER sowie in Mitochondrien detektiert werden [168]. Innerhalb der Mitochondrien katalysiert p66shc die Oxidation von Cytochrom c und die Reduktion von Sauerstoff zu  $H_2O_2$  und trägt so zur mitochondrialen ROS-Bildung bei [158]. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Bildung von  $H_2O_2$  zwischen RV-Mitochondrien, die aus scheinoperierten WT- und p66 KO-Mäusen isoliert wurden, vergleichbar war. Auch die Analyse der Lipidperoxidation sowie der Tropomyosinoxidation als Marker für oxidativen Stress zeigte keine Unterschiede zwischen isolierten WT- und p66 KO-Herzen [244]. Weiterhin war die basale zelluläre  $H_2O_2$ -Konzentration in der Mausleber und in murinen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen zwischen WT- und p66shc-defizienten Zellen nicht unterschiedlich, ebenso wenig wie die mitochondriale ROS-Produktion in HUVECs und in primären hepatischen Sternzellen der Ratte [245-247]. Mitochondriales p66shc ist unter basalen Bedingungen Teil eines hochmolekularen Komplexes von etwa 670 kDa, der unter anderem das mtHsp70 enthält und direkt mit p66shc interagiert. Man geht davon aus, dass p66shc innerhalb dieses Komplexes katalytisch inaktiv vorliegt [168], was unsere und die Befunde anderer [244, 245] erklären könnte. Es gibt allerdings auch den Hinweis, dass p66shc-defiziente Zellen niedrigere intrazelluläre ROS-Konzentrationen aufweisen [160]. Da dieser Befund von embryonalen Zellen stammt, einer Bedingung, die mit einer erhöhten p66shc-Expression assoziiert ist,

könnte dies den Umstand erklären, wieso der p66shc *knockout* in der genannten Studie in basal signifikant niedrigeren ROS-Konzentrationen resultierte.

Es gibt Hinweise darauf, dass die mitochondriale ROS-Produktion im kompensierten Zustand der RVH vermindert ist, während der Übergang von RVH zum RV-Pumpversagen mit oxidativem Stress assoziiert ist [60]. Das Einsetzen und der Zeitpunkt von Veränderungen der ROS-Konzentration während dieses Übergangs sind nicht klar definiert und unterscheiden sich innerhalb der Modelle und der Spezies. In einer neueren Studie mit Monocrotalin-(MCT)-induzierter pulmonaler Hypertonie an Ratten stieg die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in RV-Homogenaten eine Woche nach der MCT-induzierten Druckbelastung an, kehrte jedoch nach zwei und drei Wochen wieder zu den Kontrollwerten zurück [248]. Nach 25 Tagen der MCT-Gabe hingegen wurde eine erhöhte ROS-Produktion festgestellt, die einer erhöhten Aktivität des Atmungskettenkomplexes II und der NADPH-Oxidase in RV-Gewebehomogenaten und in isolierten Mitochondrien zugeschrieben wurde [249]. Im PAB-Modell stieg in der akuten Phase, d.h. sechs Stunden nach der Operation die Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aber nicht die Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup>, an und kehrte nach 24 Stunden zu den Kontrollwerten zurück. Der Inhibitor DPI verminderte diesen Anstieg und es wurde vermutet, dass die erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion nach akutem PAB mit der Aktivität der NADPH-Oxidase 4 zusammenhing [250]. Drei und vier Wochen nach chronischer Druckbelastung durch PAB wurde ein robuster Anstieg der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Konzentration beobachtet [251, 252]. Die Hinweise aus diesen Studien deuten darauf hin, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs verschiedene ROS-Spezies relevant sein könnten. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass drei Wochen nach PAB kein Effekt auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in WT- oder p66shc-defizienten Mitochondrien aus RV-Gewebe nachweisbar war. Die Beobachtung, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vor allem in der akuten Phase der PAB-induzierten Druckbelastung (und nicht in späteren Phasen) generiert wurde, könnte erklären, wieso die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in der vorliegenden Studie nach dreiwöchiger Konstriktion der Pulmonalarterie nicht verändert war.

In Anwesenheit von Rotenon war die ROS-Bildung in WT-Mitochondrien nach PAB jedoch signifikant höher als in den Mitochondrien, die aus scheinoperierten RV isoliert wurden. Interessanterweise traf dies nicht auf Mitochondrien zu, die aus p66 KO-RV isoliert wurden. Rotenon hemmt den Elektronentransfer von Komplex I zu Ubichinon, was zur ROS-Bildung führt [253]. Die Literatur berichtet, dass mitochondriales p66shc bei oxidativem Stress aus dem inhibitorischen Komplex dissoziiert und dadurch aktiviert wird [254]. Die Rotenon-

induzierte ROS-Bildung könnte einen ausreichenden Stimulus darstellen, um mitochondriales p66shc akut zu aktivieren, was zur weiteren ROS-Bildung in WT-Mitochondrien beitragen könnte, nicht aber in Mitochondrien, denen p66shc fehlte. Ferner ist beschrieben, dass p66shc die Expression von Enzymen wie MnSOD runterreguliert [255]. Folglich könnte der fehlende Anstieg der PAB-vermittelten ROS-Produktion die Folge einer verminderten antioxidativen Kapazität in WT-, nicht aber in p66 KO-Tieren sein. Tatsächlich wiesen p66shc-defiziente Mäuse eine höhere Katalase-Aktivität und eine stärkere Resistenz gegenüber oxidativem Stress auf [166, 256].

Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass p66shc zu dem hier gewählten Zeitpunkt (3 Wochen) im PAB-Modell nicht zur Generierung von mitochondrialem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beiträgt. Unter Berücksichtigung der Hinweise bezüglich der zeitlichen Kinetik der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung im PAB-Modell, könnte die p66shc-vermittelte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion allerdings eine Rolle in der akuten Phase der rechtsventrikulären Druckbelastung spielen.

### 5.2.3 Einfluss von p66shc auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten

Zusätzlich zu den Mitochondrien ist p66shc im Zytosol von Kardiomyozyten lokalisiert. Zytosolisches p66shc trägt zur zellulären ROS-Bildung bei [173], die wiederum die Funktion der Kardiomyozyten durch oxidative Modifikation kontraktiler Proteine direkt reduzieren kann [30]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die p66shc-Deletion einen Einfluss auf die Funktion der RV-Kardiomyozyten nach chronischer Druckbelastung hat. Im Rahmen dieser Studie unterschieden sich p66shc-defiziente und WT-Kardiomyozyten aus scheinoperierten RV hinsichtlich ihrer diastolischen Zelllänge, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit; sowie der lastfreien Zellverkürzung nicht voneinander. Im Gegensatz dazu demonstrierte unsere Arbeitsgruppe, dass LV-Kardiomyozyten, die von p66 KO-Mäusen isoliert wurden, länger waren als linksventrikuläre WT-Kardiomyozyten, während die lastfreie Zellverkürzung vergleichbar war [170]. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass die p66shc-Expression mit der Zelllänge im LV, nicht aber im RV assoziiert sein könnte.

Es wird angenommen, dass eine Zunahme der Kardiomyozyten-Kontraktilität als funktionelle Anpassung der Hypertrophie erfolgt, wie es bereits in PAH-Patienten [257] und in Tiermodellen der chronischen Druckbelastung [258] beobachtet wurde. Ein solcher Befund konnte im Rahmen dieser Studie nicht bestätigt werden, da die lastfreie Zellverkürzung von

WT- und p66 KO-Kardiomyozyten durch die PAB-Intervention nicht beeinflusst wurde. Allerdings wurde in einer früheren Studie unserer Kooperationspartner eine verbesserte Funktion von rechtsventrikulären WT-Kardiomyozyten drei Wochen nach PAB beschrieben [259]. Andere hingegen zeigten, dass RV-Kardiomyozyten vier Wochen nach PAB signifikant in ihrer Funktion beeinträchtigt waren, was sich in einer reduzierten Zellverkürzung, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit äußerte und auf eine Dekompensation des RVs zu diesem Zeitpunkt hindeutete [251]. Dies wiederum lässt den Rückschluss zu, dass das von uns gewählte Modell zum Zeitpunkt drei Wochen nach PAB das Stadium der adaptiven Hypertrophie abbildete, zu dem auf zellulärer Ebene noch keine Dekompensation eingesetzt hatte.

Zudem unterschieden sich im Rahmen dieser Arbeit die Genotypen auch nach dreiwöchiger Druckbelastung nicht in ihrer diastolischen Zelllänge, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, allerdings war die lastfreie Zellverkürzung von RV-Kardiomyozyten aus p66 KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Kardiomyozyten reduziert (Tabelle 3). Dies könnte darauf hindeuten, dass p66shc für die kontraktile Anpassung der Kardiomyozyten an mechanischen Stress relevant ist. Wie diese Anpassung des kardiomyozytären Kontraktionsverhaltens vermittelt sein könnte, ist bislang unklar. Für die Kontraktion und Relaxation des Myokards bzw. der Kardiomyozyten ist die Homöostase des Kalziumhaushalts von elementarer Bedeutung. Somit ist es denkbar, dass p66shc die Kontraktilität von Kardiomyozyten dadurch reguliert, indem es die Aktivität von Proteinen, die die Kalziumhomöostase vermitteln, beeinflusst. Tatsächlich weisen Komponenten der elektromechanischen Kopplung wie der kardiale Ryanodin-Rezeptor (RyR2) und die SERCA Redox-sensitive Aminosäuren auf [260], die potentiell durch p66shc-vermitteltes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkt oxidativ modifiziert werden könnten. Einerseits ist es denkbar, dass die im Vergleich zu p66shc-defizienten Kardiomyozyten höhere lastfreie Zellverkürzung indirekt durch p66shc vermittelt sein könnte. Es ist bekannt, dass p66shc durch die Ausübung seiner Funktion als Adaptorprotein oxidativen Stress in der Zelle auslösen kann [173]: Indem p66shc SOS aus dem Komplex mit Grb2 verdrängt, induziert es die SOS-abhängige Aktivierung von Rac-1, den Zusammenbau membrangebundener NOX und die Produktion von ROS [181]. Um diesen Aspekt abzuklären, wären Messungen der zytosolischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration, z.B. durch den Einsatz von Hyper-Cyto, einem genetisch kodierten, ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffs, in lebenden Kardiomyozyten erforderlich. Eine solche Messung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, sodass nicht geklärt werden kann, ob die zytosolische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration

nach PAB durch p66shc beeinflusst wird. Andererseits ist es vorstellbar, dass die Kardiomyozytenfunktion durch  $H_2O_2$ , welches unmittelbar von mitochondrialem p66shc durch die Oxidation von Cytochrom c produziert wurde, moduliert werden kann. Da sich jedoch die mitochondriale ROS-Bildung drei Wochen nach PAB in dieser Arbeit zwischen beiden Genotypen nicht unterschied, ist es unwahrscheinlich, dass die durch die Deletion von p66shc vermittelte reduzierte lastfreie Zellverkürzung von mitochondrialen ROS beeinflusst wird.

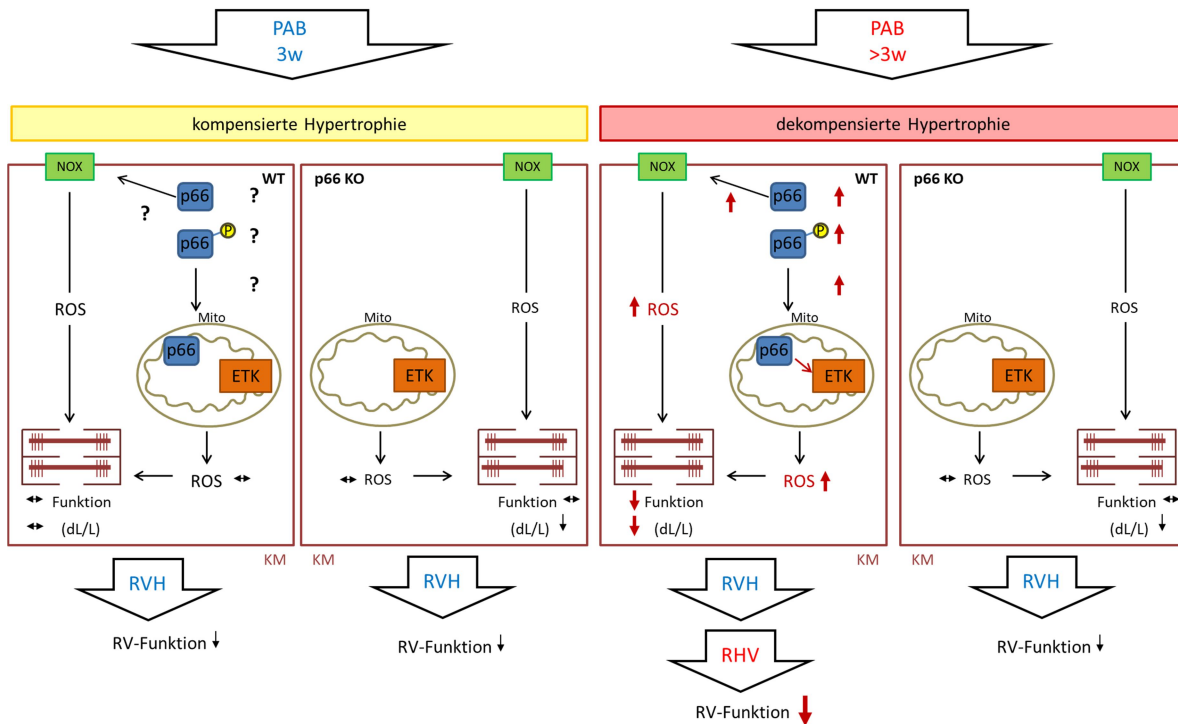
Zusammengenommen zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass p66shc möglicherweise an der kontraktilen Anpassung von RV-Kardiomyozyten nach chronischer Druckbelastung des RV beteiligt ist.

#### 5.2.4 Einfluss von p66shc auf die Herzfunktion

In Übereinstimmung mit zuvor publizierten experimentellen Studien [259, 261] induzierte die Stenose der Pulmonalarterie mittels Hemoclip eine spezifische Erhöhung der Nachlast für den RV, was deutlich an der signifikanten Zunahme des RVSP ablesbar war, während der SAP nicht beeinflusst wurde (Abbildung 29). Über den Zeitraum von drei Wochen führte der erhöhte RVSP zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie, wie anhand der Zunahme des rechtsventrikulären Gewichts und der RVWT erkennbar war. Die Konstriktion der Pulmonalarterie resultierte nach dreiwöchiger Versuchsdauer in einer Abnahme der kontraktilen Funktion des RVs (TAPSE) und der globalen Herzfunktion (CI). Das Ausmaß der Hypertrophie sowie die eingeschränkte Funktion des RV drei Wochen nach PAB waren jedoch zwischen WT- und p66 KO-Herzen vergleichbar, was darauf hindeutet, dass die p66shc-Deletion *per se* keinen Einfluss auf die Entwicklung einer RV-Hypertrophie und die RV-Funktion bei chronischer Druckbelastung hatte. Damit bestätigt die vorliegende Arbeit die Daten einer kürzlich erschienenen Studie, in der die Deletion von p66shc bei der Hypoxie-induzierten PH die Hypertrophie und die Funktion des RV ebenfalls nicht beeinflusste [245]. Wie bereits weiter oben beschrieben, ist die Expression von p66shc unter basalen Bedingungen gering, kann jedoch durch hypertrophe Stimuli im LV induziert werden [193, 194]. Allerdings war die p66shc-Proteinmenge im Modell der Hypoxie-induzierten PH zum Zeitpunkt vier Wochen nicht verändert [262], was eine fehlende Beteiligung von p66shc an der Entwicklung der PH bestätigt.

