

Veränderungen mitochondrialer Atmungskettenfunktionen
in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen
unter chronischer Hypoxie

-

Respirometrische und Remissions-Spektrophotometrische
Untersuchungen

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

vorgelegt von
Susanne Cornelia Schörner
aus Reutlingen

Gießen 2014

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Exzellenzcluster Kardio-Pulmonales System
der Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Gutachter: Prof. Dr. Holger Nef

Tag der Disputation: 10. Juni 2014

MEINEN ELTERN

Ulrike Knörzer-Schörner
Hans-Joachim Schörner

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
1.1. Anatomie und Physiologie der Lunge	1
1.1.1. Das Ventilationssystem	1
1.1.2. Das Gefäßsystem	1
1.1.2.1. Gefäßsystem allgemein.....	1
1.1.2.2. Gefäßsystem der Lunge.....	2
1.1.3. Der Gasaustausch	2
1.2. Das Mitochondrium	3
1.2.1. Die Elektronentransportkette	4
1.2.1.1. Aufbau der Elektronentransportkette	5
1.2.1.2. Oxidative Phosphorylierung.....	5
1.2.1.3. Inhibitoren der Elektronentransportkette und ATPase	6
1.3. Reaktion der pulmonalen Gefäße auf Hypoxie	7
1.3.1. Einteilung der Reaktion pulmonaler Gefäße auf Hypoxie	7
1.3.2. Eigenschaften der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion und Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	8
1.4. Die pulmonale Hypertonie	10
1.4.1. Einteilung der pulmonalen Hypertonie	11
1.4.2. Vaskuläres Remodeling	13
1.5. Mechanismen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion und der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie	14
1.5.1. Mechanismen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion	14
1.5.2. Veränderungen in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen unter chronischer Hypoxie	15
1.5.3. Die Rolle der Mitochondrien	15
1.5.4. Die Rolle von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies.....	16
1.5.4.1. Mitochondrialer ROS-Abfall unter Hypoxie	17

1.5.4.2. Mitochondrialer ROS-Anstieg unter Hypoxie	18
1.5.5. Die Rolle von metabolischen Veränderungen bei der Hypoxie- induzierten pulmonalen Hypertonie	19
1.5.6. Weitere Sauerstoffsensorkandidaten.....	20
1.5.6.1. NADH-Oxidoreduktasen.....	21
1.5.6.2. NADPH-Oxidasen	21
1.5.6.3. Cytochrom P450	21
1.5.6.4. K _v -Kanäle	22
1.6. Die Rolle von Endothelin in der pulmonalen Hypertonie	23
2. Zielsetzung der Arbeit.....	25
3. Material.....	28
3.1. Chemikalien	28
3.2. Antikörper	29
3.3. Verbrauchsmaterialien	30
3.4. Geräte	31
4. Methoden	32
4.1. Zellisolierung von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen.....	32
4.2. Zellisolierung von aortalen glatten Muskelzellen.....	35
4.3. Zellkultur: Bedingungen und Begriffsdefinitionen.....	35
4.3.1. Atmosphärische Bedingungen und Zellkultur	35
4.3.2. Zellalter	36
4.3.3. Konfluenz.....	36
4.3.4. Wechsel des Kulturmediums	36
4.3.5. Zellteilung und Neuaussaat.....	37
4.3.6. Zellzählung.....	37
4.3.7. Versuchsvorbereitung	37
4.3.8. Spezifische Bedingungen bei der Zellkultur von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen.....	38
4.3.9. Spezifische Bedingungen bei der Zellkultur von aortalen glatten Muskelzellen	38

4.4.	Inkubation von Zellkulturen in chronischer Hypoxie	38
4.5.	High-Resolution Respirometrie.....	39
4.5.1.	Kalibrierungen.....	40
4.5.1.1.	Raumluft-Kalibrierung.....	40
4.5.1.2.	Nullpunkt-Kalibrierung.....	41
4.5.1.3.	Hintergrund-Kalibrierung	41
4.6.	Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Sauerstoffaffinität und maximalen endogenen Atmung.....	42
4.7.	Versuchsprotokoll zur Bestimmung von Protonenleak und maximaler Atmungsketten-Kapazität	44
4.7.1.	Atmungsphasen und Atmungsquotienten	45
4.8.	Remissions-Spektrophotometrie.....	47
4.9.	Aktivitätsbestimmung der mitochondrialen Citrat-Synthase	51
4.10.	Proteinbestimmung	52
4.11.	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	53
4.12.	Statistik	55
5.	Ergebnisse	56
5.1.	Charakterisierung der glatten Gefäßmuskelzellen	56
5.2.	Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die mitochondriale Atmung in PSMCs	58
5.2.1.	Einfluss des Zellalters	58
5.2.2.	Einfluss des Wachstumsfaktorengehaltes	60
5.2.3.	Einfluss von Endothelin	62
5.3.	Sauerstoffaffinität und Zellatmung unter chronischer Hypoxie	63
5.3.1.	Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen	63
5.3.1.1.	PSMCs nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation	63
5.3.1.1.1.	Einfluss des Wachstumsfaktorengehaltes in chronischer Hypoxie.....	65
5.3.1.2.	PSMCs nach 48-stündiger hypoxischer Inkubation	66
5.3.2.	Aortale glatte Muskelzellen.....	68
5.3.2.1.	ASMCs nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation	68

5.3.3. Vergleich ASMCs und PASMCs	69
5.4. Auswirkungen chronischer Hypoxie auf das Protonenleak und die maximale Atmungsketten-Kapazität	72
5.4.1. Mitochondriale Atmungsphasen nach hypoxischer Inkubation.....	72
5.4.2. Mitochondriale Atmungsquotienten nach hypoxischer Inkubation.....	73
5.5. Mitochondriale Citrat-Synthase-Aktivität unter chronischer Hypoxie	74
5.6. Redox-Status der mitochondrialen Atmungsketten-Cytochrome unter chronischer Hypoxie.....	75
5.6.1. Darstellung des sauerstoffabhängigen Reduktionsstatus mitochondrialer Atmungskettencytochrome.....	79
6. Diskussion	82
6.1. Überlegungen zu Messungen an isolierten Gefäßmuskelzellen des Kaninchens	82
6.2. Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die Eigenschaften der Mitochondrien.....	84
6.2.1. Mitochondriale Atmung von PASMCs im Vergleich zu anderen Zellarten.....	84
6.2.2. Einfluss von Aussaat, Passage und Versuchsdauer.....	85
6.2.3. Einfluss von Wachstumsfaktoren.....	86
6.2.4. Einfluss von Endothelin-1	87
6.2.5. Zellkulturbedingungen für die chronisch hypoxischen Versuche.....	88
6.3. Mitochondriale Atmungskettenfunktionen in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nach Inkubation in chronischer Hypoxie.....	89
6.3.1. Die Rolle von Mitochondrien in der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion sowie der pulmonalen Hypertonie	89
6.3.2. Auswirkungen der chronisch hypoxischen Inkubation auf mitochondriale Sauerstoffaffinität und Atmung	89
6.3.3. Auswirkungen der chronisch hypoxischen Inkubation auf die Mitochondrienzahl	92
6.4. Veränderungen des cytochromalen Redox-Status unter chronischer Hypoxie	93
6.5. Mitochondriale Atmungskettenfunktionen in aortalen glatten Muskelzellen nach Inkubation in chronischer Hypoxie	96

6.6. Schlussfolgerung.....	97
7. Zusammenfassung.....	99
8. Summary.....	101
Abkürzungsverzeichnis.....	I
Verzeichnisse.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Literaturverzeichnis.....	VIII
Publikationsverzeichnis.....	XVIII
Ehrenwörtliche Erklärung.....	XIX
Danksagung.....	XX

1. EINLEITUNG

1.1. ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER LUNGE

1.1.1. Das Ventilationssystem

Die Lunge dient dem Gasaustausch im menschlichen Organismus. Eingeatmete Luft strömt über die Trachea in die beiden Hauptbronchien (Bronchus principalis dexter et sinister) und weiter in die Lungenflügel (Pulmo dexter et sinister). Die Hauptbronchien teilen sich in Lappenbronchien (Bronchi lobares, 3 rechts, 2 links) und diese weiter in Segmentbronchien (Bronchi segmentales). Diese wiederum verzweigen sich in knorpelhaltige Bronchi und weiter distal in knorpellose Bronchioli, die die Lungenläppchen (Lobuli pulmonis) versorgen. Auf der letzten Ebene verzweigen sich die Bronchioli terminales zu Bronchioli respiratorii, der Übergangszone zu den Azini. Der Weg bis zu den Bronchioli terminales wird als anatomischer Totraum bezeichnet und dient nur der Luftleitung. Ein Bronchiolus terminalis enthält 1.500 bis 4.000 Alveolen, eine menschliche Lunge ca. 300 bis 400 Mio. Alveolen. Dies ergibt eine Gesamtläche von 70 bis 140 m², die für den Gasaustausch zur Verfügung steht. Zwei Drittel der eingeatmeten Luft gelangen über den Totraum hinweg in die Alveolen, um am Gasaustausch teilzunehmen ⁴¹.

1.1.2. Das Gefäßsystem

1.1.2.1. Gefäßsystem allgemein

Das menschliche Gefäßsystem hat eine Gesamtlänge von 20.000 bis 40.000 km und eine innere Oberfläche von 1.000 m²⁹. Seine Funktion besteht primär im Nährstoff- und Gastransport, sekundär in der Wärmeverteilung und Temperaturregulation ⁹.

Das Kreislaufsystem gliedert sich in zwei Abschnitte, einerseits die Makrozirkulation mit Arterien und Venen, und andererseits die Mikrozirkulation oder Endstrombahn mit Arteriolen, Kapillaren und Venulen ⁹.

Die Gefäße sind aus drei Schichten aufgebaut, von innen nach außen: Tunica intima aus Endothelzellen; Tunica muscularis (Media) aus glatter Muskulatur, welche durch ihre Elastizität eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation spielt; Tunica externa (Adventitia) aus Bindegewebe, in welcher die Nerven und Vasa vasorum verlaufen.

Dazwischen befindet sich jeweils eine Membrana elastica interna, bzw. externa. Der Wandaufbau der Venen entspricht dem der Arterien, allerdings existiert keine Membrana elastica externa. Da Venen größere Blutvolumina als Arterien aufnehmen können (Kapazitätsgefäße), ist die Media der Venen dehnbarer. Um einen gerichteten Blutstrom zum Herzen zu gewährleisten, besitzen periphere Venen im großen Kreislauf Klappen⁹.

Kapillaren zeigen einen zweischichtigen Wandaufbau, innen Endothel und außen Perizyten. Sie besitzen keine Media^{9, 10, 19, 31}.

Auch im Hinblick auf die Druck- und Strömungsverhältnisse bestehen Unterschiede im arteriellen und venösen System. In den Arterien herrscht im großen Kreislauf ein mittlerer Druck von 100 mmHg (13 kPa) (systolisch 120 mmHg, diastolisch 80 mmHg in der Aorta) bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 150 - 200 mm/s. In den Endaufzweigungen dagegen beträgt der Druck nur 35 mmHg (5 kPa) und die Strömungsgeschwindigkeit in den Kapillaren 0,2 - 0,4 mm/s. Daraus ergibt sich eine Austauschzeit zwischen Blut und Gewebe von 0,5 s. Der Druck in den großen Venen beträgt 5 - 10 mmHg (0,7 - 1,3 kPa) und kann suprakardial negativ werden, in den Venulen findet man Drücke von 15 mmHg (2 kPa)¹⁰.

1.1.2.2. Gefäßsystem der Lunge

Ausgehend vom rechten Ventrikel des Herzens gelangt arterielles sauerstoffarmes Blut in den Truncus pulmonalis, welcher sich in rechte und linke Arteria pulmonalis teilt. Diese verlaufen jeweils parallel zum Bronchialbaum und werden dann als Arteriae bronchiales bezeichnet. Nach Passage des Kapillarbettes vereinigen sich die Venae bronchiales jeweils zu zwei Venae pulmonales, welche venöses sauerstoffreiches Blut in das linke Atrium des Herzens transportieren. Dieser Kreislauf dient der Sauerstoffversorgung des Körpers, die Gefäße werden Vasa publica genannt. Die Eigenversorgung der Lunge sowie der Bronchien erfolgt mit sogenannten Vasa privata über Rami bronchiales aus der Aorta thoracica sowie über Interkostalarterien^{9, 10, 71}.

1.1.3. Der Gasaustausch

Gasaustausch findet in zwei Bereichen im Körper statt: Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidabgabe in den Alveolen, und Sauerstoffabgabe und Kohlendioxidaufnahme im peripheren Gewebe. Sauerstoff diffundiert aus der Alveolarluft durch das Alveolarepithel und Kapillarendothel in das Blut (Diffusionsstrecke 0,2 - 0,4 μm)⁴¹. Im peripheren Gewebe diffundiert Sauerstoff aus

den Kapillaren in die umliegenden Zellen. Für Kohlendioxid gilt das Gegenteil. Die Diffusion gehorcht dem Fick'schen Diffusionsgesetz und ist in der Lunge abhängig von der Differenz der Partialdrücke in Alveolarluft und Kapillarblut, der Diffusionsstrecke und der Austauschfläche: $V' = D_L \cdot \Delta P \cdot (mol/(s \cdot m^2))$ und $D_L = D \cdot \alpha \cdot (A/x)$

(V' : Diffusionsstrom; D_L : Diffusionskapazität der Lunge; ΔP : Differenz der Partialdrücke von Alveolarluft und Lungenkapillarblut; $D \cdot \alpha$: Krogh-Diffusionskoeffizient; A : Durchtrittsfläche; x : Dicke der Membran; α : Löslichkeit; D : Diffusionskoeffizient des diffundierenden Gases)⁴¹.

Treibende Kraft der Diffusion stellt der Partialdruckunterschied ΔP dar. In den Alveolen herrscht beim Gesunden ein Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von 100 mmHg (13,3 kPa) sowie ein Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO_2) von 40 mmHg (5,3 kPa). Im venösen Blut der Pulmonalarterie besteht nur ein pO_2 von 40 mmHg (5,3 kPa) bei einem pCO_2 von 46 mmHg (6 kPa). Nach Ausgleich durch Diffusion betragen die Werte ca. 100 mmHg (13,3 kPa) für pO_2 und ca. 40 mmHg (5,3 kPa) für pCO_2 ^{19, 31}. O_2 aus der Atemluft diffundiert dabei in die Lungenkapillaren (\varnothing 7 - 10 μm). CO_2 verlässt das Gefäßsystem und diffundiert in die Lungenalveolen, um anschließend abgeatmet zu werden. Die Alveolen werden über das Kapillarnetz täglich mit etwa 7.000 - 8.000 l Blut durchspült⁴⁶. Die Kontaktzeit beträgt dabei nur 0,7 - 0,8 s. Diese kann unter Belastung bei gleichbleibender Austauschleistung auf 0,3 s verkürzt sein⁴¹. Die Lungenvenen befördern das sauerstoffreiche arterialisierte Blut in das linke Atrium. Von dort wird es über die Aorta und die Arterien des großen Kreislaufs im gesamten Körper verteilt. In den Kapillargebieten der peripheren Endstrombahn erfolgen der Gasaustausch mit dem umliegenden Gewebe und der anschließende Rückstrom des Blutes über die Venen zum Herz. Von dort fließt das sauerstoffarme venöse Blut im kleinen Kreislauf über die Lungenarterien zurück in die Lunge, um dort CO_2 abzugeben und erneut O_2 aufzunehmen^{9, 10, 71}. Damit ist der Kreislauf geschlossen.

1.2. DAS MITOCHONDRIMUM

Mitochondrien sind Zellorganellen, die sich im Zytoplasma aller Körperzellen, mit Ausnahme der Erythrozyten, befinden und im Allgemeinen als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet werden. Die Anzahl der Mitochondrien schwankt abhängig vom Energieverbrauch der Zellen, in der Leber befinden sich z.B. ca. 2.000 Mitochondrien pro Zelle. Ihre Überlebenszeit beträgt 10 - 20 Tage. Sie sind in der Lage, faserartige Netzwerke zu bilden, die vaskuläre SMCs (smooth muscle cell(s), glatte Muskelzelle(n)) durchflechten können (“Networks that permeate vascular smc“)⁵³.

Entwicklungsgeschichtlich stammen sie von Bakterien ab, ihr Entwicklungsfortschritt wird über die Endosymbiontentheorie erklärt. Diese besagt, dass es sich bei diesen semiautonomen Organellen um ehemalige Prokaryozyten handelt, die als Symbionten in die eukaryotische Zelle aufgenommen worden sind¹⁰³. Genetisch enthalten sie ein unvollständiges aber eigenes Genom, die DNA liegt als Doppelstrang-DNA in Ringform vor. Sie sind in der Lage, selbstständig RNA und Proteine zu synthetisieren.

Die „Kraftwerke der Zelle“ spielen im lebenden Organismus eine wichtige Rolle zur Energiegewinnung. Diese erfolgt über die mitochondriale Atmungskette (= ETC, electron transport chain, Elektronentransportkette), welche in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Diese ist ein Teil der Mitochondrien und besteht aus einer Doppelmembran, aufgebaut aus zwei konzentrisch angeordneten Biomembranen. Diese äußere und innere Membran begrenzen den spaltförmigen intermembranären Raum. Die stark gefaltete und dadurch stark oberflächenvergrößerte innere Membran wiederum schließt den Matrixraum als Ort des Zitratzykluses und der β -Oxidation der Fettsäuren ein^{9, 85}. Je nach Art der Fältelung werden Mitochondrien vom Cristaetyp (mit Falten), Tubulustyp (mit röhrenförmigen Tubuli) und Sacculustyp (mit bläschenförmigen Erweiterungen) unterschieden. Mitochondrien sind in allen höheren Organismen, welche an eine sauerstoffreiche Umgebung gewöhnt sind, essenziell zur Energieproduktion. Diese erfolgt durch einen Prozess, der oxidative Phosphorylierung genannt wird (siehe Kap. 1.2.1.2). Mitochondrien gelten als primäre sauerstoffverbrauchende Einheit im Körper, da sie ca. 90 % des zellulären Sauerstoffs verbrauchen^{63, 86}. Mitochondrien sind nicht in allen Geweben identisch, unterschiedliche SMCs enthalten funktionell unterschiedliche Mitochondrien^{53, 55}.

1.2.1. Die Elektronentransportkette

Die mitochondriale Atmungskette wird aufgrund des Elektronentransportes der Atmungskettenkomplexe (Komplex I - IV) auch als Elektronentransportkette, kurz ETC bezeichnet und ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Diese beinhaltet den Elektronentransport jeweils vom Redox-System mit dem negativeren zum positiveren Redoxpotenzial. Diese Redox-Systeme, auch Atmungskettenkomplexe genannt, gelten als Einzelkomponenten der Atmungskette. Durch die freiwerdende Energie werden von den Komplexen I, III und IV Protonen in den Intermembranraum befördert. Der Protonengradient wird zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt¹⁰.

^{55, 85}

1.2.1.1. Aufbau der Elektronentransportkette

Insgesamt besteht die mitochondriale Elektronentransportkette aus vier membrangebundenen Proteinkomplexen plus zwei nicht-membrangebundenen Proteinen, Ubichinon (Coenzym Q, kurz Q) und Cytochrom c. Drei der vier Komplexe, nämlich I, III und IV sind Protonenpumpen. Außerdem besteht über die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) eine direkte Verbindung zum Citratzyklus (Abbildung 1). An Komplex I, der NADH-Q-Oxidoreduktase (= NADH-Dehydrogenase), werden Elektronen von NADH, welches im Citratzyklus gebildet wird, in die Atmungskette aufgenommen. NADH wird hierbei zu NAD^+ oxidiert und die Elektronen auf einen Teil von Komplex I (FMN) übertragen, welches dadurch zu FMNH_2 reduziert wird. Gleichzeitig werden von Komplex I 4 Protonen (H^+) aus dem Matrixraum in den Intermembranraum gepumpt. Die Elektronen werden von Komplex I an Coenzym Q abgegeben. Es entsteht QH_2 (= Ubichinol). Elektronen von FADH_2 werden mittels der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) des Citratzyklus ebenfalls an Ubichinon abgegeben. FADH_2 wird dabei zu FAD oxidiert. Komplex II dient nicht als Protonenpumpe. Die Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) beinhaltet die Cytochrome b_H und b_L und gibt Elektronen vom Ubichinol zum Cytochrom c weiter. Gleichzeitig werden 4 H^+ in den Intermembranraum transportiert. Über Cytochrom c werden die Elektronen auf Komplex IV, die Cytochrom-c-Oxidase übertragen. Komplex IV beinhaltet 2 Cytochrome, Cytochrom a und a_3 ⁵⁵. Hier erfolgt die katalysierte Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Dabei werden wiederum 4 H^+ aus dem Matrixraum in den Intermembranraum gepumpt^{10, 85}.

1.2.1.2. Oxidative Phosphorylierung

Unter oxidativer Phosphorylierung versteht man die Umwandlung von ADP in ATP mittels der mitochondrialen Atmungskette. Dabei werden Elektronen von NADH oder FADH_2 über Elektronen-Carrier (Komplex I - IV) auf O_2 übertragen. Durch den Elektronentransfer entlang des Redoxpotenzialgefälles wird ein Protonengefälle entlang der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut. Dieser Protonengradient treibt die ATP-Synthase (oder F_0F_1 -ATPase) der Atmungskette an. Sie katalysiert die Bildung von ATP aus ADP und einem Orthophosphat (P_i). Hierzu befördert der Symporter, auch Phosphat-Transporter genannt, ein Phosphat zusammen mit einem Proton in den Matrixraum. Die ADP-ATP-Translokase befördert das neu gebildete ATP im Austausch mit einem ADP in den Intermembranraum und von dort weiter ins Cytoplasma (Abbildung 1). Der Begriff wird geprägt durch die beiden vorherrschenden Vorgänge, der Oxidation von NADH / FADH_2 und der Phosphorylierung von ADP zu ATP.

Insgesamt werden im Citratzyklus und der Atmungskette bei vollständiger Verbrennung von 1 Molekül Glukose zu CO_2 und H_2O ca. 30 Moleküle ATP freigesetzt^{10, 85}.

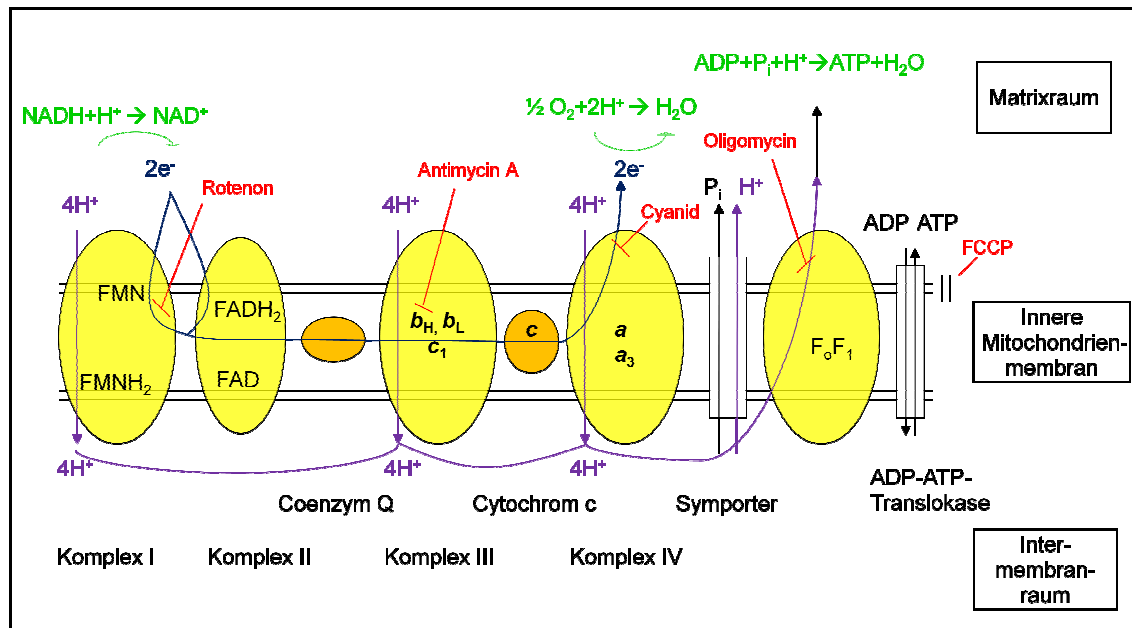


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Elektronentransportkette mit Inhibitoren

Gelb dargestellt die verschiedenen Komplexe, rot die Hemmstoffe der Elektronentransportkette und ATPase, grün die ablaufenden Reaktionen, blau der Elektronenfluss, lila der H^+ -Transport.

ADP: Adenosin-Di-Phosphat; ATP: Adenosin-Tri-Phosphat.

FAD: oxidiertes Flavin-Adenin-Dinukleotid; FADH_2 : reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid.

FMN: oxidiertes Flavinmononukleotid; FMNH_2 : reduziertes Flavinmononukleotid.

NAD^+ : oxidiertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid; NADH: reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid; F_0F_1 : kurz für F_0F_1 -ATPase.

FCCP: Carbonyl-Cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon.

H^+ : Proton; e^- : Elektron; O_2 : Sauerstoff; H_2O : Wasser; P_i : organisches Phosphat.

a, *a*₃, *b*_H, *b*_L, *c*, *c*₁: kurz für die jeweiligen Cytochrome.

Schema in Anlehnung an^{1, 10, 85}.

1.2.1.3. Inhibitoren der Elektronentransportkette und ATPase

Die mitochondriale Elektronentransportkette kann an verschiedenen Stellen gehemmt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren diffundieren frei durch die intakte Zellmembran.

Hemmstoffe der Elektronentransportkette blockieren den Elektronentransfer und hemmen dadurch sowohl den Elektronentransport, als auch die oxidative Phosphorylierung:

Rotenon hemmt die Elektronenübertragung innerhalb der NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I)^{23, 30, 80, 81}.

Myxothiazol ist ein kompetitiver Inhibitor von Ubichinol und inhibiert damit den Elektronentransfer proximal von Cytochrom *b*_{H/L} in Komplex III⁸¹.

Antimycin A blockiert als spezifischer Inhibitor in der Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (Komplex III) den Elektronentransfer distal von Cytochrom b_{HL} ^{23, 81}.

Cyanid hemmt den Elektronentransfer in der Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV)⁸¹.

Hemmstoffe der oxidativen Phosphorylierung hemmen den Abbau des Protonengradienten und dadurch auch den Elektronentransport:

Oligomycin hemmt die ATP-Synthase, indem der Protonenfluss verhindert wird^{23, 27}.

Atmungsketten-Entkoppler vermindern den Protonengradienten und aktivieren dadurch den Elektronentransport:

FCCP entkoppelt den Elektronentransfer von der oxidativen Phosphorylierung, indem der Protonengradient abgebaut wird. FCCP transportiert dazu Protonen entlang des Konzentrationsgradienten durch die innere Mitochondrienmembran. Es kann kein ATP mehr gebildet werden und Energie wird als Wärme frei^{10, 23, 85}.

1.3. REAKTION DER PULMONALEN GEFÄßE AUF HYPOXIE

1.3.1. Einteilung der Reaktion pulmonaler Gefäße auf Hypoxie

Die Reaktion der pulmonalen Gefäße auf Hypoxie kann in drei Phasen unterteilt werden (Abbildung 2):

- Unter akuter alveolärer Hypoxie kommt es zur Vasokonstriktion der präkapillären Gefäße, genannt hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV). Die akute hypoxische Vasokonstriktion setzt innerhalb von Sekunden als Antwort auf moderate Hypoxie ein und bewirkt durch bessere Koordination von Ventilation und Perfusion einen optimierten Gasaustausch⁹⁹. Das Maximum der akuten HPV ist innerhalb von 5 bis 15 Minuten erreicht^{55, 102}.
- Unter prolongierter Hypoxie (> 30 Minuten bis Stunden) kommt es zur Vasokonstriktion (prolongierte HPV), welche ebenfalls zur Verbesserung des Ventilations-Perfusions (V/Q) - Quotienten beiträgt⁹⁹. Typisch ist eine Vasokonstriktion nach einer Phase der Vasodilatation, die der akuten HPV folgt⁹⁹. Diese prolongierte HPV kann unter chronischer Hypoxie Stunden bis Tage andauern⁹⁷ und damit zu chronischen vaskulären Hypoxieprozessen überleiten.
- Unter chronischer Hypoxie kommt es zu vaskulärem Remodeling und pulmonaler Hypertonie, die zum Cor pulmonale führen kann⁹⁹.

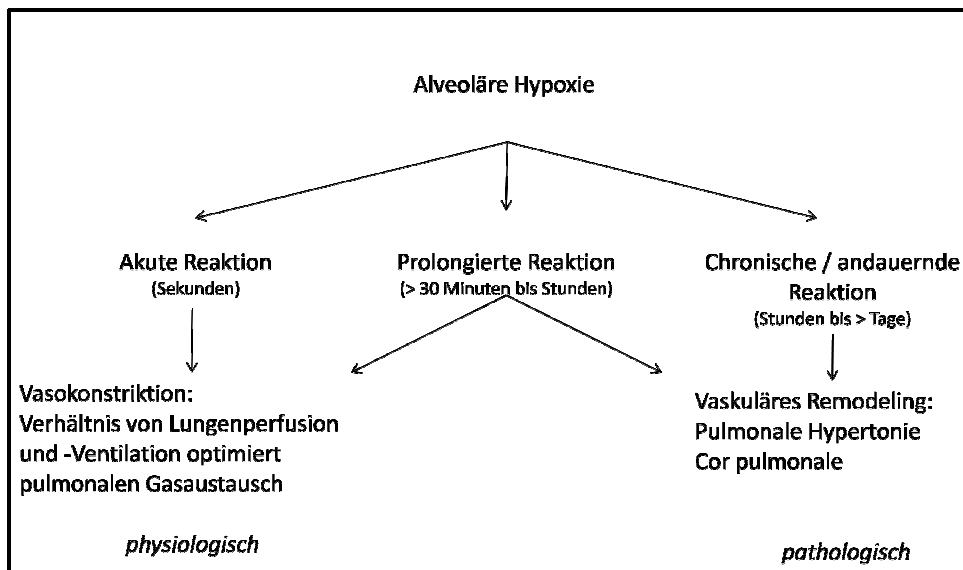


Abbildung 2: Grafische Darstellung der Reaktion der Lungengefäße auf alveoläre Hypoxie

1.3.2. Eigenschaften der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion und Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion ist eine physiologische Anpassungsreaktion auf alveoläre Hypoxie. Erstbeschreiber waren 1894 Bradford und Dean, sie beschrieben einen erhöhten pulmonalarteriellen Druck als Antwort auf Asphyxie¹². 1946 wurde von von-Euler und Liljestrand¹⁸ erstmals die adaptive Komponente des Mechanismus beschrieben, mit dem der pulmonale Blutfluss von Gebieten alveolärer Hypoxie in normal belüftete Gebiete mit höherem Sauerstoffpartialdruck umverteilt wird. Ziel ist eine Optimierung des pulmonalen Gasaustausches durch Verbesserung des Ventilations-Perfusions-Quotienten. Bei Sauerstoff-Minderversorgung durch alveoläre pO_2 -Differenzen entsteht in den hypoventilierten Lungenarealen ein Shuntfluss. Durch Reduktion dieses Shuntflusses wird ein höherer systemischer pO_2 erreicht⁵⁵. Bei sinkendem pO_2 in einzelnen Alveolen erfolgt die Vasokonstriktion in diesen Alveolen, wodurch durch zeitweise Ausschaltung dieser ineffektiven Lungenareale ein verbesserter V/Q-Quotient resultiert^{57, 65, 104}. Als bestimmender Faktor gilt hauptsächlich die alveoläre Sauerstoffkonzentration und weniger der pulmonalarterielle pO_2 ⁵⁵. Vasokonstriktion als Reaktion auf verminderten Sauerstoffpartialdruck ist in der Lunge einzigartig, im Systemkreislauf erfolgt eine Vasodilatation. Beim Menschen resultiert aus der Vasokonstriktion eine Steigerung des pulmonalen (Gefäß)-Widerstandes (pulmonary vascular resistance, PVR) um ca. 50 %, wenn der alveoläre pO_2 auf unter 50 mmHg (6,7 kPa) absinkt¹⁷. Andere Autoren beschreiben sogar einen Anstieg des PVR um 50

- 300 %⁵⁵ (Normwerte altersabhängig für alveolären pO_2 : 72 - 107 mmHg; 1 mmHg = 1 Torr = 133,3 Pa; 1 % \triangleq 7,5 mmHg). Bei Untersuchungen an Freiwilligen konnte während einer Inhalation von 12,5 % O_2 (\triangleq ca. 94 mmHg, 12,5 kPa) ein Abfall des systemischen pO_2 auf unter 50 mmHg (6,7 kPa) beobachtet werden, wobei der PVR um 100 - 150 % anstieg⁵⁵. Obwohl die HPV durch das Endothelium moduliert wird, gilt die glatte Muskelzelle als prinzipielle Sensor- und Effektorzelle^{55, 101}. In pathophysiologischen Situationen, z.B. dem ARDS (acute respiratory distress syndrome, akutes Lungenversagen), dem hepatopulmonalen Syndrom oder während einer Narkose, kann es zu einer Beeinträchtigung der HPV kommen. Als Folge daraus resultiert eine mangelhafte Oxygenierung des arteriellen Blutes. Ursachen einer prolongierten Hypoxie sind beispielsweise der Aufenthalt in großer Höhe oder krankheitsbedingte Situationen in denen die Atmung beeinträchtigt wird. Dies ist vor allem bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen wie COPD (chronic obstructive pulmonary disease, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung), Pneumonie, Lungenfibrose, Atelektasen oder teilweise bei neurologischen Erkrankungen der Fall. Prolongierte alveoläre globale Hypoxie kann aufgrund eines generalisierten und permanent erhöhten Gefäßwiderstandes als Folge von prolongierter HPV und Umbauprozessen der Lungengefäße (= vaskuläres Remodeling) zu pulmonaler Hypertonie führen^{44, 58, 91, 99}. Diese Hypoxie-induzierten Veränderungen sind ortsspezifisch, d.h. die Umbauvorgänge unterscheiden sich in großen Gefäßen von denjenigen in kleinen Gefäßen (siehe Kap 1.4.2).

Beim Vergleich der genannten Vorgänge mit denjenigen pränatal wird deutlich, dass die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion in Uteri physiologisch ist. Eine Vasokonstriktion der präkapillären Lungengefäße vermindert dabei die Perfusion der noch nicht expandierten Lunge. Die Oxygenierung des Blutes wird zu diesem Zeitpunkt noch über die Plazenta von der Mutter übernommen. Der durch Hypoxie offen gehaltene Ductus arteriosus (Botalli) leitet das Blut aus der Pulmonalarterie unter Umgehung der Lungenstrombahn direkt über die Aorta in den Systemkreislauf⁹⁷. Post partum erfolgt mit dem ersten Schreien und den ersten Atemzügen des Neugeborenen die Entfaltung der Lunge bis in die Alveolen. Dies führt durch den dadurch entstandenen höheren alveolären Sauerstoffpartialdruck zur Vasodilatation der Lungengefäße und damit zum gesteigerten Blutfluss in der Lungenstrombahn. Der postnatale Zustand kann somit auch als „normoxische pulmonale Vasodilatation“ bezeichnet werden¹⁰¹. Der Ductus arteriosus wird nun aufgrund des steigenden pO_2 verschlossen, der Säugling atmet selbstständig⁸¹.

Die Stärke der HPV ist abhängig von Gattung, Alter, Geschlecht, pO_2 und pH-Wert. Man findet diesen Mechanismus in Säugetieren, Vögeln, Reptilien und sogar in Fischen. Ausgelöst wird die HPV in den meisten Spezies durch milde Hypoxie (alveolärer $pO_2 < 100$ mmHg, 13,3 kPa)¹⁰¹. Das Ausmaß der HPV im Menschen wird durch wiederholte Manöver akuter Hypoxie vermindert, lässt sich aber nicht potenzieren. Menschen und Tiere, die wie die Tibeter oder das Yak genetisch an das Leben in großer Höhe angepasst sind, zeigen eine abgeschwächte Form oder gar keine HPV⁵⁵. Die genauen Prozesse sind heutzutage trotz intensiver Forschung noch nicht endgültig geklärt. Die Höhe der HPV ist bei Wiederherstellung normoxischer Konditionen schnell rückläufig und reversibel⁵⁵.

1.4. DIE PULMONALE HYPERTONIE

Die Lunge des Menschen ist das einzige Organ, welches ständig vom gesamten Herzzeitvolumen durchströmt wird. Normalerweise ist der Lungenkreislauf ein „high-flow, low-resistance, low-pressure“ - System, kann sich aber unter unphysiologischen Bedingungen verändern⁴⁹. Eine Widerstandserhöhung des Lungengefäßsystems wird als pulmonale Hypertonie (PH) bezeichnet. Diese wird eingeteilt nach der Dana Point Klassifikation. PH nach Klasse 3 der Dana Point Klassifikation ist beispielsweise assoziiert mit Hypoxie oder anderen chronischen Erkrankungen des Atmungssystems wie COPD, interstitiellen Lungenerkrankungen, schlafassoziierten Atemproblemen (z.B. Schlafapnoe) sowie Aufenthalt in großer Höhe²⁵ (siehe Kap 1.4.1).

Charakterisiert wird die PH durch einen fortschreitenden und anhaltenden Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes, was letztendlich zum Rechtsherzversagen und einem chronischen Cor pulmonale führt^{68, 92}. Die erste Klassifikation wurde 1998 in Evian, Frankreich festgelegt und 2003 in Venedig, Italien modifiziert⁷⁶. Neueste Daten kamen 2008 aus Dana Point, Kalifornien, USA, wo folgende Grenzen festgelegt wurden: normal ist ein Pulmonalarteriendruck (PAP, pulmonary artery pressure) in Ruhe < 20 mmHg (2,7 kPa), > 25 mmHg (3,3 kPa) gilt als manifeste PH, dazwischen ist der PAP grenzwertig. Bei der Einteilung mithilfe der Echokardiographie gelten folgende Grenzen: eine maximale systolische Trikuspidal-Regurgitationsgeschwindigkeit $< 2,5$ m/s ist normal, $> 2,8$ m/s bedeutet eine manifeste PH, dazwischen sind die Werte grenzwertig. Die Durchführung eines Rechtsherzkatheters zur Diagnosesicherung ist obligatorisch und spätestens vor Beginn der Therapie durchzuführen⁵⁶. Die sogenannte pulmonalarterielle Hypertonie

(PAH) Dana Point Klasse 1 kann z.B. entweder hereditär (hPAH) oder sporadisch (idiopathisch, iPAH) auftreten⁶⁸.

1.4.1. Einteilung der pulmonalen Hypertonie

Dana Point Klassifikation (2008, Dana Point, Kalifornien), leicht modifiziert nach⁷⁷:

1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
 - 1.1. idiopathische PAH (iPAH)
 - 1.2. erbliche PAH (hereditäre PAH, hPAH)
 - 1.2.1. BMPR2
 - 1.2.2. ALK1, Endoglin (mit od. ohne hereditäre haemorrhagische Teleangiektasie)
 - 1.2.3. unbekannt
 - 1.3. Medikamenten-, Drogen- oder Toxin-induziert
 - 1.4. assoziiert mit
 - 1.4.1. Bindegewebserkrankungen
 - 1.4.2. HIV-Infektion
 - 1.4.3. Portaler Hypertension
 - 1.4.4. angeborenen Herzerkrankungen
 - 1.4.5. Schistosomiasis
 - 1.4.6. chronisch hämolytischer Anämie
 - 1.5. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
- 1'. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD) u/od pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)
2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen
 - 2.1. systolische Herzinsuffizienz
 - 2.2. diastolische Herzinsuffizienz
 - 2.3. Herzklappendysfunktion
3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen u/od Hypoxie
 - 3.1. chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
 - 3.2. interstitielle Lungenerkrankungen
 - 3.3. andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiver u. obstruktiver Ventilationsstörung
 - 3.4. schlaf-assoziierte Atemstörung
 - 3.5. alveoläre Hypoventilation
 - 3.6. chronische Höhenexposition
 - 3.7. Entwicklungsstörungen

4. chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
5. Pulmonale Hypertonie aufgrund unklaren multifaktoriellen Mechanismen
 - 5.1. hämatologische Erkrankungen: myeloproliferativ, Splenektomie
 - 5.2. Systemerkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Histiozytose: Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
 - 5.3. Stoffwechselerkrankungen: Glykogenspeicherkrankheiten, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
 - 5.4. andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz unter Dialyse

ALK1: activin receptor-like kinase type 1; BMPR2: bone morphogenetic protein receptor type 2; HIV: human immunodeficiency virus.

Die PH besitzt eine hohe Mortalität. Dabei muss beachtet werden, dass sie durch unterschiedliche Krankheiten ausgelöst werden kann. Neben den bereits genannten (v.a. aus Dana Point Klasse 1 u 3), gehören dazu auch Linksherzversagen und Klappenfehler (Klasse 2)⁶⁸. Zur PH der Klasse 3 der Dana Point Klassifikation, die mit Erkrankungen der oberen Atemwege vergesellschaftet sind, gehören z.B. das Schlafapnoe- oder Pickwick-Syndrom („Obesity-Hypoventilation-Syndrom“), aber auch Verletzungen oder Schäden des Respirationstraktes. Diese Schäden können entweder primär (Hypoventilationssyndrom, „Undine-Syndrom“) oder sekundär nach Traumata oder neurologischen Erkrankungen auftreten. Einige primäre Lungenerkrankungen sind mit dem Vorhandensein chronischer Hypoxie verknüpft; dazu gehören COPD, zystische Fibrose, diffuse interstitielle Fibrose, bronchopulmonale Dysplasie, Strahlenfibrose, infiltrative Lungentumore sowie kollagene Gefäßerkrankungen. Neuromuskuläre Erkrankungen und Skelettfehlbildungen, welche den Thorax befallen, wie Skoliose, Muskeldystrophie Duchenne oder Poliomyelitis können ebenfalls die Ventilation beeinträchtigen und dadurch mit Hypoxie-induzierter PH assoziiert sein⁸³. Dass auch Hypoxie alleine Lungenhochdruck und Remodeling von Pulmonalarterien (PA) provozieren kann, leitet sich aus Beobachtungen ab, die zeigen, dass aus längeren Aufenthalten in großer Höhe ebenfalls ein erhöhter pulmonalarterieller Druck resultiert, der nur zu einem geringen Teil durch Sauerstoffgabe rückgängig gemacht werden kann⁸³. In der „Operation Everest II-Studie“ konnte gezeigt werden, dass chronische Hypoxie alleine in der Lage ist, schnelle und signifikante Veränderungen in humanen Pulmonalarterien zu verursachen^{36, 83}. Bereits nach 40 Tagen in großer Höhe, und damit in Hypoxie, ließen sich signifikant höhere pulmonalarterielle Drücke im Vergleich zu denjenigen feststellen, welche vor dem Aufstieg gemessen wurden. Zusätzlich konnte eine fehlende vasodilatatorische Antwort auf die Gabe von 100 %

Sauerstoff detektiert werden. Somit wurde angenommen, dass schon nach dieser relativ kurzen Zeitspanne eine Veränderung im pulmonalen Gefäßsystem induziert werden konnte³².

