

Aus dem *Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS)*/

Cardio-Pulmonary Institute (CPI)

Innere Medizin II

am Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Inaugural-Dissertation

**Die Rolle der NADPH-Oxidase (NOX)-Untereinheit,
Nox Organizer 1 (NOXO1), in der Pathogenese des
Zigarettenrauch-induzierten Lungenemphysem und der
pulmonalen Hypertonie im Mausmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

von

Mariola Bednorz (Dipl. Biologin)

aus Wiesbaden

Gießen 2020

Die vorliegende Arbeit wurde am *Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS)/ Cardio-Pulmonary Institute (CPI)* in der Zeit vom Mai 2012 bis Oktober 2020 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Norbert Weißmann angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek
Dekan des Fachbereichs (FB) 08
Heinrich-Buff-Ring 17
35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Lakes-Harlan
Institut für Tierphysiologie, FB 08
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 38
35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann
*Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS)/
Cardio-Pulmonary Institute (CPI),*
Justus-Liebig-Universität Gießen
Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II/V,
Aulweg 130, 35392 Gießen
(University of Giessen and Marburg Lung Center, UGMLC)

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2020

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE ANATOMIE DER SÄUGERLUNGE	1
1.1.1	<i>Gasaustausch der Lunge und der Blutkreislauf</i>	2
1.1.2	<i>Anatomie von Blutgefäßen und Alveolen</i>	3
1.2	CHRONISCH OBSTRUKTIVE LUNGENERKRANKUNG (COPD)	5
1.2.1	<i>Definition</i>	5
1.2.2	<i>Epidemiologie</i>	7
1.2.3	<i>Risikofaktoren bei COPD</i>	8
1.2.3.1	<i>Zigarettenrauch</i>	9
1.2.3.2	<i>Genetische Faktoren</i>	10
1.2.3.3	<i>Umweltverschmutzungen</i>	11
1.2.3.4	<i>Weitere Faktoren</i>	11
1.3	PATHOPHYSIOLOGIE DER COPD	12
1.3.1	<i>Chronische Bronchitis</i>	13
1.3.2	<i>Obstruktion der kleinen Bronchiolen</i>	13
1.3.3	<i>Emphysem</i>	14
1.3.4	<i>Pulmonalvaskuläre Veränderungen</i>	14
1.4	DAS ZIGARETTENRAUCH-INDUZIERTES EMPHYSEM BEI MÄUSEN	16
1.5	SYSTEMISCHE VERÄNDERUNGEN	17
1.6	PATHOGENESE DER COPD	18
1.6.1	<i>Inflammation</i>	18
1.6.1.1	<i>Makrophagen</i>	19
1.6.1.2	<i>Neutrophile Granulozyten</i>	20
1.6.1.3	<i>T-Lymphozyten</i>	20
1.6.2	<i>Proteasen-Antiproteasen Gleichgewicht</i>	21
1.6.3	<i>Apoptose</i>	22
1.6.4	<i>Oxidativer Stress</i>	23
1.7	NADPH-OXIDASEN ALS QUELLE REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES (ROS)	25
1.7.1	<i>Die NADPH-Oxidase NOX1</i>	29
1.7.2	<i>NOX Organisator 1 (NOXO1)</i>	30
1.8	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	31
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	MATERIAL	33
2.2	VERSUCHSTIERE	43
2.2.1	<i>Primerdesign und verwendete Primer</i>	44
2.3	METHODEN	47

2.3.1 Mausstämme	47
2.3.1.1 C57BL/6Ntac Maus	47
2.3.1.2 Noxo1 ^{-/-}	47
2.3.1.3 Zigarettenrauchexposition in der Zigarettenrauchmaschine	47
2.3.1.4 Versuchsgruppen	49
2.4 PHYSIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	50
2.4.1 Echokardiographie	50
2.4.2 Fluorescence Molecular Tomography kombiniert mit mikro-Computertomographie (FMT- μ CT)	51
2.4.3 Lungenfunktionsmessung mit dem flexiVent-System	52
2.4.3.1 Kalibrierung	52
2.4.3.2 Narkose und Intubation mittels Tracheotomie	53
2.4.3.3 Lungenfunktionsmessung	54
2.4.3.4 Software und Datenerfassung	55
2.4.3.5 Hämodynamische Messung	55
2.4.3.6 Vena jugularis	56
2.4.4 Blutentnahme	56
2.4.5 Lungenspülung und Lungenfixierung	57
2.4.6 Organentnahme	58
2.4.7 Messung der Rechtsherzhypertrophie	58
2.5.1 Alveoläre Morphometrie	59
2.5.2 Vaskuläre Morphometrie	61
2.5.3 Bestimmung des Gefäßlumens	63
2.5.4 Proliferative-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) Färbung	64
2.5.5 Stereologische Analyse in Paraffinlungenschnitten	66
2.6 BRONCHOALVEOLÄRE LAVAGE (BAL) DER MAUS	66
2.6.1 Bestimmung der Makrophagen aus der BAL	67
2.6.2 Zytospin aus der BAL	67
2.7 MESSUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES MITTELS ELEKTRONENSPINRESONANZ	67
2.7.1 Superoxid-Messung in PSMCs und ATII-Zellen	67
2.7.2 Messung der Wasserstoffperoxid Konzentration (H ₂ O ₂) in ATII-Zellen mit dem „AmplexRed Assay“	69
2.8 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	69
2.8.1 Laser-Mikrodissektion	69
2.8.2 RNA-Extraktion	70
2.8.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	70
2.8.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	70
2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese	70
2.8.6 Proteinaufreinigung des Lungengewebes	71
2.8.7 Bestimmung der Proteinkonzentration	71
2.8.8 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	72
2.8.9 Semi-Dry Western Blot	73

2.8.10 LC-MS/MS Protein Identifikation	74
2.9 MICROARRAY-ANALYSE IN MIKRODISSEKTIERTEN ALVEOLARSEPTEN UND PULMONALEN GEFÄßEN	74
2.10 STICKSTOFFMONOXID-ASSAY IN DER BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGE	75
2.11 ZELLKULTUR	75
2.11.1 Isolierung von murinen ATII-Zellen	75
2.11.2 Isolierung von murinen-pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs)	76
2.11.3 PASMCs-Kultivierung	77
2.11.4 Herstellung des Zigarettenrauchextrakts für die Behandlung von PASMCs- und ATII-Zellen	77
2.12 MESSUNG DER APOPTOSE	78
2.13 BESTIMMUNG DER PROLIFERATION	78
2.14 STATISTISCHE ANALYSEN	79
3 ERGEBNISSE	81
3.1 IN <i>Noxo1</i> KNOCKOUT MÄUSEN KOMMT ES ZUR KEINER LUNGENFUNKTIONSABNAHME NACH CHRONISCHER ZIGARETTENRAUCHEXPOSITION	81
3.2 <i>Noxo1</i> KNOCKOUT MÄUSE WEISEN KEINE EMPHYSEMENTWICKLUNG NACH 8-MONATIGER ZIGARETTENRAUCHEXPOSITION AUF	82
3.3 ZIGARETTENRAUCHEXPOSITION FÜHRT ZU KEINER PULMONALEN HYPERTONIE UND ZU KEINER RECHTSHERZHYPERTROPHIE-ENTWICKLUNG IN <i>Noxo1</i> ^{-/-} -MÄUSEN	85
3.4 ECHOKARDIOGRAPHISCHE EVALUIERUNG DER RECHTSVENTRIKULÄREN FUNKTION IN WT- SOWIE <i>Noxo1</i> ^{-/-} -MÄUSEN	87
3.5 EFFEKTE DER <i>Noxo1</i> -DELETION AUF DEN PULMONALVASKULÄREN UMBAU (<i>REMODELING</i>)	90
3.6 VERÄNDERUNGEN DES PROLIFERATIONSVERHALTENS IN WT- UND <i>Noxo1</i> ^{-/-} -MÄUSEN	95
3.6.1 Untersuchung der PCNA-Expression in Lungengewebeschnitten	95
3.6.2 Einfluss vom <i>Noxo1</i> Knockout auf die Proliferations- und Apoptoserate in PASMCs und ATII-Zellen	96
3.7 ÄNDERUNG INFLAMMATORISCHER ZELLEN IN DER BAL VON <i>Noxo1</i> ^{-/-} -MÄUSEN UND WT-MÄUSEN NACH CHRONISCHER ZIGARETTENRAUCHEXPOSITION	99
3.8 <i>IN VIVO</i> VISUALISIERUNG INFLAMMATORISCHER SIGNALWEGE UND APOPTOTISCHER PROZESSE	99
MITTELS FMT- μ CT IN DER LUNGE VON WT- UND <i>Noxo1</i> ^{-/-} -MÄUSEN NACH 8-MONATIGER ZIGARETTENRAUCHEXPOSITION	99
3.9 <i>Noxo1</i> ^{-/-} -MÄUSE ERZEUGEN WENIGER REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS) NACH ZIGARETTENRAUCHEXPOSITION SOWIE NACH EINER CSE-BEHANDLUNG ALS WT-MÄUSE	103
3.9.1 Detektion von ROS nach Zigarettenrauchexposition und CSE-Behandlung in isolierten PASMCs und ATII-Zellen	103
3.10 VERÄNDERUNG DER 3-NITROTYROSIN-MENGEN NACH 8-MONATIGER ZIGARETTENRAUCHEXPOSITION IN DEN LUNGEN VON WT-MÄUSEN UND <i>Noxo1</i> ^{-/-} -MÄUSEN	106
3.11 IDENTIFIZIERUNG NITRIERTER PROTEINE IM LUNGENHOMOGENAT MIT HILFE DER LC-MS/MS-ANALYSE AUS SDS-GELELEKTROPHORETISCHEN ISOLIERTEN GELPROBEN	107
3.12 NÄHERE UNTERSUCHUNGEN VON UPSTREAM/DOWNSTREAMS MECHANISMEN ZIGARETTENRAUCH-EXPONIERTER <i>Noxo1</i> KNOCKOUT MÄUSE UND WT-MÄUSE	109

3.12.1	Untersuchung der RNS-Bildung in der BAL von WT-Mäusen und Noxo1 Knockout Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition	109
3.12.2	Untersuchung der Mmp12- und Timp3-Expression unter chronischer Zigarettenrauchexposition in WT-Mäusen und in Noxo1 ^{-/-} -Mäusen	110
3.12.3	Genexpressionsanalysen in ATII-Zellen und PAMSCs von WT- und Noxo1 ^{-/-} -Mäusen nach CSE-Behandlung.....	112
3.13	GEN-EXPRESSIONSMUSTERANALYSEN VON SPEZIFISCHEN ZELLSIGNALWEGEN IN MIKRODISSEKTIERTEN PULMONALEN GEFÄßEN UND ALVEOLÄREN SEPTEN VON WT- UND Noxo1 ^{-/-} -MÄUSEN NACH 3- UND 8-MONATIGER ZIGARETTENRAUCHEXPOSITION ...	113
4	DISKUSSION	121
4.1	DAS MODELL DES ZIGARETTENRAUCH-INDUZIERTEN EMPHYSEMS	122
4.2	EIN NOXO1 KNOCKOUT SCHÜTZT MÄUSE VOR EINEM ZIGARETTENRAUCH-INDUZIERTEM EMPHYSEM UND EINER PULMONALEN HYPERTONIE	124
4.3	AUFKLÄRUNG DES NOXO1 SIGNALWEGES IN DER EMPHYSEM- UND DER PH-ENTWICKLUNG NACH CHRONISCHER ZIGARETTENRAUCHEXPOSITION	128
4.3.1	Downstream-assoziierte NOXO1-Signalwege.....	128
4.3.2	Upstream-assoziierte NOXO1-Signalwege	129
4.4	DELETION VOM NOXO1 BEDINGEN VERÄNDERUNGEN IM PROTEASE-ANTIPROTEASE-GLEICHGEWICHT MIT DEM FOKUS AUF MMP12 UND TIMP3, DIE IM ZUSAMMENHANG MIT EINER LUNGENEMPHYSEMSTEHUNG STEHEN	132
4.5	EINFLUSS EINER NOXO1-DELETION AUF SUPEROXID-ASSOZIIERTE GEWEBE- SOWIE ZELLULÄRE SCHÄDIGUNGEN, DIE ZUR EMPHYSEMBILDUNG UND EINER PH FÜHREN	135
4.6	EINFLUSS EINES NOXO1 KNOCKOUTS AUF ZELL-SPEZIFISCHE PATHWAYS WIE Z.B DIE APOPTOSE UND DIE PROLIFERATION IN PASMCS UND ATII-ZELLEN	140
5	AUSBLICK	145
6	ZUSAMMENFASSUNG	147
7	SUMMARY	149
8.	VERZEICHNISINDEX	V
	TABELLENVERZEICHNIS	VI
	FORMELVERZEICHNIS.....	VI
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS:	VII
	LITERATURVERZEICHNIS	XII
9.	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	LV
	DANKSAGUNG.....	LVI

Abkürzungsverzeichnis

% Prozent
°C Grad Celsius
Abb. Abbildung
ACO-2 Aconitat Hydratase 2, (mitochondrial)
ACTA2 Alpha-Actin-2,
ADAM A Disintegrin And Metalloprotease
ALDH1A1 Aldehyde Dehydrogenase
ALODA Aldolase A
ANP *Atrial Natriuretic Peptid*
AP-1 Activator Protein 1
APS Ammoniumpersulfat
ATI alveoläre Typ I Zellen
ATII alveoläre Typ II Zellen
ATP Adenosintriphosphat
Bad Bcl2-Antagonist of Cell Death
BAL Bronchoalveoläre Lavage
Bax Bcl2 Associated X Protein
Bcl B-cell lymphoma
BNP *Brain Natriuretic Peptid*
bp Basenpaare
BSA Bovines Serumalbumin
Casp3 Caspase 3 (Cysteiny-Aspartate Specific Protease)
CCL Chemokin (C-C Motiv) Ligand
CCT2 Chaperonin Containing subunit 2,
CD4⁺ Cluster of Differentiation 4
CD8⁺ Cluster of Differentiation 8
cDNA *complementary* DNA
CMH Cyclic Hydroxylamine 1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidine
CO Kohlenstoffmonoxid
COPD Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
COX Cyclooxygenase
CS Citratsynthase
CXC Chemokin (C-X-C Motiv)
CXCL Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand
CXCR Chemokin (C-X-C Motiv) Rezeptor
DAPI 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride
dest. Destiliert
DMEM Dulbecco's verändertes Adler Medium
DNA Desoxyribonukleinsäure
DNase Desoxyribonuklease
DPBS Dulbecco's Phosphate-buffered Saline
DPSYL2=Dihydropyrimidinase Like 2,
DUOX Dual Oxidase
EC Endothelzellen
EDTA Ethylendiamintetraacetat

EGF Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
EKG Elektrokardiographie
ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER Endoplasmatisches Retikulum
ERK Extracellular Signal-related Kinases
ERK1/2 Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 und 2
ERS *European Respiratory Society*
ESC *European Society of Cardiology*
EU Europäische Union
FAD Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS Fetales Kälberserum (*Fetal Calf Serum*)
FEV1 Einsekundenkapazität (engl.: *Forced Expiratory Volume in 1 Second*)
g Erdbeschleunigung
G gauge
G-CSF Granulozytenkolonien-stimulierender Faktor
GHz Gigahertz
GLUD1 Glutamatdehydrogenase
GM-CSF Granulozyten-Makrophagen Kolonien
GOLD Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GPDH Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase X-linked
GPI Glucose-6-Phosphat Isomerase
GSH Glutathion
GSN Gelsolin
GSTM1 Glutathione S-Transferase
GTP Guaninriphosphat
h Stunde
H⁺ Wasserstoffion
H₂O Wasser
H₂O₂ Wasserstoffperoxid
HBA-A2 Hemoglobin Alpha, Adult Chain 2
HCl Salzsäure
HE-Färbung Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HMGB1 High-Mobility-Group-Protein B1 (Protein)
Hmgb1 High-Mobility-Group-Protein B1
Hmox1 Hämoxygenase 1
HSP90ab1=Heat Shock Protein 90
kW Mikrowellenenergie
IL Interleukin
iNOS Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
JNK c-Jun-N-terminalen Kinasen
KCl Kaliumchlorid
kDa Kilodalton
kg Kilogramm
KG Körpergewicht
KH₂PO₄ Kaliumhydrogenphosphat

kHz Kilohertz
KO Knockout
l Liter
Lama4 Laminin Subunit Alpha 4
loxP Locus of X-pver P
LPS Lipopolysaccharid
LC-MS/MS Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
m Meter
M molar
m² Quadratmeter
m³ Kubikmeter
mA Milliampere
MAO Monoaminoxidase
MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase
max. maximal
mg Milligramm
min Minute
MEKK MAP Kinase
ml Milliliter
miR MicroRNA
miRNA MircoRNA
MIF Macrophage Inhibitory Factor
ml Mililiter
MLI Mean Linear Intersept (mittlerer Abstand zwischen Alveolarsepten)
mm Hg Millimeter Quecksilbersäule
mm Millimeter
mM Millimolar
mm² Quadratmillimeter
mmHg Millimeter Quecksilbersäule
MMP Matrix-Metalloproteinase
mPAP Mittlerer Pulmonalarterieller Druck
mRNA Messenger RNA
MSN Moesin
MW Mittelwert
n Anzahl der Messungen
N. *Nervus* (Nerv)
Na₂HPO₄ x 2H₂O Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl Natriumchlorid
NADPH Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NE Neutrophile Elastase
Nep Neuronale Endopeptidase
NfκB Nuclear Factor Kappa-Light-Chain Enhancer of Activated B-Cells
ng Nanogramm
nm Nanometer
nNOS neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO Stickstoffmonoxid

NOX NADPH-Oxidase
NOXO1 1 NADPH Oxidase Organizer 1
NPR-A Atriales Natriuretisches Peptid Rezeptor 1
Nr. Nummer
O₂ Sauerstoff
O₂⁻ Superoxid
OGG1 8-Oxoguanine glycosylase
OH Hydroxylanion
ONOO⁻ Peroxynitrit
OSS Oscillatory Shear Stress
P Druck
P/S Penicillin/Streptomycin
p38 p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PAAT Pulmonary Artery Acceleration Time
PAH Pulmonalarterielle Hypertonie
PAP Pulmonalarterieller Druck
PBGD Porphobilinogen Deaminase
PBS Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PC Personal Computer
PCR Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)
PDE Phosphodiesterase
PDGF Platelet Derived Growth Factor
PEEP Positive End-Expiratory Pressure
PH Pulmonale Hypertonie
phox Phosphizooxazolines
PI Phosphoinositiden
PI₃K Phosphoinositid-3-Kinasen-Serin/Threonin-Kinasen
PIP₂ Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PKC Proteinkinase C
PKM Pyruvate Kinase
PLC Phospholipase C
PMA Phorbol-12-myristat-13-Acetat
pmol Pikomolar
PMSF Phenylmethansulfonylfluorid
pO₂ Sauerstoff-Partialdruck
ppm Parts Per Million (Teile von einer Million)
PRDX6 Peroxiredoxin
PS Phosphatidylserin
PVDF Polyvenylidendifluorid
R Rückwärts
RAC Rho-like GTPase
Ras Rat sarcoma (G-Protein Ras)
RCF Relative Zentrifugalbeschleunigung
Raf Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
RE RaumlufTEXposition
RIPA Radioimmunoprecipitation assay Buffer

RNA Ribonukleinsäure
Rnf RING Finger Domain
RNS Reactive Nitrogen Species (reaktive Stickstoffspezies)
ROS Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm Revolutions Per Minute (Umdrehungen pro Minute, UpM)
RT-PCR Real-Time Polymerase-Kettenreaktionen
RV Rechter Ventrikel
RVSP Right Ventricular Systolic Pressure (rechtsventrikulärer systolischer Druck)
S Septum
s.c. Subkutan
SAP Systemic Arterial Pressure (systemisch-arterieller Druck)
SAPK Stress-Activated Protein Kinases
SDS Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec. Sekunde
SEM Standard Error Mean (Standardfehler)
SOD Superoxiddismutase
Tab. Tabelle
TAE Tris-Acetat-EDTA
TAPSE Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion
TBST Tris Buffered Saline with Tween (Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween)
TEMED Tetramethylethyldiamin
TGF- β Transformierender Wachstumsfaktor β
TIMP Tissue inhibitor of Matrixmetalloproteinase (Protein)
Timp3 Tissue inhibitor of Matrixmetalloproteinase 3
Tlr4 Toll-like Rezeptor 4
TNF-R1 Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1
TNF α Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
tRNA transfer RNA
TV Tidal Volume (Atemzugvolumen)
V Volt oder Volumen
V. Vena (Vene)
v.a. Vor allem
VIM Vimentin,
v/v Volumen pro Volumen
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
vWF Von Willebrand Faktor
w/v Gewicht (*weight*) pro Volumen
WARS Tryptophan- tRNA Ligase
WHO Weltgesundheitsorganisation
WT Wildtyp
 μ g Mikrogramm
 μ l Mikroliter
 μ m Mikrometer
 μ M Mikromolar
z.B. Zum Beispiel
ZE Zigarettenrauchexposition

1 Einleitung

1.1 Die Anatomie der Säugerlunge

In der Tierwelt gibt es verschiedene Atmungsorgantypen, die sich in ihrer Funktion unterscheiden. Sie alle dienen demselben Zweck, dem Gasaustausch zwischen der Umgebung und dem Blut. Dieser Vorgang wird auch als „äußere Atmung“ beschrieben und ist für die Aufnahme des Sauerstoffes sowie der Abgabe des Kohlenstoffdioxids notwendig. Des Weiteren gibt es die „Zellatmung“ oder auch „innere Atmung“ genannt, die den Gasaustausch zwischen Blut und Zellen beschreibt ⁶⁴. Die menschliche Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln, die sich in der Pleurahöhle befinden und dort von den Rippen und dem Diaphragma begrenzt werden ³⁰³. Durch Furchen werden die Lungenflügel in Lungenlappen unterteilt. Der linke Lungenflügel (*Pulmo sinister*) besteht aus zwei Lungenlappen (*Lobus superior* und *Lobus inferior*). Der rechte Lungenflügel besteht dagegen aus drei Lungenlappen, einem oberen, mittleren und unteren Lungenlappen. Die jeweiligen Lungenlappen sind in verschiedene Lungensegmente eingeteilt, dabei erfolgt die Zuordnung der Segmente dem mit Luft versorgenden Bronchialast. Der rechte Lungenflügel wird in zehn Segmente unterteilt, dagegen besteht der linke Lungenflügel nur aus neun Segmenten. Dem linken Lungenflügel fehlt aus evolutionären Entwicklungen das siebte Segment, sodass dadurch das Herz mehr Raum im Thorax bekommt. Gewöhnlicher Weise ist der linke Lungenflügel durch das Fehlen des siebten Segments kleiner als der rechte Lungenflügel. Die einströmende Luft gelangt über die Nase sowie den Mund in die Luftröhre (*Trachea*), die sich in zwei Hauptbronchien (*Bronchi principales*) teilt. Die beiden Hauptbronchien verzweigen sich zu Lappenbronchien (*Bronchi lobares*), weiterhin in die Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*) bis hin zu den terminalen Bronchiolen. Die aufgezählten Strukturen ausgehend von der Trachea bis einschließlich der terminalen Bronchien dienen ausschließlich der Leitung der Atemgase und werden als anatomischer Totraum klassifiziert, da in diesen Bereichen kein Gasaustausch stattfindet. Die terminalen Bronchiolen gehen ihrerseits in das respiratorische funktionelle System über, welches aus den respiratorischen Bronchiolen (*Bronchi respiratorii*), den Alveolargängen (*Ductuli alveolares*), den Alveolarsäckchen (*Sacculi alveolares*) und den Lungenbläschen (Alveolen) bestehen ^{64; 116}. Die menschliche Lunge enthält etwa 300×10^6 Alveolen und zusammen mit einem dichten Netz aus Lungenkapillaren bilden Sie eine bis zu 100 m² große Oberfläche für den Gasaustausch von O₂ und CO₂ ³⁴⁵.

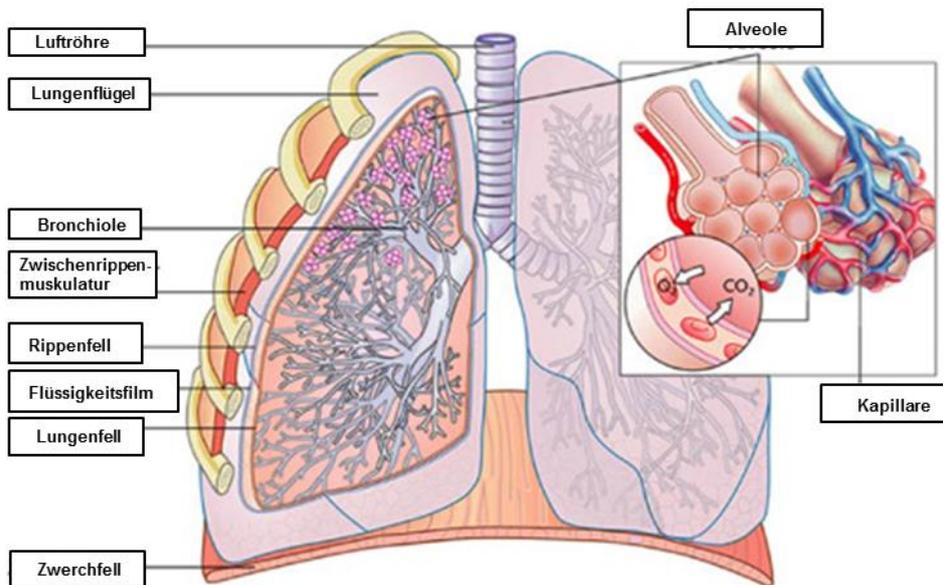


Abbildung 1: Darstellung der menschlichen Lunge. Sauerstoff (O_2)- und Kohlenstoffdioxid (CO_2)- Austausch in den Alveolen. (modifiziert aus www.julius-ecke.de)

1.1.1 Gasaustausch der Lunge und der Blutkreislauf

Der Körper benötigt den Gasaustausch, um sich mit dem lebensnotwendigen Sauerstoff zu versorgen und andererseits das Kohlenstoffdioxid, ein Produkt aus der Zellatmung, zu entsorgen. Durch das vegetative Nervensystem wird die Atmung gesteuert. Die eingeatmete Luft füllt Luftröhre sowie Bronchien und dringt bis in die Lungenbläschen vor. Der Austausch von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid zwischen den Alveolen, dem Blut und dem Gewebe erfolgt über die passive Diffusion. Die unterschiedlich vorliegenden Partialdrücke lassen die Gase nach dem physikalischen Diffusionsgesetz von einem höher liegenden Partialdruck zu Bereichen mit einem niedrigeren Partialdruck über die Blut-Luft-Schranke diffundieren ¹⁰². Der atmosphärische Sauerstoffpartialdruck befindet sich bei etwa 160 mmHg und der von Kohlenstoffdioxid bei 0,2 mmHg. In den Lungenbläschen herrschen andere Bedingungen, hier liegt der Kohlenstoffdioxidpartialdruck bei 40 mmHg und der von Sauerstoff bei 100 mmHg, sodass Sauerstoff aus der Atmosphäre in die Alveolen diffundiert und vice versa Kohlenstoffdioxid aus den Alveolen in die Atmosphäre dringt. In den Lungenarterien ist der O_2 -Partialdruck niedriger, hier liegt dieser bei etwa 40 mmHg. Diese physikalischen Bedingungen gewährleisten, dass das Blut mit Sauerstoff angereichert werden

kann. Der pulmonalarterielle CO₂-Partialdruck liegt bei 45 mmHg und kann aus dem Blut in den Alveolen abtransportiert werden ³⁹⁹. Säugetiere besitzen zwei Blutkreisläufe, die hintereinandergeschaltet sind. Venöses (sauerstoffarmes) Blut wird aus dem großen Körperkreislauf zum rechten *Atrium* des Herzens geleitet und wird von dort über den rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie (*Arteria pulmonalis*) geführt. Dort fließt das Blut in den zu den Bronchien parallel verlaufenden pulmonalarteriellen Gefäßen bis zu den Kapillarnetzen der Alveolen, wo es mit Sauerstoff angereichert wird. Das sauerstoffreiche (arterielle) Blut fließt über die Lungenvene (*Vena pulmonalis*) in das linke *Atrium* und in den linken *Ventrikel*. Von dort aus wird es über die Aorta in den Körperkreislauf gepumpt ⁶⁴.

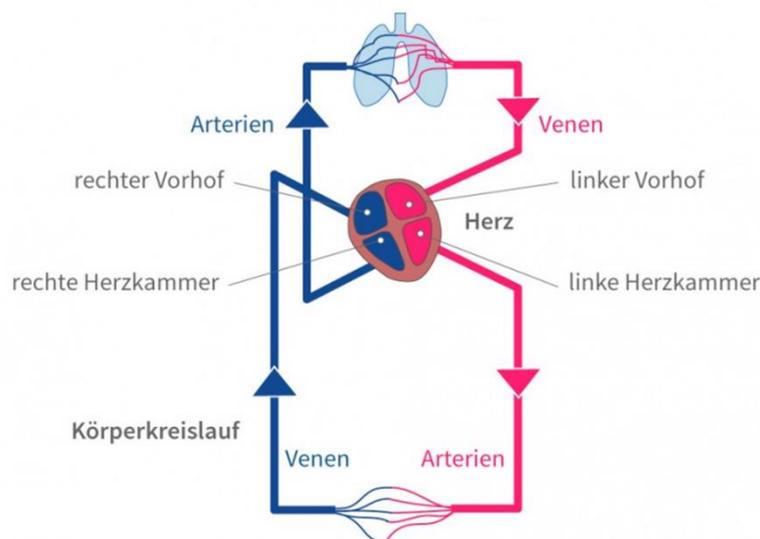


Abbildung 2: Lungen- und Körperkreislauf des Blutes. Die Fließrichtung des Blutes ist durch die Pfeile angegeben. Sauerstoffarmes Blut ist in blauer Farbe und sauerstoffreiches Blut ist in roter Farbe dargestellt. (modifiziert aus onmeda.de© 2015)

1.1.2 Anatomie von Blutgefäßen und Alveolen

Die Blutgefäße werden in folgende Gefäßarten kategorisiert: die Hauptschlagader (*Aorta*), die Schlagadern (*Arterien*), kleine Schlagadern (*Arteriolen*), die Haargefäße (*Kapillaren*) die kleinen Venen (*Venolen*), Blutadern (*Venen*) und in die die Hohlvene (*Vena cava*). Die Gefäßwand besteht aus verschiedenen Schichten. Arterien und Venen besitzen eine äußere Schicht (*Tunica adventitia*), eine mittlere Schicht (*Tunica media*) und eine innere Schicht (*Tunica intima*). Im Gegensatz zu den Venen verfügen Arterien noch zusätzlich über zwei elastische Faserschichten. Der Bronchialraum der Lunge trägt auf luminaler Seite ein Epithel, das aus verschiedenen Zelltypen besteht. Das respiratorische Epithel ist mit Becherzellen,

Club-Zellen und serösen Zellen ausgekleidet, die für den Transport des Bronchialschleims und für die Reinigung der Atemwege verantwortlich sind ^{133; 257}. Die kleinsten Verzweigungen der Bronchien, die so genannten Bronchiolen führen zu den *Bronchioli respiratorii* und weiterführend zu den Lungenbläschen (Alveolen). Das alveoläre Epithel ist mit zwei Zelltypen ausgekleidet, den flachen alveolären Typ I-Zellen (ATI) sowie den kubischen alveolären Typ II-Zellen (ATII). Die ATI-Zellen bilden mit den kleinen Kapillaren die Blut-Luft-Schranke und sind für den Gasaustausch verantwortlich. Über die ATII-Zellen wird das oberflächenaktivierende *Surfactant* sekretiert, welches die Oberflächenspannung in den Alveolen reduziert und eine Kollabierung der Lungenbläschen verhindert ^{253; 393}. Weiterhin regulieren sie ist den Ionen- und Flüssigkeitstransport ²⁵⁴. ATII-Zellen sind teilungsaktiv, besitzen sogar Stammzellfunktionen, da sie in der Lage sind, sich zu ATI-Zellen auszudifferenzieren.

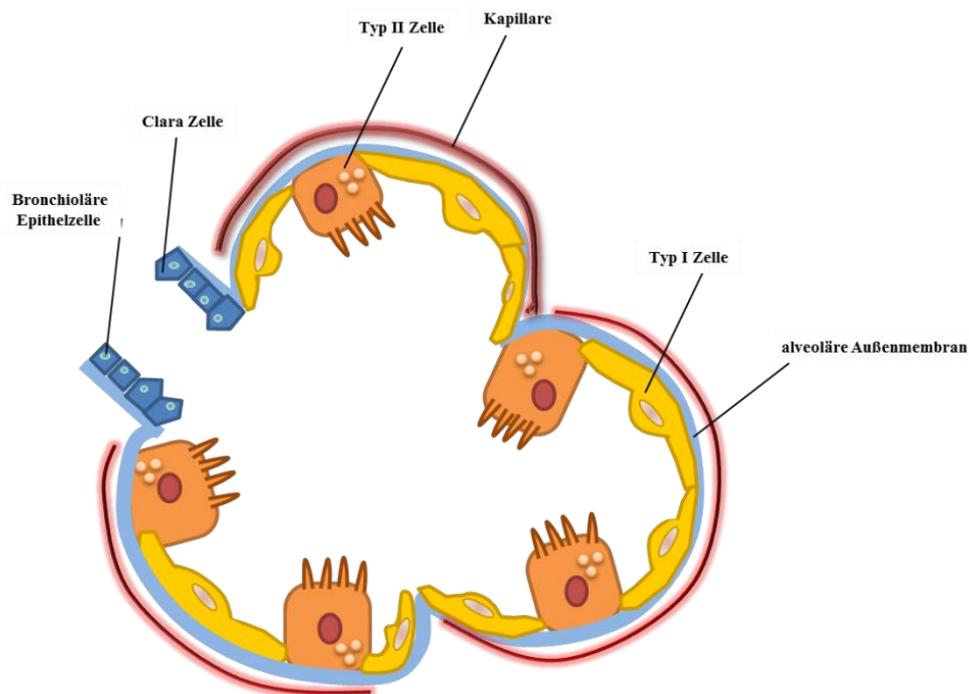


Abbildung 3: Schematisches Bild der epithelialen Auskleidung eines Alveolus. ATI- und ATII-Zellen kleiden das alveoläre Epithel vorherrschend aus. Club- und bronchiale Epithelzellen sind für die Clearance- und Mukus-Produktion notwendig.

1.2 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.2.1 Definition

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, COPD) gehört zu den lebensbedrohlichsten Lungenerkrankungen weltweit und kann bis dato nicht geheilt werden ²³⁴. Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die chronisch obstruktive Lungenerkrankung durch ein progressiv limitierenden Atemstrom charakterisiert und mit einer chronische-entzündliche Immunantwort der Lungen assoziiert ^{31; 36}. Die Atemwegslimitation betrifft nicht nur die großen und zentralen Atemwege (chronische Bronchitis), sondern tritt auch in den kleinen Bronchiolen (*small airway diseases*), die als periphere Atemwege bezeichnet werden, auf ^{30; 154}. Die strukturellen Veränderungen und die Verengung (Atemwegsobstruktion) der kleinen Bronchiolen werden durch die chronische Entzündung ausgelöst und resultieren in einer Atemwegsfibrose, einer chronischen Bronchitis, sowie einem pulmonalen Emphysem. Dieses entsteht durch den Verlust der Lungenelastizität und den Verlust der alveolären Verbindungen (Destruktion des Lungenparenchyms) und zugleich korreliert dies mit der Vergrößerung des Luftraumes in der Lunge ²⁹. Die wesentlichen Beschwerden einer COPD werden als die sogenannten „AHA“-Symptome beschrieben (www.COPD-aktuell.de).

- ❖ **Auswurf:** beim Husten hervorgebrachter Schleim aus den Atemwegen
- ❖ **Husten:** vor allem am frühen Morgen
- ❖ **Atemnot:** beginnend bei körperlicher Belastung, später auch in Ruhe

Der Schweregrad der Lungenerkrankung wird spirometrisch ermittelt. Dabei wird besonderer Fokus auf den FEV₁ (*Forced Expiratory Volume in 1 Second*) gelegt. Der FEV₁, auch unter dem Namen Einsekundenkapazität bekannt, erfasst die Veränderung des Verhältnisses zwischen den FEV-Wert und der forcierten Vitalkapazität (FVC), sodass eine Limitation des Atemflusses in der Lunge identifiziert werden kann ^{67; 292; 343}. Das Verhältnis zwischen den beiden Parametern FEV₁/FVC liegt bei einem gesunden Menschen bei > 0,7. Liegt dieser Wert deutlich unter dem Normalwert, dann kann dies ein Indiz für eine Lungenerkrankung wie z.B einer COPD oder einer Fibrosierung der Lunge sein ³⁹⁶. Zusammen mit den klinischen Zeichen, den „AHA“-Symptomen und der spirometrischen Auswertung eines COPD-Patienten wird die Krankheit gemäß der *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) in vier Schweregrade (GOLD I-IV) eingeteilt (Tabelle 1) ^{35; 396}. Seit 2018 empfiehlt GOLD erstmalig die Therapieentscheidung anhand von Symptomen und der

Anzahl der Exazerbationen zu treffen, wobei Patienten in einer Vierfeldertafel Gruppe A-D eingeteilt werden ³⁵⁴. Diese Einteilung ermöglicht eine differenzierte Therapieentscheidung, vor allem zwischen Patienten mit ähnlicher Erkrankungsschwere, aber unterschiedlicher Symptomausprägung ^{35; 354}. Ein Patient mit mehr als zwei Exazerbationen in den letzten 12 Monaten oder mindestens einer durch Exazerbationen bedingten Krankenhausaufenthaltes, zählt zu den Hochrisikogruppen C und D ³⁵⁴. Der Schweregrad 0 ist durch eine chronische Bronchitis charakterisiert, mit unauffälligen spirometrischen Kenngrößen einer Obstruktion. Die Patienten sollten jährlich ihre Lungenfunktion überprüfen lassen, um eine Obstruktion frühzeitig erkennen zu können ^{232; 229; 243}. Interessanterweise ist bei der leichten COPD die Einschränkung der Lungenfunktion dem Betroffenen meist nicht bewusst, da eine Atemnot oft nicht bemerkt wird. Demzufolge sollen Husten und Auswurf berücksichtigt werden, da die COPD nicht nur eine Folgeerkennung einer Atemlimitation ist. Weiterhin ist zu erwähnen, dass es aber auch bei einer mittelgradigen bis zur schweren COPD-Erkrankung zum Ausbleiben der klassischen Symptomatik, wie der chronischen Bronchitits, kommen kann. Diese Patienten weisen jedoch eine schwere Atemwegsobstruktion auf, sodass die Überwachung und die Erfassung einer regelmäßigen Lungenfunktionsmessung von großer Notwendigkeit sind.

Tabelle 1: Gemäß der GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) klassifizierten Schweregrade von COPD.

Stadium	FEV ₁	Symptome
0 (Risikogruppe)	> 80 % (normal)	Chronischer Husten und/ oder Auswurf
I (gering)	> 80 %	Chronische Bronchitis mit/ohne Auswurf, leichte Atemwegsobstruktion
II (mittelgradige COPD)	>50 % < FEV ₁ < 80 %	Zunahme der Atemwegsobstruktion, Progression der Symptomatik (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
III (schwere COPD)	30 % < FEV ₁ < 50 %	Ausgeprägte Atemwegsobstruktion, Zunahme der Symptomatik (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
IV (sehr schwere COPD)	< 30 % FEV ₁	Respiratorische Insuffizienz oder Rechtsherzinsuffizienz. Ausgeprägte Atemwegsobstruktion

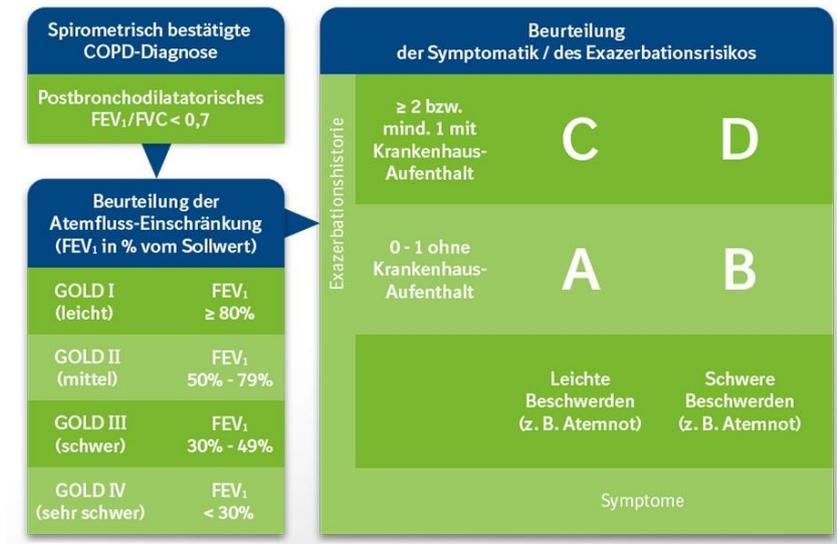


Abbildung 4: Schweregrad der COPD nach Symptomen (A-D).
<https://www.copd-aktuell.de/wie-werden-die-copd-stadien-eingeteilt>
 abgerufen am 23.08.2020

1.2.2 Epidemiologie

COPD ist eine Erkrankung, die mit einer hohen Mortalität und Morbidität einhergeht, in Entwicklungsländern als auch in Industrieländern weit verbreitet ist und weltweit etwa 280 Millionen Menschen betrifft^{243; 247; 255; 412}. Jährlich sterben bis zu 2,75 Millionen Menschen an dieser Krankheit⁴⁰³. Global gesehen galt COPD im Jahre 1990 noch als sechsthäufigste Todesursache, seit dem Jahre 2000 als vierthäufigste und sie wird gegenwärtigen Statistiken der WHO zufolge im Jahre 2030 zur dritthäufigsten Todesursache werden³¹⁴. Schätzungsweise leiden etwa 10 % der weltweiten Gesamtbevölkerung an COPD²⁷². Im Einklang mit der WHO wird laut der *European Lung Foundation* postuliert, dass die Prävalenz (Anteil der bereits Erkrankten), die Inzidenz (die Rate der Neuerkrankungen) und die Letalität von COPD weltweit weiter zunehmen²⁹². Ein Grund für die steigende Inzidenz von COPD könnte der Anstieg des durchschnittlichen Lebensalters der Menschheit sein²⁴¹. Etwa 8,7 % der über 40-Jährigen in Deutschland leiden an COPD und bei den über 70-jährigen Männern wird bereits bei 19 % eine COPD-Erkrankung diagnostiziert⁵⁹. Die tatsächliche Prävalenz, kann aufgrund der komplexen Pathophysiologie, der fehlenden Kenntnisse über die Symptome von Patienten sowie falscher Diagnosen nicht präzise bestimmt werden^{354; 389; 410}. Einige europäische Studien weisen darauf hin, dass COPD bei vielen Patienten nicht diagnostiziert wurde²⁹⁷. Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung verursacht einen enormen Leidensdruck bei den Patienten und darüber hinaus auch eine

globale wirtschaftliche Belastung. In Europa belaufen sich die finanziellen Anforderungen auf 6 % der Gesamtkosten im Gesundheitswesen, was einer Gesamtsumme von 35,6 Milliarden Euro entspricht ^{46; 349}. Aus US-Studien (2015) ist ersichtlich, dass sich in Deutschland die direkten jährlich entstehenden Patientenversorgungskosten pro COPD-Patient auf 2266 Dollar belaufen, in den USA liegen die Kosten bei bis zu 9981 Dollar (Pro COPD-Patient) ¹²⁵. Eine Studie der *American College of Chest Physicians* (CHEST) veröffentlichte in einem Bericht, dass die chronisch obstruktive Lungenerkrankung im Jahr 2010 nationale Gesundheitskosten von insgesamt 32,1 Milliarden Dollar verursacht hat ^{46; 126}. Eine weitere interessante Studie zeigte, dass die Gesundheitskosten in den USA für COPD-Patienten zwischen 1987 und 2007 um 38 % gestiegen sind ^{46; 126}. In der Altersgruppe der über 60-Jährigen leiden interessanterweise aktuell mehr Männer als Frauen unter COPD. In Anbetracht der jüngeren Generationen gleicht sich die COPD-Prävalenz zwischen den Geschlechtern an, was auf die veränderten Zigarettenrauchgewohnheiten von Frauen zurückzuführen ist ⁵⁸. Aufgrund der weltweit wachsenden COPD-Opfer, ist es sehr wichtig, die Lebensqualität der Patienten durch effiziente Therapierichtlinien zu verbessern ³²⁸.

1.2.3 Risikofaktoren bei COPD

Die Hauptursache für COPD, speziell für die Entstehung eines Emphysems, sind Zigarettenrauch, Luftverschmutzung sowie eine Interaktion von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen ^{43; 388}. Weiterhin haben Alterungsprozesse sowie epigenetische Modifikationen einen Einfluss auf die Entstehung von COPD ^{181; 330}. In Abbildung 5 sind die wichtigsten Risikofaktoren skizziert.

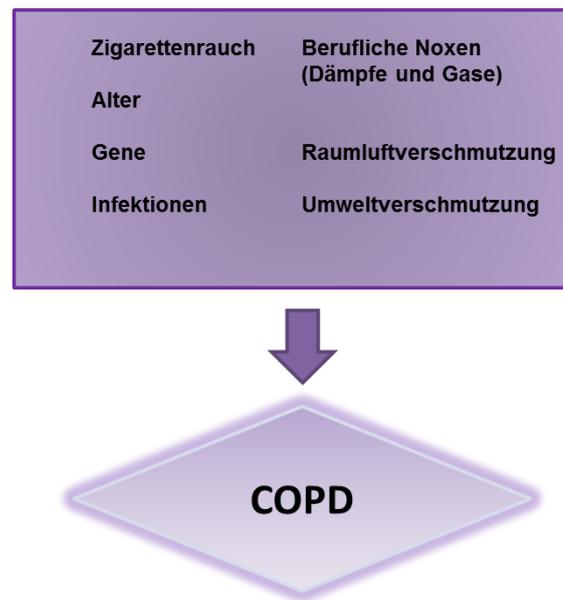


Abbildung 5: Schematische Darstellung der wichtigsten Risikofaktoren für COPD.

1.2.3.1 Zigarettenrauch

Die Inhalation von Zigarettenrauch wird als Hauptursache für die Entstehung von COPD betrachtet und es verursacht laut WHO ca. 73 % der weltweiten COPD-Todesfälle²⁴⁴. Studien besagen, dass 90 % aller COPD-Patienten Zigarettenraucher sind²⁹⁴. Die Zusammensetzung des Zigarettenrauchs ist sehr komplex und man vermutet ein Gemisch von mehr als 5000 Komponenten, davon werden über 200 chemische Komponenten als toxisch für Mensch und Tiere eingestuft^{169; 371}. Zigarettenraucher neigen häufiger zu Atemwegsentzündungen und zeigen im Vergleich zu Nichtrauchern eine Veränderung der Lungenfunktion. Dies wird vor allem durch die substantiell signifikant fallende FEV₁ (Einsekundenkapazität) veranschaulicht^{137; 266}. Neben dem aktiven Zigarettenrauchen kann auch passiver Zigarettenrauch die Lungen mit schädlichen bzw. giftigen Partikeln belasten und eine Emphysementwicklung fördern⁸⁰. Etwa 10-12 % der gesamten COPD-Patienten haben niemals in ihrem Leben Zigaretten geraucht. Darüber hinaus kann das Rauchen von Pfeifen, der Zigarrenkonsum sowie auch der Konsum von Marijuana mögliche Risikofaktoren sein, die ein Emphysem in der Lunge induzieren können^{237; 372}.

1.2.3.2 Genetische Faktoren

Der bekannteste genetische Defekt, der zur klinischen Manifestation einer COPD führt, ist der α 1-Antitrypsin-Mangel, der bei 1-3 % aller COPD-Patienten vorkommt ²⁴⁴. Bei α 1-Antitrypsin handelt es sich um einen Proteinaseinhibitor, der vorwiegend in der Leber, aber auch in neutrophilen Granulozyten gebildet wird ^{90; 172}. Das α 1-Antitrypsin ist ein 52 kDa großes Protein und wird durch das Gen *SERPINA1* kodiert ³⁶¹. Bei einer Entzündung, im Rahmen einer Immunantwort im Körper, wird es vermehrt gebildet und schützt den Körper vor dem Gewebeabbau durch Proteasen. Die Lunge nimmt während des Atmens kontinuierlich potentiell gefährliche Krankheitserreger sowie auch Fremdstoffe auf. Eine permanente Aktivierung der Abwehrmechanismen, dazu gehört die Synthese von Antiproteasen wie z.B. das α 1-Antitrypsin, ist notwendig, um den Abbau von Proteinen in der Lunge zu verhindern ^{191; 327}. Bei einem α 1-Antitrypsin-Mangel bzw. einem genetischen Defizit ist die Lunge einem verstärkten proteolytischen Abbau durch neutrophile Elastasen ausgesetzt. Bei Patienten, die einen α 1-Antitrypsin-Mangel aufweisen (homozygoter ZZ-Phänotyp), kommt es frühzeitig zur Ausbildung eines panlobulären Emphysems ¹⁹¹. Bei dieser Art des Lungenemphysems ist die Verteilung der beschädigten Strukturen gleichmäßig über den Lungenlappen verteilt und betrifft primär die Lungenbläschen und erst später die kleinen Atemwege. Im Gegensatz dazu, sind beim zentrilobulären Emphysem die oberen Teile des Lungenlappens von einer Emphysembildung betroffen. Dabei findet man die Schädigung der Lungenbläschen im Bereich der kleinen Atemwege und die Alveolen der Peripherie bleiben intakt. Das zentrilobuläre Emphysem wird sehr häufig in Verbindung mit einer chronisch obstruktiven Bronchitis gebracht. Neben dem α 1-Antitrypsin-Defizit sind laut Literatur auch Genpolymorphismen verschiedener Matrix-Metalloproteinasen MMPs (*Matrix metalloproteinases*) und von Metalloproteinasen-Inhibitoren TIMPs (*Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases*) an der Entstehung eines Emphysems beteiligt ^{152; 175}. Im Fokus stehen die Genpolymorphismen der Matrix-Metalloproteinasen 1 und 9 (*MMP1* und *MMP9*), aber auch des Metalloproteinasen-Inhibitors *TIMP3* ¹⁵². Proteine aus der TIMP-Gruppe kennzeichnen sich durch die Funktion, MMPs zu inhibieren und die Elastolyse der Lunge zu verhindern ³¹⁷.

1.2.3.3 Umweltverschmutzungen

Der Begriff „Umweltverschmutzungen“ schließt neben den landwirtschaftlich entstandenen und den durch Verkehrsmittel-verursachten Abgasen auch solche ein, die bei der Textil-, Plastik- und Bergbauindustrie entstehen. Nicht zu unterschätzen sind auch die in Innenräumen inhalierten Dämpfe, Gase, Stäube und Chemikalien ⁴⁵. Laut WHO sind in den Industrieländern nur 1 % der gesamten COPD-Todesfälle auf Umweltverschmutzungen zurückzuführen ²³¹. In Entwicklungsländern stellt die Verschmutzung in geschlossenen Räumen ein viel größeres Risiko dar, da hier- wie auch in Schwellenländern, Biomasse und fossile Brennstoffe zum Heizen und zum Kochen in sehr schlecht belüfteten Wohnräumen genutzt werden ^{229; 281}. Laut WHO kochen und heizen weltweit etwa 3 Milliarden Menschen in ihren Einrichtungen/Wohnungen mit Kohle und anderen Biobrennmaterialien, wie z.B. Holz, Getreideresten und Dünger. Betroffen sind gewöhnlich Menschen aus Ländern mit mittleren- und unteren Einkommensverhältnissen (<http://www.who.int/en/> Stand 2019).