Eine Beteiligung von p66shc bei der Entstehung und Progression der RV-Hypertrophie würde eine Aktivierung des Proteins beinhalten. Eine Aktivierung von p66shc könnte über eine erhöhte Proteinmenge, eine verstärkte Phosphorylierung, eine Zunahme der mitochondrialen Translokation oder eine gesteigerte ROS-Bildung gemessen werden [158, 169, 193]. Aufgrund der begrenzten Anzahl der genehmigten Versuchstiere wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nur die mitochondriale ROS-Bildung charakterisiert und kein Unterschied in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion drei Wochen nach PAB zwischen rechtsventrikulären WT- und p66 KO-Mitochondrien detektiert. Eine vergleichbare Funktion und Morphologie des RV zwischen WT- und p66 KO-Mäusen macht es unwahrscheinlich, dass p66shc zur Entwicklung der RV-Hypertrophie im PAB-Modell beiträgt. Da in der vorliegenden Arbeit allerdings nur ein Zeitpunkt (drei Wochen nach PAB bzw. Scheinoperation) untersucht wurde, ist es denkbar, dass p66shc zu einem späteren Zeitpunkt z.B. beim Übergang vom kompensierten zum dekompenzierten Stadium oder im Stadium des Rechtsherzversagens an Bedeutung gewinnt. Diese Stadien werden mit erhöhten ROS-Mengen und oxidativem Stress in Verbindung gebracht [9, 61] und es ist vorstellbar, dass es unter diesen Bedingungen zu einer zunehmenden Expression, S36-Phosphorylierung sowie Translokation in die Mitochondrien von p66shc kommt. Das Gleichgewicht zwischen dem reduzierten, inaktivierten p66shc-Dimer und dem oxidierten, aktivierten p66shc-Tetramer wird durch das antioxidative System reguliert. Gertz und Kollegen zeigten, dass bei erhöhtem oxidativen Stress die antioxidative Kapazität erschöpft wird, woraufhin aktives p66shc akkumuliert [263]. Außerdem wurde gezeigt [264], dass Prx1 bei erhöhtem oxidativen Stress aus dem p66shc/Prx1-Komplex dissoziierte, woraufhin die Phosphorylierung, Dimerisierung mit Pin1 sowie die anschließende Translokation von p66shc in die Mitochondrien begünstigt wurde. Es ist daher denkbar, dass p66shc zu einem späteren Zeitpunkt nach PAB für die ROS-Bildung und Herzfunktion von Bedeutung ist.

**Fazit und Ausblick:** Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die mitochondriale ROS-Bildung nach dreiwöchiger Druckbelastung des RV durch die Deletion von p66shc nicht beeinflusst wurde und sich die Zell- und Herzfunktion der p66 KO-Tiere nicht von denen der WT-Tiere unterschieden. Dementsprechend lässt sich schlussfolgern, dass p66shc nicht an der Entwicklung und dem Fortschreiten der durch die PAB-Operation induzierten RV-Hypertrophie beteiligt ist. Allerdings könnte mitochondriales p66shc bei erhöhten ROS-Mengen (z.B. in späteren Phasen der RVH) aktiviert und zum Rechtsherzversagen beitragen.



**Abbildung 34: Bedeutung von p66shc bei der Entwicklung der RV-Hypertrophie nach PAB.**  
**Links:** Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass die dreiwöchige (3w) Druckbelastung des rechten Ventrikels (RV) durch die Stenose der Pulmonalarterie mittels Pulmonalarterien *Banding* (PAB) eine RV-Hypertrophie (RVH) in WT-Mäusen induzierte, die mit einer verminderten RV-Funktion ( $\downarrow$ ) assoziiert war. Die lastfreie Zellverkürzung (dL/L) und Funktion der RV-Kardiomyozyten (KM) sowie die mitochondriale Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) blieben nach 3w PAB-Intervention unverändert ( $\leftrightarrow$ ), was für das Stadium der kompensierten Hypertrophie spricht. Während die mitochondriale ROS-Produktion und die KM-Funktion durch die genetische Deletion von p66shc (p66 KO) 3w nach PAB nicht beeinflusst wurde, konnte eine verminderte lastfreie Zellverkürzung in p66 KO-Kardiomyozyten festgestellt werden. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf das Ausmaß der RVH und die RV-Funktion, da beide Parameter in WT- und p66 KO-Tieren gleichermaßen eingeschränkt waren. Allerdings blieb im Zuge dieser Arbeit ungeklärt (?), ob die PAB Intervention die Proteinexpression, Phosphorylierung (P) und/oder die Translokation von p66shc in die Mitochondrien (Mito) sowie die intrazellulären ROS-Spiegel erhöht. **Rechts:** Da die dekompensierte Phase der RVH mit erhöhten ROS-Spiegeln ( $\uparrow$ ) assoziiert ist, ist es denkbar, dass nach längerer PAB-Intervention (>3w) die Expression, Phosphorylierung und mitochondriale Translokation von p66shc zunimmt und p66shc entweder indirekt durch die Aktivierung von NADPH-Oxidasen (NOX) oder direkt durch Oxidation von Cytochrom c aus der Elektronentransportkette (ETK) zur ROS-Produktion beiträgt. Hohe ROS-Konzentration wiederum können die Funktion der Kardiomyozyten durch bspw. die Oxidation von kontraktile Proteinen verschlechtern und so eine weitere Abnahme der RV-Funktion ( $\downarrow$ ) und Rechts Herzversagen (RHV) hervorrufen, was durch den *knockout* von p66shc möglicherweise vermeidbar sein könnte.

## 6. Zusammenfassung

Große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren oxidativen Stress, der über eine Veränderung der Zellfunktion zur Schädigung des Herzens beitragen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei ROS-bildende Enzyme unter physiologischen und pathologischen Bedingungen charakterisiert. Die NAPDH-Oxidase 4 (NOX4) ist überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert und bildet ROS nach Interaktion mit dem Protein p22phox. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob NOX4 auch in kardialen Mitochondrien lokalisiert ist und dort zur ROS-Bildung beiträgt. Dafür wurden die ROS-Produktion und die Proteinmenge von NOX4 in linksventrikulären (LV) Mitochondrien von Wildtyp (WT) und NOX4 *knockout* (NOX4 KO)-Mäusen und unter Verwendung der NOX-Inhibitoren GKT136901 und VAS2780 analysiert. Beide Inhibitoren hemmten die ROS-Produktion von WT- und NOX4 KO-Mitochondrien gleichermaßen. Die mitochondriale Proteinmenge von NOX4 und p22phox lag unterhalb der Detektionsgrenze. Die vorliegenden Daten legen nahe, dass NOX4 unter physiologischen Bedingungen keine Relevanz für die mitochondriale ROS-Produktion des LV hat. Das Adaptorprotein p66shc transloziert durch hypertrophe Stimuli vermehrt in die Mitochondrien, fördert dort die ROS-Bildung und trägt damit zur LV-Hypertrophie bei. Die Rolle von p66shc bei der rechtsventrikulären (RV) Hypertrophie (RVH) ist unklar und wurde im Rahmen dieser Arbeit bei der Maus am Modell der durch Pulmonalarterien *Banding* (PAB)-induzierten RVH untersucht. Die mitochondriale ROS-Bildung, die Funktion von RV-Kardiomyozyten sowie die Morphologie und Funktion des RV wurden drei Wochen nach PAB in WT- und p66shc *knockout* (p66 KO)-Mäusen analysiert. PAB induzierte in WT-Mäusen eine RVH und eine verminderte Herzfunktion, beeinflusste jedoch nicht die mitochondriale ROS-Produktion oder die Funktion von RV-Kardiomyozyten. Die Deletion von p66shc veränderte weder die basale mitochondriale ROS-Produktion noch die Funktion der Kardiomyozyten, allerdings war die kardiomyozytäre Verkürzung von p66 KO-RV nach PAB beeinträchtigt. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Herzfunktion oder das Ausmaß der RVH. p66shc-vermittelte ROS sind daher nicht mit der Entstehung der RVH assoziiert.

## 7. Summary

Large amounts of reactive oxygen species (ROS) induce oxidative stress (OS), which can contribute to cardiac damage via alteration of cell function. In this work, two ROS-forming enzymes were characterized under physiological and pathological conditions. NADPH oxidase 4 (NOX4) is predominantly localized at the plasma membrane and forms ROS following interaction with the protein p22phox. One aim of the present study was to investigate whether NOX4 is also localized in cardiac mitochondria and contributes to ROS formation. Therefore, the ROS production was analyzed in left ventricular (LV) mitochondria from wild-type (WT) and NOX4 knockout (NOX4 KO) mice using the NOX inhibitors GKT136901 and VAS2780. Both NOX inhibitors blocked the ROS production of WT and NOX4 KO mitochondria equally. Mitochondrial protein levels of NOX4 and p22phox were below the detection limit. The present data suggest that NOX4 is not relevant for mitochondrial ROS production of the LV under physiological conditions. The adaptor protein p66shc increasingly translocates to the mitochondria upon hypertrophic stimuli where it promotes mitochondrial ROS formation thereby contributing to LV hypertrophy. The role of p66shc in right ventricular (RV) hypertrophy (RVH) is unclear and was investigated in the present study in the mouse model of pulmonary artery banding (PAB)-induced RVH. The mitochondrial ROS formation, the function of RV cardiomyocytes as well as the morphology and function of the RV were analyzed three weeks after PAB in WT and p66shc knockout (p66 KO) mice. PAB induced RVH and decreased cardiac function in WT mice but did not affect mitochondrial ROS production or RV cardiomyocyte function. Deletion of p66shc did not alter basal mitochondrial ROS production or cardiomyocyte function; but cardiomyocyte shortening of KO RV was impaired after PAB. However, this did not affect cardiac function or the extent of RVH. Thus, the present data suggest that p66shc-mediated ROS are not associated with the development of RVH.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Bspw.	Beispielsweise
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
5-HIAL	5-Hydroxyinodelessigsäure
5-HT	Serotonin
ADP	Adenosindiphosphat
ÄMM	Äußere Mitochondrienmembran
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BMP4	Knochenmorphogenetisches Protein 4, <i>Bone morphogenetic protein 4</i>
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
Cdc42	<i>Cell division cycle 42</i>
CH-Domäne	Kollagen-Homologie-, <i>collagen homology</i> - Domäne
c-Myc	<i>v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homologue</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cyt-b5	Cytochrom b5
Cyt c	Cytochrom c
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser
DH-Domäne	Dehydrogenase-Domäne
DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodonium
e <sup>-</sup>	Elektron
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	EGF-Rezeptor
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ERK	<i>Ras/ extracellular signal-regulated kinases</i>
ET-1	Endothelin 1
ETF:QO	elektronentransferierende Flavoprotein:Ubichinon-Oxidoreduktase-System
ETK	Elektronentransportkette
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACL4	Langkettige-Fettsäure-CoA-Ligase 4, <i>long-chain fatty acid-CoA ligase</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FOXO1	<i>Forkhead-Box-Protein O1</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPX	Glutathion-Peroxidase
GRb2	Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2, <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>

---

H <sup>+</sup>	Protonen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK	Humane embryonale Nierenzellen, <i>human embryonic kidney</i>
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 $\alpha$
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
Hsp	Hitzeschockprotein, <i>Heat shock</i> Protein
HUVEC	Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen, <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IgG	Immunoglobulin G
IMM	Innere Mitochondrienmembran
IMR	Intermembranraum
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k	Kilo
KAT	Katalase
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LV	Linker Ventrikel
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
m	Milli
M	Molar
MAO	Monoaminoxidase
MAM	Mitochondrien-assoziierte ER-Membran
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCU	Mitochondrialer Ca <sup>2+</sup> -Uniporter
MEF	Embryonale Maus-Fibroblasten-Zellen, <i>mouse embryonal fibroblasts</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions Pore, <i>mitochondrial permeability transition pore</i>
mRNA	Boten Ribonukleinsäure, <i>messenger ribonucleic acid</i>
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NFE2	<i>Nuclear factor erythroid 2</i>
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor Kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
NOX	NADPH-Oxidasen
Nrf2	<i>NEF2-related factor 2</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anionenradikal

---

ODH	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
OH·	Hydroxylradikal
oxLDL	Oxidiertes <i>low-density</i> Lipoprotein
P	Phospho
PAB	Pulmonalarterien <i>Banding</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDGF	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten, <i>platelet-derived growth factor</i>
PDE5	Phosphodiesterase Typ 5
PDH	Pyruvat- Dehydrogenase
PDK	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase
PGC	Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor Gamma Koaktivator, <i>proliferator-activated receptor gamma coactivator</i>
PH	Pulmonale Hypertonie
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHF	primäres Herzfeld
Pin	Prolyl-Isomerase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	<i>Pasteurella multocida</i> Toxin
Poldip2	Polymerase-Delta-interagierendes Protein 2
PAR-1	Proteinase-aktivierter Rezeptors-1
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma, <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
RCR	<i>Respiratory Control Ratio</i>
RT	Raumtemperatur
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
Rac-1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Ras	Rattensarkomvirus
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RV	Rechter Ventrikel
RVH	Rechtsventrikuläre Hypertrophie
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
S	Serin
SERCA	Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen/ endoplasmatischen Retikulums, <i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
Shc	<i>Src homology and collagen</i>
SH-Domäne	Src Homologie-Domäne
SMAD	<i>Small mothers against decapentaplegic</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Src	<i>Rous sarcoma virus</i>

T	Threonin
TAC	transverse Aortenkonstriktion
TF	Transkriptionsfaktoren
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor, <i>transforming growth factor-beta</i>
TIM	( <i>translocase of the inner membrane</i> )
TIMP	Gewebe-Inhibitoren von Metalloproteinasen, <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TM-Domäne	Transmembran-Domäne
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TOM	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran, <i>translocase of the outer Membrane</i>
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VDAC	Spannungsabhängiger Anionen-Kanal, <i>voltage-dependent anion channel</i>
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, <i>vascular endothelial growth factor</i>
VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzellen, <i>vascular smooth muscle cells</i>
WT	Wildtyp
Wnt	Akronym aus "Wingless" und "Int-1"
XO	Xanthinoxidase
Y	Tyrosin
z.B.	Zum Beispiel