1.4.2. Vaskuläres Remodeling

Unter vaskulärem Remodeling versteht man eine strukturelle und funktionelle Veränderung der normalen Wandarchitektur (pulmonalarterieller) Gefäße⁹², charakterisiert durch Zellproliferation, die für alle Formen der PH, also auch der Hypoxie-induzierten PH, ähnlich ist. Pathomechanismen beinhalten eine erhöhte Konzentration von intrazellulärem Kalzium, vermindertem Kaliumeinstrom durch spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α (hypoxia-inducible factor, Hypoxie-induzierbarer Faktor 1, Untergruppe α), Genexpression für proliferations-auslösende Gene, Rezeptoraktivierung von Wachstumsfaktoren, sowie einer gesteigerten Synthese oder Aktivierung von Endothelin-1^{16, 49, 99}.

Auf genetischer Ebene konnten heterozygote Mutationen des „bone morphogenetic protein (BMP) receptor type 2“-Gens (BMPR 2) auf Chromosom 2q33 nachgewiesen werden, welches für ein Mitglied des Typ-II-Rezeptors der Wachstumsfaktoren-Familie (growth factor- β , TGF- β) kodiert. Diese konnten zusammen mit Mutationen der „activin-like kinase typ-1 (ALK)“ in > 70 % der Patienten mit vererbter PAH (hPAH) gefunden werden¹⁵.

Als Voraussetzung für die Strukturveränderungen gilt die Anwesenheit von sogenannten SM-like-cells (SM: smooth muscle, glattmuskulär), welche α -SM-Aktin exprimieren. Die Media-Verdickung resultiert aus Hypertrophie und gesteigerter Akkumulation von SMCs, aber auch aus vermehrtem Abscheiden extrazellulärer Matrixproteine (v.a. Kollagen und Elastin). Die Verdickung der Adventitia wird einer erhöhten Fibroblasten- und Myofibroblasten-Konzentration, sowie einer ebenfalls gesteigerten Matrixproteindichte (Kollagen, Elastin, Fibronectin, Tenascin) zugeschrieben.

Eine morphologische Besonderheit fortgeschrittener PAH stellt die sogenannte plexiforme Läsion („plexiform lesion“) dar. Sie ist das Ergebnis aus der Proliferation von monoklonalen, phänotypisch fremdartigen Endothelzellen, der Migration und Proliferation von SMCs und Myofibroblasten sowie der Ansammlung von im Blut zirkulierenden Zellen, zu denen Makrophagen und endotheliale Vorläuferzellen

gehören. Diese Läsionen treten vor allem bei der idiopathischen und hereditären PAH auf, können aber auch bei anderen schweren Formen der PH nachgewiesen werden⁶⁸.

Eine wichtige Rolle beim Remodeling spielt die Proliferation pulmonalarterieller Gefäßmuskulzellen (pulmonary artery smooth muscle cell(s), PASMC(s)). Diese kann durch einen Hypoxiestimulus ausgelöst werden. Im Vergleich mehrerer Studien konnte gezeigt werden, dass die Proliferation zum einen von der Gefäßgröße und -wandschicht, und zum anderen von der Art der Hypoxie abhängig ist. Bei moderater Hypoxie wurde eine verstärkte Proliferation gefunden, wohingegen diese unter schwerer Hypoxie oder gar Anoxie abnahm. Ähnliche Unterschiede zeigten sich je nach Dichte der Zellaussaat⁵⁹.

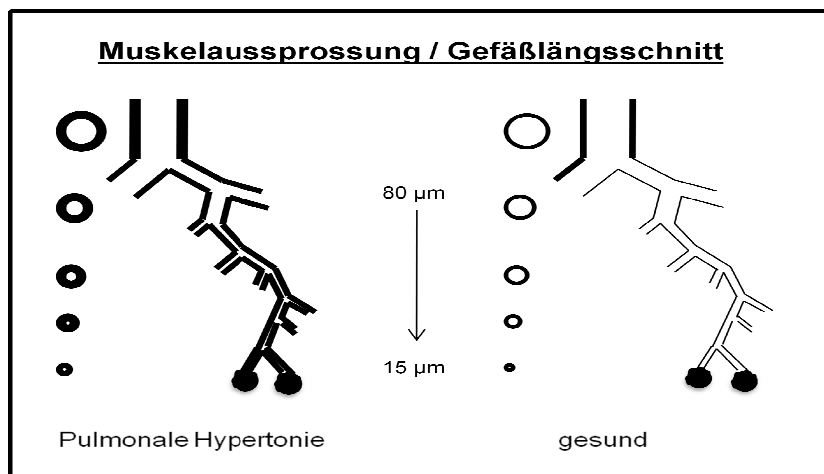


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Muskularisierung unter Hypoxie

Rechts im Bild der Gefäßlängsschnitt und die Muskularisierung in gesunden Lungen, links dargestellt die Veränderungen bei pulmonaler Hypertonie mit Verdickung der Gefäßwände.

1.5. MECHANISMEN DER HYPOXISCHEN PULMONALEN VASOKONSTRIKTION UND DER HYPOXIE-INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTONIE

1.5.1. Mechanismen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion

Chronische Hypoxie gilt als Auslöser von Strukturveränderungen in Pulmonalarterien, und verursacht biochemische und funktionelle Veränderungen vom Lungenhilum bis zu peripheren und kleinsten Gefäßen in den Alveolen.

Die HPV ist ein intrinsischer Mechanismus der Lunge, als dessen Effektor- und Sensorzellen die glatten Gefäßmuskulzellen der Pulmonalarterien gelten^{34, 39, 101}. Sie

kann durch das Endothelium und Kalzium-Sensibilisierung des kontraktiven Apparates (z.B durch die Rho-Kinase) moduliert werden⁵⁵. Als intrazellulärer Sauerstoffsensoren werden seit langem Mitochondrien vermutet. Diese bilden möglicherweise einen diffusionsfähigen Redox-Mediator (wie H_2O_2). Eine Hypothese besagt, dass eine Erniedrigung des Redox-Mediators zur Hemmung bestimmter spannungsgesteuerter Kalium-Kanäle (K_v) in PASMCs führt. Diese K_v -Kanäle (v.a. K_v 1.5 und K_v 2.1) regulieren das zelluläre Membranpotenzial (E_M) und damit den Kalzium-Einstrom über spannungsgesteuerte Kalzium-Kanäle, und regeln somit den Gefäßtonus⁵⁵.

Eine entgegengesetzte Hypothese postuliert, dass Mitochondrien als Folge von Hypoxie mehr ROS (reactive oxygen species) produzieren, was über eine Aktivierung verschiedener zellulärer Membrankanäle und möglicherweise Kalziumkanäle des sarkoplasmatischen Retikulums zu einem intrazellulären Kalziumanstieg führt⁸². Die gemeinsame Endstrecke aller Formen der pulmonalen Vasokonstriktion beinhaltet die Aktivierung des kontraktiven Apparates, bestehend aus Aktin und Myosin⁵⁵. Diese führt unter chronischer Hypoxie zusammen mit vaskulärem Remodeling zu Mechanismen der pulmonalen Hypertonie und Cor pulmonale (siehe Kap 1.4)^{59, 66, 82, 99}.

1.5.2. Veränderungen in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen unter chronischer Hypoxie

Der Stimulus der chronischen Hypoxie führt zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade, welche Tyrosinkinasen, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs), Protein-Kinase C (PKC), Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K), (SMAD)-Phosphorylierung, Kalzium (Ca^{2+})-Einstrom und Rho-Kinasen beinhaltet. Diese Signalwege kontrollieren gemeinsam Wachstum, Kontraktibilität und Differenzierung sowie die Matrix-Protein-Synthese der SMCs⁸³. Dadurch erfolgen z.T. irreversible Strukturveränderungen der pulmonalarteriellen Media. Dazu gehören SMC-Proliferation, Hypertrophie, Matrixprotein-Produktion sowie Rekrutierung zirkulierender Zellen der Adventitia. Endpunkt dieser Veränderungen ist die pulmonale Hypertonie. Als Signalmediator werden wie bei akuten hypoxischen Prozessen von Mitochondrien produzierte reaktive Sauerstoffspezies vermutet, die über Interaktion mit Ionenkanälen zu einer intrazellulären Kalziumerhöhung und möglicherweise Stabilisierung von HIF-1 α führen.

1.5.3. Die Rolle der Mitochondrien

Mitochondrien gelten als Hauptort des zellulären Sauerstoffverbrauchs (ca. 90 %). Diese Eigenschaft im Zusammenhang mit ihrer Rolle in der Energieproduktion und als

bestimmender Faktor des zellulären Redox-Status, sowie die Nähe zur Plasmamembran und zum sarkoplasmatischen Retikulum, machen sie zum idealen Kandidaten als primären Sauerstoffsensoren und somit Auslöser der HPV, aber auch der Hypoxie-induzierten PH^{55, 95}. Die Hypothese der Mitochondrien als Sauerstoffsensoren bei der HPV wird grundsätzlich von zwei Faktoren gestützt: 1) Eine Hemmung der Elektronentransportkette führt zur Hemmung der HPV^{53, 98} und 2) PASMCs ohne funktionierende ETC zeigen keine Hypoxie-typischen Veränderungen⁹⁶. Es ist daher wahrscheinlich, dass Mitochondrien in bestimmten Zellen die Hypoxieantwort modulieren können. Ob sie allerdings primäre Sensoren für die HPV darstellen, ist noch unklar. Im kardiovaskulären System wurden vergleichbare Reaktionen der Zellen auf Hypoxie und Inhibitoren der proximalen ETC (Rotenon und Antimycin A) gefunden. Darauf beruht die Vermutung, dass Mitochondrien als vaskuläre Sauerstoffsensoren dienen könnten. Die Inhibitoren der Elektronentransportkette imitieren Hypoxie insofern als dass sie, wie Hypoxie, die mitochondriale Atmungskette inhibieren. Ihre Applikation führte, wie Hypoxie, zu gegenteiligen Effekten in pulmonalen oder systemischen Arterien (Konstriktion vs. Dilation)⁴. Von manchen Autoren werden Mitochondrien als Sauerstoffsensoren gesehen, weil diese unter bestimmten Bedingungen ROS aus Komplex III der mitochondrialen Atmungskette freisetzen können, das als Mediator für Hypoxie-induzierte Reaktionen gilt⁹⁶. Chandel und Schumacker konnten hierfür den Nachweis erbringen, dass Hypoxie zu einem Anstieg von Superoxid in Komplex III führen kann. Nachdem dieses Konzept primär für die Genregulation während chronischer Hypoxie angenommen wurde, wird es mittlerweile auch für akute und verlängerte Hypoxie diskutiert⁹⁹. Zudem konnte gesehen werden, dass Antioxidantien oder Hemmstoffe der proximalen ETC die HPV in Rattenlungen verringern und die Hypoxie-induzierte Kontraktion isolierter pulmonalarterieller Myozyten hemmen konnten⁹⁶. Neben dem ROS-Signaling als möglichem Auslöser der HPV übernehmen Mitochondrien wichtige Aufgaben in der Zelle, wie Energieproduktion und -speicherung über ATP, Einleitung und Kontrolle der Apoptose, sowie Ca²⁺-Regulation. Aufgaben, die beim Hypoxiesensing und der Modulation des Hypoxiesignals eine wichtige Rolle spielen könnten¹⁰¹.

1.5.4. Die Rolle von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies

Von Mitochondrien freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) wie beispielsweise H₂O₂ (auch als AOS: activated oxygen species, aktivierte Sauerstoffspezies bezeichnet) können durch das Zytoplasma diffundieren und z.B. durch Aktivierung sarkolemmaler Kaliumkanäle eine Vasodilatation auslösen. Sie

spielen eine wichtige Rolle als Mediatoren in der zellulären Signaltransduktion. Hauptquelle von ROS und Peroxiden sind Oxidasen, wie NADPH- und NADH-Oxidasen, sowie Komplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette^{5, 53}. Lange Zeit wurden sie als toxische Nebenprodukte der ETC und als mögliche Ursache für das Altern angesehen. Später schrieb man ihnen eine Funktion in der intrazellulären Signalweitergabe zu. Eine Quelle der mitochondrialen ROS-Produktion befindet sich im Komplex III der ETC. Dort wird ein freies Radikal, Semiubichinon, gebildet, welches sein unpaares Elektron an Sauerstoff abgeben und dadurch Superoxid bilden kann. Dieser Mechanismus erklärt auch die unterschiedlichen Konsequenzen, die sich aus einer Hemmung der ETC entweder proximal oder distal von Komplex III ergeben. So konnte in isolierten und mit Puffer perfundierten Rattenlungen und isolierten PA-Myozyten nach Inhibierung der ETC proximal von Komplex III eine Minderung der HPV gesehen werden. Im Vergleich dazu führte eine Inhibierung der ETC distal von Komplex III zu keiner Veränderung oder sogar zu einer Verstärkung der HPV⁹⁶. Es konnte allerdings noch nicht einheitlich geklärt werden, ob die ROS-Produktion unter Hypoxie ansteigt oder absinkt^{75, 87}. Probleme bei dieser Fragestellung ergeben sich unter anderem aus der Verwendung unterschiedlicher experimenteller Modelle (isolierte Lungen, Gefäße, Zellen), oder des ROS-Messortes (intra- oder extrazellulär). Zwei gegensätzliche Hypothesen werden aktuell diskutiert:

1.5.4.1. Mitochondrialer ROS-Abfall unter Hypoxie

Das erste Modell von Weir, Archer et al. beschreibt einen Abfall der mitochondrialen ROS-Produktion unter Hypoxie und gilt als ursprüngliche Redox-Theorie⁵⁵. Die daraus resultierende Verschiebung des Redox-Status Richtung „reduziert“ bewirkt nach dieser Hypothese die Hemmung spannungsgesteuerter K_v -Kanäle, woraufhin es zur Membrandepolarisation kommt. Dies bewirkt schließlich einen Kalzium-Einstrom durch spannungsgesteuerte L-type- Ca^{2+} -Kanäle⁵⁵.

Die ersten Untersuchungen wurden am Modell der isolierten und mit Blut perfundierten Rattenlunge gewonnen. Man stellte fest, dass u.a. die Gabe von Rotenon oder Antimycin A als Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette unter normoxischen Bedingungen zu einem erhöhten vaskulären Druck und anschließend zur Hemmung der HPV führten^{67, 101}. Später konnte die Gruppe um Archer und Weir demonstrieren, dass Hypoxie sowie Inhibitoren der proximalen ETC (Rotenon und Antimycin A) zu einer verminderten pulmonalen ROS-Produktion führten, wohingegen distale Hemmstoffe wie Cyanid einen Anstieg der ROS-Abgabe unter Normoxie bewirkten. Unter normoxischen Bedingungen konnte nach Gabe von Rotenon und Antimycin A

neben einem erhöhten pulmonalarteriellen Druck eine Inhibierung der HPV gemessen werden, während es als Reaktion auf Cyanidgabe ebenfalls zu einem erhöhten Gefäßdruck kam, allerdings ohne Einfluss auf die HPV^{5, 67}. In PASMCs und isolierten Pulmonalarterien wurde durch Gabe von Rotenon oder Antimycin A die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung bzw. Kontraktion gehemmt. Nach Gabe dieser ETC-Inhibitoren kam es zu sinkender ROS-Produktion, begleitet von einer Hemmung der Kalium-Kanäle in PASMCs⁵³ sowie einem verminderten Anstieg des intrazellulären Kalziums⁹⁶. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Hemmung der ETC proximal der ROS-freisetzenden Komplexe (I oder III) zu einer Verminderung des Redox-Potenziales, einer verminderten ROS-Produktion und einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes führt. Erfolgte die Hemmung dagegen distal von Komplex III wurden keine Auswirkungen auf den Gefäßwiderstand sichtbar⁵⁴. Zusammenfassend wurde daraus geschlussfolgert, dass Hypoxie über eine verringerte ROS-Freisetzung und die darauffolgende Hemmung spannungsabhängiger Kalium-Kanäle (K_v -channel) zur HPV führen könnte¹⁰¹.

Unter chronischer Hypoxie konnte die Gruppe um Dromparis eine vergleichbare Signalkaskade nachweisen, und damit zeigen, dass Mitochondrien als kritische Sauerstoffsensoren in PASMCs agieren. Hypoxie, und damit verminderte Atmung, führt zum Abfall der mitochondrialen ROS-Produktion (mROS), und zur Hemmung Redox-sensitiver Kaliumkanäle in der Plasmamembran. Dies wiederum führt zur Depolarisation und Öffnung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle, zum Kalzium-Einstrom und zur Vasokonstriktion¹⁶.

1.5.4.2. Mitochondrialer ROS-Anstieg unter Hypoxie

Im zweiten Model, das von Schumacker, Chandel et al. etabliert wurde, konnte während absinkendem pO_2 ein paradoxer ROS-Anstieg beobachtet werden. Dies führte über noch ungeklärte Mechanismen zur Öffnung intrazellulärer Kalziumspeicher, im weiteren Verlauf zudem zur Rekrutierung plasmalemaler Ca^{2+} -Kanäle, dem Beginn der Kontraktion, und letztlich zur HPV. Auch bei dieser Theorie wurde Komplex III der ETC als Ort der ROS-Produktion angesehen^{95, 97, 101}.

Die unter Hypoxie gesteigerte ROS-Freisetzung aus der Semiubichinon-Bindungsstelle in Komplex III wurde aus folgenden Ergebnissen geschlussfolgert: 1) In isolierten Rattenlungen führten proximale ETC-Hemmstoffe wie Rotenon zur Hemmung der HPV, wohingegen distale Hemmstoffe wie Cyanid und Antimycin A keine Wirkung erzielten⁹⁶. 2) Proximale Inhibitoren schwächten außerdem die Hypoxie-induzierte

Kontraktion sowie den Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in PASMCs ab. 3) Eine Überexpression an Katalase inhibierte den durch Hypoxie ausgelösten Anstieg des intrazellulären Kalziums, wie auch den Hypoxie-induzierten Anstieg von ROS. 4) Myxothiazol schwächte ebenfalls den Hypoxie-induzierten ROS-Anstieg ab, verhinderte die HPV und inhibierte den Hypoxie-induzierten Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration. 5) Antimycin A zeigte keine spezifische Wirkung auf die Hypoxie-induzierte Reaktion in isolierten Lungen oder PASMCs. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen war die Inhibierung der Hypoxie-induzierten Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration durch Rotenon in isolierten Pulmonalarterien aus Ratten durch die Gabe von Succinat reversibel¹⁰¹.

Aufgrund dieser diskrepanten Ergebnisse bezüglich einer Hypoxie-induzierten Hoch- oder Herunterregulation von ROS wurde die Vermutung angestellt, dass eine lokale, subzelluläre und Zellkompartiment-abhängige ROS-Regulation die HPV auslöst. Dabei wird möglicherweise eine lokale ROS-Erhöhung unter Hypoxie von einer globalen Hypoxie-induzierten ROS Verringerung überdeckt¹⁰¹.

Die Theorie der ansteigenden ROS-Produktion unter chronischer Hypoxie wurde unterstützt durch Untersuchungen an humanen Hepatozyten (Hep 3B-Zellen). Unter chronischer Hypoxie konnte nachgewiesen werden, dass Hypoxie die mitochondriale ROS-Produktion stimuliert. In der gleichen Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass isolierte Mitochondrien aus Rattenleber unter Hypoxie eine steigende ROS-Produktion an Komplex III aufweisen¹³. Ein Hypoxie-induzierter ROS-Anstieg konnte auch in Mesenterialgefäßen *in vivo* sowie in PC12-Zellen nachgewiesen werden. Voraussetzung für den ROS-Anstieg wäre nach diesen Ergebnissen eine Veränderung, welche durch Hypoxie-induzierte Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase und damit des Elektronentransfers erreicht werden könnte¹³.

1.5.5. Die Rolle von metabolischen Veränderungen bei der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie

Mitochondrien sind nicht nur über ROS, sondern auch über metabolische Veränderungen an den Umbauvorgängen unter chronischer Hypoxie, aber auch der pulmonalen Hypertonie allgemein beteiligt. Bereits mehrfach konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien bei der Entwicklung der pulmonalarteriellen Hypertonie eine wichtige Rolle übernehmen. Dromparis beschreibt in der „metabolic theory“ die Bedeutung von Mitochondrien als Sauerstoffsensoren und vergleicht die

Entstehungsvorgänge der PAH mit Pathologien, welche zu Krebserkrankungen führen können¹⁶. Bei der PAH konnte eine Dysfunktion sowie eine erhöhte Apoptoserate des Endothels nachgewiesen werden, gefolgt von der Entwicklung eines hyperproliferativen und Apoptose-resistenten Milieus in der Gefäßwand. Die letzten Veränderungen wurden einer Verschiebung des Metabolismus von oxidativer Phosphorylierung zu Glykolyse zugeschrieben, wie sie bei Sauerstoffmangel auftreten kann, zu einer normoxischen Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α sowie einer HIF-1 α -induzierten Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase, was zu einer verminderten Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase führen würde. Dies wiederum würde den Krebs-Zyklus inhibieren, wodurch es zu einer verminderten Mitochondrienatmung und einer gesteigerten Glykolyse kommen würde. Als Konsequenz würde der Elektronenfluss unter normoxischen Bedingungen sowie die mitochondriale ROS-Produktion vermindert, was unter anderem über eine Inhibierung der Kaliumkanäle proliferativ wirken könnte^{4, 6}. Dieser sogenannte Warburg-Effekt wird bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumorerkrankungen diskutiert⁴. Damit könnte die PAH als eine proliferative, Apoptose-resistente Erkrankung mit Gemeinsamkeiten zu Neoplasien¹¹, und damit zwischen Entzündung und Krebs⁹³ eingeordnet werden. Der genaue Mechanismus der Entstehung und Folgen dieser metabolischen Veränderung ist dabei unbekannt. Bei Hypoxie-induzierter PH könnte die hypoxische Stabilisierung von HIF-1 α zu oben genannten Veränderungen führen, während es bei nicht Hypoxie-induzierter PH möglicherweise durch die Entwicklung der pseudohypoxischen Umgebung durch ungeklärte Mechanismen zur normoxischen Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α kommt⁴. Die Gruppe um Erzurum konnte in pulmonalarteriellen Endothelzellen nachweisen, dass Zellen aus iPAH-Lungen bei geringeren Mitochondrienzahlen einen geringeren Sauerstoffverbrauch aufwiesen, als Zellen aus gesunden Lungen. Zudem fanden sie einen höheren ATP-Gehalt in Zellen hypoxischer Lungen, verbunden mit einer gesteigerten Glykolyserate¹⁰⁶.

1.5.6. Weitere Sauerstoffsensorkandidaten

Eine wichtige Voraussetzung, die ein pulmonalvaskulärer Sauerstoffsensoren erfüllen muss, ist eine Sauerstoffsensitivität ab einem pO₂ von ca. 50 mmHg (6,66 kPa)⁸¹. Die genauen Sauerstoffsensing-Mechanismen sind jedoch immer noch unbekannt. Im Folgenden werden die wichtigsten Sensing-Kandidaten neben den Mitochondrien kurz aufgezeigt:

1.5.6.1. NADH-Oxidoreduktasen

NADH-Oxidoreduktasen könnten über Superoxide, welche in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt werden, ebenfalls als primäre Sauerstoffsensoren fungieren. Es wird postuliert, dass H_2O_2 die Guanylat-Zyklase stimuliert, vasodilatierendes cGMP zu bilden¹⁰¹.

1.5.6.2. NADPH-Oxidasen

NADPH-Oxidasen sind Enzyme, welche in der Lage sind, nach Komplexbildung der Untereinheiten aus Sauerstoff Superoxide zu bilden. Die klassische leukozytäre NADPH-Oxidase umfasst einen Multiproteinkomplex, bestehend aus den membrangebundenen Einheiten gp91^{phox} (heute NOX-2) und p22^{phox}, einer kleinen GTPase (Rac 1 od. 2), sowie den zytosolischen Proteinen p47^{phox}, p67^{phox} und p40^{phox}. Für alle Untereinheiten konnten mittlerweile Isoformen gefunden werden^{7, 24, 88}, die wichtigsten für gp91^{phox} sind: NOX-1 als erste bekannte Isoform, welche auch in glatten Muskelzellen vorkommt, NOX-3, NOX-4 (auch in glatten Muskelzellen) und NOX-5^{43, 86}. Eine Hypothese besagt, dass das nicht-phagozytotische (low-output)-System der NADPH-Oxidasen paradoxerweise durch Hypoxie aktiviert wird und anschließend zu einem Anstieg von Superoxiden (H_2O_2) führt. Dieser Anstieg könnte durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus eine Vasokonstriktion auslösen⁹⁹. NADPH-Oxidasen gelten auch als Sauerstoffsensoren-Kandidaten im System der Chemorezeptoren der Atemwege^{20, 101}. In der Lunge hemmt der NADPH-Oxidase Hemmstoff DPI (Diphenyleneiodonium) die HPV⁸⁹. Allerdings ist DPI kein spezifischer Hemmstoff, sondern inhibiert z.B. auch die mitochondriale ETC oder Kalium-Kanäle. Da p47-knockout-Mäuse eine reduzierte HPV und keinen Unterschied im Vergleich zu WT-Mäusen (wild type) während chronischer Hypoxie zeigten, kann vermutet werden, dass NADPH-Oxidasen an dem Sauerstoffsensing- oder Transduktionsmechanismus der HPV beteiligt sind¹⁰¹. Ob NADPH-Oxidasen die Superoxid-Produktion unter Hypoxie steigern oder verringern, ist noch nicht endgültig geklärt. Für eine ausführliche Darstellung wird auf¹⁰¹ verwiesen.

1.5.6.3. Cytochrom P450

Das Vorhandensein eines Cytochrom-P450-abhängigen Arachidonsäure-Metabolismus, der z.B. mit der Entstehung von Hydroxyeicosatetraenoic-Säure in den Mechanismus der HPV integriert ist, wird vermutet⁹⁹.

1.5.6.4. K_v -Kanäle

In Patch-clamp-Versuchen an PSMCs konnte gezeigt werden, dass akute Hypoxie den Auswärtsstrom von Kalium hemmt und dadurch eine Depolarisation verursacht. Unter Hypoxie werden K^+ -Kanäle unterschiedlichen Typs inhibiert¹⁷. Dies führt zu Membrandepolarisation, Aktivierung von L-type- Ca^{2+} -Kanälen, Ca^{2+} -Einstrom, Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ und schließlich zur Zellkontraktion^{94, 99}. Aus Studien an humanem Gewebe und Ratten-PSMCs ist bekannt, dass hauptsächlich spannungsgesteuerte K_v -Kanäle dafür verantwortlich sind¹⁷. Der genaue Mechanismus für die Inhibierung unter Hypoxie ist noch nicht geklärt. Möglicherweise wird der K^+ -Strom durch Änderungen im Redox-Status, und damit in der (mitochondrialen) NAD(P)H-Oxidase-abhängigen Sauerstoffradikal-Bildung oder durch veränderte Verhältnisse mitochondrialer Redox-Paare gesteuert. Alternativ kann die hypoxie-gesteuerte Erhöhung intrazellulären Ca^{2+} sekundär durch Membrandepolarisation auf die K_v -Kanäle wirken^{94, 99}.

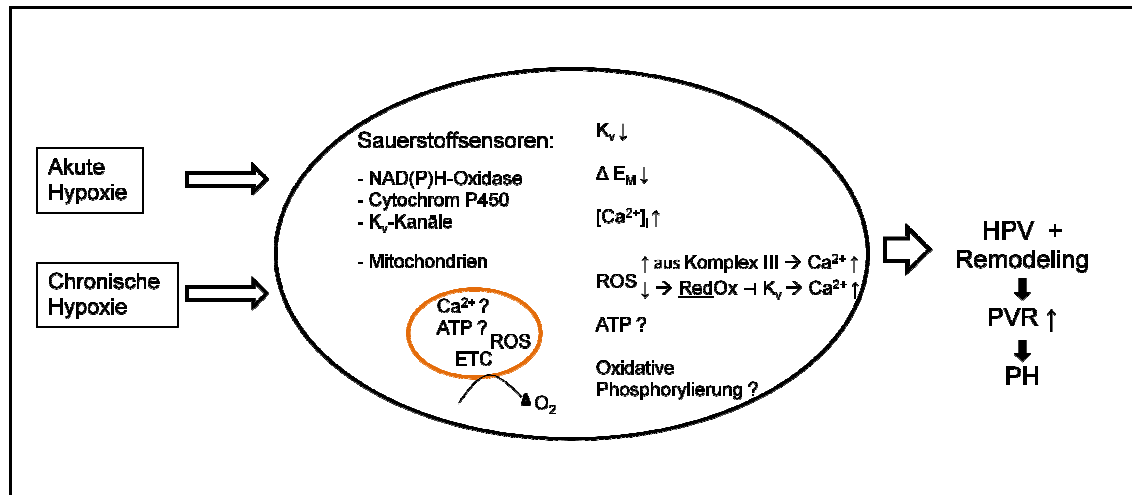


Abbildung 4: Schematische Darstellung über die Auswirkungen akuter und chronischer Hypoxie auf pulmonalarterielle glatte Gefäßmuskelzellen

Akute oder chronische Hypoxie führt über eine Erhöhung des peripheren vaskulären Widerstandes ($PVR \uparrow$) und vaskuläres Remodeling zur pulmonalen Hypertonie (PH). Die möglichen Sauerstoffsensoren sind allerdings noch nicht endgültig geklärt, in Frage kommen (links im Oval aufgeführt:) NAD(P)H-Oxidasen, Cytochrom P 450, spannungsgesteuerte Kalium-Kanäle (K_v), sowie die in dieser Arbeit schwerpunktmäßig behandelten Mitochondrien, mittels Änderung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder möglicherweise intrazellulären Kalzium (Ca^{2+}), sowie ATP (Adenosintriphosphat)-Konzentration (orangefarbenes Oval).

Ebenso sind die Signaltransduktionswege noch nicht vollständig erforscht (rechts im Oval von oben nach unten): Bekannt ist, dass die Hemmung von spannungsabhängigen Kalium- (K_v)-Kanälen zur Depolarisation der Plasmamembran ($\Delta E_M \downarrow$) führt, das wiederum zum Kalzium-Einstrom ($[Ca^{2+}]_i \uparrow$) führt. Möglicherweise spielen Veränderungen der ROS-Produktion sowie ein veränderter mitochondrialer Metabolismus mit einer erniedrigten oxidativen Phosphorylierung und Veränderung der ATP-Quellen eine Rolle.

$K_v \downarrow$: Hemmung der spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle, $\Delta E_M \downarrow$: Depolarisation, $[Ca^{2+}]_i \uparrow$: intrazelluläre Kalzium-Konzentration steigt, ROS \uparrow/\downarrow : ROS steigt oder sinkt mit nachfolgender Erhöhung der Kalzium-Konzentration ($Ca^{2+} \uparrow$), ATP?: Auswirkungen auf ATP sind noch ungeklärt, ebenso die Auswirkungen auf die oxidative Phosphorylierung.

ETC: mitochondriale Elektronentransportkette; RedOx: Reduktion und Oxidation, HPV: Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion, O_2 : Sauerstoff.

Quellen siehe Text.

1.6. DIE ROLLE VON ENDOTHELIN IN DER PULMONALEN HYPERTONIE

Endothelin ist eine vasoaktive Substanz, ein Peptidhormon, welches sehr wirkungsvoll als Vasokonstriktor wirkt. Es liegt in mehreren Varianten vor⁸. Zellen des respiratorischen Epithels, Makrophagen, Fibroblasten und Herzmuskelzellen sind in der Lage, Endothelin-1 (kurz Et-1) zu produzieren. In der Lunge wird es hauptsächlich von Endothelzellen, aber auch von SMCs gebildet. Es wirkt v.a. an glatten Muskelzellen. In der Lunge greift das Endothelin-System in die Regulation des Tonus

der Bronchien sowie die Proliferation und Vasokonstriktion der Blutgefäße ein, wodurch die Entstehung einer PH gefördert wird⁸. Durch die Interaktion mit dem Endothelin-Rezeptor A (ET_A-Rezeptor), welcher vor allem in glatter Muskulatur und damit auch in PASMCs exprimiert wird, kommt es zum schnellen Anstieg von [Ca²⁺]_i und zu einer verlängerten Aktivität der Phospholipase C (PLC)^{8, 37}. Diese spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Die durch DAG vermittelte Aktivierung der PKC bewirkt eine Membrandepolarisation durch Inhibition der spannungsabhängigen K⁺-Kanäle oder durch Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanäle, was zum Ca²⁺-Einstrom durch aktivierte spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle und zum Anstieg von [Ca²⁺]_i führt. Eine Hypothese besagt, dass Endothelin (als aus dem Endothel freigesetzte Substanz) an der protrahierten Phase der HPV beteiligt, die akute Phase aber endothelunabhängig sei^{45, 70}. Es besteht aktuell ein Diskurs, inwiefern die akute HVP ohne die Anwesenheit von Endothel ablaufen kann^{14, 40, 64, 108}.

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die pulmonale Hypertonie kann durch Exposition gegenüber chronischer Hypoxie sowohl im Tiermodell, als auch beim Menschen, ausgelöst werden. Als mögliche Faktoren der Hypoxieerkennung („sensing“) und des vaskulären Remodelings werden Veränderungen in der ROS - Freisetzung und im Metabolismus der pulmonalarteriellen glatten Gefäßmuskelzellen ("metabolic theory") diskutiert. Mitochondrien nehmen eine zentrale Stellung bei diesen beiden Zellfunktionen ein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Auswirkungen von chronischer Hypoxie auf mitochondriale Funktionen in isolierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs) zu untersuchen (Abbildung 5).

Dazu sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Etablierung eines Zellkulturmodells, um die Eigenschaften der Mitochondrien in PASMCs hinsichtlich ihrer Antwort auf chronische Hypoxieexposition zu untersuchen.

Der Einfluss folgender Faktoren auf die mitochondriale Atmung unter basalen Bedingungen (Normoxie) sollte bestimmt werden:

- a) Zellkulturdauer (Passage 1 und 2, Aussaat 1 und 2)
 - b) Versuchsdauer (Abatmung 1 und 2)
 - c) Menge an FCS im Kulturmedium als allgemeinen Proliferationsstimulus
 - d) Zusatz von Endothelin-1 als Proliferationsstimulus bei der pulmonalen Hypertonie (PH).
2. Bestimmung
 - a) der Sauerstoffaffinität (p_{50}), als Parameter für die Funktion der Atmungskette unter Hypoxie
 - b) der mitochondrialen Atmung (V_{max}), als Parameter für die maximale endogene Atmung der Mitochondrien
 - c) und des pO_2 -abhängigen Redox-Status mitochondrialer Cytochrome, als Parameter für Redox-Veränderungen unter Hypoxie in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs) nach Inkubation in chronischer Hypoxie.

3. Vergleich der Veränderungen in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs) mit denjenigen in aortalen glatten Muskelzellen (ASMCs) nach Inkubation in chronischer Hypoxie.

Die Arbeitshypothese besagte, dass es nach Inkubation von PASMCs in chronischer Hypoxie zu Veränderungen kommt, die sowohl die Reaktion auf akute Hypoxie, als auch das vaskuläre Remodeling beeinflussen können.

In der vorliegenden Arbeit wurden respirometrische Messungen normoxisch und hypoxisch inkubierter pulmonalarterieller (PASMCs) und aortaler (ASMCs) glatter Muskelzellen in Verbindung mit der Methode der Remissions-Spektrophotometrie durchgeführt.

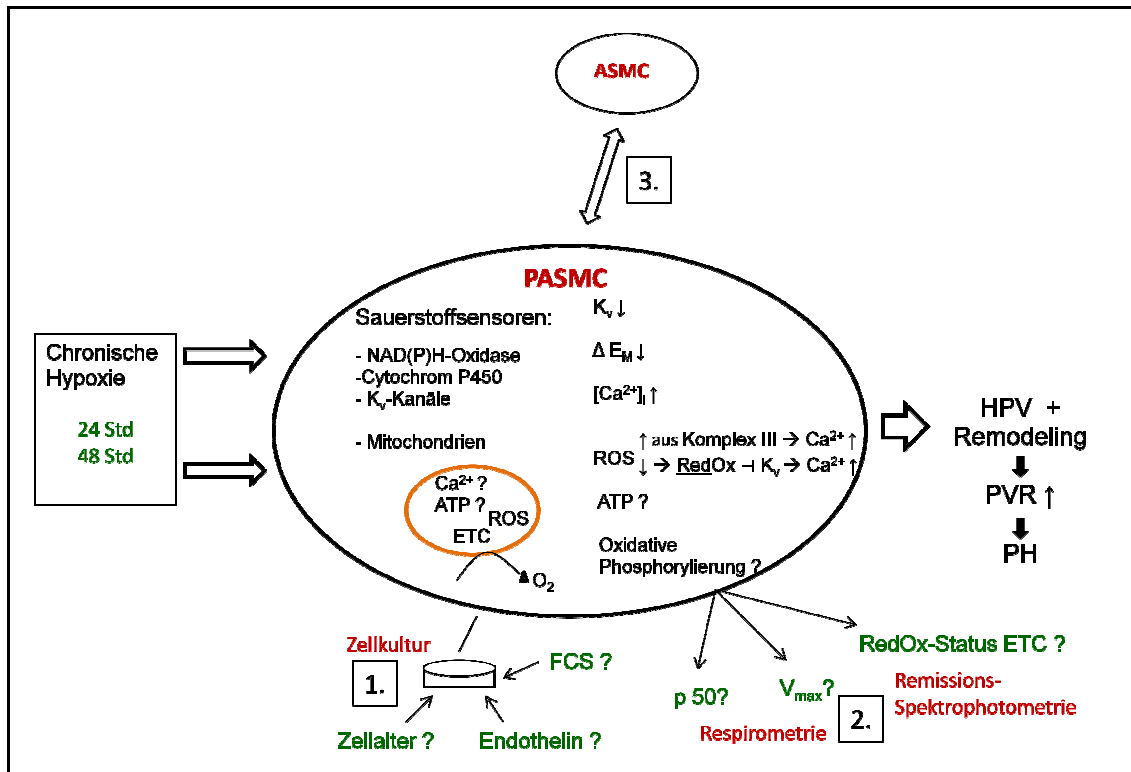


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zielsetzung der Arbeit

In der ersten Versuchsreihe (1.) wurde der Einfluss von Zellalter, Wachstumsfaktorengehalt (FCS) und Endothelin in normoxisch und chronisch hypoxisch (24 und 48 Stunden) inkubierten PSMCs untersucht. In der zweiten Versuchsreihe (2.) wurden unter normoxischen und hypoxischen Versuchsbedingungen respirometrisch die Sauerstoffaffinität (p₅₀) und der Sauerstoffverbrauch (V_{max}), sowie mithilfe der Remissions-Spektrophotometrie der Redox-Status der mitochondrialen Elektronentransportkette (ETC) bestimmt. In einem dritten Schritt (3.) wurden die Versuche der Respirometrie mit aortalen Vergleichszellen (ASMCs) durchgeführt und anschließend mit den Ergebnissen der PSMCs verglichen.

(Vgl. Abbildung 4: Schematische Darstellung über die Auswirkungen akuter und chronischer Hypoxie auf pulmonalarterielle glatte Gefäßmuskelzellen).

HPV: Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion, PVR↑: Erhöhung des peripheren vaskulären Widerstandes, PH: pulmonalen Hypertonie, K_v↓: Hemmung der spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle, ΔE_M↓: Depolarisation des Membranpotenzials, [Ca²⁺]_i↑: intrazelluläre Kalzium-Konzentration steigt, ROS ↑/↓: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies steigt oder sinkt mit nachfolgender Erhöhung der Kalzium-Konzentration (Ca²⁺↑), ATP?: Auswirkungen auf Adenosintriphosphat sind noch ungeklärt, ebenso die Auswirkungen auf die oxidative Phosphorylierung. RedOx: Reduktion und Oxidation.

Std: Stunden, K_v: spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, Ca²⁺: Kalzium, FCS: fetales Wachstumsserum, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzellen, ASMC(s): aortale glatte Muskelzellen.

3. MATERIAL

3.1. CHEMIKALIEN

Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acetyl Coenzym A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose Typ VII	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Antimycin A from streptomyces sp	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua B. Braun, Ecotainer	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen
Braunoderm	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen
BSA Waschmedium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Citrate Synthase (CS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Collagenase Typ IV ca. 80 U/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eisen(II,III)-oxid; Pulver; < 5 µm; 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Endothelin-1	Calbiochem / Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %	SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn
FCCP (Carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Heparin-Natrium-2500-ratiopharm	Ratiopharm GmbH, Ulm
HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazinyl)-1-ethansulfonate)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Ketamin (Ketavet) 100 mg/ml	Pfizer Pharmacia GmbH, Karlsruhe
Kollagen Typ I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Medium 199 (= M199)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Medium 199 without phenol red (farblos)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	Diaco, Serag-Wiesner, Naila
Natriumcyanid, 97 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Oligomycin from streptomyces diastatochromogenes (Oligo A, B, C)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Oxalacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Reagenzien zur Proteinbestimmung: Reagenz A (alkaline copper tartrate)	Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA
Reagenz B (dilute folin)	
Reagenz S (surfactant solution)	
Ripa-Buffer	
Rompun 2 % (Xylazin)	Bayer HealthCare, Leverkusen
Rotenon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDT. (Natriumdithionid techn) ca 85 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-HCL	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypsin EDTA 10-fach	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Xylocain 1 %	AstraZeneca GmbH, Wedel

Histologie

Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Hamburg
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 1: Liste verwendeter Chemikalien

3.2. ANTIKÖRPER

Primärantikörper

Collagen I, Alexa Fluor 488, rabbit anti-human	Invitrogen, Karlsruhe
Cytokeratin, monoclonal, Clone MNF116, mouse anti-human	Dako Cytomation, Hamburg
SM-α-Aktin, anti-α-smooth muscle actin, monoclonal Clone 1A4, mouse anti-human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Vimentin, monoclonal, Clone V9, mouse anti-human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
vWF, anti-von Willebrand factor, polyclonal, rabbit anti-human	Dako Cytomation, Hamburg

Sekundärantikörper:

Goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 (für Collagen, vWF)	Invitrogen, Karlsruhe
Goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 (für Cytokeratin, SM- α -Aktin, Vimentin)	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 2: Liste verwendeter Antikörper

3.3. VERBRAUCHSMATERIALIEN

8-Well-Permanox Objektträger („Chamber slides“)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Butterfly 25G Ecoflo	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Deckgläschen 24 x 50 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
sterile Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (T 25, T 75)	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikroliter-Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland
Kanüle (15 G, 18 G) BD Microlance	Becton, Dickinson, New York, USA
Leukoplast	BSN medical GmbH, Hamburg
Leukosilk	3M Deutschland GmbH, Neuss
Magnetic Particle Concentrator, Dynal MPC-1	Invitrogen Dynal A.S, Oslo, Norwegen
Perfusorspritze	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen
Pipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml)	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
Skalpelli, Feather Disposable Scalpell	Feather Safety Razor Co, Osaka, Japan
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Friedrichsdorf

Tabelle 3: Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien

3.4. GERÄTE

CASY Cell Counter Model DT	Innovatis AG, Reutlingen
ELISA BIO TEK ELX 808	BioTek Instruments, Winooski, US
Filter AL 340 - 380 nm	Leica Microsystems, Wetzlar
Filter I3L	Leica Microsystems, Wetzlar
Inkubatoren	Flow Laboratories, Meckenheim u.
Temp 37 °C, 5 % CO ₂	HeraCell, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop Leica CTR MIC	Leica Microsystems, Wetzlar
Kamera für Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DC300FX	
Leica QWin	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop	Olympus IMT-2, Olympus, Hamburg
O2C, CytoSPEC II	LEA Medizintechnik, Gießen
Oxygraph-2k	OROBOROS® INSTRUMENTS GmbH, Innsbruck, Österreich
Sterilwerkbank („Flow“) HeraSafe	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Wasserbad der Hypoxiekammer	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Zentrifuge Hettich Rotana PR	Hettich Instruments, Beverly, USA

Tabelle 4: Liste verwendeter Geräte

4. METHODEN

4.1. ZELLISOLIERUNG VON PULMONALARTERIELLEN GLATTEN MUSKELZELLEN

Die Isolierung erfolgte nach der von Waypa und Schumacker^{51, 96} beschriebenen Technik und wurde den Laborbedingungen angepasst und modifiziert.