1.2.3.4 Weitere Faktoren

Eine neue Studie hat ergeben, dass auch klimatische Extrema, wie Wärme und Kälte einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der COPD haben können und die Entstehung von COPD fördern können ¹⁴⁴. Ein weiterer Aspekt der modernen Gesellschaft ist das Erreichen eines hohen Lebensalters. Dieses erhöht ebenfalls die Prävalenz für eine COPD-Erkrankung, da sich im Alter die Lungenfunktion rapide verschlechtert ³⁴⁰. Ein nicht intaktes Immunsystem, das durch immer wiederkehrende bakterielle oder virale Infektionen der Lunge gekennzeichnet ist, fördert die Exazerbation einer COPD-Erkrankung ²⁰⁴. Weiterhin können im Kindessalter schwere Infektionen der Atemwege, die letztendlich zu einer reduzierten Lungenfunktion führen, im Erwachsenenalter das Risiko einer COPD-Erkrankung fördern ²³¹. Auch gibt es Menschen, die genetisch bedingt eine Überempfindlichkeit der Bronchien aufweisen z.B. durch das Vorhandensein einer Asthma-Erkrankung oder einer chronischen Bronchitis, was das Risiko einer COPD-Erkrankung erhöht ¹⁵¹.

1.3 Pathophysiologie der COPD

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung ist durch multifaktorielle Veränderungen gekennzeichnet, die sich auf die Lungenstruktur und -Funktion auswirken. **Abbildung 6** stellt die wichtigsten Mechanismen dar, die zur Pathogenese der COPD beitragen. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass es durch inhalative Noxen zu einer chronischen Entzündung der Bronchiolen kommen kann. Die Zerstörung des Flimmerepithels und die vermehrte Mukusproduktion führen zu einem erhöhten Atemwegswiderstand und einer chronisch progredienten Obstruktion. Ein chronischer Nikotinabusus sowie auch bronchopulmonale Infekte können eine Verschiebung des Proteasen/Antiprotease-Gleichgewichts zugunsten der Proteasen begünstigen und einen Parenchymverlust der Alveolen fördern. Oxidativer Stress sowie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus Entzündungszellen potenzieren die Schädigungsmechanismen im pulmonalen Gewebe, sodass eine gesunde Lungenexpiration verhindert wird, gleichzeitig eine Lungenüberblähung und die Bildung eines Emphysems gefördert wird ^{2; 34; 262}.

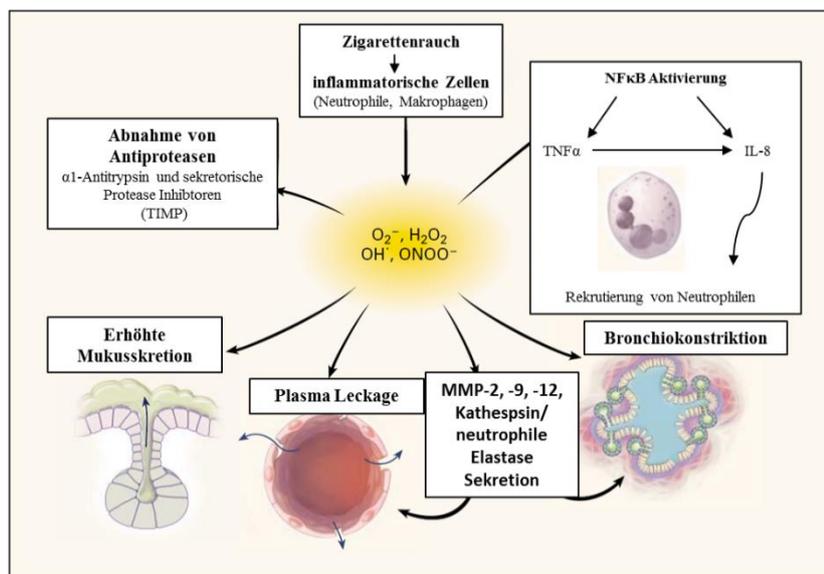


Abbildung 6: Pathophysiologie der COPD. An der Krankheit beteiligte pathologische Effekte und Zellen (modifiziert aus ²⁹).

1.3.1. Chronische Bronchitis

Eine COPD ist häufig gekennzeichnet durch die chronische Bronchitis, die als wichtiges klinisches Symptom gesehen wird. Sie ist durch eine verstärkte Mukusproduktion der Bronchien gekennzeichnet, zudem ist sie von einem produktiven Husten begleitet, der mindestens 3 Monate eines Jahres in zwei aufeinander folgenden Jahren auftritt ³¹. Die pathophysiologischen Veränderungen, die mit verstärkter Mukusproduktion assoziiert werden, sind eine Hyperplasie der Goblet- Zellen, begleitet von einer submukösen Drüsenhypertrophie und einem Verlust von epithelialen Zilien-Zellen. Das bronchiale Epithel entzündet sich, was im weiteren Verlauf zur Verdickung der bronchialen Wand führt. Die mukoziliäre Säuberung (*Clearance*) der Lunge wird dadurch gestört und die verstärkte bronchiale Mukusekretion erhöht das Risiko für das Aufkommen von Infekten durch Bakterien und Viren ¹⁵⁴. Zusätzlich konnten Studien nachweisen, dass sich bei einer chronischen Bronchitis Wachstumsfaktoren wie TGF- β (*Transforming growth factor beta*) in den zentralen Atemwegen ansammeln und die Verdickung der bronchialen Wand fördern ¹⁵⁴.

1.3.2 Obstruktion der kleinen Bronchiolen

Kennzeichnend für eine Obstruktion ist, dass die kleinen Atemwege (< 2 mm Innendurchmesser) betroffen sind ^{156; 415}. Im Vordergrund einer Obstruktion steht die Verkrampfung der ringförmigen Bronchialmuskulatur, die eine Folge der Bildung lymphoidaler Follikel ist, die sich in der Adventitia anhäufen. Zudem schwillt die Schleimhaut der Bronchien an, was zu einer Hyperproduktion des zähen Schleims führt. Die Mukusproduktion wird durch Schleimdrüsen induziert, jedoch haben inflammatorische Exsudate, die sich im Lumen der kleinen Atemwege formen, einen großen Einfluss darauf. Des Weiteren schränkt der zunehmende Kollagenabbau in den äußeren Luftwegen ihre Öffnungsfähigkeit ein ³². Aus früheren Studien wird angenommen, dass es eine Korrelation zwischen einem Anstieg der inflammatorischen T-Zellen (CD4⁺-sowie CD8⁺-Lymphozyten) im Gewebe der Luftwege und einem Abfall im FEV₁ bei COPD-Patienten gibt ^{49; 286}.

1.3.3 Emphysem

Beim Lungenemphysem handelt es sich um eine irreversible Erweiterung der Lufträume, die pathologisch-anatomisch gesehen, distal der terminalen Bronchiolen stattfindet ⁶⁰. Die Lunge verliert ihre Elastizität, was eine Konsequenz des Verlustes des Lungenparenchyms ist ¹⁵⁷. Laennec et al. beschrieb als Erster die entstandenen Lungengeräusche, die sich infolge der Läsionen bei einem Emphysem äußern und er konnte diese mit dem Stethoskop wahrnehmen ²⁰¹. Das Emphysem ist definiert durch die Dilatation und Zerstörung des Lungengewebes jenseits der terminalen Bronchiolen und konnte bereits 1978 durch eine verschlechterte Lungenfunktionsleistung nachgewiesen werden ⁹⁶. Verschiedene Emphysem-Arten sind laut Literatur bekannt ^{357; 364}. Das mit Zigarettenrauch assoziierte Emphysem betrifft meist die respiratorischen Bronchiolen im oberen Lungenlappen sowie anteiliges Gewebe des unteren Lungenlappens und ist unter dem Begriff, zentrilobuläres Emphysem, bekannt ³²². Menschen mit einem α 1-Antitrypsin-Defizit erleiden zumeist ein panlobuläres Emphysem, bei dem die Alveolen des gesamten Lungenlappen zerstört werden ^{12; 157}. Darüber hinaus gibt es noch das subpleurale Emphysem, welches im Zwerchfellrippenwinkel sowie den Lungenspitzen entstehen kann und dort klinisch unauffällig bleibt, da es keine Einschränkung der Lungenfunktion verursacht. Bei einem fortgeschrittenen Emphysem leiden die Patienten aufgrund des vergrößerten Totraums an einer respiratorischen Insuffizienz und einem verminderten Atemminutenvolumen. Es kommt zu einer ungenügenden Sauerstoffversorgung, da der Gasaustausch zwischen den Alveolen und dem Blutkreislauf nicht mehr gewährleistet wird ⁴⁰⁷.

1.3.4 Pulmonalvaskuläre Veränderungen

Pulmonalvaskuläre Veränderungen, auch unter dem Begriff Gefäßumbau (*Remodeling*) bekannt, so wie die pulmonale Hypertonie (PH) können mit COPD in Verbindung gebracht werden. Etwa 5-10 % der Patienten mit einer fortgeschrittenen COPD-Erkrankung leiden an einer schweren pulmonalen Hypertonie ^{98; 275; 353}. Einige Indizien zeigen, dass Zigarettenrauch einen Einfluss auf das pulmonalvaskuläre System ausübt und eine entstandenes *Cor pulmonale* sowie eine pulmonale Hypertonie im Spätstadium der COPD-Erkrankung nicht zwingend eine Folge hypoxischer Konditionen sein müssen ^{293; 295}. Beim 6. Weltsymposium zur pulmonalen Hypertonie (2019) wurde die Definition der pulmonalen Hypertonie diskutiert. Im Fokus des Expertengremiums stand die Diskussion einer differenzialdiagnostischen Hilfestellung zur Unterscheidung zwischen PAH und PH bei

COPD. Die Ergebnisse aus dem 6. Weltsymposium sind bis dato nur Empfehlungen und sie sind bis dato nicht in den Leitlinien verankert ³⁵². Derzeit sind noch immer die *European Society of Cardiology* (ESC) und die *European Respiratory Society* (ERS)-Leitlinien aus dem Jahr 2015 zur Diagnose und Therapie der PH gültig ¹³¹. Die PH wird nach ihrer Ätiologie in fünf Gruppen eingeteilt. Als pulmonale Hypertonie (PH) werden Erkrankungen bezeichnet, die durch einen Anstieg des mittlerer pulmonalarteriellen Drucks ($\text{PAPm} \geq 25 \text{ mmHg}$, Hypertonie) in Ruhe gekennzeichnet sind ³⁵¹. Die meisten COPD-Patienten leiden unter einer milden Form einer PH mit einem mPAP zwischen 20 bis 35 mmHg ⁷⁵. Lediglich bei ~5-10 % der COPD-Patienten wird eine schweren Form der PH mit einem mittlerer pulmonalarteriellen Drucks von über 35 mmHg festgestellt ^{75; 168; 398}. Beim Gefäßumbau kommt es zu einer Verdickung der *Tunica media*, die wesentlich durch eine Hyperplasie der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen entsteht. Zu Erwähnen ist weiterhin die Dysfunktion des Endothels, die zu einer Verdickung der Gefäßwand beitragen kann und mit einer damit verbundenen Reduktion des Gefäßlumens im Zusammenhang stehen kann. Zum Fortschreiten des Gefäßumbaus führen vermutlich aktivierte inflammatorische Prozesse sowie eine verstärkte Angiogenese in den pulmonalarteriellen Gefäßen, ausgelöst durch verschiedene Noxen, wie z.B dem Zigarettenrauch ²⁷⁶. Eine PH-Diagnose erweist sich bei COPD-Patienten als schwierig, da die Rechtsherzkatheterisierung ein invasiver Eingriff ist und meist eine nicht-invasive Untersuchungsmethode bei den Patienten indiziert ist. Dazu zählt die echokardiographische Untersuchung, mit der man nicht in allen Fällen eine PH in den Patienten bestätigen oder ausschließen kann ²⁰. Einige Arbeitsgruppen, inbegriffen die Arbeitsgruppe von Prof. Weißmann, zeigten an einem Tiermodell, dass bei einem Zigarettenrauch-induzierten Emphysem eine PH-Entwicklung einer Emphysementwicklung vorausgeht und die pulmonale Hypertonie einem komplexen Mechanismus unterliegt ^{122; 404; 409; 332}.

1.4 Das Zigarettenrauch-induzierte Emphysem bei Mäusen

Wie bereits erwähnt zählt bis dato Zigarettenrauch in den Industrieländern als Hauptauslöser einer COPD. In verschiedenen Tierspezies, wie Meerschweinchen, Ratten, Mäusen, Hunden und Kaninchen wird das Zigarettenrauch-Modell zur Induktion des Emphysems eingesetzt^{192,194; 404; 408}. Die Emphysementwicklung bei der Tierspezies Maus hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zu diesen gehören beispielsweise die Wahl des Mausstammes und der Expositionsart. So ist es ein Unterschied, ob die Zigarettenrauchexposition mittels einer Ganzkörperkammer oder mittels einer Nasenmaske erfolgt oder ob es sich um Hauptstrom- oder Nebenstrom-Zigarettenrauch handelt¹⁷³. Weiterhin spielen Partikelkonzentration, Expositionszeit, die Anzahl, Art der Zigaretten, sowie auch Alter und Geschlecht eine tragende Rolle bei der Induktion des Emphysems^{252; 312}. In einer Studie von Geritt und Kollegen konnte eine unterschiedliche Immunantwort bei einer Hauptstrom- und Nebenstrom Zigarettenexposition gefunden werden. Bei der Nebenstrom-Zigarettenrauchexposition handelte es sich hauptsächlich um eine Immunantwort mit erhöhter Makrophagenzahl aber nur sehr leicht erhöhten GM-CSF-Werten (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)¹⁷³. Vergleichstudien zur Ganzkörperkammer-Zigarettenrauchexposition und Nasenmaske-Zigarettenrauchexposition zeigten, dass bei Nagern mit einer Ganzkörperkammer-Zigarettenrauchexposition weniger Carboxyhämoglobin nachzuweisen war, zudem hatten diese Tiere einen geringeren Gewichtsverlust als Tiere mit einer Nasenmaske-Zigarettenrauchexposition²⁵⁹. Weiterhin kann durch eine intracheale Elastase Applikation ein Emphysem bei Nagern induziert werden. Bei diesem Modell kann das Emphysem schnell induziert werden und ist bereits durch eine einmalige Elastase-Applikation gewährleistet¹⁵. Gegenwärtig ist es gängig die *Porcine Pancreatic Elastase* (PPE) für die Elastase-induzierten Emphysemmodelle zu verwenden, da durch diese Elastase einheitliche und repräsentative Ergebnisse generiert werden¹⁵. Im Vergleich zum Zigarettenrauch-induzierten Emphysem kann beim Elastase-Modell ein schweres Emphysem bei Mäusen induziert werden. Dies hängt von der eingesetzten Elastase-Enzymdosis ab. Ein durch Zigarettenrauch-induziertes Emphysem in Mäusen entspricht einem milden Emphysem beim Menschen¹⁴². Zu Beginn der Zigarettenrauchexposition werden inflammatorische Prozesse aktiviert, Neutrophile Granulozyten und Makrophagen werden aktiviert, angesammelt und als Folge wird eine Gewebeschädigung induziert²⁴⁶. Zudem kommt es zu physiologischen Veränderungen, wobei sich das Residualvolumen und die totale Lungkapazität verändern. Zudem nimmt die Lungenfunktion ab⁴⁰⁵. Eine chronische Zigarettenrauchexposition (von mindestens 6 Monaten) verursacht in Mäusen irreversible Läsionen in der Lungenmatrix, eine

Hyperplasie von glatten Muskelzellen sowie Gobletzellen, Atemwegsveränderungen und eine pulmonale Hypertonie ²⁵⁰. Letztendlich induziert das Zigarettenrauchmodell eine COPD-Erkrankung, die nach dem GOLD-Standard eingeschätzt der Stufe I bis II entsprechen würde ⁴⁰⁸. An dieser Stelle ist zu betonen, dass mittels des Zigarettenrauchmodells nicht das volle Krankheitsbild einer COPD imitiert werden kann, da bei Mäusen beispielsweise keine Atemwegsobstruktion auftritt und dies ein wichtiges Merkmal bei der GOLD I und II-Klassifizierung ist. Dieses Modell ermöglicht aber die molekularbiologischen Prozesse einer Emphysementwicklung zu untersuchen. In erster Linie können die dahinterstehenden zellulären und molekularbiologischen Prozesse sowie die auftretenden pulmonalvaskulären Veränderungen untersucht werden.

1.5 Systemische Veränderungen

Weltweit wird COPD vor allem primär als eine Lungenkrankheit beschrieben, jedoch gibt es neben den pulmonalvaskulären Veränderungen auch weitere klinisch relevante Effekte, die einen extrapulmonalen Ursprung haben. Ursache dieser extrapulmonalen Symptome soll eine erhöhte systemische Inflammation sein, einhergehend mit einem verstärkten systemischen oxidativen Stress ^{6; 165; 197}. Dieser führt zur Aktivierung zirkulierender inflammatorischer Zellen- sowie proinflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel dem *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF α) ⁶. Viele Studien zeigten, dass COPD-Patienten unter einer Skelettmuskel-Dysfunktion sowie einer Muskelschwäche leiden, die durch einen erheblichen Gewichtsverlust deutlich werden ^{6; 165; 301}. Dies ist vor allem bei Patienten mit einer schweren COPD zu beobachten und korreliert mit einer erhöhten Mortalität dieser Patienten ³⁵⁶. Hinter dem starken Gewichtsverlust und dem Muskelabbau werden die eingeschränkte Immobilität der Patienten sowie der im Kontrast stehende erhöhte Metabolismus und die chronische Hypoxie vermutet, der zu Veränderungen der muskulären Fasern führt ^{6; 301}. Des Weiteren sind bei der COPD-Pathogenese weitere Organe wie z.B das Gehirn von Veränderungen betroffen ⁴²⁸. Diese Umstände führen bei COPD-Patienten zu einer stark eingeschränkten Lebensqualität, sodass viele Patienten unter Depressionen leiden ⁷⁶. Weiterhin werden in einigen Patienten neben den bereits aufgeführten systemischen Komponenten auch noch Herzerkrankungen und Tumorleiden festgestellt ¹⁶⁵. Aus klinischer Sicht wird versucht COPD-Patienten durch spezifische Trainings- und Rehabilitationsprogramme eine bessere Lebensqualität zu gewährleisten ⁶.

1.6 Pathogenese der COPD

Die genauen Ursachen und die Pathogenese dieser Krankheit sind noch nicht vollständig entschlüsselt. In der Literatur werden drei Hauptmechanismen genannt, die zur COPD-Pathogenese beitragen. Zu diesen gehören die Inflammation, das Protease-Antiprotease-Gleichgewicht sowie der oxidative Stress, verbunden mit Apoptose^{33; 380}. Die genannten Mechanismen wirken nicht unabhängig voneinander, im Gegenteil, sie können sich untereinander beeinflussen und verstärken (**Abbildung 7**)³⁹⁵.

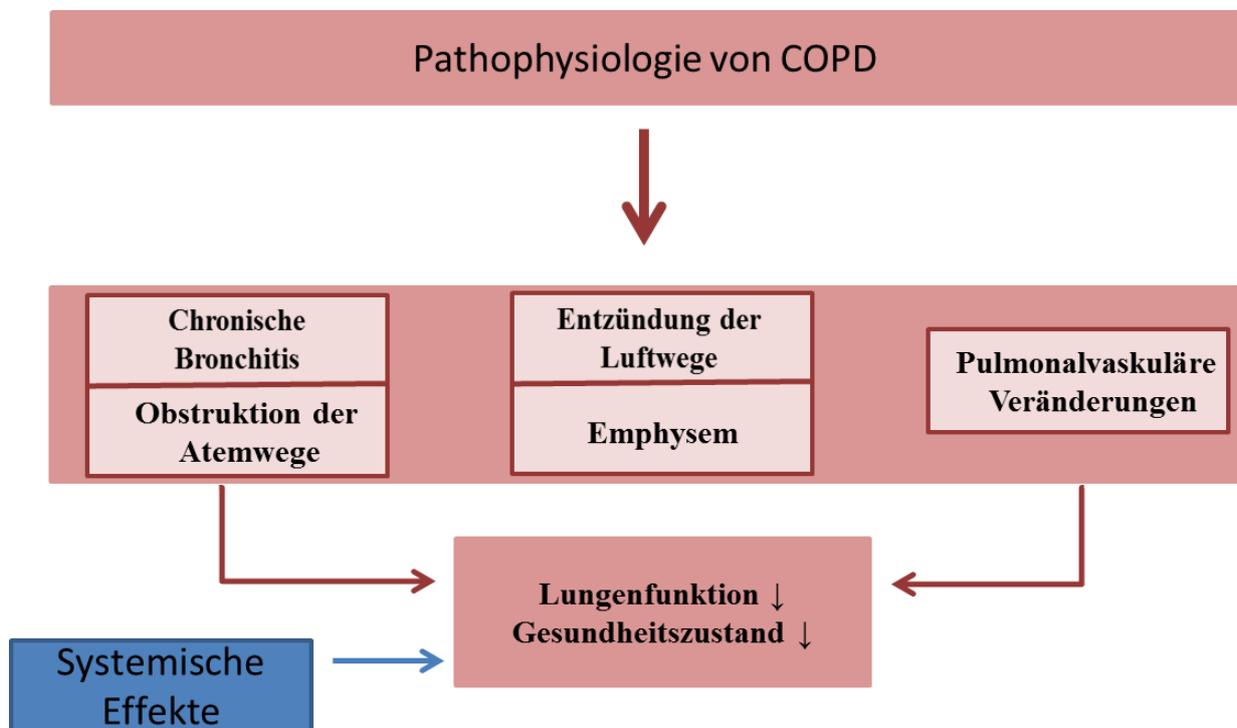


Abbildung 7: Pathophysiologie der COPD. Zusammenhang der Komponenten, die während der COPD auftreten (vereinfacht dargestellt). (Modifiziert aus³⁹⁵).

1.6.1 Inflammation

Beim Entzündungsprozess der COPD sind die kleinen und zentralen Luftwege betroffen, das Lungenparenchym sowie die pulmonalen Arterien. Zigarettenrauch aktiviert eine komplizierte inflammatorische Kaskade mit Beteiligung verschiedener Zelltypen und Signalwege⁹⁵. Beispielsweise aktivieren die im Zigarettenrauch enthaltenen Irritantien bzw. Reizstoffe das Immunsystem, welche wiederum NFκB-Signalkaskaden (*Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-cells*) sowie *Toll-Like-Receptor* (TLR)-Signalwege induzieren

können¹²⁰. In **Abbildung 6** wurde die Inflammation bei einer COPD schematisch dargestellt. Der bei COPD-Patienten charakteristischer Weise limitierte Atemgasstrom ist begleitet von zellulären und strukturellen Veränderungen der zentralen und peripheren Luftwege, dem Parenchym und der pulmonalen Gefäße. Insbesondere wird durch Zigarettenrauch die Ausschüttung von Zytokinen sowie Chemokinen induziert, die zu einer Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten führt¹⁴¹. Bei beginnender Inflammation werden die zentralen Luftwege von Zigarettenrauchern mit Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten sowie T-Lymphozyten infiltriert. In die Wände der respiratorischen Bronchiolen werden Makrophagen und mononukleärer Zellen eingeschleust^{24; 97}. Mit zunehmender Progression der Krankheit, steigt die Anzahl der Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten¹⁸⁰. Weiterhin kommt es zu einer gesteigerten CD8⁺-Lymphozyten Bildung, sodass sich das CD8⁺/CD4⁺-Gleichgewicht zugunsten der CD8⁺-Lymphozyten verschiebt³¹⁹.

1.6.1.1 Makrophagen

Makrophagen zählen zu einem wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie gehören zu den Fresszellen (Phagozyten) der weißen Blutkörperchen (Leukozyten)^{363; 391}. Für die Immunabwehr ist die Einwanderung von Makrophagen essenziell, denn sie verhelfen dem Organismus Bakterien zu phagozytieren und zu entfernen. Sie haben die Fähigkeit, das an der Zelloberfläche exprimierte Phosphatidylserin (PS) apoptotischer Zellen zu erkennen und diese zu eliminieren^{3; 138}. In der bronchoalveolären Lavage (BAL), den Luftwegen sowie im Sputum von COPD-Patienten kann eine 5-10fache Steigerung der Makrophagenzahl gemessen werden und an den zerstörten Alveolarwänden bzw. im Parenchym eine 25fach erhöhte Makrophagenkonzentration nachgewiesen werden^{13; 95}. Ihre Anzahl korreliert nachweislich mit der Schwere der COPD¹⁰⁸. Makrophagen besitzen die Eigenschaft, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), inflammatorische Mediatoren, wie CXC (chemotaktische Zytokine), Interleukine ,wie das Interleukin 8 (IL-8), TNF α (*Tumor Necrosis Factor*) und elastolytische Enzyme (wie die Matrixmetalloproteinasen, MMP2, MMP9, MMP12, Kathepsine und neutrophile Elastase) freizusetzen und zu aktivieren^{225; 317}. Eine Studie konnte zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NF κ B in aktivierten Makrophagen von COPD-Patienten, vor allem während der Exazerbation, eine Schlüsselrolle bei der von Makrophagen freigesetzten inflammatorischen Mediatoren spielt²²³.

1.6.1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören wie Makrophagen zum angeborenen Immunsystem, werden im Knochenmark von hämatopoetischen Stammzellen gebildet und sie sind für den Schutz vor eindringenden Pathogenen wie z.B. Bakterien und Mikroorganismen sowie bei Infektionen sehr wichtig ^{196; 216}. In der BAL sowie dem Sputum von COPD-Patienten kann eine erhöhte Konzentration aktivierter Neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden. Zudem wird ein Zusammenhang zwischen der Menge an Neutrophilen und dem Abfall des FEV1 bei den Patienten vermutet ^{211; 344; 360}. Ihre Expression wird durch die von Makrophagen ausgeschütteten Faktoren, dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) und dem Granulozyten-Kolonien-stimulierenden-Faktor (G-CSF), gefördert ⁴²¹. Nach ihrer Aktivierung können sie sich mittels Leukotrien B4 und Interleukin 8 (IL-8) an die Epithelzellen anhaften und in die Lunge wandern ³¹. Neutrophile Granulozyten fördern die COPD-Pathogenese, indem sie die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen wie MMP8 und MMP9 fördern. Weiterhin sekretieren sie die Neutrophile Elastase (NE), Proteinase von Kathepsinen und sind Quellen reaktiver Sauerstoffspezies ^{141; 148}. Ein progressiver Abbau des Lungenparenchyms und der Verlust von Alveolen ist den induzierten MMPs und der NE zuzuschreiben ^{199; 320}.

1.6.1.3 T-Lymphozyten

Während einer fortschreitenden COPD kann eine erhöhte Konzentration von T-Lymphozyten im Lungenparenchym gemessen werden. Interessanterweise ist die Zahl der produzierten zelltoxischen CD8⁺-Zellen gegenüber dem Verhältnis von CD4⁺-Zellen, den T-Helferzellen, deutlich erhöht ^{128; 315}. Wie Makrophagen gehören Lymphozyten zu den Leukozyten und sind Teil des Immunsystems. Es wird vermutet, dass sie in der Lage sind, vermehrt Proteasen in die intrazellulären Granula von Abwehrzellen (sogeannte Granzyme) und Perforine freizusetzen und damit die Apoptose der alveolären Epithelzellen zu stimulieren und eine Emphysementwicklung zu fördern ¹²⁸.

1.6.2 *Proteasen-Antiproteasen Gleichgewicht*

Im klinischen Alltag ist beobachtet worden, dass Patienten, die an einem Defizit des Serin-Elastase Inhibitors α 1-Antitrypsin leiden, sehr früh ein Emphysem entwickeln^{206; 347}. Ohne eine Lungentransplantation führt dies letztendlich zum einem frühen Tod der Patienten⁵⁷. Das Übergewicht proteolytischer Aktivität, das Ursache der Emphysementwicklung ist, führte zur Protease/Antiprotease-Theorie in der COPD-Pathogenese^{105; 167}. Zigarettenrauch kann als pro-inflammatorisches Signal wirken und eine gesteigerte Ausschüttung von Proteasen induzieren^{336; 338}. Diverse Studien können belegen, dass Neutrophilen-abgeleitete Serinproteasen bei dem Gewebeumbau beteiligt sind. Beispielweise konnte eine Studie zeigen, dass Neutrophile Elastase-*Knockout* Mäuse sowie Mäuse mit einem MMP12-Defizit, vor einer Emphysementwicklung geschützt sind³⁴⁶. In diesem Kontext wurde eine vermehrte Ausschüttung der NE in den unteren Atemwegen von COPD-Patienten gefunden^{129; 320}. Dies korreliert mit einem erhöhten Vorkommen der MMP9 und MMP12 in COPD-Patienten^{77; 67; 268}. Studien zeigten, dass Zigarettenraucher, verglichen mit Nichtrauchern, eine bis zu 40 %ige Reduktion der α 1-Antitrypsin-Funktion aufweisen¹³⁰. Die Reduktion der anti-Elastase-Enzymaktivität durch Zigarettenrauch wird zusätzlich durch die vermehrte Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten verstärkt, die zur Aktivierung multipler Proteasen, wie den MMPs, den Cysteinproteasen sowie den Serinproteasen führt^{183; 337}. In BAL-Proben von COPD-Patienten korreliert die Konzentration der nachgewiesenen NE mit der Abnahme des FEV₁. Dieses Ungleichgewicht von Proteasen, die das Elastin sowie weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen, führt zu den für das Emphysem charakteristischen Läsionen in den alveolären Wänden. Bei Tieren, speziell Mäusen, denen intratracheal Elastase instilliert wurde, kommt es sehr schnell zu einem Elastinabbau. Histologische Untersuchungen zeigen, dass eine intratracheale Elastase-Applikation bei Mäusen dem Elastinabbau in humanen COPD-Lungen gleicht¹⁹⁸. Wie bereits zu Beginn erwähnt gehören Metalloproteinasen zu einer wichtigen Gruppe der Lungengewebsmodulatoren sowie zu Mitgliedern der intrazellulären Kommunikation. Neben den MMPs gehören ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) zu dieser Enzymgruppe¹²⁴. MMPs sind in der Lage, ihren Gegenspieler, den *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinasen* (TIMPs) zu degradieren, die zu den endogenen Inhibitoren der Metalloproteinasen gehören²⁸⁴. Seit längerer Zeit gilt MMP12, auch als Makrophagenmetalloproteinase bekannt, als wichtiger Kandidat für das durch Zigarettenrauch verursachte Emphysem. Dies konnte vor allem in Mausmodellen mit einem Zigarettenrauch-induziertem Emphysem gezeigt werden⁴³⁰. So führt eine erhöhte MMP12-

Expression in den Mäuseatemwegen zur Elastindegredierung, die mit einer erhöhten Makrophagen-Aktivierung korreliert ¹⁶¹.

1.6.3 Apoptose

Die Apoptose, auch unter dem Begriff „programmierter Zelltod“ bekannt, wird in der Literatur häufig mit der COPD-Pathogenese in Zusammenhang gebracht ⁴¹¹. Laut Definition beschreibt sie die morphologische Veränderung von Zellen und steht für den streng regulierten Zelltod. Apoptotische Zellen zeigen typische Merkmale, wie die Zellschrumpfung, die Kondensation des Chromatins und das sogenannte *Blebbing* „Blasenbildung“ der Zellmembran. Außerdem zeigen diese Zellen eine erhöhte Endonuklease-Aktivität ⁴¹¹. In einem gesunden System halten sich apoptotische und Zellteilungs- bzw. Zellproliferations-Prozesse im Gleichgewicht. Diese Homoöostase ist für Eliminierung von Zellen des Systems notwendig. Durch oxidativen Stress können Endothel- sowie alveoläre Epithelzellen und Entzündungszellen (Neutrophile Granulazysten sowie T-Lymphozyten) dem programmierten Zelltod verfallen ^{394; 417}. Eine Studie postuliert, dass die Apoptose von ATII-Zellen einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung eines Emphysems ausübt ³⁸¹. Bekannterweise können apoptotische Prozesse in alveolären Epithel- sowie in Endothelzellen durch die Inhibierung des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Rezeptors induziert werden ^{178; 193}. In einem murinen VEGF-*Knockout*-Modell konnten in ATII-Zellen größere Mengen des pro-apoptotischen Markers, der aktivierten Caspase-3, nachgewiesen werden. Dies führte zur Schlussfolgerung, dass VEGF einen möglichen protektiven Effekt auf die Caspase-3-abhängige bzw. -induzierte Apoptose ausübt ²⁷¹. In einer Studie mit humanen Paraffinschnitten von emphysematösen Lungen wurde eine erhöhte Apoptoserate in Endothelzellen in Korrelation mit der verminderten Expression von VEGF in Verbindung gebracht ¹⁷⁸. In der COPD-Pathogenese ist die Apoptose ein Teil dieses komplexen pathophysiologischen Mechanismus und sie steht in Wechselwirkung mit den inflammatorischen Prozessen, dem oxidativen Stress sowie der Protease-Antiprotease-Ungleichgewicht. Beispielsweise können während inflammatorische Prozesse in der Lunge ablaufen, eine erhöhte Ausschüttung vom Tumornekrosefaktor α (TNF α) und von Perforinen stimuliert werden, die die Apoptose in den Lungenepithelzellen induzieren ^{37; 318; 373}. Bei dem komplexen Mechanismus sind verschiedene pro- sowie anti-apoptotische Gene involviert, darunter die *B-Cell Lymphoma-2* (Bcl2) Genfamilie, die den mitochondrial-initiierten

programmierten Zelltod regulieren ⁴²⁶. In BAL-Proben von COPD-Patienten konnte in einer Studie pro-apoptotische Faktoren wie Bax und dem *Bcl2-Associated Death* Promoter (Bad) nachgewiesen werden, die nicht in gesunden Kontrollen vorlagen ¹⁷⁰. Weiterhin kann erhöhter oxidativer Stress, der sich durch die anfallenden Konzentrationen von Peroxynitrit definiert, als Apoptoseinduktor in Erkrankungen wie z.B. Asthma bronchiale, Arteriosklerose und auch COPD fungieren ^{91; 305; 397}. Im Zigarettenrauchmodell konnte in Mäusen nach 6-monatiger Zigarettenrauchexposition neben einem erhöhten oxidativen Stress auch eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den Septen der Mäuselungen gemessen bzw. gezählt werden ³⁰⁴. Mit der Apoptose wird zudem der NFκB-Signalweg in Verbindung gebracht ³⁹⁷. Eine erhöhte Aktivität der neutrophilen Elastase steht im Zusammenhang mit einem gestörten Protease-Antiprotease-Gleichgewicht und kann apoptotische Prozesse in den kleinen Luftwegen sowie in alveolären Epithelzellen über den PI3K-Akt- (*Phosphoinositid-3-Kinasen-Serin/Threonin-Kinasen*) Signaltransduktionsweg induzieren ³⁶⁸. Neben der NE wird vermutet, dass MMP12 und MMP9 einen Anstieg des Apoptose-Levels in den Lungen von COPD-Patienten induzieren können. Dabei wird die Expression durch ein komplexes Wechselspiel verschiedener Faktoren (z.B. TNF-α oder IL-1) reguliert. Die Aktivierung des TNF-α Signalweges in den Lungen von COPD Patienten lässt vermuten, dass das Fas-FasL-System eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Apoptose in den Lungenzellen spielt. Dabei aktiviert der Fas-Ligand nach Bindung zum Fas-Rezeptor den programmierten Zelltod ^{273; 296}.

1.6.4 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress beschreibt zunächst einmal eine überschüssige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, sodass es zu einem Ungleichgewicht vorhandener Oxidantien und Antioxidantien kommt ¹¹¹. Unter physiologischen Bedingungen werden ROS-Moleküle von endogenen Antioxidantien wie dem Glutathion (GSH) und dem Bilirubin oder exogenen Antioxidantien wie dem Vitamin C abgepuffert ^{145; 300}. Eine mögliche chemische Eigenschaft von Radikalen ist mit anderen Molekülen zu reagieren und neue Radikale zu bilden. Sie haben nur eine sehr kurze Lebensdauer und auf der anderen Seite tragen sie eine hohe biologische Wirksamkeit ²³. Diese hochreaktiven ROS-Moleküle können die Schädigungen verschiedener Proteine, Lipide sowie von DNA-Molekülen induzieren ^{22; 308}. Sie umfassen sowohl nichtradikalische als auch radikalische reaktive Spezies. Zu den nichtradikalischen Oxidantien gehören z. B. H₂O₂, Peroxynitrit (ONOO⁻) und Lipidperoxid (LOOH). Zu den Radikalen

zählen unter anderem Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxylradikal ($OH^{\cdot-}$), das Lipidradikal ($L^{\cdot-}$) und das Lipidperoxyradikal ($LOO^{\cdot-}$). Sie weisen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen im äußeren π -Orbital auf ¹⁴³. Quelle exogener ROS und freier Radikale ist Zigarettenrauch, welcher über 5000 verschiedene chemische Substanzen enthält ³⁷¹. Im Organismus wird die Bildung endogener ROS- sowie RNS-Moleküle (Reaktive Stickstoff-Spezies) durch inflammatorische Zellen, wie z.B. den Neutrophilen Granulozyten, den Makrophagen und den Eosinophilen getriggert ^{113; 238}. Das am häufigsten produzierte ROS-Molekül ist das Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$), welches mittels der Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt wird. Darüber hinaus gehört das Hydroxyl-Radikal ($OH^{\cdot-}$), das Peroxynitrit und der Singulett-Sauerstoff (1O) zu dieser ROS-Familie ⁴¹³. Zu den wichtigsten ROS-Produzenten gehören die Mitochondrien, NADPH-Oxidasen sowie die Xanthin-Oxidasen ³⁷⁴. Das von Mitochondrien produzierte ROS entsteht durch das Entweichen von Elektronen („Leck“) aus der mitochondrialen Elektronentransportkette während der oxidativen Phosphorylierung der Zellatmung ³⁵⁸. Unter physiologischen Gegebenheiten sind sie für die Erhaltung von physiologischen Prozessen und als *Second Messenger* von Signaltransduktionswegen in der Zelle von großer Bedeutung ⁹⁹. Wachstumsprozesse ^{212; 348}, der Aufbau/Abbau von extrazellulärer Matrix und die Zellmigration ³²⁶ sind wesentliche Signalwege, die von ROS gesteuert werden, indem diese reaktiven Moleküle beispielsweise Kinasen aktivieren ^{111; 158}. Um ein ROS-Gleichgewicht zu gewährleisten müssen ROS-Moleküle, vor allem das Superoxid, von Antioxidantien wie z.B. der mitochondrialen und zytosolischen Superoxiddismutase 1 und 2 (SOD1 und SOD2) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und in einem weiteren Schritt mittels der Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden ^{263; 341}. Dieses Reaktionsschema ist unter Gleichung 1 dargestellt.

Gleichung 1



Superoxid-Radikale besitzen die Eigenschaft mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit, einem sehr reaktiven Molekül, zu reagieren. NO gehört, ebenso wie auch das Superoxid, zu einer Gruppe von Radikalen, die sehr kurzlebig und aufgrund von ungepaarten Elektronen auch sehr reaktiv sind ²⁸⁹. Exogen kann NO im Zigarettenrauch mit einer Konzentration von 500-1000 ppm nachgewiesen werden ²⁹⁹. Endogen wird es aus L-Arginin über die NO-Synthase (NOS) synthetisiert. Bis dato sind 4 verschiedene Isoformen, die induzierte NOS (iNOS), die endotheliale NOS (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) und die mitochondriale NOS (mtNOS) bekannt ²⁶⁹. Im Zusammenhang mit COPD wird vor allem der Fokus auf die

iNOS, jedoch auch auf die eNOS, gelegt ⁵⁶. In der Lunge wird NO durch die katalytische Aktivität der iNOS gebildet sowie in Endothelzellen und glatten Muskelzellen durch die eNOS produziert. Stickstoffmonoxid fungiert in physiologischen Konzentrationen als bedeutendes Signalmolekül, insbesondere übt es über eine Signaltransduktionskaskade eine vasodilatatorische Wirkung auf die Gefäße aus, wodurch der Blutdruck reguliert werden kann ⁷. Im Falle der iNOS können pro-inflammatorische Faktoren bzw. Zytokine, wie z.B. *TNF α* und IL- β ihre Regulation beeinflussen ⁷. COPD-Patienten weisen erhöhte NO-Konzentration im Lungenparenchym und in der BAL nach. Dies korreliert zusätzlich mit dem Anstieg der Makrophagen ^{150; 289}. Unter pathophysiologischen Bedingungen reagiert das $O_2^{\cdot-}$ mit NO sehr schnell zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) ⁴⁰. Diese Reaktionen führen zu einer NOS-Entkopplung, wodurch die vasoprotektive Funktion entfällt und es in den vaskulären Zellen gefäßschädigend wirken kann und sich dadurch zu einem superoxidproduzierenden Enzym verändert ²⁸⁹. Zudem stimuliert oxidativer Stress und die damit zusammenhängenden ROS die Ausschüttung inflammatorischer Faktoren wie z.B. IL-8, was mit einer Aktivierung des NF κ B-Signalweges korreliert ²⁷⁰. Weiterhin wird durch ROS die Ausschüttung von IL-17A gefördert, das für seine Schlüsselrolle bei der Induktion des Chromatin *Remodeling* bei COPD-Patienten bekannt ist ¹⁶. Zudem wird durch ROS eine verstärkte Immunantwort induziert, die zur Ausschüttung von Chemokinen und MMPs führt, die zur Progression der COPD-Erkrankung beitragen. Dabei werden Proteine und Lipide in der Lunge direkt modifiziert, was in einer zellulären Dysfunktion resultiert ¹⁵⁰. So können Phospholipide in den Zellmembranen durch hochreaktiven ROS oxidiert werden und beispielsweise kann dadurch die Gefäßpermeabilität erhöht werden, indem membrangebundene Rezeptoren und Proteine modifiziert und inaktiviert werden ²³⁸. Dies kann den Lungenschädigungsprozess verstärken. Oxidativer Stress wird im Zusammenhang mit der Pathogenese von COPD gebracht. Die progressive Atemwegslimitierung bei COPD-Patienten mit den in den Luftwegen befindlichen Zytokinen und den aktivierten Entzündungszellen erklärt könnte dadurch erklärt werden ³⁶⁷

1.7 NADPH-Oxidasen als Quelle reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

NADPH-Oxidasen, auch NOX-Enzyme genannt, sind Enzyme, die Sauerstoff mittels eines Elektrons aus dem Coenzym NADPH zu Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) reduzieren. NADPH-Oxidasen produzieren reaktive Sauerstoffspezies gezielt her und nicht als Nebenprodukt ^{41; 123}. Weitere ROS-bildende Enzyme in Säugetierzellen sind Enzyme aus der mitochondrialen Atmungskette (wie z.B. die NADH-Dehydrogenase oder dem Cytochrom-bc1-Komplex)

51; 203; 245, Stickstoffmonoxid-Synthasen ⁴²⁵, Cyclooxygenasen ²⁷⁸, die Cytochrom P450-Reduktase ³⁰⁶ und die Xanthin-Oxidasen ⁶¹. Hierbei wird ROS als Nebenprodukte synthetisiert. NOX-Enzyme sind membrangebundene Enzymkomplexe, die Elektronen vom Elektronendonator NADPH zum molekularen Sauerstoff übertragen, den Sauerstoff reduzieren und somit ROS generieren ²⁷⁷. (siehe Gleichung 2).

Gleichung 2



Bis dato wurden sieben verschiedene NOX-Isoformen in Säugetieren identifiziert, die NOX1-5 sowie die beiden *Dual Oxidase* (DUOX)-Formen, DUOX1 und DUOX2. Jede dieser Isoformen unterscheidet sich in ihrer katalytischen Untereinheit, ihrem zytosolischen Bindeproteinen und/oder der subzellulären Lokalisation ⁸ (**siehe Abbildung 8**). NOX2, nach älterer Literatur auch gp91^{phox} (phox = *phagocytic oxidase*) genannt, ist die am längsten bekannte NADPH-Oxidase. Sie wurde als erste in Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen entdeckt und erhielt ihren Namen gp91^{phox} durch ihre katalytische Untereinheit ³⁹². Eine zentrale Rolle nimmt diese Isoform bei der Verteidigung des Organismus gegen Pathogene, wie z.B. Bakterien, ein ²¹⁷. NOX2 kann neben ihrem Vorkommen in Phagozyten vor allem in vaskulären Endothelzellen ⁸, in adventitiellen Fibroblasten ⁷² und mesenchymalen Zellen gefunden werden. Interessanterweise besitzen alle NOX-Formen eine konservierte transmembrane Domäne, welche durch vier Histidinreste gekennzeichnet ist. Dadurch werden zwei Häm-Bindungsstellen sowie eine FAD- und NADPH-Bindestelle durch den zytosolischen C-Terminus bereitgestellt. Neben NOX2 werden die Isoformen NOX1, NOX4 und NOX5 in vaskulären Zellen, in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (*Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells, PASMOC*), der Gefäßmedia und den Fibroblasten der Adventitia exprimiert ^{52; 53; 112}. Zur Aktivierung der Multi-Enzymkomplexe NOX1, NOX2 und NOX4 wird eine Interaktion mit weiteren regulatorischen Proteinen benötigt ⁵⁵. Die NOX1-, NOX2-, NOX3- sowie NOX4-Komplexe benötigen beispielweise zur Stabilisierung in der Zellmembran ein kleines Integral-Membranprotein, das p22^{phox} als regulatorische Untereinheit ³⁸⁵. Diese Untereinheit (alternativ auch Cytochrom b245, α -polypeptid genannt), besteht aus 198 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 21 kDa ⁴¹. Weiterhin ist sie konstitutiv exprimiert und kann mit der katalytischen Untereinheit NOX2 zusammen das membrangebundene Flavocytochrom b558 bilden ^{41; 52; 112; 423}. Weiterhin benötigen NOX1 und NOX2 ein Organisator-Protein (p47^{phox} oder die Isoform NOXO1) und ein Aktivator-

Protein (p67^{phox} oder die Isoform NOXA1). Im Falle von NOX2 führt die Phosphorylierung des Gerüstproteins p47^{phox} zu einer Stimulierung des p67^{phox}-Proteins, sodass dieses mit der Membran assoziieren kann, folglich eine Konformationsänderung der NOX2-Untereinheit induziert und der Elektronenfluss gewährleistet wird^{192; 207; 290}. NOX2-spezifisch ist zudem noch die Untereinheit p40^{phox} im Enzymkomplex eingebunden, indem es durch p47^{phox} stimuliert wird²⁵⁸. Die im Zytosol vorhandene p47^{phox} ist nicht glykosyliert und besitzt eine phox-(PX)-Domäne, welche mit Membranphospholipiden sowie über zwei SH3-Domänen mit der C-terminalen-prolinreichen-Region der p22^{phox}-Untereinheit interagieren kann. Über eine autoinhibitorische Region (AIR) wird diese Interaktion so lange zurückgehalten, bis die zytosolische Untereinheit p47^{phox} phosphoryliert wird, sodass es dann zu einer Konformationsänderung kommt¹¹⁸. Eine kleine GTPase (*Guanosine Triphosphate Phosphohydrolase*), Rac1 und Rac2, welche zu der Rho-Familie gehören, sind für die Aktivierung der beiden Enzymkomplexe NOX1 und NOX2 essentiell, jedoch trifft das nicht auf NOX5 und NOX4 zu^{55; 290}. Die beiden unterschiedlichen GTPasen, Rac1 und Rac2, teilen eine 92 %ige Sequenzhomologie. Im Falle des Multi-Enzymkomplexes NOX2 interagiert das Rac2 mit der aktiven GTP-Form des Enzyms^{83; 334}. Diese Interaktion wird über das am N-Terminus gelegene TPR-Motiv der p67^{phox} Untereinheit gewährleistet. Nach der Aktivierung des GTP-bindenden Rac-Komplexes kommt es zu dessen Translokation an die Plasmamembran, sodass eine Wechselwirkung mit dem Aktivatorprotein p67^{phox} und dem Cytochrom b558 stattfindet²¹⁸. Nach erfolgter Aktivierung der NADPH-Oxidase, kann NADPH an NOX2 binden und seine Elektronen freisetzen. Die beiden freigesetzten Elektronen werden über das FAD-Molekül und die beiden Häm-Gruppen zum Sauerstoff transportiert, um zwei Sauerstoffmoleküle zu Superoxidradikalen zu reduzieren. Im Gegensatz dazu benötigt NOX4 für die Stabilisierung nur das p22^{phox}. NOX5 scheint unabhängig von regulatorischen Proteinen zu sein^{179; 334}. Interessanterweise wird NOX5 nicht in Nagetieren exprimiert³³⁴. Die beiden DUOX Enzyme können direkt H₂O₂ produzieren. Ihre Aktivität und H₂O₂-Produktion ist Ca²⁺ gesteuert und reguliert^{114; 310}. Eine Untergliederung der NOX, nach regulatorischen Untereinheiten und Expression ist in **Tabelle 2** dargestellt. Die zelluläre Lokalisation der NOX ist in **Abbildung 8** zu sehen und in **Abbildung 9** die genaue Zusammensetzung der NADPH-Oxidasen⁴².

Tabelle 2: Enzymfamilie der NADPH-Oxidasen

Katalytische Untereinheit	Regulatorische Untereinheit	Expression
NOX1	p22 ^{phox} , NOXO1, NOXA1, Rac1	Kolon, Niere, Muskelzellen, Endothelzellen, Prostata, Plazenta,
NOX2	p22 ^{phox} , p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , p40 ^{phox} Rac1, Rac2	Phagozyten, B-Lymphozyten, Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten
NOX3	p22 ^{phox} , NOXO1, NOXA1, Rac1	Innenohr, fetale Niere, fetale Milz
NOX4	p22 ^{phox}	Niere, Blutgefäße, Endothelium
NOX5		Milz, Testis, Muskelzellen
DUOX1, DUOX2	Ca ²⁺	Schilddrüse

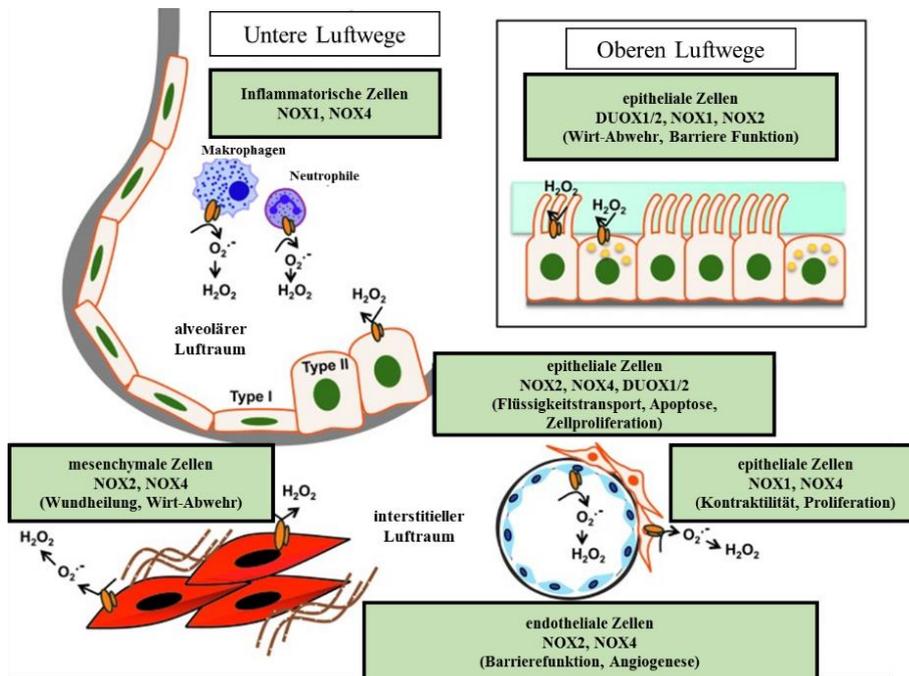


Abbildung 8: Darstellung verschiedener Lokalisation der NOX-Enzyme in der Lunge. Die spezifischen NOX/DUOX-Isoformen werden in unterschiedlichen Lungenzellen exprimiert (modifiziert aus ⁴²).