## 9. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: QUELLEN FÜR ROS UND ROS-ABWEHRMECHANISMEN. (A) MITOCHONDRIALE ELEKTRONENTRANSPORTKETTE (ETK), BESTEHEND AUS DEN KOMPLEXEN I-V. DIE KOMPLEXE I, II UND III GENERIEREN KONTINUIERLICH SUPEROXID ( $O_2^-$ ). (B) DIE MONOAMINOXIDASE (MAO) KATALYSIERT DIE DESAMINIERUNG VON MONOAMINEN WIE Z.B. SEROTONIN (5-HT) ZU 5-HYDROXYINDOLESSIGSÄURE (5-HIAL) UND GENERIERT DABEI WASSERSTOFFPEROXID ( $H_2O_2$ ). (C) DIE XANTHINOXIDASE (XO) KATALYSIERT DIE OXIDATION VON HYPOXANTHIN UND XANTHIN ZU HARNSÄURE, BEI DER  $H_2O_2$  ALS NEBENPRODUKT ENTSTEHT. (D) DURCH DIE ENZYMATISCHE AKTIVITÄT DER ENTKOPPELTEN STICKSTOFFMONOXID-SYNTHESE (NOS) WIRD  $O_2^-$  GENERIERT. (E) DIE GLUTATHION-PEROXIDASE (GPX) REDUZIERT  $H_2O_2$  BEI GLEICHZEITIGER OXIDATION VON GLUTATHION (GSH ZU GSSG). (F) DIE SUPEROXID-DISMUTASE KATALYSIERT DIE UMWANDLUNG VON  $O_2^-$  ZU  $H_2O_2$ , WELCHES VON DER (G) KATALASE (KAT) WEITER ZU WASSER ( $H_2O$ ) UND MOLEKULAREM SAUERSTOFF ( $O_2$ ) UMGESETZT WIRD (MODIFIZIERT NACH [9]). ..... 2

ABBILDUNG 2: MITOCHONDRIALE ROS-PRODUKTION. IN DER ÄUßEREN MITOCHONDRIENMEMBRAN (ÄMM) SIND DIE MONOAMINOXIDASE-ISOFORMEN A UND B (MAO A/B) UND DIE CYTOCHROM-B5-(CYT-B5)-REDUKTASE LOKALISIERT. DIE MAOS BAUEN MONOAMINE ZU ALDEHYDEN UND WASSERSTOFFPEROXID ( $H_2O_2$ ) AB. DIE CYT-B5-REDUKTASE KATALYSIERT DIE REDUKTION DES AN DAS CYTOCHROM B5 GEBUNDENEN EISEN-IONS VON DER DREIWERtigen IN DIE ZWEIWERTIGE FORM UNTER GLEICHZEITIGER OXIDATION VON NAD(P)H. IM MITOCHONDRIALEN INTERMEMBRANRAUM (IMR) GENERIERT P66SHC  $H_2O_2$  DURCH DIE OXIDATION VON CYTOCHROM C (C). DIE ELEKTRONENTRANSPORTKETTE (ETK)-KOMPLEXE I-V SIND IN DER INNEREN MITOCHONDRIENMEMBRAN (IMM) LOKALISIERT. DIE KOMPLEXE I, II UND III ERZEUGEN AUS MOLEKULAREM SAUERSTOFF ( $O_2$ ) SUPEROXID ( $O_2^-$ ) UND WASSERSTOFFPEROXID ( $H_2O_2$ ). DIE DIHYDROOROTAT-DEHYDROGENASE (DHODH) UND DIE GLYCERIN-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE (GAPDH) BEFINDEN SICH AN DER ÄUßEREN OBERFLÄCHE DER IMM. DIE DHODH KATALYSIERT DIE UMWANDLUNG VON DIHYDROOROTAT ZU OROTAT, WOBEI ES IN ABWESENHEIT DES ELEKTRONENAKZEPTORS KO-ENZYM Q (Q) IN DER IMM ZUR PRODUKTION VON  $H_2O_2$  KOMMT. DIE GAPDH NUTZT MITOCHONDRIALES KO-ENZYM Q ALS ELEKTRONENAKZEPTOR UND KATALYSIERT DIE OXIDATION VON GLYCERIN-3-PHOSPHAT ZU DIHYDROXYACETONPHOSPHAT, WOBEI  $H_2O_2$  ALS NEBENPRODUKT ENTSTEHT. DAS ELEKTRONENTRANSFERIERENDE FLAVOPROTEIN:ÜBICHINON-OXIDOREDUKTASE-SYSTEM (ETF:QO) DER B-OXIDATION IST AN DER MATRIXSEITE DER IMM LOKALISIERT UND IST ESSENTIELL FÜR DEN ELEKTRONENTRANSFER VON FLAVINHALTIGEN DEHYDROGENASEN AUF KO-ENZYM Q. DIE OXIDATION VON PALMITOYL-CoA IN DEN MITOCHONDRIEN FÜHRT ZUR PRODUKTION VON  $H_2O_2$ . DIE PYRUVAT-DEHYDROGENASE (PDH) KATALYSIERT DIE OXIDATIVE DECARBOXYLIERUNG VON PYRUVAT UND DIE 2-OXOGLUTARAT-DEHYDROGENASE (ODH) KATALYSIERT DIE OXIDATIVE DECARBOXYLIERUNG VON 2-OXOGLUTARAT UND DIE NACHFOLGENDE UMSETZUNG MIT COENZYM A ZUM SUCCINYL-CoA. BEIDE ENZYME ENTHALTEN FAD ALS PROSTHETISCHE GRUPPE UND KÖNNEN ROS ALS REAKTION AUF SCHWANKUNGEN IM NADH-GEHALT PRODUZIEREN (ZUSAMMENGESTELLT AUS [26, 28, 29]). ..... 5

ABBILDUNG 3: ROS-INDUZIERTER INTRAZELLULÄRE VERÄNDERUNGEN IN KARDIOMYOZYTEN. DIE ERHÖHTEN INTRAZELLULÄREN KONZENTRATIONEN AN REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES (ROS), DIE BEI EINER RV-DRUCKBELASTUNG AUFTRETEN, BEEINFLUSSEN MEHRERE FUNKTIONEN DER KARDIOMYOZYTEN. ROS KÖNNEN PRO-HYPERTROPHE WEGE STIMULIEREN, INDEM SIE AUF SCHLÜSSELMOLEKÜLE IN DIESEM PROZESS ABZIELEN, WIE Z.B. MITOGEN-AKTIVIERTE PROTEINKINASE (MAPK), PROTEINKINASE C (PKC) UND SRC-KINASEN. DIE REDOX-VERMITTELTE AKTIVIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN WIE HYPOXIE-INDUZIERBARER FAKTOR (HIF-) 1A, *v-MYC AVIAN MYELOCYTOMATOSIS VIRAL ONCOGENE HOMOLOGUE* (C-MYC) UND *FORKHEAD-BOX-PROTEIN O1* (FOXO1) KÖNNTE FÜR DIE AKTIVIERUNG DER PYRUVAT-DEHYDROGENASE-KINASE (PDK) VERANTWORTLICH SEIN, WELCHE DEN MITOCHONDRIALEN OXIDATIVEN METABOLISMUS HEMMT, WAS WIEDERUM ZU EINER MITOCHONDRIALEN DYSFUNKTION FÜHRT. HOHE ROS-KONZENTRATIONEN KÖNNEN DIE ÖFFNUNG DER MITOCHONDRIALEN PERMEABILITÄTS-ÜBERGANGSPORE (MPTP) UND DIE DEPOLARISIERUNG DER MITOCHONDRIALEN MEMBRAN INDUZIEREN, WAS WIEDERUM MEHR ROS PRODUZIERT UND DURCH DIE FREISETZUNG VON CYTOCHROM C (CYT C) AUS DEN MITOCHONDRIEN ZUR APOPTOSE FÜHRT. DIE HIF-1A-AKTIVIERUNG VERRINGERT AUCH DIE AKTIVITÄT DES  $O_2$ -SENSITIVEN KV-KANALS (KV1,5), WAS ZU EINER MEMBRANDEPOLARISATION UND EINER ERHÖHUNG DER ZYTOSOLISCHEN  $Ca^{2+}$ -KONZENTRATION FÜHRT. DER ÜBERSCHUSS AN ZYTOSOLISCHEN  $Ca^{2+}$ -IONEN, ZUSÄTZLICH ZU DEN AUS DEM SARKOPLASMATISCHEN RETIKULUM (SR) FREIGESetzten ÜBERSCHÜSSIGEN  $Ca^{2+}$ -IONEN, ALS FOLGE DER ROS-VERMITTELTEN ÖFFNUNG DES RYANODIN-REZEPTOR 2 (RYR2)-KANALS

- UND DER HEMMUNG DER SR  $Ca^{2+}$ -ATPASE (SERCA), TRÄGT ZUR KONTRAKTILEN DYSFUNKTION DER KARDIOMYOZYTEN BEI. ROS TRAGEN AUCH ZU EINEM UNGLEICHGEWICHT ZWISCHEN MATRIX-METALLOPROTEINASEN (MMPs) UND GEWEBSINHIBITOR-METALLOPROTEINASEN (TIMPs) BEI, DAS DEN UMBAU (*REMODELLING*) DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX (EZM) UND DIE FIBROSE VORANTREIBT. ↑ ZEIGT EINE ZUNAHME AN; ↓ ZEIGT EINE ABNAHME AN (MODIFIZIERT NACH [40]). ..... 7
- ABBILDUNG 4: STRUKTUR DER NADPH-OXIDASEN (NOX). DIE NOX-ENZYME WEISEN KONSERVIERTE STRUKTUREN AUF, WELCHE DIE FÜR ALLE NOX-ISOFORMEN GEMEINSAME FUNKTION GEWÄHRLEISTEN. BEGINNEND VOM ZYTOSOLISCHEN  $NH_2$ -TERMINUS UMFASSEN DIESE FOLGENDE KONSERVIERTEN STRUKTUREN: DIE TRANSMEMBRAN (TM) –DOMÄNE, BESTEHEND AUS SECHS KONSERVIERTEN ALPHA-HELICES, DIE WIEDERUM ÜBER 5 SCHLAUFEN (*LOOP A-D*) MITEINANDER VERBUNDEN SIND UND DEN VIER HOCHKONSERVIERTEN HÄM-BINDENDEN HISTIDINRESTEN (ROTE KREISE) INNERHALB DER TM-DOMÄNE. DIE ORANGENEN RAUTEN STELLEN DIE HÄM-GRUPPEN MIT JE EINEM EISEN-ION (Fe) ALS ZENTRALATOM DAR. IM ZYTOSOL IST DIE DEHYDROGENASE (DH) – DOMÄNE, BESTEHEND AUS EINER FAD-BINDUNGSSTELLE SOWIE EINER NADPH-BINDUNGSSTELLE DIREKT AM COOH-TERMINUS, LOKALISIERT. ES WIRD ANGENOMMEN, DASS NOX-ENZYME EIN-ELEKTRON-TRANSPORTER DARSTELLEN, WELCHE ELEKTRONEN VON NADPH ÜBER FAD UND DIE BEIDEN HÄM-GRUPPEN DIREKT AUF SAUERSTOFF ÜBERTRAGEN. DIE GRÜNEN KREISE STELLEN KONSERVIERTE AMINOSÄUREN ZWISCHEN DEN HUMANEN ISOFORMEN NOX1, NOX2, NOX3 UND NOX4 DAR (MODIFIZIERT NACH [67]). ..... 12
- ABBILDUNG 5: ZUSAMMENFASSUNG DER NOX-ISOFORMEN, DER BENÖTIGTEN REGULATORISCHEN UNTEREINHEITEN SOWIE DEREN EXPRESSIONSMUSTER. DIE ISOFORM NOX1 BENÖTIGT FÜR DIE AKTIVIERUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT P22PHOX, NOXO1 (IN MANCHEN FÄLLEN MÖGLICHERWEISE AUCH P47PHOX) UND NOXA1 SOWIE DIE KLEINE GTPASE RAC. DIE NOX2-AKTIVIERUNG HÄNGT VON DEN UNTEREINHEITEN P22PHOX, P47PHOX, P67PHOX UND RAC AB. DABEI IST DIE PHOSPHORYLIERUNG VON P47PHOX FÜR DIE AKTIVIERUNG VON NOX2 NOTWENDIG. NOX3 BENÖTIGT P22PHOX SOWIE NOXO1; NOXA1 KÖNNTE SPEZIESABHÄNGIG RELEVANT SEIN UND EINE NOTWENDIGKEIT VON RAC WIRD WEITERHIN DEBATTIERT. NOX4 BENÖTIGT AUßER P22PHOX KEINE WEITEREN UNTEREINHEITEN. NOX5 SOWIE DUOX1/2 WERDEN DURCH KALZIUMIONEN ( $Ca^{2+}$ ) AKTIVIERT UND SIND UNABHÄNGIG VON ANDEREN UNTEREINHEITEN FÜR IHRE ENZYMATISCHE AKTIVITÄT. AUF DIE EXPRESSION UND REGULATION VON NOX4 WIRD UNTER 1.5.3 EINGEGANGEN. FETT GEDRUCKT: STARKE EXPRESSION; NORMAL GEDRUCKT: MITTLERE/GERINGE EXPRESSION (MODIFIZIERT NACH [67]). ..... 13
- ABBILDUNG 6: REGULATION, FUNKTION UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON NOX4 SOWIE NOX4-ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN. DARGESTELLT SIND DIE PROTEINSTRUKTUR VON NOX4 UND EINE ZUSAMMENFASSUNG BISLANG BEKANNTER FUNKTIONEN, REGULATIONSMECHANISMEN, SUBZELLULÄRE LOKALISATIONEN SOWIE MIT NOX4-ASSOZIIERTEN ERKRANKUNGEN. MODIFIZIERT NACH [72]. ..... 18
- ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PROTEINSTRUKTUR VON P66SHC. P66SHC BESTEHT AUS EINER AMINO (N) – TERMINALEN KOLLAGEN-HOMOLOGIE (CH2) – DOMÄNE, EINER CYTOCHROM C-BINDUNGS- DOMÄNE (CB), EINER PHOSPHOTYROSIN-BINDUNGS- DOMÄNE (PTB), EINER WEITEREN CH1- DOMÄNE UND EINER CARBOXY (C) - TERMINALEN SRC-HOMOLOGIE 2 (SH2)-DOMÄNE. INNERHALB DER CH1 DOMÄNE BEFINDEN SICH TYROSINRESTE (Y239/240 UND Y317), DIE NACH AKTIVIERUNG VON REZEPTOR-TYROSINKINASEN PHOSPHORYLIERT WERDEN. DIE PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN (P) SERIN (S) 36 UND 54, THREONIN (T) 386 UND DIE TYROSINE (Y) 239/240 UND 317 WERDEN WÄHREND DER SIGNALTRANSDUKTION DURCH REZEPTOR-TYROSINKINASEN PHOSPHORYLIERT (MODIFIZIERT NACH [147]). ..... 21
- ABBILDUNG 8: SIGNALWEGE VON P52/P46SHC UND P66SHC. NACH LIGANDEN (LIG)-STIMULATION WERDEN DIE SHC-PROTEINE DURCH DIE ZYTOSOLISCHE TYROSINKINASE PHOSPHORYLIERT (P) UND DAMIT REKRUTIERT, UM EINEN KOMPLEX MIT GRB2 UND SOS ZU BILDEN, DER ANSCHLIEßEND DEN MAP-KINASE-SIGNALWEG AKTIVIERT. DURCH DIE BETEILIGUNG VON P66SHC AN DER KOMPLEXBILDUNG KOMMT ES ZUR ZELLALTERUNG ANSTELLE VON ZELLWACHSTUM UND ZELLDIFFERENZIERUNG. P66SHC REGULIERT DIE ZELLULÄRE ROS-KONZENTRATION DURCH DIE AKTIVIERUNG MEMBRAN- GEBUNDENER NOX, DER VERMINDERTEN SYNTHESE ANTIOXIDATIVER ENZYME UND DER ERZEUGUNG VON ROS IN DEN MITOCHONDRIEN (MODIFIZIERT NACH [164]). ..... 26
- ABBILDUNG 9: STUDIENDESIGN P66SHC-PROJEKT. DIE BESTÄTIGUNG DES GENOTYPS ERFOLGTE IN PROTEINEXTRAKTEN VON P66 KO- UND WT-LV MITTELS WESTERN BLOT ANALYSEN. INSGESAMT 35 WT-