Für die Präparation wurden Kaninchen der Rasse „White New Zealand“ mit einem Körpergewicht von circa 2,5 bis 3,5 kg verwendet. Eine entsprechende Anzeige (vom 04.06.1996 sowie 21.06.2009) wurde von der zuständigen lokalen Behörde (Regierungspräsidium Gießen) bewilligt.

Zu Beginn wurde die Ohrtrandvene mit einem Butterfly punktiert und der Zugang mit Leukoplast gesichert. Darüber erfolgte die Antikoagulation mit 1000 I.E. Heparin / kg Körpergewicht i.v. sowie die anschließende Gabe des Narkosegemischs (1 - 2 ml / kg Körpergewicht eines Gemisches aus 1,5 Teilen Ketanest (50 mg/ml und 2 Teilen Rompun 2 %). Das narkotisierte Tier wurde nun in Rückenlage locker fixiert und den Nacken überstreckt. Nach Feststellung ausreichender Narkosetiefe konnte mit der Präparation begonnen werden. Die Hals-, Thorax- und Abdomenregion wurden großzügig mit Braunoderm desinfiziert und mit einem Gemisch aus 8 ml Xylocain 1 % + 2 ml NaCl eine Quaddel unterhalb des Larynx über die Trachea gesetzt. Nach Entfernung des Fells an Abdomen und Hals erfolgte nach vorsichtiger Freipräparation unter Schonung der Halsnerven und -gefäße die Tracheotomie durch Querinzision an der Vorderseite und das Einbinden einer Trachealkanüle mit einem Bindfaden. Durch einen medianen Schnitt folgte die Freilegung des Processus xiphoideus. Dieser wurde mit Hilfe einer Klemme gefasst, sodass mit an beiden Seiten entlang der Rippenbögen gesetzten Hautschnitten der Thorax und das Abdomen eröffnet werden konnten. Das Diaphragma wurde unter Schonung der Lungenflügel unterhalb des Processus xiphoideus eröffnet und ein künstlicher Pneumothorax geschaffen, wodurch das Risiko einer Lungenverletzung minimiert wurde. Das Diaphragma wurde mit einer weiteren Klemme befestigt, nach kaudal gezogen, fixiert und über beidseitige Schnitte vom Rippenbogen gelöst. Nach vorsichtiger stumpfer Ablösung des Perikards und des Thymus vom Brustkorb erfolgte unter Schonung der Aa. mammae internae die Thorakotomie über eine mediale Sternotomie mit anschließender Aufspreizung und Fixierung der beiden Thoraxhälften durch zwei mit Leukosilk am Tisch fixierten Klemmen. Nun konnte das Perikard eröffnet und der Apex mit einer Klemme gefasst

werden. Es folgte die vorsichtige Umschlingung und Legierung der Aorta ascendens und des Truncus pulmonalis mit Bindfäden (Abbildung 6a) und damit die Tötung des Tieres durch Unterbinden der zentralen Gefäße gemäß Anzeige. Über einen Schnitt in den rechten Ventrikel wurde der Pulmonalarterienkatheter eingeführt und über die Ligatur in der Pulmonalarterie befestigt. Durch Entfernen der Herzspitze wurden gleichzeitig beide Ventrikel eröffnet, um einen Abfluss der Lungenstrombahn herzustellen. Über den Pulmonaliskatheter wurde die Lunge nun mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) + 1 % Penicillin/Streptomycin blasenfrei blutleer gespült und anschließend mit einer Eisen-Agarose-Mischung (5 mg/ml Agarose Typ VII mit niedrigem Schmelzpunkt und 5 mg/ml Eisen-II-Oxid definierter Größe) gefüllt (Abbildung 6b). Dabei wurde besonders auf eine gleichmäßige und seitengleiche Verteilung der Infusion geachtet. Zur optimalen Verarbeitung wurde das Eisen-Agarose-Gemisch vor der Infusion in Medium 199 + 1 % Penicillin/Streptomycin gelöst, über 10 min im Wasserbad auf 70 °C erwärmt und auf 40 °C abgekühlt, damit sich die Agarose vollständig löste. Die Lunge färbte sich durch die Instillation schwärzlich-grau. Die angefärbten Lungenanteile entsprechen im Wesentlichen den Präkapillargebieten der pulmonalarteriellen Endstrecke. Die Kapillaren selbst konnten aufgrund der Größe der Eisenpartikel nicht erreicht werden.

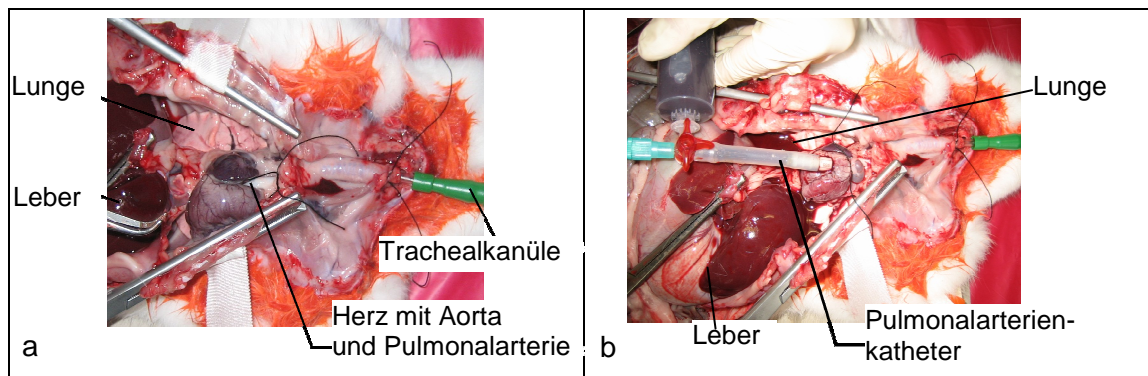


Abbildung 6: Isolation von PAMSCs aus Kaninchen

a) Blick in den Situs: Links im Bild die Leber, rechts ist die Trachealkanüle in die Trachea eingebunden. Mittig dargestellt ist das Herz. Mit dem Bindfaden wird die Aorta angeschlungen. Die Lunge ist noch nicht gespült und daher noch rosa.

b) Kanülierung des rechten Vorhofs über einen Pulmonalarterienkatheter. Darüber wurde die vorbereitete Eisen-Agarose-Mischung in die Lunge instilliert, welche sich dabei dunkel färbt.

Anschließend wurde eine Agarose-Mischung (10 mg/ml Agarose, gelöst in Medium 199 + 1 % Penicillin/Streptomycin), die über 10 min im Wasserbad auf 70 °C erwärmt und wieder auf 40 °C abgekühlt worden war, über die Trachealkanüle in die Lunge instilliert. Es erfolgte der Verschluss der Trachealkanüle, um die noch flüssige Agarose am Auslaufen zu hindern. Danach folgte die Entnahme des Herz-Lungen-Paketes, das in einem mit gekühltem DPBS gefüllten und verschlossenen Behälter auf Eis gelegt

wurde. Nach ca. 10 min war die Agarose fest (Schmelzpunkt bei 36 °C) und das Lungengewebe damit schnittfest (Abbildung 7).



Abbildung 7: Zellisolierung PASMCs: präparierte Lunge

Mit Eisen und Agarose präparierte Lunge. Das pulmonalarterielle Stromgebiet stellt sich schwarz dar, das restliche Lungengewebe durch die Instillation von Agarose über die Trachea rosa.

Die Weiterverarbeitung erfolgte an der Sterilwerkbank. Es wurden nacheinander etwa 2 x 2 x 2 cm große Lungenstücke in sterile 50 ml Röhrchen gegeben, mit einigen Tropfen DPBS + 2 % Penicillin/Streptomycin befeuchtet und mithilfe drei nebeneinander gehaltenen Scheren („3-Scheren-Technik“) möglichst klein geschnitten. Anschließend wurde der Behälter mit DPBS aufgefüllt und die Stückchen im Magnetic Particle Concentrator gewaschen. Das eisenhaltige Kapillargewebe wurde von dem Magnet an der Wand des sterilen Röhrchens fixiert, wodurch das pulmonalarterielle Präkapillargewebe vom restlichen Lungengewebe durch einfaches Absaugen des ungebundenen Gewebes samt restlichem DPBS getrennt werden konnte. Dieser Schritt wurde je dreimal wiederholt. Die nun gewaschenen Gewebeteilchen wurden zusammen mit vorgewärmter Collagenase-Mischung (Collagenase 80 U/ml + M 199 + 1 % Penicillin/Streptomycin) in sterile Zellkulturschalen pipettiert. Im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) erfolgte nun über 1 Std der enzymatische Verdau. Der anschließende mechanische Verdau erfolgte manuell durch Verwendung von Kanülen verschiedener Größe (15G u. 18G). Im Magnetic Particle Concentrator wurde das Gewebe wiederum mit einem Gemisch aus M 199 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin dreimal gewaschen. Der Verdauungsprozess der Collagenase wurde durch das FCS abgestoppt. Ziel des Verdauens war die Gewinnung einer Fibroblasten-freien Zellkultur, da Fibroblasten durch den Verdau abgetötet werden.

Die gewaschenen und in M 199 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin gelösten Eisenpartikel mit Lungengefäßgewebe wurden nun in sterilen T 75-Gewebekulturflaschen ausgesät. Die Flaschen wurden beschriftet und für ca. 5 - 7 Tage im Inkubator kultiviert. Da Endothelzellen zur Kultur andere Bedingungen benötigen, als die hier verwendeten, konnten weitgehend reine PASMC-Kulturen gezüchtet werden (vgl. Immunfluoreszenzfärbungen Kap.5.1).

4.2. ZELLISOLIERUNG VON AORTALEN GLATTEN MUSKELZELLEN

Die Isolierung der aortalen glatten Muskelzellen erfolgte aus der Aorta thoracica und den oberen Anteilen der Aorta abdominalis von Kaninchen. Diese wurde den toten Kaninchen direkt nach Entnahme des Herz-Lungen-Pakets für die Isolierung von PSMCs entnommen. Die Weiterverarbeitung der entnommenen Aorta erfolgte an der Sterilwerkbank (Abbildung 8). Zuerst wurde die Aorta vom umgebenden Fett- und Sympathikusgewebe befreit. Die gesäuberte, etwa 5 cm lange Aorta wurde in 2 - 3 Stücke unterteilt, diese wurden der Länge nach aufgeschnitten und mit der Innenseite nach oben auf einen Gummiblock gelegt. Mit Hilfe eines Skalpell wurde die Endothelschicht (Monolayer) abgetragen. Eventuell verbliebene Endothelzellen wurden durch die angewandten Scherkräfte beschädigt, so dass eine Kontamination der Zellkultur mit Endothelzellen vermieden werden sollte. Ebenfalls mit dem Skalpell wurde in einem weiteren Schritt die Media von der Adventitia getrennt. Die Adventitia wurde verworfen, die jetzt Endothelzellen- und Fibroblasten-freie Media mit einer Schere in möglichst kleine Stückchen geschnitten. Diese wurden mit etwas Kulturmedium (M199 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) in T25-Gewebekulturflaschen gebracht.

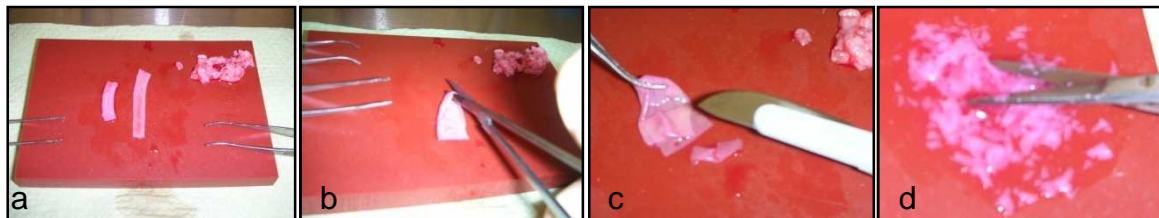


Abbildung 8: Zellisolierung von ASMCs

Die von Fett und Sympathikusgewebe gesäuberte Aorta (a) wird längs aufgeschnitten (b). Mit dem Skalpell werden Media und Adventitia getrennt (c). Anschließend wird die Media in kleinste Stücke geschnitten (d).

4.3. ZELLKULTUR: BEDINGUNGEN UND BEGRIFFSDEFINITIONEN

4.3.1. Atmosphärische Bedingungen und Zellkultur

Alle Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, unter Raumluftbedingungen (pO_2 158 mmHg (21 kPa), pCO_2 40 mmHg (5,3 kPa), Rest N_2) kultiviert. Die Luftzusammensetzung im Inkubator bestand bei normoxischer Inkubation aus Raumluft + 5 % CO_2 . Die hypoxische Inkubation erfolgte bei 1 % O_2 , 5 % CO_2 , Rest N_2 .

Die in dieser Arbeit mit „serumreich“ bezeichneten Zellen wurden mit 10 % Wachstumsfaktoren (FCS) im Kulturmedium gezüchtet und während der gesamten Kultivierungszeit bis zur Trypsinierung damit behandelt. Bei „serumarmen“ Zellen wurde 24 Std vor Versuchsbeginn (48 Std vor der Messung und 24 Std vor der hypoxischen Inkubation) der FCS-Gehalt im Kulturmedium auf 1 % reduziert.

Bei den Messungen mit Endothelin-1 wurde zu Beginn des Versuches zu 2 ml Zellsuspension aus normoxisch und mit 10 % FCS kultivierten PSMCs 21 µl Endothelin -1 (Endkonzentration in der Kammer 10 nM) gegeben.

4.3.2. Zellalter

Das Alter der jeweiligen Zellen wird mit Hilfe zweier Begriffe beschrieben:

Aussaat (A) – Anzahl der Aussaaten ausgehend vom Ursprungsgewebe.

Passage (P) – Angabe, wie oft Zellen nach dem Vorgang der Trypsinierung auf neue Gewebekulturplatten gesetzt wurden.

Zellen, die direkt aus dem Ursprungsgewebe oder den isolierten Gewebestückchen wachsen, befinden sich in der 1. Aussaat und gleichzeitig in der 0. Passage. Durch Teilung der Zellkultur und Verteilen in neue Gewebekulturflaschen erreichten die Zellen eine höhere Passage. Durch erneutes Aussäen von Gewebestückchen aus dem Ursprungs-Gewebe-Isolat wurde eine höhere, zweite Aussaat erreicht.

4.3.3. Konfluenz

Die Wachstumsdichte der Zellkultur wird als Konfluenz bezeichnet. Eine zu geringe Zelldichte bewirkt durch fehlende Zell-Zell-Kontakte ein langsames Wachstum, andererseits bewirkt eine zu große Zelldichte mangelhaftes Wachstum durch Kontaktinhibition. Beides führt zur Verschlechterung der Zellqualität. Optimale Konfluenz für die Weiterverarbeitung sind ca. 80 %.

4.3.4. Wechsel des Kulturmediums

Ein regelmäßiger Mediumwechsel tauscht Stoffwechselendprodukte der Zellen gegen neue Wachstumsfaktoren aus, und sorgt damit für ein gleichmäßiges und gesundes Zellwachstum. Für diese Arbeit erfolgte alle 2 - 3 Tage ein Mediumwechsel.

Bei den PSMCs und ASMCs handelt es sich um Adhäsionszellen, die am Boden der jeweiligen Gewebekulturträger wachsen und über Kalzium-Brücken daran verankert

sind. Mediumwechsel erfolgt durch Absaugen des alten und Hinzufügen des neuen Mediums. Zur Weiterverarbeitung müssen diese Zellen trypsinisiert werden, um sie von der Gewebekulturflasche zu lösen.

4.3.5. Zellteilung und Neuaussaat

Beim sog. Splitten werden Zellen einer Gewebekulturflasche oder -schale auf eine größere Anzahl Gewebekulturflaschen verteilt und befinden sich dann in der nächsten Passage. In dieser Arbeit wurde dieser Arbeitsschritt bei einer Konfluenz von ca. 70 - 80 % durchgeführt. Der erste Schritt erfolgte durch Waschen der Zellen mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} - freiem Medium, der zweite durch Inkubation in Trypsinlösung (Trypsin/EDTA + HEPES + NaCl, 8:1:1), die im Inkubator für 1 min einwirkte und durch Komplexbildung der zellstabilisierenden Membranproteine eine Lösung der Zellen vom Flaschenboden bewirkte. Das Lösungsverhalten wurde unter dem Mikroskop beurteilt und anschließend mit FCS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen entweder neu ausgesät oder im Versuch verwendet.

Für die Neuaussaat wurde eine Zelldichte von ca. 500.000 bis 1 Mio. Zellen pro T 75 - Platte gewählt. Je nach ausgesäter Zelldichte und Wachstumsverhalten der Zellen waren die Platten nach 4 - 8 Tagen wieder ca. 80 % konfluent und konnten weiter gesplittet oder für Versuche verwendet werden. In dieser Arbeit wurden nur Zellen der 1. und 2. Aussaat sowie der 1. und 2. Passage verwendet.

4.3.6. Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte manuell mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durch Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop, und automatisch mit dem Zellzähler „CASY“ (Innovatis AG, Reutlingen). Für diese Arbeit wurden beide Verfahren parallel verwendet, um möglichst genaue Zellzahlen bestimmen zu können.

4.3.7. Versuchsvorbereitung

Zur Versuchsvorbereitung wurden die Zellen nach dem Trypsinieren mit 1 ml DPBS resuspendiert und mit Waschmedium (M 199 farblos + 0,2 M HEPES, 9:1) gewaschen. Nach 3-maligem Waschen wurden die Zellen in Medium (M 199 farblos + 0,2 M HEPES, 9:1) resuspendiert und die Messungen durchgeführt. Da die Zugabe von Farbstoffen im Medium bei Messungen durch Remissions-Spektrophotometrie zu Störungen führt, wurde farbloses Medium 199 ohne Phenolrot verwendet. Um alle

Zellen einheitlich zu behandeln, wurde für alle Messungen ab dem Zeitpunkt der Versuchsvorbereitung farbloses Medium verwendet.

4.3.8. Spezifische Bedingungen bei der Zellkultur von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen

Die Eisenpartikel nach dem Anwachsen der 1. Aussaat wurden nach ca. 5 - 7 Tagen durch vorsichtiges Abspülen mit Kulturmedium aus den Gewebekulturflaschen entfernt. Die daraus gewachsenen Zellen befanden sich in der 0. Passage und wurden erneut ausgesät. Die mit Hilfe des Magnetic Particle Concentrators gewaschenen Eisenpartikel, an denen noch Gewebe haftete, wurden als 2. Aussaat auf mehrere Gewebekulturflaschen verteilt.

4.3.9. Spezifische Bedingungen bei der Zellkultur von aortalen glatten Muskelzellen

Nach 2 - 4 Wochen waren aus den Aortenfragmenten in den Gewebekulturflaschen jeweils kleine Zellinseln gewachsen. Die Gewebestückchen wurden zusammen mit dem restlichen Medium mit einer Pipette abgenommen, in ein steriles Röhrchen gebracht und als 2. Aussaat erneut ausgesät. Die aus der 1. Aussaat gewachsenen Zellen wurden trypsiniert, gewaschen und ebenfalls neu auf Gewebekulturflaschen verteilt.

4.4. INKUBATION VON ZELLKULTUREN IN CHRONISCHER HYPOXIE

Für die hypoxische Inkubation der Zellen wurde eine thermo-kontrollierte Hypoxiekammer verwendet (Abbildung 9, Abbildung 10). Diese bestand aus einem großen Wasserbad, in welchem auf Flaschen gelagert eine luftdicht verschließbare Hypoxiekammer lag. Durch die untergelegten Glasflaschen wurde ein direkter Kontakt der wasserdichten Kammer mit den Heizstäben des Wasserbeckens vermieden. Der Aufbau der Hypoxiekammer in einem großen Wasserbad diente der Gewährleistung einer konstanten Temperatur von 37 °C. Die verwendete Gasmischung aus 1 % O₂, 5 % CO₂, Rest N₂ wurde über eine zwischengeschaltete Befeuchtungseinheit in die Hypoxiekammer geleitet. Die Gewebekulturflaschen wurden in die Hypoxiekammer

gestellt. Durch die für Gas permeablen Verschlüsse der Gewebekulturflaschen wurde die Äquilibration der Zellkammern mit der hypoxischen Gasmischung erreicht. Der Ausstrom des Gases aus der Kammer erfolgte über ein Ventil ins Wasserbecken, das damit als Rückschlagventil diente. Zur Sicherstellung der gewünschten Gasmischung in der Kammer wurden regelmäßig Gasproben aus dem Ausstrom entnommen und die jeweilige Gaszusammensetzung bestimmt.



Abbildung 9: Hypoxiekammer

Ansicht der Hypoxiekammer im Wasserbad. In der verschlossenen Kammer befanden sich Gewebekulturflaschen zur hypoxischen Inkubation. Unten im Bild (rot) befindet sich der Befeuchter, über den das Gas eingeleitet wurde. Am Boden des Wasserbads sind die Heizspiralen sichtbar.

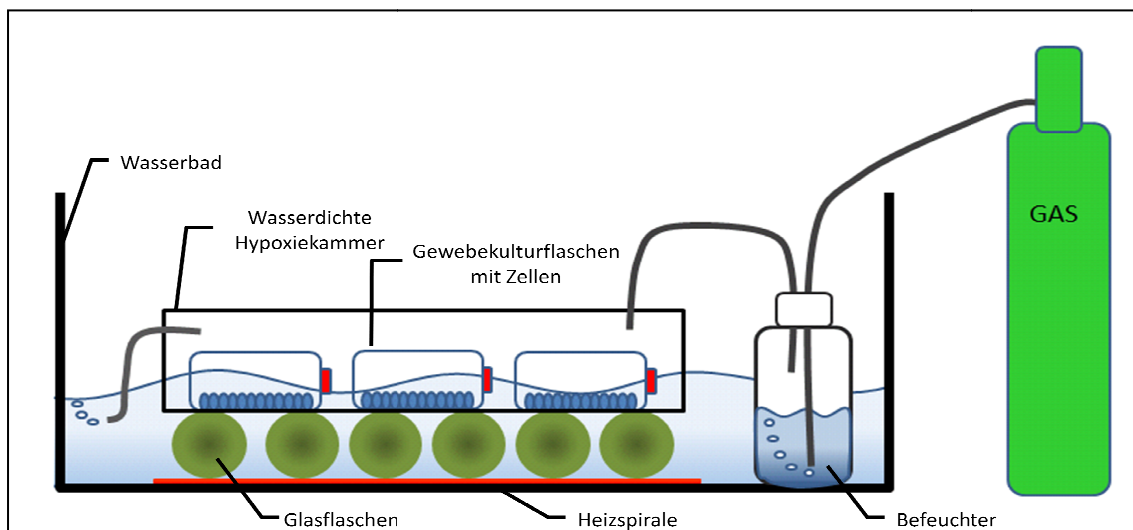


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Hypoxiekammer

Schematischer Blick in die Hypoxiekammer: Eine verschließbare und auf Glasflaschen gelagerte Kammer diente als Hypoxiekammer, darin befanden sich die zu inkubierenden Gewebekulturflaschen. Das Hypoxiegas wurde über einen Befeuchter in die Kammer geleitet. Der Aufbau im Wasserbad sorgte für eine gleichmäßige Temperatur in der Kammer.

4.5. HIGH-RESOLUTION RESPIROMETRIE

Die Bestimmung der mitochondrialen Atmungskettenfunktion in pulmonalarteriellen (PAMCs) und aortalen (AMCs) glatten Muskelzellen erfolgte mit Hilfe eines High-Resolution Respirometers, dem Oxygraph-2k (OROBOROS Instruments, Innsbruck, Österreich). Dieses Gerät wurde verwendet, um auch bei geringer respiratorischer Aktivität und niedrigen Sauerstoffkonzentrationen präzise Messungen durchführen zu können. Das Prinzip basiert auf einer polarografischen Messung der

Sauerstoffkonzentration in Zellsuspensionen. Der Sauerstoffverbrauch wurde aus der 1. Ableitung der Sauerstoffkonzentration berechnet. Realisiert werden konnte die Präzision durch speziell verwendete sauerstoffneutrale Materialien, hohe Sensitivität der Sauerstoffelektrode und geeignete Kalibrierungsverfahren. Das Gerät besteht aus einem Gehäuse, an dessen vorderem Ende zwei Glaskammern mit einem Messvolumen von jeweils 2 ml eingelassen sind. An jeder dieser Kammern ist seitlich eine Clark-Sauerstoff-Elektrode (Clark type polarographic oxygen sensor) angebracht. Das Detektionslimit des Sauerstoffverbrauchs liegt bei $1 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{cm}^3)$ ($0,001 \text{ }\mu\text{M}/\text{s}$), das Detektionslimit der Sauerstoffkonzentration bei $0,005 \text{ }\mu\text{M O}_2$ ^{23, 28}. In den Kammern befindet sich jeweils ein magnetischer Rührer (sog. Stirrer) zur besseren Durchmischung der zu messenden Zellsuspension. Dadurch wurden Diffusionsstrecken vermieden. Die Kammern wurden nach dem Befüllen mit Medium oder Zellsuspension mithilfe eines Zylinders (sog. Stopper) luftdicht abgeschlossen. Über eine Öffnung im Stopper konnten unter Einhaltung der Luftdichtigkeit Substanzen hinzugefügt werden. Das Messvolumen der Kammern konnte über einen verstellbaren Ring am Stopper verändert und auf genau 2,0 ml eingestellt werden. Die Kammern waren beheizt und sorgten für eine gleichmäßige Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (variabel einstellbar zwischen 2 u. $45 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,001 \text{ }^\circ\text{C}$)²⁸. Durch die Anordnung zweier Kammern nebeneinander bestand die Möglichkeit der vergleichenden Messung zweier Zellsuspensionen. Im Ruhezustand wurden die Kammern mit 70 % Ethanol befüllt.

4.5.1. Kalibrierungen

4.5.1.1. Raumluft-Kalibrierung

Vor dem Versuch wurde regelmäßig eine Zweipunkt-Kalibrierung des Messaufbaus durchgeführt. Als oberen Kalibrierungspunkt wurde die Luftsauerstoffkonzentration herangezogen. Dieser Vorgang der Raumluftkalibrierung wird auch „air calibration“ genannt. Dazu wurde vor Beginn jeden Versuches das Medium, in welchem später die Zellen gelöst wurden (Medium 199 farblos mit HEPES 0,2 M; 9:1) in die Kammern gefüllt. Die Kammern wurden mit dem Stopper nur soweit verschlossen, dass über eine Luftblase eine Äquilibration des Mediums mit der umgebenden Raumluft stattfinden konnte. Über einen Zeitraum von mindestens 30 min wurde nun eine Äquilibration durchgeführt. Durch Messung des Luftdruckes während der Kalibrierung konnte die Sauerstoffkonzentration in der Luft genau bestimmt und als oberen Kalibrierungspunkt verwendet werden (Abbildung 11).

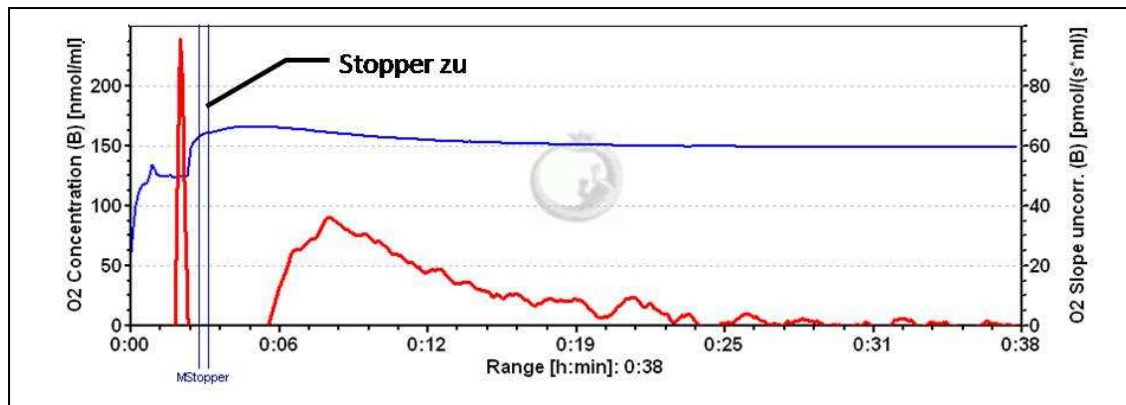


Abbildung 11: Air calibration

Versuchsprotokoll über eine halbstündige Raumlufkalibrierung. Die Sauerstoffkonzentration in der Kammer (blaue Linie) gleicht sich der Raumluf an. Der Sauerstoffverbrauch (rote Linie) beträgt nach Äquilibration 0 pmol/(s*cm³).
Stopper zu: Kammer geschlossen.

4.5.1.2. Nullpunkt-Kalibrierung

Am Ende jedes Versuches wurde die sogenannte „zero calibration“ oder Nullpunktkalibrierung durchgeführt. Dazu wurden ca. 10 µl Natriumdithionid (SDT in 1 mg/ml Medium) in die verschlossenen Kammern pipettiert. SDT bindet den in der Kammer vorhandenen Sauerstoff und führt damit zu einem pO₂ von (nahe) 0 mmHg (0 kPa).

4.5.1.3. Hintergrund-Kalibrierung

In regelmäßigen Abständen wurde zusätzlich eine Hintergrund-Kalibrierung (background calibration) durchgeführt, um den Sauerstoffverbrauch der pO₂-Elektrode und die sauerstoffspeichernden Eigenschaften der Messkammer zu bestimmen, und diese aus den Messdaten korrigieren zu können. Erst dadurch konnten valide Messungen auch im niedrigen Sauerstoffkonzentrationsbereich gewonnen werden (Abbildung 12). Über eine 50 ml-Perfusorspritze wurde in regelmäßigen Abständen Stickstoff (N₂) in die Luftphase der mit Medium gefüllten und leicht geöffneten Kammer geleitet. Dadurch wurde jeweils ein schrittweiser Abfall der Sauerstoffkonzentration in der Kammer erreicht. Nach Verschluss der Kammer wurde der O₂-Verbrauch bei bestimmten O₂-Konzentrationen gemessen. Damit konnte ein pO₂ abhängiger Sauerstoffverbrauch der Messanordnung hergeleitet und die lineare Beziehung zur Korrektur des gemessenen Sauerstoffverbrauchs verwendet werden. Die für jede Kammer erhaltenen Daten wurden online bei der Auswertung berücksichtigt.

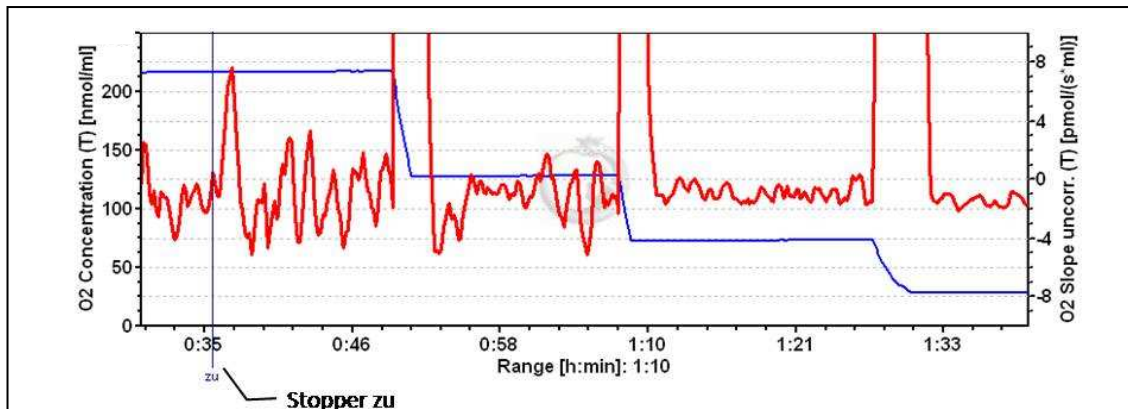


Abbildung 12: Background calibration

Nach jeder der drei Gaben von Stickstoffgas (N_2) fiel der Sauerstoffpartialdruck (blaue Linie) in der Kammer ab. Über den pO_2 -abhängigen O_2 -Verbrauch (rote Linie) in der Plateauphase erfolgte die Auswertung des Korrekturfaktors.
Stopper zu: Kammer geschlossen.

4.6. VERSUCHSPROTOKOLL ZUR BESTIMMUNG DER SAUERSTOFFAFFINITÄT UND MAXIMALEN ENDOGENEN ATMUNG

Die Sauerstoffaffinität (p_{50} -Wert, kurz p_{50}) ist der Sauerstoffpartialdruck bei halbmaximaler mitochondrialer Atmung und ist ein Parameter für die mitochondriale Atmung bei erniedrigtem pO_2 (Hypoxie). Er wird bestimmt, indem der Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit vom pO_2 gemessen wird. Die maximale endogene Atmung aus dieser Abhängigkeit wird dabei V_{max} genannt und ist die Atmung unter optimalen pO_2 -Bedingungen. Der wie unten beschrieben gemessene pO_2 -abhängige Sauerstoffverbrauch verhält sich nach der Michaelis-Menten-Kinetik, zu deren Charakteristika die beiden Messgrößen gehören:

- p_{50} : der Sauerstoffpartialdruck bei halbmaximaler Atmung (= Sauerstoffaffinität), Einheit [kPa], $1 \text{ kPa} \triangleq \sim 1 \% O_2$ in Raumluft.
- V_{max} : der maximale endogene Sauerstoffverbrauch, Einheit [$\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{ml})$] korrigiert auf die Zellzahl, Einheit [$\text{pmol}/\text{Mio. Zellen}$].

Zu Beginn des Versuches wurden Kammervolumen, Zellmenge, Sauerstofflöslichkeitsfaktor des Mediums und die Werte der aktuellen Hintergrund-Kalibrierung in die Software eingegeben. Mithilfe dieser Daten kann der Sauerstoffverbrauch errechnet und online angezeigt werden. Pro Versuch wurden 2,5 ml Zellsuspension mit Hilfe einer Pipette blasenfrei in die Kammer eingefüllt und die Kammer für ca. 10 min so verschlossen, dass über eine verbleibende Luftblase ein Luftaustausch mit der umgebenden Raumluft stattfinden konnte und die Zellsuspension

sich hinsichtlich Temperatur und Sauerstoffkonzentration äquilibrierte. Anschließend wurde die Kammer mit einem Suspensionsinhalt von 2 ml luftdicht verschlossen und über die Abnahme der Sauerstoffkonzentration der Sauerstoffverbrauch bestimmt (Abbildung 13). Bei Erreichen einer kritischen Hypoxie fiel der Sauerstoffverbrauch ab bis kein mitochondrialer Sauerstoffverbrauch bei Anoxie mehr nachweisbar war. Eine solche Episode wird als Abatmung (Transition) bezeichnet. Nach ca. 1 min vollständiger Hypoxie in der Kammer wurde die Zellsuspension reoxygeniert, indem der Verschlusszylinder etwas herausgezogen wurde und Raumluft einströmen konnte. Nach vollständiger Reoxygenierung wurde die Kammer wieder luftdicht verschlossen und eine 2. Abatmung erfolgte. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem gemessenen Sauerstoffverbrauch um mitochondrialen Sauerstoffverbrauch handelte, wurde 1 µl Cyanidlösung (Endkonzentration ca. 1 mM) in die Zellsuspension pipettiert. Cyanid hemmt Komplex IV der Atmungskette, wodurch eine vollständige Inhibierung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs resultiert.

Aus dem pO_2 abhängigen Sauerstoffverbrauch wurde offline gemäß der Michaelis-Menten-Kinetik [$\% V_{max} = (V_{max} * pO_2) / (p50 + pO_2)$] der pO_2 bei halbmaximaler mitochondrialer Atmung (p50) in kPa ($1 \text{ kPa} \triangleq \sim 1 \% O_2$ in Luft, $1 \text{ mmHg} \triangleq 0,133 \text{ kPa}$) errechnet³⁰. Diese Auswertung erfolgte mit Hilfe der DatLab 2 Analysis Software (OROBOROS Instruments).

Vor und nach jedem Versuch wurden die Kammern jeweils dreimal mit 70 % Ethanol und destilliertem Wasser im Wechsel gereinigt und desinfiziert. Bei Nichtbenutzung des Gerätes blieben die Kammern mit 70 % Ethanol gefüllt.

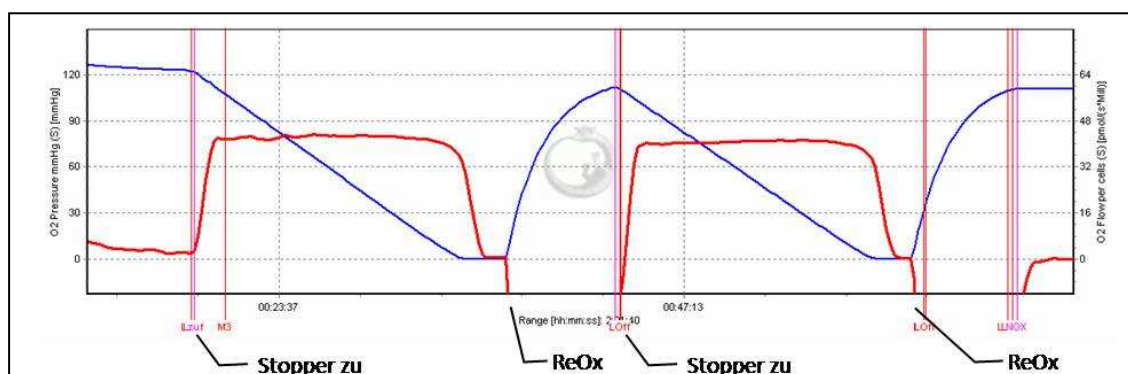


Abbildung 13: Bestimmung der Sauerstoffaffinität

Versuchsablauf: Äquilibrierung bis „Stopper zu“, 1. Abatmung, Reoxygenierung, 2. Abatmung
 Rote Linie: Sauerstoffverbrauch/Millionen Zellen, Blaue Linie: pO_2 .
 ReOx: Reoxygenierung; Stopper zu: Kammer geschlossen.

4.7. VERSUCHSPROTOKOLL ZUR BESTIMMUNG VON PROTONENLEAK UND MAXIMALER ATMUNGSKETTEN- KAPAZITÄT

Um weitere Basiseigenschaften der Mitochondrien bestimmen zu können, wurden zusätzlich sogenannte „Titrations-Versuche“ durchgeführt. Namensgebend ist die Titration verschiedener mitochondrialer Inhibitoren / Entkoppler zur Zellsuspension in die geschlossene Messkammer. Diese Messungen wurden parallel mit normoxisch und hypoxisch inkubierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen durchgeführt. Der Versuchsablauf wird in OROBOROS Protocols²³ beschrieben. Die Vorbereitung der Zellen, sowie die ersten 15 Minuten des Versuchsablaufes erfolgten analog der Versuche zur Bestimmung der Sauerstoffaffinität und maximalen endogenen Atmung.

Nach einer Äquilibrierungszeit von ca. 10 min erfolgten der luftdichte Verschluss der Kammern mit Hilfe des Stoppers und der Versuchsbeginn (Abbildung 14). Nach einer stabilen Phase des Sauerstoffverbrauchs durch endogene Zellatmung („Routineatmung“) bei nicht limitierendem pO_2 wurde das Titrationsprotokoll gestartet. Begonnen wurde mit der Gabe von 1 μ l Oligomycin (4 mg/ml Stocklösung in 70 % Ethanol, Endkonzentration 2 μ g/ml Oligomycin) über eine Mikroliter-Spritze. Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase der Atmungskette, sodass es über die Erhöhung des Protonengradienten zu einer Abnahme der mitochondrialen Atmung kommt. Der residuale Sauerstoffverbrauch spiegelt die mitochondriale Atmung, die zur Kompensation des Protonenverlusts entlang des Gradienten benötigt wird, wider. Nach Erreichen eines neuen stabilen Plateaus (nach ca. 10 - 15 min) begann die repetitive Gabe von FCCP (Carbonyl-Cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone). Diese konnte entweder manuell oder über die automatische Einspritzpumpe (TIP 2k) erfolgen. FCCP ist protonophor und entkoppelt den Protonentransport von der ATP Produktion, indem es die Mitochondrienmembran permeabilisiert. Damit führt es zu einer maximalen Aktivierung der Elektronentransportkette, der sogenannten maximalen Atmungskettenkapazität, die die ADP unabhängige Aktivierung der Atmungskette widerspiegelt und von Substratangebot sowie Funktion der einzelnen Atmungskettenkomplexe abhängt. Es wurden 0,1 ml 10 mM FCCP im Abstand von ca. 120 s über etwa 15 Einzelgaben in die Kammer gespritzt, bis sich wieder ein stabiler Sauerstoffverbrauch einstellte. Danach erfolgte die Inhibierung von Komplex I der Elektronentransportkette durch Gabe von 1 μ l Rotenon (Stocklösung in Ethanol, Endkonzentration 0,2 mM). Anschließend wurde durch 1 μ l Antimycin A (Stocklösung in Ethanol, Endkonzentration 5 mM) Komplex III gehemmt. Daraufhin sank der

Sauerstoffverbrauch auf ein Niveau, das dem nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch entspricht. Als letzter Schritt wurde mit SDT eine Nullpunktkalibrierung durchgeführt.