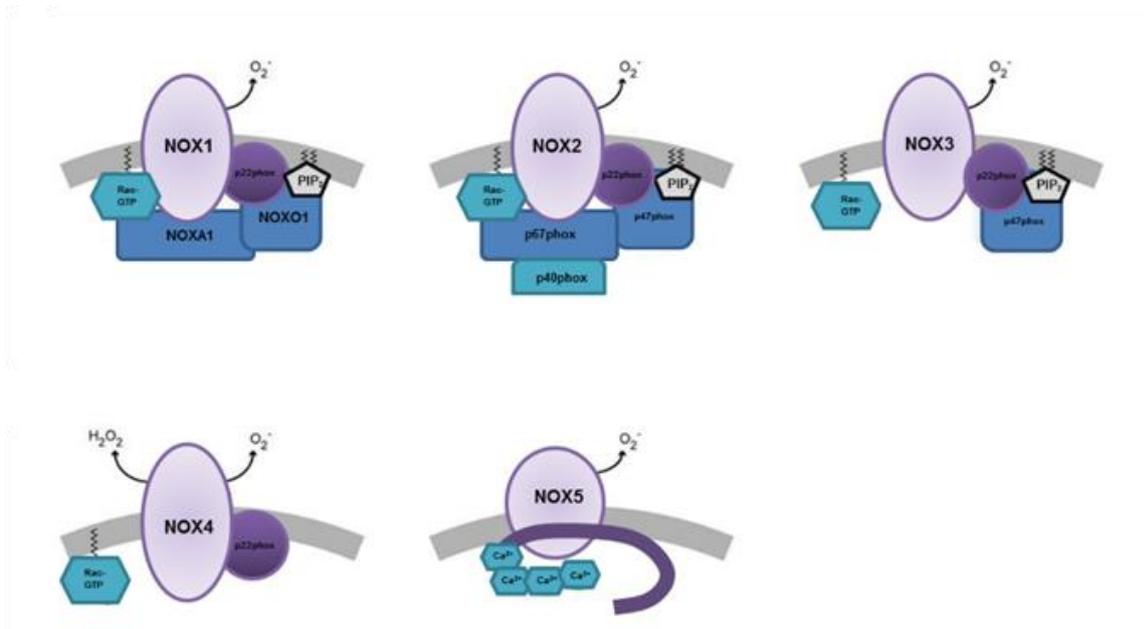


Abbildung 9: Zusammensetzung der unterschiedlichen NADPH-Oxidasen mit katalytischen und regulatorischen Untereinheiten.

1.7.1 Die NADPH-Oxidase NOX1

NOX1 wurde als Homolog zu NOX2 entdeckt und weist eine 56 %ige Homologie mit NOX2 auf ³⁶⁵. Strukturell enthält NOX1 am C-Terminus die NADPH-Substratbindungsstelle. Zudem verfügt es wie das NOX2 auch über eine FAD-Gruppe und zwei Häm-Regionen. Für seine Membranstabilisierung ist eine Assoziation mit der Untereinheit p22^{phox} zwingend notwendig ⁹; ³⁸⁵. Um aktiviert zu werden benötigt es zudem die NOXO1 (NOX-Organisator 1)-Untereinheit sowie die NOXA1 (NOX-Aktivator 1)-Untereinheit, die Homologe zu p47^{phox} sowie p67^{phox} sind ²⁵. Anders als NOX2 ist NOX1 vor allem im Kolon Epithelium ⁸⁶; ³⁶⁵, im Magen ³⁷⁷, in vaskulären glatten Muskelzellen ¹⁰, in den Nieren ³²⁹, in der Prostata und in Phagozyten zu finden ²⁶. Mit seinen 594 Aminosäuren besitzt es ein Molekulargewicht von 65 kDa, wobei die observierten Banden nach durchgeführter *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) sich zwischen 50 und 65 kDa befinden ²¹; ¹⁸⁵. Wahrscheinlich liegt dies an der erschwerten Immunodetektion der NOX-Proteine durch Antikörper ¹³².

1.7.2 NOX Organisator 1 (NOXO1)

Die Organisator Untereinheit NOXO1 ist für die Aktivierung von NOX1 essentiell ¹³⁵. Wie bereits erwähnt werden NOX1, NOXO1 und NOXA1 überwiegend im Darmepithel exprimiert. NOXO1 weist eine 27 %ige Homologie mit dem NOX2-Organisatorprotein p47^{phox} auf, es besitzt eine N-terminale PX-Domäne sowie zwei SH3-Domänen (*Src-homology 3*) und einen *Proline Rich Region (PRR)* COOH-Terminus ^{5; 55}. Anders als der p47^{phox}-Untereinheit fehlt NOXO1 die AIR-Region, sodass die SH3-Domänen der NOXO1-Untereinheit ohne eine Phosphorylierung mit der p22^{phox}-Untereinheit interagieren können. Daher wird vermutet, dass NOX1 konstitutiv aktiv ist ^{115; 366}. NOXA1 besitzt ein ähnliches Molekulargewicht wie p67^{phox} (51 kDa) und auch vier TPR-Motife (*Tetratricopeptide Repeat*), die Rac1 binden und für die NOX1-Aktivierung obligatorisch ist ²⁰². NOXA1 verfügt, verglichen mit p67^{phox}, lediglich am C-Terminus eine SH3-Domäne, die an NOXO1 binden kann ⁸⁴. Einige interessante Studien haben beispielweise gezeigt, dass in verschiedenen voneinander unabhängigen Zelllinien die mit humaner NOX1-, NOXO1- und NOXA1-cDNA transfiziert wurden, eine kontinuierliche Superoxid-Produktion nachgewiesen werden konnte ¹³⁵. Dies könnte durch den strukturellen Aufbau der NOXO1-Untereinheit erklärt werden. NOXO1 unterscheidet sich von p47^{phox} durch das Fehlen der AIR-Domäne was zu Vermutung führt, dass NOXO1 nicht phosphoryliert werden kann und somit die NOX1-Aktivierung unabhängig von einer Phosphorylierung ist ²⁶⁷. Die Abwesenheit der AIR-Domäne gewährleistet zudem eine permanente NOXO1-p22^{phox}-Wechselwirkung ^{84; 370}. Die aufgeführten Unterschiede zwischen NOXO- und p47^{phox} sowie NOXA1- und p67^{phox} könnten auch die funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Oxidasen erklären. Vor allem kann aufgrund dieser Unterschiede behauptet werden, dass es sich bei NOX1 um eine konstitutiv aktive Oxidase handelt und dass die Aktivität von NOX2 von einem Phosphorylierungs-Prozess abhängig ist. Im Gegensatz zu den anderen NOX-Untereinheiten gibt es bezüglich NOXO1 mehrere Hinweise über die Existenz verschiedener Splice-Varianten. Beispielsweise wurde eine *Long Transcript*-Variante und eine *Short Transcript*-Variante dieser Untereinheit gefunden ¹³⁵. Studien zeigten, dass die Splice-Varianten in verschiedenen Bereichen der Zelle lokalisiert sind. NOXO1 soll vor allem in der Zellmembran bzw. im Zytosol lokalisiert sein ^{82; 146}, jedoch kann es auch mit Caveolin-1 kolokalisieren ¹⁴⁹. Weiterhin ist NOXO1 im Nukleus, im Zytosol sowie in den Mitochondrien zu finden ^{73; 107}. Die Studie von Seimetz et al., untersuchte die Expression der verschiedenen NOX-Untereinheiten in humanen Lungenproben sowie auch im Zigarettenrauch-induzierten Emphysem in Mäusen. In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Expressionmuster der

verschiedenen NOX-Enzyme und deren Unterheiten nachgewiesen³³³. Die Ergebnisse dieser Studie haben NOXO1 als ein bedeutsames Protein in der COPD-Pathogenese sowie auch in im Zigarettenrauch-induzierten Emphysem in Mäusen vorgeschlagen. Während allen Zigarettenrauchexpositionszeitpunkten, einer akuten Zigarettenrauchexposition (2 Wochen), nach einer subchronischen Zigarettenrauchexposition von 3 Monaten sowie nach einer chronischen Zigarettenrauchexposition von 8 Monaten konnte eine permanente Hochregulierung von NOXO1 in der gesamten Lunge sowie den pulmonalen Gefäßen nachgewiesen werden³³³. Auch konnten Untersuchung in humanen Lungenproben eine erhöhte Expression von NOXO1 in Raucherlungen aufweisen³³¹. Die zuvor genannten Ergebnisse führten zur Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

Ziel dieser Arbeit ist, die Rolle und die Bedeutung der NOXO1-Untereinheit bei der Emphysem- sowie PH-Pathogenese nach einer Zigarettenrauchexposition in Mäusen zu evaluieren.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits dargestellt, gehört die COPD zu einer der häufigsten Todesursachen weltweit. Die Pathomechanismen und die detaillierten molekularen Signalwege, die dieser Erkrankung zu Grunde liegen sind bis dato noch nicht detailliert aufgeschlüsselt. COPD gilt bis heute als unheilbar, da lediglich die Symptome gelindert werden können. Die Untersuchung pathogenetischen Signalwege könnte ermöglichen, heilende Behandlungsstrategien gegen eine COPD-Erkrankung zu entwickeln. Die Ergebnisse einer vorausgehenden Doktorarbeit konnte NOXO1 als möglichen Kandidaten in der Entstehung der COPD-Pathogenese sowie des Zigarettenrauch-induzierten Emphysems in Mäusen identifizieren³³¹. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit der Effekt und Einfluss des *Noxo1 Knockouts* in Zigarettenrauch-exponierten Mäusen untersucht werden. Zur Induktion des Emphysems und der PH wurde das bereits etablierte Zigarettenrauchexpositionsmodell verwendet, indem C57BL6/Ntac (WT) und *Noxo1*^{-/-}-Mäuse (KO-Mäuse) für 3 und 8 Monate Zigarettenrauch ausgesetzt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Untersuchungen vorgenommen werden:

1. phänotypische Untersuchungen von Wildtyp- und *Nox1*^{-/-}-Mäusen mittels hämodynamischer Messungen, Lungenfunktionstests sowie auf histologischer Ebene durch die Bestimmung von Veränderungen der Alveolar- und Gefäßstruktur,
2. molekularbiologische Untersuchungen beider Genotypen, mit dem Fokus auf die Nitrotyrosin-, die *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA)-, und die *Mmp12*-Expression in Zigarettenrauch-exponierten- und Raumluf-exponierten Mäusen,
3. Genexpressionsanalysen verschiedener Gentargets im murinen Lungenhomogenat, wie z.B. den NADPH-Oxidasen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition,
4. Proteinexpressionsanalysen im murinen Lungenhomogenat nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition,
5. Microarray-Analysen aus der RNA von mikrodisektierten alveolären Septen und pulmonalen Gefäßen von über 3- und 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Nox1*^{-/-}-Mäusen,
6. Veränderungen des Proliferations- und Apoptose-Verhaltens in den ATII-Zellen sowie in den PSMCs von *Nox1 Knockout* Mäusen sowie in den Zellen in Kombination mit Zigarettenrauch,
7. Superoxid-Analysen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition in isolierten ATII-Zellen und PSMCs von WT- und *Nox1 Knockout* Mäusen unter Kontrollbedingungen sowie nach einer chronischen Rauchexposition als auch nach einer akuten Zigarettenrauchextrakt-Behandlung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Firma/Hersteller
Beatmungsgerät, flexiVent FX1	SCIREQ, Montreal, Kanada
Beatmungspumpe, MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
ChemiGenius Bio Imaging System	VWR, Bruchsal, Deutschland
Digitale Kamera, DC 300F	Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
Schallkopf für die Ultraschallmessung (25-55 MHz)	VisualSonics, Toronto, Kanada
Einbettungsmaschine	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
EKG-Tisch mit Temperaturfühler und Überwachungseinheit TM150-04-08-0496	Indus Instruments, Webster, TX, USA
Elektrophorese-Kammer	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Entwässerungsmaschine	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
ESR-Spektrometer EMXmicro	Bruker BioSpin, Karlsruhe, Deutschland
Färbekammer	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Feinwaage PL303 max. 310 g d = 0,001 g	Mettler Toledo, Columbus, USA
Feinwaage AB104-S max. 110 g, mind. 10 mg,	Mettler Toledo, Columbus, USA
Filmentwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Tokio, Japan
FMT-Imaging-System, FMT 2500 LX	Perkin Elmer, Waltham, USA
FX1 Modul	Scireq, Montreal, Kanada
geschlossener Vakuumsystem Gewebeinfiltrationsautomat, TP 1050	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Gradienten PCR-iCycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Hämatokrit-Zentrifuge, Hämatokrit 210	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Heizblock	VWR, Bruchsal, Deutschland
Heizplatte Hi 1220	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Heraeus (Ofen)	Hilder & Kretschmer, Gießen, Deutschland
Homogenisator Precellys 24	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Isofluranverdampfer MatrX VIP 3000,	Midmark Orchard Park, NY, USA
Isofluranverdampfer Vet Equip	KF Technology, Rom, Italien
Kryostat	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte, EG 1150C	Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
Laboport Mini Laboratory Pump	KNF Neuberger Inc., Trenton, USA
Laser-Capture Mikroskop, Leica	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

LMD6000 Mikrodisektion	
Lichtmikroskop (Leica DMLA)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Metallblock für Gewebeschnitte	selbst hergestellt
Microplate reader (Infinite M200) i-control Verson 1.10	Tecan, Mennedorf, Deutschland
Mikroplattenlesegerät ELx808	Bio-Tek, Bad Friedrichhall, Deutschland
Mikroskop, DMR Deutschland	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Q 550 IW	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom RM 2165	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge Hettich Micro 200	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Millar-Katheter, Model SPR-671, Druckkatheter; Länge 65 cm Größe 1,4 F	Millar Instruments Inc, Houston, USA
Mx3000P (q-PCR)	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
NanoDrop (ND-1000)	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	LO – Laboroptik GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Objektträgerstrecktisch, HI 1220	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Paraffinausgießstation, EG 1140H	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Paraffinstreckbad, HI 1210	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Px1TM PCR Plate Sealer	Bio-Rad, München, Deutschland
Zigarettenrauchgenerator	RGB01, Burghart GmbH, Weld, Deutschland
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore, Billerica, USA
Röntgen-Micro-CT, SkyScan® 1178	Bruker, Brüssel, Belgien,
Schüttelgerät Eb Swip KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Semidry-Blot-System	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Spannungsgerät für Elektrophorese	Bio-Rad, München, Deutschland
Stereomikroskop, Leica M50 Routine	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Sterilbank HERA Safe	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Tierwaage (groß)	August Sauter GmbH, Albstadt, Deutschland
Tierwaage (klein), TEE 150/1 max. 150 g	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Tpersonal Thermocycler (PCR-Cycler)	Biometra, Göttingen, Deutschland
Transducer	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Ultraschallgerät, Vevo® 770 Imaging	System VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Ultraschalltisch und Halterung für Schallkopf VEVO® Imaging Station	VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Vakuumgewebe-Infiltrationsautomaten TP1050	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Vakuum-Pumpe	Jun-Air, Ahrensburg, Deutschland
Verstärker MPVS-Ultra Pressure-Volume-Loop System	Millar Instruments Inc., Houston, USA
Verstärker PowerLab 8/30, ML870	AD Instruments, Oxford, Großbritannien

Vortex	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Waage für Substanzen (Mettler Toledo PL 303)	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Zellinkubator HERAccl 150	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge, klein, 8-Wells	VWA, Radnor, USA
Zytozentrifuge, Cellspin I	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 4: Software

Software	Hersteller/Firma
Analyze Direct	Mayo Clinic, Arizona, USA
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
FlexiWare Version 7.2	SCIREQ, Montreal, Kanada
FMT 4000 system software, TrueQuant v3.0	Perkin Elmer, Waltham, USA
ImageJ	Wayne, Rasband, USA
Imaris	Bitplane, Zürich, Schweiz
InnoScan 900	Innopsys, Chicago, USA
LabChart	AD Instruments, Oxford, Großbritannien
Leica Application Suit, Version 4.5.0	Microsystems Leica, Wetzlar, Deutschland,
Makro für	
- Alveolar-Morphometrie	
- Muskularisierungsgrad	
- Wandstärke	
- Zellzählung	
Mx3000RQPCR Systems	Stratagen, Kirkland, USA
new CAST	Visiopharm, Hørsholm, Dänemark
Statistiksoftware R	Open Source: www.r-project.org
Software Leica Application Suit, Version 4.5.0	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Software, Q Win V3	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien für Zellkultur/ molekularbiologische Untersuchungen/ Histologie/ physiologische Untersuchungen

Artikel	Hersteller/Firma
0,22 µm Porenfilter	Millipore, Billerica, MA, USA
0,5 ml Tubes, Dnase/Rnase free	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1 % Providonjod-Lösung, Braunoderm®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
3R4F Research Zigaretten	University of Kentucky, Kentucky Tobacco Research and Development Centre
6-Well, Zellkultur Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
12-Well, Cell Culture Plate	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
18 G Trachealtubus	emka TECHNOLOGIES, Paris, Frankreich
24-Well, Zellkultur Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
24-Well, Zellkultur Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
40 µm Nylonfilter,	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
70 µm Nylonfilter	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
50 % 2-Propanol	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
60er TC-Schale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Platte weiß	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-Well, Zellkultur Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Mikroplatten	Thermo Fischer Scientific Schwerte, Deutschland
100er Petrischale	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Abgene® PCR-Platten	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
AbsoluteQ PCR Seal	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
AGFA Cronex 5 Medical X-Ray Film	AGFA, Mortsel, Belgien
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München, Deutschland
Arterienclip, Aesculap® Biemer Clip	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Buprenorphin, Temgesic®	Essex Pharma, München, Deutschland
Chemilumineszenzfilm, Cronex 5 Medical X-Ray Film	Agfa, Morstel, Belgien
Deckgläser (24x36 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Dreiwegehahn, Discofix®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einbettkassetten, groß, Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassette Macro	
Einbettkassetten, klein, TissueTek® 3	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Uni-Cassette®	
Einbettmedium, TissueTek®	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Eindeckmedium, Xylol-lösliches Pertex®	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Einfrierröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Einmalhandschuhe, Vasco® Nitril white	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalnitrilhandschuhe, Peha soft®	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Nitrile	
Einmalspritze	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, Inject	

Luer®	
Einmalspritze 50 ml, Original Perfusor® Spritze	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Enthaarungscreme, Elca® Med Creme	ASID BONZ Herrenberg, Deutschland
Express plus Filter 0,22 µm	Millipore Billerica, MA, USA
Falkonröhrchen , 15 ml, 50 ml, Cellstar® Tubes Falkons (15 ml, 50 ml) dunkel	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Filter, Ministart, 0,20 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Filtercards, Cellspin	Tharmac, Marburg, Deutschland
Gauze 5 x 4 cm Purzellin®	Lohmann und Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Gauze Bälle Größe 6 Fuhrman	Verrbandstoffe GmbH, Much, Deutschland
Hämatokrit-Kapillaren	Hirschmann Laborgeräte GmbH & CoKG, Eberstadt, Deutschland
Hämatokrit-Versiegelungsset,	Brand GmbH & CoKG, Wertheim, Deutschland
Haushaltsbindfaden Nr.12	Coats GmbH, Kenzingen, Deutschland
Haushaltsfaden, schwarz 100 % Baumwolle	Amann, Bönningheim, Deutschland
Isofluran, Isofluran Baxter	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Kaltlichtquelle, Schott Kaltlichtquelle KL 200 mit zweihalsigem Schwanenhalslichtleiter	Fiber Optics, SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Kanüle, 24 G (0,55 mm x 25 mm) 26 G (0,9 mm x 25 mm) 30 G (0,3 mm x 25 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Katheder/ Tubus Adapter, Combifix- Adapter	Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Keramikkügelchen, 1,4 mm	Peqlab Erlangen, Deutschland
Maske für Maus	(selbst konstruiert)
Medizinisches Klebeband	Durapore® 3M, Minnesota, USA
Membran-Slides	Microdissect, Herborn; Deutschland
Membran, Maschenweite 10 µm	Büchmann GmbH & Co, Monchengladbach, Deutschland
Metallklemme für Zytocentrifuge	
Microarray Objektträger	Mausgenom 8x60K, Agilent Technologies, Design ID 028005, Waldbronn, Deutschland
Mikrotomklingen S 35, Feather	Produkte für die Medizin AG Köln, Deutschland
Mulltupfer (20 x 20cm)	Beese Barbüttel, Deutschland
Multistep-Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nahtmateria, I Prolene® 6-0	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Narkosebox, klein	Harvard Apparatus, March, Deutschland

Objektträger, Superfrost Plus®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Operationsbesteck	Fine Science Tools (F.S.T), Heidelberg, Deutschland
Paraffin Einbettmedium, Paraplast Plus®	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Parafilm	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Pasteur-Pipetten 230 mm	VWR Radnor, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
PET-Schläuche, mit unterschiedlichen Durchmessern	Baumarkt
Pin um Arterie anzuheben, Gefertigt aus BD Microlance™ 3 (30 ½ G)	Becton, Dickinson & Co. Ltd, Drogheda, Irland
Pinsel	Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
Polyester Garn 5/0	FSSB, Jestetten, Deutschland
Polyvenylidendifluorid-Membran, PVDF-Membran	Pall Corporation, Dreieich, Deutschland
Precellys 24	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Real-time PCR-Reaktionsgefäße	Thermo-Fischer (Abgene), Hamburg, Deutschland
Rektalthermometer	Indus Instruments, Houston, TX, USA
Röhrchen zur Kryokonservierung, Cryo's™ Freezing Tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Schere <i>extra fine bone Scissors—straight</i> 8,5 cm	Fine Science Tools (F.S.T), Heidelberg, Deutschland
Schere, <i>delicate Scissors curved</i> 120 mm	AUSTOS, Irvine, USA
Selecta Faltenfilter	Schleicher + Schüll GmbH, Dassel, Deutschland
Skalpel 10er, 11er, 20er, Feather® Disposal Scalpel	Pfm medical AG, Köln, Deutschland
Spülkanüle für die Pulmonalarterie, Sonderanfertigung für ILU1	HSE (Hugo Sachs Elektronik), Hugstetten, Deutschland
Spülkanüle, Pulmonalarterieller Katheter	HSE (Hugo Sachs Elektronik), Hugstetten, Deutschland
Stativ, zum Halten der Spritzen während Teesieb	Rossmann Drogerie, Hannover, Deutschland
Trachealtubus, aus Vasofix® Safety 20G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Trichter für Zytocentrifuge	
Ultraschallgel, Aquagel®	Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA
Urinbecher (100 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vergrößerungslupe, MS5	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Wärmeunterlage mit Rektalsonde, Hotplate with Physitemp TCAT-1LV Controller	Physitemp Instruments, Clifton, USA
Zellstofftupfer (4x5 cm), Pur-Zellin®	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

Zellulose-Handtücher Tork, Mannheim, Deutschland

Tabelle 6: Reagenzien/Chemikalien für Zellkultur/ Histologie/ molekularbiologische und physiologische Untersuchungen

Name	Firma
0,9%ige Natrimchlorid-Lösung	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
1 mol/l Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH)	Noxygen, Denzlingen, Germany
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
4x NuPage LDS-Ladepuffer	Invitrogen Carlsbad, USA
6x Loading Dye, Ladepuffer, Gelelektrophorese	Fermentas St. Leon Rot, Deutschland
Acetat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Aceton	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamid/Bis	Serra Nürnberg, Deutschland
Agarose	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Agarose Type VII (niedrig schmelzend)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Alexa Fluor 488	H&L, Herford, Deutschland
Amersham ECL Plus Detection System	GE Healthcare, München, Deutschland
Ammoniumchlorid	Promega, Madison, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Promega, Madison, USA
Annexin-Vivo 750, NEV11053	Perkin Elmer, Waltham, USA
<i>α-alpha-smooth muscle actin</i>; Verdünnung 1:800 mit 10 % BSA Klon 1A4 monoklonal, Maus anti-human	Sigma Aldrich St. Louis, USA
<i>α-von Willebrand Faktor Verdünnung 1:1200 mit 10 % BSA polyklonal, rabbit anti-human</i>	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
<i>α-Ki67, ab15580</i>	Abcam, Cambridge, UK
<i>α-Collagen Typ 1</i>	Calbiochem, Billerica, USA
Antikörper Diluent	Zytomed systems, Berlin, Deutschland
Augencreme, Bepanthen® Augen und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit	Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, USA
Blocking Reagent	Roche, Basel, Schweiz
Blotting-Papier Whatman	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
CD16/31 beschichtete Petrischale	BD Pharmigen, New Jersey, USA
CD45 beschichtete Petrischale	BD Pharmigen, New Jersey, USA
Citratpuffer pH 6,0	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

Collagenase Type IV	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Complete™ Protease Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
DAB Peroxidase (HRP) Substrat kit	Vector/Linaris, Wertheim, Deutschland
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako, Hamburg, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Destilliertes Wasser (dH₂O, DNase-/RNase-frei)	Gibco TM Invitrogen, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dispase	BD Bioscience, New Jersey, USA
DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium ohne Phenolrot, High Glucose [0,5 mg/ml]	GIBCO Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose [0,5 mg/ml]	GIBCO Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Dnase	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Eisenpartikel (Fe₃O₄)	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Eosin	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Ethanol	Fischer, Saarbrücken, Deutschland
70 %ig, 96 %ig, 99,6 %ig, vergällt mit Ethylmethylketon	
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Fibronektin	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Formaldehydl Lösung 3,5 – 3,7 %ig	Otto Fischar GmbH & Co. KG Saarrbrücken, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hämalaun	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Hämalaun nach Mayer, sauer	Division Chroma, Münster, Deutschland
Heparin, Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig	Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Immunodetection Kit	Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Isofluran	Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Isopropanol (99,8 %ig)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid, KCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat, KH₂PO₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot Aluminiumsulfat	Chroma, Münster, Deutschland
Krebs-Henseleit Puffer (KHB)	Noxygen Science Transfer & Diagnostic GmbH, Elzbach, Germany
Laemmli Proben-Puffer (2x)	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Maus anti-nitrotyrosine (Abcam, clone HM11, Cambridge, UK)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Medium 199 (M199)	Gibco Life technologies, Carlsbad, USA

Methanol	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Methylgrün Counterstain	Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Milchpulver, Skim Milk	Sigma Aldrich, St. Louis, Deutschland
MM HRP Polymer	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
MMPSense 750 FAST, NEV10168	Perkin Elmer, Waltham, USA
Natriumchlorid, NaCl (1000 ml)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumchloridlösung (100 ml)	Serag-Wiessner KG, Naila, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (Na₂HPO₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Promega, Madison, USA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nile-Red Fluoreszenz Farbstoff	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Nω-Nitro-L-arginine (L-NNA) N5501	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Normocin	Invivo-Gen, Toulouse, Frankreich
Nuklear Fast Red	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Nylon-Membran, Amersham HybondTM-N+	GE Healthcare, München, Deutschland
PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
α-PCNA Antikörper (IHC Färbung)	Santa Cruz, Texas, USA
Peg Superoxiddismutase (pSod)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen Strep, P/S)	Gibco, Life technologies, Carlsbad, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglycol-Superoxiddismutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Povidoniod (Braunoderm[®])	Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PVDF-Membran ImmobilionTM-P	Millipore, Billerica, USA
R.T.U. Horseradish	Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Resorcin Fuchsin	Chroma, Münster, Deutschland
Rodent Block M	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 37 %ig, rauchend,	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide), Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Sekundärantikörper, Goat anti-mouse IgG	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Smooth Muscle Cell Basalmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Smooth Muscle Cell growth Medium 2 Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Staurosporin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SYBR[®] Safe	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TissueTek[®]	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Trachealer Tubus, Vasofix[®] Safety, 20 G gekürzt, ca.	Braun. Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

1,5 cm,	
Triton®-X 100	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin, Digest All 2®	Zytomed Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA (1x)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Vector M.O.M.™ Kit (Mouse-On-Mouse)	Biozol Diagnostics, Eching, Deutschland
Vector VIP peroxidase (HRP) Substrat Kit	Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Vector VIP® Substrat Kit	Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Vector® Hematoxylin QS	VECTOR Laboratories Inc., Burlingame, USA
Vulcan Fast Red	Biocare medical, Concord, USA
Wasserstoffperoxid 30 %ig, H₂O₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 7: Assays

Name	Hersteller
Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit, A22188	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, Madison, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Basel, Schweiz
DC Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
iTaq Sybr Green Supermix plus ROX	Bio-Rad, München, Deutschland
NB70/ NB78 Kofaktoren (Nitric Oxide Synthase Cofactors)	Oxford Biomedical Research, Oxford, USA
Nitric Oxide Assay Kit, EMSNO	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Nitric Oxide Synthase Cofactors, NS70	Oxford Biomedical Research, Oxford, USA
Ovation® Pico WTA System V2	NuGEN Technologies, Bermmel, Niederlande
PeqGOLD Total RNA Kit	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Rneasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ultra Sensitive Assay for Nitric Oxide Synthase,	Oxford Biomedical Research, Oxford, USA
ZytoChem-Plus AP Polymer-Kit	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

Tabelle 8: Größenstandards

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

2.2 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Promotion wurden männliche sowie weibliche konstitutive *Noxo1^{-/-}* (*Knockout*) Mäuse und C57BL/6Ntac- (Wildtyp, WT) Mäuse verwendet. C57BL/6Ntac stammten von der Firma *Taconic Biosciences GmbH* (Ejby, Dänemark). Da diese Mäuse durch ihre leichte Aufzucht und Robustheit bekannt sind, werden sie häufig zur Erforschung von humanen Erkrankungen eingesetzt. Die Linie der *Noxo1^{-/-}*-Mäuse wurde von der Firma *Taconic Artemis* generiert (*Taconic Artemis GmbH*, Köln, Deutschland) und besitzt den genetischen Hintergrund C57BL/6Ntac. Die vollständige Nomenklatur dieser Mäuse lautet C57BL/6-*Noxo1^{tm1881_17.2Arte}*. Die Zucht erfolgte bei der Firma *mfd diagnostics* (*mfd diagnostics GmbH*, Wendelsheim, Deutschland). Von dort wurden die Tiere für das Versuchsvorhaben bezogen. Während des Versuchszeitraumes befanden sich die Mäuse in der Tierstallhaltung der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie wurden bei einer

Beleuchtungsdauer von 12 Stunden pro Tag und einer konstanten Temperatur von 22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 40 % bis 70 % gehalten. Wasser und Futter (Altromin® Standarddiätfutter) erhielten die Mäuse *ad libitum*. Das Alter der Mäuse betrug bei Versuchsbeginn 12-14 Wochen, das Gewicht der Mäuse lag vor Versuchsbeginn zwischen 19-22 g.

2.2.1 Primerdesign und verwendete Primer

Die verwendeten Primer wurden mit dem frei verfügbaren Programm „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) erstellt. Die Primer wurden mit intron-überspannenden, amplifizierten cDNA-Produkten konstruiert. Ihre Schmelztemperatur lag bei 62 °C ± 1 °C. Über die Firma Metabion International AG (Martinsried, Deutschland) wurden die Primer synthetisiert und im lyophilisierten Zustand geliefert. Gelöst wurden sie in destilliertem Wasser, sodass man eine 100 pmol-Ausgangslösung erhielt. Zur Analyse wurden die Primer um ein weiteres Mal um 10fach (auf 10 pmol) verdünnt. Folgende Primer wurden während der Doktorarbeit verwendet:

Tabelle 9: Verwendete Maus-spezifischer Primer

Gen	Primersequenz	Produktgröße (bp)
p22	F:5'-AGATCGAGTGGGCCATGTG-3' R:5'-ATGGTGGACCCCTTTTTCCT-3'	182
p47	F:5'-TTGGGTCCCTGCATCCTATC-3' R:5'-ACCAGCCATCCAGGAGCTTA-3'	187
p67	F:5'-CAGACCCAAAACCCAGAAA-3' R:5'-AGGGTGAATCCGAAGCTCAA-3'	223
Bcl2	F: 5'-CATGTGTGTGGAGAGCGTCA-3' R: 5'-GCATGCTGGGGCCATATAGT-3'	152
HMOX1	F: 5'-TGGCGTCACTTCGTGAGAGG-3' R: 5'-CCTGGGGGCCAGTATTGCAT-3'	193
Ki61	F: 5'-GTCGCTTTGGACAGTGAACCT-3' R: 5'-TTCTTGTTCTTAACTTCTTGGTGCAT-3'	112
MMP12	F:5'-TATTCCCTGGGCTTCTCTGC-3' R:5'-GGTAAGCAGGGTCCATGAGC-3'	139
NOX1	F:5'-CACTGGCTGGGATAGCAACA-3' R:5'-AGTCCGAGGGCCACATAAGA3'	184
NEP	F:5'-TCAGCCAAAGCAAGCAGCTA-3' R:5'-CGATGCCCCCATAGTTCAAT-3'	186
NOX2	F:5'-TCGCTGGA AACCTCCTATG-3' R:5'-GGATACCTTGGGGCACTTGA-3'	158
NOX4	F:5'-CCGGACAGTCTGGCTTATC-3' R:5'-TTGAGGGCATTACCAAGTG-3'	159
NOXA1	F:5'-CATCTGGAGCCCATGGATTT-3' R:5'-TCATATAGGCCAGGGCTCGT-3'	182
PBGD	F:5'-ATGTCCGGTAACGGCGGC-3' R:5'-GGTACAAGGCTTTCAGCATCG-3'	139
TIMP3	F: 5'-AAGACCAGAGTGCCAAAGGGC-3' R: 5'-CAACAGCTACCATGACTCCCT-3'	196
TLR4	F: 5'-CCTGACACCAGGAAGCTTGA-3' R:5'-TCAAGGGGTTGAAGCTCAGA-3'	140

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper (AK) aufgelistet. Alle Antikörper wurden in 6 %iger (w/v) Milch/TBST (Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween) verdünnt.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für Western Blots

Antikörper	Firma	Bezeichnung	Verdünnung	Spezies
Primäre Antikörper				
α-β-Aktin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA,	A5316	1:30000	mouse
α-Nitrotyrosin	Abcam, Cambridge, UK	ab7048	1:1000	mouse
Sekundäre Antikörper				
α-rabbit	Promega, Madison, USA	W401B	1:5000	goat
α-mouse	Promega, Madison, USA	W402B	1:5000	rabitt

2.3 Methoden

2.3.1 Mausstämme

2.3.1.1 C57BL/6Ntac Maus

Um eine Vergleichbarkeit zur Emphysem- und PH-Entwicklung zu gewährleisten, wurden für das Versuchsvorhaben adulte WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäuse verwendet.

2.3.1.2 *Noxo1*^{-/-}

Die vollständige Nomenklatur der *Noxo1*^{-/-}-Mäuse lautet C57BL/6-*Noxo1*^{tm1881_17.2Arte}. Hierbei handelt es sich um eine Mauslinie, die einen konstitutiven, globalen *Knockout* von NOXO1 aufweist und homozygot gezüchtet wurde. Bei den genetisch veränderten Mäusen werden spezifische Analysen durchgeführt, um die Bedeutung bzw. die Rolle des Ziel-Proteins/Gens, in diesem Fall NOXO1 und dessen Einfluss auf die Emphysem- als auch PH-Pathogenese nach einer Zigarettenrauchexposition zu untersuchen. Der *Noxo1 Knockout* liegt bei den Mäusen konstitutiv vor und wurde durch die Integration der loxP-sites vor dem 2. und hinter dem 9. Exons gewährleistet. Lediglich das erste Exon verbleibt, welches keine funktionelle Einheit besitzt. Durch das Fehlen von NOXO1 kann auf Proteinebene keine funktionsfähige NOXO1-abhängige NADPH-Oxidase gebildet werden.

2.3.1.3 Zigarettenrauchexposition in der Zigarettenrauchmaschine

WT- (C57BL/6Ntac) und *Noxo1*^{-/-}-Mäuse wurden 5 Tage pro Woche, für 6 Stunden pro Tag und für bis zu 8 Monaten Zigarettenrauch in einer Zigarettenrauchkammer (RGB01 Zigarettenrauchgenerator, Burghart GmbH, Wedel, Deutschland) ausgesetzt. Für die Zigarettenrauchexposition wurden 3R4F-Forschungszigaretten (Kentucky Tobacco Research and Development Centre, Lexington, USA) verwendet, die in ihrer Zusammensetzung standardisiert sind. Über den Zigarettenrauchgenerator wurde der Zigarettenrauch generiert und in die Zigarettenrauchkammer geleitet. Durch die Verdünnung mit Frischluft enthielt der zugeleitete Zigarettenrauch eine konstante Partikelkonzentration von 140 mg/m³. Um eine Gefährdung der Mäuse auszuschließen wurde der Kohlenmonoxidgehalt ermittelt. Der maximale Wert am Arbeitsplatz (MAK-Wert) von Kohlenmonoxid beträgt 30 ppm. Dieser Wert wurde während der kompletten Versuchsdauer nicht erreicht. Eine Kontrollgruppe von jeweils C57BL/6Ntac-Wildtyp-Mäusen sowie *Noxo1*^{-/-}-Mäusen hielt sich unter gleichen

Bedingungen in der Raumluft auf (mit einem Sauerstoffgehalt von 20,9 % (c.a 160 m über den Meeresspiegel). Diese beiden Kontrollgruppen wurden zur Erhebung möglicher Effekte des Alterungsprozesses verwendet.

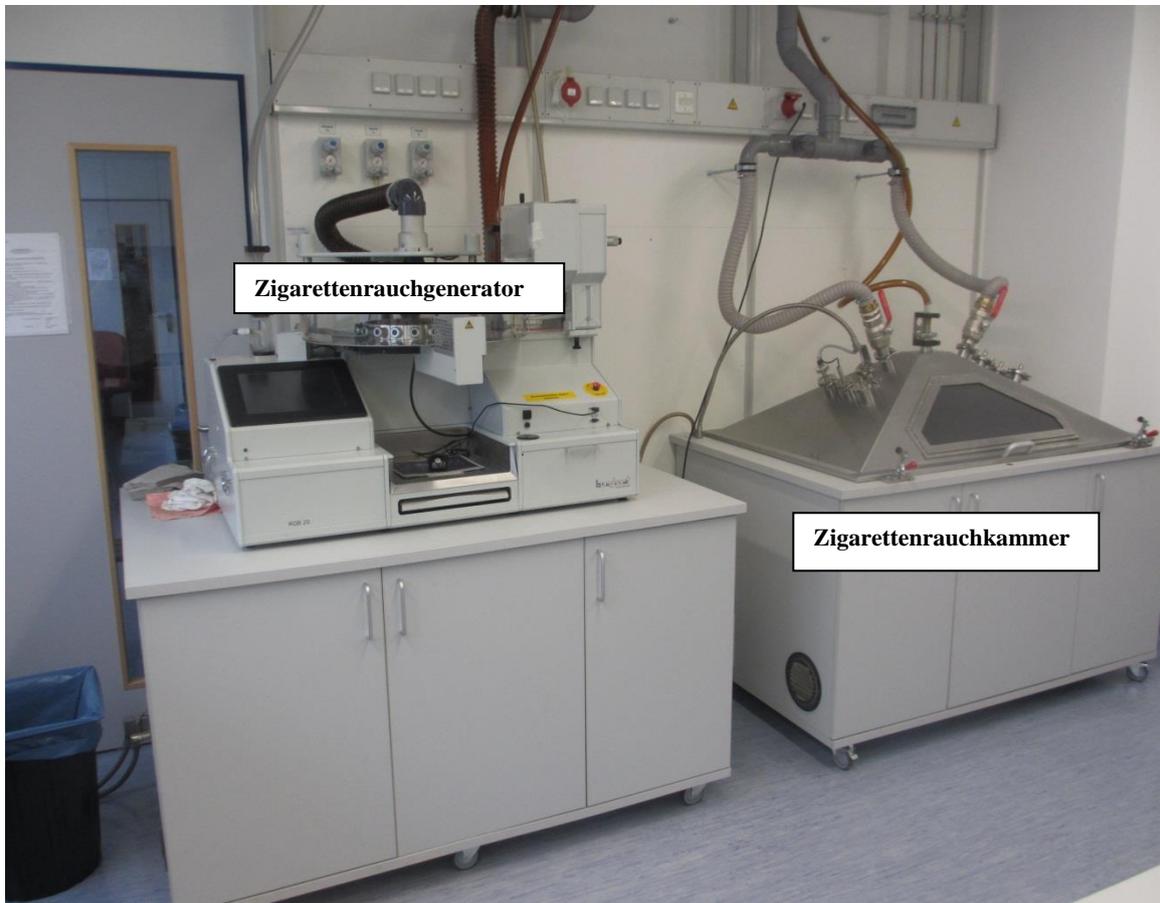


Abbildung 10: Zigarettenrauchmaschine mit Zigarettenrauchgenerator und Zigarettenrauchkammer

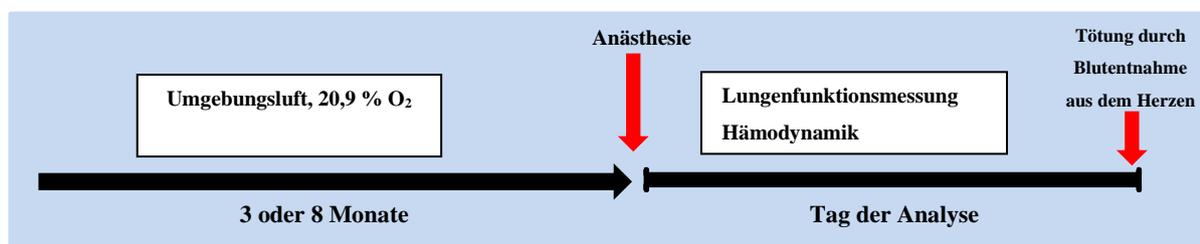
2.3.1.4 Versuchsgruppen

Die Mäuse wurden in verschiedene Gruppen aufgeteilt und mit einem Alter von 12-14 Wochen in den Versuch genommen. Vor dem Versuchsstart wurde das genaue Gewicht der Tiere festgehalten.

Alle Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen GI 20/10 Nr. 05/2012 sowie GI 20/10 Nr. 25/2013 genehmigt.

Versuchsgruppen:

WT (C57BL/6N) Mäuse n=15 und *Nox1^{-/-}*-Mäuse n=15



WT (C57BL/6N) n=15 und *Nox1^{-/-}*-Mäuse n=15

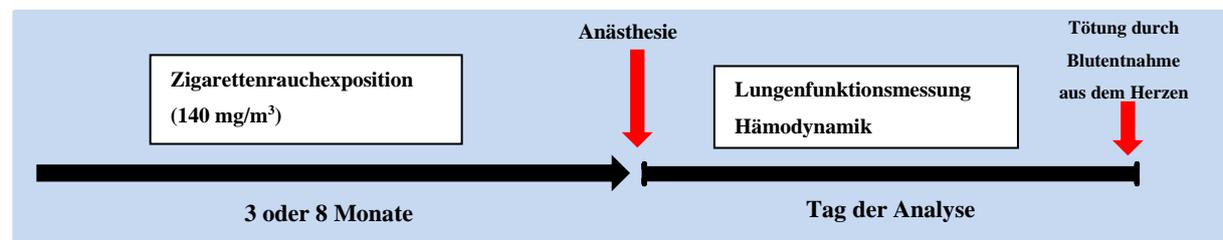


Abbildung 11: Darstellung der verschiedenen Versuchsgruppen.

Um die Entwicklung bzw. den Verlauf der Emphyseentwicklung und der PH unter der Zigarettenrauchexposition zu analysieren erfolgte nach 3- bzw. 8-monatiger Zigarettenrauchexposition, unter einer tiefen Anästhesie, die Lungenfunktionsmessung und die hämodynamische Messung jeder einzelnen Maus. In tiefer Isofluran-Narkose wurde das Tier durch die Blutentnahme aus dem rechten Ventrikel getötet. Organe, wie z.B. Milz, Leber, Niere sowie Teile des Muskels wurden entnommen. Der rechte Lungenflügel wurde für molekularbiologische Untersuchungen in Flüssigenstickstoff eingefroren, der linke Lungenflügel wurde entweder für histologische Untersuchungen fixiert oder in Tissue Tek[®]

eingebettet und bei -80°C eingefroren. Eine Plasmagewinnung erfolgte durch das Zentrifugieren des entnommenen Blutes ($9500 \times g$ für 15 Minuten) und das Herz wurde zur Bestimmung einer möglichen Rechtsherzhypertrophie verwendet.

2.4 Physiologischen Untersuchungen

2.4.1 Echokardiographie

Die Echokardiographie (VEVO770, VisualSonics Inc; Toronto, Kanada) ist eine nicht-invasive bildgebende Methode, die auch zur Untersuchung des kardiovaskulären Systems genutzt werden konnte. Einen Tag vor Versuchsende wurde bei den Mäusen jeder Versuchsgruppe eine Herzultraschall Messung durchgeführt. Dr. Baktybek Kojonazarov hat aufgrund seiner Expertise hinsichtlich dieser Methode die Untersuchung an diesen Tieren durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in die Narkosekammer gesetzt, die mit einem 3 %igen Isofluran/Sauerstoff-Gemisch begast wurde. Die anästhesierten Mäuse wurden in Rückenlage auf eine Wärmeplatte mit intergrierten Elektrodiagramm-(EKG) Elektrodenplatten gelegt und mit einem Klebestreifen an den Gliedmaßen fixiert. Durch einen Nasenkonus wurde die Inhalationsnarkose mit einem 1,5-3 %igen Isofluran/Sauerstoff-Gemisch aufrechterhalten. Über ein rektal eingeführtes Thermometer wurde die Körpertemperatur der Maus überprüft. Das Fell am Thorax und des kranialen Abdomens wurden zur Vermeidung von Bildartefakten entfernt. Nach Applikation des Ultraschallgels, konnten mit dem Doppler-Echokardiographie-Gerät, welches mit einem Linearschallkopf (30-45 MHz, VisualSonics) ausgestattet ist, folgende Parameter erhoben werden:

- *Pulmonary Artery Acceleration Time (PAAT):*

Beschreibt den Zeitrahmen von Beginn des pulmonalarteriellen Flusses bis die maximale Geschwindigkeit erreicht ist.

- *Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion (TAPSE)*

Mit diesem Parameter wird die systolische Funktion des rechten Ventrikels bewertet. TAPSE beschreibt die zurückgelegte Distanz (in Milimeter) des Trikuspidalring zwischen Enddiastole und Endsystole.

- Cardiac Output (CO) = Herzzeitvolumen

Auch bekannt unter dem Begriff „Herzzeitvolumen“. Es beschreibt die Größe des Volumens, das innerhalb einer festgelegten Zeit vom Herzen über die *Aorta ascendens* in den Blutkreislauf gepumpt wird. In der Regel wurde das Herzzeitvolumen über einen Zeitraum von 1 Minute angegeben. Aus der Formel Schlagvolumen des Herzens x die Herzfrequenz wird der CO errechnet.

Nach der Untersuchung wurde jeder Maus vom Ultraschallgel gesäubert, die Klebestreifen wurden entfernt und sie wurde in ihren Käfig gelegt, in dem sie bis zum vollständigen Erlangen des Bewusstseins sowie der motorischen Fähigkeiten beobachtet wurde.

2.4.2 Fluorescence Molecular Tomography kombiniert mit mikro-Computertomographie (FMT- μ CT)

Die Kombination dieser beiden Methoden ermöglicht, ein breites Spektrum biologischer Zielproteine, spezifische Signalwege sowie die dahinterstehenden Prozesse, auch solcher die bei einer Emphysementstehung eine Rolle spielen können, am lebenden Tier zu untersuchen. Bei der Durchführung dieser Untersuchung wurden folgende fluoreszierende Sonden zum Einsatz gebracht: Annexin-Vivo™ 750, und MMPSense™ 750 FAST. Aufgrund der identischen Wellenlänge der Sonden wurde für die Injektion jeder Sonde eine Gruppenanzahl von n=5 Mäusen benötigt. Intravenös wurde den Mäusen das MMPSense™ 750 FAST verabreicht und weiteren 5 Tieren jeder Gruppe die zweite Sonde (Annexin-Vivo™ 750). Nach der vom Hersteller vorgegebenen Inkubationszeit der Sonden (von 2 Stunden beim Annexin-Vivo™ 750 und von 6 Stunden beim MMPSense™ 750 FAST wurden die Mäuse mit dem Computertomographen (CT) (SkyScan 1178®) gescannt, um die Organe des gesamten Tieres darzustellen. Die in der Scan-Einheit befindliche Liegefläche für die Maus, wurde mit einem 1,5 %igen Isofluran/Sauerstoff-Gemisch durchflutet, sodass das Tier während des Scans narkotisiert war. Nachfolgend wurde die Maus in das FMT- Imaging-System (FMT 2500 System, PerkinElmer, Waltham, USA) gelegt, um ein dreidimensionales Ganzkörper- bzw. Tiefengewebebild des Fluoreszenzsignals zu erstellen. Während des vier- bis fünfminütigen Scans, wurde die Maus mittels eines 1,5 %igen Isofluran/Sauerstoff Gemisches in Narkose gehalten. Währenddessen wurden die Atemfrequenz, die Herzfrequenz und die Körpertemperatur aufgezeichnet. Das gemessene Signal wurde offline über eine

Software (Analyze Direct, Mayo Clinic) quantifiziert und durch den CT-Scan genau lokalisiert. Nach der Untersuchung wurde die Maus in einen mit einer Rotlichtlampe bestrahlten Käfig gelegt, in dem sie bis zum vollständigen Erlangen des Bewusstseins sowie der motorischen Fähigkeiten beobachtet wurde.

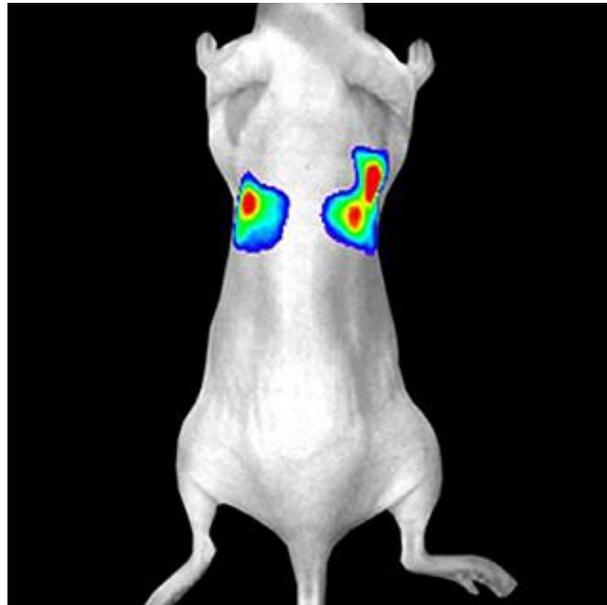


Abbildung 12: 3D-Visualisierung mit PerkinElmer™ Sonden.