- UND 37 P66 KO-MÄUSE WURDEN EINER PAB- ODER SCHEINOPERATION (PAB-OP/SCHEIN-OP) UNTERZOGEN (TAG 1). NACH DREI WOCHEN (TAG 21) WURDEN ALLE TIERE ECHOKARDIOGRAPHISCH (ECHO) UNTERSUCHT. AM DARAUFFOLGENDEN TAG (TAG 22) WURDEN DIE TIERE ENTWEDER EINER HÄMODYNAMISCHEN MESSUNG (HÄMO) UNTERZOGEN MIT ANSCHLIEßENDER BESTIMMUNG DES HERZGEWICHTS ODER ES ERFOLGTE DIE HERZENTNAHME ZWECKS ISOLIERUNG VON RV-KARDIOMYOZYTEN (KM) ODER RV-MITOCHONDRIEN MIT ANSCHLIEßENDER MESSUNG DER KM-FUNKTION BZW. ROS-PRODUKTION..... 38
- ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER PERFUSIONSANLAGE NACH LANGENDORFF ZUR ISOLIERUNG ADULTER MAUS KARDIOMYOZYTEN. DIE ANLAGE BESTEHT AUS EINEM DOPPELWANDIGEN GLASROHR, WELCHES DAS PERFUSIONSMEDIUM IM INNEREN AUF 37 °C TEMPERIERT. DAS HERZ WIRD ÜBER DIE AORTA MIT HILFE EINER KANÜLE AM UNTEREN ENDE DER ANLAGE RETROGRAD PERFUNDIERT. DARUNTER BEFINDET SICH EIN AUFFANGBEHÄLTER, WORAUS DAS AUS DEM HERZ AUSTRETENDE PERFUSAT MIT HILFE EINER PERISTALTIKPUMPE ZUM GLASTRICHTER AM OBEREN ENDE DES GLASROHRS TRANSPORTIERT WIRD. DIE TROPFGESCHWINDIGKEIT WIRD MIT HILFE DES REGLERS AUF CA. 1 TROPFEN/ SEKUNDE EINGESTELLT. 44
- ABBILDUNG 11: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN FRISCH ISOLIERTER KARDIOMYOZYTEN AUS EINEM RECHTEN VENTRIKEL DER MAUS. NACH DER ISOLIERUNG BEFINDEN SICH ÜBERWIEGEND STÄBCHENFÖRMIGE KARDIOMYOZYTEN AUF DER ZELLKULTURSCHALE. VERGRÖßERUNG 200X..... 46
- ABBILDUNG 12: PRINZIP EINER CLARK-ELEKTRODE. DER SAUERSTOFF AUS DER MESSKAMMER GELANGT DURCH EINE SAUERSTOFF-PERMEABLE MEMBRAN ZUR KATHODE, AN WELCHER DIE EIGENTLICHE REAKTION STATTFINDET. DURCH DIE REDUKTION VON SILBER AN DER ANODE WIRD EIN ELEKTRON FREI, DAS WIEDERUM FÜR DIE REDUKTION VON SAUERSTOFF BENÖTIGT WIRD. NIMMT DER SAUERSTOFFGEHALT IN DER MESSKAMMER AB, GELANGT WENIGER SAUERSTOFF ZUR KATHODE UND ES FLIEßT WENIGER STROM. .... 52
- ABBILDUNG 13: PRINZIP DER AMPLEX ULTRA RED METHODE. DAS FARBLOSE AMPLEX ULTRA RED WIRD GEMEINSAM MIT H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> VON DER PEROXIDASE HRP ZU DEM STARK FLUORESZIERENDEN PRODUKT AMPLEX ULTROX RED UMGESETZT, DESSEN EXITATIONS-/ EMISSIONSMAXIMUM BEI 568NM ( $\lambda_{568}$ ) / 581NM ( $\lambda_{581}$ ) LIEGT..... 54
- ABBILDUNG 14: REPRÄSENTATIVE RESPIRATIONSMESSUNG. ERMITTLUNG DES BASALEN UND ADP-STIMULIERTEN SAUERSTOFFVERBRAUCHS ISOLIERTER HERZMITOCHONDRIEN UNTER VERWENDUNG VON KOMPLEX I- UND KOMPLEX II-SUBSTRATEN (GLUTAMAT/MALAT BZW. SUCCINAT UND ROTENON) DURCH MESSUNG DES SAUERSTOFFABFALLS IN DER MESSKAMMER IN 0,5 MINUTEN SCHRITTEN (SCHWARZE, SENKRECHTE LINIEN). ..... 58
- ABBILDUNG 15: SAUERSTOFFVERBRAUCH VON ISOLIERTEN, LINKSVENTRIKULÄREN WT-MITOCHONDRIEN. FÜR DIE QUALITÄTSKONTROLLE DER MITOCHONDRIENPRÄPARATION WURDE DER BASALE SAUERSTOFFVERBRAUCH FÜR DEN RESPIRATIONSKOMPLEX I MIT GLUTAMAT UND MALAT BZW. FÜR DEN RESPIRATIONSKOMPLEX II MIT SUCCINAT UNTER GLEICHZEITIGER HEMMUNG DES RESPIRATIONSKOMPLEX I MIT ROTENON GEMESSEN. NACH ZUGABE VON 40 µM ADP WURDE DIE ADP-STIMULIERTE RESPIRATION GEMESSEN. IN DER TABELLE SIND DER MITOCHONDRIALE SAUERSTOFFVERBRAUCH IN NMOL O<sub>2</sub>/ MIN \* MG PROTEIN ± STANDARDABWEICHUNG SOWIE DER QUOTIENT AUS DER ADP-STIMULIERTEN UND BASALEN RESPIRATION (RCR) AUFGELEISTET. DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSPUNKTE DAR, DAS KREUZ DEN MITTELWERT VON N= 5 TIEREN. .... 59
- ABBILDUNG 16: EINFLUSS DER NOX-INHIBITOREN AUF DEN MITOCHONDRIALEN SAUERSTOFFVERBRAUCH. AUS WT-MÄUSEN ISOLIERTE LINKSVENTRIKULÄRE MITOCHONDRIEN WURDEN MIT 1 % DMSO, MIT 1 µM ODER 10 µM DES NOX1/4-INHIBITORS GKT136901 (GKT, A) BZW. MIT 0,1 µM ODER 1 µM DES PAN NOX-INHIBITORS VAS2780 (VAS, B) BEHANDELT. DER BASALE SAUERSTOFFVERBRAUCH WURDE FÜR DEN RESPIRATIONSKOMPLEX I (ROT) MIT GLUTAMAT UND MALAT BZW. FÜR DEN RESPIRATIONSKOMPLEX II (BLAU) MIT SUCCINAT UNTER GLEICHZEITIGER HEMMUNG DES RESPIRATIONSKOMPLEX I MIT ROTENON GEMESSEN. NACH ZUGABE VON 40 µM ADP WURDE DIE ADP-STIMULIERTE RESPIRATION (ADP) GEMESSEN. DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN

- MESSPUNKTE DAR, DAS KREUZ DEN MITTELWERT VON  $n = 5$  TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS EIN-WEGE-ANOVA,  $p = \text{n.s.}$  vs. DMSO. .... 60
- ABBILDUNG 17: REPRÄSENTATIVE ROS-MESSUNG VON GKT136901-INKUBIERTEN MITOCHONDRIEN MITTELS DER AMPLEX ULTRA RED METHODE. DARGESTELLT SIND DIE FLUORESZENZZUNAHMEN DER EINZELNEN ANSÄTZE (MIT 1 % DMSO, 1  $\mu\text{M}$  UND 10  $\mu\text{M}$  GKT136901 INKUBIERTE LV-MITOCHONDRIEN) ÜBER EINEN ZEITRAUM VON DREI MINUTEN. DIE HINTERGRUNDFLUORESZENZ DES PUFFERS OHNE ZUGESetzte MITOCHONDRIEN WURDE SUBTRAHIERT. .... 61
- ABBILDUNG 18: DER INHIBITOR GKT136901 HEMMT DIE MITOCHONDRIALE ROS-PRODUKTION. AUS WT-MÄUSEN ISOLIERTE LINKSVENTRIKULÄRE MITOCHONDRIEN WURDEN MIT 1 % DMSO, MIT 1  $\mu\text{M}$  ODER 10  $\mu\text{M}$  DES NOX1/4-INHIBITORS GKT136901 BEHANDELT. DIE PRODUKTION VON ROS WURDE BASAL (A) SOWIE IN ANWESENHEIT DES KOMPLEX I-INHIBITORS ROTENON (B) UND UNTER VERWENDUNG VON KOMPLEX I-SUBSTRATEN MIT HILFE VON AMPLEX ULTRA RED GEMESSEN. DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSPUNKTE DAR, DAS KREUZ DEN MITTELWERT VON  $n = 5$  TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS EIN-WEGE-ANOVA \*:  $p < 0,05$  vs. DMSO, \*\*:  $p < 0,05$  vs. DMSO + ROTENON. .... 61
- ABBILDUNG 19: DER PAN NOX-INHIBITOR VAS2870 HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE MITOCHONDRIALE ROS-PRODUKTION. AUS WT-MÄUSEN ISOLIERTE LINKSVENTRIKULÄRE MITOCHONDRIEN WURDEN MIT 1 % DMSO, MIT 0,1  $\mu\text{M}$  ODER 1  $\mu\text{M}$  DES PAN NOX-INHIBITORS VAS2870 BEHANDELT. DIE PRODUKTION VON ROS WURDE BASAL (A) SOWIE IN ANWESENHEIT DES KOMPLEX I-INHIBITORS ROTENON (B) UND UNTER VERWENDUNG VON KOMPLEX I-SUBSTRATEN MIT HILFE VON AMPLEX ULTRA RED GEMESSEN. DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSPUNKTE DAR, DAS KREUZ DEN MITTELWERT VON  $n = 4$  TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS EIN-WEGE-ANOVA.  $p = \text{n.s.}$  .... 62
- ABBILDUNG 20: DER NOX1/4-INHIBITOR GKT136901 HEMMT DIE ROS-PRODUKTION VON WT- UND NOX4 KO-MITOCHONDRIEN. AUS LINKEN VENTRIKELN VON WT- UND NOX4 KO-MÄUSEN ISOLIERTE MITOCHONDRIEN WURDEN MIT 1 % DMSO, MIT 1  $\mu\text{M}$  UND 10  $\mu\text{M}$  DES NOX1/4-INHIBITORS GKT136901 BEHANDELT. DIE PRODUKTION VON ROS WURDE BASAL (A) SOWIE IN ANWESENHEIT DES KOMPLEX I-INHIBITORS ROTENON (B) UND UNTER VERWENDUNG VON KOMPLEX I-SUBSTRATEN MIT HILFE VON AMPLEX ULTRA RED GEMESSEN. DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSPUNKTE DAR, DAS KREUZ DEN MITTELWERT VON  $n = 5$  TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS ZWEI-WEGE-ANOVA \*\*:  $p < 0,05$  vs. WT DMSO + ROTENON, ##:  $p < 0,05$  vs. NOX4 KO DMSO + ROTENON. .... 63
- ABBILDUNG 21. DER PAN NOX-INHIBITOR VAS2870 HAT KEINEN EFFEKT AUF DIE ROS-PRODUKTION VON WT- UND NOX4 KO-MITOCHONDRIEN. VON WT- UND NOX4 KO-MÄUSEN ISOLIERTE LINKSVENTRIKULÄRE MITOCHONDRIEN WURDEN MIT 1 % DMSO ODER MIT 0,1  $\mu\text{M}$  DES PAN NOX-INHIBITORS VAS2870 BEHANDELT. DIE PRODUKTION VON ROS WURDE BASAL (A) SOWIE IN ANWESENHEIT DES KOMPLEX I-INHIBITORS ROTENON (B) UND UNTER VERWENDUNG VON KOMPLEX I-SUBSTRATEN MIT HILFE VON AMPLEX ULTRA RED GEMESSEN. DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSPUNKTE DAR, DAS KREUZ DEN MITTELWERT VON  $n = 3$  TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS ZWEI-WEGE-ANOVA.  $p = \text{n.s.}$  .... 64
- ABBILDUNG 22: DIE NOX-INHIBITOREN GKT136901 UND VAS2870 HABEN KEINEN EFFEKT AUF DIE ROS-PRODUKTION VON MITOCHONDRIEN ISOLIERT AUS NIEREN VON WT- UND NOX4 KO-MÄUSEN. ISOLIERTE MITOCHONDRIEN AUS DER NIERE VON WT- UND NOX4 KO-MÄUSEN WURDEN MIT 1 % DMSO ODER MIT 1  $\mu\text{M}$  UND 10  $\mu\text{M}$  DES NOX1/4-INHIBITORS GKT136901 (A UND B) SOWIE MIT 1  $\mu\text{M}$  UND 10  $\mu\text{M}$  DES PAN NOX-INHIBITORS VAS2870 (C UND D) BEHANDELT. DIE PRODUKTION VON ROS WURDE BASAL (ROT) SOWIE IN ANWESENHEIT DES KOMPLEX I-INHIBITORS ROTENON (BLAU) UND UNTER VERWENDUNG VON KOMPLEX I-SUBSTRATEN MIT HILFE VON AMPLEX ULTRA RED GEMESSEN. DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSPUNKTE DAR, DAS KREUZ