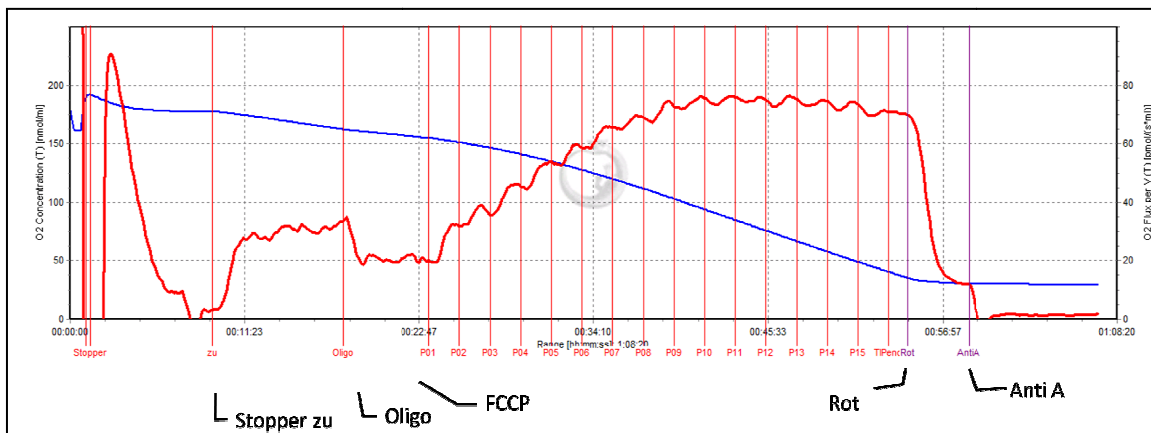


Abbildung 14: Bestimmung der endogenen Atmung, des Protonenleaks, der maximalen Atmungskettenkapazität und der nicht mitochondrialen Zellatmung

Nach luftdichtem Verschluss der Kammer „Stopper zu“ beginnt die Sauerstoffkonzentration (blaue Linie, O₂ Concentration [nmol/ml], linke Y-Achse) zu sinken und die Messung des Sauerstoffverbrauchs (rote Linie, O₂ Flux per Volume [pmol/(s*ml)], rechte Y-Achse). Nach Erreichen eines stabilen Plateaus erfolgte die Gabe von Oligomycin (Oligo), woraufhin der Sauerstoffverbrauch durch Hemmung der ATP Synthase sank. Wiederum nach Erreichen einer stabilen Phase erfolgt die repetitive Gabe von FCCP (Carbonyl-Cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon, hier Gabe durch die TIP-2k Injektions-Pumpe, gekennzeichnet durch regelmäßige senkrechte rote Striche (P01 etc.)). Anschließend wurde Rotenon (Rot) und Antimycin A (Anti A) gegeben. Dies führt über Hemmung von Komplex I und III zu einem Sauerstoffverbrauch nahe Null.

4.7.1. Atmungsphasen und Atmungsquotienten

Aus dem Versuchsablauf konnten nun folgende Daten gewonnen werden ^{23, 23, 27, 29}.

Atmungsphasen (Respiratory states)	
C _r	(C = intakte Zellen, r = Routine) C _r stellt die endogene Atmung intakter Zellen unter nicht limitierenden pO ₂ Bedingungen (= <u>Routineatmung</u>) dar. Die erhaltene Größe entspricht dem zellzahlspezifischen Sauerstoffverbrauch und V _{max} aus den Versuchen zur Bestimmung der Sauerstoffaffinität. Gemessen wird die aerobe metabolische Aktivität der Zellen unter Routinebedingungen im verwendeten Kulturmedium.
C _{rO}	(C = intakte Zellen, r = Routine, O = Oligomycin) Bezeichnung der <u>durch die Gabe von Oligomycin inhibierten Atmung</u> . Diese erfolgt primär zur Kompensation des Protonenleaks nach Hemmung der ATP-Synthase. Indirekt ist dieser Wert damit ein Marker

	für die Dichtigkeit der inneren mitochondrialen Membran. Sie ist vergleichbar mit der sogenannten "state 4" Atmung, d. h. der Atmung unter gesättigter Substratkonzentration, aber ohne Zugabe von ADP.
C_{ru}	(C = intakte Zellen, r = Routine, u = uncoupled) Nach Entkopplung durch FCCP wird der maximale Sauerstoffverbrauch erreicht: Der Wert ist ein Marker für die <u>maximale Atmungskapazität entkoppelter Mitochondrien</u> in intakten Zellen. Er ist unabhängig von ADP aktivierter Atmung und wird bestimmt durch das Substratangebot und Funktion der einzelnen Atmungskettenkomplexe. Der hier gemessene Sauerstoffverbrauch ist vergleichbar mit der sogenannten "state 3" Atmung, d. h. Atmung mit gesättigter Substratkonzentration nach Zugabe von ADP zur maximalen Aktivierung der Atmungskette.
C_{ruRA}	<u>Durch Rotenon und Antimycin A inhibierte Atmung</u> nach Hemmung von Komplex I und III. Der verbleibende Sauerstoffverbrauch erfolgt durch andere zelluläre sauerstoffverbrauchende Prozesse wie z.B. Radikalbildung.

Tabelle 5: Atmungsphasen

Atmungsquotienten (Respiratory ratios)	
UCR' $= (C'_{ru}/C'_r)$; in % $= 1/(C'_r/C'_{ru})$ $= (C'_r/C'_{ru})$	<u>Entkoppelter Kontroll-Quotient</u> (in % = $1/UCR'$) Gibt die maximale Atmungskapazität im Verhältnis zur Ruheatmung wider. Damit besagt dieser Wert in Prozent, inwieweit die endogene Atmung im Vergleich zur maximal möglichen Kapazität aktiviert ist.
RCR' $= (C'_{ru}/C'_{ro})$; in % $= 1/(C'_{ro}/C'_{ru})$ $= (C'_{ru}/C'_{ro})$	<u>Respiratorischer Kontroll-Quotient</u> (in % = $1/RCR'$) Gibt an, wie viel Prozent der maximal möglichen Atmung zur Kompensation des Protonenleaks aufgebracht werden müssen. Dieser Wert ist ein Index für die Kopplung der Atmungskette.
RCR_p $= (C_r - C_{ro}) /$ $(C_{ru} - C_{ruRA})$	<u>Phosphorylierter respiratorischer Kontroll-Quotient</u> (in %) Gibt an, wie viel Prozent der Ruheatmung im Verhältnis zur maximalen Atmungskapazität für die ATP-Produktion verwendet werden.
x' = Werte korrigiert für C_{ruRA} , d.h. ohne sonstige sauerstoffverbrauchende Faktoren (automatische Berechnung bei Verwendung des O2k-DatLabAnalysis_TIP2k – Template aus Course on High-Resolution Respirometry, OROBOROS, Austria)	

Tabelle 6: Atmungsquotienten

4.8. REMISSIONS-SPEKTROPHOTOMETRIE

Die Methode der Remissions-Spektrophotometrie wurde in einem Versuchsaufbau kombiniert mit der Respirometrie angewendet (Abbildung 15). Mit Hilfe dieser Methode konnte der Redox-Status der Cytochrome innerhalb der mitochondrialen Atmungskette in Abhängigkeit vom pO_2 bestimmt werden. Dadurch wurde zum Einen eine von der Respirometrie unabhängige Information zur Aktivität der Atmungskette gewonnen, zum Anderen konnte die spezifische Regulation unterschiedlicher Cytochrome untersucht werden⁸². Da Cytochrome das Wellenlängenspektrum von Weißlicht auf seinem Weg durch das Gewebe verändern, indem sie Licht absorbieren, werden sie als Zellfarbstoffe (griechisch: *zyto* = Zelle; *chrôma* = Farbe) bezeichnet. Die Absorption der mitochondrialen Cytochrome wiederum ändert sich in Abhängigkeit des Redoxzustandes, d.h. durch Elektronenaufnahme oder -abgabe. Eine distale Inhibierung der Atmungskette, z. B. durch Hypoxie, verhindert die Abgabe von Elektronen, es kommt zur Reduktion der Cytochrome und zu einer Veränderung der Absorption. Das aus dem Gewebe remittierte Weißlicht ist dadurch im Vergleich zum eingestrahlten Weißlicht und im Vergleich zur Normoxie in seinem Wellenlängenspektrum verändert. Die Messung der Remissionsspektren erfolgte durch ein Spektrophotometer des Typs „CytoSPEC II“ (LEA Medizintechnik, Gießen). Dieses Gerät besteht aus zwei Komponenten: einer Temperatur- und Strom-regulierten Breitband-Lichtquelle (395 bis 670 nm); sowie einem temperaturgesteuerten Spektrophotometer mit asymmetrisch gekreuztem Czerny-Turner Design (Detektionsbereich 390 - 650 nm, Auflösung von 1,5 nm) zur Messung und Quantifizierung des Lichts⁸⁰. Die Messungen in Zellsuspensionen wurden mit integrierten Glasfaseroptiken des CytoSPEC II in der Messkammer des Oxygraph durchgeführt.



Abbildung 15: Versuchsaufbau für Remissions-Spektrophotometrie

Links im Bild das Spektrophotometer (LEA Medizintechnik, Gießen), rechts das Respirometer (Oxygraph, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich).

Das Licht wurde aus der Weißlichtquelle über ein Glasfaserkabel in die Messkammer geleitet, dort interagierte es mit den Zellen und wurde zurück zu den Glasfaserkabeln gestreut. Diese leiteten die empfangenen Signale in das Spektrophotometer, welches aus den für die verschiedenen Wellenlängen erhaltenen Daten Spektren errechnete

und diese am Monitor angezeigt (Abbildung 16). Die Spektren wurden im Abstand von 8 - 300 ms ermittelt, abhängig von den optischen Eigenschaften der zu messenden Zellsuspension, und über einen Zeitraum von mindestens 2 - 10 s gemittelt⁸⁰.

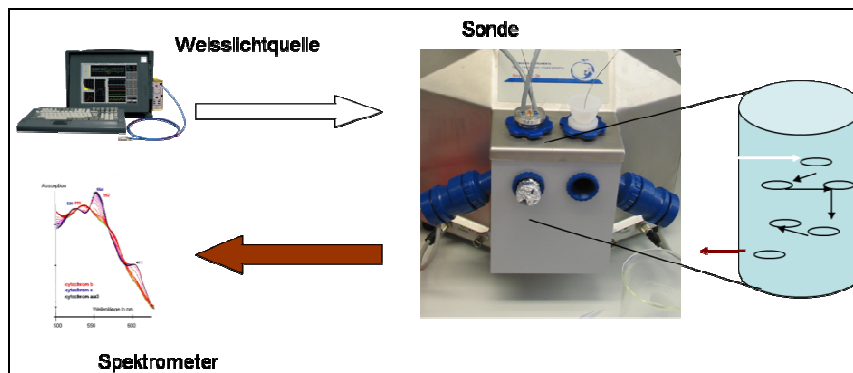


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der kombinierten Respirometrie und Remissions-Spektrophotometrie

Das Licht wird aus der Weißlichtquelle über die Sonde in die mit Zellsuspension gefüllte und verschlossene Kammer des Respirometers geleitet. Dort interagiert das Licht mit den Zellen und wird wiederum über die Sonde zurück ins Spektrophotometer geleitet. Dort werden die Spektren gemessen.

Quellen Bild O2C und Spektren: LEA Medizintechnik, Gießen, vgl.⁸⁰.

Die Berechnung und Darstellung der verschiedenen Spektren erfolgte durch die CytoSPEC II - Software. In Abbildung 17 dargestellt ist beispielhaft der zeitliche Verlauf der gemessenen Spektren im Übergang von Normoxie zu (durch die Mitochondrienatmung bedingte) Hypoxie in der Kammer. Die Spektren wurden mit einem Referenzspektrum, das unter Normoxie aufgenommen worden war, verglichen (= "Differenzspektren"). Ab einem bestimmten Grad der Hypoxie konnten Absorptionsveränderungen detektiert werden. Die Absorptionsmaxima konnten verschiedenen bekannten Absorptionsmaxima der einzelnen mitochondrialen Cytochrome zugeordnet werden. Die gewonnenen Spektren sind somit Summationsspektren von Einzelspektren der jeweiligen Cytochrome unter Reduktion. In dieser Arbeit besonders betrachtet wurden Cytochrom *aa3* (kurz Cytochrom *a*), Cytochrom *b_h* (kurz Cytochrom *b*) und Cytochrom *c*. Die dargestellten Diagramme stellen die bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessenen Intensitätswerte als Differenz zu unter Baselinebedingungen (Normoxie) gemessenen Intensitätswerten dar (= "Differenzspektren"). Die Normoxie in den Zellsuspensionen entspricht dem Sauerstoffpartialdruck nach Äquilibration mit Raumluft ($pO_2 \sim 130 \text{ mmHg}$ (17,3 kPa)). Alle angegebenen Gaskonzentrationen entsprechen Normaldruckwerten auf Meeresniveau.

Basierend auf den Differenzspektren wurden Änderungen im Redox-Status wie folgt ermittelt: Die Schwächung der Lichtintensität (Differenzspektrum) ist eine nicht-lineare

Funktion von Absorption und Streuung. Für kleine Absorptionsänderungen und ausreichende Schmalbandbetrachtungen kann näherungsweise das Lambert-Beer-Gesetz herangezogen werden: $A_{(\lambda)} \propto \ln(I_{0(\lambda)} / I_{s(\lambda)})$, $A_{(\lambda)} = \mu_{a(\lambda)} + \mu_{s(\lambda)}$ (λ : Wellenlänge, A : Lichtschwächung, I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes, I_s : Intensität des zurückgestrahlten Lichtes, $\mu_{a(\lambda)}$: Absorption, $\mu_{s(\lambda)}$: Streuung) vgl.⁸⁰. Entsprechend dieser Annäherung ist die Lichtschwächung linear abhängig von Absorption und Streuung. Das Vorhandensein einer linearen Beziehung zwischen Lichtschwächung und Absorption wurde bereits getestet. Bei den durchgeführten Versuchen konnte eine positive Korrelation der Differenzspektren von Cytochrom *c* mit der jeweiligen Konzentration von Cytochrom *c* in Zellsuspensionen dargestellt werden⁸². Das Absorptionsvermögen ist vom Farbgehalt und Redox-Status abhängig, die Streuung von der Partikelgröße und -menge. Bleiben die Konzentration der Cytochrome, sowie die Form und Anzahl der Streupartikel (v.a. Mitochondrien) konstant, so hängt die Absorption nur noch vom Redox-Status ab. Die ersten Marker können nicht vollständig kontrolliert werden, da Hypoxie-bedingte Formänderungen von Zellen und/oder Mitochondrien nicht ausgeschlossen werden können. Da Streuungseffekte wellenlängenabhängig sind, würden starke Änderungen der Streuung in diskrepanter Absorption in niedrigen sowie hohen Wellenlängen (415 - 460 nm beziehungsweise 500 - 620 nm) erfolgen^{80, 82, 101}. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit nur spektrale Messungen in die Analyse eingeschlossen, in denen unterschiedliche Berechnungen von niedrigen und hohen Wellenlängen die gleichen Ergebnisse zeigten. Der geringe Einfluss der Streuungseffekte in solch einem System wurde bereits durch Hollis et al.³⁵ beschrieben. Somit kann ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen dem Summationsspektrum und dem Redox-Status der einzelnen Cytochrome angenommen werden.

Um den Redox-Status der einzelnen Cytochrome aus dem Summationsspektrum quantifizieren zu können, wurden die durch die Breitband-Lichtquelle detektierten Summenspektren mithilfe der „Methode der kleinsten Quadrate“ (engl. method of least squares) ausgewertet. Dazu wird eine Funktion zur gewonnenen Datenpunktwolke gesucht, welche jeweils den kleinstmöglichen Abstand zu den einzelnen Datenpunkten hat. Damit konnten die bekannten Absorptionsspektren (= Referenzspektren) der jeweiligen Cytochrome den summierten Differenzspektren zugeordnet („gefittet“) werden⁸⁰ (TechPlot, SfteK, Braunschweig, Germany) (Abbildung 18).

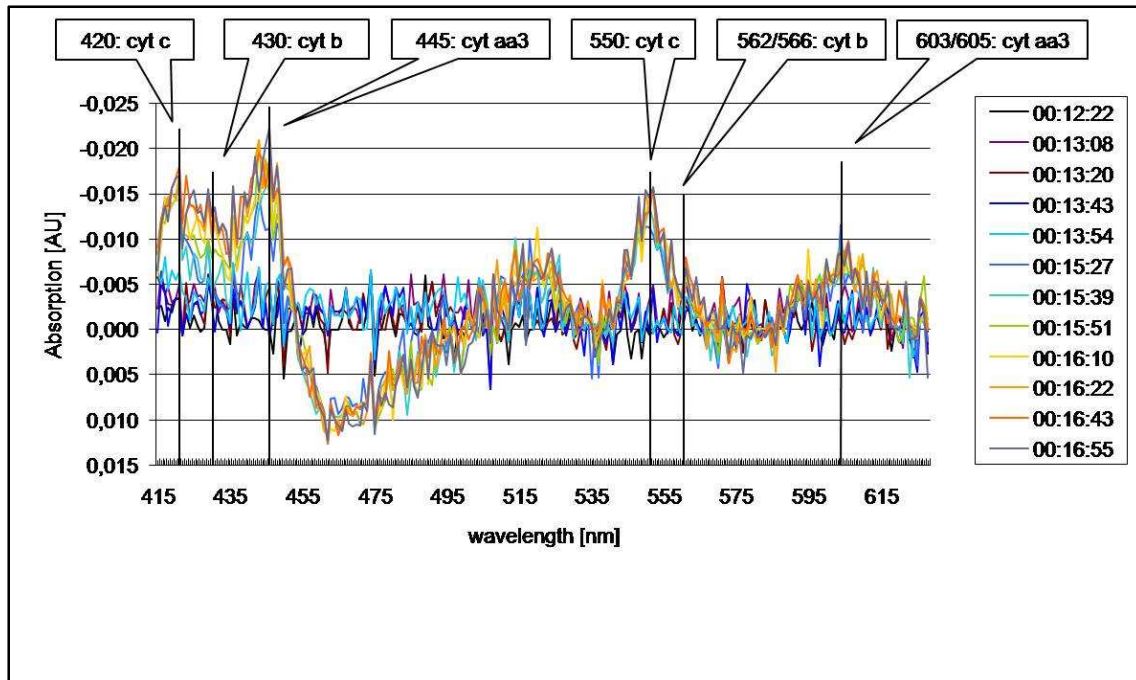


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf des Redox-Status der Cytochrome

Zeitlicher Verlauf der Spektren während der Reduktion der Cytochrome. Mit zunehmender Hypoxie zeigen die einzelnen Cytochrome Absorptionsmaxima (Zeit 0:15:27 – 0:16:55), welche über definierte Wellenlängen den jeweiligen Cytochromen zugeordnet werden konnten.
cyt: Cytochrom.

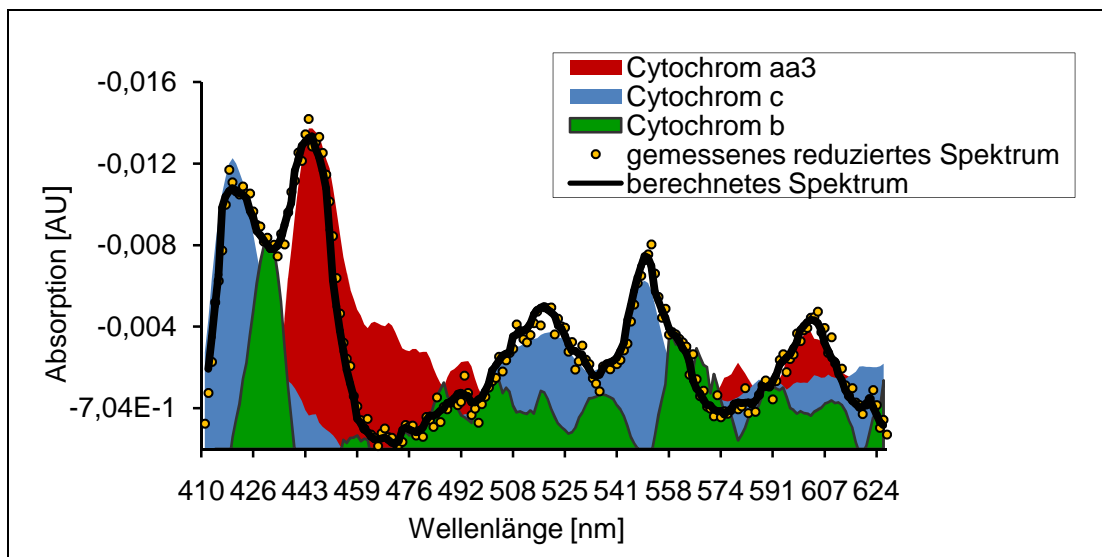


Abbildung 18: Berechnetes Summationsspektrum

Im Diagramm dargestellt sind die spezifischen Absorptionsspektren der einzelnen Cytochrome, sowie das gemessene reduzierte Summationsspektrum und das aus den Einzelspektren unter diesen Bedingungen berechnete Summationsspektrum aller Cytochrome.

Modifiziert nach ⁸².

4.9. AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER MITOCHONDRIALEN CITRAT-SYNTASE

Die Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität wurde als Marker für die Menge an Mitochondrien in normoxischen und hypoxischen Zellen durchgeführt. Das Versuchsprotokoll basiert auf dem Laborprotokoll von „OROBOROS Protocols“⁴². Das Prinzip des verwendeten Assays beruht auf einer Absorptionsänderung, welche durch den Farbumschlag des Inkubationsmediums angezeigt wird. Dabei ist die gemessene Absorptionsänderung proportional zur Enzymaktivität.

Die Citrat-Synthase (CS) katalysiert folgende Reaktion:

Acetyl-CoA + Oxalacetat + H₂O → Citrat + CoA-SH. Im Spektrophotometer läuft schließlich folgende irreversible Reaktion, geschwindigkeitslimitiert durch die verwendete Menge an CS, ab: *CoA-SH + DTNB → TNB + CoA-S-S-TNB*.

Das Reaktionsprodukt TNB (Trinitrobenzol) gilt als absorbierende Substanz mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm Wellenlänge und ist gelb. Bestimmt wurden die zu messenden Parameter an Zellproben, die bei der Versuchsvorbereitung für die Versuche zur Bestimmung der Zellatmung („Titrations-Versuche“, vgl. Kapitel 4.7) entnommen, sofort tiefgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

Zuerst erfolgte die Herstellung des Inkubationsmediums: Für 1000 µl Endvolumen benötigte man 770 µl Aqua dest, 100 µl 0,1 mM DTNB (Endkonzentration 0,1 mM), 25 µl 10 % Triton X-100 (Endkonzentration 0,25 %), 50 µl Oxalacetat (Endkonzentration 0,5 mM) und 25 µl Acetyl CoA (Endkonzentration 0,31 mM). Vom fertigen Inkubationsmedium wurden nun jeweils 50 µl zusammen mit 170 µl Aqua dest. in die Vertiefungen einer ELISA-Platte pipettiert. Die Vorbereitung des Citrat-Synthase Standards erfolgte durch die Mischung von 6 ml eines 0,1 M Tris-HCl-Puffers (2,4228 g Tris / 20 ml Aqua dest + 37 % HCl, pH 8,1) mit 1 µl Citrat-Synthase (CS). Die fertige Lösung wurde ebenso wie die CS und die Zellsuspensionen auf Eis gestellt. Die Messung der Zellsuspensionen erfolgte mit dem ELISA-Verfahren. Das Titrationsschema sah eine Standardreihe ohne CS sowie mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an CS vor. Zuerst wurde die CS-Standard-Reihe in aufsteigender Konzentration von 2,5 - 5 - 10 µl (bei höherer CS-Aktivität der Zellen mit 5 - 10 - 15 µl) der zuvor hergestellten CS-Lösung gemessen. Dazu wurde die zu messende Menge der CS-Lösung in die jeweiligen, schon mit Aqua (170 µl) und Inkubationsmedium (50 µl) vorbereiteten Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert. Es wurden von jeder Zellsuspension (CS-Standard und Zellsuspension) elf Messungen im Abstand von jeweils 30 s durchgeführt. Diese Zeitspanne wurde in Vorversuchen als optimale

Versuchsdauer ermittelt. Nach jeder Messung wurde die gemessene Absorption bei 412 nm Wellenlänge sowie die aktuelle Temperatur notiert. Nach Messung der Standardreihe wurden in die mit Inkubationslösung vorbereiteten Vertiefungen jeweils 30 µl Zellsuspension pipettiert und sofort gemessen (Abbildung 19). Dieser Schritt wurde mit jeder Zellsuspension zweimal wiederholt, sodass am Ende aus den Triplets Mittelwerte gebildet werden konnten. Messwerte sowie Temperatur wurden notiert.

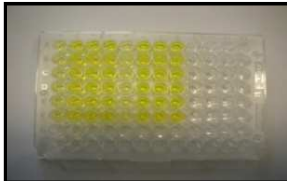


Abbildung 19: ELISA-Platte für das Citrat-Synthase Assay

ELISA-Platte nach Durchführung des Citrat-Synthase Assays. Durch die Reaktion der CS erfolgte der Farbumschlag von farblos nach gelb.

4.10. PROTEINBESTIMMUNG

Zur Standardisierung der Ergebnisse aus dem Citrat-Synthase Assay war die Bestimmung des Proteingehaltes der verwendeten Zellsuspensionen nötig. Aus diesem Grunde wurde mit Proben der gleichen Zellsuspension außerdem ein sogenanntes DC (detergent compatible) Protein Assay durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu mit dem Instruction Manual von BIO-RAD gearbeitet².

Die Messung erfolgte in Anlehnung an die Lowry-Methode zur Proteinbestimmung⁴⁷. Sie beruht auf einem Farbumschlag, an Hand dessen mit Hilfe des ELISA-Gerätes die Proteinbestimmung durchgeführt werden kann. Der erste Schritt der Reaktion besteht aus der Biuret-Reaktion. In alkalischer Lösung bildet sich ein Komplex zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen. Die Lösung färbt sich blau-violett. Im zweiten Schritt wird zweiwertiges Kupfer (Cu(II)) zu einwertigem Kupfer (Cu(I)) reduziert. Letzteres wiederum reduziert das Folin-Ciocalteu-Reagenz (gelb) zu Molybdänblau. Diese Blaufärbung wird verwendet, um mithilfe der Photometrie eine quantitative Proteinbestimmung durchführen zu können.

Die Zellsuspensionen wurden im Grundmedium (M 199 farblos + 0,2 M HEPES, 9:1) 1:10 verdünnt. Begonnen wurde mit der Standardreihe als Vergleichskonstante mit bekannten Proteinkonzentrationen. Dazu wurde die ELISA-Platte nach Anleitung wie folgt bestückt: Reihe A und B: Blank (Leerwert nur mit 2,5 µl Ripa-Puffer und 2,5 µl Medium), dann Standardlösungen mit den Konzentrationen 0,125 - 0,250 - 0,500 - 0,750 - 1,000 - 1,500 - 2,000 mg/ml (je 5 µl der Standardlösung, Fertigprodukt von BIO-RAD). In die folgenden Reihen wurde je 5 µl verdünnte Zellsuspension in Triplets

pipettiert. In jedes Well wurde anschließend je 25 µl vom Gemisch A' gegeben, einer Mischung aus 1 ml Reagenz A (alcaline copper tartrate, alkalische Kupfersalzlösung) + 20 µl Reagenz S (surfactant solution, hat die Aufgabe, die Detergentien zu lösen). Hinzu kamen jeweils 200 µl Reagenz B (dilute folin, verdünnte Folinlösung). Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Platte im ELISA Plate Reader bei 720 nm Wellenlänge gemessen.

4.11. INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

Zum Nachweis, dass es sich bei den verwendeten Zellen um PSMCs handelte, und zum Ausschluss anderer Zellarten, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Diese erfolgten mit Antikörpern (AK) gegen glattmuskuläres α -Aktin als geeigneten Marker zum Nachweis von glatten Muskelzellen und damit PSMCs⁷⁹, gegen von-Willebrand-Faktor (vWF) zum Ausschluss von Endothelzellen, gegen Cytokeratin zum Ausschluss von Epithelzellen, sowie gegen Collagen I zum Ausschluss von Fibroblasten. Hierzu wurde die Methode der indirekten Fluoreszenzfärbung verwendet²². Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass ein primärer Antikörper gegen das jeweils nachzuweisende Protein gerichtet ist. Zusätzlich wird ein zweiter, gegen den primären AK gerichteter sekundärer AK verwendet, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dieser Fluoreszenzfarbstoff besitzt die Eigenschaft, dass er nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge Licht einer ebenfalls spezifischen Wellenlänge emittiert⁵². Das Licht wird von einer Kamera detektiert und über eine Software als digitales Bild dargestellt. Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung des sekundären AK dienten ohne primären AK durchgeführte Kontrollfärbungen. Als positive Kontrolle, die als Nachweis für die prinzipielle Funktionsfähigkeit der Fluoreszenzfärbung diente, wurde ein Antikörper gegen Vimentin verwendet²². Vimentin kommt in allen Zellen mesodermaler Herkunft, und damit auch in PSMCs vor. Als sekundärer AK diente bei allen Färbungen ein FITC (fluorescein-isothiocyanate)-konjugierter AK, welcher sich im Bild grün darstellt. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde bei allen Färbungen die DAPI-Färbung verwendet, welche die Zellkerne blau färbt. Die einzelnen Bilder wurden anschließend mit der dazugehörenden Software überlagert, sodass auf dem Endbild sowohl die jeweilige AK-Färbung also auch die Zellkernfärbung sichtbar wurde.

Angefärbt wurden PSMCs der 1. Aussaat und 1. Passage (A1 P1).

Die PASMCs wurden direkt auf Objektträger in abnehmbaren Kammern (chamber slides) ausgesät, die zuvor für 4 Std mit einer 0,01 %-igen Kollagenlösung (Kollagen Typ I) beschichtet und anschließend mit steriler isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) gewaschen wurden. Pro Kammer wurden 1500 Zellen in 300 µl M 199 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät. Nach 2 - 3 Tagen bei etwa 70 % Konfluenz wurde mit der Färbung begonnen. Dazu wurden die Zellen dreimal mit DPBS + 0,1 % BSA gewaschen. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgte anschließend für 5 min mit einem -20 °C kalten Gemisch aus Aceton und Methanol im Verhältnis 1:1. Danach erfolgten fünf weitere Waschschrte mit 0,1 % BSA in DPBS (Waschpuffer aus 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,115 % Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,02 % KH₂PO₄, pH 7,4). Vor der Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 3 % BSA in DPBS für 15 - 30 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der mit Waschmedium verdünnte AK appliziert (Vimentin 1:150, SM-α-Aktin 1:450, Cytokeratin 1:50, vWF 1:500 und Collagen I 1:5) und für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde nur Waschpuffer ohne primären Antikörper verwendet. Danach wurde erneut fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Inkubation des 1:100 in Waschmedium verdünnten FITC konjugierten sekundären AK für 1 Std im Dunkeln bei Raumtemperatur. Als sekundärer AK wurde bei Vimentin, SM-α-Aktin und Cytokeratin ein AK goat anti-mouse und bei vWF und Collagen I ein AK goat anti-rabbit verwendet. Nach weiteren fünf Waschgängen mit Puffer erfolgte die Zellkernfärbung mit DAPI (1:5000 in 0,1 % BSA) für 5 min, wiederum bei Raumtemperatur und im Dunkeln⁵². DAPI bindet spezifisch an Adenin und Thymin in der Doppelstrang-DNA und bildet einen UV-Licht stabilen fluoreszierenden Komplex⁷². Nach Ablauf der 5 min wurde erneut fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Danach konnten die Kammern vom Objektträger entfernt und dieser mit 3 Tropfen Dako Fluorescent Mounting Medium eingedeckt werden, um das Fluoreszenzsignal zu verstärken. Anschließend wurde der Objektträger mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte im Dunkeln bei 4 °C. Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop und dem daran angeschlossenen Computer mit der Software Leica QWin (Wetzlar) innerhalb von 48 Std nach Antikörperinkubation beurteilt. Die Auswertung sollte aus Stabilitätsgründen trotz Lichtschutz möglichst frühzeitig erfolgen. Bei der Anregung des FITC-konjugierten sekundären AK wurde ein Filter der Bandbreite 450 - 490 nm (Filter I3L) verwendet, die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes mit einem Maximum bei 530 nm sowie die Digitalisierung erfolgte durch eine angeschlossene Kamera. Die maximale Anregungswellenlänge für DAPI liegt bei 359 nm (Filter AL, 340 - 380 nm) und das Maximum des Emissionsspektrums

bei 461 nm. Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte die Aufnahme aller Bilder bei gleicher Belichtungszeit und Verstärkung, wurde jedoch für jedes Bild einzeln optimiert. Die Fluoreszenzbilder der Kontrollfärbungen wurden mit gleicher Belichtungszeit und Verstärkung (Einstellungen) wie bei den Bildern der Primär-AK aufgenommen. Der FITC-konjugierte sekundäre AK wurde als grünes Signal detektiert, die Zellkerne der DAPI-Färbung als blaues. Die beiden korrespondierenden Bilder wurden anschließend zu einem neuen Bild überlagert. Eine quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzmethode ist grundsätzlich nicht möglich. Vgl. ²².

4.12. STATISTIK

Die in der Arbeit gezeigten Ergebnisse sind alle als Mittelwert \pm Standardfehler (engl. standard error of the mean, kurz: sem) dargestellt.

Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der Student t-Test verwendet. Bei voneinander abhängigen Messungen wurde der gepaarte t-Test angewendet.

Für den statistischen Vergleich von mehr als zwei Parametern wurde eine ANOVA durchgeführt. Beim Vergleich der hypoxischen Gruppen gegenüber der Normoxie-Kontrollgruppe wurde eine one-way-ANOVA mit Dunnet's *post hoc* test, und bei dem Vergleich aller Gruppen gegeneinander eine one-way-ANOVA mit Bonferroni's *post hoc* test durchgeführt.

Als Signifikanzniveaus wurden definiert:	$p \leq 0,05$	→	*
	$p \leq 0,01$	→	**
	$p \leq 0,001$	→	***

Die Anzahl der Versuche wird mit n angegeben.

5. ERGEBNISSE

5.1.CHARAKTERISIERUNG DER GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN

Zur Charakterisierung der PASMCs wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dabei diente die Färbung mit SM- α -Actin dem Nachweis von glatten Muskelzellen, die Färbung mit von-Willebrand-Faktor dem Ausschluss von Endothelzellen, die Färbung mit Cytokeratin dem Ausschluss von Epithelzellen und die Färbung mit Collagen I dem Ausschluss von Fibroblasten.

Bei der Färbung mit einem AK gegen glattmuskuläres α -Actin konnten glatte Muskelzellen auf dem Objektträger identifiziert werden (Abbildung 20). Zur genaueren Differenzierung von pulmonalarteriellen Zellen und Fibroblasten diente die anschließende Färbung mit Collagen I.

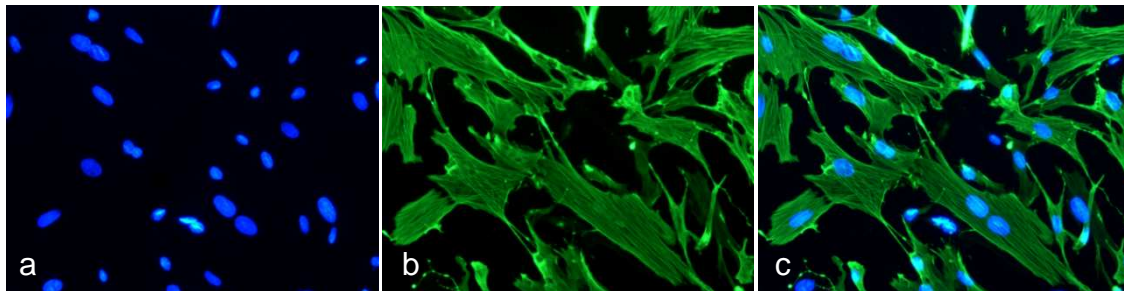


Abbildung 20: Färbung mit SM- α -Actin

a) Kernfärbung mit DAPI, Vergrößerung x 400. b) Färbung von Zellen mit SM- α -Actin, Vergrößerung x 400. c) Überlagerung der Bilder der Zellfärbung und der Kernfärbung, Vergrößerung x 400.

Es konnten keine Zellen mit einem Antikörper gegen den von-Willebrand-Faktor angefärbt werden (Abbildung 21a). Ebenso ließen sich bei der Färbung mit Antikörpern gegen Cytokeratin (Abbildung 21b) und Collagen I (Abbildung 21c) keine Zellen darstellen. Damit konnte ein Wachstum von Fibroblasten ausgeschlossen werden. Bei diesen Färbungen zeigten sich nur die mit DAPI blau markierten Zellkerne.

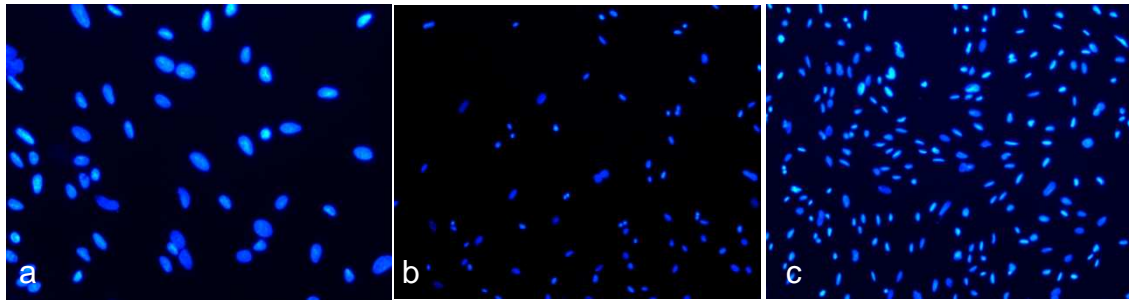


Abbildung 21: Färbung mit Antikörpern gegen a) von-Willebrand-Faktor, Vergrößerung x 400. b) Cytokeratin, Vergrößerung x 200 und c) Collagen I, Vergrößerung x 200. blau: Kernfärbung mit DAPI.

Die Färbung mit einem AK gegen Vimentin diente zur Bestätigung der Existenz von Zellen mesenchymaler Herkunft. Die kultivierten Zellen ließen sich mit Vimentin anfärben (Abbildung 22).

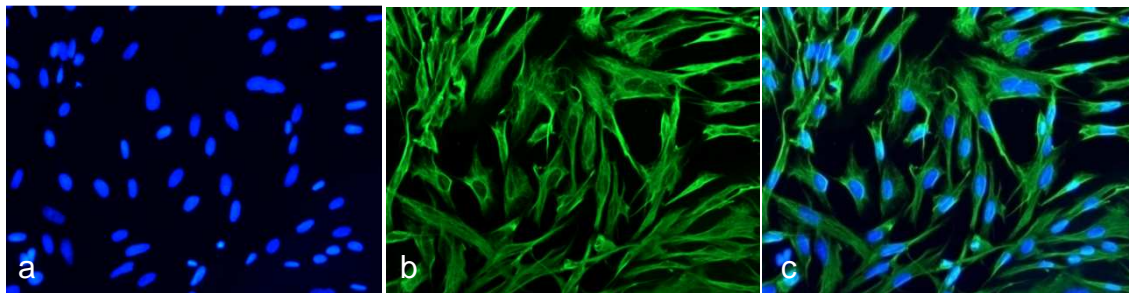


Abbildung 22: Färbung mit Vimentin als Positivkontrolle

a) Kernfärbung mit DAPI, Vergrößerung x 200. b) Färbung von Zellen mit einem Antikörper gegen Vimentin, Vergrößerung x 200. c) Überlagerung der Bilder der Zellfärbung und der Kernfärbung, Vergrößerung x 200.

Bei den Kontrollfärbungen zeigte sich bei keinem der sekundären Antikörper eine spezifische Färbung des Zytoplasmas (Abbildung 23).

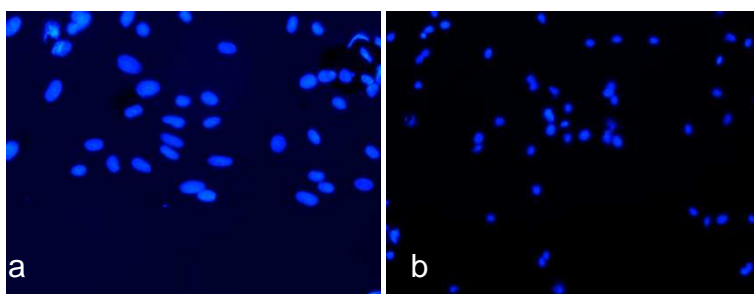


Abbildung 23: Färbung ohne Primärantikörper als Kontrollfärbungen

a) Kontrollfärbung des goat anti-mouse-Antikörpers nach Überlagerung mit der DAPI-Färbung, Vergrößerung x 200. b) Kontrollfärbung des goat anti-rabbit-Antikörpers nach Überlagerung mit der DAPI-Färbung, Vergrößerung x 200. blau: Kernfärbung mit DAPI.

5.2. EINFLUSS DER ZELLKULTURBEDINGUNGEN AUF DIE MITOCHONDRIALE ATMUNG IN PASMCS

5.2.1. Einfluss des Zellalters

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde der Einfluss der Zellkulturbedingungen und der Versuchsdauer auf die mitochondriale Atmung untersucht. Dazu wurde die mitochondriale Atmung von Zellen unterschiedlicher Aussaat und Passage, sowie bei unterschiedlicher Abatmungshäufigkeit (= Transition, T) verglichen. Zu diesem Zweck wurden folgende Gruppen gebildet: A1P1, A1P2; A2P1, A2P2; sowie die Untergruppen T1 und T2 (A1: 1. Aussaat, A2: 2. Aussaat, P1: 1. Passage, P2: 2. Passage, T1: 1. Transition, T2: 2. Transition, A1P1 bezeichnet damit eine Zellprobe der 1. Aussaat und 1. Passage, Rest analog).

Anhand der gewonnenen und hier dargestellten Daten konnte gezeigt werden, dass es bei normoxisch inkubierten und mit 10 % FCS behandelten PASMCS keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen hinsichtlich unterschiedlicher Aussaat, Passage oder Transition gibt (Abbildung 24, Abbildung 25). Die gezeigten Ergebnisse gelten sowohl für die Sauerstoffaffinität (p_{50} -Wert), als auch für den zellzahlkorrigierten maximalen endogenen Sauerstoffverbrauch (V_{max}). Zellalter oder Versuchsdauer (widergespiegelt durch Zahl der Abatmungen) spielten damit im hier beschriebenen Versuchsaufbau eine untergeordnete Rolle. Diese Ergebnisse wurde für die folgenden Versuche genutzt, um Zellen der 1. und 2. Passage sowie der 1. und 2. Aussaat zusammenzufassen. In allen Versuchen wurde allerdings in den verschiedenen Gruppen auf ein homogenes Mischungsverhältnis hinsichtlich des Zellalters geachtet.