<https://www.perkinelmer.com/de/category/bioluminescent-oncology-cell-lines> (abgerufen am 25.10.2020)

2.4.3 Lungenfunktionsmessung mit dem flexiVent-System

2.4.3.1 Kalibrierung

Zur Durchführung respiratorischer Manöver und zur Atemmechanikmessung wurde das flexiVent-System (Scireq, Montreal, Kanada) verwendet. Vor Beginn der Vorbereitung der Tiere wurde die Datenerfassungs-Software (flexiWare Version 7.2, SCIREQ, Montreal, Kanada) sowie die Beatmungspumpe des flexiVent FX1 (SCIREQ, Montreal, Kanada) gestartet. Die Vorbereitungen der Tiere und der Ablauf der Messung werden im Folgenden beschrieben: Vor Beginn der Messung erfolgte an jedem Tag eine Zweipunkt-Kalibrierung der Drucksensoren. Für diese Kalibrierung werden mittels eines Barometers zwei Druckpunkte mit 0 cmH₂O und mit 300 cmH₂O eingestellt. Hierbei erfolgte einmal am geschlossenen und einmal am offenen Schlauchsystem eine automatische Kalibrierung der verschiedenen Manöver für die Atemmechanikmessung. Mittels eines geschlossenen Schlauchsystems wird die Kurzschlussimpedanz, welche die Gas-Kompression des gesamten

Atemgases im System widerspiegelt, gemessen. Mit dem offenen System dagegen wird die Resistenz des Schlauchs und des Tubussystems erfasst, was als Leerlaufimpedanz bezeichnet wird. Durch die beiden Kalibrierungsmanöver werden die im Gerät entstandenen Druckänderungen durch die Schläuche, Ventile und das Beatmungssystem kalibriert. Nach Beendigung der Kalibrierung wurde mit der volumenkontrollierten Ventilation begonnen.

2.4.3.2 Narkose und Intubation mittels Tracheotomie

Zur Analgesie wurde den Mäusen 30 min vor der Anästhesie subkutan Buprenorphin in einer Dosierung von 0,05-0,10 mg/kg injiziert. Die Narkose wurde durch ein 3 %iges Isofluran-Sauerstoffgemisch eingeleitet. Die Narkosetiefe wurde mittels des Ausfallens des Zwischenzehenreflexes getestet. Das Inhalationsmittel Isofluran ist eine etablierte Methode zur Sedierung von Nagetieren²³⁵. Sie ist kaum kardiodepressiv und nicht arrhythmogen. Die Metabolisierung erfolgt nur zu 0,2 % über die Leber, wodurch die Toxizität dieser Narkose gering ist. Zur Einleitung der Inhalationsnarkose wurde jedes Versuchstier in eine Narkosekammer gesetzt, welche mit einem 3 %igen Isofluran/Sauerstoff-Gemisches geflutet wurde. Zur darauffolgenden hämodynamischen sowie spirometrischen Analyse wurden die anästhesierten Mäuse auf einer Wärmeplatte in Rückenlage fixiert. Die Narkose wurde hierbei mittels eines Nasenkonus aufrechterhalten. Über eine Rektalsonde wurde die Temperatur der Mäuse ermittelt und bei 37 °C stabil gehalten. Nach Erreichen der Narkosetiefe, wurden Hals, Thorax sowie Abdomen mit Braunoderm (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) befeuchtet, um Verunreinigungen des OP-Feldes mit Haaren zu verhindern. Mittels einer Schere wurde die Haut in der Medianen vom Brustkorb bis zum Hals in einer Breite von ca. 5 mm entfernt. Die Speicheldrüsen (*Glandulae mandibularis*) wurden mit Hilfe einer feingebogenen Pinzette lateral verlagert, um den Zugang zur Trachea freizulegen. Die umliegenden Muskeln an der Trachea wurden zur Seite abpräpariert und ein chirurgischer Faden unter der Trachea durchgeführt. Zur Intubation wurde eine Inzision zwischen zwei Knorpelstangen unterhalb des Larynx angelegt und der Metalltubus (18 G, emka Technologies, Paris, Frankreich) wurde vorsichtig in die Trachea vorgeschoben und mit Hilfe des vorgelegten Fadens luftdicht fixiert. Für die folgende Messung der Lungenfunktion wurde die Narkose auf ein 1,5-3 %iges Isofluran/Sauerstoff-Gemisch eingestellt.

2.4.3.3 Lungenfunktionsmessung

Der Tubus verbindet die Trachea mit dem Y-Stück, welches sich in einen Inspirations- und Expirationsschenkel aufteilt. Ein mikroprozessorgesteuerter Linearmotor bewegt einen im Glaszylinder befindlichen Kolben in axialer Richtung. Mit der Vorwärtsbewegung des Kolbens im Zylinder wird Frischgas mit Überdruck (gegenüber dem Umgebungsdruck) in die Lunge der Maus gepumpt. Während der Expirationsphase erfolgt eine vom inspirierten Atemzugvolumen herrührende passive Ausatmung aus den mechanisch gedehnten elastischen Komponenten des Thorax. Die künstliche Beatmung mithilfe des flexiVents erfolgte mit einer Frequenz von 150 Atemzüge/Minute und 10 ml/kg Tidalvolumen. Um das Kollabieren der Alveolen während der maschinellen Expiration zu verhindern, wurde ein positiv-endexpiratorischer Druck von 3 cm Wassersäule angelegt. Neues Frischgas wurde während jeder Expirationsphase bei geöffnetem Expirationsventil zugeführt, indem der Kolben in seine Ausgangsposition zurückbewegt wird.



Abbildung 13: flexiVent Beatmungsgerät von SCIREQ

. (<https://www.medicaexpo.de/prod/scireq-scientific-respiratory-equipment-inc/product-126455-917939.html>).
Abgerufen am 23.08.2020

2.4.3.4 Software und Datenerfassung

Mit Hilfe der dazugehörigen Software (flexiWare Version 7.2, SCIREQ, Montreal, Kanada) können alle Komponenten der respiratorischen Manöver eingestellt und gesteuert werden. Die Software stellt unterschiedliche Atemmanöver vor:

- Sinusoidales Profil „*snapshot*“, das zur Bestimmung der dynamischen Compliance, Elastizität und Resistenz dient,
- Das Blähmanöver „*total lung capacity*“, dient zur Bestimmung von Maximal- und Plateauwerten.

Die Programmstruktur der Software ermöglicht die Implementierung neuer Manöver. Zur Bestimmung des wichtigsten Parameters der Lungenfunktionsmessung, der dynamischen Compliance, wurde ein standardisierter Atemzug mit der eingestellten Beatmungsfrequenz „*snapshot-Analyse*“ gewählt. Die dynamische Compliance dient als Maß für die Dehnbarkeit bzw. Elastizität der Lunge und errechnet sich aus dem Quotienten der Änderung des Lungenvolumens ΔV zur transpulmonalen Druckdifferenz ΔPTP .

$$C_{\text{dyn}} = \frac{\Delta V}{\Delta P} = \frac{V_{\text{tex}}}{PIP - PEEP} \quad \text{Formel 1}$$

Dabei stellt der Parameter PIP (*Peak Inspiratory Pressure*) den erreichten Spitzendruck während des standardisierten Atemzuges und der Parameter PEEP (*Positive End-Expiratory Pressure*), den end-expiratorische Druck dar. V_{tex} ist das expiratorisch gemessene Tidalvolumen. Die Messung der dynamischen Compliance wurde während des respiratorischen Manövers dreimal pro Tier durchgeführt.

2.4.3.5 Hämodynamische Messung

Zur Messung von *in vivo*-Druck- und Volumenkurven des rechten Ventrikels wurde der Druck/Volumen-Konduktanz-Katheter (Millar-Katheter, Model SPR-671; Länge 65 cm Größe 1,4 F; Millar Instruments Inc., Houston, USA) verwendet^{233; 264}. Vor Präparationsbeginn wurde der Katheter mind. 30 min bei 37 °C angewärmt und anschließend kalibriert. Nach Beendigung der Lungenfunktionsmessung wurde die zur Aufzeichnung der physiologischen Messungen benötigte Software Lab Chart 7 für Windows® geöffnet, der Kopf der Maus etwas nach rechts verschoben und die Präparation der *Vena jugularis* wurde

gestartet. Währenddessen war die Narkose auf ein 1,5 %iges Isofluran/Sauerstoff-Gemisch eingestellt gewesen.

2.4.3.6 Vena jugularis

Die rechte *Vena jugularis* wurde unter Verwendung einer feingebogenen Pinzette vom umliegenden Bindegewebe befreit und es wurden 3 chirurgische Fäden untergelegt. Um die Vene zu stauen wurde der unterste Faden zur Seite gezogen und mittels einer Arterienklammer fixiert. Der oberste Faden diente zur Ligation der gestauten Vene und wurde zu diesem Zweck unter leichter Spannung seitlich mit Durapore[®] (3 M, Minnesota, USA) fixiert. Mit Hilfe des mittleren Fadens wurde eine Ligatur zur späteren Befestigung des Katheters im Gefäß vorgelegt. Mit einer sehr feinen Federschere wurde die Jugularvene zwischen dem obersten und dem untersten Faden inzidiert, der Katheter eingeführt und mit Unterstützung der Ligatur leicht fixiert. Der rechtsventrikuläre Druck (RVSP) konnte nach Verschieben des Katheters in den rechten Ventrikel aufgezeichnet werden. Dafür musste die Ligatur um den Katheter soweit gelockert werden, dass man den Katheter verschieben konnte. Nach der Messaufzeichnung wurde die Ligatur gelöst und der Katheter herausgezogen. Um einen Blutverlust zu vermeiden wurde die Jugularvene nach Entfernung des Katheters mit einem chirurgischen Knoten verschlossen.

2.4.4 Blutentnahme

Nach Beendigung der hämodynamischen Messungen wurde der Thorax und das Abdomen des Tieres mit Braunoderm befeuchtet, die Bauchdecke eröffnet, das Sternum erfasst und das Diaphragma inzidiert. Mit einer 24 G-Kanüle mit aufgesetzter 1 ml-Spritze wurde venöses Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen, sodass eine schnelle Tötung des Tieres anhand eines Kreislaufstillstandes unter fortgeführter Isoflurannarkose erfolgte. Das Blut wurde in ein heparinisiertes Eppendorf-Gefäß überführt, wovon mit einer Kapillare etwas Blut für die Hämatokritmessung aufgenommen wurde und bei 16060 g für 4 Minuten zentrifugiert (Hämatokrit 210, Hettich Zentrifugen Tuttlingen, Deutschland) werden konnte. Das restliche Blut wurde, um Plasma zu gewinnen, bei 4 °C mit 9500 x g für 15 Minuten zentrifugiert (Hettich Mikro 200R, Hettich Zentrifugen Tuttlingen, Deutschland).

2.4.5 Lungenpulung und Lungenfixierung

Das bereits aufgeschnittene Diaphragma wurde ventral von den Rippen abgetrennt, das Sternum auf gesamter Länge medial durchtrennt und beide Sternumteile seitlich mit 24 G Kanülen fixiert. Die Pulmonalarterie wurde ligiert. Danach konnte in den rechten Ventrikel ein Schnitt gesetzt werden und über diesen konnte eine Splkanle in die Pulmonalarterie eingeführt werden, die durch einen vorgelegten Knoten ligiert werden konnte. Ein weiterer Schnitt wurde in den linken Ventrikel gesetzt, damit die zum Spülen verwendete isotonische Kochsalzlösung bei einem Druck von 22 cmH₂O abfließen konnte. Nachdem die Lunge von den Blutresten befreit war, wurde je nach Verwendungszweck folgendermaßen weitergearbeitet:

Zur Aufarbeitung für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde die rechte -oder die linke Lungenhalfte mit einem Faden abgebunden und am Hilus abgetrennt. Diese Lungenhalfte wurde in ein Kryobehalter überführt und in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Alternativ wurde in die linke Lunge über die Trachea mit etwa 1 ml Tissue Tek[] (Sakura Fintek, Staufen, Deutschland) gefllt und in flüssigem Stickstoff konserviert. Andererseits konnte die linke oder rechte Lunge nach einem bei uns im Labor etablierten Verfahren für die stereologischen und für vaskuläre Analysen fixiert werden. Für eine vaskuläre als auch alveoläre Fixierung wurde eine 20-minütliche Fixierung der linken/rechten Lunge über einer Braunüle (aus einer 20 G Vasofix[]-Safety) bei einem Druck von 15 cm Wassersäule durchgeführt. Hierbei wurde eine 3,7 %ige Formaldehydlösung in die Trachea eingeleitet und gleichzeitig die *A.pulmonalis* ber die Splkanle mit 3,7 %igem Formaldehyd mit einem Druck von 22 cmH₂O gespült. Nach Beenden der Fixierung wurde eine Ligatur um die Trachea gelegt, um zu verhindern, dass die eingeleitete Formaldehydlösung entweicht. Die Ligatur aus der *A. pulmonalis* wurde entfernt und die Lungenhalfte wurde vorsichtig aus der Maus entnommen und in eine beschriftete Einbettkassette gelegt. Diese wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einem mit 3,7 %igem Formaldehyd gefllten Behälter aufbewahrt. Am Tag 2 wurde die Formaldehydlösung durch 0,1 M phosphatgepuffertes Kochsalz (PBS) ersetzt und bei 4 C gelagert. Nach mindestens 24 Stunden Lagerung der Lungen in PBS wurden diese für die stereologischen Analysen weiter aufbereitet (siehe Abschnitt 2.5.5). Für die Histologie erfolgte nach der Lagerung in PBS eine jeweils 24 stndige Lagerung in 50 %igem und 70 %igem Ethanol. Die zum Teil dehydrierten Lungen wurden über Nacht im Routineprogramm eines geschlossenen Vakuumgewebe-Infiltrationsautomaten (Leica TP1050, Wetzlar, Deutschland) vollständig entwässert bzw. dehydriert. Mittels der Paraffinausgussstation wurden die Lungen am Folgetag in Paraffin eingebettet, die auf einer

Kühlplatte aushärten konnten. Bis zur histologischen bzw. stereologischen Analyse wurden die Paraffinblöcke bei 4 °C aufbewahrt.

2.4.6 Organentnahme

Nach der Lungenspülung (wie im Abschnitt **2.4.5** beschrieben) wurden von jedem Tier eine Niere, ein Leberlappen, die Milz und Teile der Oberschenkelmuskulatur entnommen und in beschriftete Kryobehälter gelagert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.7 Messung der Rechtsherzhypertrophie

Bei allen Mäusen wurde die Herzratio als Maß für eine vorhandene Rechtsherzhypertrophie bestimmt. Nach Entnahme und Aufbereitung der unter **2.4.6** beschriebenen Organentnahme, wurde das Herz aus dem Körper entfernt. Überschüssiges Bindegewebe sowie Arterien wurden entfernt, bevor das Herz säuberlich in den rechten Ventrikel (RV) und linken Ventrikel (LV) sowie Septum (S) zerteilt wurde. Die Gewichte der einzelnen Herzteile wurden bestimmt und das Verhältnis vom rechten Ventrikel (RV) zum linken Ventrikel (LV) plus Septum (LV+S) ermittelt.

2.5 Histologische und immunhistochemische Analysen

Alle im Folgenden aufgeführten histologischen Untersuchungen wurden an 3 µm dicken Lungenschnitten durchgeführt. Diese wurden am Mikrotom angefertigt, auf Objektträger gezogen und zum Trocknen auf eine Heizplatte (40 °C) gelegt. Vor jeder Färbung wurden die Schnitte bei 37 °C gelagert.

2.5.1 Alveoläre Morphometrie

Um die alveoläre Morphometrie durchführen zu können, musste eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung durchgeführt werden. Dafür wurde folgendes Protokoll verwendet.

Tabelle 11: Färbeprotokoll für die HE-Färbung an Mäuselungen

Nr	Inkubationszeit (min)	Reagenz	Bemerkung
1	60	Wärmeschrank	Deparaffinieren (58-60 °C)
2	10	1. Xylol	Deparaffinieren
	10	2. Xylol	Deparaffinieren
4	10	3. Xylol	Deparaffinieren
5	5	Ethanol 99,6 %	Rehydrierung
6	5	Ethanol 99,6 %	Rehydrierung
7	5	Ethanol 96 %	Rehydrierung
8	5	Ethanol 70 %	Rehydrierung
9	2	Aqua dest.	Waschen
10	20	Hämalaun nach Mayer, sauer	Anfärben der Zellkerne (blau)
11	5	Fließend H ₂ O (Leitungswasser)	Waschen
12	1	Ethanol	Dehydrierung
13	4	Eosin-y-alkoholisch	Einfärbung eosinophile Strukturen (Zellplasmaproteine) rot
14	Spülen	Aqua. dest	Waschen
15	2	Ethanol	Dehydrierung
16	2	Ethanol	Dehydrierung
17	5	Ethanol	Dehydrierung
18	5	Isopropylalkohol (99,8 %ig)	Dehydrierung
19	5	1.Xylol	Dehydrierung
20	5	2.Xylol	Dehydrierung
21	5	3.Xylol	Dehydrierung
22		Mit Pertex® eindecken	

Die gefärbten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Leica DMLA) unter Verwendung des Programmes Leica Q Win Standard Analyzing Software evaluiert. Dafür wurde das speziell entwickelte Makro „alveoläre Morphometrie“ gestartet.

Der gesamte Lungenschnitt wurde bei 5-facher Vergrößerung eingescannt, in ein Mosaik unterteilt und es wurden die Punkte grün markiert, die Lungengewebe enthielten. Die Analyse der 50-100 Mosaikbilder wurde unter 10-facher Vergrößerung durchgeführt. Wobei einzelne Lungenabschnitt auf dem Analysefeld automatisch von der Software selektiert wurden. Die Auswertung erfolgte auf einer von Leica speziell entwickelten kolorimetrisch-spektrometrisch basierenden Messung, indem eine Unterscheidung des Lungengewebes (gelb) von den Lufträumen (grau) erfolgte (**Abbildung 14**). Nicht parenchymatöse Areale wie Bronchien und Gefäße wurden umrandet und von der Analyse ausgeschlossen. Während der Evaluierung der respiratorischen Fläche wurden folgende Parameter ermittelt:

- *Airspace* (Gesamtluftanteil in den Alveolen)
- *Septal Wall Thickness* (mittlere Septendicke)
- *Mean Linear Intercept* (mittlerer Abstand zwischen Alveolarsepten)

Die Messwerte wurden direkt in Microsoft[®] Excel überführt.

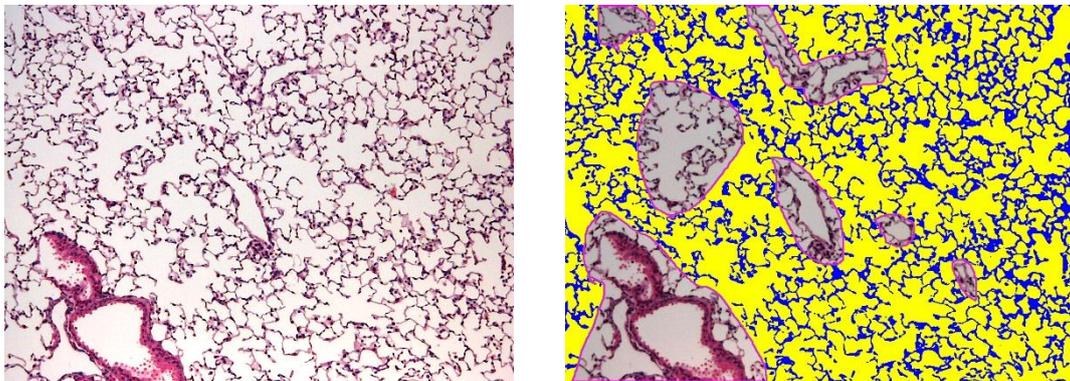


Abbildung 14: Bildanalyse der alveolären Morphometrie. Gelbe Farbe; Lungenparenchym, grau, von der Analyse ausgeschlossenes nichtparenchymatöse Areale.

2.5.2 Vaskuläre Morphometrie

Um den Muskularisierungsgrad der kleinen pulmonalen Arterien zu analysieren, wurde eine Doppelfärbung mit 2 Antikörpern, *alpha-Smooth Muscle Actin* (α -SMA) und von-Willebrand-Faktor (vWF), nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 12: Färbeprotokoll für die Doppelfärbung mit Peroxidase

Nr	Inkubationszeit (min)	Reagenz	Bemerkung
1	60	Wärmeschrank	Deparaffinieren (58-60 °C)
2	10	1.Xylol	Deparaffinieren
3	10	2.Xylol	Deparaffinieren
4	10	3.Xylol	Deparaffinieren
5	5	Ethanol 99,6 %	Rehydrierung
6	5	Ethanol 99,6 %	Rehydrierung
7	5	Ethanol 96 %	Rehydrierung
8	5	Ethanol 70 %	Rehydrierung
9	15	20 ml H ₂ O ₂ (30%ig) in 180 ml Methanol	Inaktivierung endogener Peroxidasen
10	2x5	Aqua dest.	Waschen
11	2x5	PBS	Waschen
12	15	Trypsin Digest All® 1,5:3 (37 °C)	Verdau
13	4x5	PBS	Waschen
14	20	10 % BSA	Blocken unspezifischer Bindungen
15	4x5	PBS	Waschen
16	30	Rodent Block M	Blocken unspezifischer Bindungen und endogener Maus IgG
17	3x5	PBS	Waschen
18	30	Primärantikörper (α -SMA)	Verdünnung 1:900 mit 10 % BSA
19	4x5	PBS	Waschen
20	20	HRP Polymer	Blocken unspezifischer Bindungen und endogener Maus IgG
21	3x5	PBS	Waschen
22	ca. 3-4	Vector VIP® Subtrat Kit	Violettes Chromogen
23	5	H ₂ O (Leitungswasser)	Waschen
24	2x5	PBS	Waschen
25	20	10 % BSA	Blocken unspezifischer Bindungen
26	3x5	PBS	Waschen
27	20	Serumblock I	2,5 % normal horse Serum ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig
28	30	Primärantikörper (37 °C) vWF (aus Kaninchen)	Verdünnung 1:1200 in 10 %igen BSA
29	4x5	PBS	Waschen

30	30	Sekundärer Antikörper (biotinyliert)	ImPRESS Kit Anti-Rabbit Ig Peroxidase
31	4x5	PBS	Waschen
32	20-40 Sekunden	DAB Substrat Kit	Braunes Chromogen
33	5	H ₂ O	Waschen
34	3	Methylgrün	Zellkerne darstellen
35	1	Aqua dest.	Waschen
36	2	Ethanol 70 %	Dehydrierung
37	2	Ethanol 96 %	Dehydrierung
28	5	Isopropylalkohol (99,8 %ig)	Dehydrierung
39	5	Isopropylalkohol (99,8 %ig)	Dehydrierung
40	5	1. Xylol	Dehydrierung
41	5	2. Xylol	Dehydrierung
42	5	3. Xylol	Dehydrierung
43		Mit Pertex® eindecken	

Die Analyse der Lungengewebeschnitte wurde unter der Verwendung des von Leica eigens programmierten Makros „Muskularisierung“ durchgeführt. Nach durchgeführter Doppelfärbung wurde nicht-muskularisiertes endotheliales Gewebe durch den vom *von-Willebrand-Faktor* braun und muskularisierte Areale durch den α -SMA Antikörper violett angefärbt. Zur Analyse des Muskularisierungsgrades wurden unter 40-facher Vergrößerung die Gefäße manuell markiert und das Gefäßlumen durch die Software detektiert. Daraufhin markierte die Software die Gefäßwand und evaluierte durch -von Leica speziell entwickelten-kolorimetrisch-spektrometrische Messungen den Grad der muskularisierten Gefäßwand. Pro Tier wurden alle kleinen Gefäße (externer Gefäßdurchmesser: 20-70 μ m) gezählt. Der Mittelwert aller Muskularisierungsgrade (nicht-muskularisiert, 0-5 %, partiell-muskularisiert, >5-70 %, und voll-muskularisiert, >70 %) wurde pro Lunge jeder Gruppe ermittelt.

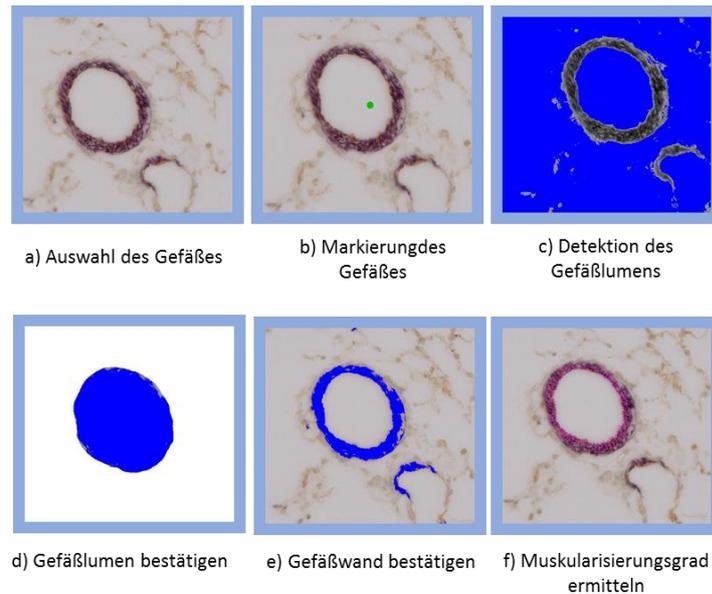


Abbildung 15: (a-f) Bildanalyse der vaskulären Morphometrie.

2.5.3 Bestimmung des Gefäßlumens

Die Analyse des Gefäßlumens erfolgte an 3 μm dicken Paraffinschnitten. Die Lungenschnitte wurden nach einem etablierten Färbeprotokoll (Elastica-nach Weigert mit Kernechtrot) gefärbt. Um das Gefäßlumen analysieren zu können, wurde ein speziell programmiertes Makro der Firma Leica, „*Wall thickness Macro*“ genutzt. Es wurden 85 kleine Gefäße mit einem Durchmesser von 20-70 μm (Durchmesser), 10 Gefäße mit einem Durchmesser von 70-150 μm und fünf Gefäße mit einem Durchmesser >150 μm pro Tier ausgewertet. Nach der Analyse können anhand der von der Software generierten Parameter *tunica externa* und *tunica intima* die Lumenflächen errechnet werden. Die Gefäßlumina konnten durch das Mittel der einzelnen Lumenflächen innerhalb der Gefäßgruppen-Größe berechnet werden.

Tabelle 13: Elastika-Färbung nach Weigert mit Kernechtrot

Nr	Inkubationszeit (min)	Reagenz	Bemerkung
	60	Wärmeschrank	Deparaffinieren (58-60 °C)
1	10	1. Xylol	Deparaffinieren
2	10	2. Xylol	Deparaffinieren
3	10	3. Xylol	Deparaffinieren
4	5	Ethanol absolut 99,6 %	Rehydrierung
5	5	Ethanol absolut 99,6 %	Rehydrierung
6	5	Ethanol 96 %	Rehydrierung
7	5	Ethanol 70 %	Rehydrierung
8	10-24 Stunden	Resorcin - Fuchsin	
9	2x abspülen	Aqua dest.	Waschen
10	10	Kernechtrot Aluminiumsulfat	
11	2x abspülen	Aqua dest.	
12	1	Ethanol 70 %	Dehydrierung
13	2	Ethanol 96 %	Dehydrierung
14	3	Ethanol 96 %	Dehydrierung
15	5	Isopropylalkohol	Dehydrierung
16	5	Isopropylalkohol	Dehydrierung
17	5	1. Xylol	Dehydrierung
18	5	2. Xylol	Dehydrierung
19	5	3. Xylol	Dehydrierung
20		Eindecken in Pertex®	

2.5.4 Proliferative-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) Färbung

Zur immunohistologischen Analyse der Proliferation wurde der Proliferationsmarker PCNA auf 3 µm dicken Paraffinschnitten gefärbt und die positiv gefärbten Zellen anschließend unter einer 40-fachen Vergrößerung gezählt. In der folgenden Tabelle ist das Färbeprotokoll aufgeführt. In Abhängigkeit der Lungengröße wurden 135-288 Bilder analysiert. PCNA positive Zellen wurden innerhalb einer Fläche von 0,076 mm² pro Bild gezählt und die Anzahl der positiven Zellen pro Fläche wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\text{PCNA positive Zellen pro mm}^2 = \frac{\Sigma \text{ PCNA positive Zellen}}{\Sigma \text{ Bilder} \times 0,076 \text{ mm}^2} \quad \text{Formel 2}$$

Tabelle 14: Protokoll der PCNA Färbung

Nr	Inkubationszeit (min)	Reagenz	Bemerkung
1	60	Wärmeschrank	Deparaffinieren (58-60 °C)
2	10	1.Xylol	Deparaffinieren
3	10	2.Xylol	Deparaffinieren
4	10	3.Xylol	Deparaffinieren
5	5	Ethanol 99,6 %	Rehydrierung
6	5	Ethanol 99,6 %	Rehydrierung
7	5	Ethanol 96 %	Rehydrierung
8	5	Ethanol 70 %	Rehydrierung
9	5	Aqua dest.	Waschen
10	20	Citratpuffer (pH 6.0, Zymed Lab.)	Kochen 90 ml A. dest + 10 ml Rodent Deloaker 10x
11	10	Citratpuffer (pH 6.0, Zymed Lab.)	Warm halten im Citrat Puffer
12	5	Citratpuffer (pH 6.0, Zymed Lab.)	Kühlen im Citrat Puffer
13	5	Aqua .dest	Waschen
14	20	H ₂ O ₂ - Methanol Gemisch 15 %	Inaktivierung endogener Peroxidasen
15	2x5	Aqua dest.	Waschen
16	2x5	PBS	Waschen
17	15	Proteinase	Proteinspaltung
18	kurz	Aqua dest.	Waschen
19	2x5	PBS	Waschen
20	60	10 % BSA	Blocken unspezifischer Bindungen
21	2x5	PBS	Waschen
22	20	Serumblock I Rodent M Blocking Solution, Reagent 1 Plus AP Polymer Kit, ZytoChem	Blocken unspezifischer Bindungen und endogener Maus IgG
23	3x5	PBS	Waschen
24	über Nacht	Primärantikörper bei 4 °C	PCNA 1:50 mit Antikörper Diluent 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
25	120	PBS	Waschen
26	30	AP-Polymer	Reagent 3 (rot) ZytoChem Plus AP Polymer Kit
27	3x5	PBS	Waschen
28	2-3	Vulcano Red	Rotes Chromogen (Nova Red)
29	Kurz	Aqua dest.	Waschen
30	30-45 Sekunden	Hämatoxylin QS/Vector	Gegenfärbung
31	10 Sekunden	Leitungswasser	
32	Ca. 30 Sekunden	TRIS	Bläuen
33	1	Aqua dest.	Waschen
34	3x 5 Sekunden	Isopropylalkohol	Dehydrierung
35	2	Xylol	Dehydrierung
36	2	Xylol	Dehydrierung
Eindecken mit Pertex®			

2.5.5 Stereologische Analyse in Paraffinlungenschnitten

Eine stereologische Analyse der Lunge basiert auf statischen und mathematischen Prinzipien, bei der die Präparate frei von systematischen Fehlern, sogenannte *unbiased*, sein müssen¹⁶². Das Gesamtvolumen der Lunge wurde mittels des Flüssigkeitsverdrängungs-Prinzip ermittelt, indem nach dem Archimedischen Prinzip ein Objekt in einer Flüssigkeit (Wasser) getaucht wird und die Menge an Flüssigkeit, die verdrängt wird dem Volumen des Objektes entspricht³²⁴. In der Praxis wurde in ein mit Wasser gefülltes Becherglas auf einer Waage platziert und mit einer selbstkonstruierten Halterung (bestehend aus Stab, Klemme und Teesieb) tariert. Jede einzelne Lunge wurde vorsichtig in das hängende Teesieb gelegt, langsam ins Wasser getaucht und das Gewicht auf der Waage abgelesen. Danach wurde jede Lunge in 3 %iger (etwa 60 °C heiß) Agarose eingebettet und nach Aushärtung der Agarose wurden gleichmäßig 3 mm dicke Scheiben, in einem vom Institut konstruierten Gewebeschneider, angefertigt. Die einzelnen Lungengewebestücke wurden von der Agarose befreit und in einem Paraffinblock eingebettet. Die Auswertung der stereologischen Analyse erfolgte mit Hilfe der speziellen Software (newCAST, Visopharm, Hørsholm, Dänemark). Die Alveolenzahl wurde als Parameter für die Analyse bestimmt und mit dem Programm berechnet.

2.6 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) der Maus

Nach finaler Blutentnahme aus dem Herzen wurde der Thorax der Maus eröffnet und die Lunge freipräpariert. Ein ca. 2 cm langer Tubus wurde in die freigelegte Trachea eingeführt und mit einem chirurgischen Faden in der Trachea fixiert. Der Tubus (Braunüle aus einer 20 G Vasofix[®]-Safety) wurde mit einer 1 ml Einmalspritze verbunden. Vor dem Aufsetzen der Spritze wurde diese mit 800 µl PBS befüllt und luftblasenfrei mit dem Tubus verbunden. Langsam und ohne Druck wurde das PBS in die Lunge gespült, danach wieder langsam aufgezogen und erneut in der Spritze aufgenommen. Insgesamt wurde dieser Prozess dreimal pro Maus durchgeführt. Das Lavagevolumen der Lunge wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt und auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.6.1 Bestimmung der Makrophagen aus der BAL

Unter Verwendung einer Neubauer[®]-Zählkammer war es möglich die Zahl der Makrophagen aus der Bronchoalveolären Lavage zu bestimmen. Dafür wurden 10 µl aus dem gesammelten Lavagevolumen in die Zählkammer pipettiert und die Zellzahl ermittelt.

2.6.2 Zytospin aus der BAL

Um eine morphologische Differenzierung der BAL-Zellpopulation durchführen zu können wurden 100 µl Lavage aus dem Eppendorf-Gefäß entnommen und durch die Nutzung einer Zytocentrifuge (500 g und 5 Minuten) auf einen vertikal montierten Objektträger zentrifugiert. Der Objektträger wurde mittels einer Metallklemme mit Filtercards (Tharmac, Marburg, Deutschland) in den Trichter eingespannt. Nach Lufttrocknung wurde der Objektträger für eine kurze Zeitspanne von 5 min in der May-Grünwald-Lösung (Eosin-Methylenblau) fixiert und darauffolgend 5 Minuten in einer Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau, 10 v/v in Aqua dest.) angefärbt. Unter dem Lichtmikroskop konnte eine differenzielle Zählung alveolärer-inflammatorischer Zellen erfolgen.

2.7 Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels Elektronenspinresonanz

2.7.1 Superoxid-Messung in PSMCs und ATII-Zellen

Vorhandene Sauerstoffspezies, speziell das Superoxid, wurde in ATII-Zellen und PSMCs mit dem „ESR-Spektrometer EMXmicro (Bruker BioSpin, Karlsruhe) im X-Band (ca. 9.4GHz) bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C und eingeschalteter Klimaanlage gemessen. Zur Messung mussten die Zellen nach einem speziellen Protokoll aufbereitet werden. ATII-Zellen und PSMCs wurden nach der Kultivierung trypsinisiert, dreimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (5 Minuten, 338 g, 20 °C). Die Konzentrationen der Zellen wurden auf 1×10^6 Zellen/ml angepasst und im Krebs-Henseleit Puffer (KHB, Noxygen, Elzach, Deutschland, Zusammensetzung siehe Tabelle 16) gelöst. Pro ROS-Messung wurden die Zellen mit der Spinprobe CMH (1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidin, Noxygen, Elzach, Deutschland) mit einer Konzentration von 0,5 mM und pSOD inkubiert. CMH ist eine hoch zellpermeable, nicht toxische Spinprobe, die mit den kurzlebigen Radikalen reagiert und stabile Produkte bildet. Aufgrund dieser Eigenschaft kann

sie dazu genutzt werden, intra- und extrazelluläres Superoxid zu detektieren ^{110; 298}. Um Superoxid spezifisch nachweisen zu können, müssen parallel in einem Ansatz die Zellen zusätzlich zum CMH mit pSOD (Superoxiddismutase-Polyethylenglycol) für 90 min bei 37 °C inkubiert werden ^{350; 390}. Nach der Zugabe von CMH wurden die Proben erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Darauffolgend wurden die Ansätze im flüssigen Stickstoff weggefroren. Um den Superoxidanteil des gesamten ROS-Signals bestimmen zu können, wurden die gemessenen Werte aus den Proben mit pSOD von den Werten der dazugehörigen Proben ohne pSOD abgezogen. Die Differenz repräsentiert die Menge von Superoxidradikalen in der Probe.

Tabelle 15: Protokoll zur Generierung der Ansätze

Ansatz	ESR (µl)	Zellen (µl)	pSod (µl)	CMH (µl)
CMH Kontrolle	270	0	0	30
CMH	170	100	0	30
CMH+pSOD	155	100	15	30

Tabelle 16: Zusammensetzung vom Krebs-Henseleit Puffer(KHB)

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	99,0
KCl	74,55	4,69
CaCl ₂ x 2H ₂ O	147,02	2,50
MgSO ₄ x 7H ₂ O	246,48	1,20
NaHCO ₃	84,01	25,00
KH ₂ PO ₄	136,10	1,03
Glukose	180,20	5,60
HEPES	260,30	20,00
DETC	256,14	0,005
Deferxamin	560,68	0,025

Die Substanzen (aus Tabelle 16) wurden in ddH₂O gelöst und steril gefiltert (0,22 µm Sterilfilter, Millipore, Darmstadt). Danach wurden 25 µM Deferoxamin und 5 µM DETC zugefügt. Vor Gebrauch vom KHB wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Die ESR-Messung wurde ausschließlich an gefrorenen Proben durchgeführt und unter speziellen Konditionen gemessen. Die Messung und Analyse der ESR-Spektren mittels der Software „EMX micro Applications“ (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Florian Veit und Frau Dr. Susan Scheibe durchgeführt.

2.7.2 Messung der Wasserstoffperoxid Konzentration (H_2O_2) in ATII-Zellen mit dem „AmplexRed Assay“

Der „Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay“ enthält eine ROS sensitive Amplex[®] Red-Reagenz (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) um Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bzw. die Peroxidase-Aktivität zu detektieren. Eine Kombination aus der „Amplex[®] Red-Reagenz“ mit der HRP (*Horseradish-Peroxidase*) kann zur Detektion von freigesetztem Wasserstoffperoxid aus Zellen genutzt werden. Weiterhin ist die „Amplex[®] Red-Reagenz“ ultrasensitiv für die Peroxidase-Aktivität, wenn H_2O_2 im Überschuss vorliegt. Die Wasserstoffperoxid-Konzentration wurde in ATII-Zellen gemessen. Im **Abschnitt 2.11.1** wird im Detail erklärt, wie die ATII- Zellen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition aus der Lunge isoliert und ausgesät werden. Pro Well wurden 35.000 ATII-Zellen ausgesät und anschließend der H_2O_2 -Assay nach Hersteller-Protokoll (nach Abschnitt 2.1-2.9) durchgeführt. Die Absorbanz wurde bei 560 nm gemessen. Zur Berechnung der H_2O_2 -Konzentration wurde eine Standardkurve erstellt.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Laser-Mikrodissektion

Die Genexpressionsanalyse wurde in isolierten intrapulmonalen Gefäßen und alveolären Septen durchgeführt. Die Isolierung der intrapulmonalen Gefäße und alveolären Septen erfolgte aus in Tissue-Tek[®]-eingebettete Lungen. In einem Kryostat wurden 8 μ m dünne Schnitte erstellt und auf einen mit RNaseZap (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gereinigten Objektträgern (Microdissect GmbH, Herborn, Deutschland) übertragen. Daraufhin wurden die Schnitte für 45 Sekunden mit Hämalaun (Waldeck GmbH & CO KG, Münster, Deutschland) gefärbt, darauffolgend zweimalig in destilliertes Wasser sowie in 70 %iges Ethanol, 90 %iges Ethanol und in 99,6 %iges Ethanol eingetaucht. Nach Trocknung der Schnitte wurden Gefäße und Septen mit Hilfe eines Laser-Mikrodissektions-Systems (LMD 6000; Leica, Wetzlar,

Deutschland) isoliert. Das herausgeschnittene Gewebe wurde je nach Lungenkompartiment in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen gesammelt. Diese waren mit 300 µl RNA-Lyse-Puffer (RLT-Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland) befüllt. Nach dem vortexen wurden die Proben im flüssigen Stickstoff gelagert und bei -80 °C weggefroren.

2.8.2 RNA-Extraktion

Die RNA aus Lungenhomogenat und Zellen sowie aus dem mikrodisektierten Material wurde mit dem „RNeasy Mini-Kit“ (rNeasy, Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Zur Isolierung der RNA wurde dem Protokoll für eukaryotische Monolayerzellen nach Herstellervorgaben gefolgt. Mit dem „Nanodrop“ (ND-1000, Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland) wurde die RNA-Konzentration spektrometrisch bestimmt und die Reinheit der RNA geprüft, indem die Wellenlänge bei 260 nm und die bei 280 nm in ein Verhältnis gesetzt wurde.

2.8.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Umschreibung von RNA zur komplementären DNA (cDNA, complementary DNA) wurde das „iScript cDNA-Synthese Kit“ (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Die Durchführung der reverse Transkription entsprach den Herstellerangaben.

2.8.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurde das „Mx3000P qPCR System“ (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) sowie das „iQ SYBR Green Supermix“ (Bio-Rad, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ansätze für die qPCR Analysen hatten ein Endvolumen von 25 µl.

2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Spezifität von Primern zu prüfen, wurden nach der qPCR die Produkte in einem Agarose-Gel aufgetrennt. In einem 1,6 %igen Gel aus Agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer: Tris-Acetat 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) der Größe nach aufgetrennt. Die Agarose wurde in der Mikrowelle zum Kochen gebracht

und nachfolgend auf etwa 50-60 °C abgekühlt. Die Gele wurden mit 3 µl „SYBR safe DNAgel stain“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) versetzt, sodass sich der Fluoreszenzfarbstoff zwischen die einzelnen Basenpaare des DNA-Stranges legen kann und sich dies im UV-Bereich sichtbar macht. Die Gele wurden in einem abgedichteten Gelschlitten ausgegossen und nach Aushärtung mit einem DNA-Standard (GeneRuler™ 100 bp Ladder, Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) beladen. Von jeder Probe wurden 12 µl mit 2 µl 6x Loading Dye (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) vermischt und auf das Gel geladen. Die Produkte wurden bei 120 Volt in einer Elektrophoresekammer mit TAE-Laufpuffer aufgetrennt und unter UV-Licht bei 320 nm mit dem Bio Imaging System (ChemiGenius Bio Imaging System, VWR, Bruchsal, Deutschland) visualisiert.

2.8.6 Proteinaufreinigung des Lungengewebes

Für eine Proteinextraktion aus dem Lungengewebe wurden ca. 150 mg Lunge in 500 µl kaltem Lysispuffer mit 1 mM PMSF in einem Homogenisator (Precellys 24, Peqlab, Erlangen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde die homogenisierte Lunge für 10 Minuten bei 9503 g, 4 °C, zentrifugiert und der entstandene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Das Pellet wurde verworfen. Zuletzt wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt (siehe 2.8.7 Bestimmung der Proteinkonzentration) und bei -80 °C gelagert.

2.8.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent wurde die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford bestimmt. Für die Standardkurve wurden jeweils 5 µl einer BSA-Lösungsreihe aufsteigender Konzentrationen (0-10 µg/ml) genutzt. Die Proben wurden 1:10 in Lysis-Puffer verdünnt. In Doppeltansätzen mit je 5 µl der Probe wurden in eine 96-Well Platte (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. Als Leerwert wurden 5 µl Lysispuffer als Doppeltansatz genutzt. Als nächstes wurden 25 µl Reagenz A` (entspricht 1 ml von Reagenz A mit 20 µl Reagenz S) in die Wells gegeben, gefolgt von 200 µl Reagenz B. Zur Messung der Absorption, bei 750 nm, wurde die 96-Well Platte in ein Mikroplattenlesegerät (Elx808, Bio Tek, Bad Friedrichhall, Deutschland) gelegt. Vor der Messung wurden die Proben durch ein Schütteln durchmischt. Die Berechnung der Standardkurve sowie die Proteinkonzentrationen erfolgten mittels der Standardsoftware.

2.8.8 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Diese Methode ermöglicht es denaturierte Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes in einem denaturierenden Gel aufzutrennen. Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) in den Gelen hat die Eigenschaft die Proteine zu denaturieren. Durch die Anlegung eines elektrischen Feldes können die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode wandern und die Auftrennung nach dem Molekulargewicht kann gewährleistet werden. Kleine Proteine wandern schneller zur Anode als große Proteine ²³⁶. Das Gel bestand aus zwei Anteilen, dem Sammelgel und dem Trenngel. Für diese Arbeit wurden aufgrund der nachzuweisenden Proteine 12 %ige Gele genutzt. In der folgenden Tabelle sind die Zusammensetzungen der Gele aufgeführt.

Tabelle 17: Substanzen für Gelherstellung

Substanz	Sammelgel	Trenngel
Aqua dest.	5,7 ml	3,4 ml
30 % Acrylamid	1,7 ml	4,0 ml
Tris-Puffer	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Das Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurde zum Starten der Polymerisierung dazugegeben.

2.8.9 Semi-Dry Western Blot

Mit dieser Methode können spezifische Proteine mittels der Nutzung von Antikörpern detektiert werden ²³⁶. Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden auf eine Polyvenylidendifluorid-Membran (PVDF) (Pall Corporation, Dreieich, Deutschland) unter der Nutzung des „Semidry-Blot-Systems“ der Firma Keutz transferiert. Dafür wurden PVDF Membranen und Whatmann-Filter auf eine von 8,5 x 5,5 cm zugeschnitten und die Membran wurde für eine Sekunde in Methanol getaucht, um sie zu aktivieren. Whatmann-Filter sowie auch die PVDF-Membran wurden bis zum Proteintransfer im Transferpuffer (2,9 g Glycin, 5,8 g Tris, 1,85 ml 20 %iges SDS, 200 ml Methanol, mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt) eingelegt. Dann wurde der Blot in der Reihenfolge, 3 Lagen Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, 3 Lagen Filterpapier, zusammengebaut. Der Stromfluss wurde so angelegt, dass durch das SDS negativ geladene Proteine von minus nach plus, in diesem Fall vom Gel in Richtung Membran, wanderten. Der Proteintransfer dauerte 75 Minuten bei 100 V, 115 mA und 150 Watt. Nach dem Transfer wurde die Membran in einer 6 %igen Milchpuffer-Lösung (w/v) (Skim Milk, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, gelöst in TBST), für eine Stunde geblockt. Das diente zur Absättigung unspezifischer Bindungen. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (gelöst in 6 %iger Milchpuffer-Lösung (w/v)) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran mit mehreren Waschschritten in TBST (20 mM Tris; 150 nM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20) vom Primären Antikörper gesäubert und danach für eine Stunde mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, der in einer 6 %iger Milchpuffer-Lösung (w/v) gelöst war, inkubiert. Es folgten wieder mehrmalige TBST Waschschrritte (jeweils 5 Minuten). Zur Entwicklung des Blots wurde das Peroxidase-Substrat ECL Plus (0,5 ml Lösung A + 0,5 ml Lösung B pro Membran) von Amersham (Healthcare, München, Deutschland) verwendet, womit die Membran 5 Minuten inkubiert wurde. Der Blot wurde mit der Entwicklungsmaschine (Curix, Agfa, Morstel, Belgien) und den Gebrauch der Chemilumineszenz-Filme (Cronex 5 Medical X-Ray Film, Agfa, Mostel, Belgien) entwickelt. Der Film wurde unter Verwendung eines Bio-Imaging System eingescannt und die Banden mit der Gene-Tools-Software evaluiert. Vor erneuter Inkubation der Membran mit einem Antikörper (z.B. β -Aktin) erfolgte das „strippen“ der Membran. Der gebundene Antikörper wurde hierbei durch die einstündige Inkubation mit einer Stripping-Lösung (90 ml Aqua dest. 10 ml 1 M Glycin, 2-3 ml HCl 37 %) von der Membran entfernt. Es folgten mehrere Waschschrritte mit TBST (jeweils 5 Minuten) und ein einstündiges Blocken in 6 %igem Milchpuffer (w/v). Danach konnte die Membran erneut mit einem Primär- und Sekundärantikörper inkubiert werden.

2.8.10 LC-MS/MS Protein Identifikation

Eine LC-MS/MS-Protein-Identifikation wurde von der Firma Alphalyse A/S in Odense, Dänemark durchgeführt (<https://www.alphalyse.com/quantitative-amino-acid-analysis>) steht für Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie und ist eine moderne Analyse für die exakte Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen. Bevor die Proben von Alphalyse analysiert werden konnten, wurden die Zielbanden aus dem SDS-PAGE nach Visualisierung mit einer „Coomassie-Blau“-Färbung mit einem Skalpell ausgeschnitten. Es wurden pro Maus 3 Banden mit einer Größe von c.a 2 x 5 mm ausgeschnitten. Nach Firmenprotokoll wurde jede ausgeschnittene Bande einzeln in eine 96 Well- Platte gelegt und mit 100-200 µl destilliertem Wasser bedeckt. Insgesamt wurden 5 verschiedene Proben pro Gruppe für die Analyse verwendet.

2.9 Microarray-Analyse in mikrodisektierten Alveolarsepten und pulmonalen Gefäßen

Für diese Analyse wurden aus den im Abschnitt 2.8.1 beschriebenen Proben die RNA extrahiert. Hierfür wurde das „Rneasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde mit dem „The Ovation[®] Pico WTA System V2“ (NuGEN Technologies, Bernmel, Niederlande) amplifiziert und mit Cy5- markiert, indem die RNA über Nacht mit 8x60 K 60mer Oligonukleotid besetzten Microarray-Objektträgern (Maus Gesamtgenom 8x60 K, Agilent Technologies, Design ID 028005) hybridisiert wurde. Pro Reagenz wurde 50 ng der Gesamt-RNA eingesetzt. Hybridisierung, Waschschritte sowie Trocknung der Objektträger erfolgten nach dem Agilent-Hybridisierungsprotokoll. Die trockenen Objektträger wurden mit dem InnoScan 900 (Innopsys, Carbonne, Frankreich) gescannt und die Bildanalyse wurde mit der Software „Mapix 6.5.0“ durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte freundlicherweise durch Dr. Jochen Wilhelm. Die berechneten Werte aller Punkte wurden als GenePix Dateien gespeichert und mit der R Software sowie dem limma package von BioConductor evaluiert. Für weitere Analysen wurden die Log arithmischen Mittelwerte der Signale verwendet. Die Gene wurden nach ihrer Expression mit der t-Statistik analysiert.

2.10 Stickstoffmonoxid-Assay in der Bronchoalveolären Lavage

Mit diesem Nitric Oxide Assay Kit kann eine quantitative Analyse von Nitrat und Nitrit in biologischen Körperflüssigkeiten durchgeführt werden. Durch die Verwendung der Nitratreduktase wird Nitrat zu Nitrit konvertiert. Vorliegendes Nitrit entsteht als Produkt der Griess-Reaktion und kann als Farbstoffe bei einer Absorbanz von 540 nm detektiert werden. Für eine akkurate NO-Quantifizierung muss die Nitrat- und Nitrit-Menge bestimmt werden, da die relativen Mengen an Nitrat und Nitrit variieren können. Der Assay wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Ein Volumen von 100 µl der BAL wurde pro Probe eingesetzt. Die Nitrat- und Nitrit-Konzentrationen wurden mittels Standardkurven ermittelt und zum Proteingehalt der BAL standardisiert.