- DEN MITTELWERT VON N = 6 TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS ZWEI-WEGE-ANOVA. P=N.S. .... 65
- ABBILDUNG 23: ANALYSE ZUM NACHWEIS DER REINHEIT ISOLIERTER MITOCHONDRIEN. ES WURDEN WESTERN BLOT ANALYSEN MIT PROTEINEXTRAKTEN VON WT-RV (HERZ GESAMT) UND -NIEREN (NIEREN GESAMT) SOWIE MIT AUFGEREINIGTEN MITOCHONDRIEN (MITO), ISOLIERT AUS WT- UND NOX4 KO (KO)-LV UND -NIEREN UNTER VERWENDUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN MARKER DER PLASMAMEMBRAN ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASE), DES ZYTOSOLS (GAPDH), DES ZELLKERNS (HDAC 2), DES SARKOPLASMATISCHEN RETIKULUMS (SERCA2A), DES ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUMS (CALNEXIN) UND DER MITOCHONDRIEN (MNSOD) DURCHGEFÜHRT. .... 66
- ABBILDUNG 24: NADPH-OXIDASE 4 IST UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN NICHT IN MITOCHONDRIEN DETEKTIERBAR. WESTERN BLOT ANALYSE ZUR NOX4-LOKALISATION IN PROTEINEXTRAKTEN (GESAMT) UND IN ISOLIERTEN MITOCHONDRIEN (MITO) AUS WT- UND NOX4 KO (KO)-LV UND -NIEREN. ALS NEGATIV-KONTROLLE (NEG-KNTR.) WURDE EIN WESTERN BLOT MIT PROTEINEXTRAKTEN AUS RECHTEN VENTRIKELN (RV) UND NIEREN (N) VON WT-MÄUSEN OHNE VERWENDUNG VON ANTI-NOX4 ANTIKÖRPERN DURCHGEFÜHRT. .... 67
- ABBILDUNG 25: SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON NOX4 UND SEINES KOFAKTORS P22PHOX. WESTERN BLOT ANALYSE DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON NOX4 UND P22PHOX IN PROTEINEXTRAKTEN (GESAMT), IN ISOLIERTEN MITOCHONDRIEN (MITO), IN MEMBRANFRAKTIONEN (MEM) UND ZYTOSOLFRAKTIONEN (Zyto) VON WT- UND NOX4 KO (KO)-HERZEN UND -NIEREN UNTER VERWENDUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN NOX4, P22PHOX SOWIE MARKERN DER PLASMAMEMBRAN ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASE), DES ZYTOSOLS (GAPDH), DES ZELLKERNS (HDAC 2), DES SARKOPLASMATISCHEN RETIKULUMS (SERCA2A), DES ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUMS (CALNEXIN) UND DER MITOCHONDRIEN (MNSOD). 68
- ABBILDUNG 26: VALIDIERUNG DES BEFUNDES, DASS NOX4 UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN NICHT IN HERZMITOCHONDRIEN DETEKTIERBAR IST. WESTERN BLOT ANALYSE ZUR NOX4-LOKALISATION IN PROTEINEXTRAKTEN (GESAMT) UND IN MITOCHONDRIEN (MITO) ISOLIERT AUS WT- UND NOX4 KO (KO)-LV UND -NIEREN (S. ABB. 24). DAS NOX4-PROTEIN WURDE NACH „STRIPPEN“ DER MEMBRAN UNTER DER VERWENDUNG DES GUT DOKUMENTIERTEN ANTI-NOX4 ANTIKÖRPERS VOM KINGS COLLEGE DETEKTIERT. ALS KONTROLLE (NEG-KNTR.) WURDE EINE WESTERN BLOT ANALYSE MIT PROTEINEXTRAKTEN (GESAMT) AUS RECHTEN VENTRIKELN (RV) UND NIEREN (N) VON WT-MÄUSEN OHNE VERWENDUNG DES ANTI-NOX4 ANTIKÖRPERS DURCHGEFÜHRT. .... 69
- ABBILDUNG 27: P66SHC-PROTEINEXPRESSION. ES WURDEN WESTERN BLOT ANALYSEN MIT PROTEINEXTRAKTEN VON WILD TYP (WT, N = 4) UND P66SHC *KNOCKOUT* (P66 KO, N = 4) LINKEN VENTRIKELN (LV) DURCHGEFÜHRT. DIE FÄRBUNG MIT PONCEAU S DEMONSTRIERTE EINE EINHEITLICHE PROTEINBELADUNG DES GELS. .... 70
- ABBILDUNG 28: EINFLUSS VON P66SHC AUF DIE ROS-PRODUKTION ISOLIERTER RECHTSVENTRIKULÄRE MITOCHONDRIEN. BASALE (A) UND ROTENON-STIMULIERTE (B) ROS-PRODUKTION IN ISOLIERTEN RECHTSVENTRIKULÄREN MITOCHONDRIEN VON WT- UND P66 KO-MÄUSEN DREI WOCHEN NACH PULMONALARTERIEN *BANDING* (PAB-OP) ODER SCHEINOPERATION (SCHEIN-OP). DIE DATEN SIND IN QUANTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSWERTE DAR, DAS KREUZ DEN MITTELWERT VON N = 4 (WT SCHEIN-OP), N = 6 (WT PAB-OP), N = 5 (P66 KO SCHEIN-OP) BZW. VON N = 5 (P66 KO PAB-OP) TIEREN. \*: P < 0,05 VS. WT SCHEIN-OP, ANALYSIERT MITTELS ZWEI-WEGE-ANOVA. .... 71
- ABBILDUNG 29: HÄMODYNAMISCHE PARAMETER. RECHTSVENTRIKULÄRE SYSTOLISCHER DRUCK (RVSP, A) UND SYSTEMISCHER ARTERIELLER BLUTDRUCK (SAP, B) VON WT- UND P66 KO-MÄUSEN DREI WOCHEN NACH PULMONALARTERIEN *BANDING* (PAB-OP) ODER SCHEINOPERATION (SCHEIN-OP). DIE DATEN SIND IN QUANTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSWERTE DAR, DIE KREUZE DEN MITTELWERT VON N = 6 (WT SCHEIN-OP), N = 7 (WT PAB-OP), N = 6 (P66 KO SCHEIN-OP) BZW. VON N = 9 (P66 KO PAB-OP) TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS ZWEI-WEGE-ANOVA. \*: P < 0,05 VS. WT SCHEIN-OP, \*\*: P < 0,05 VS. P66 KO SCHEIN-OP. .... 73

ABBILDUNG 30: RECHTVENTRIKULÄRE HYPERTROPHIE DREI WOCHEN NACH PAB. DARSTELLUNG DER GEWICHTSVERHÄLTNISSE DES RECHTEN VENTRIKELS ZUM KÖRPERGEWICHT (RV/KG, A) UND DES RECHTEN VENTRIKELS ZUM LINKEN VENTRIKEL PLUS SEPTUM (RV/LV+S, B) VON WT- UND p66 KO-MÄUSEN DREI WOCHEN NACH PULMONALARTERIEN *BANDING* (PAB-OP) ODER SCHEINOPERATION (SCHEIN-OP). DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSWERTE DAR, DIE KREUZE DEN MITTELWERT VON N = 6 (WT SCHEIN-OP), N = 7 (WT PAB-OP), N = 6 (p66 KO SCHEIN-OP) BZW. VON N = 9 (p66 KO PAB-OP) TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS ZWEI-WEGE-ANOVA. \*: p < 0,05 vs. WT SCHEIN-OP, \*\*: p < 0,05 vs. p66 KO SCHEIN-OP..... 74

ABBILDUNG 31: ECHOKARDIOGRAPHISCHE MESSUNGEN ZUR RECHTSVENTRIKULÄREN HYPERTROPHIE UND DILATATION. RECHTSVENTRIKULÄRE WANDDICKE (RVWT, A) UND RECHTSVENTRIKULÄRE INNERER DURCHMESSER (RVID, B) VON WT- UND p66 KO-MÄUSEN DREI WOCHEN NACH PULMONALARTERIEN *BANDING* (PAB-OP) ODER SCHEINOPERATION (SCHEIN-OP). DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSWERTE DAR, DIE KREUZE DEN MITTELWERT VON N = 6 (WT SCHEIN-OP), N = 7 (WT PAB-OP), N = 6 (p66 KO SCHEIN-OP) BZW. VON N = 9 (p66 KO PAB-OP) TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS ZWEI-WEGE-ANOVA. \*: p < 0,05 vs. WT SCHEIN-OP, \*\*: p < 0,05 vs. p66 KO SCHEIN-OP. .... 75

ABBILDUNG 32: ECHOKARDIOGRAPHISCHE MESSUNGEN ZUR RECHTSVENTRIKULÄREN HERZFUNKTION. *TRICUSPID ANNULAR PLANE SYSTOLIC EXCURSION* (TAPSE, A) UND HERZZEITVOLUMEN BEZOGEN AUF DAS KÖRPERGEWICHT (*CARDIAC INDEX*, CI, B) VON WT- UND p66 KO-MÄUSEN DREI WOCHEN NACH PULMONALARTERIEN *BANDING* (PAB-OP) ODER SCHEINOPERATION (SCHEIN-OP). DIE DATEN SIND IN QUARTILEN VON 25 %, 50 % UND 75 % DARGESTELLT, WOBEI DIE WHISKER DAS GESAMTE SPEKTRUM DER DATENVERTEILUNG REPRÄSENTIEREN. DIE PUNKTE STELLEN DIE EINZELNEN MESSWERTE DAR, DIE KREUZE DEN MITTELWERT VON N = 6 (WT SCHEIN-OP), N = 7 (WT PAB-OP), N = 6 (p66 KO SCHEIN-OP) BZW. VON N = 9 (p66 KO PAB-OP) TIEREN. DIE STATISTISCHE ANALYSE ERFOLGTE MITTELS ZWEI-WEGE-ANOVA. \*: p < 0,05 vs. WT SCHEIN-OP, \*\*: p < 0,05 vs. p66 KO SCHEIN-OP. .... 76

ABBILDUNG 33: BEDEUTUNG VON NOX4 UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN IN HERZ UND NIERE. UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN IST DIE NIERE DAS ORGAN MIT DER HÖCHSTEN EXPRESSION DER NADPH-OXIDASE 4 (NOX4) (DURCHGEZOGENE LINIE), WOHINGEGEN DIE NOX4-PROTEINMENGE IM HERZEN DEUTLICH GERINGER IST UND IM RAHMEN DIESER ARBEIT UNTERHALB DER DETEKTIONSGRENZE LAG (GESTRICHELTE LINIE). WEDER DIE MITOCHONDRIALE LOKALISATION NOCH DIE ENZYMATISCHE AKTIVITÄT VON NOX4 INNERHALB DES MITOCHONDRIUMS (MITO) KONNTE IN DIESER STUDIE GEZEIGT WERDEN, DA DIE MITOCHONDRIALE ROS-PRODUKTION SOWOHL NACH PHARMAKOLOGISCHER HEMMUNG ALS AUCH NACH *KNOCKOUT* ( $\perp$ ) DER NOX4 UNVERÄNDERT ( $\leftrightarrow$ ) BLIEB. SOMIT BLEIBT UNKLAR (?), OB DIE PROTEINMENGE UND SOMIT AUCH DER NOX4-VERMITTELTE BEITRAG ZUR MITOCHONDRIALEN ROS-PRODUKTION UNTERHALB DER DETEKTIONSGRENZE LIEGT ODER OB NOX4 UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN NICHT INNERHALB DER MITOCHONDRIEN LOKALISIERT IST. ALLERDINGS KÖNNTE DIE NOX4-EXPRESSION UNTER PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN IM HERZEN ZUNEHMEN, WAS NICHT NUR EINE STEIGERUNG ( $\uparrow$ ) DER INTRAZELLULÄREN ROS-PRODUKTION, SONDERN AUCH EINE VERSTÄRKTE TRANSLOKATION VON NOX4 IN DIE MITOCHONDRIEN ZUR FOLGE HABEN KÖNNTE. IN LETZTEREM FALL WÄRE NICHT NUR EINE STEIGERUNG DER INTRAZELLULÄREN ROS-PRODUKTION, SONDERN AUCH EINE GESTEIGERTE MITOCHONDRIALE ROS-BILDUNG ZU ERWARTEN. .... 91

ABBILDUNG 34: BEDEUTUNG VON p66SHC BEI DER ENTWICKLUNG DER RV-HYPERTROPHIE NACH PAB. LINKS: IM RAHMEN DIESER STUDIE WURDE GEZEIGT, DASS DIE DREIWÖCHIGE (3W) DRUCKBELASTUNG DES RECHTEN VENTRIKELS (RV) DURCH DIE STENOSE DER PULMONALARTERIE MITTELS PULMONALARTERIEN *BANDING* (PAB) EINE RV-HYPERTROPHIE (RVH) IN WT-MÄUSEN INDUZIERTE, DIE MIT EINER VERMINDERTEN RV-FUNKTION ( $\downarrow$ ) ASSOZIIERT WAR. DIE LASTFREIE ZELLVERKÜRZUNG (dL/L) UND FUNKTION DER RV-KARDIOMYOZYTEN (KM) SOWIE DIE MITOCHONDRIALE PRODUKTION VON REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES (ROS) BLIEBEN NACH 3W PAB-INTERVENTION UNVERÄNDERT ( $\leftrightarrow$ ), WAS FÜR DAS STADIUM DER KOMPENSIERTEN HYPERTROPHIE SPRICHT. WÄHREND DIE MITOCHONDRIALE ROS-PRODUKTION UND DIE KM-FUNKTION DURCH DIE GENETISCHE DELETION VON p66SHC (p66 KO) 3W NACH PAB NICHT BEEINFLUSST WURDE, KONNTE EINE VERMINDERTE LASTFREIE ZELLVERKÜRZUNG IN p66 KO-KARDIOMYOZYTEN FESTGESTELLT WERDEN. DIES HATTE JEDOCH KEINEN EINFLUSS AUF DAS AUSMAß DER RVH ODER DIE RV-FUNKTION, DA BEIDE PARAMETER IN WT- UND p66 KO-TIEREN GLEICHERMABEN EINGESCHRÄNKT WAREN. ALLERDINGS BLIEB IM ZUGE DIESER ARBEIT UNGEKLÄRT (?), OB DIE PAB

INTERVENTION DIE PROTEINEXPRESSION, PHOSPHORYLIERUNG (P) UND/ODER DIE TRANSLOKATION VON P66SHC IN DIE MITOCHONDRIEN (MITO) SOWIE DIE INTRAZELLULÄREN ROS-SPIEGEL ERHÖHT. RECHTS: DA DIE DEKOMPENSIERTE PHASE DER RVH MIT ERHÖHTEN ROS-SPIEGELN (↑) ASSOZIIERT IST, IST ES DENKBAR, DASS NACH LÄNGERER PAB-INTERVENTION (>3W) DIE EXPRESSION, PHOSPHORYLIERUNG UND MITOCHONDRIALE TRANSLOKATION VON P66SHC ZUNIMMT UND P66SHC ENTWEDER INDIREKT DURCH DIE AKTIVIERUNG VON NADPH-OXIDASEN (NOX) ODER DIREKT DURCH OXIDATION VON CYTOCHROM C AUS DER ELEKTRONENTRANSPORTKETTE (ETK) ZUR ROS-PRODUKTION BEITRÄGT. HOHE ROS-KONZENTRATION WIEDERUM KÖNNEN DIE FUNKTION DER KARDIOMYOZYTEN DURCH BSPW. DIE OXIDATION VON KONTRAKTILEN PROTEINEN VERSCHLECHTERN UND SO EINE WEITERE ABNAHME DER RV-FUNKTION (↓) UND RECHTSHERZVERSAGEN (RHV) HERVORRUFEN, WAS DURCH DEN *KNOCKOUT* VON P66SHC MÖGLICHERWEISE VERMEIDBAR SEIN KÖNNTE. .... 100