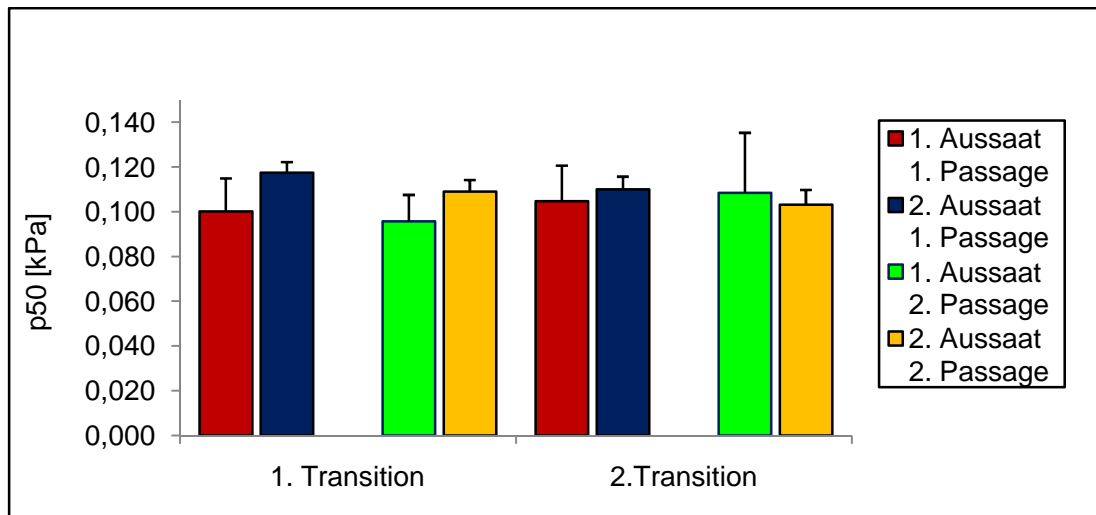


Abbildung 24: p50 normoxisch inkubierter serumreicher PSMCs, Vergleich von Aussaat, Passage und Transition

Es konnte kein signifikanter Unterschied für die Sauerstoffaffinität der Zellen unterschiedlicher Aussaat, unterschiedlicher Passage oder unterschiedlicher Abatmungshäufigkeit nachgewiesen werden.

A1P1T1: n = 5; A1P1T2: n = 5; A1P2T1: n = 5; A1P2T2: n = 5; A2P1T1: n = 4; A2P1T2: n = 3; A2P2T1: n = 4; A2P2T2: n = 3.

p50: Sauerstoffaffinität, A1: 1. Aussaat, A2: 2. Aussaat, P1: 1. Passage, P2: 2. Passage, T1: 1. Transition, T2: 2. Transition.

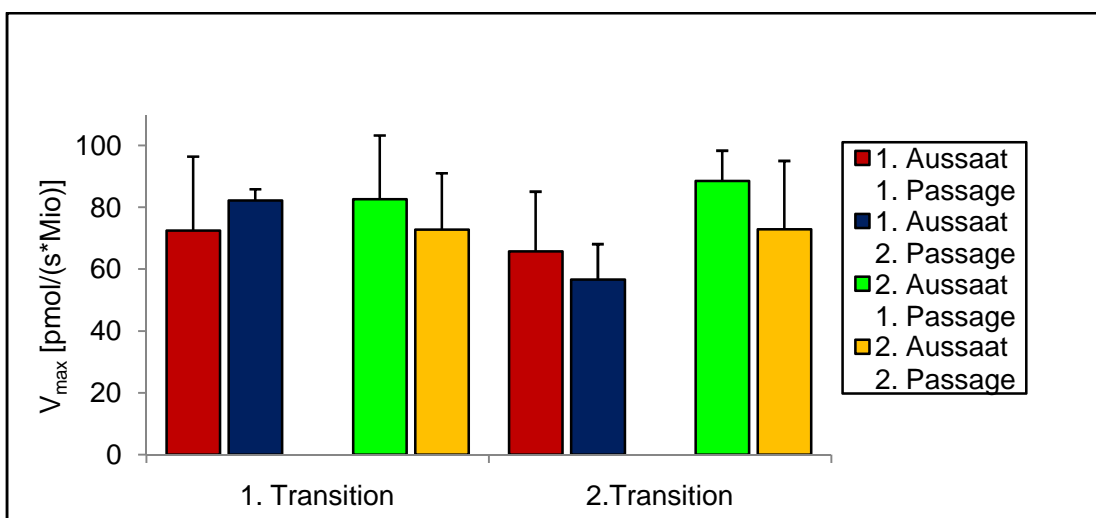


Abbildung 25: V_{max} normoxisch inkubierter serumreicher PSMCs, Vergleich von Aussaat, Passage und Transition

Es konnte kein signifikanter Unterschied für den maximalen Sauerstoffverbrauch in der 1. oder 2. Aussaat oder Passage und damit durch längere Zellkulturdauer detektiert werden. Ebenso wenig konnte eine Veränderung durch unterschiedliche Abatmungshäufigkeiten gesehen werden.

A1P1T1: n = 5; A1P1T2: n = 5; A1P2T1: n = 5; A1P2T2: n = 5; A2P1T1: n = 4; A2P1T2: n = 3; A2P2T1: n = 4; A2P2T2: n = 3.

V_{max}: maximaler Sauerstoffverbrauch, A1: 1. Aussaat, A2: 2. Aussaat, P1: 1. Passage, P2: 2. Passage, T1: 1. Transition, T2: 2. Transition.

5.2.2. Einfluss des Wachstumsfaktorengehaltes

Der Wachstumsfaktorengehalt im Medium stellt konzentrationsabhängig einen (Proliferations-) Stimulus für die Zellen dar. Es wurde daher untersucht, ob er auch einen Einfluss auf die mitochondriale Atmung hat. Eine Gruppe Zellen wurden dazu jeweils 24 Std vor Beginn der respirometrischen Messungen mit einem serumarmen Kulturmedium, bestehend aus M 199 + 1 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt. Die andere Gruppe der Zellkultur wurde mit 10 % FCS (serumreich) beibehalten.

Im Vergleich von serumarmen und serumreichen Zellen fand sich in der 2. Abatmung ein signifikanter Unterschied im $p50$, wobei serumarme Zellen einen niedrigeren $p50$ und damit eine höhere Sauerstoffaffinität aufwiesen (T2 serumreich $p50$: $0,103 \pm 0,004$ kPa vs. T2 serumarm $p50$: $0,068 \pm 0,009$ kPa, $p \leq 0,01$) (Abbildung 26).

Bei Betrachtung des maximalen Sauerstoffverbrauchs zeigte sich während der 1. und 2. Abatmung eine statistisch signifikant niedrigere maximale Atmung in serumarmen Zellen im Vgl. zu serumreichen Zellen: (T1 serumreich V_{max} : $87,2 \pm 8,8$ pmol/(s*Mio) vs. T1 serumarm V_{max} : $47,8 \pm 13,6$ pmol/(s*Mio), $p \leq 0,05$ und T2 serumreich V_{max} : $80,8 \pm 10,1$ pmol/(s*Mio) vs. T2 serumarm V_{max} : $34,6 \pm 13,0$ pmol/(s*Mio), $p \leq 0,05$). In beiden Abatmungen war die maximal erreichte Atmung in serumarmen Zellen signifikant geringer (Abbildung 27).

Zusätzlich zeigte sich in serumarmen Zellen für die Sauerstoffaffinität ein signifikanter Unterschied zwischen der 1. und 2. Transition: (serumarm T1 $p50$: $0,088 \pm 0,004$ kPa vs. serumarm T2 $p50$: $0,068 \pm 0,009$ kPa, $p \leq 0,05$) (Abbildung 26).

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurden für die weiteren Versuche serumreiche Zellen aus Passage 1 und 2 sowie Aussaat 1 und 2 verwendet.

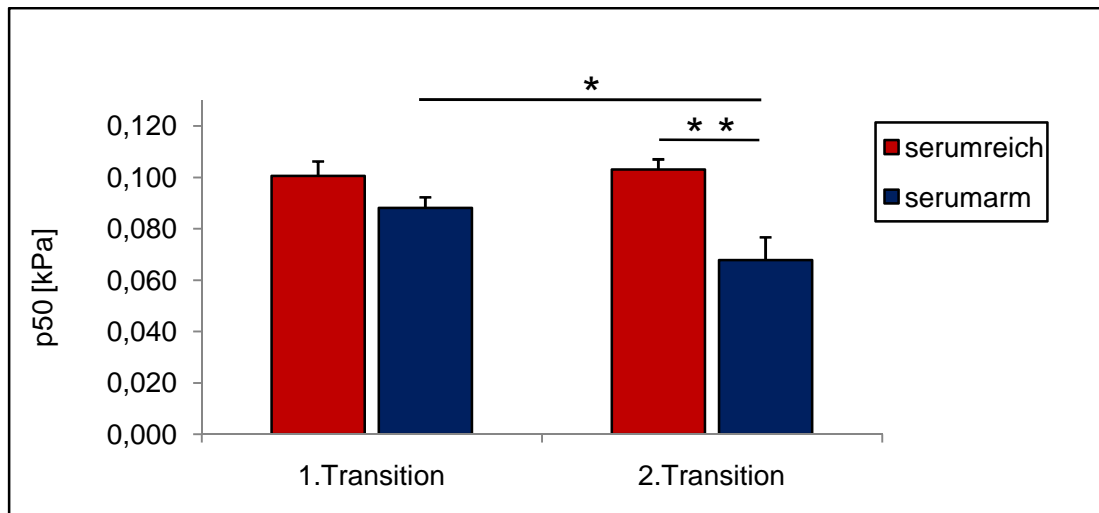


Abbildung 26: p50 normoxisch inkubierter PSMCs, Vergleich von serumreichen und serumarmen Zellen

Serumarme PSMCs zeigten in der 2. Abatmung einen signifikant niedrigeren p50 und damit eine höhere Sauerstoffaffinität als serumreiche PSMCs. In der 2. Abatmung zeigten serumarme PSMCs einen signifikant niedrigeren Wert für p50 im Vergleich zur 1. Abatmung. Serumreich T1: n = 11; serumreich T2: n = 8; serumarm T1: n = 7; serumarm T2: n = 4. p50: Sauerstoffaffinität, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), T1: 1. Transition, T2: 2. Transition.

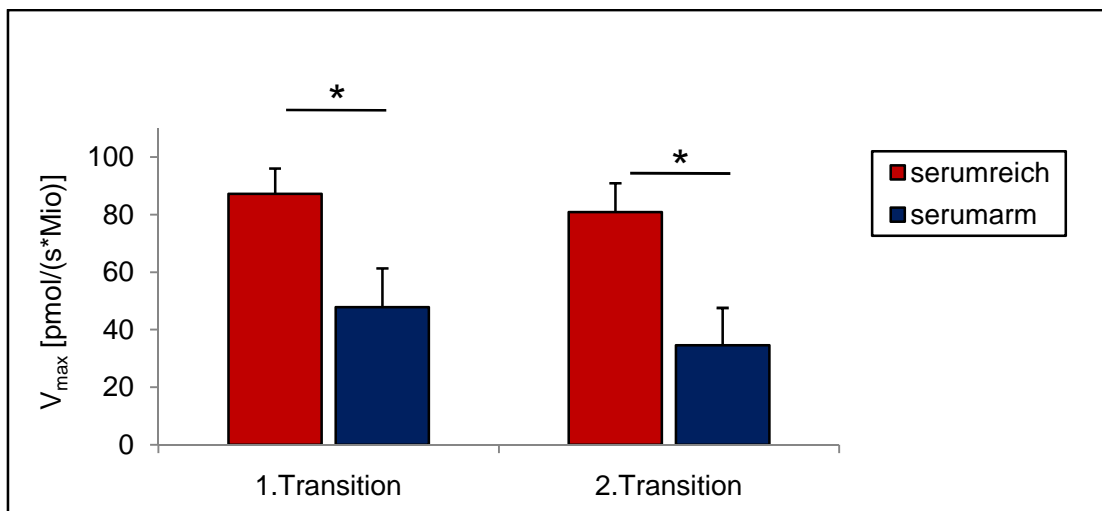


Abbildung 27: V_{max} normoxisch inkubierter PSMCs, Vergleich von serumreichen und serumarmen Zellen

Serumarme PSMCs zeigten in beiden Abatmungen einen signifikant niedrigeren maximalen Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu serumreichen PSMCs. Serumreich T1: n = 11; serumreich T2: n = 8; serumarm T1: n = 7; serumarm T2: n = 4. V_{max}: maximaler Sauerstoffverbrauch, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), T1: 1. Transition, T2: 2. Transition.

5.2.3. Einfluss von Endothelin

Um zu prüfen, ob die Sauerstoffaffinität oder der maximale Sauerstoffverbrauch von Endothelin-1 beeinflusst werden, wurde zu Versuchsbeginn den normoxisch inkubierten und mit 10 % FCS kultivierten PASMCs Endothelin-1 (kurz Et-1) zugesetzt. Die Endkonzentration in der Kammer betrug 10 nM.

Bei Betrachtung der Sauerstoffaffinität der Versuche ohne Endothelin-1 gab es im Vergleich zu Versuchen mit Endothelin-1 keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 28).

Bezüglich der maximalen Atmung zeigte sich in der 2. Abatmung ein signifikanter Unterschied zwischen mit Endothelin-1 versetzten Zellen und Zellen ohne Endothelin-1: (T2 Normoxie Et-1 V_{\max} : $47,0 \pm 11,5$ pmol/(s*Mio) vs. T2 Normoxie ohne Et-1 V_{\max} : $94,2 \pm 12,8$ pmol/(s*Mio), $p \leq 0,05$) (Abbildung 29). Der maximale Sauerstoffverbrauch nahm dabei durch die Zugabe von Et-1 signifikant ab.

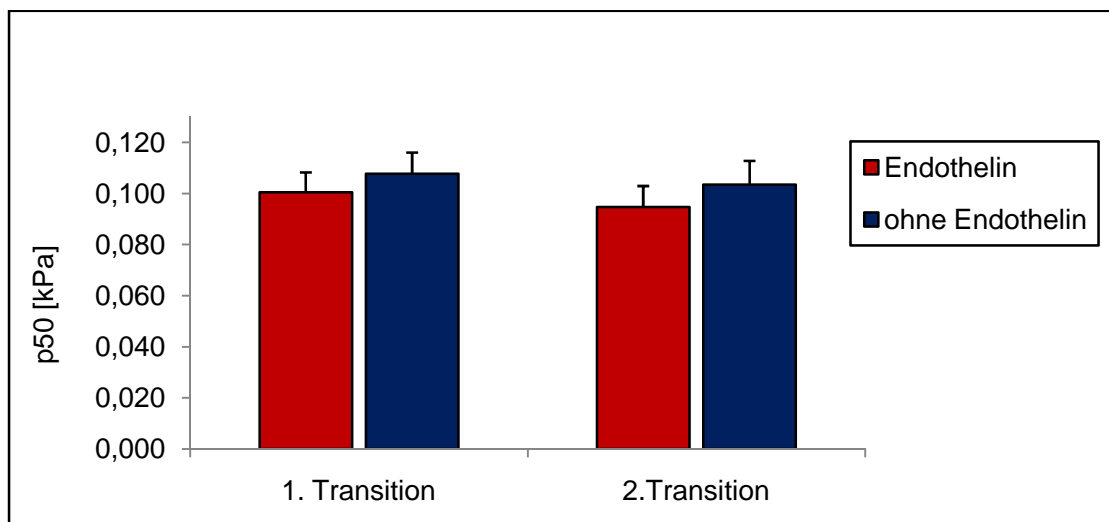


Abbildung 28: p50 normoxisch inkubierter PASMCs, Effekt von Endothelin-1

Endothelin-1 (Endkonzentration in der Kammer von 10 nM) hatte keinen Einfluss auf die Sauerstoffaffinität von PASMCs.

Endothelin: $n = 4$, ohne Endothelin: $n = 4$.

p50: Sauerstoffaffinität, PASMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n).

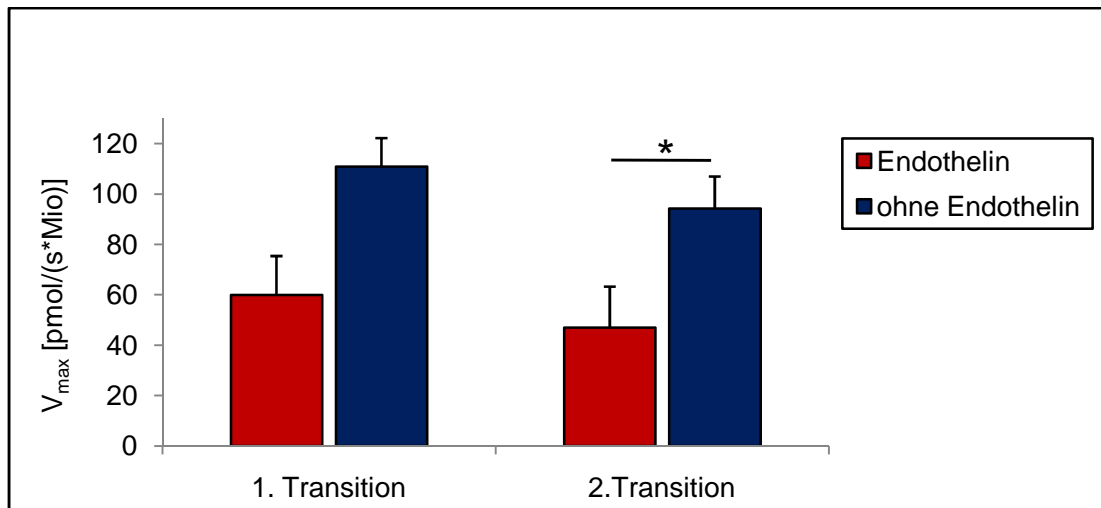


Abbildung 29: V_{\max} normoxisch inkubierter PSMCs, Effekt von Endothelin-1

Endothelin-1 (Endkonzentration in der Kammer 10 nM) führte in der 2. Abatmung zu einem signifikant niedrigeren maximalen Sauerstoffverbrauch in PSMCs.

Endothelin: $n = 4$, ohne Endothelin: $n = 4$.

V_{\max} : maximaler Sauerstoffverbrauch, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n).

5.3. SAUERSTOFFAFFINITÄT UND ZELLATMUNG UNTER CHRONISCHER HYPOXIE

5.3.1. Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen

5.3.1.1. PSMCs nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation

Um zu untersuchen, ob PSMCs messbare Differenzen in Bezug auf Sauerstoffaffinität ($p50$) oder maximalen Sauerstoffverbrauch (V_{\max}) nach Inkubation in chronischer Hypoxie zeigen, wurden die Zellen vor Versuchsbeginn hypoxisch inkubiert.

Die PSMCs wurden dazu in zwei Gruppen eingeteilt:

Die eine Hälfte der Zellen wurde 24 Std in der Hypoxiekammer bei 1 % O_2 inkubiert. Die andere Hälfte wurde als Vergleichsgruppe über den gleichen Zeitraum normoxisch inkubiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich der $p50$ -Wert der 24 Std hypoxisch inkubierten Zellen im Vergleich zu normoxisch inkubierten Zellen nicht signifikant unterschied und damit die Sauerstoffaffinität nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation der Zellen unverändert blieb (Abbildung 30).

Die maximale Atmung war in beiden Abatmungen in hypoxisch inkubierten Zellen im Vergleich zu normoxisch inkubierten Zellen signifikant erniedrigt: (T1 Normoxie V_{\max} :

$87,2 \pm 8,8$ pmol/(s*Mio) vs. T1 Hypoxie V_{\max} : $54,1 \pm 6,2$ pmol/(s*Mio), $p \leq 0,01$ und T2 Normoxie V_{\max} : $80,8 \pm 10,1$ pmol/(s*Mio) vs. T2 Hypoxie V_{\max} : $48,6 \pm 5,4$ pmol/(s*Mio), $p \leq 0,01$) (Abbildung 31).

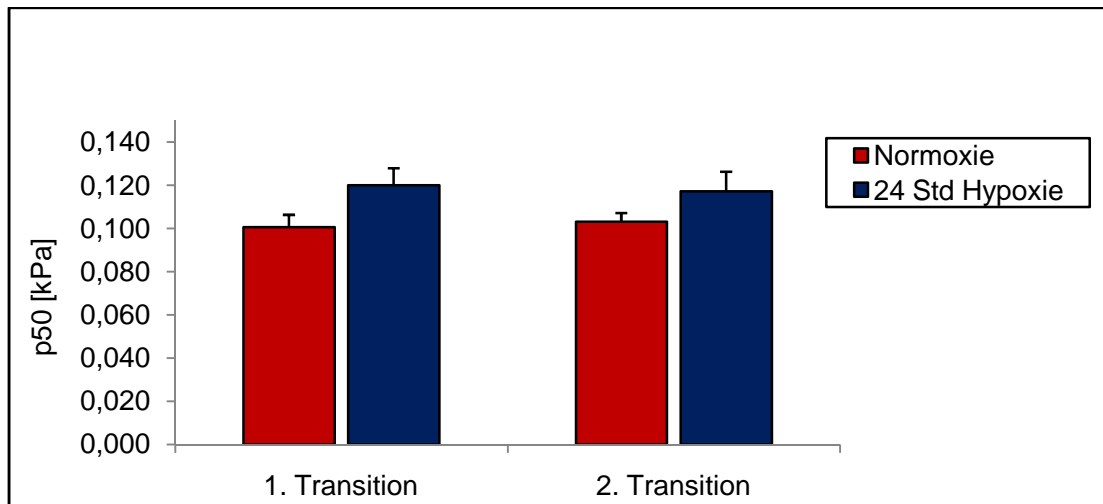


Abbildung 30: p50 serumreicher PASMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied und damit keine Änderung der Sauerstoffaffinität durch 24-stündige hypoxische Inkubation serumreicher PASMCs.

Normoxie T1: n = 11; Normoxie T2: n = 9; Hypoxie T1: n = 10; Hypoxie T2: n = 10.

p50: Sauerstoffaffinität, PASMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), T1: 1. Transition, T2: 2. Transition, Std: Stunde(n).

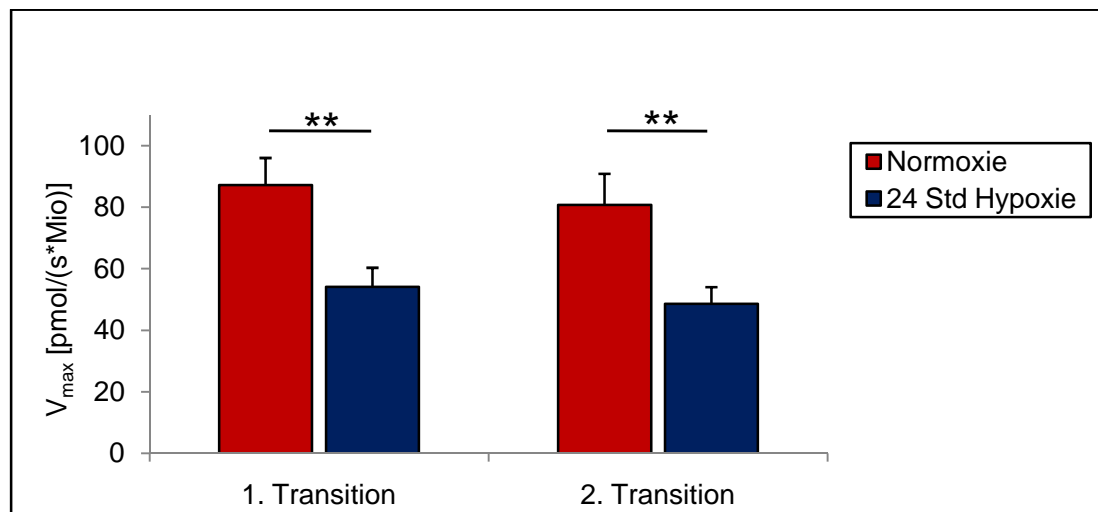


Abbildung 31: V_{\max} serumreicher PASMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie

In beiden Abatmungen wurde der maximale Sauerstoffverbrauch nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation der PASMCs signifikant kleiner.

Normoxie T1: n = 11; Normoxie T2: n = 9; Hypoxie T1: n = 10; Hypoxie T2: n = 10.

V_{\max} : maximaler Sauerstoffverbrauch, PASMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), T1: 1. Transition, T2: 2. Transition, Std: Stunde(n).

5.3.1.1.1. Einfluss des Wachstumsfaktorgehaltes in chronischer Hypoxie

Aufgrund der unterschiedlichen $p50$ und V_{max} Werte der normoxisch inkubierten serumarmen oder serumreichen Zellen wurde die Versuchsreihe mit den 24 Std hypoxisch inkubierten Zellen ebenfalls mit serumarmen Zellen durchgeführt. Dazu erfolgte 24 Std vor Beginn der hypoxischen Inkubation ein Mediumwechsel zu 1 % FCS im Kulturmedium. In den normoxisch inkubierten Vergleichszellen wurde der FCS-Gehalt zur gleichen Zeit ebenfalls auf 1 % gesenkt, diese blieben weiterhin im normoxischen Inkubator.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der serumarmen hypoxisch oder normoxisch inkubierten Zellen in Bezug auf die Sauerstoffaffinität (Abbildung 32).

V_{max} war in der ersten Abatmung signifikant niedriger in 24 Stunden hypoxisch inkubierten serumarmen Zellen im Vergleich zu normoxisch inkubierten serumarmen Zellen (T1 Normoxie V_{max} : $55,9 \pm 15,3$ pmol/(s*Mio) vs. T1 Hypoxie V_{max} : $38,3 \pm 12,9$ pmol/(s*Mio), $p \leq 0,05$) (Abbildung 33).

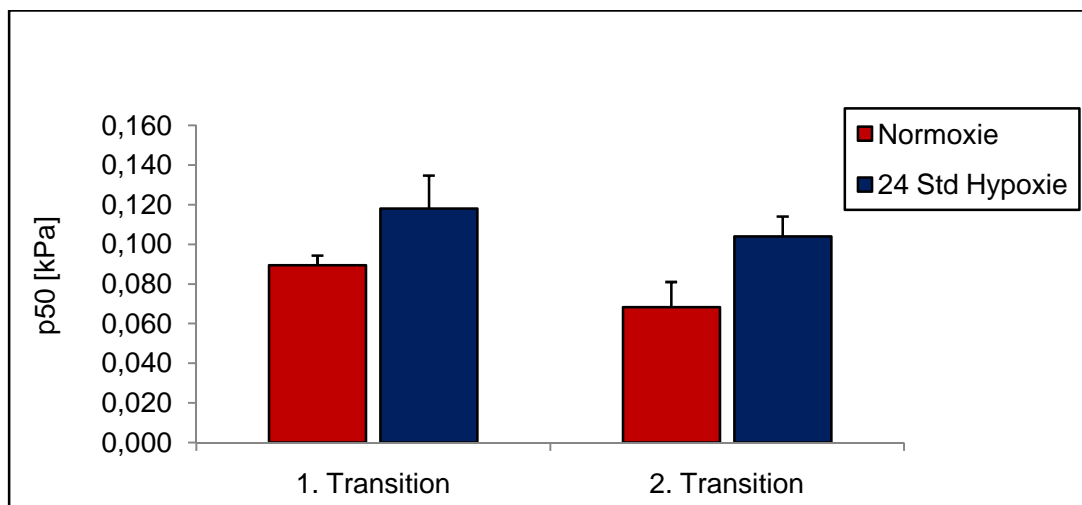


Abbildung 32: $p50$ serumarmer PASMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen normoxisch und 24 Stunden hypoxisch inkubierten serumarmen PASMCs gefunden werden.

Normoxie T1: $n = 5$; Normoxie T2: $n = 4$; Hypoxie T1: $n = 5$; Hypoxie T2: $n = 4$.

$p50$: Sauerstoffaffinität, PASMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), T1: 1. Transition, T2: 2. Transition, Std: Stunde(n).

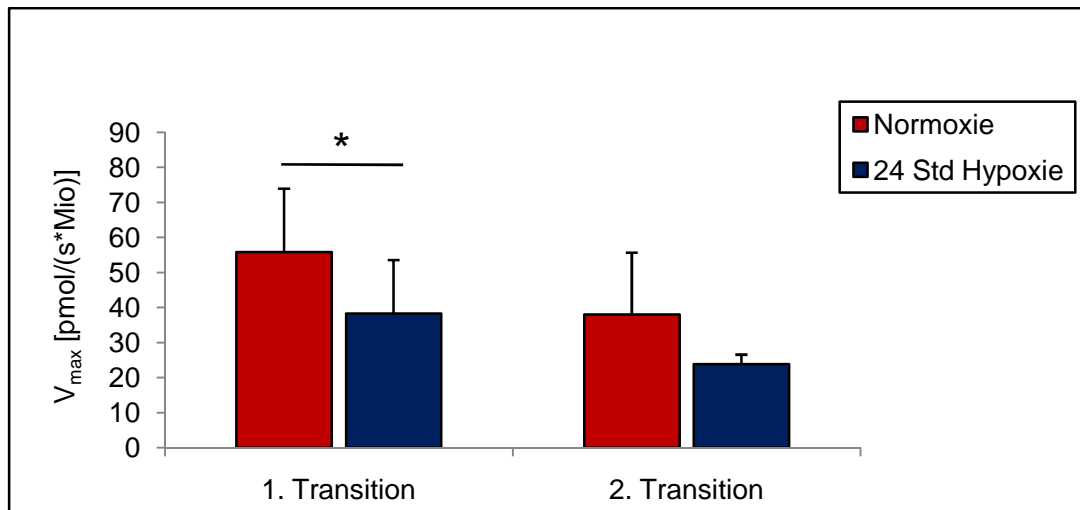


Abbildung 33: V_{\max} serumarmer PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie

In der ersten Abatmung konnte eine signifikant geringere maximale Atmung nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation gemessen werden.

Normoxie T1: n = 5; Normoxie T2: n = 4; Hypoxie T1: n = 5; Hypoxie T2: n = 4.

V_{\max} : maximaler Sauerstoffverbrauch, T1: 1. Transition, T2: 2. Transition, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

5.3.1.2. PSMCs nach 48-stündiger hypoxischer Inkubation

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, wie sich eine 48-stündige Inkubation von PSMCs in 1% O_2 auswirkt.

Die Sauerstoffaffinität der 48 Std hypoxisch inkubierten Zellen nahm im Vergleich mit den normoxisch inkubierten signifikant ab: (Normoxie T1 p50: $0,101 \pm 0,006$ kPa vs. 48 Std Hypoxie T1 p50: $0,162 \pm 0,112$ kPa, $p \leq 0,001$ und Normoxie T2 p50: $0,103 \pm 0,004$ kPa vs. 48 Std Hypoxie T2 p50: $0,155 \pm 0,015$ kPa, $p \leq 0,01$). Auch gegenüber 24 Stunden hypoxisch inkubierten Zellen nahm die Sauerstoffaffinität signifikant ab: (24 Std Hypoxie T1 p50: $0,120 \pm 0,008$ kPa vs. 48 Std Hypoxie T1 p50: $0,162 \pm 0,012$ kPa, $p \leq 0,01$ und 24 Std Hypoxie T2 p50: $0,117 \pm 0,009$ kPa vs. 48 Std Hypoxie T2 p50: $0,155 \pm 0,015$ kPa, $p \leq 0,05$). Diese Veränderungen zeigten sich bei beiden Abatmungen (Abbildung 34).

Beim Vergleich des maximalen Sauerstoffverbrauchs zwischen normoxisch inkubierten und 48 Stunden hypoxisch inkubierten PSMCs konnte in beiden Abatmungen eine signifikante Verringerung festgestellt werden (T1 Normoxie V_{\max} : $87,2 \pm 8,8$ pmol/(s*Mio) vs. T1 48 Std Hypoxie V_{\max} : $39,7 \pm 2,6$ pmol/(s*Mio), $p \leq 0,001$ und T2 Normoxie V_{\max} : $80,8 \pm 10,1$ pmol/(s*Mio) vs. T2 48 Std Hypoxie V_{\max} : $36,2 \pm 2,4$ pmol/(s*Mio), $p \leq 0,01$). Im Vergleich 24 und 48 Stunden hypoxischer Inkubation ergab sich keine signifikante Veränderung im maximalen Sauerstoffverbrauch (Abbildung 35).

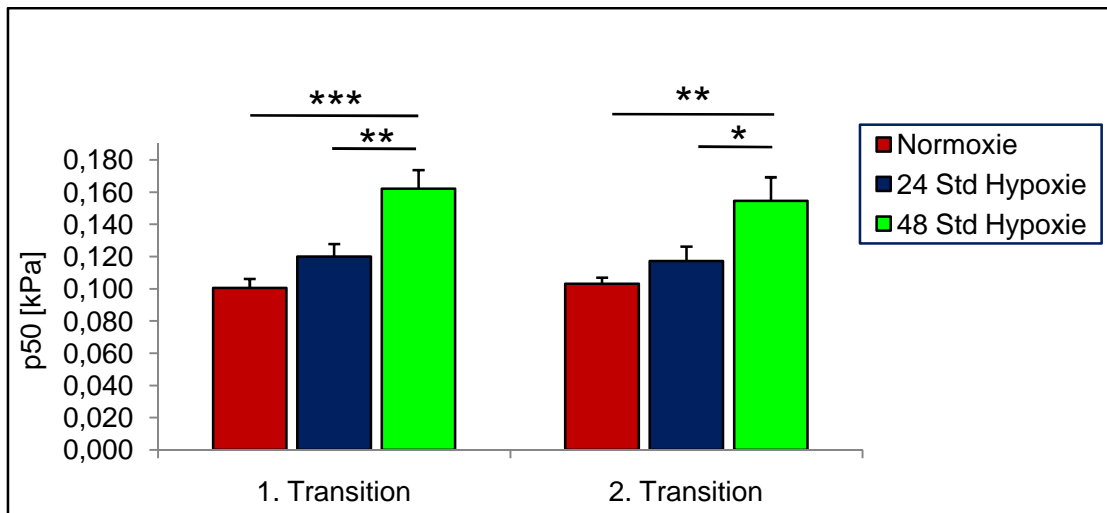


Abbildung 34: p50 serumreicher PSMCs, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie

Nach 48 Std hypoxischer Inkubation mit 10 % FCS nahm die Sauerstoffaffinität im Vergleich zur normoxischen Inkubation in beiden Abatmungen signifikant ab und damit der p50-Wert signifikant zu.

Im Vergleich 24 und 48 Stunden hypoxischer Inkubation zeigte sich ebenfalls in beiden Abatmungen eine signifikante Zunahme des p50 mit Zunahme der Hypoxiedauer.

Normoxie T1: n = 11; Normoxie T2: n = 9; 24 Std Hypoxie T1: n = 10; 24 Std Hypoxie T2: n = 10; 48 Std Hypoxie T1: n = 6; 48 Std Hypoxie T2: n = 6.

Normoxie und 24 Std Hypoxie = Daten aus Abbildung 30.

p50: Sauerstoffaffinität, T1: 1. Transition, T2: 2. Transition, PASM(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), FCS: Wachstumsfaktoren, Std: Stunde(n).

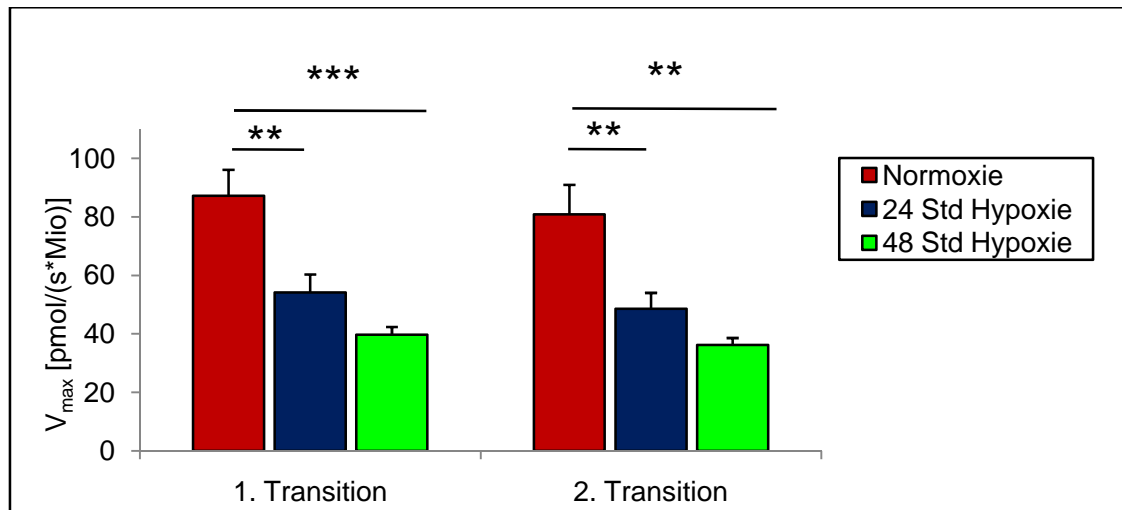


Abbildung 35: V_{\max} serumreicher PSMCs, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie

Mit zunehmender Dauer der hypoxischen Inkubation mit 10 % FCS verringerte sich der maximale Sauerstoffverbrauch in beiden Abatmungen nach 24 und 48 Stunden jeweils signifikant im Vergleich zur normoxischen Inkubation.

Im Vergleich von 24 Std und 48 Std hypoxischer Inkubation zeigte sich in beiden Abatmungen kein signifikanter Unterschied.

Normoxie T1: n = 11; Normoxie T2: n = 9; 24 Std Hypoxie T1: n = 10; 24 Std Hypoxie T2: n = 10; 48 Std Hypoxie T1: n = 6; 48 Std Hypoxie T2: n = 6.

Normoxie und 24 Std Hypoxie = Daten aus Abbildung 31.

V_{\max} : maximaler Sauerstoffverbrauch, T1: 1. Transition, T2: 2. Transition, PASM(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), FCS: Wachstumsfaktoren, Std: Stunde(n).

5.3.2. Aortale glatte Muskelzellen

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen unter Hypoxie hinsichtlich Sauerstoffaffinität und maximalem Sauerstoffverbrauch spezifisch für pulmonalarterielle SMCs sind, wurde eine weitere Versuchsreihe mit aortalen SMCs (ASMCs), die 24 Stunden hypoxisch inkubiert wurden, durchgeführt. Diese Versuchsreihe erfolgte unter Verwendung von serumreichen Zellen (10 % FCS).

5.3.2.1. ASMCs nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation

Im Vergleich normoxisch und hypoxisch (24 Std, 1 % O₂) inkubierter aortaler Zellen zeigte sich in beiden Abatmungen eine signifikante Abnahme der Sauerstoffaffinität in hypoxischen Zellen: (T1 Normoxie p₅₀: 0,106 ± 0,009 kPa vs. T1 Hypoxie p₅₀: 0,165 ± 0,015 kPa, p ≤ 0,01 und T2 Normoxie p₅₀: 0,109 ± 0,0012 kPa vs. T2 Hypoxie p₅₀: 0,160 ± 0,014 kPa, p ≤ 0,05) (Abbildung 36).

Hinsichtlich des maximalen Sauerstoffverbrauchs konnten in beiden Abatmungen signifikant niedrigere Werte in ASMCs nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation gemessen werden: (T1 Normoxie V_{max}: 67,6 ± 13,9 pmol/(s*Mio) vs. T1 Hypoxie V_{max}: 40,6 ± 8,6 pmol/(s*Mio), p ≤ 0,05 und T2 Normoxie V_{max}: 56,3 ± 12,0 pmol/(s*Mio) vs. T2 Hypoxie V_{max}: 35,4 ± 7,9 pmol/(s*Mio), p ≤ 0,05) (Abbildung 37).

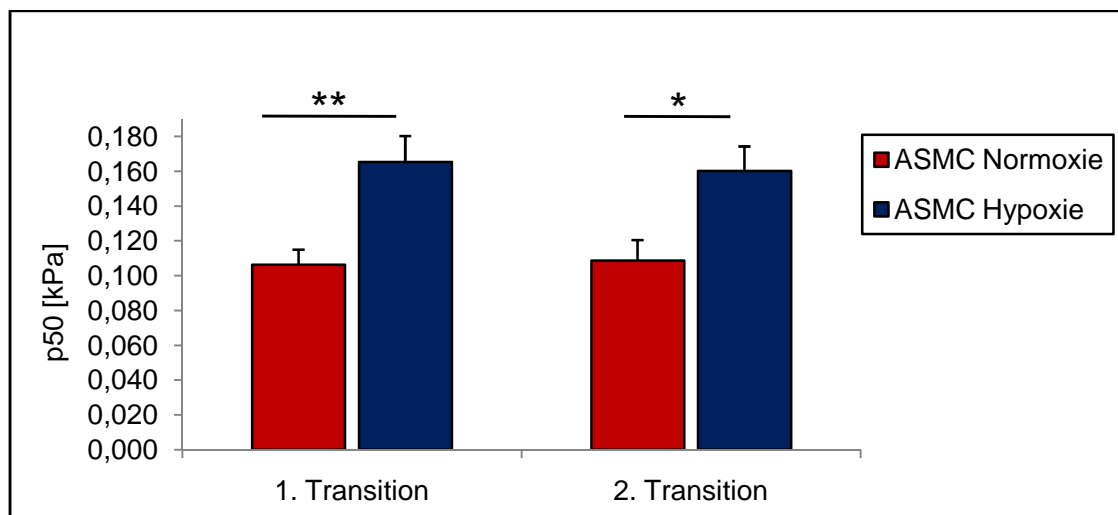


Abbildung 36: p₅₀ serumreicher ASMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie

Es konnte in beiden Abatmungen eine signifikante Zunahme von p₅₀ und damit eine geringere Sauerstoffaffinität nach hypoxischer Inkubation nachgewiesen werden.

Normoxie: n = 5, Hypoxie: n = 5.

p₅₀: Sauerstoffaffinität, ASMC(s): aortale glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

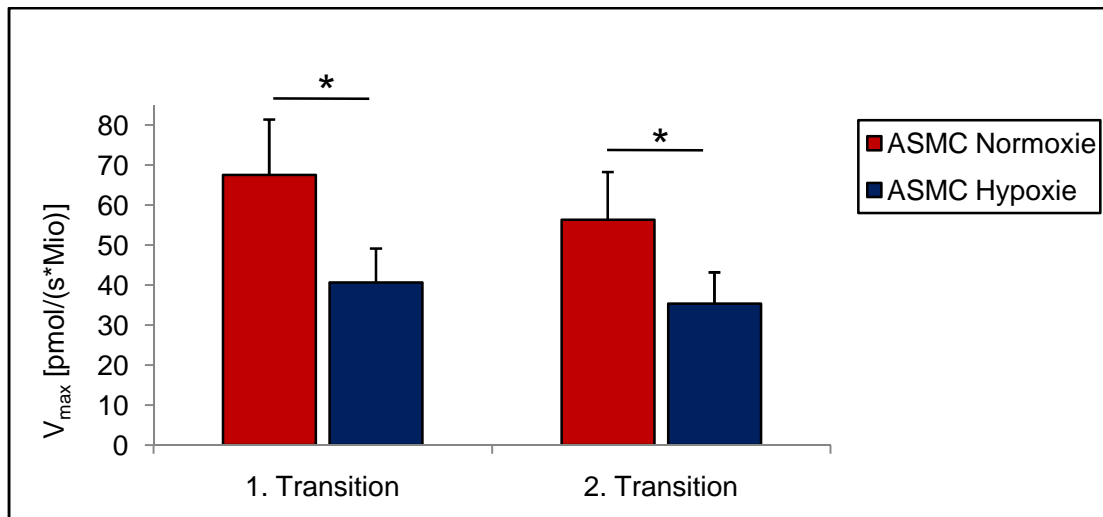


Abbildung 37: V_{\max} serumreicher ASMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie

In beiden Abatmungen zeigte sich nach hypoxischer Inkubation ein signifikant verringerter maximaler Sauerstoffverbrauch.