2.11 Zellkultur

Die Isolierung der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen und die der alveolären Epithelzellen wurde anhand des etablierten Protokolls von bereits publizierter Studien durchgeführt^{332; 333}.

2.11.1 Isolierung von murinen ATII-Zellen

Die Isolierung der ATII-Zellen erfolgte aus Wildtyp- sowie *Noxo1^{-/-}* Mäusen. Die Lungen wurden über die Trachea mit 2 ml Dispase befüllt und anschließend in ein mit Dispase gefülltes Falcon[®]-Gefäß (Blue Caps, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) für 30 min bei 37 °C zum Zwecke des Gewebeverdaus gegeben. Anschließend wurde die Suspension zerkleinert und durch ein 70 µm, 40 µm und 10 µm Nylongewebe filtriert. Nach einer 10minütigen Zentrifugation (200 g) wurde das Pellet in DMEM (Dulbecco's verändertes Adler Medium, (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C auf CD16/32- und CD45- beschichteten Petrischalen inkubiert. Aufgrund dieses Schrittes erfolgte die negative Selektion von Lymphozyten und Makrophagen und Fibroblasten. Nach der ATII-Isolierung wurden die Reinheit sowie die Vitalität der Zellen überprüft. Dies erfolgte mittels Immunofluoreszenzfärbung mit dem Antikörper pro-SP-C, der positiv für ATII-Zellen ist. Zudem wurde die Morphologie der Zellen geprüft. Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe des Trypan-Blau-Ausschlusses überprüft. Am Ende wurden die

ATII-Zellen in DMEM (mit 10 % FCS, 3 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin mit 100 g/ml Streptomycin) suspendiert und für 24 Stunden kultiviert. Nach einem Mediumwechsel konnten die ATII-Zellen für weitere 48 Stunden im Wärmeschrank bei 37 °C und 0,04 % CO₂ aufbewahrt werden.

2.11.2 Isolierung von murinen-pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs)

PASMCs wurden aus den pulmonalen präkapillären Arterien isoliert und wie bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben, kultiviert ²⁴². Kurzgefasst: nach Entfernung des Thymus und Eröffnung des Perikards wurde um die Pulmonalarterie mittels eines Fadens eine Ligatur gelegt. Der rechte Ventrikel wurde inzidiert, sodass eine selbst hergestellte Kanüle in die Pulmonalarterie eingebunden werden konnte. Anschließend wurde die Lunge luftblasenfrei mit PBS gespült. Es folgte die langsame Perfusion von einem 40 °C warmen Gemisch aus M199 Wachstumsmedium (Medium 199, Invitrogen, Carlsbad, USA), 5 mg/ml Agarose (Typ VII, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit niedrigem Schmelzpunkt und 5 mg/ml Fe₃O₄ (Eisen-II, III-oxid, 98 % Fe₃O₄, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Da die Eisenpartikel zu groß sind, um durch die Kapillaren zu gelangen sammelten sich diese in den mikrovaskulären präkapillären Gefäßen an. Die Lunge wurde von Herz und Trachea separiert und in ein steriles mit 1 ml PBS befülltes Falcon[®] (Blue Caps, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Unter Verwendung mehrerer Scheren wurden die Lungen für 5 Minuten kleingeschnitten und anschließend in 10 ml PBS suspendiert. Mit einem Magnetkonzentrierer (Dynal A.S, Oslo, Norwegen) konnten die mit Eisen enthaltenden pulmonalen Arterien fixiert werden, sodass nur das Absaugen des Überstandes mit Gewebestückchen, die keine Eisenpartikel enthielten, gewährleistet werden konnte. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Es folgte ein Transfer der Eisenpartikel in eine Petrischale, die mit 10 ml M199 Medium und 80 U/ml Kollagenase Typ IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) befüllt war. Dieses Gemisch wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, was den Verdau von Fibroblasten sowie überschüssigem Gewebe diente. Anschließend wurde der Gewebemix mehrfach durch eine Spritze (15 G und 18 G-Kanüle) aufgezogen, um das angedaute Gewebe von den Eisenpartikeln zu lösen. Danach wurden die Eisenpartikel wie oben bereits beschrieben für 3 Waschgänge in ein steriles Falcon[®] mit Medium 199 1 % P/S und 10 % FCS (Fetales Kälberserum, PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) überführt. Die isolierten Gefäßstücke wurden zur Kultivierung auf 60er TC-Schalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät.

2.11.3 PSMCs-Kultivierung

Die Zellen wurden in *Smooth Muscle Cell Growth Medium 2* (Promocell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Nach 4-5 Tagen wurde das gewechselt. Wenn die Zellen eine 80 %ige-Konfluenz erreichten, erfolgte die Passagierung (splitten) mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland). Bevor die Zellen trypsiniert werden konnten, wurde die Trypsin-Lösung auf 37 °C vorgewärmt, da dies die optimale Temperatur für die Trypsinwirkung ist. Die PSMCs wurden mit PBS gewaschen, um serumhaltige Spuren des Mediums zu entfernen. Jeder 60er TC-Schale wurde eine 2 ml Trypsin/EDTA-Gemisch zugegeben und für eine Minute bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in FCS aufgenommen und anschließend für 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert (Mikro 22, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet im Kulturmedium (*Muscle Cell Growth Medium 2*) resuspendiert und für die gewünschten Analysen mit entsprechender Zellzahl ausgesät. Für alle Experimente wurden Zellen in Passage 1 benutzt.

2.11.4 Herstellung des Zigarettenrauchextrakts für die Behandlung von PSMCs- und ATII-Zellen

Das Basalmedium (10 ml) der jeweiligen Zelltypen (ATII-Zellen, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PSMC, Smooth Muscle Cell Growth Medium 2, Promocell, Heidelberg, Deutschland) wurde mit Hilfe einer motorbetriebenen Pumpe (Laboport Mini Laboratory Pumps, KNF Neuberger Inc, Trenton, USA) durch einen kurzen Schlauch, welcher mit einer modifizierten Pasteur-Pipette verbunden war und als Halterung für die Zigaretten diente, mit dem Zigarettenrauch einer wissenschaftlichen Zigarette (3R4F, Kentucky, USA) angereichert. In das mit Medium gefüllte Falcon[®] wurde der infiltrierte Zigarettenrauch geleitet, sodass das Medium mit dem Zigarettenrauch angereichert wurde. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in **Abbildung 16** zu sehen. Dieser Prozess wurde unter einem Abzug durchgeführt wobei die Saugleistung der Pumpe so eingestellt war, dass die Zigarette innerhalb einer Minute abgeraucht war. Der im Basal-Medium aufgenommene Zigarettenrauchextrakt wurde steril filtriert (0,22 µm Filter, Millipore, Massachusetts, USA). Die Absorbanz der CSE (*Cigarette Smoke Extract*)-Lösung wurde mit der Absorbanz des zellspezifischen Grundmediums in einer Spannweite von 290 nm bis 320 nm verglichen. Die Differenz beider Medien sollte nicht 0.1 überschreiten. Zudem wurde der pH-Wert der

erstellten CSE-Lösung gemessen, wobei bei 7,4 liegen sollte. Der gewonnene Zigarettenrauchextrakt wurde als 100 %ige Stammlösung definiert und für die Versuche mit Zellkulturmedium verdünnt, sodass Final eine 10 %ige CSE-Lösung verwendet wurde.

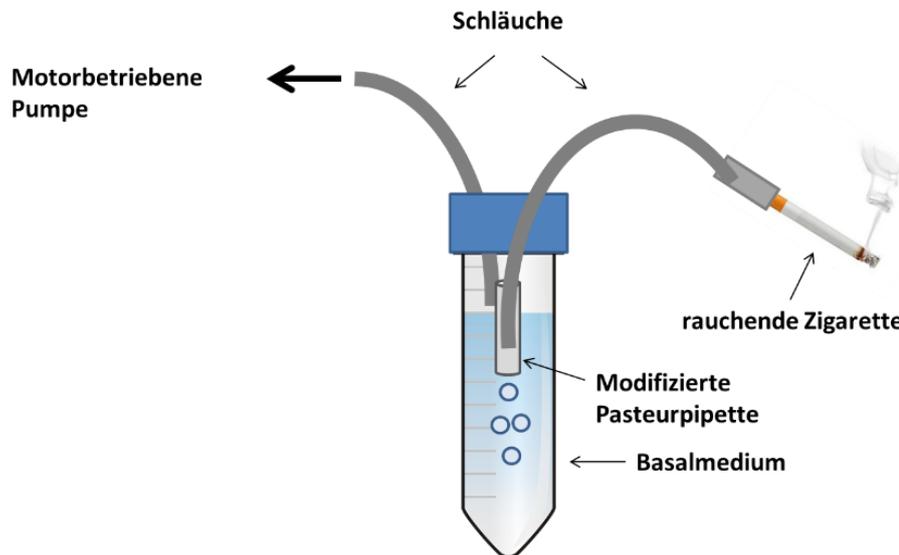


Abbildung 16: Darstellung der Herstellung der 100 %igen Zigarettenrauchextrakt-Lösung. Eine 3R4F-Zigarette wurde für eine Minute unter Saugen der Pumpe abgeraucht wobei der Primärzigarettenrauch über den Schlauch direkt ins Medium geleitet wurde.

2.12 Messung der Apoptose

Mit Hilfe des Caspase-Glo[®] 3/7 Assay Systems Lumineszenz (Promega, Madison, USA) wurde die Apoptoserate in murinen Zellen bestimmt. Der Assay wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde 1 μM Staurosporin (für 4 Stunden; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Der Assay wurde auf 96 Well-Platten durchgeführt. Pro Well wurden bei ATII-Zellen 35.000 Zellen und bei PSMCs 10.000 Zellen ausgesät.

2.13 Bestimmung der Proliferation

PASMCs- und ATII-Zellen wurden in 24 Well-Zellkulturplatten (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) kultiviert (bei PSMC, 20.000 Zellen/pro Well und bei ATII-Zellen, 350.000 Zellen/pro Well). Die Zellen wurden konstant bei 37 °C (5 % CO₂, 95 % O₂ Atmosphäre) gelagert. Zur Quantifizierung der Proliferation wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) *Colorimetric Assay* (Roche, Basel, Schweiz) verwendet. Bei diesem Assay wird ein markiertes Nukleotid während der S-Phase der DNA-

Synthese eingebaut und immuno-chemisch bestimmt. Verwendete PASMIC sowie ATII-Zellen wurden für dieses Experiment auf 24 Well-Platten (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) kultiviert und anschließend der ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde die BrdU *Labeling-Solution* 1:1000 pro Well-Platte eingesetzt und für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das *Labeling-Medium* wurde abgesaugt und die Zellen mittels der Zugabe vom FixDenat (500 µl/Well) fixiert sodass die DNA denaturiert wurde. Nach 30-minütiger Inkubation mit Raumluft wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen mit der anti-BrdU-POD *Working Solution* behandelt. Mit dem Antikörper-Verdünnungsmittel wurde die BrdU-POD *Solution* in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt und für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Das anti-BrdU-POD bindet dabei an das inkorporierte BrdU. Zuletzt wurden die Zellen mit der Substrat-Solution behandelt und nach 10 Minuten wurde die Absorbanz bei 370 nm gemessen. Die Messwerte zur Auswertung waren die Differenz aus der Absorbanz-Messung bei 370 nm und der Referenz-Absorbanz, die bei 495 nm gemessen wurde.

2.14 Statistische Analysen

Alle *in vivo* Experimente wurden unter randomisierten Bedingungen durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte freundlicherweise mit der Unterstützung von Dr. Jochen Wilhelm. Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung von R mit dem *add-on* des lme4³⁹ Packetes, um linear uneinheitliche Modelle anzupassen, verwendet und multcomp¹⁵⁹ wurde verwendet, um allgemein lineare Hypothesen innerhalb geeigneter Modelle zu testen. Punktgenau positiv-metrische Variablen (z.B. Konzentrationen) wurden log-umgewandelt bevor die statistische Analyse auf Basis linearer Modelle durchgeführt wurde. Zählungen oder positive Variablen mit Nullen wurden mit Hilfe des quasi-Poisson Modells mit log-link berechnet. Prozentuale Daten (wie z.B die Berechnung der Muskularisierung oder des Luftraums in den Alveolen) wurden nach einer logit-Umwandlung mittels linearer Modelle statistisch analysiert. Linear uneinheitliche Modelle wurden für Daten mit korrelierten Fehlerdatenstrukturen (wie z.B Wiederholungsmessung pro Maus, Messungen von unterschiedlichen Westernblot-Membranen) verwendet. ΔC -Messwerte von qRT-PCR wurden mit Hilfe des linearen Modells auf Grundlage unveränderter ΔC -Messwerte angewandt. Dafür wurden gepoolte Varianzeinschätzungen quer durch die Gene für den gewünschten Test durchgeführt. Verbleibende diagnostische Diagramme wurden auf alle

geeigneten Modelle geprüft. Die P-Werte wurden von angemessenen Wahrscheinlichkeitsverhältnis-Tests erhoben. Mehrere Tests innerhalb eines Modells wurden unter Verwendung der Funktion *glt* durchgeführt. Experimente, bei denen ein Screening bzw. eine Vorfeldsdiagnostik erhoben wurde, wurden die P-Werte für Mehrfachtests (Einzelschritt-Methode, wenn nicht expliziert angegeben) zur Hilfe genommen. Alle P-Werte sind in den Abbildungen bereitgestellt; P-Werte ≥ 0.05 sind als nicht Signifikanz angezeigt. Die statistische Analyse des Microarray Experiments wurde folgendermaßen durchgeführt. Die berechneten Werte aller Punkte wurden als GenePix Dateien gespeichert und mit der R Software sowie dem *limma* package von BioConductor evaluiert. Für weitere Analysen wurden die Log-arithmischen Mittelwerte der Signale verwendet. Die Gene wurden nach ihrer Expression mit der t-Statistik analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 In *Noxo1* Knockout Mäusen kommt es zur keiner Lungenfunktionsabnahme nach chronischer Zigarettenrauchexposition

Um die Auswirkung einer chronischen Zigarettenrauchexposition auf die Lungenfunktion untersuchen zu können, wurden nach 3 und 8 Monaten funktionelle Messungen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen durchgeführt. Hierzu wurde die dynamische Lungen-Compliance, die als Maß für die Dehnbarkeit der Lunge dient, gemessen. Mittels der dynamischen Lungen-Compliance kann die Elastizität der Lunge quantifiziert werden ³⁴⁵. Nach 3 Monaten Zigarettenrauchexposition konnte weder in den WT-Mäusen noch in den *Knockout* Mäusen eine veränderte Lungen-Compliance festgestellt werden (**Abbildung 17a**). Zum späteren Zeitpunkt (nach 8 Monaten Zigarettenrauchexposition) wurde die Lungenfunktion aller vier Gruppen gemessen. Die Ergebnisse zeigten keine Erhöhung der Lungen-Compliance ($0,044 \text{ ml/cmH}_2\text{O} \pm 0,002 \text{ ml/cmH}_2\text{O}$) in den *Noxo1* *Knockout* Mäusen, wohingegen die Lungen-Compliance in den WT-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition signifikant erhöht war ($0,057 \text{ ml/cmH}_2\text{O} \pm 0,001 \text{ ml/cmH}_2\text{O}$) (**Abbildung 17b**).

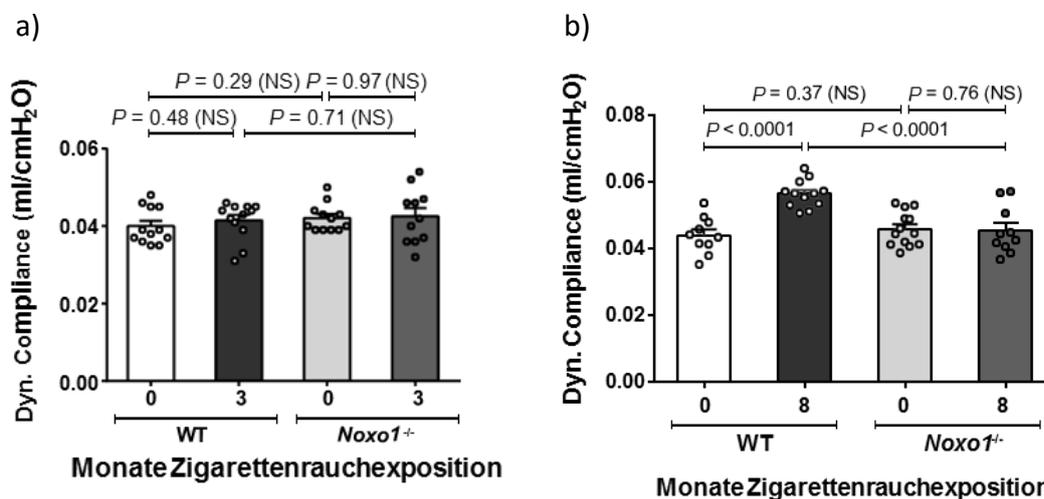


Abbildung 17: Dynamische Compliance-Messung in WT und *Noxo1* *Knockout* Mäusen nach a) 3 und b) 8 Monaten Zigarettenrauchexposition. a) n=12 Mäuse pro Gruppe (ausgenommen in der Gruppe *Noxo1*^{-/-} 3 Monate Zigarettenrauchexposition n=11). b) n=10 pro Gruppe (ausgenommen in der Gruppe *Noxo1*^{-/-} 8 Monate Raumlufteexposition n=13 und n=12 in der Gruppe WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition). Statistik: a-b) 2 × 2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelten Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test

3.2 *Noxo1* Knockout Mäuse weisen keine Emphysementwicklung nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition auf

Die im Abschnitt 3.1 gezeigten physiologisch gemessenen Ergebnisse können ein Hinweis darauf geben, dass es zu einer Emphysementwicklung nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition in den WT-Mäusen gekommen ist, nicht aber in den *Noxo1* Knockout Mäusen. Um eine Emphysementwicklung zu bestätigen, wurde eine alveolarmorphometrische Analyse in den Lungengewebeschnitten von den einzelnen Versuchsgruppen durchgeführt. Die Degradierung des Lungengewebes und eine Luftraumerweiterung konnte über nachfolgende Parameter evaluiert werden: a) dem Gesamtluftraum auf alveolärer Ebene (%), b) dem mittleren Abstand zwischen Alveolarsepten (MLI, *Mean Linear Intercept*) und c) der Septendicke. In **Abbildung 18** kann man sehen, dass eine 8-monatige Zigarettenrauchexposition in den WT-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg des a) prozentualen Gesamtluftraums ($74,84 \% \pm 0,82 \%$) führte, (b) sowie zu einer Vergrößerung des mittleren Abstandes zwischen den Alveolarsepten ($24,82 \mu\text{m} \pm 0,07 \mu\text{m}$). Die Septendicke nahm nach einer chronischen Zigarettenrauchexposition in den WT-Mäusen signifikant ab und lag bei (c) $4,12 \mu\text{m} \pm 0,07 \mu\text{m}$. Im Vergleich dazu konnte in keinem der drei genannten Parameter eine signifikante Veränderung nach chronischer Zigarettenrauchexposition in den *Noxo1*^{-/-}-Mäusen gemessen werden (Gesamtluftraum: $72,85 \% \pm 0,47 \%$, mittlerer Abstand zwischen den Alveolarsepten lag bei $23,7 \mu\text{m} \pm 0,38 \mu\text{m}$ und die Septendicke bei $4,33 \mu\text{m} \pm 0,05 \mu\text{m}$). In **Abbildung 19** sind repräsentative histologische Bilder der der alveolären Morphometrie dargestellt.

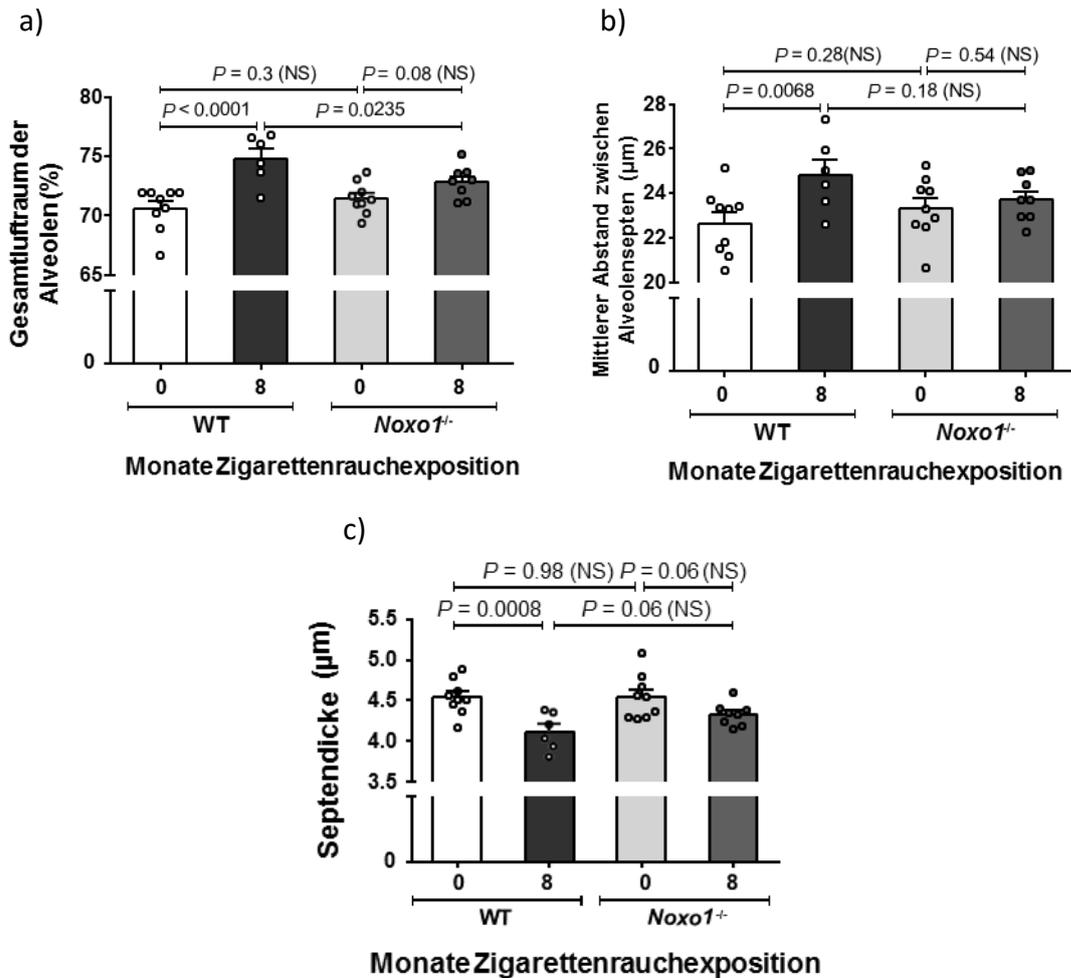


Abbildung 18: Alveolarmorphometrische Analyse von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Lungen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Die alveoläre Morphometrie wurde an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Lungenschnitten durchgeführt, um den Effekt der Zigarettenrauchexposition auf das Lungenparenchym in WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen zu untersuchen. Dargestellt sind die Parameter a) Gesamtluftraum der Alveolen, b) mittlerer Abstand zwischen Alveolarsepten und c) die Septendicke. a-b) n=9 Lungen pro Gruppe (8-monatige Raumluft-exponierte WT-Mäuse und 8-monatige Raumluft-exponierte *Noxo1*^{-/-}-Mäuse), ausgenommen sind 8-monatige Zigarettenrauch-exponierte WT-Mäuse n=6 und 8-monatige Zigarettenrauch-exponierte *Noxo1*^{-/-}-Mäuse n=8. C) jeweils n=9 für Gruppen in Raumluft, n=6 Lungen in der Gruppe WT 8-monatige Zigarettenrauchexposition und n=8 Lungen in der Gruppe *Noxo1*^{-/-} 8-monatige Zigarettenrauchexposition. Statistik: a und c) 2 × 2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test, b) 2 × 2 faktorielles Modell bezogen auf logit-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test.

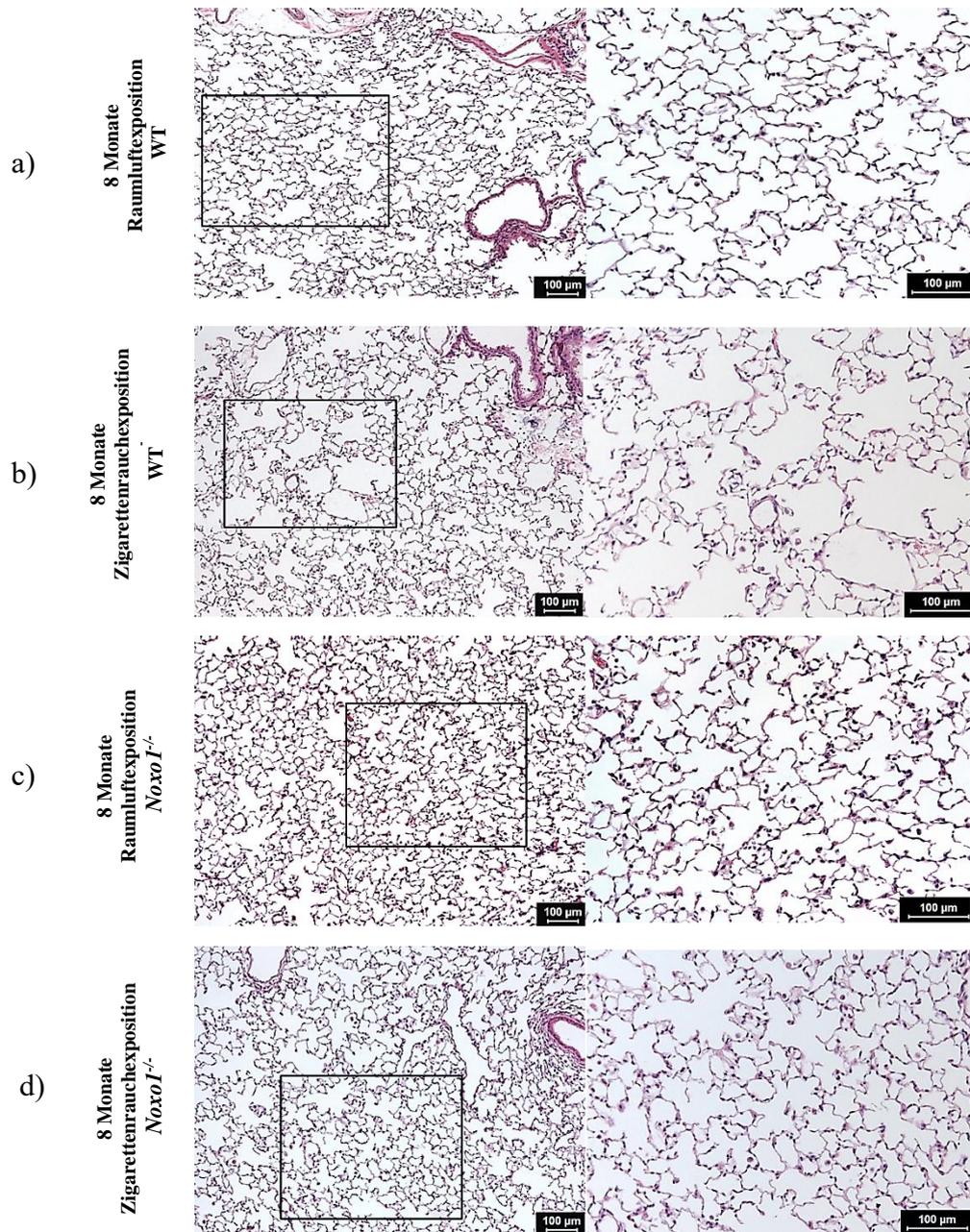


Abbildung 19: Repräsentative Bilder der HE-Färbung von der alveolären Morphometrie in Lungenschnitten nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Die Visualisierung der Alveolen erfolgte durch die HE-Färbung. a) und c) 8 Monate ohne Zigarettenrauchexposition (WT und *Nox1*^{-/-}-Mäuse) sowie b) und d) beide Genotypen nach Zigarettenrauchexposition.

Auf histologischer Ebene wurde mittels der stereologischen Analyse die Anzahl der Alveolen in Paraffinlungenschnitten ermittelt. In **Abbildung 20** ist ein deutlicher Effekt von Zigarettenrauch auf die Anzahl der Alveolen zu erkennen. Zigarettenrauch-exponierte WT-Mäuse zeigten einen signifikanten Verlust von Alveolen. Dies kann ein Indiz für eine Emphysem sein. Im Gegensatz dazu konnte bei den *Noxo1*^{-/-}-Mäusen kein signifikanter Alveolenverlust gemessen werden.

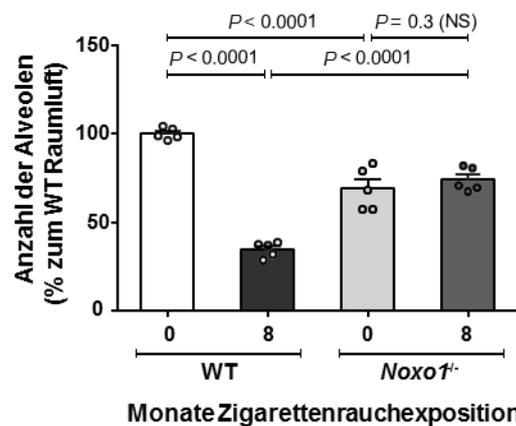


Abbildung 20: Stereologische Analyse von Lungenparaffinschnitten in WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Dargestellt ist die Anzahl der Alveolen nach 8 Monaten Zigarettenrauchexposition. n = 5 pro Gruppe. Statistik: 2 × 2 faktorielle quasi-Poisson Modell. P- Werte stammen aus dem Chi-Quadrat Tests. Daten werden als individuelle Datenpunkte gezeigt, Mittelwert ± SEM.

3.3 Zigarettenrauchexposition führt zu keiner pulmonalen Hypertonie und zu keiner Rechtsherzhypertrophie-Entwicklung in *Noxo1*^{-/-}-Mäusen

Durch hämodynamische Messungen wurde die Auswirkung einer chronischen Zigarettenrauchexposition auf das rechte Herz analysiert und ob es zur Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie kommt. Hierzu wurde der rechtsventrikuläre systolische Blutdruck (*Right Ventricular Systolic Pressure*, RVSP) sowie der systemische Blutdruck (*Systemic Arterial Pressure*, SAP) nach 3 sowie 8 Monaten ermittelt. Des Weiteren wurde das Herz in den rechten Ventrikel und in den linken Ventrikel plus Septum getrennt und die Nassgewichte wurden bestimmt, um eine mögliche Rechtsherzhypertrophie in den Mäusen zu finden. Die Ratio aus rechtem Ventrikel zum linken Ventrikel plus Septum wurde ermittelt, um eine Aussage über die Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie zu treffen. Aus **Abbildung 21a)**

und **b**) ist zu ersehen, dass der RVSP nach 3 Monaten Zigarettenrauchexposition in den WT-Mäusen mit $29,6 \text{ mmHg} \pm 0,9 \text{ mmHg}$ und nach 8 Monaten mit $30,1 \text{ mmHg} \pm 1,0 \text{ mmHg}$ im Vergleich zu den *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach Zigarettenrauchexposition (nach 3 Monaten mit $21,4 \text{ mmHg} \pm 0,1 \text{ mmHg}$ und nach 8 Monaten mit $20,2 \text{ mmHg} \pm 0,5 \text{ mmHg}$) signifikant erhöht war. Eine Rechtsherzhypertrophie konnte in den WT-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition festgestellt werden (**Abbildung 21d**). In den *Noxo1* Knockout Mäusen führte eine 8-monatige Zigarettenrauchexposition zu keiner Rechtsherzhypertrophie (**Abbildung 21d**).

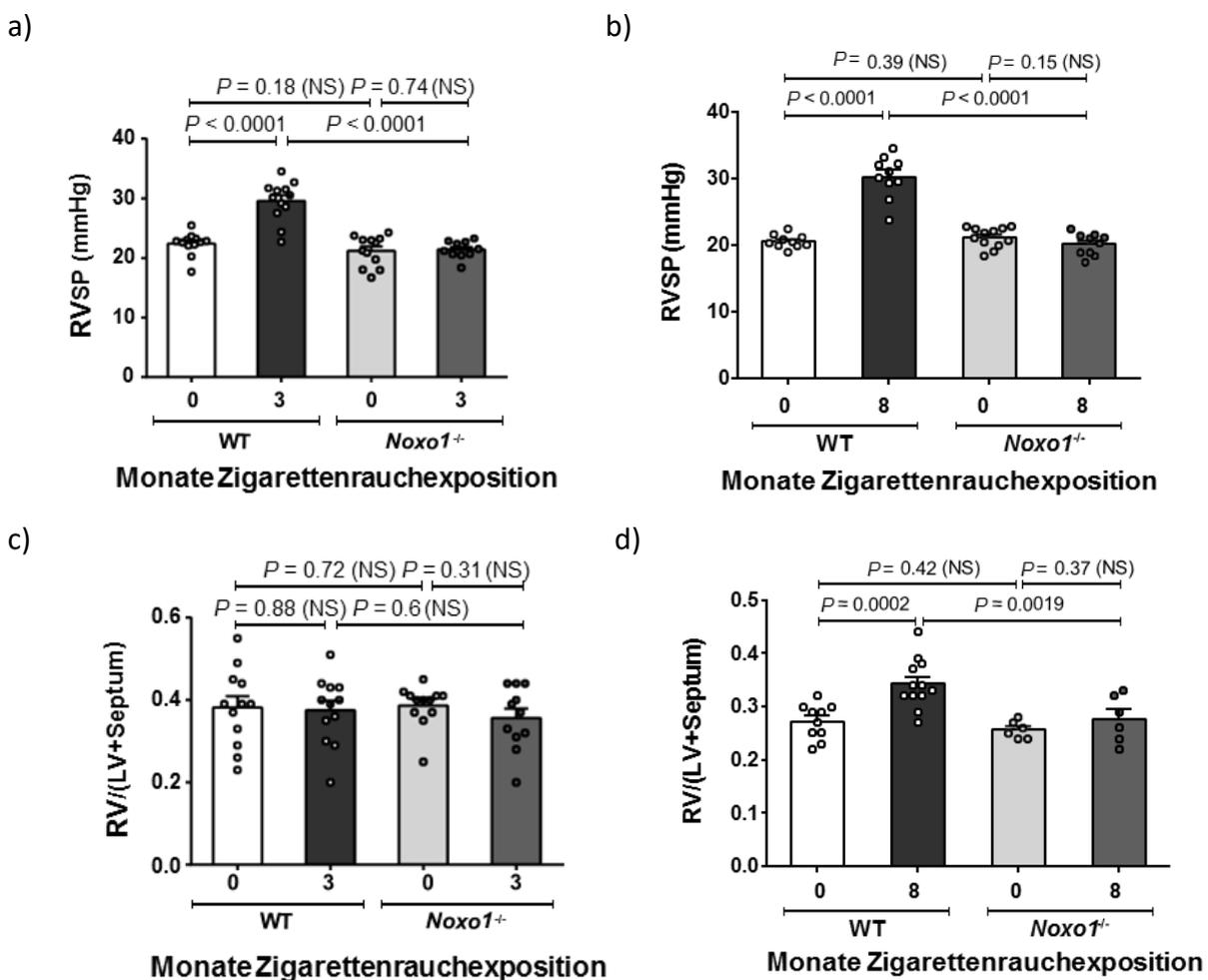


Abbildung 21: Quantifizierung des rechtsventrikulären Drucks und Rechtsherzgewichtsveränderungen in WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. a) rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck (RVSP) nach 3 Monaten. b) rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck (RVSP) nach 8 Monaten. c) Verhältnis vom rechten Ventrikel zum linken Ventrikel plus Septum nach 3 Monaten und d) die Herzratio von rechten Ventrikel zum linken Ventrikel plus Septum nach 8 Monaten. a) n=12 Mäuse pro Gruppe, ausgenommen n=10 in der Gruppe *Noxo1*^{-/-} 3 Monate Zigarettenrauchexposition, b) n=10 Mäuse pro Gruppe, ausgenommen n=12 bei *Noxo1*^{-/-} 8 monatige Raumlufteexposition, c) n=12 Mäuse pro Gruppe, ausgenommen n=11 in der Gruppe *Noxo1*^{-/-} 3 Monate Zigarettenrauchexposition. d) n=10 Mäuse pro Gruppe (WT 8 Monate Raumlufte), ausgenommen n=12 in der Gruppe WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition und n=6 in den beiden *Noxo1*^{-/-}-Gruppen. Statistik: a) P-Werte stammen von Tukey HSD Test, unter Verwendung der log-umgewandelten Daten. b-d) 2 × 2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test.

3.4 Echokardiographische Evaluierung der rechtsventrikulären Funktion in WT- sowie *Nox1^{-/-}*-Mäusen

Mit Hilfe hämodynamischer Analysen konnte bereits eine PH in den WT-Mäusen nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition nachgewiesen werden. Durch Erhebung mehrerer echokardiographischer Parameter konnte eine Aussage über die Pumpfunktion und Kontraktilität des Herzens nach Zigarettenrauchexposition getroffen werden. Durch Messung des Herzzeitvolumens (*Cardiac Output*, CO) konnte gezeigt werden, dass die Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäuse eine veränderte Pumpleistung des Herzens aufwiesen ($17,5 \pm 1,0$ ml/min), was jedoch nicht in der Gruppe der Zigarettenrauch-exponierten *Nox1 Knockout* Mäuse ($21,9 \pm 0,7$ ml/min) zu sehen war (**Abbildung 22a**). Die Messwerte der TAPSE (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*) sowie des pulmonalen Flusses (PAAT, *Pulmonary Artery Acceleration Time*) waren lediglich in der Gruppe der 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäuse signifikant verändert gewesen (**Abbildung 22b-c**). Der Wert für die TASPE lag bei den Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen bei $1,3 \text{ mm} \pm 0,0 \text{ mm}$ und der Wert für die PAAT, einem Parameter, der eine Aussage über die Rechtsherzfunktionalität geben kann, lag bei $19,3 \text{ Sek} \pm 1,5 \text{ Sek}$. Die Gruppe der 8-monatigen Raumlufte-exponierten WT-Mäuse wies keinen veränderten TAPSE-Wert ($1,4 \text{ mm} \pm 0,0 \text{ mm}$) auf. Bei den 8-monatigen *Nox1^{-/-}*-Kontrollmäusen lag der Wert bei $1,4 \text{ mm} \pm 0,0 \text{ mm}$ und bei den Zigarettenrauch-exponierten *Nox1^{-/-}*-Mäusen wurde ein Wert von $1,5 \text{ mm} \pm 0,0 \text{ mm}$ gemessen. Für den untersuchten Parameter PAAT, wiesen Zigarettenrauch-exponierte WT-Mäuse einen Wert von bei $19,3 \text{ Sek} \pm 1,5 \text{ Sek}$ nach und die Zigarettenrauch-exponierten *Nox1^{-/-}*-Mäuse einen PAAT-Wert von $24,0 \text{ Sek} \pm 1,0 \text{ Sek}$. Zusammenfassend zeigen die Messungen, dass lediglich die WT-Mäuse eine verschlechterte rechte Herzfunktion aufwiesen und die Herzfunktion der Zigarettenrauch-exponierten *Knockout*-Tiere vollständig erhalten blieb. In **Abbildung 23** sind repräsentative Bilder der nicht invasiven echokardiographischen Untersuchungen dargestellt.

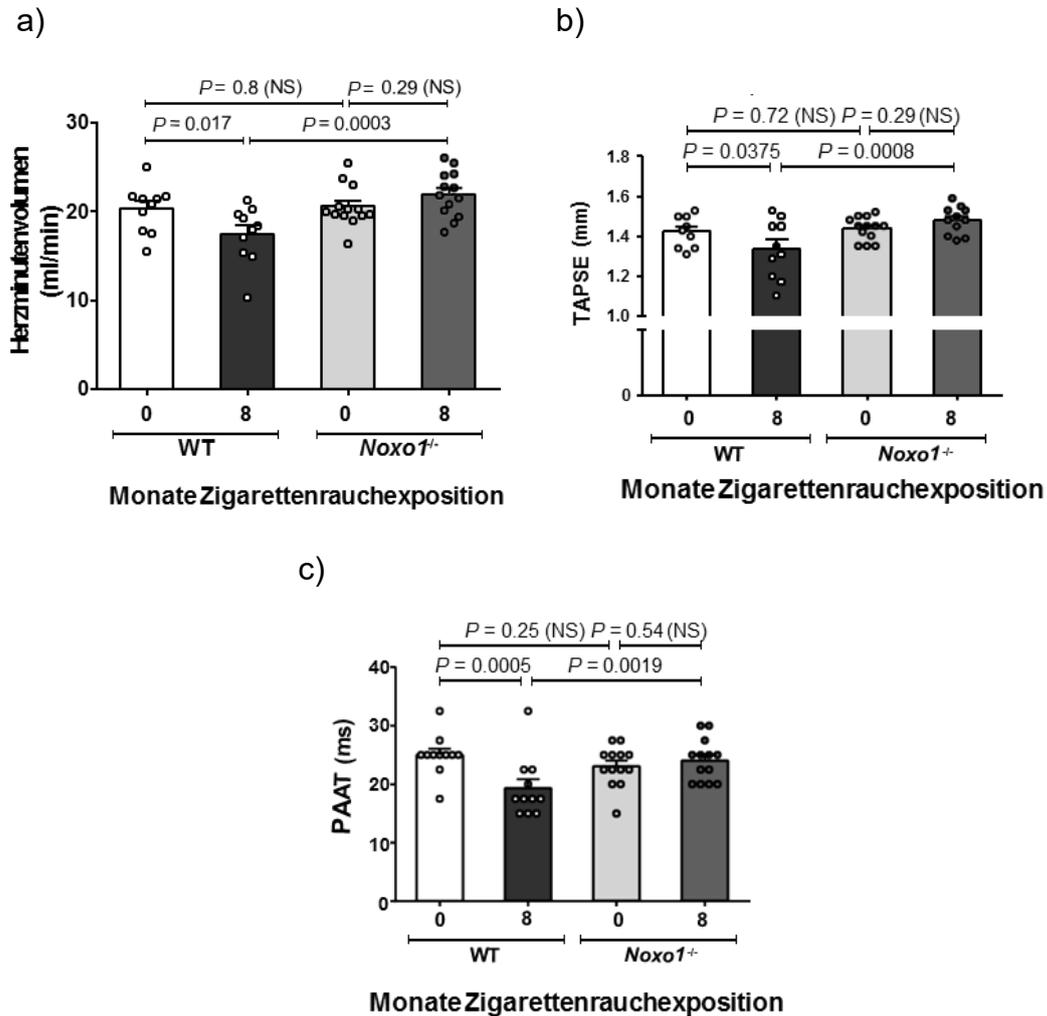


Abbildung 22: Echokardiographische Endpunktmessung der systolischen Funktion des rechten Ventrikels im Modell der Zigarettenrauchexposition. a) Messung des Herzminutenvolumens (CO) und b) systolische Funktion des rechten Ventrikels (TAPSE). c) Abschätzung des rechtsventrikulären systolischen Blutdruckes durch Messung des pulmonalarteriellen Flusses (PAAT). a) $n = 10$ Mäuse pro WT-Gruppe, $n = 13$ Mäuse pro *Noxo1*^{-/-}-Gruppen, b) $n = 9$ in der Gruppe 8 monatige Raumluf-exponierte WT Mäuse, $n = 10$ in der Gruppe 8 monatige Zigarettenrauch-exponierte WT-Mäuse, $n = 13$ in der Gruppe 8 monatige Raumluf-exponierte *Noxo1*^{-/-}-Mäuse und $n = 11$ in der Gruppe 8 monatige Zigarettenrauch-exponierte *Noxo1*^{-/-}-Mäuse. c) $n = 11$ Mäuse pro WT-Gruppe und $n = 13$ pro *Noxo1*^{-/-}-Gruppe. a-c) 2×2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test.

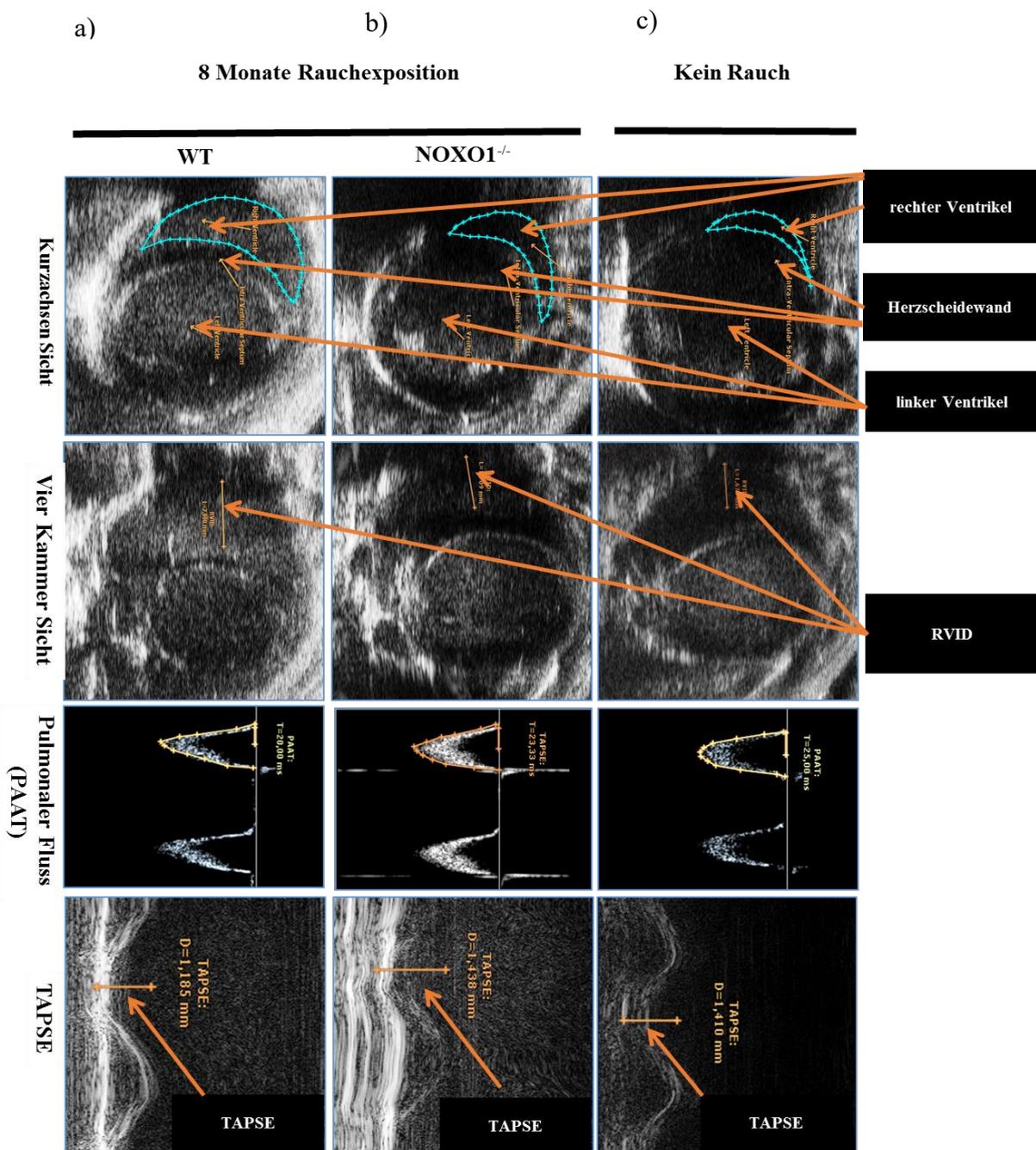


Abbildung 23: Echokardiographische Bilder nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition/Raumluftbehandlung. Repräsentative Bilder der vorgenommenen Messungen, dargestellt in der Kurzachsenansicht des pulmonalen Flusses und der TAPSE a) der WT-Mäuse nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition, b) der *Noxo1^{-/-}*-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und c) die Kontrollgruppe ohne Zigarettenrauchexposition

3.5 Effekte der *Noxol*-Deletion auf den pulmonalvaskulären Umbau (*Remodeling*)

Es ist bekannt, dass nicht nur das Lungenparenchym bei einer COPD-Erkrankung verändert ist, sondern auch ein Gefäßumbau (*Remodeling*) stattfinden kann. Aus diesem Grund wurden die pulmonalen Gefäße nach 3 und 8 Monaten Zigarettenrauchexposition analysiert. Der Grad der Muskularisierung wurde in kleinen pulmonalen Gefäßen (20-70µm), nach 3 Monaten Zigarettenrauch- bzw. RaumlufTEXposition sowie nach 8 Monaten Zigarettenrauch- bzw. RaumlufTEXposition in WT und *Noxol*^{-/-}-Mäusen untersucht. Eine Analyse der partiell-muskularisierten pulmonalen Gefäße schließt eine Muskularisierungsgrenze von 5 % - 70 % ein, daher wurde eine detailliertere Analyse dieser Muskularisierungsgrenze in Erwägung gezogen. Aus der Analyse geht hervor, dass es nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition in den WT-Mäusen zu einer signifikanten prozentualen Zunahme muskularisierter kleinen Gefäßen kam, jedoch nicht in der Gruppe der 3-monatigen Rauch-exponierten *Noxol*^{-/-}-Mäuse. Hier ist lediglich eine Tendenz zu beobachten, die keine Signifikanz aufwies (**Abbildung 24a**). In **Abbildung 24b** wird der Grad der Muskularisierung in den kleinen pulmonalen Gefäßen (20-70µm), nach 8-monatiger Zigarettenrauch- bzw. RaumlufTEXposition in WT und *Noxol*^{-/-}-Mäusen gezeigt. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass es nach chronischer Zigarettenrauchexposition beim WT- und beim *Noxol*^{-/-} zur prozentualen Zunahme der muskularisierten kleinen Gefäße kam. Zwischen den Genotypen war kein signifikanter Unterschied zu messen gewesen. In **Abbildung 25a-d** sind repräsentative Bilder der Doppelfärbung für die Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße dargestellt.

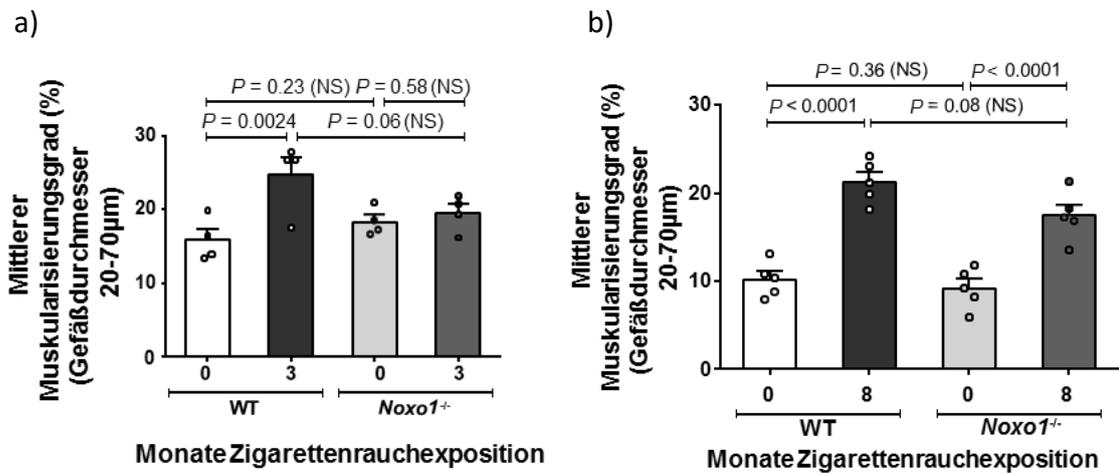


Abbildung 24: Prozentuale Verteilung aller Muskularisierungsgrade in der Gesamtheit der kleinen pulmonalen Gefäße (20-70 μm) nach a) 3-monatiger Zigarettenrauchexposition und b) nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. a) $n=4$ pro Gruppe. b) $n=5$ pro Gruppe. Statistik: a-b) 2×2 faktorielles Modell bezogen auf logit-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test. Daten werden als Einzelwerte repräsentiert, Mittelwert \pm SEM.