## 10. Tabellenverzeichnis

- TABELLE 1: STUDIENDESIGN NOX4-Projekt. (I) Messungen des Sauerstoffverbrauchs von isolierten linksventrikulären Mitochondrien (LV-Mito) von C57BL/6 Mäusen (WT) zwecks Testung möglicher Eigeneffekte der NOX-Inhibitoren GKT136901 und VAS2870. Messungen der ROS-Produktion von GKT136901- oder VAS2870-behandelten Mitochondrien isoliert aus (II) LV von C57BL/6 (WT) sowie aus (III) LV und Nieren von NOX4 KO-Mäusen und WT-Wurfgeschwistern. (IV) Western Blot Analysen zwecks Ermittlung der NOX4-Proteinexpression in Gesamtextrakten, Mitochondrien sowie in Zytosol- und Membranfraktionen von NOX4 KO-Mäusen und WT-Wurfgeschwistern. n.B. = nicht bestimmt..... 37
- TABELLE 2: Körpergewicht und Herzfrequenz. Die Daten zeigen das Körpergewicht (KG) in Gramm (G) sowie die Herzfrequenz (HR) in Schlägen pro Minute (bpm) von Mäusen drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB-OP) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 16 (WT Schein-OP), n = 15 (WT PAB-OP), n = 15 (p66 KO Schein-OP) bzw. von n = 18 (p66 KO PAB-OP) Tieren dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. p = n.s..... 70
- TABELLE 3: Funktion isolierter rechtsventrikulärer Kardiomyozyten. Die Daten zeigen die diastolische Zelllänge (Ldiast in  $\mu\text{m}$ ), die Kontraktionsgeschwindigkeit (Con Vel in  $\mu\text{m/s}$ ), die Relaxationsgeschwindigkeit (Rel Vel in  $\mu\text{m/s}$ ) und die lastfreie Zellverkürzung (dL/L in %) von isolierten rechtsventrikulären (RV) Kardiomyozyten drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 101 Zellen (WT Schein-OP), 153 Zellen (p66 KO Schein-OP), 106 Zellen (WT PAB) bzw. 131 Zellen (p66 KO PAB) dargestellt (4 Mäuse pro Gruppe). #: p < 0,05 vs. WT PAB-OP, analysiert mittels Zwei-Wege-ANOVA. .... 72
- TABELLE 4: Echokardiographische Messungen zur rechtsventrikulären Hypertrophie und Funktion. Die Daten zeigen die rechtsventrikuläre Wanddicke (RVWT), die *Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion* (TAPSE) und das Herzzeitvolumen im Verhältnis zum Körpergewicht (*Cardiac Index*, CI) von WT- und p66 KO-Mäusen drei Wochen nach Pulmonalarterien *Banding* (PAB-OP) oder Scheinoperation (Schein-OP). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 16 (WT Schein-OP), n = 15 (WT PAB-OP), n = 15 (p66 KO Schein-OP) bzw. von n = 18 (p66 KO PAB-OP) Tieren dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zwei-Wege-ANOVA. \*: p < 0,05 vs. WT Schein-OP, \*\*: p < 0,05 vs. p66 KO Schein-OP. .... 76

---

## 11. Literatur

1. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.
2. Dikalov, S., K.K. Griendling, and D.G. Harrison, *Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 717-27.
3. Witko-Sarsat, V., et al., *Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects*. Lab Invest, 2000. **80**(5): p. 617-53.
4. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
5. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
6. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.
7. Nordberg, J. and E.S. Arner, *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(11): p. 1287-312.
8. Rodriguez, C., et al., *Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin*. J Pineal Res, 2004. **36**(1): p. 1-9.
9. Schluter, K.D., et al., *Review on Chamber-Specific Differences in Right and Left Heart Reactive Oxygen Species Handling*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 1799.
10. Brown, D.A., et al., *Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(4): p. 238-250.
11. Schaper, J., E. Meiser, and G. Stammeler, *Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts*. Circ Res, 1985. **56**(3): p. 377-91.
12. Nickel, A., J. Loffler, and C. Maack, *Myocardial energetics in heart failure*. Basic Res Cardiol, 2013. **108**(4): p. 358.
13. Mootha, V.K., A.E. Arai, and R.S. Balaban, *Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart*. Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 2): p. H769-75.
14. Balaban, R.S., *Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(10): p. 1259-71.
15. M. Scharl, M.G., A. von Eckstein, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*, in Elsevier Urban & Fischer 2009. p. 182-190.

16. Hu, B.B., et al., [*Determination of main flavone glycosides in Flos Chrysanthemi and observation of factors influenced contents*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2006. **31**(21): p. 1772-5.
17. Lee, H.L., et al., *Biphasic modulation of the mitochondrial electron transport chain in myocardial ischemia and reperfusion*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **302**(7): p. H1410-22.
18. Turrens, J.F., *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. *Biosci Rep*, 1997. **17**(1): p. 3-8.
19. St-Pierre, J., et al., *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(47): p. 44784-90.
20. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. *Physiol Rev*, 1979. **59**(3): p. 527-605.
21. Navarro, A. and A. Boveris, *The mitochondrial energy transduction system and the aging process*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(2): p. C670-86.
22. Chen, Q., et al., *Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. **294**(2): p. C460-6.
23. Nohl, H., L. Gille, and K. Staniek, *The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration*. *Acta Biochim Pol*, 2004. **51**(1): p. 223-9.
24. Carroll, J., et al., *Bovine complex I is a complex of 45 different subunits*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(43): p. 32724-7.
25. Brand, M.D., *The sites and topology of mitochondrial superoxide production*. *Exp Gerontol*, 2010. **45**(7-8): p. 466-72.
26. Kalogeris, T., Y. Bao, and R.J. Korthuis, *Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning*. *Redox Biol*, 2014. **2**: p. 702-14.
27. Peoples, J.N., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease*. *Exp Mol Med*, 2019. **51**(12): p. 1-13.
28. Mailloux, R.J., *Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species*. *Redox Biol*, 2015. **4**: p. 381-98.
29. Andreyev, A.Y., Y.E. Kushnareva, and A.A. Starkov, *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. *Biochemistry (Moscow)*, 2005. **70**(2): p. 200-214.
30. Sharma, K. and D.A. Kass, *Heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms, clinical features, and therapies*. *Circ Res*, 2014. **115**(1): p. 79-96.

31. Qipshidze, N., et al., *Autophagy mechanism of right ventricular remodeling in murine model of pulmonary artery constriction*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2012. **302**(3): p. H688-H696.
32. Bernardi, P. and F. Di Lisa, *The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **78**: p. 100-6.
33. Zorov, D.B., et al., *Reactive Oxygen Species (Ros-Induced) Ros Release: A New Phenomenon Accompanying Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Cardiac Myocytes*. Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(7): p. 1001-1014.
34. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 821-31.
35. Bogaard, H.J., et al., *The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension*. Chest, 2009. **135**(3): p. 794-804.
36. Maulik, S.K. and S. Kumar, *Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review*. Toxicol Mech Methods, 2012. **22**(5): p. 359-66.
37. Tsutsui, H., S. Kinugawa, and S. Matsushima, *Oxidative stress and heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(6): p. H2181-90.
38. Misra, M.K., et al., *Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes*. Med Sci Monit, 2009. **15**(10): p. RA209-219.
39. Liu, Q., S. Wang, and L. Cai, *Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage*. J Diabetes Investig, 2014. **5**(6): p. 623-34.
40. Iacobazzi, D., et al., *Cellular and molecular basis of RV hypertrophy in congenital heart disease*. Heart, 2016. **102**(1): p. 12-7.
41. Sheehan, F. and A. Redington, *The right ventricle: anatomy, physiology and clinical imaging*. Heart, 2008. **94**(11): p. 1510-5.
42. Voelkel, N.F., et al., *Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure*. Circulation, 2006. **114**(17): p. 1883-91.
43. Drake, J.I., et al., *Molecular signature of a right heart failure program in chronic severe pulmonary hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(6): p. 1239-47.
44. Bertram, H.C., et al., *NMR relaxometry and differential scanning calorimetry during meat cooking*. Meat Sci, 2006. **74**(4): p. 684-9.
45. Haddad, F., et al., *Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure*. Circulation, 2008. **117**(13): p. 1717-31.

46. Friedberg, M.K. and A.N. Redington, *Right versus left ventricular failure: differences, similarities, and interactions*. *Circulation*, 2014. **129**(9): p. 1033-44.
47. Kondo, R.P., et al., *Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform*. *J Physiol*, 2006. **571**(Pt 1): p. 131-46.
48. Brooks, W.W., et al., *Comparison of contractile state and myosin isozymes of rat right and left ventricular myocardium*. *J Mol Cell Cardiol*, 1987. **19**(5): p. 433-40.
49. Schreckenber, R., et al., *Specific Mechanisms Underlying Right Heart Failure: The Missing Upregulation of Superoxide Dismutase-2 and Its Decisive Role in Antioxidative Defense*. *Antioxid Redox Signal*, 2015. **23**(15): p. 1220-32.
50. Liu, L., et al., *Serotonin-mediated protein carbonylation in the right heart*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **45**(6): p. 847-54.
51. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. *J Clin Invest*, 1975. **56**(1): p. 56-64.
52. Ryan, J.J. and S.L. Archer, *The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure*. *Circ Res*, 2014. **115**(1): p. 176-88.
53. Piao, L., G. Marsboom, and S.L. Archer, *Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure*. *J Mol Med (Berl)*, 2010. **88**(10): p. 1011-20.
54. Reddy, S. and D. Bernstein, *Molecular Mechanisms of Right Ventricular Failure*. *Circulation*, 2015. **132**(18): p. 1734-42.
55. Vonk-Noordegraaf, A., et al., *Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(25 Suppl): p. D22-33.
56. Zaffran, S., et al., *Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field*. *Circ Res*, 2004. **95**(3): p. 261-8.
57. Bar, H., et al., *Upregulation of embryonic transcription factors in right ventricular hypertrophy*. *Basic Res Cardiol*, 2003. **98**(5): p. 285-94.
58. Urashima, T., et al., *Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murine model of pulmonary stenosis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(3): p. H1351-H1368.
59. Watts, J.A., M.R. Marchick, and J.A. Kline, *Right ventricular heart failure from pulmonary embolism: key distinctions from chronic pulmonary hypertension*. *J Card Fail*, 2010. **16**(3): p. 250-9.
60. Paulin, R. and E.D. Michelakis, *The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension*. *Circ Res*, 2014. **115**(1): p. 148-64.

61. Sutendra, G., et al., *A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension*. J Mol Med (Berl), 2013. **91**(11): p. 1315-27.
62. Ecartot-Laubriet, A., et al., *The activation pattern of the antioxidant enzymes in the right ventricle of rat in response to pressure overload is of heart failure type*. Heart Dis, 2003. **5**(5): p. 308-12.
63. Wang, X., N.V. Shults, and Y.J. Suzuki, *Oxidative profiling of the failing right heart in rats with pulmonary hypertension*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0176887.
64. Karamanlidis, G., et al., *Impaired mitochondrial biogenesis precedes heart failure in right ventricular hypertrophy in congenital heart disease*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(6): p. 707-13.
65. Gomez-Arroyo, J., et al., *Metabolic gene remodeling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to pulmonary arterial hypertension*. Circ Heart Fail, 2013. **6**(1): p. 136-44.
66. Redout, E.M., et al., *Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(3): p. H1038-47.
67. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
68. Burritt, J.B., et al., *Phage display epitope mapping of human neutrophil flavocytochrome b558. Identification of two juxtaposed extracellular domains*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 2053-61.
69. Imajoh-Ohmi, S., et al., *Topology of cytochrome b558 in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis*. J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 180-4.
70. Segal, A.W., et al., *Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes*. Biochem J, 1992. **284** ( Pt 3): p. 781-8.
71. Altenhofer, S., et al., *The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(14): p. 2327-43.
72. Chen, F., et al., *From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 412.
73. Goyal, P., et al., *Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(1): p. 32-9.

- 
74. He, W., et al., *NOX4 rs11018628 polymorphism associates with a decreased risk and better short-term recovery of ischemic stroke*. *Exp Ther Med*, 2018. **16**(6): p. 5258-5264.
75. Takac, I., et al., *The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(15): p. 13304-13.
76. Lassegue, B. and R.E. Clempus, *Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. **285**(2): p. R277-97.
77. Griendling, K.K., *Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system*. *Heart*, 2004. **90**(5): p. 491-3.
78. Lassegue, B. and K.K. Griendling, *NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(4): p. 653-61.
79. von Lohneysen, K., et al., *Constitutive NADPH oxidase 4 activity resides in the composition of the B-loop and the penultimate C terminus*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(12): p. 8737-45.
80. Sturrock, A., et al., *Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. **290**(4): p. L661-L673.
81. Sturrock, A., et al., *Nox4 mediates TGF-beta1-induced retinoblastoma protein phosphorylation, proliferation, and hypertrophy in human airway smooth muscle cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **292**(6): p. L1543-55.
82. Cucoranu, I., et al., *NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts*. *Circ Res*, 2005. **97**(9): p. 900-7.
83. Pedruzzi, E., et al., *NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(24): p. 10703-17.
84. Hwang, J., et al., *Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation*. *Circ Res*, 2003. **93**(12): p. 1225-32.
85. Vallet, P., et al., *Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia*. *Neuroscience*, 2005. **132**(2): p. 233-8.
86. Lu, X., et al., *PPAR $\gamma$  regulates hypoxia-induced Nox4 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells through NF- $\kappa$ B*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. **299**(4): p. L559-66.

87. Wosniak, J., Jr., et al., *Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(6): p. 1265-78.
88. Xu, H., et al., *Differential roles of PKC $\alpha$  and PKC $\epsilon$  in controlling the gene expression of Nox4 in human endothelial cells*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **44**(8): p. 1656-67.
89. Richard, D., et al., *Docosahexaenoic acid down-regulates endothelial Nox 4 through a sPLA2 signalling pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **389**(3): p. 516-22.
90. Hwang, J., et al., *The PPAR $\gamma$  ligand, rosiglitazone, reduces vascular oxidative stress and NADPH oxidase expression in diabetic mice*. *Vascul Pharmacol*, 2007. **46**(6): p. 456-62.
91. Lassegue, B., et al., *Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways*. *Circ Res*, 2001. **88**(9): p. 888-94.
92. Lambeth, J.D., T. Kawahara, and B. Diebold, *Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(3): p. 319-31.
93. Peshavariya, H., et al., *Translation-linked mRNA destabilization accompanying serum-induced Nox4 expression in human endothelial cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(10): p. 2399-408.
94. Zhang, Q., et al., *Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(9): p. 1627-33.
95. Diebold, I., et al., *The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(12): p. 2087-96.
96. Pendyala, S., et al., *Nrf2 regulates hyperoxia-induced Nox4 expression in human lung endothelium: identification of functional antioxidant response elements on the Nox4 promoter*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **50**(12): p. 1749-59.
97. Ambasta, R.K., et al., *Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(44): p. 45935-41.
98. Lyle, A.N., et al., *Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 2009. **105**(3): p. 249-59.
99. Kuroda, J., et al., *The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells*. *Genes Cells*, 2005. **10**(12): p. 1139-51.
100. Gorin, Y., et al., *Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **285**(2): p. F219-29.