Normoxie: n = 5, Hypoxie: n = 5.

V_{\max} : maximaler Sauerstoffverbrauch, ASMC(s): aortale glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

5.3.3. Vergleich ASMCs und PASMCs

Im Vergleich von aortalen mit pulmonalarteriellen SMCs war sowohl im p50 als auch in V_{\max} unter normoxischen Kulturbedingungen kein signifikanter Unterschied detektierbar (Abbildung 38, Abbildung 39).

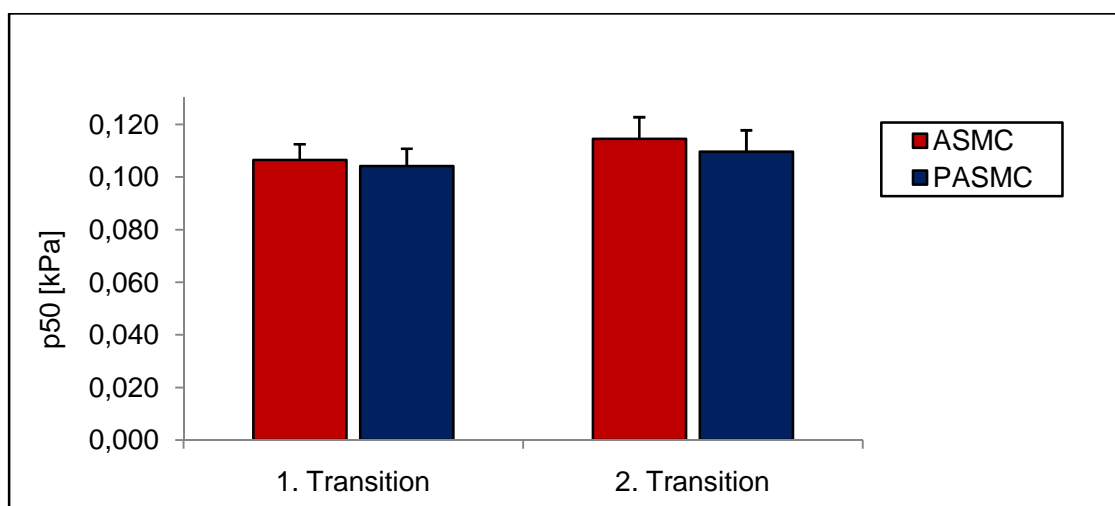


Abbildung 38: p50 normoxisch inkubierter Zellen, Vergleich von ASMCs und PASMCs

Es zeigte sich eine vergleichbare Sauerstoffaffinität in beiden Zellarten.

ASMC T1: n = 16; ASMC T2: n = 12; PASMC T1: n = 16; PASMC T2: n = 13.

p50: Sauerstoffaffinität, T1: 1. Transition, T2: 2. Transition, ASMC(s): aortale glatte Muskelzelle(n), PASMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n).

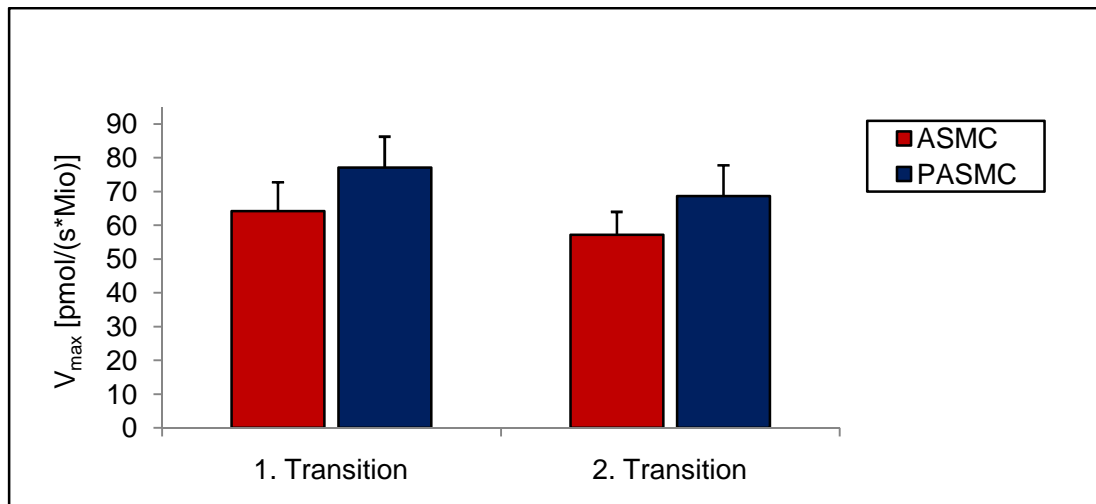


Abbildung 39: V_{\max} normoxisch inkubierter Zellen, Vergleich von ASMCs und PASMCs

Es konnte ein vergleichbarer maximaler Sauerstoffverbrauch in aortalen und pulmonalarteriellen Zellen nachgewiesen werden.

ASMC T1: n = 16; ASMC T2: n = 12; PASMC T1: n = 16; PASMC T2: n = 13.

V_{\max} : maximaler Sauerstoffverbrauch, T1: 1. Transition, T2: 2. Transition, ASMC(s): aortale glatte Muskelzelle(n), PASMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n).

Im direkten Vergleich 24 Std hypoxisch inkubierter ASMCs und PASMCs zeigte sich in beiden Abatmungen eine signifikant niedrigere Sauerstoffaffinität aortaler SMCs gegenüber pulmonalarteriellen SMCs: (ASMC T1 p50: $0,165 \pm 0,015$ kPa vs. PASMC T1 p50: $0,120 \pm 0,008$ kPa, $p \leq 0,05$ und ASMC T2 p50: $0,160 \pm 0,014$ kPa vs. PASMC T2 p50: $0,117 \pm 0,009$ kPa, $p \leq 0,05$) (Abbildung 40).

Hinsichtlich des maximalen Sauerstoffverbrauchs konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 41).

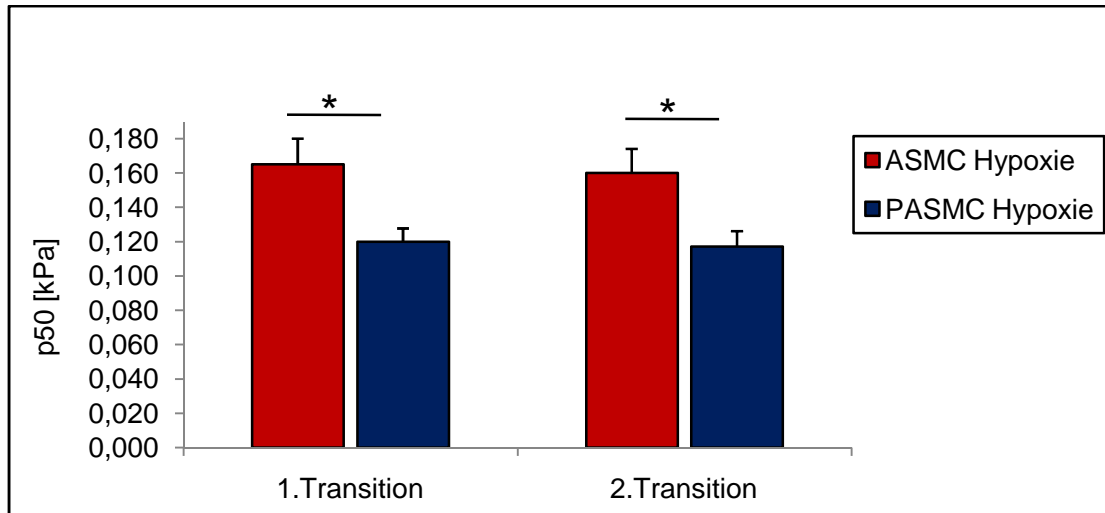


Abbildung 40: p50 24 Std hypoxisch inkubierter Zellen, Vergleich von ASMCs und PASCs

Während beiden Abatmungen wird die Sauerstoffaffinität in hypoxisch inkubierten ASMCs signifikant kleiner (p50 wird größer) als in den pulmonalarteriellen Vergleichszellen.

ASMC: n = 5; PASM: n = 10.

ASMCs = Daten aus Abbildung 36, PASCs = Daten aus Abbildung 30.

p50: Sauerstoffaffinität, ASMC(s): aortale glatte Muskelzelle(n), PASM(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

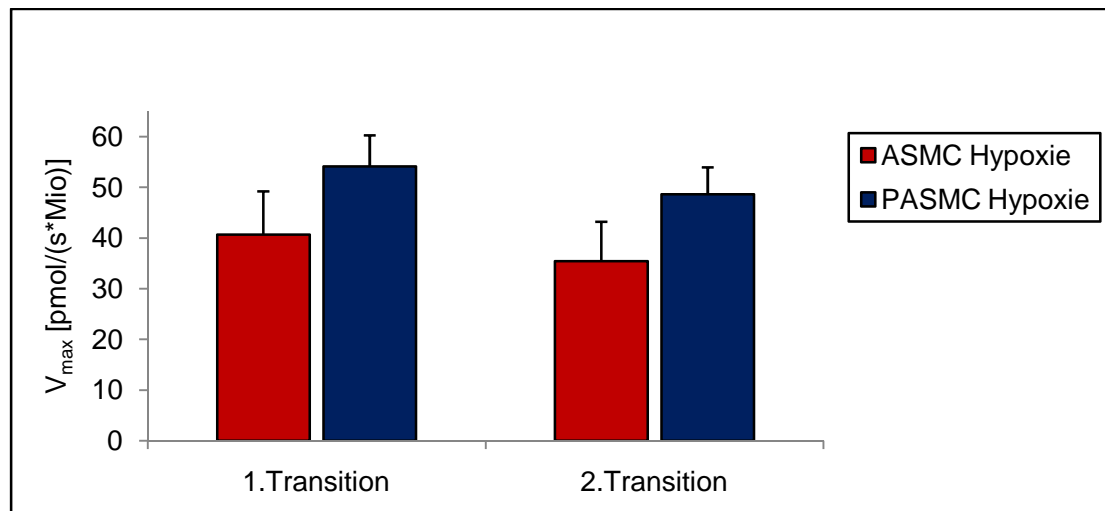


Abbildung 41: V_{max} 24 Std hypoxisch inkubierter Zellen, Vergleich von ASMCs und PASCs

Es konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, der maximale Sauerstoffverbrauch blieb auch nach hypoxischer Inkubation in beiden Zellarten vergleichbar.

ASMC: n = 5; PASM: n = 10.

ASMCs = Daten aus Abbildung 37, PASCs = Daten aus Abbildung 31.

V_{max}: maximaler Sauerstoffverbrauch, ASMC(s): aortale glatte Muskelzelle(n), PASM(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

5.4. AUSWIRKUNGEN CHRONISCHER HYPOXIE AUF DAS PROTONENLEAK UND DIE MAXIMALE ATMUNGSKETTEN-KAPAZITÄT

5.4.1. Mitochondriale Atmungsphasen nach hypoxischer Inkubation

Verschiedene Atmungsketteneigenschaften wurden unter Zuhilfenahme von mitochondrialen Inhibitoren/Entkopplern untersucht. Um eventuelle Einflüsse durch Wachstumsfaktoren im Kulturmedium ausschließen zu können, wurde dieses Versuchsprotokoll nur mit serumarmen Zellen (1 % FCS 48 Stunden vor Messbeginn und 24 Stunden vor hypoxischer Inkubation einer Gruppe) durchgeführt.

Es zeigten sich in der Routineatmung (C_r) signifikante Unterschiede im Sauerstoffverbrauch zwischen normoxisch und 24 Std hypoxisch inkubierten PSMCs. (Normoxie Cr: $64,4 \pm 14,1$ pmol/(s*Mio) vs. Hypoxie Cr: $41,1 \pm 9,0$ pmol/(s*Mio), $p \leq 0,05$), hypoxische Zellen wiesen eine geringere Routineatmung auf als normoxisch inkubierte Zellen. Nach Hemmung der ATP-Synthase der mitochondrialen Elektronentransportkette durch Oligomycin zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Atmung (C_{rO}) zwischen den unterschiedlich inkubierten Zellen. Nach Entkopplung der mitochondrialen Atmung durch FCCP konnte kein signifikanter Unterschied der Atmung in beiden Versuchsgruppen detektiert werden, womit unter chronischer Hypoxie der maximal erreichbare Sauerstoffverbrauch (C_{ru}) unverändert blieb. Nach Hemmung der Komplexe I und III durch Rotenon und Antimycin A konnte der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch durch andere sauerstoffverbrauchende Faktoren (C_{ruRA}) gemessen werden. Auch dieser Parameter zeigte keine Differenz im Hinblick auf die normoxische oder hypoxische Inkubation der PSMCs (Abbildung 42).

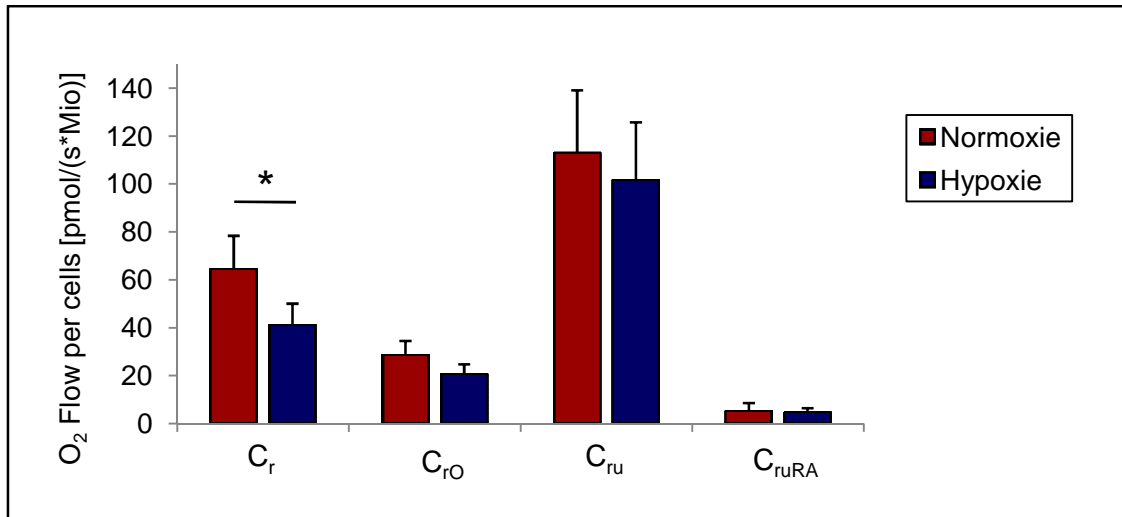


Abbildung 42: Atmungsphasen serumarmer PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie

Es zeigte sich eine signifikant erniedrigte Routineatmung hypoxisch inkubierter Zellen.

Normoxie: n = 5, Hypoxie: n = 5.

C_r = Routineatmung, C_{rO} = durch Oligomycin inhibierte Atmung, C_{ru} = maximale Atemarbeit nach Entkopplung durch FCCP, C_{ruRA} = durch Antimycin A und Rotenon inhibierte Atmung, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

5.4.2. Mitochondriale Atmungsquotienten nach hypoxischer Inkubation

Im Folgenden wurden die oben beschriebenen und in unterschiedlichen Atmungsphasen gemessenen Werte in Relation zueinander gesetzt (Abbildung 43, vgl. Tabelle 6: Atmungsquotienten). Der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch (C_{ruRA}) wurde bereits automatisch durch die OROBOROS-Software (O2k-DatLabAnalysis_TIP2k - Template aus Course on High-Resolution Respirometry, OROBOROS, Innsbruck, Österreich) subtrahiert, die gewonnenen Daten zeigen somit die reine Mitochondrienatmung.

Der Kontroll-Quotient in Prozent ($C'_r/C'_{ru} = 1/UCR'$) gibt das Verhältnis von endogener Atmung zur maximalen Atmungskettenkapazität an. Es konnte kein signifikanter Unterschied dieses Parameters im Vergleich normoxisch und hypoxisch inkubierter Zellen gesehen werden. Der respiratorische Kontroll-Quotient in % ($C'_{rO}/C'_{ru} = 1/RCR'$) als Marker für den prozentualen Anteil der Atmung an der maximalen Atmungskettenkapazität, der zur Kompensation des Protonenleaks dient, unterschied sich nach hypoxischer Inkubation der Zellen nicht signifikant vom Wert normoxisch inkubierter Zellen. Der RCR_p , phosphorylierter Kontroll-Quotient, welcher beschreibt, wie viel Prozent der maximalen Atmungskettenkapazität zur ATP-Produktion

verwendet werden, zeigte nach hypoxischer Inkubation ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied.

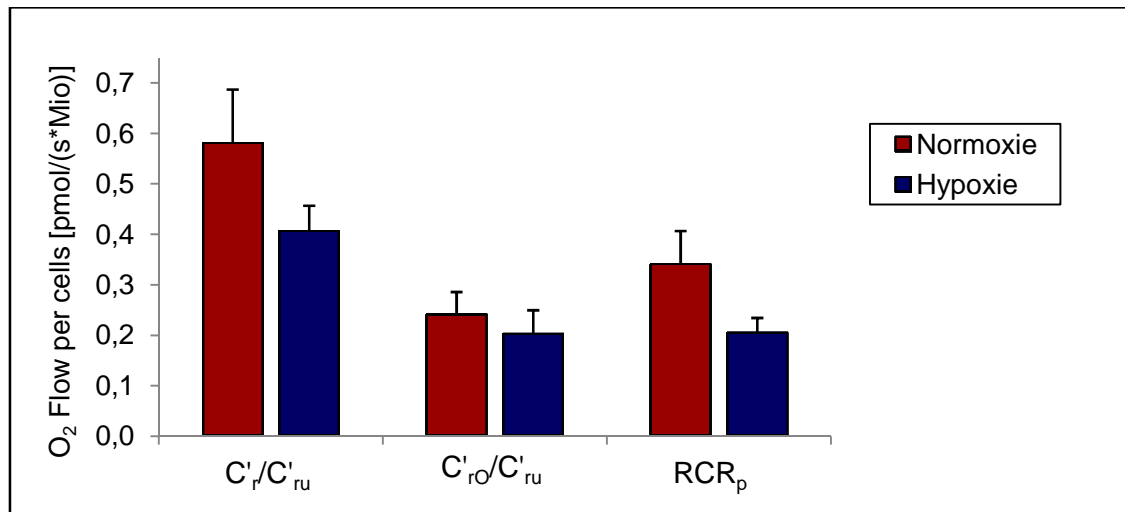


Abbildung 43: Atmungsquotienten serumarmer PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie

Es konnten keine signifikanten Unterschiede durch die hypoxische Inkubation nachgewiesen werden.

Normoxie: n = 5, Hypoxie: n = 5.

$C'_{i}/C'_{ru} = 1/UCR'$ = entkoppelter Kontroll-Quotient in %; $C'_{rO}/C'_{ru} = 1/RCR'$ = respiratorischer Kontroll-Quotient in %; RCR_p = phosphorylierter respiratorischer Kontroll-Quotient in %, PASM(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

5.5. MITOCHONDRIALE CITRAT-SYNTASE-AKTIVITÄT UNTER CHRONISCHER HYPOXIE

Die Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität dient als Marker für die Mitochondrienzahl. Diese Untersuchungen wurden vorgenommen, um eine mögliche Veränderung der Mitochondrienanzahl als Ursache für Veränderungen des maximalen Sauerstoffverbrauchs unter chronischer Hypoxie detektieren zu können.

Beim Vergleich der Messwerte von normoxisch oder 24 Std hypoxisch inkubierten Zellen konnte kein signifikanter Unterschied in der Citrat-Synthase-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 44).

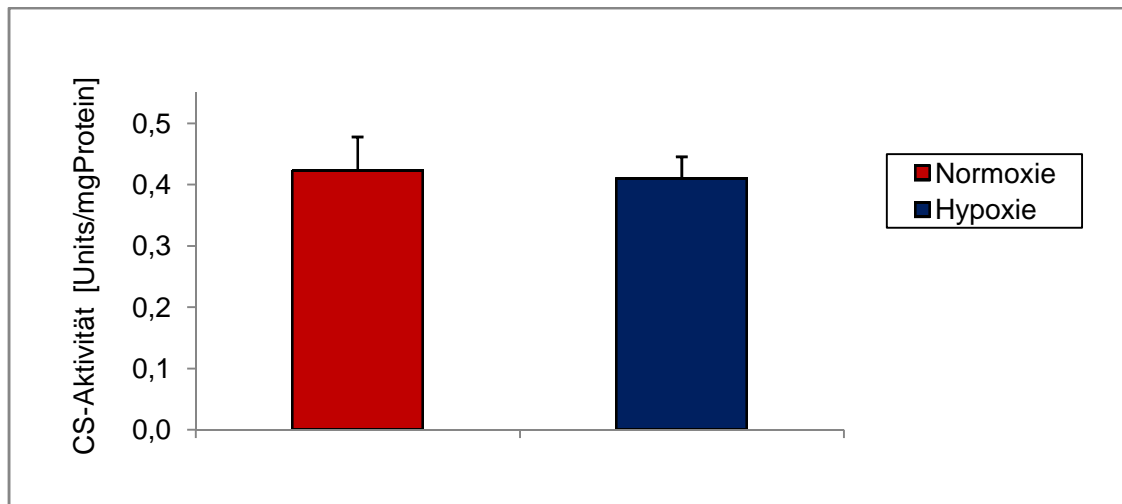


Abbildung 44: Citrat-Synthase-Aktivität in serumreichen PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen normoxisch und hypoxisch inkubierten serumreichen Zellen.

Normoxie: n = 7, Hypoxie: n = 7.

CS: Citrat-Synthase, PSMCs: pulmonalarterielle glatte Muskelzellen, Std: Stunde(n).

5.6. REDOX-STATUS DER MITOCHONDRIALEN

ATMUNGSKETTEN-CYTOCHROME UNTER CHRONISCHER HYPOXIE

In diesen Experimenten wurde der sauerstoffabhängige Redox-Status einzelner Cytochrome der mitochondrialen Atmungskette unter basalen Bedingungen (normoxische Inkubation) und nach chronisch hypoxischer Inkubation (24 oder 48 Stunden bei 1 % O₂) bestimmt. Die Spektren sind als Differenzspektren, d. h. Spektren bei definiertem pO₂ minus Spektrum bei Normoxie, dargestellt. Negative Werte für die Intensität beschreiben Absorptionsmaxima bei spezifischen Wellenlängen. Als Referenzspektren für die vollständige Reduktion der mitochondrialen Cytochrome wurden Spektren nach Cyanidgabe, sowie bekannte Spektren der einzelnen Cytochrome aa₃ (Absorptionsmaxima bei: 445 / 603 / 605 nm), b_h (Absorptionsmaxima bei: 430 / 532 / 562 / 566 nm) und c (Absorptionsmaxima bei: 420 / 521 / 550 nm) verwendet.

Unter Normoxie inkubierte Zellen zeigten pO₂-abhängige spektrale Veränderungen, die mitochondrialen Cytochromen zugeordnet werden konnten. Es zeigte sich eine Reduktion der mitochondrialen Cytochrome bei 1 % O₂ (7,5 mmHg, 1 kPa) und 0 % O₂ (Abbildung 45).

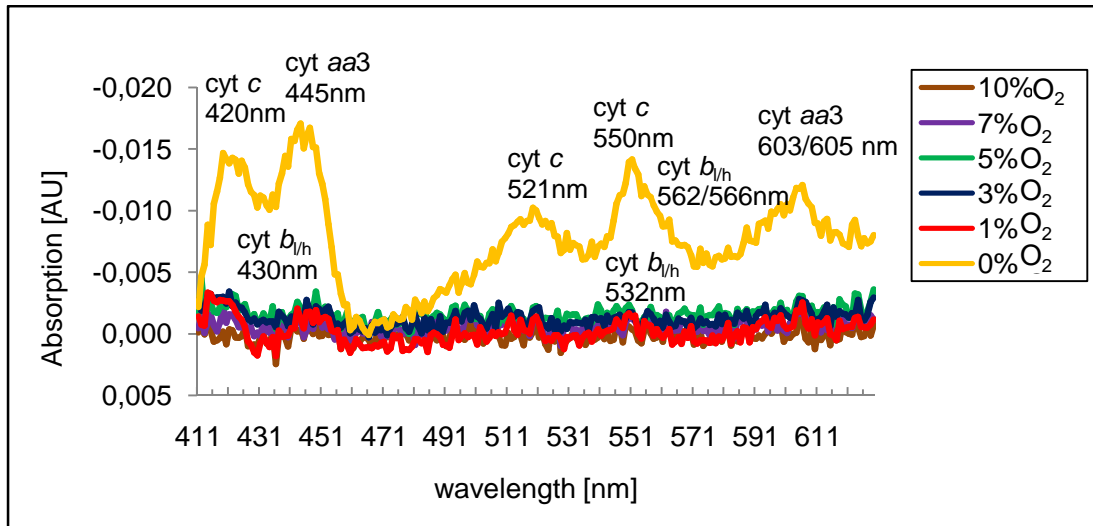


Abbildung 45: Sauerstoffabhängige Spektren normoxisch inkubierter PSMCs

Dargestellt sind die einzelnen Spektren bei der jeweils angegebenen Sauerstoffkonzentration in der Kammer. Eine visuelle Reduktion der Spektren zeigte sich erst bei $\leq 1\%$ O_2 .

Die spezifischen Absorptionsmaxima der einzelnen Cytochrome wurden in diesem Diagramm exemplarisch dargestellt und können auf die anderen Diagramme übertragen werden.

$n = 6$.

cyt: Cytochrom, O_2 : Sauerstoff, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n).

Bei PSMCs, welche 24 Std bei 1% O_2 hypoxisch inkubiert wurden, ließen sich ebenfalls ab 1% O_2 ($7,5$ mmHg, 1 kPa) visuell über dem gesamten Wellenlängenbereich Veränderungen nachweisen, die der Reduktion mitochondrialer Cytochrome zugeordnet werden konnten. Die maximale Reduktion zeigte sich auch nach hypoxischer Inkubation bei 0% O_2 (Abbildung 46). Im niedrigen Wellenlängenbereich ($410 - 460$ nm) ergaben sich bei normoxisch und hypoxisch inkubierten Zellen bereits bei 3 und 5% O_2 ($22,5$ bzw. $37,5$ mmHg, 3 bzw. 5 kPa) leichte, nicht signifikante Veränderungen.

Bei 48 Stunden hypoxisch inkubierten PSMCs, zeigten sich visuelle Veränderungen über dem gesamten Wellenlängenbereich, die mitochondrialen Cytochromen zugeordnet werden können, ebenfalls bei 1% O_2 ($7,5$ mmHg, 1 kPa). Die maximale Reduktion zeigte sich bei 0% O_2 (Abbildung 47). Im niedrigen Wellenlängenbereich ($410 - 460$ nm) konnte man ebenfalls bereits bei 3 und 5% O_2 ($22,5$ bzw. $37,5$ mmHg, 3 bzw. 5 kPa) leichte Veränderungen erkennen.

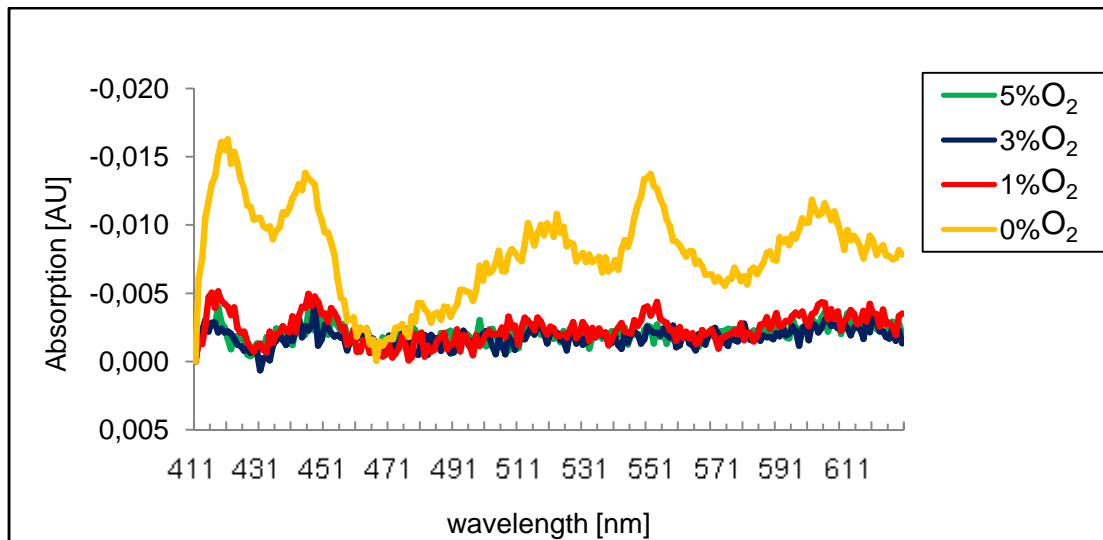


Abbildung 46: Sauerstoffabhängige Spektren 24 Std hypoxisch inkubierter PSMCs

Eine visuelle Reduktion zeigte sich erst bei $\leq 1\%$ O_2 .

$n = 6$.

O_2 (O_2): Sauerstoff, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

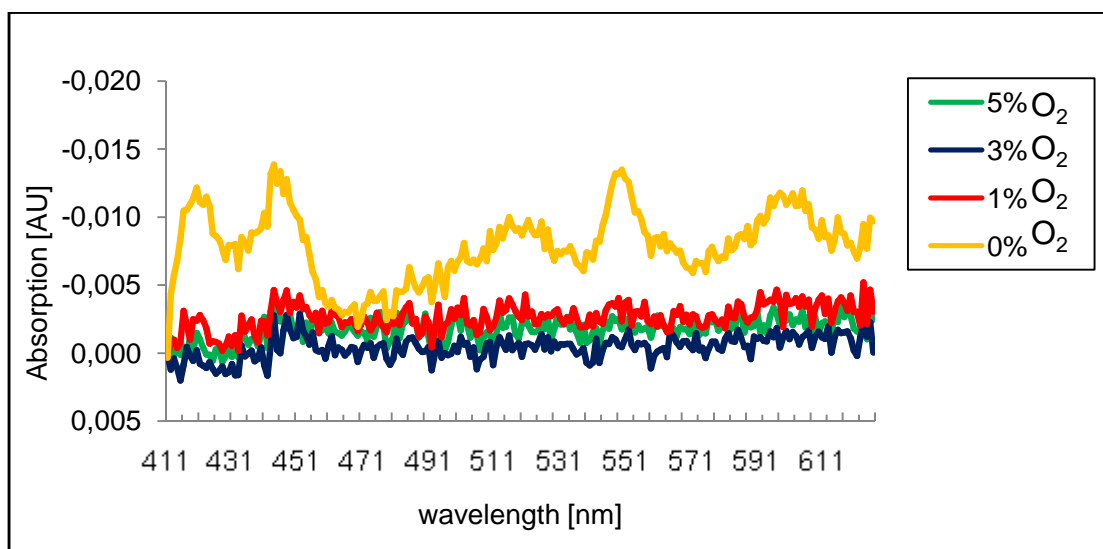


Abbildung 47: Sauerstoffabhängige Spektren 48 Std hypoxisch inkubierter PSMCs

Eine visuelle Reduktion der Spektren zeigte sich erst bei $\leq 1\%$ O_2 .

$n = 5$.

O_2 : Sauerstoff, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

Beim direkten Vergleich der unterschiedlich inkubierten PSMCs ließen sich bei 1 % (7,5 mmHg, 1 kPa) Sauerstoff keine signifikanten Unterschiede der Absorptionsmaxima erkennen (Abbildung 48).

Beim direkten Vergleich bei 0 % Sauerstoff ließen sich keine Unterschiede der Spektren der unterschiedlich inkubierten PSMCs erkennen (Abbildung 49).

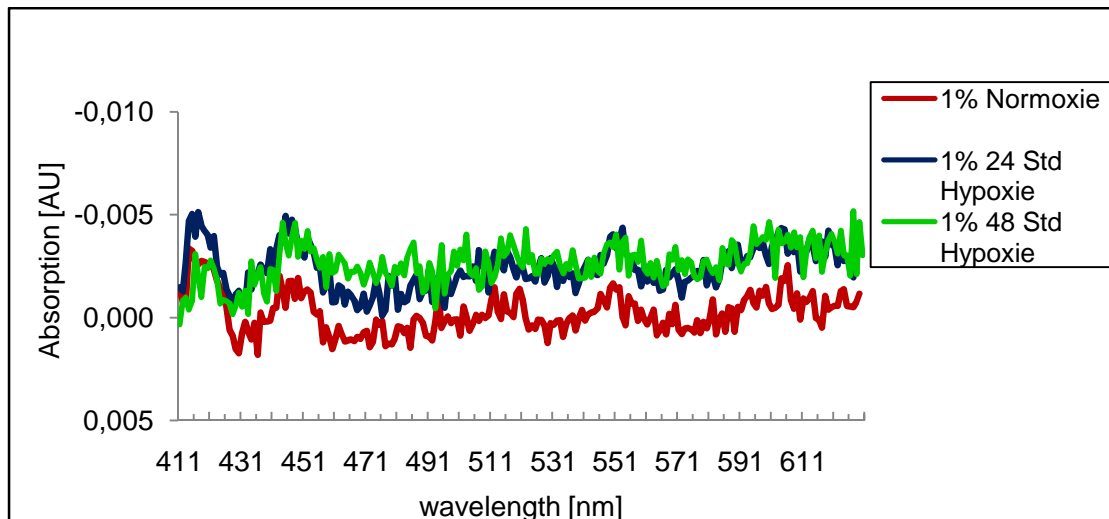


Abbildung 48: Spektren von PSMCs bei 1 % O₂, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie

Vergleich der Spektren normoxisch inkubierter Zellen, 24 Std hypoxisch inkubierter Zellen und 48 Std hypoxisch inkubierter Zellen bei 1 % O₂. Es zeigten sich visuell keine wesentlichen Unterschiede.

Den dargestellten Spektren liegen die gleichen Daten zugrunde wie in den Abbildungen 45 - 47. Normoxie: n = 6, 24 Std Hypoxie: n = 6, 48 Std Hypoxie: n = 5.

O₂: Sauerstoff, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

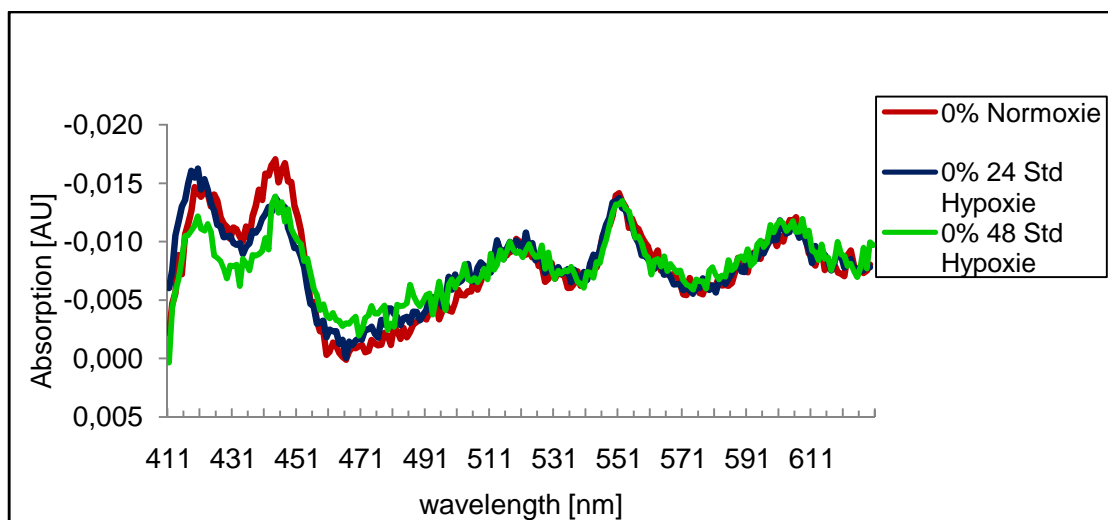


Abbildung 49: Spektren von PSMCs bei 0 % O₂, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie

Vergleich der Spektren normoxisch inkubierter Zellen, 24 Std hypoxisch inkubierter Zellen und 48 Std hypoxisch inkubierter Zellen bei 0 % O₂. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Den dargestellten Spektren liegen die gleichen Daten zugrunde wie in den Abbildungen 45 - 47. Normoxie: n = 6, 24 Std Hypoxie: n = 6, 48 Std Hypoxie: n = 5.

O₂: Sauerstoff, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

5.6.1. Darstellung des sauerstoffabhängigen Reduktionsstatus mitochondrialer Atmungskettencytochrome

Bei Auswertung der Spektren normoxisch inkubierter PSMCs nach der Methode der kleinsten Quadrate konnte unter akuter Hypoxie bei 5 % O₂ (37,5 mmHg, 5 kPa) eine signifikante Reduktion von Cytochrom *c* gesehen werden, bei 3 % O₂ (22,5 mmHg, 3 kPa) eine signifikante Reduktion der Cytochrome *a* und *c*, und bei 1 und 0 % O₂ (7,5 bzw. 0 mmHg, 7,5 bzw. 0 kPa) eine signifikante Reduktion der Cytochrome *a*, *b* und *c* (Abbildung 50).

Bei 24 Std hypoxisch inkubierten Zellen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Cytochrome *a* und *c* unter akuter Hypoxie ab 1 % (7,5 mmHg, 1 kPa) Sauerstoff. Bei 0 % zeigte sich die maximale Reduktion aller Cytochrome (Abbildung 51).

Nach semiquantitativer Auswertung der Versuche mit 48 Std hypoxisch inkubierten PSMCs konnte eine signifikante Reduktion aller drei Cytochrome unter akuter Hypoxie erst ab einem Sauerstoffgehalt von 0 % O₂ gezeigt werden (Abbildung 52).

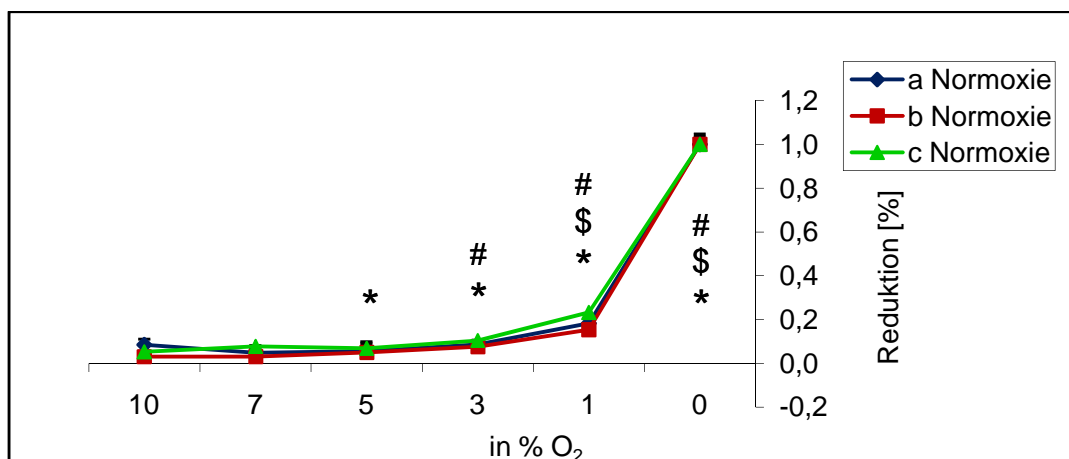


Abbildung 50: Reduktionsstatus mitochondrialer Cytochrome von normoxisch inkubierten PSMCs

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von Cytochrom *c* ab 5 % O₂, von Cytochrom *a* ab 3 % O₂ und von Cytochrom *b* ab 1 % O₂.

Den dargestellten Spektren liegen die gleichen Daten zugrunde wie in Abbildung 45.

n = 6.

#: Cytochrom *a*, \$: Cytochrom *b*, *: Cytochrom *c*; a, b, c: kurz für Cytochrom *a*, *b*, *c*; O₂: Sauerstoff, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n).

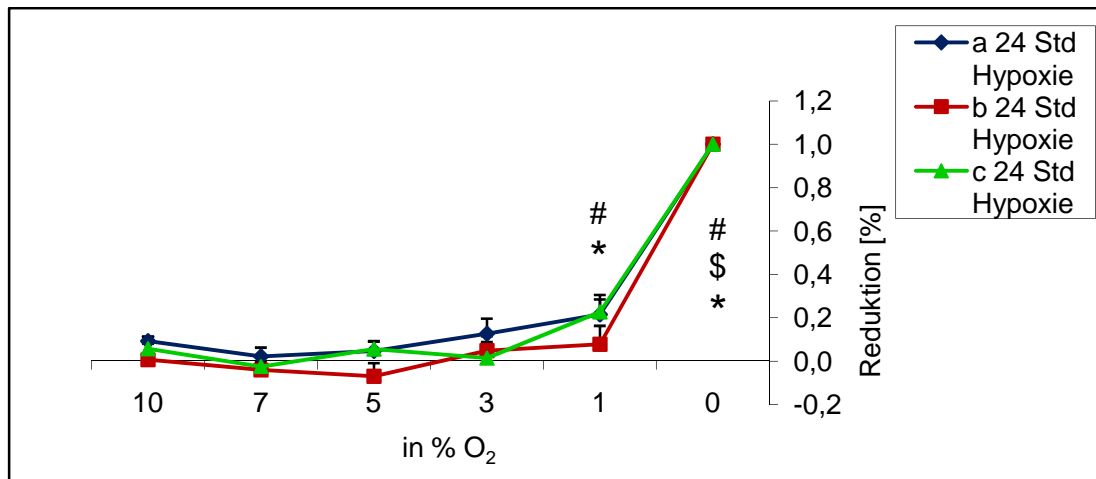


Abbildung 51: Reduktionsstatus mitochondrialer Cytochrome von 24 Std hypoxisch inkubierten PSMCs

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Cytochrome *a* und *c* ab 1 % O₂, sowie von Cytochrom *b* ab 0 % O₂.

Den dargestellten Spektren liegen die gleichen Daten zugrunde wie in Abbildung 46.

n = 6.