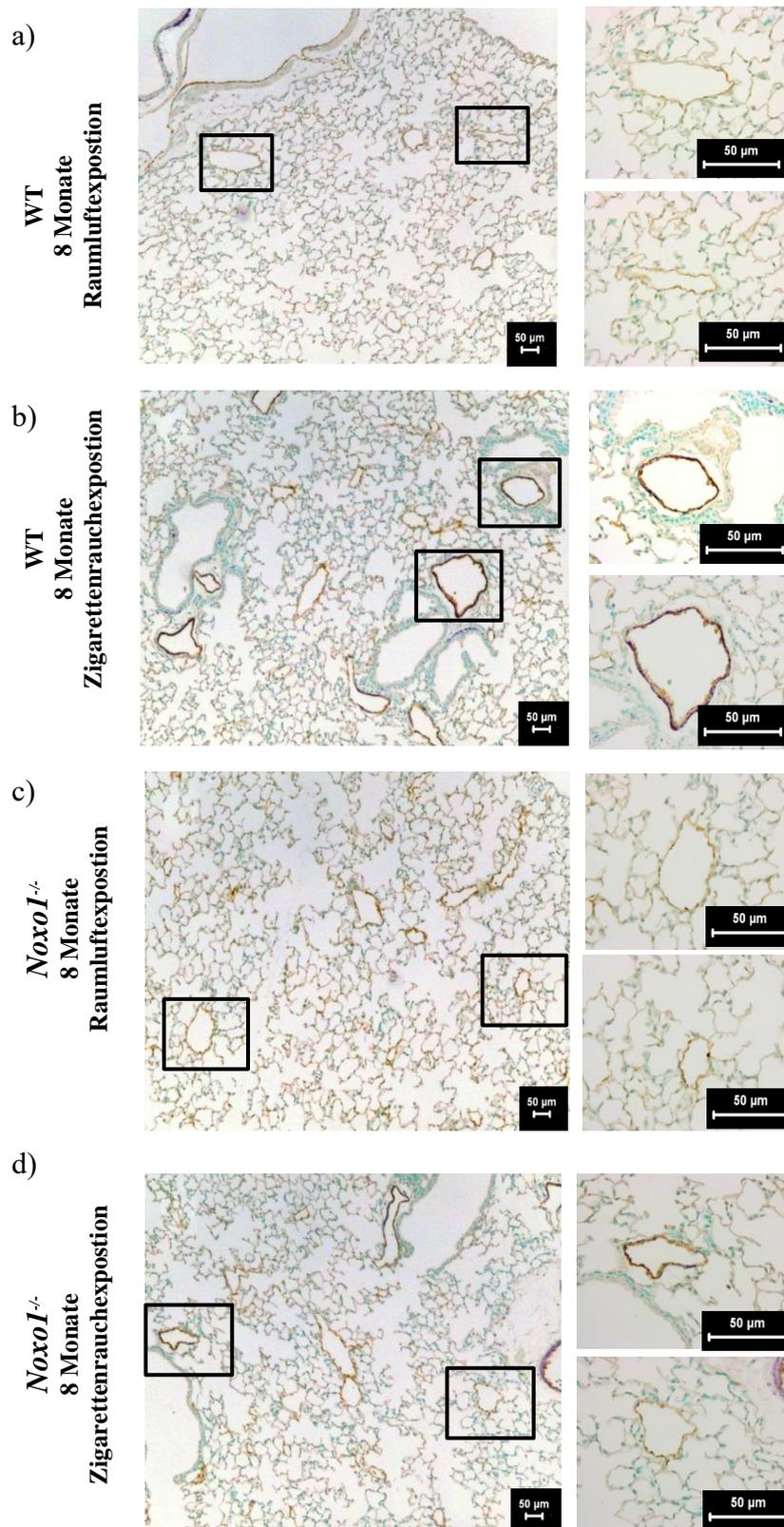
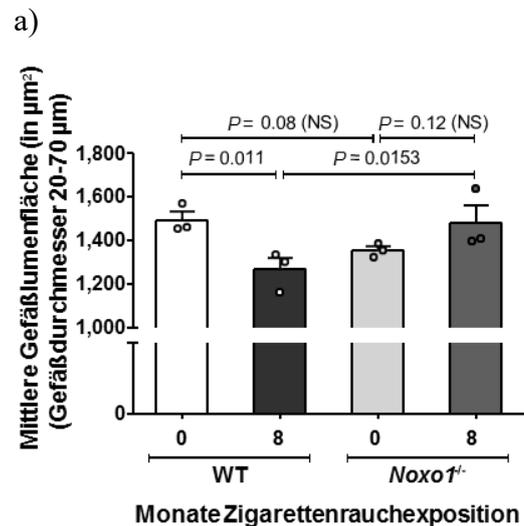
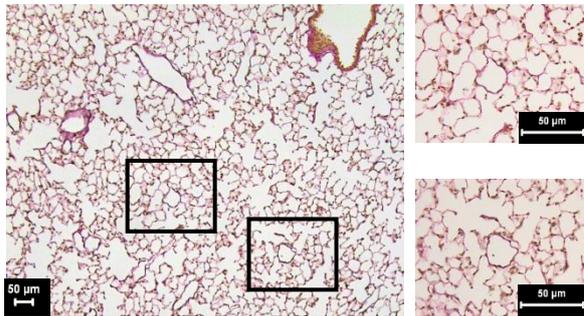


Abbildung 25: Repräsentative histologische Bilder des Muskularisierungsgrades pulmonaler Gefäße nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition in WT- und *Nox01*^{-/-}-Mäusen. Paraffinschnitte wurden mit den Antikörpern gegen α -Smooth Muscle Actin und von-Willebrand-Faktor gefärbt. Der Muskularisierungsgrad wurde visualisiert. Pro behandelte Gruppe ist ein Bild dargestellt. Rechts werden repräsentative Bilder zweier Gefäße aus der linken Abbildung gezeigt.

Zusätzlich wurde nach der Elastica-Kernechtrot-Färbung die Größe des mittleren Gefäßlumens in den kleinen Gefäßen (20-70 μm) bestimmt. Das Gefäßlumen der kleinen Gefäße wurde in den WT-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition signifikant kleiner als im Vergleich zu den Raumluft-exponierten Mäusen (WT und *Noxo1*^{-/-}) (**Abbildung 26a**). Erkenntlich ist auch, dass es zu keiner signifikanten Abnahme des Gefäßlumens in der Gruppe der 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten *Noxo1*^{-/-}-Mäuse zu beobachten gab. Der mittlere Gefäßlumen der 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten *Noxo1*^{-/-}- Mäuse zeigte ähnliche Messwerte, wie es in der Gruppe der Raumluft-behandelten *Noxo1*^{-/-}-Mäuse zu messen gab (**Abbildung 26a**). In **Abbildung 26(b-e)** sind repräsentative Bilder der histologischen Färbung zu sehen.



b) WT 8 Monate RaumlufTEXposition



c) WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition

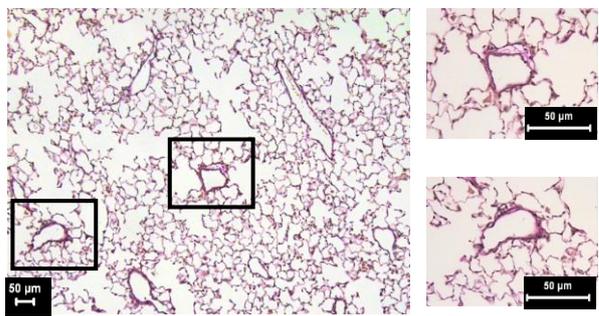
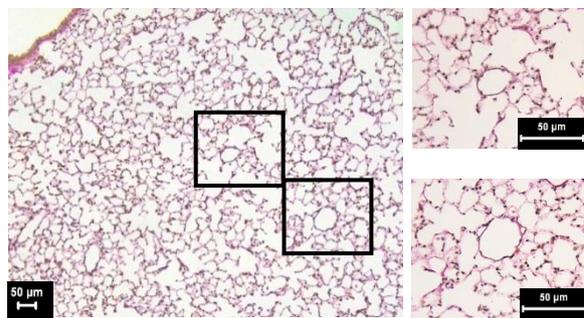
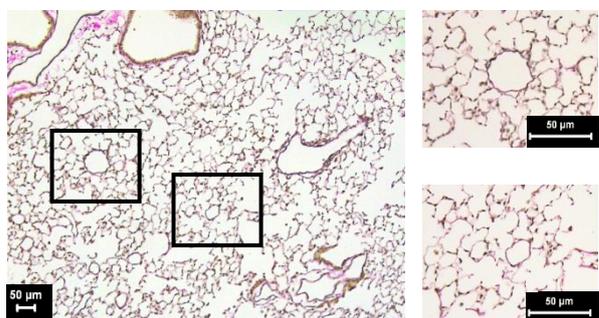
d) *Noxo1*^{-/-} 8 Monate RaumlufTEXpositione) *Noxo1*^{-/-} 8 Monate Zigarettenrauchexposition

Abbildung 26: Veränderung des mittleren Gefäßlumens in den pulmonalen Gefäßen nach Zigarettenrauchexposition. a) Zur Ermittlung der medialen Wandstärke wurden die Lungen nach Elastica-Kernechtrot gefärbt; $n = 3$ pro Gruppe. b-e) repräsentative Bilder der Elastica-Kernechtrot-Färbung zur Visualisierung der Gefäßwandstärke. Pro Gruppe ist ein Bild abgebildet. Rechts wird jeweils eine vergrößerte Darstellung der markierten Gefäße aus der linken Abbildung gezeigt. Statistik: a) 2×2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelten Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test. Daten werden als Einzelwerte repräsentiert, Mittelwert \pm SEM.

3.6 Veränderungen des Proliferationsverhaltens in WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen

3.6.1 Untersuchung der PCNA-Expression in Lungengewebeschnitten

Nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition wurde in WT-Mäusen sowie in *Noxo1*^{-/-}-Mäusen ein Gefäßumbau (*Remodeling*) in den pulmonalen Gefäßen nachgewiesen. Mit Hilfe einer immunohistologischen Färbung wurde die Proliferationsaktivität in den pulmonalen Gefäßen analysiert. Als Proliferationsmarker wurde *PCNA* (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) verwendet. Die Verteilung der PCNA-positiven Zellen wurde in den unterschiedlichen Lungenkompartimenten (Gefäßen, Alveolen/Parenchym und Bronchien) ausgewertet. Im Bereich der Alveolen und des Parenchyms konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der PCNA-positiven Zellen zwischen den beiden Genotypen gemessen werden. Die Anzahl PCNA-positiver Zellen war in der Gruppe der Raumluf-exponierten WT-Mäuse signifikant höher gewesen als in der Gruppe der Raumluf-exponierten *Noxo1*^{-/-}-Mäuse. Ein ähnliches Ergebnis konnte die Analyse beider Zigarettenrauch-exponierter Gruppen zeigen, indem die *Noxo1*^{-/-}-Mäuse signifikant weniger PCNA-positive Zellen nach Zigarettenrauchexposition in den Alveolen/Parenchym aufwiesen als die WT-Mäuse nach Zigarettenrauchexposition. Allerdings konnte nach Zigarettenrauchexposition kein signifikanter Anstieg PCNA-positiver Zellen in den WT-Mäusen oder in den *Noxo1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu der jeweiligen Raumluf-exponierten Gruppe beobachtet werden. In den pulmonalen Gefäßkompartimenten konnte ein signifikanter Anstieg PCNA-positiver Zellen in den WT-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurden keine Veränderung PCNA-positiver Zellen in den pulmonalen Gefäßkompartimenten von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen erhoben. Die Anzahl PCNA-positiver Zellen lag bei beiden *Noxo1*^{-/-}-Gruppen auf dem Niveau der Raumluf-exponierten WT-Mäuse (**Abbildung 27**) Unterschiedliche Ergebnisse PCNA-positiver Zellen konnte auch im Bereich der Bronchien gemessen werden. Die Anzahl PCNA-positiver Zellen nahm nach Zigarettenrauchexposition im WT signifikant ab. Zudem konnte man in den beiden Gruppen der *Noxo1*^{-/-}-Mäuse eine geringere Anzahl PCNA-positiver Zellen messen. Unter Raumlufexposition war die Anzahl PCNA-positiver Zellen signifikant niedriger gewesen als bei den Raumluf-exponierten WT-Mäusen und die Zahl PCNA-positiver Zellen blieb beim *Noxo1*^{-/-}-unverändert nach Zigarettenrauchexposition. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl PCNA-positiver Zellen zwischen Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen und Zigarettenrauch-exponierten *Noxo1*^{-/-}-Mäusen beobachtet werden.

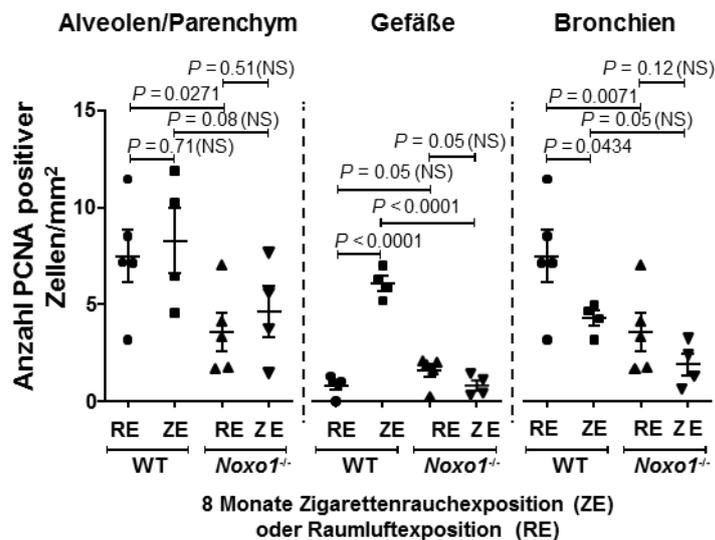


Abbildung 27: Immunhistologische Quantifizierung des Proliferationsmarkers *PCNA* in WT- und *Noxo1*^{-/-}-deletierten Mäuselungen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. In Paraffin eingebetteten Lungen wurde eine spezifische immunhistologische Färbung gegen den Proliferationsmarker *PCNA* durchgeführt und die detaillierte Verteilung der *PCNA*-positiven Zellen in den verschiedenen Lungengewebearten ermittelt. n = 5 Mäuse in den Raumluft-exponierten Gruppen (RE), n = 4 Mäuse in den Zigarettenrauch-exponierten Gruppen (ZE). Statistik: 2 × 2 allgemein lineares Modell der quasi-Poisson Familie mit log-Link. P-Werte stammen aus dem Chi-Quadrat Test. Abkürzungen (RE) = Raumluftexposition, (ZE) = Zigarettenrauchexposition.

3.6.2 Einfluss vom *Noxo1* Knockout auf die Proliferations- und Apoptoserate in PAMSCs und ATII-Zellen

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass eine erhöhte Apoptose-Rate in alveolären Epithelzellen in der COPD-Pathogenese sowie beim Fortschreiten dieser Erkrankung mit involviert ist¹⁷. Aus **Abbildung 28a** geht hervor, dass unter Kontrollbedingungen in murinen *Noxo1*-deletierten ATII-Zellen eine signifikant reduzierte Apoptose-Rate gemessen wurde, als im Vergleich zu den ATII-Zellen von WT-Mäusen. ATII-Zellen, die nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition aus den Mäusen isoliert wurden, konnte ein ähnliches Apoptose-Verhalten aufweisen und ist in **Abbildung 28a** zu sehen. Alveoläre Epithelzellen von *Noxo1* *Knockout* Mäusen wiesen eine signifikant geringere Apoptose-Rate nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition auf als die ATII-Zellen der WT-Mäuse (**Abbildung 28**). Die Proliferationsrate *Noxo1*-deletierter ATII-Zellen ist in **Abbildung 28c** zu sehen. Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass unter Kontrollbedingungen der *Knockout* keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten ausübt.

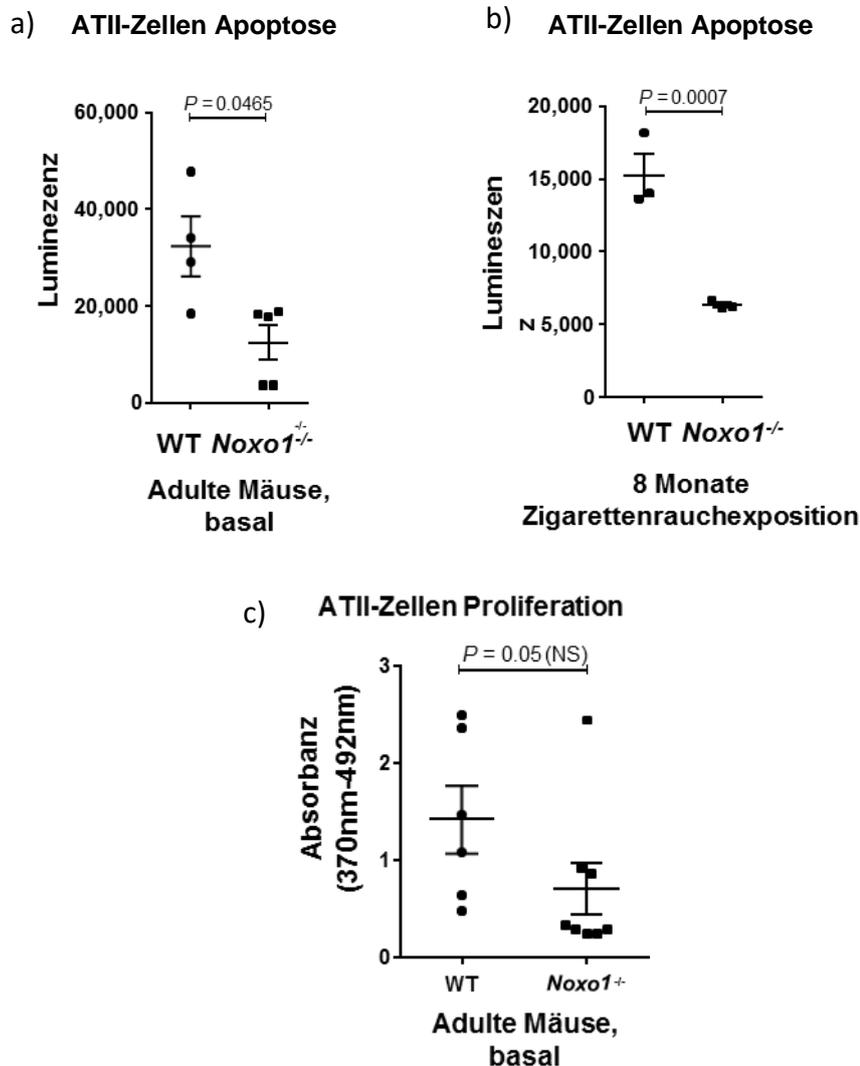


Abbildung 28: Auswirkungen einer *Noxo1*^{-/-}-Deletion auf die Apoptose- sowie Proliferationsrate in murinen ATII-Zellen. Mittels der Caspase 3/7-Aktivität wurde die Apoptoserate in a) ATII-Zellen unter Kontrollbedingungen und b) in ATII-Zellen nach 8- monatiger Zigarettenrauchexposition ermittelt. Pro Tier wurden Duplikate gemessen. Staurosporin (Positivkontrolle, nicht im Graphen gezeigt); Zellen unbehandelt (diente als Negativkontrolle, nicht im Graphen gezeigt). Mittels des BrdU-Assays wurde die c) Proliferationsrate in ATII-Zellen unter Kontrollbedingungen gemessen. Pro Tier wurden Duplikate gemessen. Nur Zellen unbehandelt (diente als Negativkontrolle, nicht im Graphen gezeigt). a) n = 4 beim WT und n = 5 beim *Noxo1*^{-/-} (jeweils unabhängige Zellsolierungen beim WT und *Noxo1*^{-/-}), b) n = 3 pro Gruppe, c) n = 6 biologische Wiederholungen beim WT und n = 8 beim *Noxo1*^{-/-} (biologische Wiederholungen), von 2–3 Zellsolierungen. Statistik: a-c) P-Werte stammen aus dem Tukey HSD Test unter Verwendung der log-umgewandelten Daten. Die Daten sind als Einzelwerte (Mittelwert ± SEM) dargestellt.

Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen sind an dem *Remodeling* der Lungengefäße bei COPD-Patienten beteiligt. Aus **Abbildung 29a** ist zu ersehen, dass unter Kontrollbedingungen in isolierten PASMCs von WT-Mäusen und *Noxo1 Knockout* Mäusen keine signifikante Veränderung der Apoptose-Rate nachgewiesen werden konnte. Die Proliferation in den PASMCs der *Noxo1 Knockout* Mäuse war signifikant niedriger als in den PASMCs der WT-Mäuse (**Abbildung 29b**).

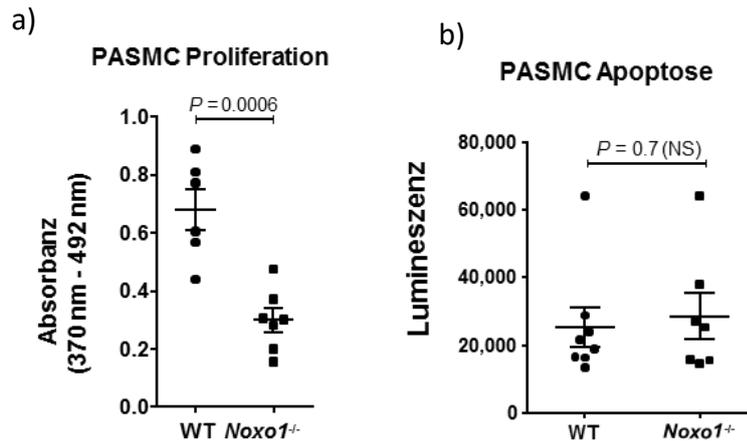


Abbildung 29: Auswirkungen einer *Noxo1^{-/-}*-Deletion auf die Apoptose- sowie Proliferationsrate in murinen PASMC. Mittels der Caspase 3/7 Aktivität wurde die a) Apoptoserate in PASMCs unter Kontrollbedingungen gemessen. Staurosporin (diente als Positivkontrolle, wird aber nicht in Graphen dargestellt), Zellen allein (dienten als Negativkontrolle, nicht Graphen gezeigt). Mittels des BrdU Assays wurde die b) Proliferationsrate in PASMCs unter Kontrollbedingungen gemessen. n = 6 jeweils beim WT (unabhängige Zellisolierungen) und n = 7 jeweils für *Noxo1^{-/-}*, b) n = 8 biologische Wiederholungen beim WT, n = 7 biologische Wiederholungen beim *Noxo1^{-/-}* (von 2–3 verschiedenen Zellisolierungen). Statistik: a) und b) P-Werte stammes aus dem Tukey HSD Ttest unter Verwendung von log-umgewandelten Daten. Die Daten sind als individuelle Datenpunkte mit Mittelwert \pm SEM aufgeführt.

3.7 Änderung inflammatorischer Zellen in der BAL von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen und WT-Mäusen nach chronischer Zigarettenrauchexposition

Inflammatorische Prozesse, speziell die Makrophagen im Sputum, spielen eine dominante Rolle bei der Emphyseentwicklung²⁸³. Aus diesem Grund wurden inflammatorische Zellen in der prozessierten bronchoalveolären Lavage (BAL) quantifiziert. Nach einer 8-monatigen Zigarettenrauchexposition wies die BAL der WT-Mäuse einen signifikanten Anstieg an inflammatorischen Zellen (einschließlich Makrophagen, Neutrophilen Granulazysten und Eosinophilen) auf, nicht aber die BAL von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen (**Abbildung 30**).

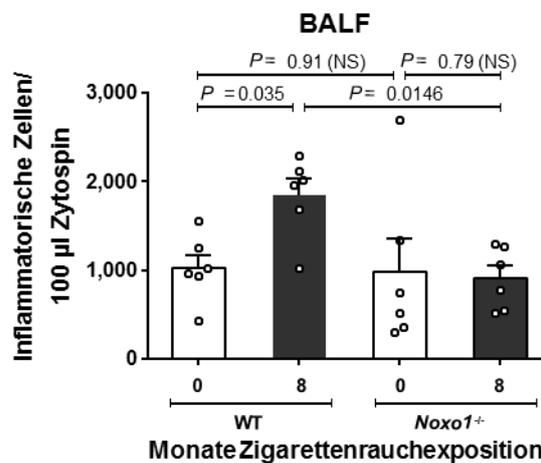
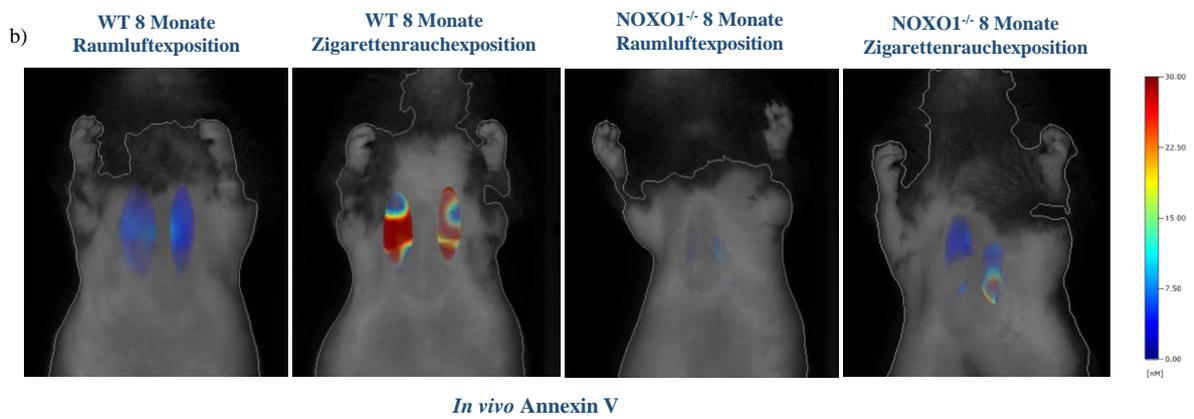
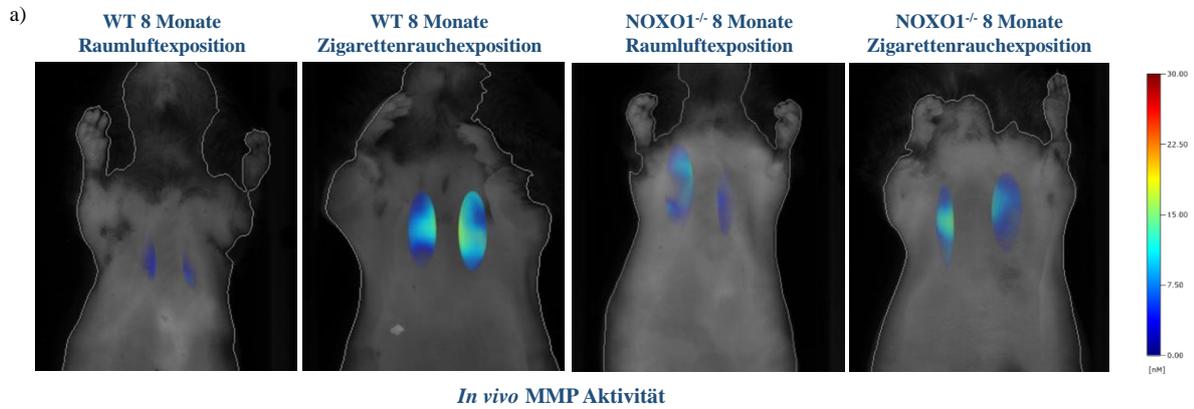


Abbildung 30: Anzahl inflammatorischer Zellen in der BAL von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. In der prozessierten BAL, dem Zytospin (je 100 µl BAL), wurden inflammatorische Zellen mit Hämalaun gefärbt, visualisiert und gezählt (n=6 pro Gruppe). Statistik: 2 × 2 allgemein lineares Modell der quasi-Poisson Familie mit log-Link, P-Werte stammen aus dem Chi-Quadrat Test.

3.8 *In vivo* Visualisierung inflammatorischer Signalwege und apoptotischer Prozesse mittels FMT-µCT in der Lunge von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition

Es ist bekannt, dass inflammatorische- sowie apoptotische Prozesse eine tragende Rolle in der COPD-Pathogenese spielen. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-basierten Tomographie, kombiniert mit der mikro-Computer-Tomographie nach intravenöser Applikation fluoreszenzmarkierter Reagenzien/Sonden, der Aktivitätsgrad vorhandener MMPs sowie mit der AnnexinV-Sonde die Anhäufung apoptotischer Zellen in der Lunge erfasst. Um einen möglichen protektiven Effekt von NOXO1 auf den Status der Inflammation

zu untersuchen, wurde den verschiedenen Gruppen nach 8 Monaten Zigarettenrauchexposition das Reagenz MMPSense 750 Fast *i.v.* appliziert. Während der Inkubationszeit von 6 Stunden, wurde die Sonde durch Anwesenheit von MMPs gespalten und aktiviert, sodass das Fluoreszenzsignal in der Lunge gemessen werden konnte. In **Abbildung 31(a,c)** ist deutlich zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal bei den Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen (8 Monate) für vorhandene MMPs signifikant erhöht war, verglichen mit dem Signal der Raumluft-behandelten Mäuse sowie auch im Vergleich mit den Zigarettenrauch-exponierten *Knockout* Mäusen. *Nox1^{-/-}*-Mäuse zeigten nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition keinen signifikanten Anstieg des aktivierten MMPSense 750 Fast-Signals in der Lunge. Als positiv-Referenz wurde das Signal in der Leber jedes Tieres überprüft, da das Reagenz dort metabolisiert wurde (wird nicht in dieser Arbeit gezeigt). Um den Apoptose-Status bei einer Emphyseentwicklung in der Lunge der Mäuse zu beurteilen, wurde die fluoreszenzmarkierte Substanz Annexin Vivo 750 als Marker genutzt. Das Reagenz wurde den Mäusen *i.v.* appliziert und nach 2 Stunden wurde die Emission bei einer Wellenlänge von 750 nm mittels des Gerätes ermittelt. Das Signal für apoptotische Zellen in der Lunge von Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen war nach 8 Monaten signifikant höher als im Vergleich zu den Kontrollmäusen sowie auch im Vergleich zu den Zigarettenrauch-exponierten *Nox1 Knockout* Mäusen (**Abbildung 31d**). Das gemessene Signal des Annexin Vivo 750 lag bei den Zigarettenrauch-exponierten *Nox1 Knockout* Mäusen auf einem sehr ähnlichen Niveau, wie bei den Kontrollmäusen zu messen war. **Abbildung 31(a-b)** zeigt repräsentative Bilder der aufgenommenen *in vivo*-Signale für die Aktivität von MMPs (**Abbildung 31a**) sowie des *in vivo*-Signals für Annexin nach *i.v.* Applikation vom Annexin-Vivo 750 (**Abbildung 31b**).



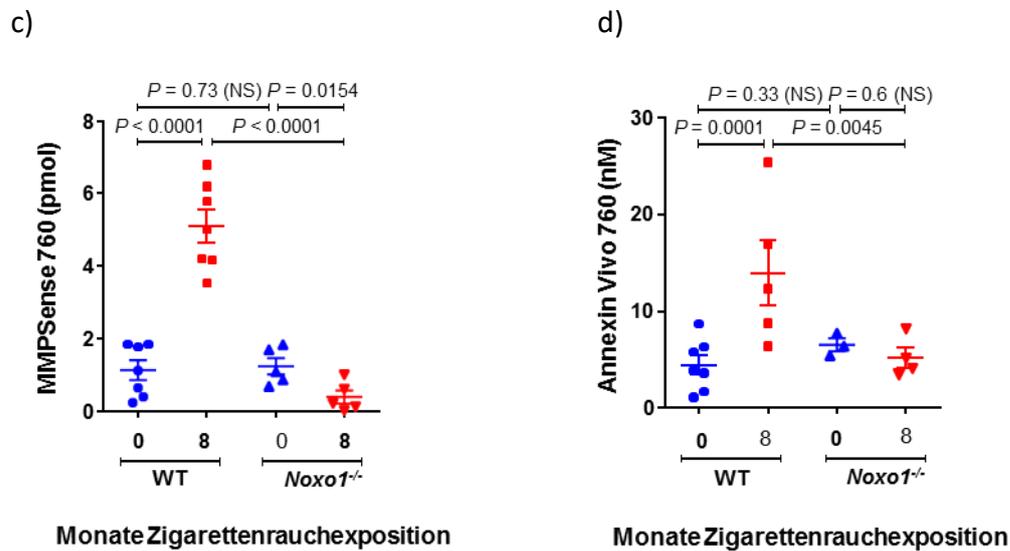


Abbildung 31: FMT- μ CT-Analyse nach 8 Monaten Zigarettenrauchexposition in WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. Repräsentative Bilder des aufgenommenen Fluoreszenzsignals während der FMT- μ CT-Untersuchung in der Lunge von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach Zigarettenrauchexposition oder unter Kontrollbedingungen. In a) nach *i.v.* Applikation von MMPsense 750 FAST; Messung fand nach 6 Stunden statt. b) Annexin Vivo 750; Messung fand 2 Stunden nach *i.v.* Injektion statt. c) Quantitative Messung einer *in vivo* Aktivität von MMPs in der Lunge nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition, nach *i.v.* Applikation der Substanz MMPsense750 FAST und d) Quantitative Analyse des proapoptose-Signals in der Lunge nach *i.v.* Applikation von der fluoreszenzmarkierten Substanz Annexin Vivo 750 nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Die Leber diente als Positivkontrolle für das Fluoreszenzsignal. Für die Messung wurden c) je n=7 Mäuse in den WT Gruppen und je n=5 Mäuse in den *Noxo1*^{-/-}, d) n=7 Mäuse in der 8-monatigen Raumluf-behandelten WT-Gruppe, n=5 Mäuse in der 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT-Gruppe, n=3 Mäuse in der 8-monatigen Raumluf-exponierten *Noxo1*^{-/-}-Gruppe und n=4 Mäuse in der 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten *Noxo1*^{-/-}-Gruppe. Statistik c) und d): 2 \times 2 allgemein lineares Modell aus der quasi-Poisson Familie mit log-Link. P-Werte stammen aus dem Chi-Quadrat Test.

3.9 *Noxo1*^{-/-}-Mäuse erzeugen weniger reaktive Sauerstoffspezies (ROS) nach Zigarettenrauchexposition sowie nach einer CSE-Behandlung als WT-Mäuse

3.9.1 Detektion von ROS nach Zigarettenrauchexposition und CSE-Behandlung in isolierten PAMSCs und AII-Zellen

Unter dem **Abschnitt 2.7** wurde die Vorbereitung der Ansätze für die ROS-Messung beschrieben. Die eingefrorenen Proben wurden im ESR-Spektrometer gemessen. Da aus vorherigen Experimenten ein *Remodeling* der pulmonalen Gefäße unter Zigarettenrauch zu beobachten war sowie aus der Literatur bekannt ist, dass PAMSCs im Gefäßumbau eine Rolle spielen ³¹⁶, war eine nähere Untersuchung hinsichtlich der ROS-Produktion in den PAMSC von Interesse. Um speziell den Superoxidanteil zu messen, wurden die Proben mit CMH und zusätzlich mit pSOD behandelt. Aus **Abbildung 32a** ist ersichtlich, dass die Superoxid-Produktion in 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten isolierten PAMSCs von WT-Mäusen verglichen mit den PAMSCs von WT-Kontrollmäusen, keinen Unterschied zeigte. Neben der Superoxid-Produktion nach einer chronischen Zigarettenrauchexposition, wurde der akute Effekt einer Zigarettenwirkung in Form einer Behandlung mit Zigarettenrauchextrakt (CSE) untersucht. PAMSCs wurden mit 10 %igem CSE für 24 Stunden inkubiert und darauffolgend wurde mit der ESR-Spektroskopie das Superoxid eruiert. Wie bereits der chronische Zigarettenraucheinfluss zeigte, bewirkte eine akute CSE-Behandlung keine veränderte Superoxid-Produktion in den PAMSCs von WT-Mäusen. Auch war kein signifikanter Anstieg an Superoxid in den PAMSCs von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach einer CSE-Behandlung nachgewiesen worden (**Abbildung 32b**)

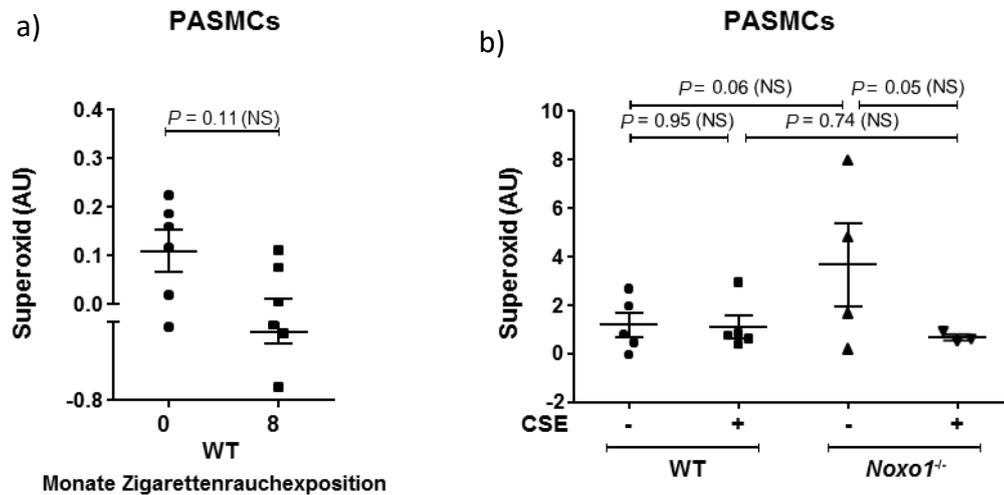


Abbildung 32: Zelluläre Superoxid Quantifizierung mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie in PASCs. a) gemessenes Superoxid (CMH+pSOD) aus isolierten PASCs von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen. b) gemessenes Superoxid aus mit 10 %igem CSE (24 Stunden) behandelten PASCs (CMH+pSOD), isoliert von WT und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. (AU)= Arbitrary Units, a) n=6 (biologische Duplikate), aus 2–3 unabhängigen Zellisolierungen b) PASCs, n=5 je WT-Gruppe, aus unabhängigen Zellisolierungen. n=4 in der Gruppe *Noxo1*^{-/-} ohne CSE-behandelte (-) und n=3 in der Gruppe *Noxo1*^{-/-} mit CSE Behandlung (+). Statistik: a) P-werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test und b) 2 × 2 faktorielles Modell. P -Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test.

Im **Abschnitt 3.2** wurde mittels alveolärer Morphometrie und Stereologie der Verlust und die Zerstörung des Lungenparenchyms, speziell der Alveolen nachgewiesen. Darüber hinaus ist es wichtig, das Niveau am gebildeten oxidativem Stress in den Alveolären Typ II-Zellen zu messen, da diese im Lungenparenchym vielzählig verbreitet sind¹⁷⁰. ATII-Zellen wurden aus 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen isoliert und mittels der ESR-Spektroskopie wurde die Superoxid-Produktion gemessen. Aus **Abbildung 33a** ist ersichtlich, dass eine chronische Zigarettenrauchexposition zu signifikant erhöhtem Superoxid in ATII-Zellen von WT-Mäusen führte. Ferner wurde auch die Superoxidproduktion nach akuter CSE-Behandlung in den ATII-Zellen gemessen. Auch in der **Abbildung 33b** ist ein ähnliches Ergebnis zu sehen. Die Superoxid-Produktion in ATII-Zellen von WT-Mäusen nach akuter Behandlung mit CSE (10 %) war signifikant erhöht gewesen. Dieses Ergebnis konnte in den ATII-Zellen von CSE-behandelten *Noxo1* Knockout Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 33b**).

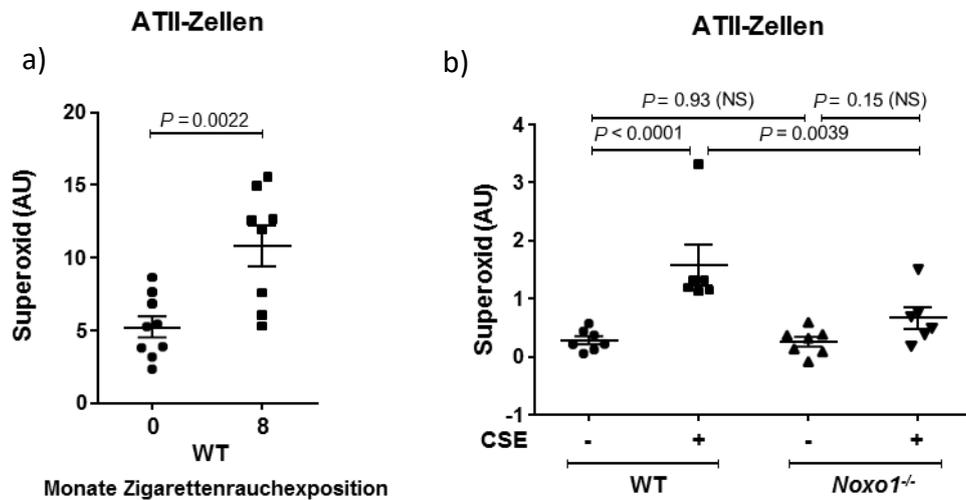


Abbildung 33: Zelluläre Superoxid Quantifizierung mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie in ATII-Zellen. A) Isolierte ATII-Zellen von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten Mäusen, verglichen mit 8-monatigen Raumlufte-xponierten ATII-Zellen. a) $n = 9$ für WT Raumlufteexposition und $n = 8$ Zigarettenrauchexposition (biologische Duplikate auf von 2–3 Zellisolierungen), b) ATII-Zellen aus WT und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen mit oder ohne CSE-Behandlung (in vitro). AU, arbitrary units, ($n = 7$ in den Gruppen ohne CSE-Behandlung und $n = 6$ in den Gruppen mit CSE-Behandlung. Statistik: a) P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test, b) 2×2 faktorielles Modell. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test

Mittels des AmplexRed[®]-Assays kann eine quantitative Enzymaktivität ROS-bilender Enzyme ermittelt werden. Auf zellulärer Ebene wurde die Wasserstoffperoxidmenge in ATII-Zellen aus 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen gemessen. Die Ergebnisse aus AmplexRed[®]-Assays sind mit den Ergebnissen aus **Abbildung 33** übereinstimmend. Die Wasserstoffperoxid-Mengen waren in den 8-monatigen Rauch-exponierten ATII-Zellen signifikant erhöht gewesen, aber nicht 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten ATII-Zellen von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen (**Abbildung 34**).

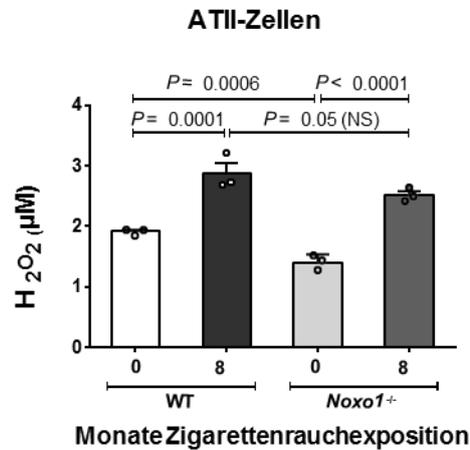


Abbildung 34: H₂O₂-Messung mittels des AmplexRed®-Assays in ATII-Zellen. Intra- und extrazellulär detektiertes Wasserstoffperoxid in isolierten ATII-Zellen aus 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen, n = 3) Statistik: 2 × 2 faktorielles Modell unter Verwendung von log-umgewandelten Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigem t-Test.

3.10 Veränderung der 3-Nitrotyrosin-Mengen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition in den Lungen von WT-Mäusen und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen

Vorangegangene Experimente zeigten, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Zigarettenrauchexposition und Zigarettenrauchextrakt-Behandlung in WT-Mäusen erhöht waren. Aus der Literatur ist bekannt, dass Nitrotyrosin ein Produkt aus der Reaktion von Peroxynitrit mit den Thyrosinresten von Protein ist ¹⁸², sodass in Rahmen dieser Arbeit die Expression vorhandener 3-Nitrotyrosin-Produkte detaillierter beleuchtet wurde. Aus **Abbildung 35** ist ersichtlich, dass es zu einer signifikant erhöhten Akkumulation nitrierter Produkte in dem Lungenhomogenat von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen kam. Die Menge an nitrierten Produkten war in WT- und *Noxo1*^{-/-}-Kontrolltieren sowie in den Zigarettenrauch-exponierten *Knockout* Mäusen deutlich geringer.

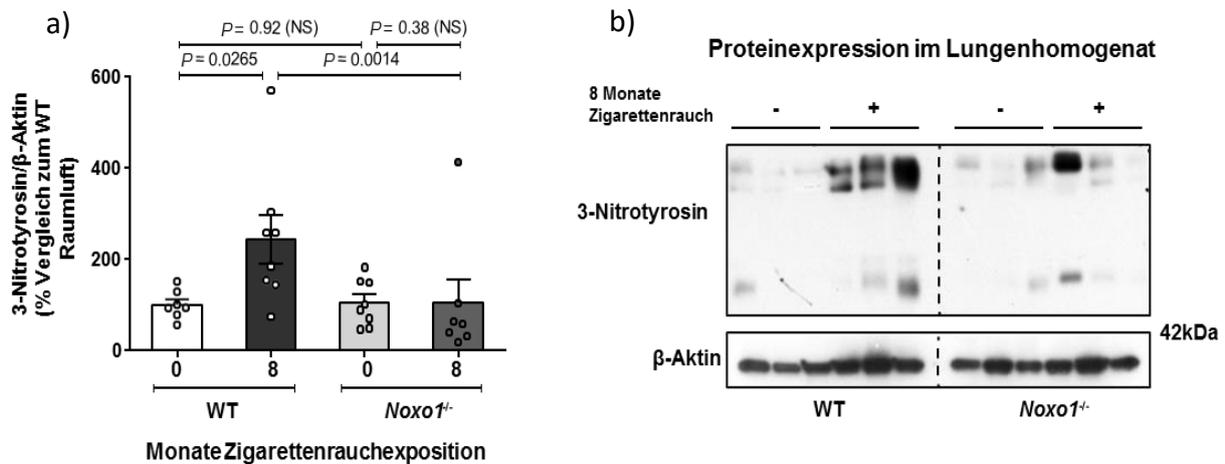


Abbildung 35: 3-Nitrotyrosin-Analyse in WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Proteineexpression von 3-Nitrotyrosin-Produkten mittels Western Blot Analyse. a) Densitometrische Auswertung der 3-Nitrotyrosin-Expression, mit Normalisierung zum β -Aktin. Quantifizierung erfolgte aus unabhängigen 3 Blots, n = 7 Lungen beim WT 8 Monate Raumlufte, n = 8 Lungen beim WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition sowie n = 8 beim *Noxo1*^{-/-} 8 Monate Raumlufteexposition, n = 7 Lungen *Noxo1*^{-/-} 8 Monate Zigarettenrauchexposition. b) Repräsentativer Blot. Statistik: 2×2 faktorielles linear gemischtes Modell unter Verwendung von log-umgewandelten Daten. Die Membran wurde als zufälliger Faktor genutzt. P-Werte stammen aus dem Chi-Quadrat Test. Daten werden als Einzelwerte gezeigt (Mittelwert \pm SEM).

3.11 Identifizierung nitrierter Proteine im Lungenhomogenat mit Hilfe der LC-MS/MS-Analyse aus SDS-gelelektrophoretischen isolierten Gelproben

Nachdem nachgewiesen wurde, dass 3-Nitrotyrosin durch eine chronische Zigarettenrauchexposition vermehrt in den Lungen von WT- jedoch nicht in den Lungen von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen gebildet wurde, stellte sich die Frage, welche Proteinklassen unter Zigarettenrauchexposition eine Nitrierung im Lungenhomogenat aufweisen. Die herausgeschnittenen Banden aus den SDS-gelelektrophoretischen Gelen wurden mittels einer massenspektrometrischen Analyse, einer LC-MS/MS-Analyse, zur Firma Alphalyse (Odense, Dänemark) übersendet und analysiert. Die Analyse zur Identifizierung über das Vorkommen nitrierter Proteine wurde in den vier Gruppen durchgeführt (**Abbildung 36**). Die Analyse zeigte, dass in jeder Lungenprobe von Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen primär die Proteine: HBA-A₂ (Hemoglobin Alpha, Adult Chain 2), PRDX6 (Peroxiredoxin 6), WARS (Tryptophan- tRNA Ligase) und die GSTM1 (Glutathione S-Transferase) nitriert sind. Dagegen war die Nitrierung dieser Proteine bei den *Noxo1*^{-/-}-Lungenproben kaum nachweisbar. Auf der anderen Seite zeigte die LC-MS/MS-Analyse in den Lungen der 8-

monatigen Zigarettenrauch-exponierten *Noxo1*^{-/-}-Mäusen, dass die Proteine ACTA2 (*Actin-Aortic Smooth Muscle*), ALDOA (*Fructose-Biphosphat Aldolase A*), CS (*Citratsynthase*), GPI (*Glucose-6-Phosphat Isomerase*) GLUD1 (*Glutamatdehydrogenase*), GSN (*Gelsolin*), MSN (*Moesin*), PKM (*Pyruvat Kinase*) und VIM (*Vimetin*) eine Nitrierung aufweisen. In den Lungenproben der WT-Kontrollmäuse ist im Vergleich zu den anderen drei Gruppen aufgefallen, dass die Proteine: ACTA2, ALDH1A1 (*Aldehyde Dehydrogenase*), CS, GLUD1 und PRDX6 nitriert waren (**Abbildung 36**).