101. Kim, S.M., et al., *Angiotensin II-induced mitochondrial Nox4 is a major endogenous source of oxidative stress in kidney tubular cells*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e39739.
102. Mahadev, K., et al., *The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 1844-54.
103. Park, H.S., et al., *Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells*. Cardiovasc Res, 2006. **72**(3): p. 447-55.
104. Park, H.S., et al., *Cutting Edge: Direct Interaction of TLR4 with NAD(P)H Oxidase 4 Isozyme Is Essential for Lipopolysaccharide-Induced Production of Reactive Oxygen Species and Activation of NF- $\kappa$ B*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(6): p. 3589-3593.
105. Murray, T.V., et al., *Redox regulation of cardiomyocyte cell cycling via an ERK1/2 and c-Myc-dependent activation of cyclin D2 transcription*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **79**: p. 54-68.
106. Zhang, M., et al., *NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(42): p. 18121-6.
107. Djordjevic, T., et al., *Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(3): p. 519-25.
108. Chen, K., et al., *Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization*. J Cell Biol, 2008. **181**(7): p. 1129-39.
109. Goettsch, C., et al., *Long-term cyclic strain downregulates endothelial Nox4*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(10): p. 2385-97.
110. Wu, R.F., et al., *HIV-1 Tat activates dual Nox pathways leading to independent activation of ERK and JNK MAP kinases*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37412-9.
111. Jaulmes, A., et al., *Nox4 mediates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 via p38 MAPK pathway in cultured human endothelial cells*. Thromb Res, 2009. **124**(4): p. 439-46.
112. Tong, X., et al., *Upregulation of Nox4 by TGF $\beta$ 1 oxidizes SERCA and inhibits NO in arterial smooth muscle of the prediabetic Zucker rat*. Circ Res, 2010. **107**(8): p. 975-83.
113. Geiszt, M., et al., *Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 8010-4.
114. Shiose, A., et al., *A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1417-23.

115. Schilder, Y.D., et al., *NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(12): p. 1598-606.
116. Clempus, R.E., et al., *Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 42-8.
117. Vaquero, E.C., et al., *Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34643-54.
118. Meng, D., D.D. Lv, and J. Fang, *Insulin-like growth factor-I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 2008. **80**(2): p. 299-308.
119. Pendyala, S., et al., *Role of Nox4 and Nox2 in hyperoxia-induced reactive oxygen species generation and migration of human lung endothelial cells*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(4): p. 747-64.
120. Yang, S., et al., *Expression of Nox4 in osteoclasts*. J Cell Biochem, 2004. **92**(2): p. 238-48.
121. Li, J., et al., *The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(9): p. 3978-88.
122. Craige, S.M., et al., *NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation*. Circulation, 2011. **124**(6): p. 731-40.
123. Hecker, L., et al., *NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury*. Nat Med, 2009. **15**(9): p. 1077-81.
124. Ago, T., et al., *NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells*. Stroke, 2005. **36**(5): p. 1040-6.
125. Kuroda, J. and J. Sadoshima, *NADPH oxidase and cardiac failure*. J Cardiovasc Transl Res, 2010. **3**(4): p. 314-20.
126. Matsushima, S., et al., *Broad suppression of NADPH oxidase activity exacerbates ischemia/reperfusion injury through inadvertent downregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha*. Circ Res, 2013. **112**(8): p. 1135-49.
127. Zhang, M., et al., *Both cardiomyocyte and endothelial cell Nox4 mediate protection against hemodynamic overload-induced remodelling*. Cardiovasc Res, 2018. **114**(3): p. 401-408.
128. Nabeebaccus, A.A., et al., *Nox4 reprograms cardiac substrate metabolism via protein O-GlcNAcylation to enhance stress adaptation*. JCI Insight, 2017. **2**(24).

129. Hilenski, L.L., et al., *Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(4): p. 677-83.
130. Serrander, L., et al., *NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation*. *Biochem J*, 2007. **406**(1): p. 105-14.
131. Weyemi, U., et al., *Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues*. *Endocr Relat Cancer*, 2010. **17**(1): p. 27-37.
132. Lee, C.F., et al., *Nox4 is a novel inducible source of reactive oxygen species in monocytes and macrophages and mediates oxidized low density lipoprotein-induced macrophage death*. *Circ Res*, 2010. **106**(9): p. 1489-97.
133. Pendergrass, K.D., et al., *The angiotensin II-AT1 receptor stimulates reactive oxygen species within the cell nucleus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **384**(2): p. 149-54.
134. von Lohneysen, K., et al., *Mutational analysis reveals distinct features of the Nox4-p22 phox complex*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(50): p. 35273-82.
135. von Lohneysen, K., et al., *Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(4): p. 961-75.
136. Anilkumar, N., et al., *A 28-kDa splice variant of NADPH oxidase-4 is nuclear-localized and involved in redox signaling in vascular cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(4): p. e104-12.
137. Block, K., Y. Gorin, and H.E. Abboud, *Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(34): p. 14385-90.
138. Kuroda, J., et al., *NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(35): p. 15565-70.
139. Ago, T., et al., *Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2010. **106**(7): p. 1253-64.
140. von Löhneysen, K., et al., *Structural Insights into Nox4 and Nox2: Motifs Involved in Function and Cellular Localization*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(4): p. 961-975.
141. Shanmugasundaram, K., et al., *NOX4 functions as a mitochondrial energetic sensor coupling cancer metabolic reprogramming to drug resistance*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 997.
142. Koziel, R., et al., *Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4*. *Biochem J*, 2013. **452**(2): p. 231-9.
143. Luzi, L., et al., *Evolution of Shc functions from nematode to human*. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. **10**(6): p. 668-74.

144. Fagiani, E., et al., *RaLP, a new member of the Src homology and collagen family, regulates cell migration and tumor growth of metastatic melanomas*. *Cancer Res*, 2007. **67**(7): p. 3064-73.
145. Jones, N., et al., *Analysis of a Shc family adaptor protein, ShcD/Shc4, that associates with muscle-specific kinase*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(13): p. 4759-73.
146. Migliaccio, E., et al., *Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway*. *EMBO J*, 1997. **16**(4): p. 706-16.
147. Galimov, E.R., *The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis*. *Acta Naturae*, 2010. **2**(4): p. 44-51.
148. Gu, H., et al., *New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(19): p. 7109-20.
149. Sakaguchi, K., et al., *Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells*. *Mol Endocrinol*, 1998. **12**(4): p. 536-43.
150. Luschnig, S., et al., *The Drosophila SHC adaptor protein is required for signaling by a subset of receptor tyrosine kinases*. *Mol Cell*, 2000. **5**(2): p. 231-41.
151. Finetti, F., M.T. Savino, and C.T. Baldari, *Positive and negative regulation of antigen receptor signaling by the Shc family of protein adapters*. *Immunol Rev*, 2009. **232**(1): p. 115-34.
152. Smith, M.J., et al., *Screening for PTB domain binding partners and ligand specificity using proteome-derived NPXY peptide arrays*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(22): p. 8461-74.
153. McGlade, J., et al., *Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(19): p. 8869-73.
154. Ravichandran, K.S., *Signaling via Shc family adapter proteins*. *Oncogene*, 2001. **20**(44): p. 6322-30.
155. Collins, L.R., et al., *Bifurcation of cell migratory and proliferative signaling by the adaptor protein Shc*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(7): p. 1561-8.
156. Ravichandran, K.S., et al., *Interaction of Shc with Grb2 regulates the Grb2 association with mSOS*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **766**: p. 202-3.
157. van der Geer, P., et al., *The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions*. *Current Biology*, 1996. **6**(11): p. 1435-1444.

158. Giorgio, M., et al., *Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis*. Cell, 2005. **122**(2): p. 221-33.
159. Pelicci, G., et al., *A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction*. Cell, 1992. **70**(1): p. 93-104.
160. Trinei, M., et al., *A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(24): p. 3872-3878.
161. Di Lisa, F., et al., *Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(2): p. 131-9.
162. Conti, L., et al., *Expression and activation of SH2/PTB-containing ShcA adaptor protein reflects the pattern of neurogenesis in the mammalian brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 8185-90.
163. Cattaneo, E. and P.G. Pelicci, *Emerging roles for SH2/PTB-containing Shc adaptor proteins in the developing mammalian brain*. Trends Neurosci, 1998. **21**(11): p. 476-81.
164. Kumar, S., *P66Shc and vascular endothelial function*. Biosci Rep, 2019. **39**(4).
165. Ventura, A., et al., *The p66Shc longevity gene is silenced through epigenetic modifications of an alternative promoter*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22370-6.
166. Migliaccio, E., et al., *The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 309-13.
167. Orsini, F., et al., *The Life Span Determinant p66Shc Localizes to Mitochondria Where It Associates with Mitochondrial Heat Shock Protein 70 and Regulates Trans-membrane Potential*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(24): p. 25689-25695.
168. Orsini, F., et al., *The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25689-95.
169. Pinton, P., et al., *Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc*. Science, 2007. **315**(5812): p. 659-63.
170. Boengler, K., et al., *P66shc and its role in ischemic cardiovascular diseases*. Basic Res Cardiol, 2019. **114**(4): p. 29.
171. Chen, H., et al., *Myeloid differentiation protein 2 induced retinal ischemia reperfusion injury via upregulation of ROS through a TLR4-NOX4 pathway*. Toxicol Lett, 2018. **282**: p. 109-120.

- 
172. Feng, D., et al., *Inhibition of p66Shc-mediated mitochondrial apoptosis via targeting prolyl-isomerase Pin1 attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(8): p. 759-773.
173. Galimov, O.V. and S.R. Tuisin, *[Application of combined bandaging material with antioxidant activity for suppurative diseases of soft tissues]*. Khirurgiia (Mosk), 2010(3): p. 41-4.
174. Khalid, S., et al., *cJun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation of serine 36 is critical for p66Shc activation*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20930.
175. Arany, I., et al., *p66shc inhibits pro-survival epidermal growth factor receptor/ERK signaling during severe oxidative stress in mouse renal proximal tubule cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(10): p. 6110-7.
176. Park, Y.J., et al., *p66Shc expression in proliferating thyroid cells is regulated by thyrotropin receptor signaling*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2473-80.
177. Le, S., T.J. Connors, and A.C. Maroney, *c-Jun N-terminal kinase specifically phosphorylates p66ShcA at serine 36 in response to ultraviolet irradiation*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 48332-6.
178. Khanday, F.A., et al., *Rac1 leads to phosphorylation-dependent increase in stability of the p66shc adaptor protein: role in Rac1-induced oxidative stress*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(1): p. 122-9.
179. Vikram, A., et al., *Canonical Wnt signaling induces vascular endothelial dysfunction via p66Shc-regulated reactive oxygen species*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(10): p. 2301-9.
180. Okada, S., et al., *The 66-kDa Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 28042-9.
181. Khanday , F.A., et al., *Sos-mediated activation of rac1 by p66shc*. Journal of Cell Biology, 2006. **172**(6): p. 817-822.
182. Arany, I., et al., *p66shc Inhibits Pro-survival Epidermal Growth Factor Receptor/ERK Signaling during Severe Oxidative Stress in Mouse Renal Proximal Tubule Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(10): p. 6110-6117.
183. Ma, Z., et al., *p66(Shc) restrains Ras hyperactivation and suppresses metastatic behavior*. Oncogene, 2010. **29**(41): p. 5559-67.
184. Nemoto, S. and T. Finkel, *Redox Regulation of Forkhead Proteins Through a p66shc-Dependent Signaling Pathway*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2450-2452.

185. Lebiedzinska, M., et al., *Oxidative stress-dependent p66Shc phosphorylation in skin fibroblasts of children with mitochondrial disorders*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1797**(6-7): p. 952-60.
186. Wu, Z., et al., *Reduction of p66Shc suppresses oxidative damage in retinal pigmented epithelial cells and retina*. *J Cell Physiol*, 2006. **209**(3): p. 996-1005.
187. Chahdi, A. and A. Sorokin, *Endothelin-1 Couples  $\beta$ Pix to p66Shc: Role of  $\beta$ Pix in Cell Proliferation through FOXO3a Phosphorylation and p27kip1 Down-Regulation Independently of Akt*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(6): p. 2609-2619.
188. Camici, G.G., et al., *Genetic deletion of p66<sup>Shc</sup> adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(12): p. 5217-5222.
189. Francia, P., et al., *Deletion of p66<sup>shc</sup> Gene Protects Against Age-Related Endothelial Dysfunction*. *Circulation*, 2004. **110**(18): p. 2889-2895.
190. Gertz, M. and C. Steegborn, *The Lifespan-regulator p66Shc in mitochondria: redox enzyme or redox sensor?* *Antioxid Redox Signal*, 2010. **13**(9): p. 1417-28.
191. Cosentino, F., et al., *Final common molecular pathways of aging and cardiovascular disease: role of the p66Shc protein*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(4): p. 622-8.
192. Sabri, A., B.A. Wilson, and S.F. Steinberg, *Dual actions of the Galpha(q) agonist Pasteurella multocida toxin to promote cardiomyocyte hypertrophy and enhance apoptosis susceptibility*. *Circ Res*, 2002. **90**(8): p. 850-7.
193. Obreztkhikova, M., et al., *Distinct signaling functions for Shc isoforms in the heart*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(29): p. 20197-204.
194. Graiani, G., et al., *Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage*. *Hypertension*, 2005. **46**(2): p. 433-40.
195. Cesselli, D., et al., *Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy*. *Circ Res*, 2001. **89**(3): p. 279-86.
196. Wang, Y., H. Qu, and J. Liu, *P66Shc Deletion Ameliorates Oxidative Stress and Cardiac Dysfunction in Pressure Overload-Induced Heart Failure*. *J Card Fail*, 2020. **26**(3): p. 243-253.
197. Kleinschnitz, C., et al., *Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration*. *PLoS Biol*, 2010. **8**(9).
198. Giorgio, M., et al., *The p66Shc knocked out mice are short lived under natural condition*. *Aging Cell*, 2012. **11**(1): p. 162-8.