#: Cytochrom *a*, \$: Cytochrom *b*, *: Cytochrom *c*; *a*, *b*, *c*: kurz für Cytochrom *a*, *b*, *c*; O₂: Sauerstoff, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

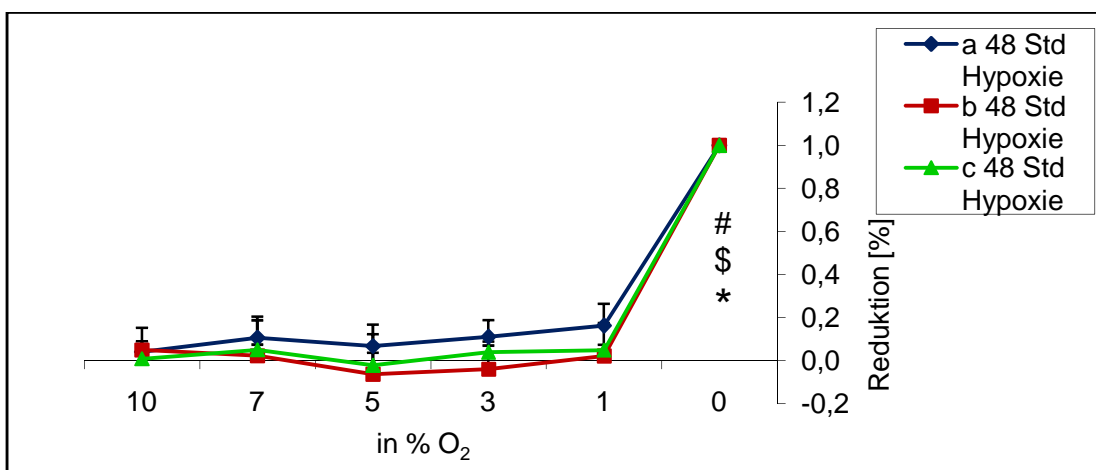


Abbildung 52: Reduktionsstatus mitochondrialer Cytochrome von 48 Std hypoxisch inkubierten PSMCs

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Cytochrome *a*, *b* und *c* ab 0 % O₂.

Den dargestellten Spektren liegen die gleichen Daten zugrunde wie in Abbildung 47.

n = 5.

#: Cytochrom *a*, \$: Cytochrom *b*, *: Cytochrom *c*; *a*, *b*, *c*: kurz für Cytochrom *a*, *b*, *c*; O₂: Sauerstoff, PSMC(s): pulmonalarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

Im nachstehenden Diagramm wurde der pO₂-abhängige Redox-Status der Cytochrome *a*, *b* und *c* im Vergleich der unterschiedlich hypoxisch inkubierten PSMCs dargestellt (Abbildung 53). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Redox-Status der einzelnen Cytochrome im Vergleich der normoxisch oder unterschiedlich hypoxisch inkubierten Zellen. Beim Vergleich der einzelnen Cytochrome untereinander konnte ein

Unterschied zwischen Cytochrom *b* und Cytochrome *a* bzw. *c* bei normoxisch und 24 Std hypoxisch inkubierten Zellen bei 1 % O₂ und bei normoxisch inkubierten Zellen bei 3 % O₂ gefunden werden.

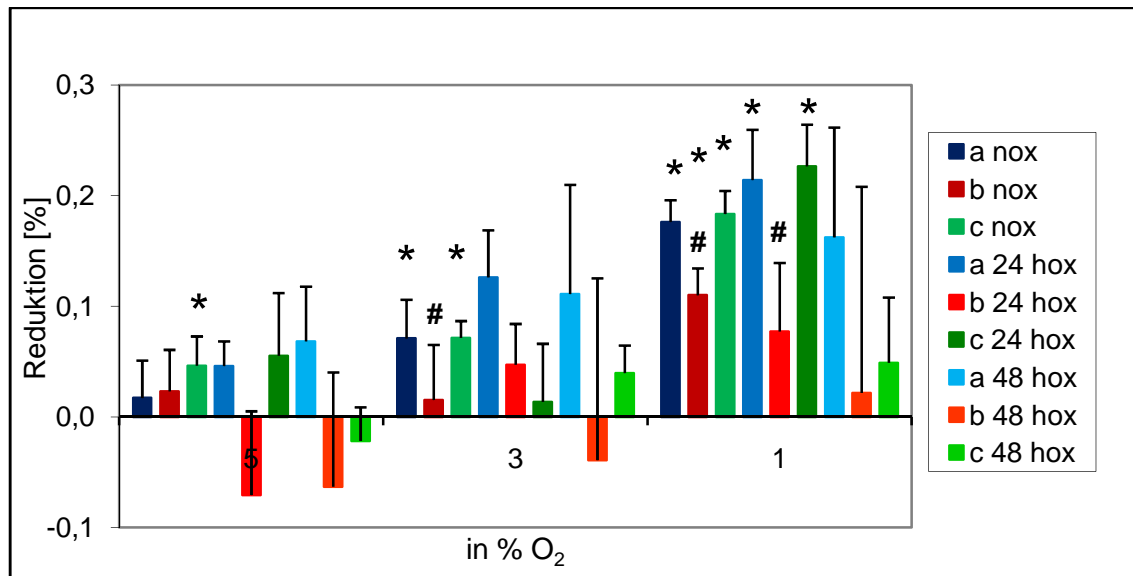


Abbildung 53: Reduktionsstatus mitochondrialer Cytochrome, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie

Übersicht über die Redox-Stadien der Cytochrome *a*, *b* und *c* bei 5, 3 und 1 % O₂, semiquantitativ dargestellt. Es zeigte sich die signifikante Reduktion von Cytochrom *b* im Vergleich zu den Cytochromen *a* und *c* bei 1 % O₂ der 24 Std hypoxisch und bei 3 und 1 % O₂ der normoxisch inkubierten Zellen.

Normoxie: n = 6, 24 Std Hypoxie: n = 6, 48 Std Hypoxie: n = 5, Daten aus Abbildungen 50 - 52.

= Unterschied von Cytochrom *b* gegenüber den Cytochromen *a* und *c*.

Zur besseren Übersicht verwendete Abkürzungen: nox: normoxisch inkubiert, 24 hox: 24 Std hypoxisch inkubiert, 48 hox: 48 Std hypoxisch inkubiert. a, b, c: kurz für Cytochrome *a*, *b*, *c*; O₂: Sauerstoff, PASMC(s): pulmonalerarterielle glatte Muskelzelle(n), Std: Stunde(n).

6. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden Veränderungen von Mitochondrien in intakten PASMCs unter chronischer Hypoxie bezüglich ihrer Atmung, Sauerstoffaffinität und ihres cytochromalen Redox-Status untersucht. Diese Studie wurde vor dem Hintergrund durchgeführt, dass mitochondriale Dysfunktion und mitochondriale ROS-Produktion in PASMCs eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie und hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion zugeschrieben wird^{16, 21, 102}. Als Voruntersuchungen wurden die Zellkulturbedingungen der PASMCs für die Messung der mitochondrialen Atmung bestimmt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass

- Zellen der 1. und 2. Passage, sowie der 1. und 2. Aussaat keinen Unterschied hinsichtlich der Respiration und Sauerstoffaffinität aufwiesen, aber eine Erniedrigung von FCS und Gabe von Endothelin-1 zu einer Abnahme der Atmung führten.
- Chronisch hypoxische Inkubation der PASMCs zu einem Abfall der Atmung und Sauerstoffaffinität führten, die sich auch in ASMCs nach chronisch hypoxischer Inkubation zeigten, wobei ASMCs eine stärkere Abnahme der Sauerstoffaffinität als PASMCs zeigten.
- Kein Unterschied im sauerstoffabhängigen cytochromalen Redox-Status nach chronisch hypoxischer Inkubation messbar war.

6.1. ÜBERLEGUNGEN ZU MESSUNGEN AN ISOLIERTEN GEFÄßMUSKELZELLEN DES KANINCHENS

Die in dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden an glatten Gefäßmuskelzellen, die aus kleinen Pulmonalarterien isoliert wurden, durchgeführt. Die Methode erlaubte eine isolierte Gewinnung von Zellen aus kleinen präkapillären pulmonalen Gefäßen²². In Immunfluoreszenzfärbungen konnte bestätigt werden, dass nur glatte Muskelzellen kultiviert wurden (siehe Kap. 5.1). Pulmonalarterielle Gefäßmuskelzellen (PASMCs) wurden gewählt, da diese sowohl für die Vasokonstriktion als Reaktion auf akute Hypoxie, als auch für vaskuläres Remodeling unter chronischer Hypoxie, essentiell sind. Zu letzterem tragen PASMCs durch Proliferation bei^{38, 49, 84}.

In verschiedenen Studien wurde als Effektorzelltyp der HPV bereits die präkapilläre glatte Muskelzellschicht der Widerstandsgefäße am Eingang der Acini identifiziert. Seit bekannt ist, dass isolierte pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (PASMCs) mit Kontraktion und Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration auf Hypoxie reagieren, gelten diese Zellen sowohl als Sensor- als auch Effektor-Zellen der Hypoxie¹⁰¹.

Als Vergleichszellen wurden aortale glatte Muskelzellen (ASMC) gewählt. Aortale Zellen werden häufig als Vergleichszellen verwendet, da sie als systemische Zellen im Gegensatz zu pulmonalarteriellen Zellen unter Hypoxie dilatieren statt zu konstringieren^{16, 94}. Allgemein gilt dies für systemische SMCs, z.B. auch für Zellen aus der *A. renalis*^{16, 48, 53}.

In dieser Arbeit wurden glatte Gefäßmuskelzellen mit der Methode der Respirometrie vermessen. Diese erlaubt, die mitochondriale Atmung in intakten Zellen zu untersuchen^{30, 35}. Der Vorteil dieser Vorgehensweise im Vergleich zur Messung an isolierten Mitochondrien bestand darin, die physiologischen intrazellulären Verhältnisse zu bewahren. Zudem wurde das Risiko, die Integrität der Mitochondrien bei der Präparation zu verletzen, geringer⁵³. Bei der Interpretation muss allerdings berücksichtigt werden, dass intra- und extrazellulär gemessene Werte, z.B. in Hinblick auf die Sauerstoffaffinität und den maximalen Sauerstoffverbrauch differieren können³⁰, vgl. Kapitel 6.2.1.

Um die gewonnenen Erkenntnisse besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Versuchsreihen mit PASMCs aus Kaninchen durchgeführt, da vorausgehende Versuche bereits an isolierten und perfundierten Kaninchenlungen durchgeführt worden waren^{82, 98, 100}. Zusätzlich erlaubte die Zellisolierung aus Kaninchenlungen hohe Zellzahlen, die für die spektrophotometrischen Untersuchungen notwendig waren. Kaninchenlungen gelten zudem hinsichtlich einer Einteilung nach Reaktion der Lunge auf akute Hypoxie als „intermediate responders“⁶⁰ mit moderatem Reaktionsverhalten, im Vergleich zu „low“ oder „high responders“ mit sehr geringem bzw. hohem Ansprechen auf einen akuten Hypoxie-Stimulus.

6.2. EINFLUSS DER ZELLKULTURBEDINGUNGEN AUF DIE EIGENSCHAFTEN DER MITOCHONDRIEN

6.2.1. Mitochondriale Atmung von PSMCs im Vergleich zu anderen Zellarten

Die in dieser Arbeit in normoxisch inkubierten PSMCs gemessenen Werte für p_{50} befanden sich alle im Bereich zwischen 0,068 kPa (0,511 mmHg) (serumarm T2) und 0,118 kPa (0,887 mmHg) (serumreich T1). Für V_{max} konnten Werte zwischen 34,6 pmol/(s*Mio) (serumarm T2) und 88,6 pmol/(s*Mio) (serumreich T2) gemessen werden. Sommer et al. konnten in PSMCs aus Kaninchenlungen p_{50} -Werte von $0,84 \pm 0,03$ mmHg (0,112 kPa), und damit vergleichbare Werte wie in dieser Arbeit, bestimmen⁸². In anderen Zellarten konnte festgestellt werden, dass in intakten Zellen gemessene p_{50} -Werte, abhängig vom Zelltyp und der metabolischen Aktivität, etwa 5 bis 10 mal größer waren, als aus isolierten Mitochondrien bestimmte p_{50} -Werte. Dieser Unterschied spiegelt wahrscheinlich den Sauerstoffgradienten zwischen Extrazellulärraum und Mitochondrium wider³⁰. In intakten Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen wurden, ebenfalls im Respirometer (Oxygraph), ein p_{50} -Wert von 0,094 kPa (0,707 mmHg) und V_{max} von 20 pmol/(s*Mio. Zellen) gemessen (Endothelzellkultur, Kulturmedium 199)³⁰. Damit zeigten die PSMCs bei ähnlichem p_{50} einen höheren maximalen Sauerstoffverbrauch und damit V_{max} . Im Vergleich dazu zeigten intakte kardiale Myozyten aus Ratten einen p_{50} von 0,19 kPa (1,43 mmHg) und einen V_{max} von 220 pmol/(s*mg). Unterschiede in der Zellatmung und im p_{50} sind je nach Zellart zu erwarten, und unter anderem abhängig von ATP-Bedarf und Zellgröße. Besonders die Zellgröße beeinflusst aufgrund des intrazellulären Sauerstoffgradienten die Sauerstoffaffinität. Daher zeigten isolierte Mitochondrien unter Ruhebedingungen niedrigere p_{50} -Werte von 0,02 bis 0,06 kPa (0,15 bis 0,45 mmHg)³⁰. In isolierten Lungenmitochondrien lag der Sauerstoffverbrauch bei ca. 6 mmHg/mg/min (mg: Lungenmitochondrien)⁵³. Dies ist mit den hier vorliegenden Untersuchungen nicht zu vergleichen, da die Mitochondrien aus Lungenhomogenat vermessen wurden und unklar ist, wie viel Milligramm Mitochondrien in einer Million PSMCs zu erwarten wären. Insgesamt liegen die Werte der hier vorliegenden Messungen jedoch im erwarteten Bereich der Literaturangaben.

6.2.2. Einfluss von Aussaat, Passage und Versuchsdauer

In den vorliegenden Untersuchungen an PSMCs und ASMCs konnte kein Unterschied zwischen der 1. und 2. Passage, sowie der 1. und 2. Aussaat hinsichtlich der Zellatmung oder Sauerstoffaffinität festgestellt werden. Dies wäre unter Umständen zu erwarten gewesen, da für ASMCs aus Kaninchen beschrieben wurde, dass diese unter Kultivierung dedifferenzieren, Veränderungen im Zytoskelett zeigen und damit ihre Funktion ändern können¹⁰⁵. Phänotypische Veränderungen bedingt durch die Zellkultur konnten ebenfalls in aortalen SMCs von Ratten festgestellt werden⁷⁸. Die ASMCs dieser Studie wurden mit Medium 199 + 5 % FCS + 2 mM Glutamin kultiviert. Diese Untersuchungen bezogen sich auf ASMCs, die in der 2. und 3. Passage kultiviert worden waren, und bezogen sich auf die Differenzierung in „kontraktilen“ und „synthetischen“ Phänotyp, was den Vergleich erschwert und hier nicht weiter erörtert werden soll¹⁰⁵. Allerdings wurden für PSMCs der Passagen P0, P1 und P3 in der Immunfluoreszenz keine signifikanten Unterschiede ihres Zytoskeletts gesehen²². Dies wurde in einem Western-Blot bestätigt, in dem ein quantitativer Vergleich bestimmter Proteinmengen (SM- α -Aktin, SM-MCH) von PSMCs der Passagen P1 und P3 durchgeführt wurde²². Damit ist nicht davon auszugehen, dass eine längere Kulturdauer, mehrmaliges Trypsinieren und Aussäen, sowie die Neuaussaat der Eisenpartikel einen Einfluss auf die mitochondriale Atmung in der hier vorliegenden Studie haben.

Nachdem in serumreichen normoxischen PSMCs zwischen unterschiedlichen Passagen und Aussaaten keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf p50 und V_{max} gefunden werden konnten, wurde dies auf andere Versuchsprotokolle übertragen. In diesem Sinne wurden serumarme wie serumreiche PSMCs ebenfalls jeweils innerhalb den Vergleichsgruppen normoxisch, 24 Stunden oder 48 Stunden hypoxisch inkubiert gepoolt. Gleiches wurde später auf aortale SMCs übertragen.

Längere Versuchszeiten durch ein längeres Versuchsprotokoll im Respirometer (durch die Durchführung von zwei Abatmungen hintereinander) zeigten keinen Einfluss auf die mitochondriale Atmung normoxischer und mit 10 % FCS kultivierter PSMCs, in serumarm kultivierten PSMCs konnte jedoch in der zweiten Transition geringere Werte für den p50 detektiert werden (siehe Kap 5.2.1).

Insgesamt wurden für die Untersuchungen dieser Arbeit die Ergebnisse von Zellen aus der 1. und 2. Passage, sowie der 1. und 2. Aussaat gepoolt.

6.2.3. Einfluss von Wachstumsfaktoren

Diese Messungen wurden durchgeführt, um den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die mitochondriale Atmung, und den für diese Untersuchungen optimalen FCS-Gehalt im Kulturmedium, bestimmen zu können. Messungen mit niedrigem FCS-Gehalt werden durchgeführt, um den Zellzyklus zu synchronisieren und damit den Einfluss des Zellzyklus auf die Messergebnisse zu minimieren. Die Konzentration der Wachstumsfaktoren im Kulturmedium (10 % oder 1 % FCS) wirkte sich in dieser Arbeit auf die Ergebnisse der Respirometrie aus, wobei unter niedrigen FCS-Konzentrationen niedrigere Werte für p_{50} und V_{max} gemessen wurden. Damit stieg die Sauerstoffaffinität in serumarm inkubierten Zellen an, während die maximale Atmung abnahm. Möglicherweise ist dies durch eine Änderung der Proliferation der Zellen unter erniedrigtem FCS-Gehalt erklärbar. Es ist bekannt, dass eine niedrigere FCS-Konzentration die Proliferation von PSMCs hemmen kann^{59, 62}. Dabei erscheint es ausreichend, den Wachstumsfaktorengehalt 24 Std vor der Messung zu reduzieren, um die Proliferation zu vermindern¹⁰⁷.

In der vorliegenden Arbeit wurde der FCS-Gehalt in den Zellen 24 Std vor Beginn der Hypoxiephase bzw. 48 Std vor Beginn der Messung, verringert. Normoxisch inkubierte serumarme Zellen zeigten einen signifikant verringerten V_{max} (um 45,2 % in T1 bzw. 57,2 % in T2) im Vergleich zu serumreichen Zellen. Unter fehlender Proliferationsstimulation sind die Zellen weniger stoffwechselaktiv und benötigen daher weniger Energie, so dass möglicherweise die mitochondriale Atmung dadurch eingeschränkt wird.

Desweiteren zeigten mit 1 % FCS behandelte PSMCs in der zweiten Abatmung einen um 34 % niedrigeren p_{50} , und damit eine höhere Sauerstoffaffinität, als mit 10 % FCS behandelte Zellen (siehe Kap 5.2.2). Der niedrigere p_{50} -Wert in der 2. Transition und die damit erhöhte Sauerstoffaffinität kann durch verschiedene Faktoren hervorgerufen sein. Unter anderem ist der p_{50} von der Substrat- und ADP Konzentration abhängig²⁶. Die Gruppe um Gnaiger erklärte den sinkenden p_{50} bei erniedrigten Substraten mit Veränderungen der ATP/ADP-Konzentration in der Zelle. Der p_{50} -Wert ist eine Funktion von V_{max} und wird von ADP kontrolliert, damit wird dieser in der sogenannten state 4-Atmung (high ATP, d.h. hohes ATP/ADP-Verhältnis) kleiner als in der state 3-Atmung (high ADP, d.h. niedriges ATP/ADP-Verhältnis)³⁰. Die in der vorliegenden Arbeit vermessenen serumarmen Zellen hatten möglicherweise durch Reduktion des FCS-Gehaltes im Kulturmedium, und damit verbundener niedrigerer Proliferationsrate, eine verminderte Stoffwechselaktivität mit niedrigerem ATP-Verbrauch (= hohes

ATP/ADP Verhältnis), sowie eine geringere Menge an Substraten zur Verfügung. Dies könnte sich möglicherweise bei der zweiten Transition auswirken, indem es im Laufe des Versuches zu einem Verbrauch von Substraten und Ansammlung von ATP kommen könnte.

Somit wirkt sich die FCS-Konzentration auf die Atmung und Sauerstoffaffinität aus. Allerdings konnten unter Hypoxie keine Unterschiede durch erniedrigte FCS-Konzentration auf die Hypoxie-induzierten Veränderungen nachgewiesen werden (siehe unten). Daher wurden aufgrund der besseren Wachstumsbedingungen für PASMCs unter 10 % FCS im Kulturmedium diese Konzentration für alle weiteren Versuche gewählt.

6.2.4. Einfluss von Endothelin-1

Endothelin-1 (Et-1) wirkt vor allem an glatter Muskulatur und entfaltet seine Hauptwirkung am Herz-Kreislaufsystem. Es spielt, da es pro-inflammatorisch, konstriktorisch und proliferativ auf SMCs wirkt, auch eine Rolle in der Entstehung von Gefäßumbauprozessen und pulmonaler Hypertonie ⁴⁹. In früheren Arbeiten zu Messungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration konnte bereits gezeigt werden, dass PASMCs auf Zugabe von Et-1 mit Kontraktion reagieren ²². Die Reaktion der Zelle ist dabei abhängig von der Endothelinkonzentration. Bei niedrigeren Dosierungen (10^{-10} M) scheint es die Sensitivität der Kontraktion als Antwort auf den durch Hypoxie bedingten $[Ca^{2+}]_i$ -Einstrom zu erhöhen. In höheren Dosierungen (10^{-8} M) erhöhte Endothelin $[Ca^{2+}]_i$ in PASMCs ⁹⁷. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit primärer oder sekundärer PH im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen erhöhte Endothelin-Spiegel im Plasma haben ⁶¹. Des Weiteren fand man eine gesteigerte pulmonale Et-1 Produktion im „fawn-hooded rat“-Modell für pulmonale Hypertonie ⁶¹. Auch in COPD-Patienten konnte nachgewiesen werden, dass der Et-1 Spiegel im Blut erhöht ist, zudem korreliert der Et-1 Spiegel negativ mit dem Grad der Hypoxie ⁹⁰. Durch Endothelin-1 wird die HPV verstärkt, und es konnte gezeigt werden, dass die HPV in isolierten pulmonalarteriellen Gefäßen nach Entfernung des Endothels teilweise oder komplett verhindert wird ²². Daher wurde in dieser Studie untersucht, ob sich Endothelin-1 auch auf die mitochondriale Atmung und Sauerstoffaffinität auswirkt.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich hinsichtlich der Sauerstoffaffinität kein Unterschied zwischen Versuchen, die mit oder ohne Endothelin-1 durchgeführt wurden. Allerdings konnte unter Zugabe von Et-1 in der

Endkonzentration von 10 nM ein signifikanter Abfall der maximalen Atmung um fast 50 % (T2) im Gegensatz zu PASMCs ohne Zugabe von Endothelin-1 beobachtet werden. Es wurde bereits gezeigt, dass Endothelin-1 zu einer mitochondrialen Dysfunktion in verschiedenen Modellen des Herzversagens führen kann, möglicherweise via Erniedrigung der Aktivität verschiedener Atmungskettenkomplexe^{50, 109}. Im Gegensatz dazu konnte in isolierten Lungenmitochondrien aus isolierten und perfundierten Rattenlungen nach Zugabe von Et-1 weder ein Unterschied in der Mitochondrienatmung noch im ATP-Gehalt des Lungengewebes im Vergleich zu unbehandelten Lungen nachgewiesen werden⁶⁹. Möglicherweise sind die Stoffwechselwege in isolierten Mitochondrien und intakten Zellen unterschiedlich, wodurch sich die unterschiedlichen Ergebnisse erklären ließen.

Daher spielt möglicherweise die Endothelin-induzierte mitochondriale Dysfunktion bei der Entstehung der pulmonalen Hypertonie eine Rolle.

6.2.5. Zellkulturbedingungen für die chronisch hypoxischen Versuche

Für die Zellkulturbedingungen, unter denen der Einfluss der Hypoxie auf die mitochondrialen Funktionen getestet werden sollten, wurden zusammenfassend die Bedingungen ausgewählt, unter denen eine optimale Atmung der Zellen beobachtet werden konnte. Dies war in Passage 1 und 2, sowie Aussaat 1 und 2 unter Kultivierung mit 10% FCS, sowie ohne Zusatz von Endothelin-1 der Fall. Daher wurden für die Ergebnisse die Messungen aus Zellen der Passage 1 und 2, sowie Aussaat 1 und 2 gepoolt. Die chronisch hypoxischen Versuche für die Hypoxiedauer von 48 Stunden wurden mit PASMCs nur unter Kultivierung mit 10 % FCS durchgeführt, da die Qualität der mit 1 % FCS kultivierten Zellen, nach 48 Stunden Hypoxieexposition, anhand optischer Kriterien beurteilt, deutlich eingeschränkt war, worauf die Respirationsversuche bereits hindeuteten. Gleiches galt für die ASMCs nach 48 Std Hypoxieexposition, so dass bei ASMCs nur Hypoxieversuche mit 24 Std Expositionsdauer, sowie 10 % FCS durchgeführt wurden. Die Hypoxieversuche mit einer Expositionsdauer von 24 Std in PASMCs wurden mit 1 und 10 % FCS durchgeführt, bzw. die Substrat-Inhibitor Titrationsversuche nur mit 1 % FCS, da sich in den zuvor durchgeführten Versuchen keine Unterschiede zwischen 1 % und 10 % FCS bzgl. der Reaktion auf 24 Std Hypoxie ergeben hatten.

6.3. MITOCHONDRIALE ATMUNGSKETTENFUNKTIONEN IN PULMONALARTERIELLEN GLATTEN MUSKELZELLEN NACH INKUBATION IN CHRONISCHER HYPOXIE

6.3.1. Die Rolle von Mitochondrien in der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion sowie der pulmonalen Hypertonie

Mitochondrien wird eine zentrale Rolle als Sauerstoffsensor in akuter und chronischer Hypoxie⁵³ sowie bei pathologischen Umbauvorgängen im Lungenkreislauf zugeschrieben. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Mitochondrien als Zellorganellen eine wichtige Rolle beim vaskulären Remodeling spielen^{16, 53}. Nach neueren Studien sind Mitochondrien im Rahmen des Warburg-Effektes („metabolic theory“) auch an der Entstehung von Neoplasien beteiligt, deren Entstehungsmechanismus mit demjenigen der pulmonalen Hypertonie verglichen wird^{4, 16}. Hierbei kommt es unter anderem aufgrund von Sauerstoffmangel zu einer Verschiebung der Energiegewinnung von oxidativer Phosphorylierung zu anaerober Glykolyse, wodurch die Zellproliferation begünstigt wird⁶, was einerseits beim Remodeling, andererseits aber auch bei der Entstehung von Tumorerkrankungen von Bedeutung ist. Erste Veränderungen in dieser Hinsicht konnten bereits in Mitochondrien aus PASMCs von PAH-Lungen nachgewiesen werden¹⁶.

6.3.2. Auswirkungen der chronisch hypoxischen Inkubation auf mitochondriale Sauerstoffaffinität und Atmung

Den oben beschriebenen metabolischen Umbauprozessen ist gemeinsam, dass sie durch chronische Hypoxie ausgelöst werden können. Es wurde bereits gezeigt, dass Zellen nicht pulmonalen Ursprungs nach hypoxischer Inkubation eine erniedrigte Atmung der Mitochondrien zeigen^{30, 53}. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Nach 24 Std hypoxischer Inkubation zeigte sich in aortalen glatten Muskelzellen eine Abnahme der maximalen Atmung. Diese war im Vergleich zur Normoxie um 38 % (T1 bzw. 39,9 % T2) verringert. 24 Std hypoxisch inkubierte Zellen zeigten hinsichtlich der Sauerstoffaffinität keine Veränderungen im Vergleich zu normoxisch inkubierten Zellen.

Aufgrund einer möglichen Überlagerung der Veränderungen unter Hypoxie durch den Proliferationsstimulus durch FCS wurden die Untersuchungen unter Hypoxie mit 10 % und 1% FCS durchgeführt. Serumarm inkubierte Zellen zeigten im direkten Vergleich

von normoxischer zu 24 Stunden hypoxischer Inkubation ähnliche Veränderungen wie serumreich inkubierte Zellen. Passend zu einem geringeren V_{\max} nach hypoxischer Inkubation konnte auch eine signifikant verminderte Routineatmung (C_r) und damit eine signifikant verminderte endogene Atmung hypoxisch inkubierter Zellen nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der durch FCCP entkoppelten Atmung (C_{ru}) konnten keine Veränderungen der maximalen Atmungskapazität bestimmt werden. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede bei Oligomycin-inhibierter Atmung oder den mitochondrialen Atmungsquotienten. Aufgrund ähnlichen Verhaltens von serumarmen und serumreichen Zellen unter 24 Std Hypoxie und keiner weiteren Auffälligkeiten bei der Analyse der Atmung unter Oligomycin und FCCP wurden diese Versuche nur mit 1 % FCS durchgeführt.

Nach weiteren 24 Std, und damit insgesamt 48 Std Hypoxie, zeigte sich eine signifikant verringerte Sauerstoffaffinität der pulmonalarteriellen Zellen in Verbindung mit einem ebenfalls signifikant verringerten maximalen Sauerstoffverbrauch. Respirometrisch konnte gezeigt werden, dass PASMCs nach 48-stündiger hypoxischer Inkubation um 60,4 % (T1 bzw. 50,5 %, T2) höhere Werte für p50 im Vergleich zur Zellen aus normoxischer Inkubation aufwiesen. Die maximale Atmung nahm nach 48 Std Hypoxie um 54,5 % (T1 bzw. T2: 55,2 %) ab.

Im Vergleich zwischen 24 und 48 Stunden hypoxischer Inkubation konnte eine signifikante Abnahme der Sauerstoffaffinität bei tendenziell niedrigerem Sauerstoffverbrauch festgestellt werden.

Die Ergebnisse zeigten demnach mit wachsender Hypoxiedauer signifikant größere Werte für p50, sowie niedrigere Werte für V_{\max} , gleichbedeutend mit einer geringeren mitochondrialen Atmung unter Hypoxie.

Ursächlich dafür kann 1) eine Einschränkung der Substrate, z. B. durch Erniedrigung von Pyruvat 2) eine Erniedrigung der Atmungskettenkomplexaktivität durch a) posttranslationale Modifikationen, z.B. Phosphorylierung und oxidative Schädigung durch ROS oder b) Veränderung der Atmungskettenkomplexisoformen oder c) Erniedrigung der Atmungskettenkomplexanzahl sowie 3) Erniedrigung des mitochondrialen ADP-Produktionsbedarfs, z.B. durch erhöhte glykolytische ATP-Produktion, sein. Der auslösende Faktor hierfür ist noch nicht ausreichend geklärt, es liegen aber Daten vor, die Schäden in den Mitochondrien, z. B. durch Einfluss von ROS, sowie einer Anpassung der Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit und Erniedrigung der Pyruvatkonzentration durch Erhöhung der Pyruvatdehydrogenasekinase nahelegen^{4, 33, 74}. Es konnte experimentell bereits nachgewiesen werden, dass die Aktivität von Komplex IV der ETC in pulmonalarteriellen Endothelzellen von Patienten mit iPAH

signifikant geringer war, als in Vergleichszellen aus gesunden Lungen¹⁰⁶. Außerdem ist bekannt, dass chronische Hypoxie die Isoform-Zusammensetzung von Komplex IV verändert⁷⁴. Inwiefern die metabolischen Umbauvorgänge eine Relevanz für die Proliferation der PSMCs bei pulmonaler Hypertonie haben, muss noch genauer untersucht werden. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass eine Aktivierung der mitochondrialen Atmung mit Dichloroacetat (DCA) als selektivem Inhibitor der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK) zu einer Verminderung der PH im Tiermodell führen kann. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass DCA zu einer selektiven Apoptose-Induktion in pulmonalarteriellen Gefäßen, verbunden mit einer Depolarisation, einer gesteigerten mitochondrialen ROS-Produktion (mROS), sowie einer Hemmung von HIF führen kann^{11, 16}.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass iPAH-PAEC-Zellen (iPAH: idiopathic PAH; PAEC: pulmonary artery endothelial cells, pulmonalarterielle Endothelzellen) vor allem in state 3-Atmung, also unter ausreichend exogenem Substrat- und ADP-Angebot, einen geringeren Sauerstoffverbrauch aufwiesen, als Kontrollzellen (PAEC gesunder Spenderlungen). Dabei konnte kein Unterschied im respiratorischen Kontroll-Index, dem Verhältnis von Sauerstoffverbrauch und ATP-Produktion, nachgewiesen werden¹⁰⁶.

In den hier vorliegenden Untersuchungen konnte kein signifikanter Unterschied des phosphorylierten Respiratorischen Kontroll-Quotienten (RCRp), mit welchem gemessen wurde, wie viel Prozent der Atemarbeit zur ATP-Produktion verwendet wird, zwischen normoxisch und hypoxisch inkubierten PSMCs nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die mitochondriale Atmung unter Hypoxie nicht durch die zelluläre ATP-Nachfrage aktiviert wurde, obwohl die Ruheatmung, und damit die mitochondriale ATP-Produktion, erniedrigt war. Möglicherweise wurde der zelluläre ATP-Bedarf von anaerober Glykolyse aufrechterhalten. Dazu passend konnte in iPAH-PAEC gezeigt werden, dass diese trotz geringerem Sauerstoffverbrauch und verminderter Mitochondrienfunktion unter Raumluftbedingungen ähnliche ATP-Gehalte aufwiesen, wie gesunde Kontrollzellen¹⁰⁶. Unter Hypoxie (2 % O₂ für 4 Std) fiel der ATP-Gehalt in iPAH-Zellen nicht signifikant, während er in Kontrollzellen abfiel. Aus der größeren Toleranz der iPAH-Zellen gegenüber Hypoxie kann geschlussfolgert werden, dass sie eine geringere Energie-Abhängigkeit hinsichtlich der zellulären Atmung zeigen, was eine anaerobe zelluläre Energiequelle induziert. Mithilfe eines FDG-PET-Scans (FDG: [¹⁸F]fluoro-deoxy-D-Glucose, PET: Positronen-Emissions-Tomografie) konnte in intakten Lungen von iPAH-Patienten eine erhöhte glykolytische Aktivität im Lungengewebe nachgewiesen werden¹⁰⁶. In ersten Studien konnte auch in PAH-

PASMCs erhöhte glykolytische Aktivitäten gemessen werden. Interessanterweise konnten sowohl in pulmonalarteriellen Zellen als auch in Endothelzellen aus PAH-Lungen ähnliche Auffälligkeiten gesehen werden. Unter anderem zeigten sie eine atypische Aktivierung von HIF-1 α sowie verstärkte Glykolyseraten¹⁶. Somit sind die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten, die auf eine verminderte mitochondriale Atmung unter Hypoxie und Normoxie sowie eine erhöhte glykolytische ATP-Produktion hinweisen, vereinbar mit der sogenannten metabolischen Theorie zur Entstehung der PH⁴.

Die erniedrigte Sauerstoffaffinität weist auf eine Änderung der Atmungskettenkomplexkomposition, v.a. unterschiedliche Expression der Isoformen der Cytochrom-c-Oxidase^{73, 74}, oder aber auch erniedrigtes ATP/ADP Verhältnis hin. Wie bereits oben ausgeführt, führt ein niedriges ATP/ADP-Verhältnis unter bestimmten Umständen zu einem erhöhten p50³⁰. Eine Zunahme des p50 nach chronisch hypoxischer Inkubation, und damit Abnahme der Sauerstoffaffinität, kann unterschiedliche Auswirkungen auf das Verhalten der PASMCs unter akuter Hypoxie haben. Dies könnte zu einem stärkeren Hypoxiesensing führen; spricht allerdings gegen die bisherigen Untersuchungen, die eine verminderte HPV nach chronisch hypoxischer Inkubation zeigten. Möglicherweise ist der Desensibilisierungsprozess im Down-Stream-Signaling der Hypoxie-induzierten Signalkaskade zu suchen.

6.3.3. Auswirkungen der chronisch hypoxischen Inkubation auf die Mitochondrienzahl

Als Ursache für die Abnahme der mitochondrialen Atmung konnte keine Veränderung der Mitochondrienzahl in den PASMCs, bestimmt durch die Citrat-Synthase-Aktivität, detektiert werden. Im Gegensatz dazu fand die Gruppe um Dromparis eine geringere Mitochondriendichte in FHR-PAH PASMCs (FHR: fawn-hooded rats) im Vergleich zu gesunden PASMCs. Auch hinsichtlich der Morphologie zeigten sich Unterschiede, erstere erschienen eher unterbrochen, letztere filamentös. Es kann vermutet werden, dass eine generelle Dysfunktion der Zellorganellen, ausgelöst durch PAH, existiert, welche das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und das Mitochondrium betreffen¹⁶. In einer anderen Studie fanden sich bei gleicher Morphologie quantitativ geringere Mitochondrienzahlen in iPAH-Endothelzellen als in gesunden Zellen¹⁰⁶. Um nachzuweisen, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten hypoxisch inkubierten Zellen keine veränderte Mitochondrienzahl besaßen und deshalb eine verminderte Atmung aufwiesen, wurde die mitochondriale Citrat-Synthase-Aktivität bestimmt. Mit

Hilfe dieser zusätzlichen Messung konnte gezeigt werden, dass die Citrat-Synthase-Aktivität in normoxisch und 24 Std hypoxisch inkubierten PSMCs vergleichbar blieb. Auch in Versuchen mit 48 Stunden hypoxisch inkubierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen konnte keine Veränderung der mitochondrialen Citratsynthaseaktivität gemessen werden (noch nicht veröffentlichte Daten, Medizinische Doktorarbeit von Phillipp Krug, freundlicherweise zur Verfügung gestellt).

Die Citrat-Synthase-Aktivität wird häufig als Marker für die Mitochondrienzahl verwendet. Eine Regulation der Citrat-Synthase-Aktivität wurde bisher nicht beschrieben, sie scheint bezogen auf die Proteinmenge konstant zu bleiben³. Es kann daher aus einer unveränderten Citrat-Synthase-Aktivität geschlossen werden, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen Veränderungen der mitochondrialen Atmung der PSMCs nach hypoxischer Inkubation nicht auf verminderten Mitochondrienzahlen beruhen.

6.4. VERÄNDERUNGEN DES CYTOCHROMALEN REDOX-STATUS UNTER CHRONISCHER HYPOXIE

Die mitochondriale Atmungskette wurde bereits als möglicher Sauerstoffsensoren unter Hypoxie beschrieben⁹⁵. Besonders der ROS-Produktion an Komplex I oder III der mitochondrialen Atmungskette wird eine essentielle Rolle beim Sauerstoffsensing unter akuter und chronischer Hypoxie zugesprochen. Dabei existieren, wie bereits oben ausgeführt, zwei gegensätzliche Hypothesen bezüglich der Rolle von ROS. Während eine Hypothese eine Erhöhung der ROS-Produktion propagiert, geht eine weitere von einer Erniedrigung der ROS-Produktion aus. Beides würde unter akuter Hypoxie zu einer erhöhten Kalzium-Freisetzung und damit zur Kontraktion führen. Unter chronischer Hypoxie spielt möglicherweise zusätzlich eine ROS-abhängige HIF-1 α Regulation eine Rolle für den vaskulären Umbauprozess, der zur pulmonalen Hypertonie führt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung des als Transkriptionsfaktor geltenden Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF-1 α) eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Proliferation und damit dem Remodeling darstellt⁷³. HIF-1 besteht unter anderem aus der sauerstoffregulierten Untereinheit HIF-1 α und wird in Säugetieren für die Entwicklung aller Komponenten des kardiovaskulären Systems benötigt⁷⁴. Es wird wahrscheinlich in fast allen humanen Geweben sowie in Nagern exprimiert und gilt als notwendiger Mediator für die O₂-Homöostase⁷³. Sowohl die

Halbwertszeit als auch die spezifische Aktivität von HIF-1 α werden direkt durch die zelluläre O₂-Konzentration reguliert⁷⁴. Die Stabilisierung beginnt bei ca. 5 % O₂ (37,5 mmHg, 5 kPa) und nimmt mit fallender O₂-Konzentration exponentiell zu³³. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass eine Aktivierung unabhängig vom pO₂ auftreten kann¹¹. Noch unklar ist, ob HIF-1 α durch eine steigende oder fallende mitochondriale ROS-Produktion aktiviert wird. ROS trägt aber wahrscheinlich zur Stabilisierung von HIF-1 α während Hypoxie bei, wofür eine funktionierende mitochondriale Atmungskette benötigt wird. Inhibitoren der ETC sind in der Lage, dies zu verhindern³³.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass ROS, gebildet an Komplex III, essentiell für die HIF-Aktivierung ist³³. In früheren Untersuchungen konnte eine Arbeitsgruppe aus dem Labor, in dem die vorliegende Doktorarbeit angefertigt wurde, bereits eine Hypoxie-abhängige Redox-Veränderung der mitochondrialen Cytochrome darstellen⁸². Dabei wurde Cytochrom *b*, das an wesentlichen Elektronentransferschritten im Komplex III beteiligt ist, bei niedrigeren pO₂-Partialdrücken reduziert, als die Cytochrome *a* und *c*. Dies unterstreicht möglicherweise die Wichtigkeit von Komplex III bei der ROS-Produktion unter Hypoxie in dem Sinne, dass Elektronen an alternative Akzeptoren (z.B. O₂), statt der downstream liegenden Cytochrome *c* und *a* weitergegeben werden und dadurch ROS bilden können.

Daher sollten die pO₂-abhängigen Veränderungen des mitochondrialen cytochromalen Redox-Status nach chronisch hypoxischer Inkubation untersucht werden. Da nach hypoxischer Inkubation eine erniedrigte Sauerstoffaffinität der PSMCs nachgewiesen werden konnte, wäre eine stärkere pO₂-abhängige Reduktion eventuell zu erwarten gewesen, was auf eine veränderte ROS-Produktion bei einem bestimmten pO₂ hindeuten könnte.

In den aktuellen Untersuchungen zeigte sich allerdings kein Unterschied der pO₂-abhängigen Reduktion nach 24 und 48 Std hypoxischer Inkubation. Spektren normoxisch inkubierter PSMCs zeigten in den eigenen Untersuchungen erste signifikante Reduktionen einzelner Cytochrome (hier Cytochrom *c*) bereits ab einer Sauerstoffkonzentration von \leq 5 % (37,5 mmHg, 5kPa). Bei 3 % O₂ (22,5 mmHg, 3 kPa) zeigte sich eine Reduktion der Cytochrome *a* und *c*, die Reduktion aller Cytochrome erfolgte bei \leq 1 % O₂ (7,5 mmHg, 1 kPa) Sauerstoff. Zudem wurde Cytochrom *b* bei 1 % O₂ (7,5 mmHg, 1 kPa) signifikant weniger reduziert als die Cytochrome *a* und *c*. Eine Reduktion von Cytochrom *a* bedeutet dabei, dass bedingt durch die Hypoxie, der Elektronentransfer auf Sauerstoff verringert ist⁸². Somit zeigte sich in diesen Messungen erneut eine hohe Aktivität des mitochondrialen

Elektronentransfers auch bei niedrigen O_2 -Konzentrationen. Dies stimmt mit der respirometrisch bestimmten hohen Sauerstoffaffinität der Mitochondrien in PSMCs überein und wurde bereits in früheren Untersuchungen gezeigt⁸².