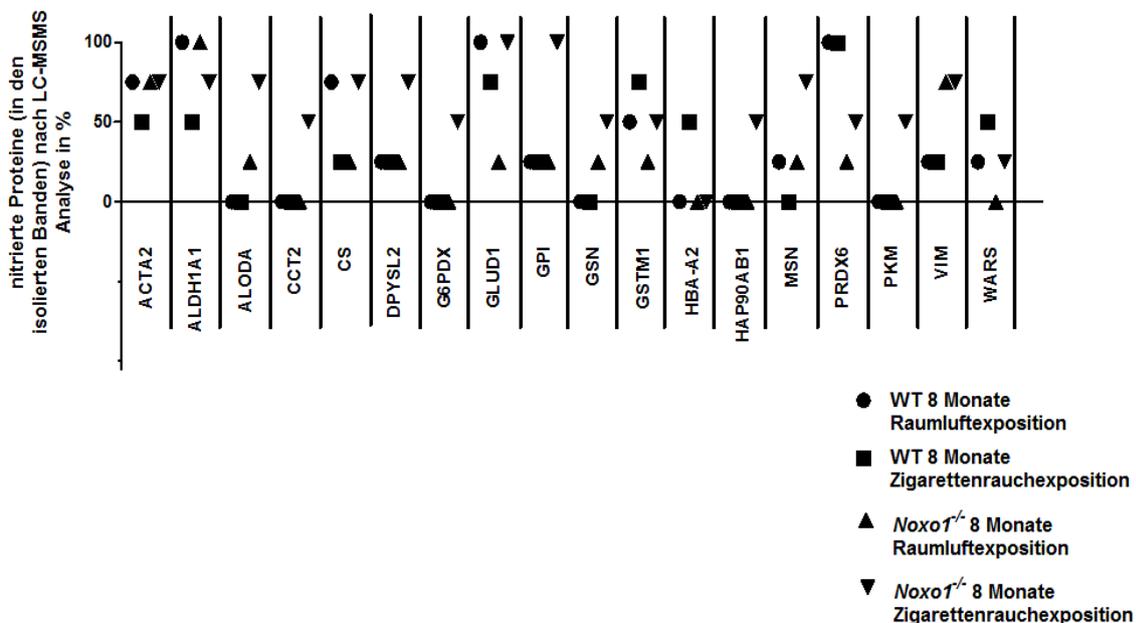


Abbildung 36: Vorkommen nitrierter Proteine im Lungenhomogenat von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach massenspektrometrischer Analyse. Die für die Analyse benötigten Banden wurden nach der SDS-Gelelektrophorese mittels eines Skalpell aus ausgeschnitten und an die Firma Alphalyse für die LC-MS/MS (massenspektrometrische Analyse) geschickt. a) prozentuale Darstellungen in den ausgeschnittenen Banden vorkommender nitrierter Proteine. Ergebnisse wurden prozentual nach Häufigkeit (%) eines vorkommenden nitrierten Proteins pro n-Zahl pro Gruppe kategorisiert. (n = 4 pro Gruppe). ACTA2=Alpha-Actin-2, ALDH1A1=Aldehyde Dehydrogenase, ALODA=Aldolase A, CCT2=Chaperonin Containing subunit 2, CS=Citratsynthase, DPYSL2=Dihydropyrimidinase Like 2, G6PDX=Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase X-linked, GLUD1=Glutamatdehydrogenase, GPI=Glucose-6-Phosphat Isomerase, Gsn=Gelsolin, GSTM1=Glutathione S-Transferase, HBA-A2=Hemoglobin Alpha, Adult Chain 2, HSP90ab1=Heat Shock Protein 90, MSN=Moesin, PRDX6=Peroxiredoxin 6, PKM=Pyruvate Kinase, VIM=Vimentin, WARS=Tryptophan- tRNA Ligase

3.12 Nähere Untersuchungen von Upstream/Downstreams Mechanismen Zigarettenrauch-exponierter *Nox1 Knockout* Mäuse und WT-Mäuse

3.12.1 Untersuchung der RNS-Bildung in der BAL von WT-Mäusen und *Nox1 Knockout* Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass unter chronischer Zigarettenrauchexposition sowie unter einer akuten CSE-Behandlung ROS im Lungengewebe von WT-Mäusen sowie auch in isolierten ATII-Zellen von WT-Mäusen anstieg, jedoch nicht im Lungengewebe von *Nox1 Knockout* Mäusen (**Kapitel 3.9.2**). Weiterhin zeigte **Kapitel 3.10**, dass eine Zigarettenrauchexposition in WT-Mäusen zu einer verstärkten 3-Nitrotyrosin Bildung führte. Da Peroxynitrit ein Produkt aus der Reaktion von Superoxid und Stickstoffmonoxid ist, stellte sich nach der Superoxid Analyse die Frage, welche Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen in der BAL nachzuweisen sind. In **Abbildung 37a-b** sind signifikante Unterschiede gemessener Nitrit und Nitrat Konzentrationen zwischen Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen und den Raumluft-exponierten Mäusen zu sehen. Dieses Ergebnis traf nicht auf die *Nox1 Knockout* Mäusen zu. In der BAL von Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen konnten deutlich größere Mengen Nitrat und Nitrit nachgewiesen werden als im Vergleich zu den Zigarettenrauch-exponierten *Nox1^{-/-}*-Mäusen.

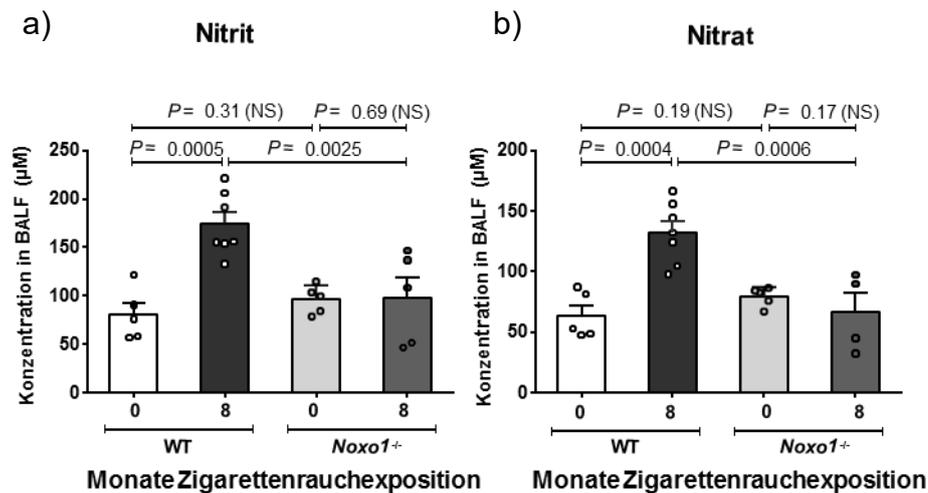


Abbildung 37: Nitrat/Nitrit-Analysen in der BAL von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. Bestimmung von Nitrit und Nitrat in der BAL nach a-b) nach 8 Monaten. Stickstoffmonoxid Synthase-Assay im Lungenhomogenat von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten Mäusen. a) n=5 Lungen pro Gruppe, ausgenommen n=7 Lungen beim WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition und b) n=5 Lungen pro Raumluft Gruppe, ausgenommen n=7 Lungen in der Gruppe WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition, n=4 Lungen beim *Noxo1*^{-/-} 8 Monate Zigarettenrauchexposition. Statistik: 2 × 2 faktorielles Modell unter Verwendung von log-umgewandelten Daten. P-Werte stammen aus einem zweiseitigen t-Test.

3.12.2 Untersuchung der *Mmp12*- und *Timp3*-Expression unter chronischer Zigarettenrauchexposition in WT-Mäusen und in *Noxo1*^{-/-}-Mäusen

Wie in der Einleitung detailliert erleutert, spielt das Protease-Antiprotease-Ungleichgewicht bei der COPD eine wichtige Rolle. Daher wurde in diesem Versuch die Expression der Metalloproteinase *Mmp12* und des Metalloproteinaseinhibitors *Timp3* durch quantitative Real-Time PCR getestet. Weiterhin wurde *Tlr4* als wichtiges Target des adaptiven Immunsystems und das im immer wieder im Zusammenhang mit der COPD steht, untersucht. Die mRNA von *Mmp12* war nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition in den WT-Mäusen signifikant hochreguliert gewesen, in den *Noxo1* *Knockout* Mäusen war die mRNA nachweisbar, jedoch war diese nicht signifikant erhöht (**Abbildung 38**). Die Expression von *Tlr4* war in den WT-Lungen nach Zigarettenrauchexposition signifikant herunterreguliert gewesen. Im *Noxo1*^{-/-}-Mäusen war dies nicht beobachtet worden. Bekannt ist, dass ein Mangel an *Timp3* die Emphysementwicklung fördern kann und die matrixabbauende Funktion von MMPs verstärkt wird ²⁴⁹, sodass die Genexpression von *Timp3* analysiert wurde. Aus **Abbildung 38** wird ersichtlich, dass die mRNA-Expression von *Timp3* in WT-Mäusen nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition signifikant runterreguliert war. Dagegen blieb in den

Noxo1^{-/-}-Mäusen die mRNA-Menge an *Timp3* zum gleichen Zeitpunkt unbeeinflusst. Weiterhin lag diese auf dem gleichen Expressionslevel wie die der Kontrollmäuse. Zum späteren Zeitpunkt, nach 8 Monaten, konnte keine signifikante Veränderung der *Timp3*-mRNA-Expression in den verschiedenen Gruppen nachgewiesen werden.

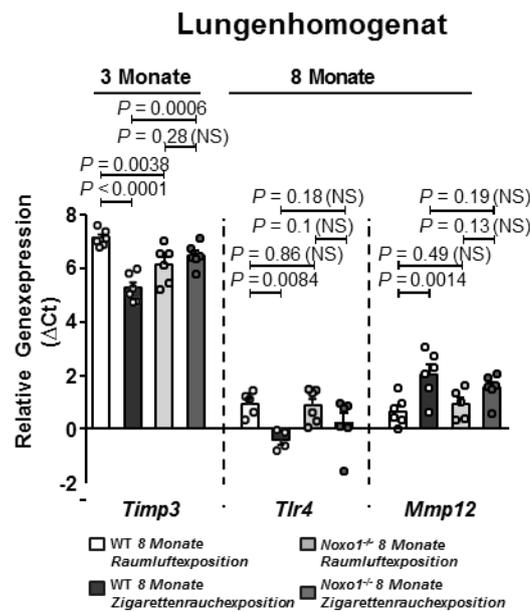


Abbildung 38 *Mmp12* und *Timp3* Genexpressionsanalyse im Lungenhomogenat von chronisch Zigarettenrauchexponierten Mäusen. a) *Timp3* mRNA-Expression nach 3 Monaten und *Mmp12*-, *Tlr4* mRNA-Expression nach 8 Monaten im WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. Die Genexpressionsanalyse wurde mittels rtPCR in murinen Lungenhomogenat durchgeführt. mRNA-Expression ist zur *Pbgd* (Porphobilinogen deaminase) normalisiert. *Timp3*: n=6 Lungen pro Gruppe, *Tlr4*: n=5 beim WT 8 Monate Raumluftexposition, n=4 beim WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition, n=6 bei beiden *Noxo1*^{-/-}. *Mmp12*: n=6 pro Gruppe, außer n=5 beim *Noxo1*^{-/-} 8 Monate Raumluftexposition. Statistik: 2 × 2 faktorielles Modell basierend auf ΔC-Werten (analysiert pro Gen). P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test.

3.12.3 Genexpressionsanalysen in ATII-Zellen und PAMSCs von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach CSE-Behandlung

Die Mechanismen, die eine PH- und Emphyseentwicklung unter einem *Noxo1 Knockout* nach einer chronischen Zigarettenrauchexposition verhindern, wurden in isolierten alveolären Epithelzellen sowie in glatten Muskelzellen von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen untersucht. Die Genexpression ausgewählter Zielgene (aus der Inflammation, Apoptose und Proliferation) wurde analysiert (**Abbildung 39**). Der pro-proliferative Marker *Ki67* war unter basalen Konditionen in den PAMSCs von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen signifikant schwächer exprimiert gewesen als in den WT-Mäusen. Durch CSE wurde dieser Effekt in den PAMSCs der *Knockout* Mäuse verstärkt und die Expression von *Ki67* war stark runterreguliert. *Bcl2*, ein anti-apoptotisches Gen und ein wichtiges regulatorisches Gen des kontrollierten Zelltods, wies eine signifikant erhöhte Expression nach CSE-Behandlung in den PAMSCs von WT-Mäusen auf. Dies war in den Zellen der *Knockout* Mäuse jedoch nicht detektierbar. Unter unbehandelten Konditionen war die Genexpression von *Bcl2* in den PAMSCs von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen signifikant schwächer exprimiert gewesen. Weiterhin wurde das für inflammatorische Signaltransduktionsprozesse aktive Enzym, die Hämoxigenase-I (*Hmox1*), untersucht. Dieses Gen zeigte eine deutliche Hochregulierung unter CSE-Behandlung in den ATII-Zellen von WT- sowie *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. In isolierten PAMSCs von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen konnte ein verändertes Expressionsmuster des *Tlr4* gemessen werden. Bereits unter basalen, sprich unter unbehandelten Bedingungen, konnte in den PAMSCs von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen eine Hochregulierung dieses Gens beobachtet werden. Unter einer CSE-Behandlung war die Expression im *Knockout* jedoch nicht verändert gewesen. In PAMSCs der WT-Mäuse wurde durch eine CSE-Behandlung eine signifikante Herunterregulierung von *Tlr4* induziert. Des Weiteren wurde die Expression von Neprilysin (*Nep*), eine neurale Endopeptidase, in den PAMSCs sowie in den ATII-Zellen analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die *Nep*-Expression in den PAMSCs von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen unter CSE herunterreguliert wurde, dies jedoch nicht in den PAMSCs der WT-Mäuse zu beobachten war (**Abbildung 39**).

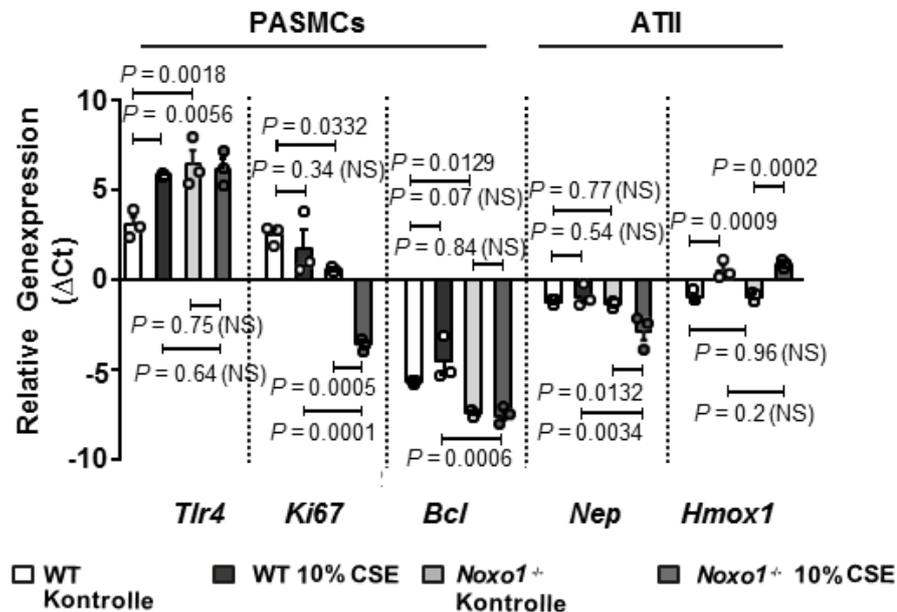


Abbildung 39: Relative Genexpression von ausgewählten Genen in isolierten Primärzellen von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach CSE- Behandlung. a) ATII-Zellen und PASMCs von WT-Mäusen und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach einer CSE-Behandlung (10 %, 24 Stunden) n=3 pro Gruppe pro Gen *Tlr4*, *Ki67*, *Bcl*= B-cell lymphoma 2) *Nep*= Neprilysin, *Hmox1*=Hämoxigenase 1. Statistik: 2 × 2 faktorielles Modell basierend auf ΔC-Werten (pro Gen analysiert). P-Werte vom zweiseitigen t-Test.

3.13 Gen-Expressionsmusteranalysen von spezifischen Zellsignalwegen in mikrodissektierten pulmonalen Gefäßen und alveolären Septen von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach 3- und 8-monatiger Zigarettenrauchexposition

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass Zigarettenrauch-exponierte *Noxo1*^{-/-}-Mäuse vor einer Emphysembildung und PH geschützt waren. Mit Hilfe einer globalen Transkriptions-Analyse (Microarray) konnte eine Vielzahl von Genen, in den unterschiedlichen Gruppen und unter verschiedenen Konditionen untersucht werden. Zudem könnten mögliche NOXO1-abhängige Signalwege gefunden werden, die den protektiven Effekt erklären. Es ist bekannt, dass in der COPD-Pathophysiologie eine alveoläre Destruktion von großer Bedeutung ist und bei einigen COPD-Patienten das *Remodeling* pulmonaler Gefäße eine Rolle spielt. Daher wurden in diesem Experiment alveoläre Septen sowie pulmonale Gefäße mittels eines Lasers aus Lungenquerschnitten, wie unter dem **Abschnitt 2.8.1** beschrieben, dissektiert. Mit der Microarray-Analyse wurden Genexpressionveränderungen in verschiedenen Signaltransduktionswegen (nach 3 und 8 Monaten) untersucht. In **Abbildung 40** sind beispielsweise einige regulierte Signalwege, die den Zellzyklus und die Inflammation

betreffen, dargestellt. Man kann erkennen, dass der *Pathway* der oxidativen Phosphorylierung und des Citratzyklus (mit der KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Nummer 00190 und 00020) nach 3 und 8 Monaten sowohl in den Septen als auch in den pulmonalen Gefäßen, unter dem Einfluss des *Noxo1 Knockouts*, verändert waren. Die Microarray-Analyse nach 3 Monaten Zigarettenrauch bzw. Raumluft zeigte, dass der *Noxo1 Knockout* (ohne Zigarettenrauch) bereits einen Effekt auf das Genexpressionsmuster der oxidativen Phosphorylierung (00020) und des Citratzyklus (00190) ausübt. Beide *Pathways* waren hoch signifikant reguliert ($p < 0,0001$) gewesen. Weiterhin war der Endozytose-*Pathway* (04144), nach 3 und 8 Monaten, in den alveolären Septen Raumluft-behandelter *Noxo1 Knockout* Mäuse signifikant reguliert gewesen. Nach 8 Monaten war dieser Signalweg zusätzlich durch den Trigger Zigarettenrauch hochsignifikant verändert gewesen. Die Microarray-Analyse pulmonaler Gefäße zeigte, dass die Kombination beider Parameter (Genotyp und Zigarettenrauch), das Genexpressionmuster der oxidativen Phosphorylierung sowie auch des Citratzyklus verändern ($p < 0,0001$). Die Interaktionsanalyse beider Parameter kann einen Hinweis auf eine mögliche Verschiebung des MAPK-*Pathways* (04010) ($p < 0,01$) (**Abbildung 40b und d**) geben. Darüber hinaus konnte in den Septenproben herausgefunden werden, dass nach 3 und 8 Monaten, die Interaktion von Genotyp und Zigarettenrauch einen veränderten TGF- β -*Pathways* induzieren konnte (04350). Weiterhin ist in **Abbildung 40a** und **c** zu sehen, dass auch Gene des *Tight-Junction-Pathways* (04530) durch eine *Noxo1*-Deletion signifikant verändert waren ($p < 0,0001$).

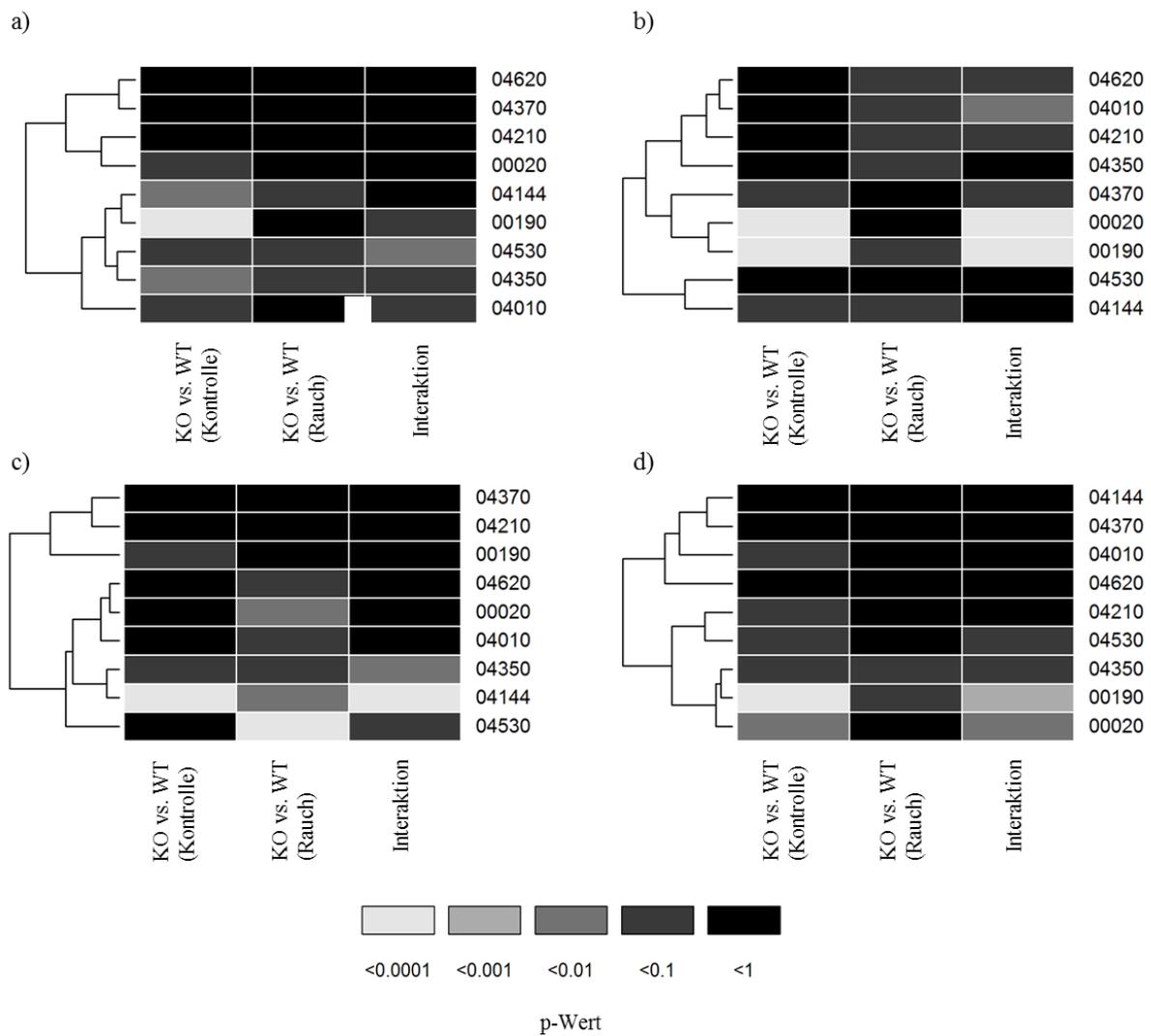


Abbildung 40: Pathway-Analysen nach 3 und 8 Monaten Zigarettenrauchexposition in den alveolären Septen und in den pulmonalen Gefäßen von WT-Mäusen und *Nox1*^{-/-}-Mäusen. Genexpressionsmuster spezifischer Pathways nach 3 Monaten a) in den Septen b) pulmonalen Gefäßen und nach 8 Monaten in c) Septen und d) pulmonalen Gefäßen. Der p-Wert ist durch Graustufen dargestellt, n = 5 Lungen pro Gruppe. KO= *Knockout* WT=Wildtyp,

Tabelle 18: Legende der KEGG Nummern und dazugehörigen Pathways

<i>Pathway</i>	KEGG Nummer
Toll-like-Rezeptor-Pathway	04620
<i>Tight-Junction-Pathway</i>	04530
VEGF-Pathway	04370
TGF-β-Pathway	04350
Apoptose	04210
<i>Endozytose-Pathway</i>	04144
MAPK-Pathway	04010
Oxidative Phosphorylierung	00190
Citratzyklus	00020

Darüber hinaus wurden die Expressionen einzelner Gene unter der Interaktion des Genotyps und Zigarettenrauch zum WT verglichen und bewertet. Die einzelnen Gene wurden in sogenannten Interaktions-Graphen dargestellt. Der Apoptose *Pathway* war nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition in den Septenproben nicht reguliert gewesen (**Abbildung 40**). Betrachtet man jedoch einzelne Gene dieses *Pathways*, so zeigte sich, dass der Expressionwert der Caspase-3 (*Casp3*) unter Kontrollbedingungen in beiden Genotypen ähnlich war (**Abbildung 41**). Nach Zigarettenrauchexposition war *Casp3* in den Septen der WT-Mäuse um den Faktor 1,7 induziert und in den Septen der *Noxol^{-/-}*-Mäusen um den Faktor 0,8 (sprich um 80 %) verringert gewesen. Eine 8-monatige Zigarettenrauchexposition führte im direkten Vergleich zu den WT-Mäusen zu einer 50 %igen Verringerung der *Casp3*-Expression in den Septen der *Noxol^{-/-}*-Mäuse (**Abbildung 41**). Das Chemokin *Ccl3*, ein Gen aus dem MAPK-*Pathway*, welches für die Rekrutierung weißer Blutzellen wichtig ist, zeigte unter Raumluftbedingungen und dem Einfluss des *Knockouts*, eine veränderte Expression. Die Expression des Gens war um den Faktor 1,9 höher als beim Wildtypen. Durch eine Zigarettenrauchexposition (3 Monate) verringerte sich die Expression vom *Ccl3* in den *Noxol^{-/-}*-Mäusen um den Faktor 0,35. In den Wildtyp-Mäusen wurde ein gegensätzliches Ergebnis beobachtet. Hier zeigte das Gen nach einer Zigarettenrauchexposition (3 Monate) eine 86 %ig erhöhte Induktion. Da inflammatorische Signalwege eine zentrale Rolle bei der COPD spielen und *Mmp12* eine wichtige Rolle bei der COPD spielt, wurde die Expression dieses Gens ebenfalls untersucht ³⁶. Neben einer veränderten Genregulierung im Lungenhomogenat (**Abbildung 38**) konnte auch in den alveolären Septen von WT-Mäusen

eine veränderte *Mmp12* Expression nachgewiesen werden. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Zigarettenrauchexposition war es im WT stärker exprimiert gewesen als bei den *Knockout*-Tieren. Unter RaumlufTEXposition war die Expression von *Mmp12* in den *Knockout* Mäusen um 13 % und nach Zigarettenrauchexposition um 25 % verringert.

Septen nach 3 Monaten Zigarettenrauchexposition

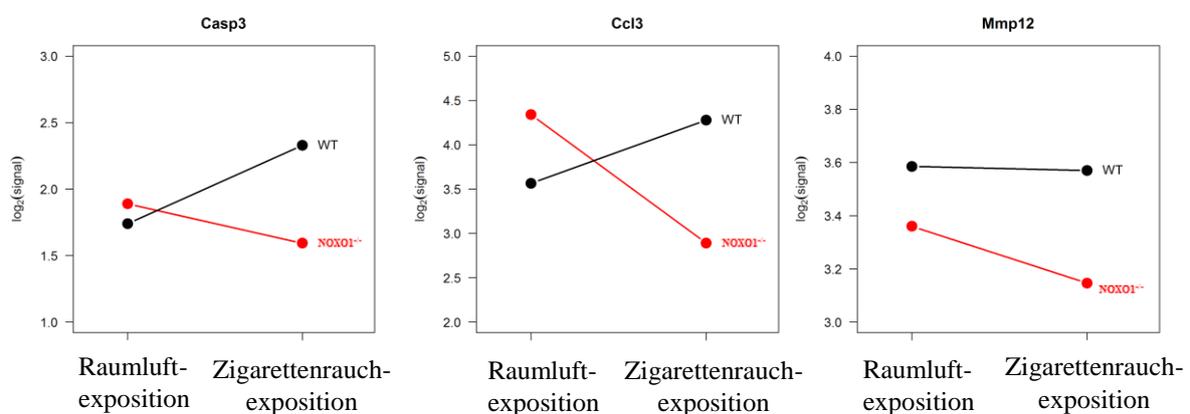


Abbildung 41: Interaktions-Plots der Microarray-Analyse in den alveolären Septen der WT- und *Nox1*^{-/-}-Mäuse. Dargestellt ist die Expression der Gene a) *Casp3* b) *Ccl3* und c) *Mmp12* nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition bzw. RaumlufTEXposition. Die Regulation (als log₂ FC) ergibt sich jeweils aus der Differenz der gezeigten Expressionswerte. (Casp3=*Caspase 3*, Ccl3=C-C Motif Chemokine Ligand 3, *Mmp12*= Matrix Metalloproteinase 12).

Die Microarray-Analyse konnte für den MAPK-Pathway kein signifikant verändertes Genexpressionsmuster nachweisen. Da jedoch bekannt ist, dass inflammatorische Prozesse und Gene des MAPK-Pathways in der COPD-Pathogenese involviert sind, wurden einzelne inflammatorischer Gene, wie *Mapk14*, *Mmp24* und *Mmp17* detaillierter untersucht. Die Microarray-Ergebnisse zeigten, dass die drei Gene in WT-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition in den pulmonalen Gefäßen hochreguliert waren (**Abbildung. 42**). *Mapk14* wurde durch nach Zigarettenrauchexposition im Wildtypen um den Faktor 1,5 induziert, in den pulmonalen Gefäßen der *Nox1* *Knockout* Mäuse wurde die Expression unter gleichen Bedingungen um den Faktor 0,57 herunterunterreguliert. Unter einer RaumlufTEXposition war die Expression von *Mapk14* im *Knockout* dagegen um einen Faktor von 1,6 stärker exprimiert als im Wildtyp. Erst nach Zigarettenrauchexposition veränderte sich die Genregulierung in beiden Genotypen in gegensätzliche Richtungen. Ein sehr ähnliches Ergebnis war für *Mmp24* sowie *Mmp17* detektierbar. Unter RaumlufTEXposition

waren beide Gene in den pulmonalen Gefäßen von *Knockout* Mäusen im Vergleich zum Wildtypen heraufreguliert und durch Zigarettenrauchexposition wurde die Genregulierung in gegensätzliche Richtungen verändert, indem es in den WT-Mäusen zur einer Geninduktion kam und in den *Noxo1 Knockout* Mäusen zu einer Herunterregulierung der Gene (**Abbildung 42**).

8 Monate Gefäße

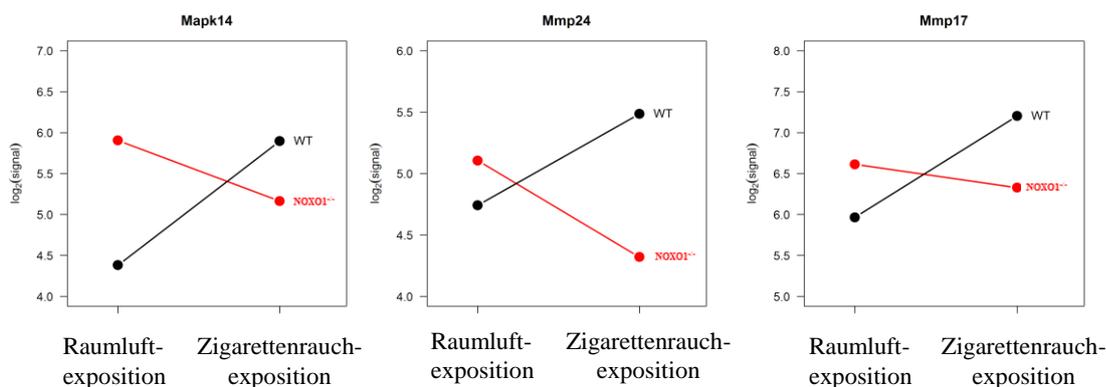


Abbildung 42: Interaktions-Plots der Microarray-Analyse in den Gefäßen der WT- und *Noxo1^{-/-}*-Mäusen. Darstellung der Expression von a) *Mapk14* b) *Mmp24* und c) *Mmp17* nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition bzw. Raumlufte-Behandlung in den pulmonalen Gefäßen. Die Regulation (als log₂ FC) ergibt sich jeweils aus der Differenz der gezeigten Expressionswerte. (*Mapk14*=Mitogen-Activated Protein Kinase 14, *Mmp24*=Matrix Metalloroteinase 24, *Mmp17*= Matrix Metalloproteinase 17).

Weiterhin konnten mit Hilfe des Microarrays neben Gen-Analysen auch Transkriptionsfaktoren-Analysen sowie auch microRNAs analysiert werden. In **Abbildung 43a** werden die Gensets der zugehörigen Transkriptionsfaktoren dargestellt und in **Abbildung 43b** die miR-Gencluster in den verschiedenen Gruppen, zu beiden Zeitpunkten und in den verschiedenen Lungenkompartimenten dargestellt. Aus den Gensets wurden mit Hilfe publizierter Literatur einige Kandidaten identifiziert, die mehr Aufschluss über die Pathomechanismen einer COPD geben könnten. In **Abbildung 43a** werden die Transkriptionsfaktoren aufgezeigt, die in Korrelation mit einer Zellproliferation stehen. *Rnf7* (*Ring Finger Protein 7*) und *Lama4* (*Laminin Subunit Alpha 4*) zeigten in den Septen und in den pulmonalen Gefäßen (nach einer 8-monatigen Zigarettenrauchexposition) eine veränderte Genexpression in den *Knockout* Mäusen. Diese beiden Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Am NFκB-Pathway ist der Transkriptionsfaktor *Hmgb1* (*High-Mobility-Group-Protein B1*) beteiligt und war in den alveolären Septen von

chronischen Zigarettenrauch-exponierten *Nox1 Knockout* verändert gewesen. **Tabelle 19** zeigt selektierte microRNAs, die in den Septen und pulmonalen Gefäßen eine veränderte Expression in Zigarettenrauch-exponierten *Nox1 Knockout* aufwiesen und mit der COPD in Korrelation stehen könnten.

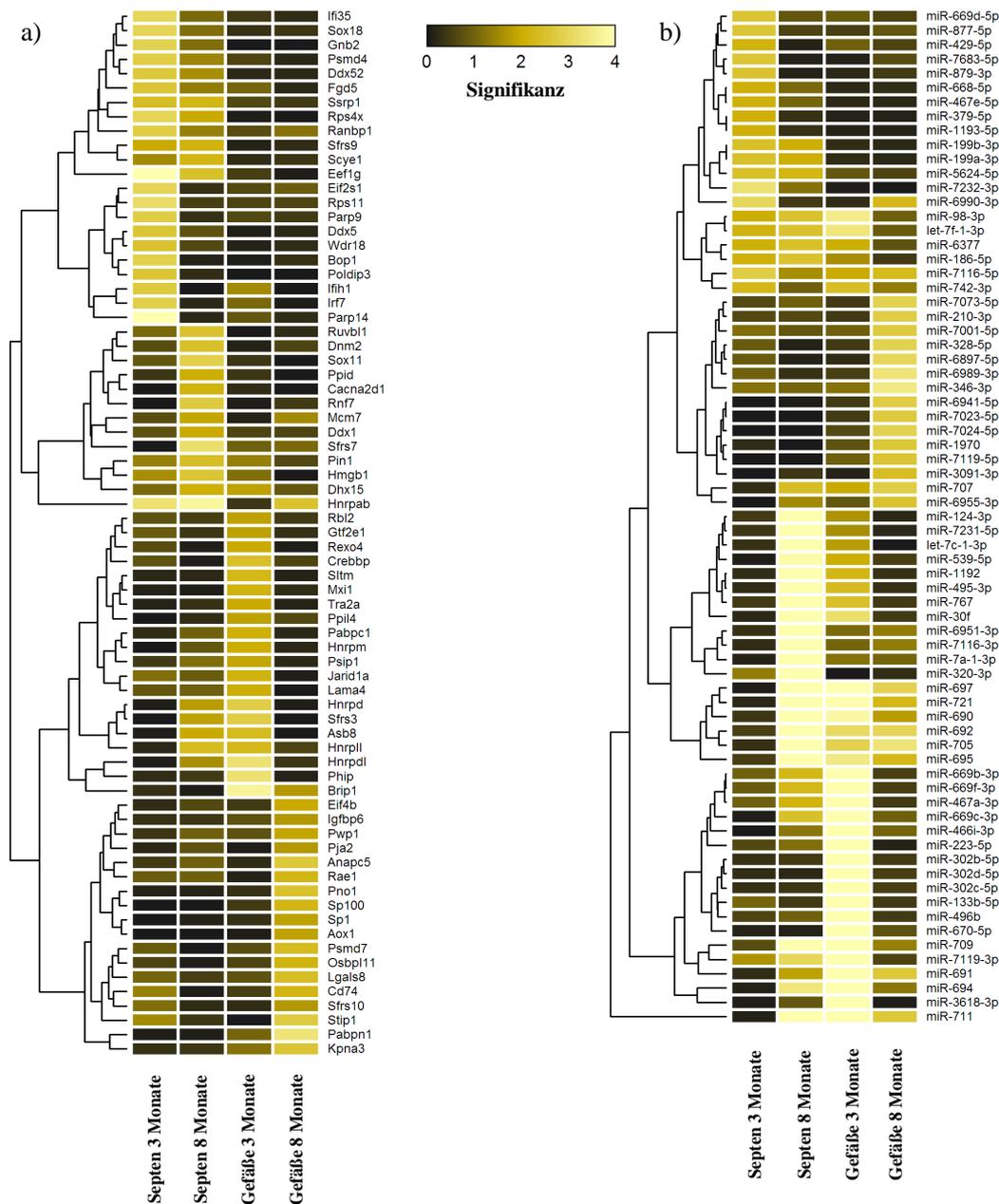


Abbildung 43: Kompartment- und zeitspezifische Transkriptom-Analyse zur Identifizierung von *Nox1*^{-/-}-abhängigen Schutzmechanismen einer Emphysem- und PH-Entwicklung. Microarray-Daten von mikrodisssektierten pulmonalen Gefäßen sowie alveolären Septen von 3- und 8-monatiger Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Nox1*^{-/-}-Mäusen. a) Transkriptionsfaktoren, Gensets mit Bindungsstellen für angegebene TF (Transkriptionsfaktoren). b) microRNAs, analysierte Gencluster mit zugehöriger miR. (je n=5), Signifikanz wird als Farbtiefe angegeben. miR= microRNA.

Tabelle 18 Transkriptionsfaktoren mit veränderter Expression in Septen und pulmonalen Gefäßen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition.

Transkriptionsfaktoren		
<i>Hmgbl</i> (<i>High-mobility-group-protein B1</i>)	Reguliert TLR4,NfκB- <i>Pathways</i>	Septen
<i>Rnf7</i> (<i>Ring finger protein 7</i>)	Zellproliferation	Septen
<i>Lama4</i> (<i>Laminin subnit alpha 4</i>)	Zellmigration	Gefäße und Septen

Tabelle 19: MicroRNAs mit veränderter Expression in den Septen und pulmonalen Gefäßen nach 8- monatiger Zigarettenrauchexposition.

Target	Funktion	Kompartiment
mircoRNAs		
<i>miR-199</i>	Involvierung bei der PH- Entwicklung	Gefäße und Septen
<i>miR-210</i>	Involvierung bei der PH- Entwicklung	Gefäße und Septen
<i>let-7-f</i>	Pro-angiogenetischer Faktor	Gefäße und Septen
<i>miR-223</i>	Zellproliferation, Migration	Gefäße

4 Diskussion

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) zählt zu den häufigsten Todesursachen weltweit und die Fallzahl ist weiterhin steigend^{354; 364}. Für die Betroffenen ist es eine große Belastung, da es bis dato nur symptomlindernde Medikamente und keine kurative Therapie gibt. Die Erforschung der molekularen Mechanismen könnte für die Behandlung einer COPD-Erkrankung und darüber hinaus für eine zukünftige Genesung dieser Erkrankung von großem Belang sein. Ein Hauptaugenmerk in der COPD-Pathogenese ist der oxidative Stress, der für das Fortstreiten der Lungen Degradation bedeutend ist¹⁵⁸. Gleichzeitig sollten auch nicht die Kardio-vaskulären Veränderungen übersehen werden, da diese bei 30-60 % der COPD-Patienten zu beobachten sind^{20; 28; 139; 168; 265}. Hierbei wird vermutet, dass NADPH-Oxidasen mögliche Hauptquellen für Superoxid sind. Ein wissenschaftlicher Zusammenhang zwischen NADPH-Oxidasen, insbesondere von der NOX1 Untereinheit, NOXO1 und COPD wurde bisher nicht untersucht. Es ist jedoch allgemein bekannt, dass NADPH-Oxidasen Hauptquellen von ROS, speziell vom Superoxid, sind^{41; 99; 359}. Gebildete ROS, wie z.B. das Superoxid (O_2^{\bullet}), sind unter physiologischen Bedingungen in den mononukleären und granulatzytären Leukozyten an der Immunabwehr von Pathogenen beteiligt und demnach für die Immunabwehr bei mikrobiellen Infektionen notwendig¹¹⁹. Zudem regulieren sie wichtige *Signal-Pathways* wie z.B. die Proliferation und die Apoptose^{99; 325}. Kommt es zu einem Überschuss von ROS, spricht man vom oxidativem Stress, der laut Literatur durch eine übermäßige Produktion, vor allem Superoxid, gekennzeichnet ist¹¹¹. Oxidativer Stress kann den Beginn sowie auch die Progression verschiedener Krankheiten, wie z.B. der COPD beeinflussen. Quellen von ROS sind beispielsweise die beiden Enzymkomplexe in den Mitochondrien, die NADH-Dehydrogenase und die Cytochrom-c-Reduktase, die ROS als Nebenprodukte während der Zellatmung produzieren. Weiterhin sind es Xanthinoxidasen und vor allem die NADPH-Oxidasen, die sogenannten NOX-Enzyme, die aus sieben Mitgliedern bestehen^{54;334} und seit einigen Jahren immer öfter mit der COPD-Pathogenese assoziiert werden. Basierend auf Vorergebnissen³³¹ war Ziel dieser Arbeit gewesen, die Rolle des NOX-Organisators ,NOXO1, bei der Emphysem- und der pulmonalen Hypertonie-Entstehung nach 3- und 8-monatiger Zigarettenrauchexposition in Mäusen zu untersuchen. Die erzielten Ergebnisse könnten neue Einblicke in das Verständnis der COPD-Pathogenese liefern.

4.1 Das Modell des Zigarettenrauch-induzierten Emphysems

Bekannterweise wird COPD durch Rauchen ausgelöst und könnte nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahr 2030 die dritthäufigste Todesursache weltweit sein ¹⁶⁴. In dieser Doktorarbeit wurde mit Hilfe eines Modells, dem Zigarettenrauch-induzierten Lungenemphysem an Mäusen, die Pathogenese dieser Krankheit untersucht. Bei diesem Modell wurden Mäuse (Wildtypen und *NoxoI^{-/-}*) in einer speziell entwickelten Zigarettenrauchkammer für 6 Stunden am Tag und an 5 Tagen pro Woche einer Zigarettenrauch-Partikelkonzentration von 140 mg/m³ ausgesetzt. Die zuvor genannte Partikelkonzentration wurde bereits in einigen Studien mit Mäusen erfolgreich verwendet ³³². In der Regel werden in diesem Modell standardisierte Zigaretten (Kentucky 3R4F) genutzt, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien zu gewährleisten. Interessanterweise entwickeln die Tiere nach einer 3-monatigen Zigarettenrauchexposition ein *Remodeling* (Gefäßumbau) der pulmonalen Gefäße. Zudem weisen sie einen erhöhten rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP) auf. Erst nach 8 Monaten einer chronischen Zigarettenrauchexposition können emphysematöse Veränderungen durch histologisch quantifizierte Parameter, wie z.B. des Gesamtluftraumes, der Septendicke und des *Mean Linear Intercept* nachgewiesen werden. Weiterhin zeigen die funktionellen Messungen eine Erhöhung der Lungen-Compliance. Derartige Veränderungen wurden auch in COPD-Patienten beobachtet ^{241; 360}. Mit dem Modell der chronischen Zigarettenrauchexposition können demzufolge der Zeitverlauf, mit dem sich ein Emphysem und eine PH entwickeln, untersucht werden, was neue Erkenntnisse in der Forschung der COPD-Pathogenese erbringen kann. Die Wahl dieses Modells ermöglicht es, kurative- sowie präventive Therapieansätze mit Pharmaka oder Substanzen durchzuführen, die für zukünftige COPD-Therapien von Bedeutung sein könnten ³³². In der Literatur werden neben Mäusen auch Meerschweinchen, Kaninchen, Ratten sowie Hunde für chronische Zigarettenrauchexpositionen genutzt, jedoch zeigte sich, dass Meerschweinchen sehr empfindlich auf die Zigarettenrauchexposition reagieren und Ratten im Gegenzug dazu eine hohe Toleranzschwelle bezüglich dem Zigarettenrauch aufweisen ^{239; 404}. Meerschweinchen entwickeln bereits nach einigen wenigen Monaten chronischer Zigarettenrauchexposition Läsionen sowie ein Emphysem in der Lunge ^{122; 134 406}. In Ratten sind dagegen nach chronischer Zigarettenrauchexposition (bis zu 13 Monaten) auf histologischer Ebene keine signifikanten morphologischen Lungenveränderungen zu messen, zudem reagieren Ratten mit einer abgeschwächten inflammatorischen Antwort auf Zigarettenrauch ¹⁴⁰. Der Vorteil der Maus ist, dass ihr Genom vollständig sequenziert ist, sie gut auf eine chronische

Zigarettenrauchexposition reagiert, leicht zu halten ist und zudem kann eine 8-monatige Zigarettenrauchexposition bei Mäusen sehr gut mit der zeitlichen Lebensspanne eines jahrelangen Rauchers verglichen werden, da die Labormaus etwa 2 Jahre alt wird ¹⁶³. Das in dieser Arbeit verwendete chronische Zigarettenrauchexpositionsmodell von bis zu 8 Monaten und die durch den Zigarettenrauch-induzierten pathologischen Veränderungen in den Mäusen sind gut mit der Pathologie von Langzeitrauchern, die an COPD erkrankt sind und zusätzlich eine pulmonale Hypertonie entwickelt haben, zu vergleichen ⁴⁰⁶. Natürlich kann mit diesem chronischen Zigarettenrauchexpositionsmodell nicht die vollständige COPD-Pathogenese erforscht werden. Neben dem Emphysem und der pulmonalen Hypertonie leiden COPD-Patienten an einem chronischen Husten, einem Auswurf und einer Atemwegsobstruktion, die mit diesem Modell nicht nachgestellt werden können ^{121; 246}. Zudem wird bei der COPD von einer multifaktoriellen Erkrankung gesprochen, die nicht nur durch den Trigger des Zigarettenrauchs, sondern auch durch weitere Umweltfaktoren und genetische Noxen ausgelöst werden kann ²⁴⁴. Studien konnten bereits zeigen, dass neben dem Rauchen auch hohe Kraftstoff- und Abgasebelastungen in Industrieländern wie z.B. China oder Indien als auch die Luftverschmutzung durch das Kochen im Haushalt mit festen Brennstoffen wie z.B. Kohle oder mit Biomassen, Risikofaktoren für eine COPD sind ^{79; 81; 219; 229}. In der Einleitung wurde bereits erläutert, dass Zigarettenrauch mehrere tausend verschiedenen Komponenten enthält ⁴⁰². In der Gasphase sind neben Carbonyl-Komponenten auch Ammonium und Kohlenwasserstoffe zu finden und in der partikelförmigen Phase sind es Ammoniak, Nitrosamine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe ^{127; 402}. Einige dieser Komponenten sind ebenfalls bei der Verbrennung von Kraftstoffe zu finden und auch in den Innenraumabgasen, die durch das Kochen im Haushalt produziert werden ^{81; 229}. Zu den erzeugten Schadstoffen gehören beispielsweise Kohlenmonoxid, Kohlenstoffdioxid, Ammoniak, organische Verbindungen und auch Stickoxide. Demzufolge gibt es durchaus Parallelen zwischen der Zigarettenrauch-induzierten COPD und der durch Luftverschmutzung-verursachten COPD. Das Modell des Zigarettenrauch-induzierten Emphysems bietet eine evidenzbasierende Grundlage zur Untersuchung der Pathophysiologie einer COPD. In diesem Modell wird primär der Zigarettenrauch als Auslöser für die Entwicklung eines Emphysems sowie einer PH verwendet, sodass die Entwicklung eines emphysematösen Endstadiums sowie eines pulmonalen Gefäßumbaus beobachtet werden kann. Bei der Wahl dieses Modells ist jedoch wichtig, dass adulte Mäuse mit abgeschlossener Alveolarisierung verwendet werden, um somit eine Vergleichbarkeit mit der humanen Pathophysiologie einer COPD zu gewährleisten. Bei Mäusen ist die Alveolarisierung nach 3

Wochen abgeschlossen. Der Schweregrad der COPD wird bei Menschen in verschiedene Stadien unterteilt (GOLDI-IV), wobei GOLD-IV eine sehr schwere Form der COPD ist. Bei Mäusen kann das COPD GOLD-IV Stadium nicht erreicht werden. Eine chronische Zigarettenrauchexposition von 8 Monaten führt bei Mäusen zu einem milden Emphysem, das sich mit dem GOLD-II-Stadium von COPD-Patienten vergleichen lässt^{88; 121}. Die Induktion dieses milden Emphysems konnte bereits von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Weißmann nachgewiesen werden³³². Letzen Endes bietet das Langzeit-Zigarettenrauchexpositionsmodell in Mäusen die Möglichkeit eine sequenzielle Lungenfunktionsanalyse sowie eine Untersuchung der Alveolenstruktur als auch die Analyse der pulmonalen Gefäße durchzuführen.