- 
199. Nippert, F., R. Schreckenber, and K.D. Schluter, *Isolation and Cultivation of Adult Rat Cardiomyocytes*. J Vis Exp, 2017(128).
200. Piper, H.M., et al., *Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1982. **14**(7): p. 397-412.
201. Delbridge, L.M. and K.P. Roos, *Optical methods to evaluate the contractile function of unloaded isolated cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(1): p. 11-25.
202. Langer, M., D. Luttecke, and K.D. Schluter, *Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship*. Pflugers Arch, 2003. **447**(3): p. 289-97.
203. Zaman, Z. and R.L. Verwilghen, *Quantitation of proteins solubilized in sodium dodecyl sulfate-mercaptoethanol-Tris electrophoresis buffer*. Anal Biochem, 1979. **100**(1): p. 64-9.
204. MORTON, J.D.B., M.F.; ZYSKOWSKI, R.F., *Respiratory Control Ratio: A Computer Simulation of Oxidative Phosphorylation*. BIOCHEMICAL EDUCATION, 1996. **24**(2): p. 110-111.
205. Helmcke, I., et al., *Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(6): p. 1279-87.
206. Wang, H., et al., *Activation of GPR30 attenuates diastolic dysfunction and left ventricle remodelling in oophorectomized mRen2.Lewis rats*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(1): p. 96-104.
207. Moe, K.T., et al., *Nox2 and Nox4 mediate tumour necrosis factor-alpha-induced ventricular remodelling in mice*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(12): p. 2601-13.
208. Schnelle, M., et al., *NADPH oxidase-4 promotes eccentric cardiac hypertrophy in response to volume overload*. Cardiovasc Res, 2021. **117**(1): p. 178-187.
209. Matsushima, S., et al., *Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2013. **112**(4): p. 651-63.
210. Sedeek, M., et al., *Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **299**(6): p. F1348-58.
211. Anilkumar, N., et al., *Nox4 and nox2 NADPH oxidases mediate distinct cellular redox signaling responses to agonist stimulation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1347-54.
212. Beretta, M., et al., *Nox4 regulates InsP3 receptor-dependent Ca(2+) release into mitochondria to promote cell survival*. EMBO J, 2020. **39**(19): p. e103530.

- 
213. Dorris, R.L., *A simple method for screening monoamine oxidase (MAO) inhibitory drugs for type preference*. J Pharmacol Methods, 1982. **7**(2): p. 133-7.
214. Brewer, A.C., et al., *Nox4 regulates Nrf2 and glutathione redox in cardiomyocytes in vivo*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(1): p. 205-15.
215. Zhang, M., et al., *NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers?* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(9): p. 1024-41.
216. Hancock, M., et al., *Myocardial NADPH oxidase-4 regulates the physiological response to acute exercise*. Elife, 2018. **7**.
217. Zhang, L., et al., *New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4*. Biochimie, 2011. **93**(3): p. 457-68.
218. Jagnandan, D., W.C. Sessa, and D. Fulton, *Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(4): p. C1024-33.
219. Filadi, R., P. Theurey, and P. Pizzo, *The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance*. Cell Calcium, 2017. **62**: p. 1-15.
220. Csordas, G., D. Weaver, and G. Hajnoczky, *Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions*. Trends Cell Biol, 2018. **28**(7): p. 523-540.
221. Marchi, S., et al., *Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death*. Cell Calcium, 2018. **69**: p. 62-72.
222. De Stefani, D., et al., *A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter*. Nature, 2011. **476**(7360): p. 336-40.
223. Prior, K.K., et al., *The Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin Is a NADPH Oxidase NOX4 Interacting Protein*. J Biol Chem, 2016. **291**(13): p. 7045-59.
224. Graham, K.A., et al., *NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria*. Cancer Biol Ther, 2010. **10**(3): p. 223-31.
225. Sakellariou, G.K., et al., *Studies of mitochondrial and nonmitochondrial sources implicate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(s) in the increased skeletal muscle superoxide generation that occurs during contractile activity*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(6): p. 603-21.
226. Martyn, K.D., et al., *Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases*. Cell Signal, 2006. **18**(1): p. 69-82.
227. Prior, K.K., et al., *CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity*. Redox Biol, 2016. **9**: p. 287-295.

- 
228. DeLeo, F.R., et al., *Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13986-93.
229. Doughan, A.K., D.G. Harrison, and S.I. Dikalov, *Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction*. Circ Res, 2008. **102**(4): p. 488-96.
230. Shanmugasundaram, K., et al., *NOX4 functions as a mitochondrial energetic sensor coupling cancer metabolic reprogramming to drug resistance*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 997.
231. Goy, C., et al., *The imbalanced redox status in senescent endothelial cells is due to dysregulated Thioredoxin-1 and NADPH oxidase 4*. Exp Gerontol, 2014. **56**: p. 45-52.
232. Altenhofer, S., et al., *Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement*. Antioxid Redox Signal, 2015. **23**(5): p. 406-27.
233. Brandes, R.P., N. Weissmann, and K. Schroder, *Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation*. Free Radic Biol Med, 2014. **76**: p. 208-26.
234. Stielow, C., et al., *Novel Nox inhibitor of oxLDL-induced reactive oxygen species formation in human endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(1): p. 200-5.
235. ten Freyhaus, H., et al., *Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 331-41.
236. Dao, V.T., et al., *Isoform-selective NADPH oxidase inhibitor panel for pharmacological target validation*. Free Radic Biol Med, 2020. **148**: p. 60-69.
237. Miwa, S., et al., *Carboxylesterase converts Amplex red to resorufin: Implications for mitochondrial H2O2 release assays*. Free Radic Biol Med, 2016. **90**: p. 173-83.
238. Dikalov, S.I., et al., *Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(9): p. 1340-51.
239. Li, Y. and M.A. Trush, *Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(2): p. 295-9.
240. Sadoshima, J., et al., *Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro*. Cell, 1993. **75**(5): p. 977-84.
241. Kim, S. and H. Iwao, *Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 11-34.

- 
242. Rota, M., et al., *Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene*. *Circ Res*, 2006. **99**(1): p. 42-52.
243. Veith, C., et al., *FHL-1 is not involved in pressure overload-induced maladaptive right ventricular remodeling and dysfunction*. *Basic Res Cardiol*, 2020. **115**(2): p. 17.
244. Carpi, A., et al., *The cardioprotective effects elicited by p66(Shc) ablation demonstrate the crucial role of mitochondrial ROS formation in ischemia/reperfusion injury*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1787**(7): p. 774-80.
245. Gierhardt, M., et al., *Genetic Deletion of p66shc and/or Cyclophilin D Results in Decreased Pulmonary Vascular Tone*. *Cardiovasc Res*, 2020.
246. Zhao, Y., et al., *p66Shc Contributes to Liver Fibrosis through the Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species*. *Theranostics*, 2019. **9**(5): p. 1510-1522.
247. Piao, S., et al., *CRIF1 deficiency induced mitophagy via p66shc-regulated ROS in endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020. **522**(4): p. 869-875.
248. Zimmer, A., et al., *Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension*. *Mol Cell Biochem*, 2020. **464**(1-2): p. 93-109.
249. Redout, E.M., et al., *Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species*. *Cardiovasc Res*, 2007. **75**(4): p. 770-81.
250. Frazziano, G., et al., *Nox-derived ROS are acutely activated in pressure overload pulmonary hypertension: indications for a seminal role for mitochondrial Nox4*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **306**(2): p. H197-205.
251. Qipshidze, N., et al., *Autophagy mechanism of right ventricular remodeling in murine model of pulmonary artery constriction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **302**(3): p. H688-96.
252. Pak, O., et al., *Impact of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ on hypoxia-induced pulmonary hypertension*. *Eur Respir J*, 2018.
253. Li, N., et al., *Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(10): p. 8516-25.
254. Orsini, F., et al., *Regulatory effects of the mitochondrial energetic status on mitochondrial p66Shc*. 2006. **387**(10\_11): p. 1405.
255. Guo, J., et al., *p66Shc links alpha1-adrenergic receptors to a reactive oxygen species-dependent AKT-FOXO3A phosphorylation pathway in cardiomyocytes*. *Circ Res*, 2009. **104**(5): p. 660-9.

- 
256. Quarrie, J.K. and K.T. Riabowol, *Murine models of life span extension*. Sci Aging Knowledge Environ, 2004. **2004**(31): p. re5.
257. Spruijt, O.A., et al., *The Effects of Exercise on Right Ventricular Contractility and Right Ventricular–Arterial Coupling in Pulmonary Hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **191**(9): p. 1050-1057.
258. Wang, Z., et al., *Progressive right ventricular functional and structural changes in a mouse model of pulmonary arterial hypertension*. Physiol Rep, 2013. **1**(7): p. e00184.
259. Esfandiary, A., et al., *Protection against pressure overload-induced right heart failure by uncoupling protein 2 silencing*. Cardiovasc Res, 2019. **115**(7): p. 1217-1227.
260. Santos, C.X., et al., *Redox signaling in cardiac myocytes*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(7): p. 777-93.
261. Boehm, M., et al., *Maintained right ventricular pressure overload induces ventricular-arterial decoupling in mice*. Exp Physiol, 2017. **102**(2): p. 180-189.
262. Gierhardt, M., *Die Rolle der Proteine p66shc und CyclophilinD für die pulmonalvaskuläre Hypoxiereaktion*, in *Edition scientifique 2017*: Giessen.
263. Gertz, M., et al., *Activation of the lifespan regulator p66<sup>Shc</sup> through reversible disulfide bond formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(15): p. 5705-5709.
264. Gertz, M., et al., *Identification of Peroxiredoxin 1 as a novel interaction partner for the lifespan regulator protein p66Shc*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(2): p. 254-265.

## 12. Publikationsverzeichnis

**Hirschhäuser, C.**, Bornbaum, J., Reis, A., Böhme, S., Kaludercic, N., Menabò, R., Di Lisa, F., Boengler, K., Shah, A.M., Rainer Schulz, Schmidt, H. H. H. W. (2015). NOX4 in Mitochondria: Yeast Two-Hybrid-Based Interaction with Complex I Without Relevance for Basal Reactive Oxygen Species? *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14), 1106–1112. <http://doi.org/10.1089/ars.2014.6238>

**Hirschhäuser, C.**, Sydykov, A., Wolf, A., Esfandiary, A., Bornbaum, J., Kutsche, H. S., Boengler, K., Sommer, N., Schreckenberger, R., Schlüter, K. D., Weissmann, N., Schermuly, R., & Schulz, R. (2020). Lack of Contribution of p66shc to Pressure Overload-Induced Right Heart Hypertrophy. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9339. <https://doi.org/10.3390/ijms21249339>

**Hirschhäuser, C.**, Lissoni, A., Gorge, P.M., Lampe P. D., Schlüter K.-D., Leybaert, L., Schulz, R., Boengler, K. (2021). Phosphorylation of Connexin 43 by casein kinase 1 is essential for the cardioprotection by ischemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 116(1), 21. <https://doi.org/10.1007/s00395-021-00861-z>

Heger J., **Hirschhäuser C.**, Bornbaum J., Sydykov A., Dempfle A., Schneider A., Braun T., Schlüter K.D., Schulz R. (2021). Cardiomyocytes-specific deletion of monoamine oxidase B reduces irreversible myocardial ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology of Medicine*. 165:14-23. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.020

Schlüter, K.D., Kutsche H., **Hirschhäuser, C.**, Schreckenberger R., Schulz R. (2018). Review on Chamber-Specific Differences in Right and Left Heart Reactive Oxygen Species Handling. *Frontiers in Physiology*, 9 (1799), 1-11. doi: 10.3389/fphys.2018.01799.

Esfandiary, A., Kutsche, H. S., Schreckenberger, R., Weber, M., Pak, O., Kojonazarov, B., Sydykov, A., **Hirschhäuser, C.**, Wolf, A., Haag, D., Hecker, M., Fink, L., Seeger, W., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Weissmann, N., Schulz, R., Rohrbach, S., Li, L., Sommer, N., Schlüter, K. D. (2019) Protection against pressure overload-induced right heart failure by uncoupling protein 2 silencing. *Cardiovascular Research*. 115(7):1217-1227. doi: 10.1093/cvr/cvz049.

Soetkamp, D., Nguyen, T. T., Menazza, S., **Hirschhäuser, C.**, Hendgen-Cotta, U. B., Rassaf, T., Schlüter K.D , Boengler, K., Murphy, E., Schulz, R. (2014). S-nitrosation of mitochondrial connexin 43 regulates mitochondrial function. *Basic Research in Cardiology*, 109(5), 433. <http://doi.org/10.1007/s00395-014-0433-x>

Kutsche H.S., Schreckenberger R., Weber M., **Hirschhäuser C.**, Rohrbach S., Li L., Niemann B., Schulz R., Schlüter K.D.. (2020) Alterations in Glucose Metabolism During the Transition to Heart Failure: The Contribution of UCP-2. *Cells*. 9(3):552. doi: 10.3390/cells9030552.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

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

Datum

Christine Hirschhäuser

## Danksagung

Ich bedanke mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. Rainer Schulz, sowohl für die Bereitstellung der Themen als auch für seine Unterstützung.

Mein größter Dank gebührt Frau PD Dr. Kerstin Böngler für ihre außerordentlich tolle wissenschaftliche und menschliche Betreuung, die vielen anregenden Gespräche und ihre uneingeschränkte Unterstützung, die sie mir entgegenbrachte. Sie hatte immer ein offenes Ohr für alle meine Fragen und stand mir mit Rat und Tat zu Seite.

Auch Frau Dr. Jacqueline Heger bin ich äußerst dankbar für ihre freundschaftliche und hilfsbereite Unterstützung. Sie war mir stets eine tolle Kollegin, deren Tür für mich immer offen stand und mit der ich viele interessante Diskussionen führen durfte.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Harald H.H.W. Schmidt und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der NOX4-Mauslinie und der NOX-Inhibitoren. Die Zusammenarbeit mit ihm war eine Freude und ich bedanke mich für die großartige wissenschaftliche Betreuung im Rahmen des NOX4-Projekts.

Ich danke außerdem recht herzlich Dr. Akylbek Sydykov für die Bereitstellung seines technischen *Knowhows* sowie für seine besondere Unterstützung und sein stets offenes Ohr beim p66shc-Projekt. Auch Frau Dr. Natascha Sommer, Herr Prof. Dr. Norbert Weißmann, Herr Prof. Dr. Ralph Schermuly und Herr Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter danke ich recht herzlich für die Unterstützung beim p66shc-Projekt und für die tolle Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Frau PD Dr. Frauke Härtel für ihre Bereitschaft danken, die vorliegende Doktorarbeit Korrektur zu lesen.

Auch meine lieben Kolleginnen Anna Reis und Sabrina Böhme waren mir in all den Jahren nicht nur fachlich eine große Stütze, sondern auch freundschaftlich. Beide sind mir sehr an`s Herz gewachsen. In diesem Zusammenhang möchte ich natürlich auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts danken: u.a. Frau Prof. Dr. Gerhild Euler, Daniel Soetkamp, Elvira Ungefug, Herman Holzträger, Ulrike Newport und vielen Anderen.

Darüber hinaus gilt mein tiefster Dank meiner geliebten Familie sowie meinen unfassbar tollen Freunden und Nachbarn für den Beistand und die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Insbesondere meiner Schwester Regina, meinem Ehemann Tim und meinen außerordentlich tapferen Kindern, Alica und Jakob, die diese anstrengende und im letzten Jahr sehr ungewöhnliche Zeit so toll gemeistert haben und eine unfassbar große Stütze für mich waren, bin ich unendlich dankbar. Danke für eure Geduld, euren Beistand und euer Verständnis. Ihr wart und seid stets auf's Neue der Wind in meinem Rücken!