Im Vergleich hinsichtlich der pO_2 -abhängigen Reduktion der Cytochrome zwischen normoxisch und 24 Std hypoxisch inkubierten PSMCs ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen. Eine signifikante Reduktion begann ab 1 % O_2 (7,5 mmHg, 1 kPa). In 24 Std hypoxisch inkubierten Zellen fiel ebenfalls auf, dass Cytochrom *b* bei 1 % O_2 signifikant weniger reduziert wurde, als die Cytochrome *a* und *c*.

Ebenso zeigte sich kein Unterschied zwischen den normoxisch, 24 Std hypoxisch und 48 Std hypoxisch inkubierten Zellen. Gegebenenfalls könnte dies das Korrelat einer strukturellen Zellveränderung durch chronische Hypoxie sein. Anhaltspunkte dafür ergeben sich aus visuell lichtmikroskopisch gesehenen Zellveränderungen nach dem Versuchsprotokoll im Respirometer. Aufgrund dieser allgemein „schlechteren Zellqualität“ (Lichtmikroskopische Beurteilung in Zellkultur) könnten sich größere Schwankungsbreiten ergeben und kleine Unterschiede möglicherweise nicht ausreichend gemessen werden. Diese Veränderungen konnten jedoch qualitativ nicht ausreichend beurteilt werden und sollten möglicherweise Gegenstand einer weiteren Studie sein.

Insgesamt stößt die in dieser Arbeit verwendete Methode der Remissions-Spektrophotometrie auf Limitationen bezüglich der Sensitivität. Vor allem im niedrigen Wellenlängenbereich kommt es zu Artefakten aufgrund von Streuveränderungen, die durch Veränderungen der Zellgröße und Zellzahl während der Messungen hervorgerufen werden. Dies erklärt möglicherweise den diskrepanten Befund hinsichtlich der Sauerstoffaffinität im Vergleich zu den respirometrischen Untersuchungen. Bei diesen konnte eine erniedrigte Sauerstoffaffinität bestimmt werden, während der fehlende Unterschied des pO_2 -abhängigen Redoxstatus keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Aktivität der Mitochondrien unter Hypoxie erlaubt. Zu erwarten gewesen wäre eine frühere Reduktion der mitochondrialen Atmungskettencytochrome bei erniedrigtem pO_2 , wohingegen bei erhöhtem pO_2 eine Reduktion bei höherem pO_2 zu erwarten gewesen wäre.

Zusätzlich muss man einschränkend bemerken, dass der cytochromale Redoxstatus aufgrund der Methode der Differenzspektrenmessung nur unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zum normoxischen Redoxstatus dargestellt werden konnte. Eine absolute Darstellung des Redoxstatus nach chronisch hypoxischer Inkubation im Vergleich zu normoxischer Inkubation ist daher nicht möglich.

Trotz dieser Einschränkungen lässt sich als wesentliches Ergebnis hervorheben, dass es auch nach chronisch hypoxischer Inkubation unter Hypoxie (1 % O₂) zu einer geringeren Reduktion von Cytochrom *b* kommt, die möglicherweise auf eine vermehrte ROS-Produktion an Komplex III hinweist⁸².

6.5. MITOCHONDRIALE ATMUNGSKETTENFUNKTIONEN IN AORTALEN GLATTEN MUSKELZELLEN NACH INKUBATION IN CHRONISCHER HYPOXIE

Um zu untersuchen, ob die Reaktion auf chronische Hypoxie spezifisch für pulmonalarterielle SMCs ist, wurden als Vergleichszellen aortale SMCs (ASMCs) aus dem Kaninchen verwendet. Diese wurden als Vertreter systemischer SMCs gewählt und bereits in anderen Studien als Vergleichszellen verwendet^{22, 82}.

Im direkten Vergleich von aortalen und pulmonalarteriellen SMCs wurden unter normoxischen Bedingungen weder für p50 noch für V_{max} signifikante Unterschiede sichtbar (vgl. ⁸²).

Nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation aortaler Zellen wurde der p50-Wert im Vergleich zu normoxischen aortalen Zellen um 52,8 % (T1 bzw. 46,8 % T2) größer. Im Vergleich zu pulmonalarteriellen hypoxisch inkubierten Zellen zeigten aortale Zellen in beiden Abatmungen höhere Werte für p50 (37,5 % T1 bzw. 36,8 % T2), womit pulmonalarterielle Zellen eine signifikant höhere Sauerstoffaffinität nach chronisch hypoxischer Inkubation aufweisen. Bei Betrachtung des V_{max} zeigte sich ein Abfall bei hypoxisch inkubierten aortalen Zellen im Vergleich zu normoxischen aortalen Zellen um 39,9% (T1 bzw. 37,2 % T2). Die maximale Atmung wurde damit deutlich eingeschränkt, vergleichbar zu PSMCs nach dieser Hypoxiedauer. Im Vergleich pulmonalarteriellen mit aortalen hypoxisch inkubierten Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im V_{max}.

Somit scheinen die Veränderungen der mitochondrialen Atmungskette unter chronischer Hypoxie nicht spezifisch für pulmonalarterielle SMCs zu sein. Allerdings weist die erhöhte Sauerstoffaffinität der PSMCs im Vgl. zu den ASMCs auf eine bessere Adaptation an chronische Hypoxie hin. Ob die quantitativen Unterschiede im Anstieg des p50-Wertes von physiologischer Relevanz sind, muss noch untersucht werden.

Zudem sollten die Wahl der Vergleichszellen kritisch hinterfragt werden. Wie bereits oben erwähnt werden aortale SMCs allerdings häufig als Vergleichszellen verwendet. Die in dieser Arbeit vermessenen präkapillären PSMCs sind in vivo nahezu dem alveolären $p_{\text{A}}\text{O}_2$ von ca. 105 mmHg (14 kPa) ausgesetzt⁴¹. Aortale Zellen sind in vivo aufgrund ihrer Nähe zu Herz und Lunge ebenfalls einem relativ hohen $p_{\text{a}}\text{O}_2$ von ca. 80 - 100 mmHg (ca. 11 - 13 kPa)⁴¹ ausgesetzt. Daher reagieren sie möglicherweise ähnlich auf chronische Hypoxie. Mit glatten Muskelzellen aus anderen Gefäßen, z.B. aus herzferneren Arterien wie der A. renalis (RASM: renal artery SMC) konnten bereits Unterschiede der Mitochondrien aufgezeigt werden. Beispielsweise zeigten RASMCs einen signifikant niedrigeren $p50$ als PSMCs und ASMCs⁸². Damit wären diese Zellen eventuell besser als Vergleichszellen geeignet. Unter anderem die Gruppe um Archer beschrieb eine gegensätzliche Reaktion von RASMCs, die mit sinkendem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und damit Relaxation auf Hypoxie reagierten, und PSMCs, die durch steigendes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kontrahierten⁵³. ASMCs als systemische Gefäße reagieren damit ebenfalls mit sinkendem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und Relaxation auf Hypoxie⁵³. Des Weiteren waren PSMC-Mitochondrien stärker depolarisiert als RASM-Mitochondrien⁵³. Erstere werden durch Perfusion mit hypoxischer Lösung hyperpolarisiert, wohingegen letztere depolarisiert werden⁵³.

6.6. SCHLUSSFOLGERUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von chronischer Hypoxie auf mitochondriale Funktionen in isolierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PSMCs) aus Kaninchen zu untersuchen (Abbildung 54). Dazu wurde erfolgreich ein Modell etabliert, um Eigenschaften der Mitochondrien unter verschiedenen Zellkulturbedingungen vergleichen zu können. In respirometrischen Messungen konnte festgestellt werden, dass Hypoxiephasen von unterschiedlicher Dauer die Sauerstoffaffinität von Mitochondrien verringerten ($p50\uparrow$) und den Sauerstoffverbrauch reduzierten ($V_{\text{max}}\downarrow$), und damit metabolische Veränderungen in PSMCs auslösen können. Unterschiede im $p\text{O}_2$ -abhängigen mitochondrialen Redox-Status konnten nicht gefunden werden.

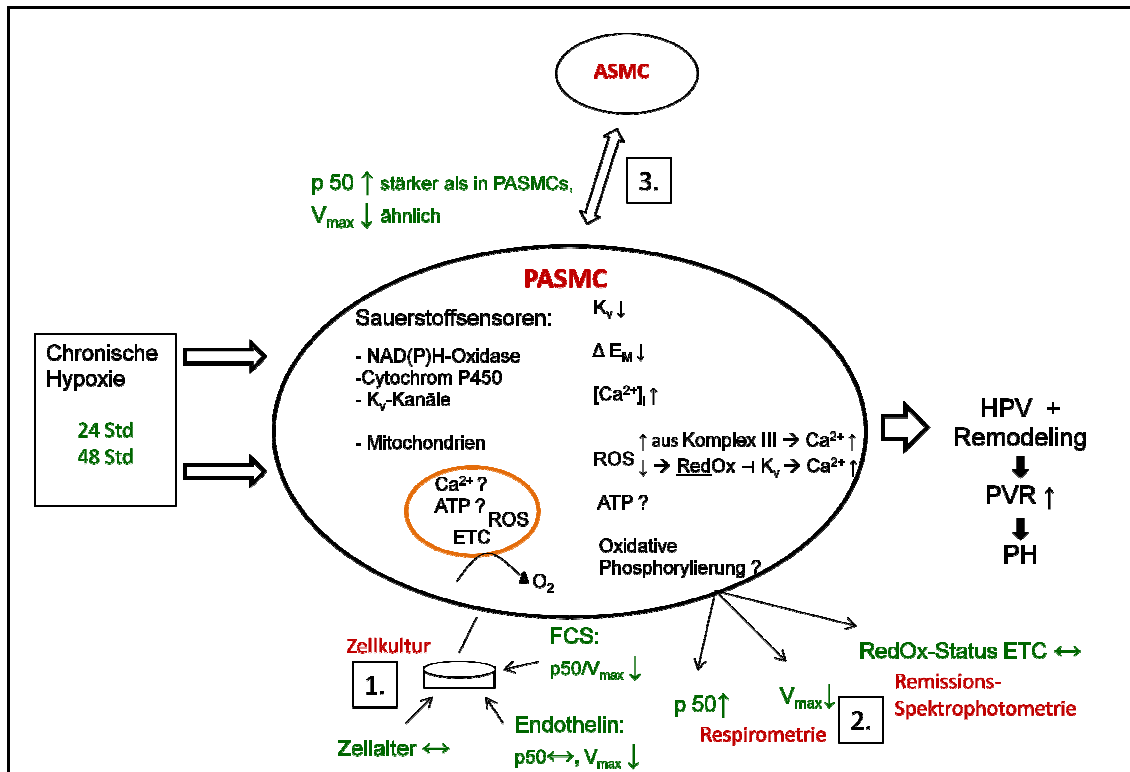


Abbildung 54: schematische Übersicht über die Auswirkungen chronischer Hypoxie auf PASMCs

Die möglichen metabolischen Veränderungen, die zur pulmonalen Hypertonie (PH) führen, sind noch nicht endgültig geklärt. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass unterschiedliches Zellkulturalter keinen Einfluss auf die mitochondriale Atmung pulmonalarterieller Zellen hat, diese aber durch unterschiedliche Konzentration an Wachstumsfaktoren (FCS) beeinflusst wird ($p50$ und V_{max} sinken). Durch chronisch hypoxische Inkubation konnten signifikante Veränderungen im Hinblick auf Sauerstoffaffinität ($p50 \uparrow$) und Sauerstoffverbrauch ($V_{max} \downarrow$) gemessen werden, allerdings nicht spezifisch für pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (PASMC). In aortalen glatten Muskelzellen (ASMC) konnte eine geringere Sauerstoffaffinität bei vergleichbarem Sauerstoffverbrauch nachgewiesen werden. Dagegen konnten keine signifikanten durch Hypoxie induzierten Veränderungen im Redox-Status mitochondrialer Atmungskettencytochrome gesehen werden (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 5).

HPV: Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion, PVR \uparrow : Erhöhung des peripheren vaskulären Widerstandes, $K_v \downarrow$: Hemmung der spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle, $\Delta E_M \downarrow$: Depolarisation des Membranpotenzials, $[Ca^{2+}]_i \uparrow$: intrazelluläre Kalzium-Konzentration steigt, ROS \uparrow/\downarrow : Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies steigt oder sinkt mit nachfolgender Erhöhung der Kalzium-Konzentration ($Ca^{2+} \uparrow$), ATP?: Auswirkungen auf Adenosinriphosphat sind noch ungeklärt, ebenso die Auswirkungen auf die Oxidative Phosphorylierung. RedOx: Reduktion und Oxidation, ETC: mitochondriale Elektronentransportkette, Std: Stunde(n), $p50$: Sauerstoffaffinität, V_{max} : maximaler Sauerstoffverbrauch, O_2 : Sauerstoff.

Quellen siehe Text.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) ist eine physiologische Anpassungsreaktion der Lungengefäße an Hypoxie. Dieser als von-Euler-Liljestrand-Mechanismus bekannte Vorgang dient zur Optimierung des Gasaustausches. Unter chronischer Hypoxie (z.B. COPD, Höhengaufenthalt) kommt es jedoch zu pathologischen Umbauvorgängen, die zu vaskulärem Remodeling und pulmonaler Hypertonie führen können. Als Sensor- und Effektorzellen konnten pulmonalarterielle glatte Gefäßmuskelzellen (PASMCs) identifiziert werden, welche durch Ca^{2+} -Einstrom kontrahieren und angeregt durch Transkriptionsfaktoren, wie z.B. HIF proliferieren. Mitochondrien sind sowohl am akuten Sauerstoffsensing als auch bei den chronischen Remodelingprozessen beteiligt. Möglicherweise spielen dabei die mitochondriale ROS-Produktion und metabolische Veränderungen eine Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob sich die mitochondriale Atmung sowie der Redox-Status mitochondrialer Atmungskettencytochrome in PASMCs unter chronischer Hypoxie verändern. Verglichen wurden die Ergebnisse mit Veränderungen in aortalen SMCs (ASMCs). In einer kombinierten Messung aus Respirometrie und Remissions-Spektrophotometrie wurden die mitochondriale Sauerstoffaffinität, die mitochondriale Atmung und der Redox-Status der Cytochrome untersucht. Nach Etablierung eines validen Zellkulturmodells wurden Messungen an 24 Std und 48 Std hypoxisch (1 % O_2) inkubierten Zellen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von 10 % FCS im Versuchsmedium die Zellkulturbedingungen hinsichtlich Aussaat oder Passage keinen Einfluss auf die Sauerstoffaffinität (p_{50}) oder den maximalen Sauerstoffverbrauch (V_{max}) haben. Serumarme Zellen (1 % FCS) dagegen wiesen im Vergleich zu serumreichen Zellen (10 % FCS) niedrigere Werte für beide Parameter auf. Nach hypoxischer Inkubation wurde nach 24 Std eine Abnahme von V_{max} gesehen, welche nach 48 Std zunahm. Eine Reduktion der Sauerstoffaffinität konnte nach 48 Std hypoxischer Inkubation detektiert werden. Dabei veränderte sich die Mitochondrienzahl, gemessen an der Citrat-Synthase-Aktivität, nicht. In aortalen Vergleichszellen nahm die Sauerstoffaffinität nach 24 Std hypoxischer Inkubation stärker als in PASMCs ab, der maximale Sauerstoffverbrauch war vergleichbar mit demjenigen in PASMCs.

In der Spektrophotometrie zeigte sich kein Unterschied in der $p\text{O}_2$ -abhängigen cytochromalen Reduktion bei hypoxisch inkubierten Zellen.

Zusammenfassend zeigte sich eine verminderte Atmung und Sauerstoffaffinität hypoxisch inkubierter PASMCs, die möglicherweise Auswirkungen auf die Proliferation und das vaskuläre Remodeling unter chronischer Hypoxie haben.

8. SUMMARY

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is a physiological response of the lung to hypoxia and is also known as von-Euler-Liljestrand-mechanism, which optimizes blood perfusion to ventilation. In contrast, chronic hypoxia (as occurring in COPD or high altitude) leads to pathological changes and can result in pulmonary hypertension (PH) and vascular remodeling. The precapillary pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) could be identified as sensor- and effector cells as they contract and proliferate in response to hypoxia mediated by Ca^{2+} -entry and transcription factors, e.g. HIF. Mitochondria take part in both, acute oxygen sensing and chronic remodeling processes. Mitochondrial ROS-production and metabolic changes are discussed to be essential for these alterations.

Aim of this dissertation was to investigate, if mitochondrial respiration and cytochromal redox-state of the mitochondrial respiratory chain complexes in PASMCs show alterations under conditions of chronic hypoxia. These results were compared to aortal SMCs (ASCMs). The protocol consisted of a combination of respirometry and remissions-spectrophotometry to analyze mitochondrial oxygen affinity, oxygen consumption and cytochromal redox state. After establishment of a valid cell culture model, measurements in cells after 24 and 48 hours of hypoxic incubation (1 % O_2) were performed.

It could be shown that cell culture conditions with regard to passage or sowing did not have any effect on oxygen affinity (p 50) or oxygen consumption (V_{max}). Cells incubated with 1 % FCS showed a decrease in both values compared to cells cultured with 10 % FCS. After hypoxic incubation (1 % O_2), a decrease in V_{max} after 24 hours could be detected, which was increased after 48 hours. In contrast, a decrease of oxygen affinity only could be seen after 48 hours of hypoxic incubation. During 24 hours hypoxic incubation, the number of mitochondria was constant, measured by citrate synthase activity. In comparison to pulmonary artery cells, in aortal cells oxygen affinity was more reduced after 24 hours of hypoxic incubation with similar values of oxygen consumption.

In spectrophotometry, no significant difference in pO_2 -dependent reduction of cytochromes could be found.

In conclusion, pulmonary artery smooth muscle cells showed a decrease in respiration and oxygen affinity after hypoxic incubation. This may affect proliferation and vascular remodeling in conditions of chronic hypoxia.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(cyt) $a_{(3)}$, $b_{(LH)}$, $c_{(1)}$	Cytochrome $a_{(3)}$, $b_{(LH)}$, $c_{(1)}$
$[Ca^{2+}]$	Kalzium-Konzentration
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalzium-Konzentration
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
24 hox / 48 hox	kurz für: (24 / 48 Std) hypoxisch inkubierte Zellen
A	Aussaat
A. / Aa.	Arteria / Arteriae
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
AK	Antikörper
ALK (1)	activin-like kinase (type-1)
AOS	activated oxygen species, aktivierte Sauerstoffspezies
ARDS	acute respiratory distress syndrome, akutes Lungenversagen
ASMC(s)	aortal smooth muscle cell(s), aortale glatte Muskelzelle(n)
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BMP	bone morphogenetic protein
BMPR 2	bone morphogenetic protein receptor type 2
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
Ca^{2+}	Kalzium
cGMP	zyklisches Guanidin-Mono-Phosphat
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronic obstructive pulmonary disease, chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CS	Citrat Synthase
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DCA	Dichloroacetat

dest.	destillata
DNA	desoxy-ribonuclein-acid, Desoxyribonucleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline
DPI	Diphenyleneiodonium
DTNB	5,5' dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
e ⁻	Elektron
E _M	Membranpotenzial
Et-1	Endothelin-1
ETC	electron-transport-chain
FAD	oxidiertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonyl-Cyanide <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazone
FCS	fetal calf serum, Wachstumsfaktoren
FITC	fluorescein isothiocyanate
FMN	oxidiertes Flavin-Mononukleotid
FMNH ₂	reduziertes Flavin-Mononukleotid
G	Gauge (Angabe für Außendurchmesser von Kanülen)
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF-1 α	hypoxia inducible factor 1 α , Hypoxie-induzierbarer Faktor
hox	kurz für: hypoxisch inkubierte Zellen
hPAH	hereditäre pulmonalarterielle Hypertonie
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
i.v.	intravenös
iPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
K ⁺	Kalium
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
km	Kilometer
kPa	Kilopascal
K _v	voltage gated potassium-channel, spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
l	Liter
ln	natürlicher Logarithmus
m	Meter

M	Mol
M 199	Medium 199
m ²	Quadratmeter
max.	maximal
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	molar
ms	Millisekunde
n	Anzahl der Messungen / Versuche
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natrium-Chlorid
NAD ⁺	oxidiertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nox	kurz für: normoxisch inkubierte Zellen
Ø	Durchmesser
O ₂	Sauerstoff
od.	oder
P	Passage
p50	Sauerstoffpartialdruck bei halbmaximaler Atmung, Sauerstoffaffinität
PA	Pulmonalarterie
Pa	Pascal
PAEC	pulmonary artery endothelial cells
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
p _A O ₂	alveolärer Sauerstoffpartialdruck
p _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAP	pulmonary arterial pressure

PASMC(s)	Pulmonary artery smooth muscle cell(s), pulmonalarterielle glatte Muskelzellen
pCO ₂	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PH	Pulmonale Hypertonie
P _i	organisches Phosphat, Orthophosphat
PKC	Protein-Kinase C
pmol	Pikomol
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVR	pulmonary vascular resistance
Q	Ubichinon
QH ₂	Ubichinol
RASMC(s)	renal artery SMC(s), SMCs aus Nierenarterien
RedOx	Reduktion und Oxidation
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SDT	Sodiumdithionid
sem	standard error of the mean, Standardfehler
SMAD	intrazelluläres Signalprotein und Transkriptionsfaktor im Signalling des transforming growth factors β (TGF- β)
SMC(s)	smooth muscle cell(s), glatte Muskelzellen
sog.	sogenannt
Std	Stunde(n)
T	Transition / Abatmung
U	Unit
u.	und
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
V/Q	Ventilations-Perfusions-Quotient
vgl.	vergleiche
V _{max}	maximaler Sauerstoffverbrauch, mitochondriale Atmung
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor
x	Dicke der Membran
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Verzeichnisse

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Elektronentransportkette mit Inhibitoren	6
Abbildung 2: Grafische Darstellung der Reaktion der Lungengefäße auf alveoläre Hypoxie	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Muskularisierung unter Hypoxie	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung über die Auswirkungen akuter und chronischer Hypoxie auf pulmonalarterielle glatte Gefäßmuskulzellen.....	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zielsetzung der Arbeit.....	27
Abbildung 6: Isolierung von PASMCs aus Kaninchen.....	33
Abbildung 7: Zellisolierung PASMCs: präparierte Lunge	34
Abbildung 8: Zellisolierung von ASMCs	35
Abbildung 9: Hypoxiekammer.....	39
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Hypoxiekammer.....	39
Abbildung 11: Air calibration	41
Abbildung 12: Background calibration	42
Abbildung 13: Bestimmung der Sauerstoffaffinität	43
Abbildung 14: Bestimmung der endogenen Atmung, des Protonenleaks, der maximalen Atmungskettenkapazität und der nicht mitochondrialen Zellatmung.....	45
Abbildung 15: Versuchsaufbau für Remissions-Spektrophotometrie.....	47
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der kombinierten Respirometrie und Remissions-Spektrophotometrie	48
Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf des Redox-Status der Cytochrome.....	50
Abbildung 18: Berechnetes Summationsspektrum	50
Abbildung 19: ELISA-Platte für das Citrat-Synthase Assay	52
Abbildung 20: Färbung mit SM- α -Actin	56
Abbildung 21: Färbung mit Antikörpern	57
Abbildung 22: Färbung mit Vimentin als Positivkontrolle.....	57
Abbildung 23: Färbung ohne Primärantikörper als Kontrollfärbungen	57
Abbildung 24: p50 normoxisch inkubierter serumreicher PASMCs, Vergleich von Aussaat, Passage und Transition	59
Abbildung 25: V_{max} normoxisch inkubierter serumreicher PASMCs, Vergleich von Aussaat, Passage und Transition	59

Abbildung 26: p50 normoxisch inkubierter PSMCs, Vergleich von serumreichen und serumarmen Zellen	61
Abbildung 27: V_{max} normoxisch inkubierter PSMCs, Vergleich von serumreichen und serumarmen Zellen	61
Abbildung 28: p50 normoxisch inkubierter PSMCs, Effekt von Endothelin-1	62
Abbildung 29: V_{max} normoxisch inkubierter PSMCs, Effekt von Endothelin-1.....	63
Abbildung 30: p50 serumreicher PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie	64
Abbildung 31: V_{max} serumreicher PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie	64
Abbildung 32: p50 serumarmer PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie	65
Abbildung 33: V_{max} serumarmer PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie	66
Abbildung 34: p50 serumreicher PSMCs, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie	67
Abbildung 35: V_{max} serumreicher PSMCs, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie	67
Abbildung 36: p50 serumreicher ASMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie	68
Abbildung 37: V_{max} serumreicher ASMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie	69
Abbildung 38: p50 normoxisch inkubierter Zellen, Vergleich von ASMCs und PSMCs	69
Abbildung 39: V_{max} normoxisch inkubierter Zellen, Vergleich von ASMCs und PSMCs	70
Abbildung 40: p50 24 Std hypoxisch inkubierter Zellen, Vergleich von ASMCs und PSMCs.....	71
Abbildung 41: V_{max} 24 Std hypoxisch inkubierter Zellen, Vergleich von ASMCs und PSMCs.....	71
Abbildung 42: Atmungsphasen serumarmer PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie	73
Abbildung 43: Atmungsquotienten serumarmer PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie	74
Abbildung 44: Citrat-Synthase-Aktivität in serumreichen PSMCs, Vergleich von Normoxie und 24 Std Hypoxie	75
Abbildung 45: Sauerstoffabhängige Spektren normoxisch inkubierter PSMCs.....	76

Abbildung 46: Sauerstoffabhängige Spektren 24 Std hypoxisch inkubierter PSMCs 77
Abbildung 47: Sauerstoffabhängige Spektren 48 Std hypoxisch inkubierter PSMCs 77
Abbildung 48: Spektren von PSMCs bei 1 % O₂, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie 78
Abbildung 49: Spektren von PSMCs bei 0 % O₂, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie 78
Abbildung 50: Reduktionsstatus mitochondrialer Cytochrome von normoxisch inkubierten PSMCs 79
Abbildung 51: Reduktionsstatus mitochondrialer Cytochrome von 24 Std hypoxisch inkubierten PSMCs 80
Abbildung 52: Reduktionsstatus mitochondrialer Cytochrome von 48 Std hypoxisch inkubierten PSMCs 80
Abbildung 53: Reduktionsstatus mitochondrialer Cytochrome, Vergleich von Normoxie, 24 Std Hypoxie und 48 Std Hypoxie 81
Abbildung 54: schematische Übersicht über die Auswirkungen chronischer Hypoxie auf PSMCs..... 98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste verwendeter Chemikalien 29
Tabelle 2: Liste verwendeter Antikörper 30
Tabelle 3: Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien 30
Tabelle 4: Liste verwendeter Geräte..... 31
Tabelle 5: Atmungsphasen..... 46
Tabelle 6: Atmungsquotienten 46

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Stoffwechsel- und Formelsammlung Biochemie. 1. Auflage 2005; Elsevier GmbH, *Urban & Fischer Verlag*, München.
- (2) BIO-RAD DC Protein Assay Instruction Manual. *BIO-RAD* 2008.
- (3) Kuznetsov AV, Lassnig B, Gnaiger E. Laboratory Protocol Citrate Synthase Mitochondrial Marker Enzyme. *Oroboros, Course on High-Resolution Respirometry* 2006.
- (4) Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JG, Weir EK. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294(2):H570-78.
- (5) Archer SL, Huang J, Henry T, Peterson D, Weir EK. A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res* 1993; 73(6):1100-12.
- (6) Archer SL, Marsboom G, Kim GH et al. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 2010; 121(24):2661-71.
- (7) Bánfi B, Clark R, Steger K, Krause K. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 2003; 278(6):3510-3
- (8) Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86(8):485-98.
- (9) Benninghoff A, Drenckhahn DH. *Anatomie Band 2*. 16. Auflage 2004; Elsevier GmbH, *Urban & Fischer Verlag*, München, Jena.
- (10) Benninghoff A, Drenckhahn DH. *Anatomie Band 1*. 16. Auflage 2002; Elsevier GmbH, *Urban & Fischer Verlag*, München, Jena.
- (11) Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ et al. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and

- triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006; 113(22):2630-41.
- (12) Bradford JR, Dean H. The pulmonary circulation. *J Physiol* 1984; 12(1-2), 34-158.
- (13) Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 2000; 275(33):25130-8.
- (14) Cornfield DN, Stevens T, McMurtry IF, Abman SH, Rodman DM. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 265(1 Pt 1):L53-L56.
- (15) Deng Z, Morse JH, Slager SL et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* 2000; 67(3):737-44.
- (16) Dromparis P, Sutendra G, Michelakis ED. The role of mitochondria in pulmonary vascular remodeling. *J Mol Med* 2010; 88(10):1003-10.
- (17) Dumas JP, Bardou M, Goirand F, Dumas M. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Gen Pharmacol* 1999; 33(4):289-97.
- (18) Euler U, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 1946; 12:301-20.
- (19) Faller A. *Der Körper des Menschen*. 12.Auflage 1995; Thieme-Verlag, Stuttgart, New York.
- (20) Fu XW, Wang D, Nurse CA, Dinauer MC, Cutz E. NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(8):4374-79.
- (21) Fuchs B, Sommer N, Dietrich A et al. Redox signaling and reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; 174(3), 282-91.
- (22) Fuchs B. Die essenzielle Bedeutung des "Classical Transient Receptor Potenzial 6" (TRPC6)-Ionenkanals für die akute vaskuläre Hypoxiereaktion der Lunge -

- Untersuchungen an isolierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen.
Inaugural Dissertation 2006; Giessen, Zentrum für Innere Medizin.
Medizinische Klinik und Poliklinik II.
- (23) Garedew A, Haffner B, Hütter E, Gnaiger E. An Experiment with High-Resolution
Respirometry: Phosphorylation Control in Cell Respiration. 2. Auflage, *MIPNet*
10 4 2008;2.2.A2.
- (24) Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL. Proteins homologous to p47phox and
p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon
epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278(22):20006-12.
- (25) Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F et al. Hypoxia- and non-hypoxia-
related pulmonary hypertension - established and new therapies. *Cardiovasc*
Res 2006; 72(1):30-40.
- (26) Gnaiger E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and
phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir*
Physiol 2001; 128(3):277-97.
- (27) Gnaiger E. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-
resolution respirometry to assess mitochondrial function. *Drug-Induced*
Mitochondrial Dysfunction 2008; John Wiley and Sons, 327-52.
- (28) Gnaiger E. DatLab4 Oxygen Calibration. *Mitochondrial Physiology Network*
Oxygraph-2k Manual 2006; 1-10.
- (29) Gnaiger E, Renner K. High-resolution respirometry with cultured cells: A
demonstration experiment. *OROBOROS Protocols* 2003.
- (30) Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Mendez G, Eberl T, Margreiter R. Control of
mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr* 1995;
27(6):583-96.
- (31) Golenhofen K. Physiologie. 1.Auflage 1997; *Urban & Schwarzenberg*, München,
Wien, Baltimore.
- (32) Groves BM, Reeves JT, Sutton JR et al. Operation Everest II: elevated high-
altitude pulmonary resistance unresponsive to oxygen. *J Appl Physiol* 1987;
63(2):521-30.

- (33) Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 2006; 91(5):807-19.
- (34) Hillier SC, Graham JA, Hanger CC, Godbey PS, Glenny RW, Wagner WW, Jr. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J Appl Physiol* 1997; 82(4):1084-90.
- (35) Hollis VS, Palacios-Callender M, Springett RJ, Delpy DT, Moncada S. Monitoring cytochrome redox changes in the mitochondria of intact cells using multi-wavelength visible light spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1607(2-3):191-202.
- (36) Houston CS, Sutton JR, Cymerman A, Reeves JT. Operation Everest II: man at extreme altitude. *J Appl Physiol* 1987; 63(2):877-82.
- (37) Humbert M, Morrell NW, Archer SL et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S):13S-24S.
- (38) Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 2001; 92(1):1-20.
- (39) Kato M, Staub NC. Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia. *Circ Res* 1966; 19(2):426-40.
- (40) Kemp PJ. Hemeoxygenase-2 as an O₂ sensor in K⁺ channel-dependent chemotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338(1):648-52.
- (41) Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S. Physiologie. 5. Auflage 2005; Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- (42) Kutznetsov A, Lassnig B, Gnaiger E. Citrate Synthase - Mitochondrial Marker Enzyme. *Oroboros, Course on High-Resolution Respirometry, OROBOROS Protocols*. 2006.
- (43) Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K 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):888-94.

- (44) Leach RM, Robertson TP, Twort CH, Ward JP. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1994; 266(3 Pt 1):L223-31.
- (45) Lin MJ, Leung GP, Zhang WM et al. Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004; 95(5):496-505.
- (46) Lippert H. Lehrbuch Anatomie. 4. Auflage 1996; *Urban & Schwarzenberg*, München, Wien, Baltimore.
- (47) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
- (48) Madden JA, Vadula MS, Kurup VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992; 263(3 Pt 1):L384-93.
- (49) Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res* 2004; 68(2):75-103.
- (50) Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Moe GW. Selective endothelin receptor blockade reverses mitochondrial dysfunction in canine heart failure. *J Card Fail* 2002; 8(5):326-32.
- (51) Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15(5):633-44.
- (52) Meyer G. Analyse von MHC II Molekülen und Beladungskofaktoren in gereinigten Dünndarmepithelzellen der Maus 2003; *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- (53) Michelakis ED, Hampf V, Nsair A et al. Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circ Res* 2002; 90(12):1307-15.
- (54) Michelakis ED, Thebaud B, Weir EK, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a

- mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37(6):1119-36.
- (55) Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 2005; 98(1):390-403.
- (56) Olschewski H. Dana Point: what is new in the diagnosis of pulmonary hypertension?. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133 Suppl 6:S180-82.
- (57) Orchard CH, Sanchez de LR, Sykes MK. The relationship between hypoxic pulmonary vasoconstriction and arterial oxygen tension in the intact dog. *J Physiol* 1983; 338:61-74.
- (58) Osipenko ON, Evans AM, Gurney AM. Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O₂-sensing potassium current. *Br J Pharmacol* 1997; 120(8):1461-70.
- (59) Pak O, Aldashev A, Welsh D, Peacock A. The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *Eur Respir J* 2007; 30(2):364-72.
- (60) Peake MD, Harabin AL, Brennan NJ, Sylvester JT. Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species. *J Appl Physiol* 1981; 51(5):1214-19.
- (61) Peng W, Michael JR, Hoidal JR, Karwande SV, Farrukh IS. ET-1 modulates KCa-channel activity and arterial tension in normoxic and hypoxic human pulmonary vasculature. *Am J Physiol* 1998; 275(4 Pt 1):L729-39.
- (62) Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL et al. Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(5):C1540-49.
- (63) Reuter P. Springer Lexikon Medizin 2004; 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- (64) Robertson TP, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca²⁺ in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca²⁺ sensitization. *Am J Physiol* 1995; 268(1 Pt 2):H301-07.
- (65) Rohrer DK, Kobilka BK. G protein-coupled receptors: functional and mechanistic insights through altered gene expression. *Physiol Rev* 1998; 78(1):35-52.

- (66) Rose F, Grimminger F, Appel J et al. Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. *FASEB J* 2002; 16(12):1660-61.
- (67) Rounds S, McMurtry IF. Inhibitors of oxidative ATP production cause transient vasoconstriction and block subsequent pressor responses in rat lungs. *Circ Res* 1981; 48(3):393-400.
- (68) Said SI. Mediators and modulators of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291(4):L547-58.
- (69) Sakai T, Ishizaki T, Nakai T, Matsukawa S, Hayakawa M, Ozawa T. Mitochondrial dysfunction in acute lung injury caused by endothelial-1 and leukotoxin. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1996; 34(8):843-49.
- (70) Sato K, Morio Y, Morris KG, Rodman DM, McMurtry IF. Mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction involves ET(A) receptor-mediated inhibition of K(ATP) channel. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(3):L434-42.
- (71) Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Anatomie 1999; 8. Auflage, *Springer Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York.
- (72) Schnedl W, Mikelsaar AV, Breitenbach M, Dann O. DIPI and DAPI: fluorescence banding with only negligible fading. *Hum Genet* 1977; 36(2):167-72.
- (73) Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88(4):1474-80.
- (74) Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 2007; 405(1):1-9.
- (75) Sham JS. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: ups and downs of reactive oxygen species. *Circ Res* 2002; 91(8):649-51.
- (76) Simonneau G, Galie N, Rubin LJ et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S):5S-12S.
- (77) Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(1 Suppl):S43-S54.

- (78) Sjolund M, Madsen K, von der MK, Thyberg J. Phenotype modulation in primary cultures of smooth-muscle cells from rat aorta. Synthesis of collagen and elastin. *Differentiation* 1986; 32(2):173-80.
- (79) Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; 103(6 Pt 2):2787-96.
- (80) Sommer N. Mitochondria and Cellular Cytochromes as Oxygen Sensors in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction 2011; *Dissertation*, Department of Medicine of Justus Liebig University Giessen.
- (81) Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT et al. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J* 2008; 32(6):1639-51.
- (82) Sommer N, Pak O, Schörner S et al. Mitochondrial cytochrome redox states and respiration in acute pulmonary oxygen sensing. *Eur Respir J* 2010; 36(5):1056-66.
- (83) Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* 2006; 99(7):675-91.
- (84) Stenmark KR, Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:89-144.
- (85) Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. Biochemie. 6. Auflage 2007; *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- (86) Suh YA, Arnold RS, Lassegue B et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; 401(6748):79-82.
- (87) Sylvester JT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a radical view. *Circ Res* 2001 ; 88(12):1228-30.
- (88) Takeya R, Ueno N, Kami K et al. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 2003; 278(27):25234-46.

- (89) Thomas HM, Carson RC, Fried ED, Novitch RS. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by diphenylethylidenehydrazide. *Biochem Pharmacol* 1991; 42(7):R9-12.
- (90) Trakada G, Marangos M, Spiropoulos K. Mechanisms of endothelin-1 elevation in chronic obstructive pulmonary disease patients with nocturnal oxyhemoglobin desaturation. *Respiration* 2001; 68(2):134-39.
- (91) Vadula MS, Kleinman JG, Madden JA. Effect of hypoxia and norepinephrine on cytoplasmic free Ca²⁺ in pulmonary and cerebral arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993; 265(6 Pt 1):L591-97.
- (92) Veit F. Einfluss von Monocrotalin auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies der pulmonalerteriellen glatten Muskelzellen von *Rattus norvegicus* 2008; *Dissertation*, University of Giessen Lung Center, Zentrum für Innere Medizin.
- (93) Voelkel NF, Cool C, Lee SD, Wright L, Geraci MW, Tuder RM. Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest* 1998; 114:225S-30S.
- (94) Ward JP, Aaronson PI. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right? *Respir Physiol* 1999; 115(3):261-71.
- (95) Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* 2001; 88(12):1259-66.
- (96) Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* 2002; 91(8):719-26.
- (97) Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* 2005 J; 98(1):404-14.
- (98) Weissmann N, Ebert N, Ahrens M et al. Effects of mitochondrial inhibitors and uncouplers on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29(6):721-32.
- (99) Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(2):L314-17.

- (100) Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol* 1995; 100(2):159-69.
- (101) Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 2006; 71(4):620-29.
- (102) Weissmann N, Zeller S, Schafer RU et al. Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(4):505-13.
- (103) Welsch U. Lehrbuch Histologie. 1. Auflage 2003; *Urban & Fischer Verlag*, München, Jena.
- (104) Wilson HL, Dipp M, Thomas JM, Lad C, Galione A, Evans AM. Adp-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. a primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Biol Chem* 2001; 276(14):11180-88.
- (105) Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbell GR. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001; 49(3):130-45.
- (106) Xu W, Koeck T, Lara AR et al. Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(4):1342-47.
- (107) Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Ionic currents in rat pulmonary and mesenteric arterial myocytes in primary culture and subculture. *Am J Physiol* 1993; 264(2 Pt 1):L107-15.
- (108) Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Inhibition of cytochrome P-450 reduces voltage-gated K⁺ currents in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol* 1995; 268(1 Pt 1):C259-70.
- (109) Yuki K, Suzuki T, Katoh S, Kakinuma Y, Miyauchi T, Mitsui Y. Endothelin-1 stimulates cardiomyocyte injury during mitochondrial dysfunction in culture. *Eur J Pharmacol* 2001; 431(2):163-70.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Veröffentlicht:

N. Sommer, O. Pak, S. Schörner, T. Derfuss, A. Krug, E. Gnaiger, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, C. Huckstorf, W. Seeger, F. Grimminger and N. Weissmann:

Mitochondrial cytochrome redox states and respiration in acute pulmonary oxygen sensing

European Respiratory Journal 2010, Volume 36 Number 5, 1056 - 1066

Abstract und Vortrag:

S. Schörner, N. Sommer, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, W. Seeger, F. Grimminger, N. Weissmann:

Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion - Sauerstoffsensitivität mitochondrialer Funktionen in akuter und chronischer Hypoxie

Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin – Herbsttagung der Sektion Zellbiologie, München 12. - 13. Oktober 2007

Abstract und Poster:

S. Schörner, N. Sommer, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, W. Seeger, F. Grimminger, N. Weissmann:

Sauerstoffsensitivität mitochondrialer Funktionen von pulmonalarteriellen Gefäßmuskelzellen in akuter und chronischer Hypoxie

49. Kongress der deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, 09. – 12. April 2008 in Lübeck

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Erklärung zur Dissertation:

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

 Giessen, den 03. Juli 2013

Ort, Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die auf ganz unterschiedliche Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Prof. Norbert Weißmann für die Überlassung des Themas, der Betreuung und Durchsicht dieser Arbeit sowie Herrn Prof. Werner Seeger für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit. Beiden danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Dr. Natascha Sommer danke ich herzlich für die Themenstellung, die Betreuung der gesamten Arbeit, ihre kompetente Hilfe und Unterstützung bei allen Fragestellungen.

Ein weiterer Dank gilt Carmen Homberger, Sabine Gräf-Höchst und Miriam Wessendorf für wertvolle Hilfestellungen in der Zellkultur, sowie Ingrid Breitenborn-Müller für die Einführung in die Proteinbestimmung.

Dem gesamten Laborteam möchte ich für interessante fachliche Gespräche und kollegiales Arbeiten danken, das die zeitintensive Laborarbeit abwechslungsreich und oft kurzweilig gestaltet hat.

E. Gnaiger von OROBOROS Instruments sowie T. Derfuss und A. Krug von LEA Medizintechnik Gießen danke ich für die technische Unterstützung.

Nicht zu vergessen meine Eltern, Hans-Joachim Schörner und Ulrike Knörzer-Schörner, meine Geschwister Philip und Markus und meine Großeltern, die mir mein Studium und damit diese Doktorarbeit ermöglichten, mich in allen Phasen und mit allen Mitteln unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

Ebenfalls danken möchte ich meinen Freunden, vor allem Paul Steffen, Nora Hausotter-Will und Monika Christner, die immer ein offenes Ohr hatten.