4.2 Ein *Noxo1* Knockout schützt Mäuse vor einem Zigarettenrauch-induziertem Emphysem und einer pulmonalen Hypertonie

Nach einer 8-monatigen Zigarettenrauchexposition wurden die emphysematösen Veränderungen in der Lunge durch die histopathologischen Untersuchungen sowie durch die Ermittlung der Lungenfunktion, sichtbar^{154; 155}. Das Lungengewebe der WT-Mäuse wies nach chronischer Zigarettenrauchexposition neben der Abnahme der Alveolarwanddicke auch einen vergrößerten Luftraum (auch unter der Bezeichnung „*Airspace*“ bekannt) auf. Die Veränderungen dieser beiden Parameter lassen auf einen Alveolenverlust bzw. Gewebeverlust in der Lunge schließen, wodurch auch die Elastizität der Lunge beeinträchtigt ist und sich dies durch den gemessenen funktionellen Parameter „dynamische *Compliance*“ bestätigen ließ. In früheren Studien wurden die genannten Lungenparameter bereits zur Analyse und Bewertung von Lungenveränderungen nach chronischer Zigarettenrauchexposition verwendet^{50; 332}. Die erhöhten *Compliance*-Werte, die bei WT-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition (dynamische *Compliance*) erfasst wurden, spiegeln den Verlust der Elastizität der Lunge wieder, welche durch den Abbau der elastischen Fasern sowie durch die Degradierung der extrazellulären Matrix im Lungengewebe gekennzeichnet ist. Die entstehenden Lufträume in den Lungen dehnen sich mit jedem Atemzug aus und können sich bei einem Verlust der alveolären Oberflächenspannung während einer Expiration nicht mehr zusammenziehen. Dadurch bleibt die Atemluft in der Lunge eingeschlossen (das sogenannte *air trapping*), sodass es folglich zu einer Hyperinflation der Lunge kommt^{155; 408}. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Lungenfunktionsmesswerte, speziell für den Parameter der dynamischen *Compliance*, in den *Noxo1*-deletierten Mäusen nach 8-monatiger

Zigarettenrauchexposition signifikant niedriger waren als in den WT-Mäusen nach chronischer Zigarettenrauchexposition. Somit ist eine Hyperinflation der Lunge sowie das *air trapping* bei den *Noxol Knockout* Mäusen nicht aufgetreten. Das Nichtauftreten eines Lungenemphysems in den *Noxol Knockout* Mäusen konnte durch morphometrische Analysen, wie z.B. durch die Erfassung des prozentualen Gesamtluftraums in den Alveolen (*Airspace*), der Septendicke sowie dem mittleren Abstand zwischen den Alveolarsepten (*Mean Linear Intercept*, MLI) gestützt werden. Alle drei Parameter entsprachen dem Niveau der Raumluf-behandelten Kontrolltiere, was für keine Entwicklung eines Emphysems spricht. Auf der anderen Seite hat die Septendicke bei den WT-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition signifikant abgenommen im Vergleich zu den nicht Zigarettenrauch-behandelten Mäusen. Ähnliche Veränderung, die in dieser Arbeit in WT-Mäusen gemessen wurden, konnten bereits in einer früheren Studie der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Weißmann beobachtet werden ³³². Durch eine Design-basierte stereologische Analyse konnte eine Alveolenquantifizierung in allen Gruppen durchgeführt werden. Die Anzahl der Alveolen nahm nach Zigarettenrauchexposition in den WT-Mäusen signifikant ab, jedoch nicht in der Gruppe der Zigarettenrauch-exponierten *Noxol*^{-/-}-Mäuse. Die Ergebnisse der Stereologie unterstützen die Beobachtungen aus den Lungenfunktionsmessungen sowie auch die histologischen Auswertungen. Aus den zuvor genannten Ergebnissen ist deutlich zu erkennen, dass ein *Noxol Knockout* die Mäuse vor einem Emphysem nach Zigarettenrauchexposition schützen konnte. Der protektive Effekt vor einer Emphysementwicklung durch eine *Noxol*-Deletion könnte durch veränderte *Signaling-Pathways* in den Mäusen erklärt werden. NOXO1 triggert die Aktivierung des *Mitogen-Activated-Protein-Signalwegs* (MAP-Kinase), dessen Kaskaden die Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose steuern ^{73; 177}. MAP-Kinasen können zusätzlich über Wachstumsfaktoren wie Zytokine und TGF- β sowie zellulären Stress induziert werden. Dies kann zu einer erhöhten Zellantwort in Form von einer erhöhten Apoptose und Inflammation führen, zweier Prozesse, die in Verbindung mit einer Emphysementwicklung stehen. Die Apoptose der ATII-Zellen wurde in erster Linie untersucht, denn durch deren Verlust wird die Emphysementwicklung verstärkt ³⁴. Die Durchführung von Microarray-Analysen konnte zeigen, dass der MAP-Kinase-Signalweg vor allem in den mikrodissektierten Gefäßen von über 8 Monaten Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen verändert war. Hier ist die MAPK14 zu nennen, die in den pulmonalen Gefäßen von WT-Mäusen unter Raumlufexposition hochreguliert war und durch Zigarettenrauch signifikant induziert wurde. MAPK14 ist ein Enzym, das durchaus mit COPD in Korrelation steht. Eine Studie von Hou et

al., konnte in ihrem Tiermodell zeigen, dass die Aktivierung des MAPK14-Signalwegs eine verstärkte Autophagozytose auslöst, die wiederum zu einer erhöhten Apoptose-Aktivität im Lungenepithel führt und dies letztendlich eine Emphyseentwicklung fördert ¹⁶⁰. Dieser Mechanismus könnte die bestehende lungenepitheliale Apoptose sowie die Inflammation der Atemwege in COPD-Patienten erklären. Wie einige Studien gezeigt haben, leiden 5 bis 10 % aller COPD-Patienten unter einer schweren pulmonalen Hypertonie. ^{20; 28; 168; 398}. Bei Patienten mit einer moderaten COPD, die zudem noch unter einer PH leiden, können morphologische Veränderungen in der *Intima* der pulmonalarteriellen Gefäße beobachtet werden. Man vermutet, dass die Veränderungen der *Intima* durch eine erhöhte Proliferation der *Smooth Muscle Cells* und durch eine Kollagen Desposition entstehen ³²¹. Diese Arbeit konnte eine vaskuläre Umgestaltung der Lungengefäße nach einer 8-monatigen Zigarettenrauchexposition bei WT-Mäusen, jedoch nicht in *Nox1 Knockout* Mäusen, nachweisen. Durch die hämodynamisch erfassten Parameter, wie z.B. dem RVSP, wurde eine PH bei den Mäusen nachgewiesen. In den *Knockout* Mäusen trat jedoch kein signifikant erhöhter RVSP nach 3- sowie nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition auf. Die Vermutung liegt nahe, dass ein *Nox1 Knockout* nicht nur eine schützende Wirkung auf das Lungenparenchym hat, sondern gleichzeitig auch die Mäuse vor pulmonalvaskulären Veränderung (*Remodeling*) schützt. Eine Erklärung dafür könnte eine verminderte Superoxid-Produktion in den alveolären ATII-Zellen von *Nox1^{-/-}*-Mäusen liefern. Aus der Literatur ist bekannt, dass übermäßiger oxidativer Stress zur Lungenparenchymdegradierung und zur Induktion inflammatorischer Prozesse führt, was eine mögliche Erklärung für den Gefäßumbau in der Lunge sein könnte ¹⁰³. Weiterhin ist bekannt, dass aktivierte Entzündungsprozesse, welche durch Zigarettenrauch induziert werden, zur Einwanderung von inflammatorischen Zellen in der Lunge führen ^{13; 315}. Dies führt zur Ausschüttung von Signalmolekülen und folglich kann dies zu einer erhöhten oxidativen sowie nitrosativen Stressantwort führen ³⁰⁸. Nicht nur oxidativer Stress sondern auch MMPs sind aktiv am Gefäßumbau beteiligt ^{158; 375; 367}. Interessanterweise zeigten die Microarray-Daten in den Gefäßen von über 8 Monate Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen, dass MMP17, eine Matrixmetalloproteinase die an der *Vascular Smooth Muscle Cell* (VSCM)-Reifung sowie für die arterielle Gefäßwandfunktion wichtig ist, signifikant hochreguliert war ²⁵¹. Eine weitere Matrixmetalloproteinase, MMP24, wurde in einer aktuellen Studie als ein potentieller Tumormarker für gastrale Krebsarten beschrieben ¹⁰⁰. Es ist nicht auszuschließen, dass neben MMP12 auch das MMP24 eine wichtige Funktion in der Lunge ausüben könnte, da unterschiedliche Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zell-Adhäsionsmoleküle

sowie Tyrosin-Kinase-Rezeptoren durch MMP24 modifizieren werden können ¹¹⁷. Durch die MMPs-induzierte Signalwege könnten auch der Endozytose- und *Tight-Junction-Pathway* verändert werden. Die Microarray-Analysen der alveolären Septen und der Gefäße von über 8 Monaten Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Nox1*^{-/-}-Mäusen wiesen unterschiedliche Expressionsmuster dieser genannten Signalwege nach. Man kann vermuten, dass durch eine *Nox1*-Deletion MMP-induzierte Signalwege, die eine Emphysem und PH-Entwicklung fördern, verhindert werden und die *Nox1*^{-/-}-Mäuse kein Emphysem noch eine PH entwickeln.

Ein möglicher Schutzmechanismus, der durch eine *Nox1*-Deletion induziert wird, ist eine Hypoinflammation in den pulmonalen Gefäßen sowie im auch den alveolaren Epithelzellen. Yao et al. postulierten, dass in p47^{phox} *Knockout* und gp91^{phox} *Knockout* Mäusen die NADPH-Oxidasen eine zentrale Rolle zur Erhaltung der Lungenintegrität spielen ⁴¹⁶. Ein weiterer Erklärungsansatz, der den Schutz einer Emphysementwicklung und PH-Entwicklung in *Nox1* *Knockout* Mäusen erklären könnte, ist der *Toll-like*-Rezeptor Signalweg. Diese Rezeptorgruppe wurde in der Vergangenheit mit einer Vielzahl Lungen-assoziiierter Immunantworten sowie deren Pathophysiologie in Verbindung gebracht ^{11; 38}. Erst kürzlich wurde von Wissenschaftlern gezeigt, dass eine TLR4-Deletion bei Mäusen spontan zu einer Emphysementwicklung führt, was mit einem erhöhtem oxidativem Stress, Zelltod und einer Elastindegredierung assoziiert wurde ^{11; 429}. Diese in der Literatur gefundenen Resultate stimmen mit den TLR4-Daten dieser Doktorarbeit überein. So konnte eine erhöhte *Tlr4*-Genexpression in murinen ATII-Zellen von *Nox1*^{-/-}-Mäusen unter basalen sowie nach einer akuten CSE-Behandlung nachgewiesen werden, weshalb TLR4 eine schützende Funktion auf eine durch Zigarettenrauch-induzierte Inflammation sowie eine Lungendegradierung ausüben könnte. Es wird vermutet, dass TLR4 einen Sensor für Zigarettenrauchbestandteile haben könnte, darunter Oxidantien oder Aldehyde, die den NF-κB-Signalweg regulieren, der wiederum für inflammatorische, proliferatorische- sowie apoptotische Prozesse bedeutend sein könnte ¹¹.

4.3 Aufklärung des NOXO1 Signalweges in der Emphysem- und der PH-Entwicklung nach chronischer Zigarettenrauchexposition

4.3.1 Downstream-assoziierte NOXO1-Signalwege

Der NOX1-Organisator, NOXO1 sowie der Aktivator (NOXA1) sind für die Superoxid-produzierende NADPH-Oxidase NOX1 essentielle regulatorische Einheiten¹⁰¹. Das Fehlen der autoinhibitorischen Region führt zu einer konstitutiven Aktivität von NOX1, die ein Komplex aus p22^{phox}, NOXO1 und NOXA1 bildet^{25; 101; 134; 135; 414}. Beim Vergleich der beiden NOX-Enzyme, NOX1 und NOX2, werden die mechanistischen Unterschiede und die besondere Eigenschaft des NOXO1-Proteins deutlich. NOXO1 wird beispielsweise durch verschiedene Agonisten, wie dem *Epidermal Growth Factor* (EGF) etwas stärker aktiviert¹⁷⁴. Erst kürzlich wurde von Joo und Kollegen ein NOXO1-ubiquitinierungsabhängiger Mechanismus entdeckt, bei dem eine Proteasom-basierende Degradation von NOXO1 die Integrität und die Aktivität des NOX1-NOXA1-NOXO1-Komplexes reguliert¹⁷⁴. Wird durch den NOXO1-NOX1-Komplex ein Überschuss an Superoxid gebildet, werden wichtige Zellsignalwege wie z.B. die Proliferation, die Apoptose und das Zellwachstum beeinflusst^{47; 84}. Ein Schutz vor einer Degradation in den vaskulären- sowie alveolären Lungenstrukturen, bedingt durch eine *Noxo1*-Deletion, könnte mit proinflammatorischen Zytokinen, wie dem TNF α und der *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL) in Verbindung gebracht werden. Diese beiden Zytokine können beispielweise die NOX1- und NOXO1-Expression in verschiedenen Tumorzellen induzieren, was jedoch bei einer *Noxo1*-Deletion nicht der Fall sein könnte. Sowohl in dieser Arbeit als auch in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine chronische Zigarettenrauchexposition zur Vergrößerung des rechten Ventrikels in Relation zum linken Ventrikel plus Septum führt, begleitend mit einer erhöhten hämodynamischen Messung, die sich mit dem RVSP bestätigen lässt³³². Obwohl der RVSP bereits nach 3 Monaten Zigarettenrauchexposition in den WT-Mäusen erhöht war, könnte die Vergrößerung des rechten Ventrikels nicht nur als Folge eines erhöhten RVSP sein, sondern von einem Zigarettenrauch-spezifisch getriggerten Signalweg abhängig sein. Diese Vermutung muss in weiteren Studien näher untersucht werden. Im pulmonalen Gefäßsystem ist NOXO1 ein essenzieller Aktivator von NOX1, daher sollten alle NOXO1-abhängigen Funktionen analog zu denen von NOX1 sein. Man weiß, dass durch NOX1 eine Angiotensin II-induzierte Hypertonie sowie eine damit einhergehende endotheliale Dysfunktion gesteuert wird²⁵⁶. Zudem ist bekannt, dass NOX2 am Kardialen-Remodeling beteiligt ist und die

Hypertonie der Kardiomyozyten in *Nox2*^{-/-}-Mäusen reduziert ist ²²⁶. NOXO1 kann neben NOX1 und NOX3 ebenfalls die Aktivierung von NOX2 vereinfachen, was jedoch weniger effektiv ist als die Aktivierung durch die Untereinheit p47^{phox} ³⁷⁰. Ferner ist bekannt, dass beim vaskulären Umbauprozess die NADPH-Oxidasen, NOX1 und NOX2, eine Rolle spielen können und möglicherweise sind sie bei der Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie beteiligt, wie z.B. bei der Involierung von Organschädigungsprozessen oder sie üben Einfluss auf Änderungen des Blutdrucks aus ^{118; 176; 226; 256}. Der MAPK-Pathway ist ein wichtiger redox-sensitiver Signalweg und ist bekannt dafür bei vaskulären Erkrankungen involviert zu sein. Durch NADPH-Oxidasen kann eine Hochregulierung des *Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun NH(2)-Terminal Kinase* (SAPK/JNK)-Pathway induziert werden, der die Hyperplasie sowie die Hypertrophie des rechten Ventrikels fördert ^{177; 342}. Dieser veränderte Mechanismus könnte durch die Deletion des NOXO1 bei den *Knockout*-Mäusen nach Rauchexposition aktiviert sein und die Mäuse dadurch vor einer PH schützen. NOX1 und daraus folgend der NOXO1-NOX1-Komplex scheint nicht nur an den pathophysiologischen Prozessen vaskulärer Erkrankungen involviert zu sein, sondern auch in der Diabetes-Pathophysiologie oder der Atherosklerose ^{355; 420}. Bei der Diabetes-Pathophysiologie soll es an der endothelialen Dysfunktion dieser Erkrankung beteiligt sein ⁴²⁰. Studien-Analysen der Arteriosklerose Pathophysiologie zeigten, dass NOX1-abhängiges produziertes ROS für die entstehenden Läsionen in murinen Arteriosklerose-Modellen verantwortlich ist. Die Studie von Siu und Kollegen zeigte, dass NOXO1 durch oszillierenden Scherrstress, OSS (*Oscillatory Shear Stress*), stark hochreguliert wurde und dies weiterführend einen Einfluss für das Auftreten der erhöhten ROS gewesen sein konnte ³⁵⁵. Zudem konnte die Studie von Siu und Kollegen zeigen, dass der durch OSS-aktivierte NOX1-NOXO1 Komplex zu einer eNOS-Entkopplung führt, sodass die oxidative Reaktion verstärkt wurde und der oxidative Stress aufgrund der vermehrten Superoxidproduktion erhöht war. Dies führt zu einer Reduzierung der NO-Produktion in den pulmonalen Gefäßen sowie zu einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit ³⁵⁵.

4.3.2 Upstream-assoziierte NOXO1-Signalwege

Neben seiner wichtigen Funktion als regulatorische Untereinheit von NOX1 könnten die verschiedenen Splice-Varianten, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten verteilt sind, einen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren sowie auf microRNAs ausüben. Aus Studien weiß man, dass NOX1 und sein akzessorisches Protein,

das NOXO1, auf transkriptioneller Ebene gesteuert werden können, sodass dadurch NOXO1 überexprimiert wird und mehr Superoxid gebildet werden kann^{200; 287}. Die Studie von Joo et al. konnte dies bei 70 % der untersuchten Kolonkrebspatienten bestätigen¹⁷⁴. Man kann spekulieren, dass ähnliche transkriptionelle Effekte auf die vaskulären und alveolären Umstrukturierungen in der Lunge nach einer Zigarettenrauchexposition in den Mäusen zutreffen könnten. Daher war es von großer Wichtigkeit gewesen *Upstream*-Mechanismen zu untersuchen. Mittels Microarray-Analysen konnten Veränderungen in verschiedener Signalwege identifiziert werden wie z.B Proliferation, Apoptose, Inflammation sowie auch Reparations/Integretations/Regenerations- abhängige Signalwege, die Zeit- sowie Kompartimentspezifisch in den *Noxo1 Knockout* Mäusen verändert waren. Wie genau diese Transkriptionsfaktoren oder microRNAs durch die verschiedenen NOXO1 Splice-Varianten beeinflusst werden, muss in weiteren Untersuchungen erforscht werden. Die Mircoarray-Analyse konnte beispielsweise zeigen, dass durch eine *Noxo1*-Deletion ein signifikant verändertes Expressionsmuster des Lipidstoffwechsels, der Glykolyse und des Citratzyklus unter Raumluftexposition induziert wurde. Die Ergebnisse aus der Microarray-Analyse lassen vermuten, dass die Mäuse durch den *Knockout* ein verbesserten oder effizienteren Metabolismus besitzen, sowie über ein stärkeres Immunsystem verfügen und auf den den Trigger „Zigarettenrauch“ mit einer verminderten inflammatorischen Antwort reagieren und somit vor einer PH-Entwicklung und einem Emphysem nach Zigarettenrauchexposition geschützt sein könnten. Da MicroRNAs immer mehr Bedeutung bezüglich ihrer Rolle bei vaskulären Veränderungen bekommen⁶⁵, wurden einige MicroRNAs auch in dieser Arbeit näher beleuchtet. Die *miR-199* sowie die *miR-210* sind bekannt für ihre Beteiligung an der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH)^{362; 400} und ihre Expressionen waren in den alveolären Septen sowie den pulmonalen Gefäßen von *Noxo1^{-/-}*-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant verändert gewesen. Weiterhin zeigten die beiden mircoRNAs *Let-7-f* und *miR-199* in den pulmonalen Gefäßen- sowie in den Septen der *Knockout* Mäuse ein signifikant verändertes Expressionsmuster. Die beiden microRNAs sind als pro-angiogenetische Faktoren bekannt^{65; 364}. Eine veränderte Expression von *Let-7-f* wird mit kardiovaskulären- sowie herz-fibrotischen Veränderungen, Arteriosklerose und einer Herzhypertrophie in Verbindung gebracht, zudem soll TLR4 sogar ein Targets sein²⁷. Diese publizierten Ergebnisse lassen vermuten, dass NOXO1 im Zusammenhang mit verschiedenen komplexen Signalmechanismen bzw. Signalkaskaden steht, die bis dato noch nicht im Detail untersucht wurden. Ein weiteres interessantes Target der Microarray-Analyse war die microRNA, *miR-223*. Diese zeigte eine hoch signifikante veränderte Expression in den

pulmonalen Gefäßen der *Nox1 Knockout* Mäuse. Diese microRNA soll in der Lage sein, die Zellproliferation, die Zellmigration sowie die Faserformationen zu inhibieren ⁴²². Eine *in vivo* Studie zeigte, dass eine *miR-223*-Administration in Ratten mit einem erhöhten pulmonalen-arteriellen Druck (durch Hypoxie-induziert) gemindert werden konnte ⁴²⁷. Eine andere Studie, in der durch Monokrotalin die PH in Ratten induziert wurde, konnte durch die Zugabe synthetischer *miR-223*-Moleküle die PH positiv beeinflussen. Der Gefäßumbau der pulmonalen Gefäße sowie auch der erhöhte RVSP konnte verbessert werden ²⁶¹. Weiterhin konnte eine Studie zeigen, dass *miR-223* eine wichtige Funktion in den emphysematösen Bereichen der COPD-Lungen besitzt. Studien konnten zeigen, dass die *miR-223*-Expression in Lungenbiopsien von COPD-Patienten und insbesondere in den Makrophagen signifikant hochreguliert war ³¹³. Zudem war die *miR-223* Expression bei Zigarettenrauchern mit und ohne Obstruktion stark beeinträchtigt ²⁸². Zusammengefasst kann man vermuten, dass NOXO1 mit den *miR-223-Pathways* im Zusammenhang stehen und durch das Fehlen von NOXO1 in den Mäusen Gefäßprotektive *miR-223*-spezifische Mechanismen induziert werden könnten. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnte eine verminderte inflammatorische Antwort bei den *Nox1 Knockout* Mäusen nach Zigarettenrauchexposition zeigen. Es könnte sein, dass eine veränderte Expression der *miR-709* hierbei eine Rolle spielt, da dieses Target für die Modulation inflammatorischer Antworten bekannt ist ²²⁴. In einer Studie führte die Überexpression von *miR-709* in murinen Makrophagen-Zellen (RAW264.7-Zellen) zu einer reduzierten Zytokine-Produktion (IL-6, TNF α , IL-1 β) nach Behandlung mit LPS ²²⁴. Auch in dieser Arbeit zeigte diese microRNA ein signifikant verändertes Expressionsmuster in den alveolären Septen- sowie den pulmonalen Gefäßen der *Knockout* Mäuse. Bei Betrachtung der Transkriptionsfaktoren-Ergebnisse, gibt es einige Targets, die eine Erklärung des in dieser Arbeit vorkommenden *Nox1 Knockout* Phänotypen geben könnten. Ein Beispiel ist das *High-Mobility-Group-Protein B1 (Hmgb1)*, ein Transkriptionsfaktor (TF), der die *Tlr4*-Expression beeinflussen kann ¹⁸⁹. Damit kann weiterhin die Makrophagen-Ausschüttung sowie die inflammatorische Antwort, die MAPK-Kinase Aktivität und auch der NF κ B-Signalweg beeinflusst werden. Zudem kann das *Hmgb1* die Stammzellenmigration beeinflussen und Regenerations-Reparations-Mechanismen induzieren ¹⁸⁹. Darüber hinaus war das Ergebnis des TFs *Rnf7 (RING-box Protein 2)* auffällig gewesen, da es ein signifikant verändertes Expressionsmuster in den Septen und in den pulmonalen Gefäßen der *Nox1 Knockout* Mäuse aufwies. *Rnf7* interagiert mit dem Proliferationsmarker PCNA und kann zudem die Reparatur der DNA induzieren ⁹³. Durch die Transkriptom-Analysen konnten ganz neue Einblicke in die NOXO1-abhängige *Upstream* Mechanismen geliefert werden und vor

allem neue mögliche mechanistische Erklärungsansätze, die den protektiven Effekt einer *Nox1*^{-/-}-abhängigen Emphyseentwicklung und einer PH nach Zigarettenrauchexposition diskutiert werden. Weiterhin ist bekannt, dass in *Vascular Smooth Muscle Cells* (VSMCs) NOX1 durch Wachstumsfaktoren sowie durch vasoaktive Agenzien die Aktivierung von spezifischen Promotern hochregulieren kann ¹⁹. Der AP-1 Promoter führt über PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), EGFR, PI3K, ATF-1, MEF2B und ERK1/2 zu einer NOX1-Hochregulierung ^{70; 205}. Einer Studie nach führt eine *Nox1* mRNA Hochregulierung in Serumproben zu einer verstärkten Proliferation sowie Migration ²¹⁴. Durch eine *Nox1*-Deletion kann ein gegensätzlicher Effekt induziert werden, indem es zu einem verminderten Proliferation- sowie Migrationsverhalten in SMCs kommt. In **Abschnitt 4.6** wird das in dieser Arbeit beobachtete verringerte Proliferationsverhalten in murinen PASMC von *Nox1*^{-/-}-Mäusen erläutert und diskutiert.

4.4 Deletion vom *Nox1* bedingten Veränderungen im Protease-Antiprotease-Gleichgewicht mit dem Fokus auf MMP12 und TIMP3, die im Zusammenhang mit einer Lungenemphysementstehung stehen

Im **Kapitel 1.6.3** wurde die Protease-Antiprotease-Theorie in der COPD erläutert. MMPs spielen bei der Proteasen-Antiproteasen-Dysbalance eine wichtige Rolle. Die matrixabbauende Aktivität von MMPs wird durch endogene Inhibitoren, den tissue *inhibitors of matrixmetalloproteinase* (TIMP) antagonisiert ⁶⁸. Bei einem Ungleichgewicht zwischen den Proteasen, die Elastin als auch andere Komponenten der extrazellulären Matrix spalten, und den Antiproteasen, die diese Proteasen inhibieren und so schützen können, fördern die Emphyseentwicklung bei einer COPD ^{338; 339}. Es gibt viele verschiedene Matrixmetalloproteinasen, wobei vor allem die Matrixmetalloproteinase MMP9 und MMP12 als wichtige Kandidaten in der COPD-Pathogenese gesehen werden ^{136; 268; 378}. MMP12 ist nachweislich in den alveolären Makrophagen von COPD-Patienten erhöht ^{89; 166; 171}. Auch wurde in dieser Arbeit eine veränderte *Mmp12*-Genexpression im Lungenhomogenat von WT-Mäusen nach Zigarettenrauchexposition gefunden. Auf Genebene konnte eine erhöhte *Mmp12*-Expression in chronischen Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen nachgewiesen werden. Unter physiologischen Bedingungen befindet sich die MMP12 Aktivität mit seinem wichtigem Regulator, dem TIMP3, in einem Gleichgewicht ^{1;230}. Durch Zigarettenrauch wird dieses Gleichgewicht gestört, die Genexpression von *Timp3* wird herunterreguliert und die

Expression von *Mmp12* induziert²⁶⁸. Eine herunterregulierte *Timp3*-Genexpression wurde auch in den Proben der Rauch-exponierten WT-Mäuse gefunden. Man weiß aus publizierten Daten, dass ein TIMP3-Mangel die Emphyseprogression fördert. Durch einen *Noxol Knockout* wird dies offenbar verhindert, da weder im Lungenhomogenat noch auf Lungenkompartement-spezifischer Ebene und auch nicht auf Zelltyp-spezifischer Ebene eine erhöhte *Mmp12* Genexpression nachgewiesen werden konnte und auch keine veränderte Regulation von *Timp3* nachgewiesen wurde. Eine verminderten MMP12 Enzymaktivität ließ sich durch die Ergebnisse der FMT- μ CT-Messungen unterstützen. Die Daten der FMT- μ CT-Messung zeigte unterschiedliche MMP12-Aktivitäten zwischen den Gruppen. Während dieser Echtzeit Aktivitätsmessung vorhandener MMPs in der Lunge konnte nur in WT-Mäusen nach chronischer Zigarettenrauchexposition eine signifikant erhöhte MMP-Aktivität detektiert werden. Die Hypothese, dass es zu einer verminderten inflammatorischen Antwort in Zigarettenrauch-exponierten *Noxol Knockout* Mäusen kommt, wurde durch die Zellzahl des Zytospins (Anzahl inflammatorischer Zellen) aus der BAL der über 8 Monate Zigarettenrauch-exponierten *Noxol Knockout* Mäuse unterstützt. Durch die Zigarettenrauchexposition waren weniger inflammatorische Zellen in den *Noxol Knockout* Mäusen nachweisbar als in den WT-Mäusen. So ist bekannt, dass inflammatorische Prozesse in der Pathogenese der COPD-Erkrankung eine wichtige Rolle einnehmen^{222; 315}. Durch die Quantifizierung inflammatorischer Zellen in der BAL von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten Mäusen konnte die pathophysiologische Bedeutung von inflammatorischen Zellen in dieser Arbeit bestätigt. Inflammatorische *Pathways* lösen Signalkaskaden aus, durch die entzündungsfördernde Gene exprimiert werden. Durch die Microarray-Analysen wurden die Inflammation-induzierenden Gene, die in der COPD-Pathophysiologie eine Rolle spielen, in isolierten pulmonalen Gefäßen und alveolären Septen von 3- sowie 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten Mäusen untersucht. Interessanterweise zeigten die Microarray-Analysen, dass *Mmp12* bereits in den Septen von 3-monatigen Raumluf-behandelten *Noxol Knockout* Mäusen schwächer exprimiert war und unter Zigarettenrauch war die Herunterregulierung noch stärker messbar. Diese Ergebnisse sprechen stark dafür, dass MMP12 sowie auch TIMP3 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des emphysematösen Phänotyps spielen. Diese Tatsache wird dadurch unterstützt, dass es in *Timp3*-defizienten Mäusen zu einem spontanen Verlust von Alveolen kommt und diese Mäuse zudem noch durch reduzierte Kollagen sowie Fibronectin Mengen im peribronchialen Raum sowie durch eine Desorganisation der Kollagen-Fibrillen in den Alveolarwänden auffallen^{210; 249}. Durch ein *Timp3 Knockout* wird eine Verschiebung des MMP/TIMP-Verhältnisses in Richtung der

Matrixmetalloproteinasen induziert, die zur Degradierung der extrazellulären Lungenmatrix führt ^{210; 419}. In der BAL, im Sputum sowie in Bronchialbiopsien von COPD-Patienten kann eine erhöhte MMP12-Proteinexpression gefunden werden, was die zuvor erwähnten Erkenntnisse eines veränderten MMP2/TIMP3-Verhältnisses unterstreichen ⁴⁴. Mit einer erhöhten *Mmp12*-Expression wird auch eine verstärkte H₂O₂-Produktion in Verbindung gebracht ²⁰⁹. Die AmplexRed-Assay Ergebnisse dieser Arbeit konnten eine erhöhte H₂O₂-Bildung in 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten isolierten murinen ATII-Zellen zeigen. Dieses Ergebnis traf jedoch nur auf die ATII-Zellen der WT-Mäuse zu und konnte nicht in den ATII-Zellen von Zigarettenrauch-behandelten *Nox1 Knockout* Mäusen gemessen werden. Ferner steht oxidativer Stress im Zusammenhang mit einer verstärkten inflammatorischen Antwort in der COPD, die mit der Aktivierung der Metalloproteinase MMP12 steht ^{379; 424}. Hierbei ist klarzustellen, dass der oxidative Stress und die Protease-Antiprotease Theorie das komplexe Netzwerk der inflammatorischen Prozesse während einer COPD beeinflussen, MMP12 wird in diesen Zusammenhang immer wieder diskutiert ^{186; 279}. Einiger Studien nach können verschiedene Proteinase an einer erhöhten arteriellen Gefäßsteifigkeit während einer COPD-Exazerbation beteiligt sein ^{186; 260}. Inwiefern hierbei MMP12 involviert ist, muss noch untersucht werden. Bis dato hat man jedoch in einem Mausmodell herausgefunden, dass die *Mmp12*-Expression nach einer akuten vaskulären Verletzung in isolierten arteriellen glatten Muskelzellen erhöht war und MMP12 in diesem Zusammenhang eine essentielle Rolle bei einer akuten und chronischen arteriellen Gefäßsteifigkeit besitzt ²²⁷. Die genannten Ergebnisse könnten auch eine Relevanz hinsichtlich des beobachteten Phänotyps in den *Nox1 Knockout* Mäusen haben. Die arterielle Gefäßsteifigkeit der PASMCs wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, jedoch weiß man bereits dass eine arterielle Gefäßsteifigkeit durch ein veränderten Gefäßtonus sowie durch eine veränderte Struktur der arteriellen extrazellulären Matrix bestimmt wird, die zu einer veränderten SMC Proliferation ¹⁸⁷ und zu einem Gefäßumbau ³⁰² führen kann. Diese Fakten liefern einen Erklärungsansatz für die signifikant veränderten pulmonalarteriellen Gefäßstrukturen nach chronischer Zigarettenrauchexposition in den WT-Mäusen, die in den *Nox1 Knockout* Mäusen weniger ausgeprägt war. Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen dieser wissenschaftlichen Arbeit folgern, dass durch den *Nox1 Knockout* die Zunahme der Metalloelastasen-Aktivität in Neutrophilen und in Makrophagen, beispielweise von MMP12, verhindert wurde.

4.5 Einfluss einer *Noxo1*-Deletion auf Superoxid-assoziierte Gewebe- sowie zelluläre Schädigungen, die zur Emphysembildung und einer PH führen

Oxidativer Stress, der durch Zigarettenrauch getriggert wird, führt bekanntlich zu einer Reduktion der antioxidativen Mechanismen. Aus der Literatur weiß man, dass es zu Veränderungen des Glutathionen-Haushalts, der Ascorbinsäure-Mengen, der Konzentration an Protein-Thiolen und von Prostaglandinen in der Lunge kommt ^{87; 145; 240}. Durch einen *Noxo1 Knockout* könnte diese Imbalance antioxidativer Mechanismen geringer ausgeprägt sein als in WT-Mäusen, wodurch es zu einem protektiven Effekt vor dem Emphysem- sowie einer PH kommt. Im **Abschnitt 3.13** wurden mittels Microarray-Analysen verschiedene Signalwege untersucht, die durch eine *Noxo1 Knockout* beeinflusst werden könnten. Dabei konnten einige Signalwege wie z.B der Endozytose-Signalweg, der MAPK- *Pathway* und der *Tight Junction-Pathway* identifiziert werden, die durch einen *Noxo1 Knockout* verändert waren. Von besonderem Interesse waren jedoch die veränderten Genexpressionmuster des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung in den *Noxo1 Knockout* Mäusen (unter Raumluft- und unter Zigarettenrauchexposition in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge). Die erwähnten Zellprozesse sind mitochondriengebunden und könnten somit neue Erklärungsansätze bieten, die den Mechanismus eines protektiven Effekts vor einer Emphysembildung sowie vor einer PH im *Noxo1 Knockout* erklären könnten. Dabei könnte eine durch NOXO1 beeinflusste Mitochondrienfunktion einen wichtigen Diskussionspunkt bieten. Neben den NADPH-Oxidasen sind Mitochondrien weitere ROS-Produzenten und potentielle Kandidaten für die Erzeugung von oxidativem Stress ¹⁴. In verschiedenen Veröffentlichungen wird postuliert, dass eine mitochondriale AII-Zellen Schädigung, die ROS-Ausschüttung induziert und dies beispielweise zur einer erhöhten Apoptose von AII-Zellen aus fibrotischen Lungen führt ^{63; 153; 271}. Neben AII-Zellen sind auch andere Zelltypen wie Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten von den oxidativen Schädigungen betroffen. Oxidativer Stress induziert eine mtDNA-Degradation, die folglich die Apoptose von AII-Zellen in COPD-Lungen sowie auch in AII-Zellen anderer Lungenerkrankungen, wie der pulmonalen Fibrose, führt ^{153; 184}. Es gibt Hinweise darauf, dass es eine Verbindung zwischen mitochondrial produzierten ROS und der daraus resultierenden mtDNA-Schädigung, einer p53-Aktivierung und einem veränderten Gleichgewicht der beiden wichtigen Redox Sensoren, 8-Oxoguanine DNA Glycosylase (OGG1) und Aconitase-2 (ACO-2), gibt ¹⁸⁴. Diese beiden Redox Sensoren sind in Tiermodellen für Fibrose-Erkrankungen an der Erhaltung der mtDNA beteiligt ¹⁸⁴. Durch eine Microarray-Studie in hypoxischen humanen Krebszellen konnte eine Korrelation zwischen einer p53-Regulierung und einer

erhöhten Apoptose und der daraus resultierenden DNA Schädigung gezeigt werden ⁹⁴. Es könnte sein, dass in den *Noxo1 Knockout* Mäusen dieser Mechanismus unterdrückt bleibt und die Tiere dadurch ein geringeres Apoptoseverhalten in der Lunge aufweisen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg in Mäusen mit einem *Macrophage Inhibitory Factor* (MIF)-Defizit stärker aktiviert wird, einem Zytokin das an der Apoptose beteiligt ist und mit der COPD-Pathogenese in Korrelation steht und laut Literatur für die Erhaltung der alveolären Struktur notwendig ist ³²³. Wie bereits bekannt, sind Mitochondrien maternaler Herkunft und haben als Kraftwerk der Zelle eine sehr essentielle zelluläre Funktion ⁹⁴, indem sie ATP im Rahmen der Atmungskette generieren und gleichzeitig sind sie auch ROS-Produzenten, die verschiedene Signalkaskaden steuern und aktivieren können ^{14; 69}. Erstaunlicherweise zeigen Studien, dass eine mitochondriale Dysfunktion unter Zigarettenrauch beobachtet werden kann, indem es zur Inhibierung der Atmungskomplexe I und II kommt ^{62; 387}. Caito und sein Kollege haben ein verändertes mitochondriales Membranpotential und veränderte ATP-Konzentration nach Zigarettenrauchexposition in alveolären Epithelzellen, die aus Ratten isoliert wurden, beobachtet ⁶². Zusätzlich kontrollieren sie auch Signalwege, z.B. wie die Zell-Differenzierung, das Wachstum, die Apoptose und den Zellzyklus, die durch eine chronische Zigarettenrauchexposition verändert werden können ^{74; 378}. In dieser Arbeit konnten mittels der Microarray-Ergebnisse gezeigt werden, dass Gene der zellulären Signalwege wie z.B. des Endozytose-*Pathways* und auch die Gene des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung unter Zigarettenrauchexposition in den alveolären Septen und in den pulmonalen Gefäßen veränderte Genexpressionmuster aufwiesen. Es könnte durchaus sein, dass Zigarettenrauch eine mitochondriale Schädigung in den WT-Mäusen induziert und das ROS-Gleichgewicht beeinflusst wird. Über einen *Noxo1 Knockout* könnte dies verhindert sein und die Mäuse vor dem Emphysem und einer PH nach Zigarettenrauchexposition schützen. Es ist nämlich bekannt, dass eine mtDNA-Schädigung zur mitochondrialen Störung, wie z.B. dem Kollabieren des mitochondrialen Membranpotentials führt, das wiederum die Ausschüttung pro-apoptotischer Faktoren initiiert ¹⁹⁵. Dies könnte beispielweise die erhöhte Rate apoptotischer ATII-Zellen von WT-Mäusen nach Zigarettenrauchexposition erklären. Eine mitochondriale Dysfunktion könnte eine wichtige Rolle bei einer durch Zigarettenrauch-induzierte Atemwegsepithel-Läsion spielen. Es könnte auch sein, dass durch NOXO1 die Mitochondrienfunktion beeinflusst wird und durch Zigarettenrauch ein erhöhter oxidativer Stress induziert wird. Daher wurde in dieser Arbeit ein Fokus auf den ROS-Marker, 3-Nitrotyrosin, gelegt. Nitrotyrosin ist ein indirekter Marker für das Peroxynitrit, da dieses Molekül selbst ein sehr potentes und hochreaktives

Radikal ist und mit Thyrosinketten der Lungenproteine reagieren kann⁴¹³. Seine Affinität mit Proteinen und Lipiden zu reagieren führt zu Gewebeschädigungen in der Lunge¹⁸². Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten mögliche downstream-Wirkmechanismen des NOXO1-abhängigen Signalwegs nachweisen und mögliche Erklärungsansätze für den *Noxo1*^{-/-}-Phänotyp liefern. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Emphysembildung bei COPD-Patienten mit einer erhöhten Bildung von 3-Nitrotyrosin in Korrelation steht¹⁸². Dies kann zu einer erhöhten Apoptose und schlussendlich zur Gewebedegradierung in den Lungen führen^{213; 348}. In einer früheren Studie dieser Arbeitsgruppe wurde in Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen eine erhöhte NO-Produktion aufgrund einer gesteigerten iNOS-Expression im Lungenparenchym sowie auch in den pulmonalen Gefäßen nachgewiesen³³². Es wäre möglich, dass es eine niedrigere iNOS-Aktivität in den *Noxo1*^{-/-}-Mäusen geben könnte und dadurch weniger NO produziert wurde. Dadurch könnte man vermuten, dass es in den *Noxo1*^{-/-}-Mäusen insgesamt zu einem verminderten nitrosativen Stress kommt und die Bildung des reaktiven Peroxynitrits reduziert wird. Bekannt ist, dass übermäßiges RNS und ROS und das gefährliche Peroxynitrit, welches aus der Reaktion von Superoxid und Stickstoffmonoxid generiert wird, zu Entzündungsreaktionen in der Lunge und Atemwegen führen^{291; 355} und bei der COPD-Pathogenese eine wichtige Rolle spielen^{291; 309}. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen annehmen, dass durch den *Noxo1*^{-/-} die Mäuse nach Zigarettenrauchexposition vor proinflammatorischen Prozessen und vor dem oxidativen Stress geschützt waren. Diese Vermutung lässt sich durch die verminderten Superoxid-Messungen in Zigarettenrauch-exponierten und mit Zigarettenrauchextrakt-behandelten ATII-Zellen von *Noxo1*^{-/-}-Mäusen bestätigen. Der genaue Zusammenhang bzw. wie der Signalweg zwischen NOXO1, einer verminderten iNOS-Aktivität, einer veränderten NO-Bildung und einer verminderten Nitrotyrosin-Bildung in den *Knockout* Mäusen ist, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Beispielsweise könnte die Rolle von *Noxo1* in iNOS *Knockout* Mäusen genauer untersucht werden. Zudem könnten die Untersuchungen der iNOS-Aktivität auf zellspezifischer Ebene präziser sein und die Hauptquelle der NO-Produktion identifizieren. Da ATII-Zellen für die Erhaltung des Lungenparenchyms sowie für die *Surfactant*-Produktion von großer Bedeutung sind¹⁴⁷, sollte eine mögliche iNOS-NOXO1-Interaktion in diesen Zelltypen genauer untersucht werden. Weiterhin wäre es von Interesse, in PASMCs eine NOXO1-iNOS-Interaktion zu belegen, da PASMCs bei der PH-Etablierung eine Rolle spielen. Das NO-produzierende Enzym, iNOS, konnte bereits durch die Arbeit von Seimetz et al. im Zytoplasma von PASMCs und in Kernmembran-Nähe mittels Fluoreszenzfärbungen lokalisiert werden³³¹. Welche genaue Rolle NOXO1 bei der

Etablierung von PH spielt muss weiterhin untersucht werden und gleichzeitig ob es eine direkte iNOS-NOXO1 Interaktion gibt. Laut Literatur wird das meiste Superoxid durch NOX1 produziert, da es als primärer ROS-Bildner bekannt ist ^{135; 289; 309; 413}. Da NOXO1 eine Untereinheit dieses Enzyms ist ³⁵⁵ und in dieser Arbeit durch ein *Noxo1 Knockout* weniger Superoxid nach Zigarettenrauchexposition gemessen wurde, ist davon auszugehen, dass pathophysiologische Veränderungen in der Lunge verhindert wurden. Die *Noxo1* Deletion verhindert wohlmöglich Zellschädigungsprozesse, beispielsweise könnte eine Nitrierung von Proteinen verhindert werden sowie auch eine abnormale mitochondriale Respiration. Die Proteine, die nitriert waren, unterschieden sich in den Lungenproben der *Noxo1^{-/-}*-Mäuse von den nitrierten Proteinen in den Lungen der WT-Mäuse. Durch die massenspektrometrische Analyse (LC-MS/MS) konnten bereits unterschiedlich nitrierte Proteingruppen in den Raumluft-behandelten Genotypen identifizieren werden, sodass der *Noxo1 Knockout* einen Einfluss ausübt. Nach Zigarettenrauchexposition waren wiederum im Wildtypen andere Proteine nitriert als im *Noxo1^{-/-}*. Dabei war auffällig, dass einige nitrierte Proteine nur im *Noxo1 Knockout* nach Zigarettenrauchexposition gefunden wurden. Wichtige Enzyme aus der Glykolyse wie z.B die Aldolase, Glucose-6-Phosphat Isomerase und die Pyruvat Kinase waren hierbei vertreten und lassen vermuten, dass durch den *Noxo1^{-/-} Knockout* kompensatorische Mechanismen aktiviert werden, die die Mäuse nach Zigarettenrauchexposition vor dem Emphysem und der PH schützen könnten. Interessanterweise war das Protein Gelsolin lediglich in Zigarettenrauch-exponierten *Noxo1^{-/-}*-Mäusen öfter nitriert gewesen. Eine Studie konnte dem Protein Gelsolin antiapoptotische Effekte zuweisen, indem es verhindert, dass es zu keinem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kommt und damit die Cytochrom C-Ausschüttung aus den Mitochondrien verhindert wird ²¹⁵. Es wurde bereits diskutiert, dass durch ein *Noxo1^{-/-}* die Apoptoserate in den ATII-Zellen reduziert wurde und möglicherweise korreliert dieses Ergebnis mit der Veränderung des Gelsolins. Die mitochondriale Respiration wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, allerdings sollten weitere Analysen durchgeführt werden, um die Mechanismen in den Mitochondrien in Bezug auf NOXO1 und Gelsolin zu untersuchen. Im Gegensatz zu den LC-MS/MS Ergebnissen vom *Knockout*, war die Nitrierung von der Tryptophan-tRNA-Ligase (kodiert durch das Gen *Wars*) häufiger im Wildtypen nach Zigarettenrauchexposition gemessen worden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Tryptophan-tRNA-Ligase die Aktivierung des ERK- und des eNOS-Pathways in vaskulären Endothelzellen beeinflusst ³⁸². Studien postulieren, dass die Tryptophan-tRNA-Ligase eine Rolle beim vaskulären Remodelling besitzt, die Angiogenese- und die Regulation des Blutdrucks beeinflusst und

zudem inflammatorische Prozesse modulieren kann ^{288; 382}. Tryptophan-tRNA-Ligase-abhängige Mechanismen sollten in Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen genauer untersucht werden, denn möglicherweise gibt es hier eine NOXO1-Abhängigkeit bei der Aktivierung der Tryptophan-tRNA-Ligase. Die beiden antioxidativen Proteine, Peroxiredoxin und Glutathion-Transferase sind in Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen häufiger nitriert gewesen als in den anderen Gruppen. Beide Proteine sind wichtige Bestandteile des antioxidativen Systems, vor allem bei der Abwehr von ROS und schützen vor inflammatorischen Prozessen ^{190 ;194}. Da diese Proteine in Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen häufiger nitriert waren, könnte die Redox-Homöostase durch ein gestörtes Abfangen von toxischen Metaboliten mittels endogener Antioxidantien, die Etablierung eines Emphysems und einer PH nach Zigarettenrauchexposition begünstigen. Li et al. konnte eine verstärkte Vulnerabilität bezüglich oxidativer Schädigungen der DNA und Proteinen in Peroxiredoxin *Knockout* Mäusen beobachten ²²¹. Aus dem Gesamtbild der LC-MS/MS-Ergebnissen ist anzunehmen, dass die Unterschiede der Proteinnitrierung einen Einfluss auf zelluläre Prozesse haben, die eine Emphysembildung in der Lunge induzieren und fördern könnten ^{109; 113; 269}. In vielen Evidenz-basierenden Studien werden NOX-Enzyme als die wichtigsten ROS-Produzenten beschrieben, aber erst aktuell hat eine interessante Studie von Ueyma und Kollegen gezeigt, dass NOXA1 und der Organisator, NOXO1, nicht nur die Superoxidmenge kontrollieren, sondern auch ROS-Produkte perse, die in den Zellen gebildet werden ^{18; 383}. Da bekannt ist, dass NOXO1 keine autoinhibitorische Region (AIR) beinhaltet und damit konstitutiv mit p22^{phox} interagiert, um NOX1 zu regulieren, könnte diese Besonderheit, wie Ueyma und Kollegen es publiziert haben, einen Erklärungsansatz liefern, weshalb die Emphysem- und PH-Entwicklung bei den *Noxo1 Knockout* Mäusen ausbleibt. Durch diese besondere Eigenschaft vom NOXO1, wird eine komplexe Signalkaskade und die damit verbundenden zellulären Prozessen beeinflusst. Zudem werden kompensatorische Mechanismen aktiviert. Ferner ist zu erwähnen, dass die PX-Domäne beim NOXO1 für die Lokalisierung verschiedener Splice-Varianten verantwortlich zu sein scheint ³⁶⁹ wohingegen die PX-Domäne beim p47^{phox} als autoinhibitorischer Regulator dient. Dabei interagiert die PX-Domäne mit dem Plasmamembran-Phosphoinositiden (PI), um somit die NOX2-katalysierte Superoxid-Produktion zu steigern ⁵. Eine der Splice-Varianten von NOXO1, das NOXO1 β ist ausnahmslos in der Plasmamembran lokalisiert, das NOXO1 γ nur im Nukleus und das NOXO1 α und NOXO1 δ in den zytoplasmatischen Aggregaten ^{85; 369; 384}. Man nimmt an, dass NOXO1 β zusammen mit NOX1 für die höchste Superoxid-Produktion verantwortlich ist ^{9; 220; 285}. Somit könnten die NOXO1-Splicevarianten in den unterschiedlichen

subzellulären Bereichen zur Aktivierung von NOX1 beitragen, die beim Fehlen vom NOXO1 zu veränderten Signalwegen führen ^{9; 220; 220; 220}.

4.6 Einfluss eines *Noxo1 Knockouts* auf Zell-spezifische Pathways wie z.B die Apoptose und die Proliferation in PASMCs und ATII-Zellen

Im **Abschnitt 4.2** wurde bereits der protektive Effekt einer PH- sowie einer Emphysementstehung nach chronischer Zigarettenrauchexposition in den *Noxo1 Knockout* Mäusen diskutiert. Der genaue Mechanismus, der dahinter steckt ist jedoch noch ungeklärt. Um die im vorherigen Abschnitt (**4.2**) beschriebenen Effekte einer *Noxo1* Deletion auf das Gefäßsystem und auf die Alveolen zu erklären, wurden mPASMCs und ATII-Zellen näher charakterisiert. Der pulmonalvaskuläre Gefäßumbau in der PH und der Verlust der elastischen Fasern beim Emphysem resultieren aus Veränderungen des Proliferations-Verhaltens sowie des Apoptose-Verhaltens ^{17; 63; 133; 270; 271; 343; 419}. NOXO1 wird in mPASMCs, ECs und auch in ATII-Zellen exprimiert ³³¹ und daher ist anzunehmen, dass durch ein *Noxo1 Knockout* und darüberhinaus in Kombination mit Zigarettenrauch veränderte zelluläre Prozesse in diesen Zelltypen induziert werden könnten. Die Analysen des Apoptose-Verhaltens unbehandelter ATII-Zellen von *Noxo1 Knockout* Mäusen zeigten eine niedrigere Apoptoserate als die ATII-Zellen der WT-Mäuse. Kommt der Trigger Zigarettenrauch hinzu, wurde ein ähnliches Ergebnis beobachtet. Nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition sowie nach einer akuten Behandlung mit 10 %igen CSE wurde in den ATII-Zellen der *Noxo1 Knockout* Mäuse eine niedrigere Apoptoserate gemessen als im direkten Vergleich zu der Apoptoserate der ATII-Zellen von WT-Mäusen. Auch *in vivo* konnten die zuvor aufgeführten Ergebnisse bestätigt werden. Mit der FMT- μ CT-Messung wurde das fluoreszenzbasierende Signal einer Sonde des Apoptose-Markers, dem AnnexinV, in Echtzeit in den Lungen von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten Mäusen erfasst. Das Fluoreszenzsignal der AnnexinV-Sonde war in den Lungen von WT-Mäusen intensiver detektierbar gewesen. Ganz anders sah es in den Lungen von *Noxo1^{-/-}*-Mäusen aus, da sich hier die Intensität des AnnexinV-Signals auf dem Niveau der Raumlauft-behandelten WT- und *Noxo1^{-/-}*-Mäuse befand. Diese Ergebnisse können durch bereits publizierte Studien gestützt werden ^{109; 246 113; 289}. All diese Ergebnisse sprechen dafür, dass in den *Knockout* Mäusen, die für eine Emphysementwicklung verantwortlichen zellulären Prozesse nicht verändert waren, allen voran die Apoptose und die *Noxo1^{-/-}*-Mäusen und diese Mäuse dadurch geschützt waren. Die Zunahme apoptotischer ATII-Zellen in den WT-Mäusen steht in Korrelation mit dem Elastinverlust und der damit in

Zusammenhang stehenden Lungenparenchymdegradierung nach Zigarettenrauchexposition. Diese Beobachtungen konnte auch die Gruppe von Imai und Kollegen machen, da in ihren Untersuchungen der Anstieg apoptotischer Zellen (wie z.B. in alveolären Epithelzellen und Endothelzellen) in emphysematösen Lungengewebe nachzuweisen war ¹⁷⁰. Dieser *Pathway*, der eine wichtige Rolle bei der Emphysementwicklung spielt, ist in den *Nox1 Knockout* Mäusen nicht induziert gewesen. Die Apoptose ist ein wichtiger pathogenetischer Mechanismus in der COPD, der mit weiteren pathogenetischen Mechanismen wie dem oxidativem Stress und der Proteinase-Antiproteinase-Dysbalance interagiert ^{104; 170}. Erst kürzlich wurde in einer Studie ein Zusammenhang zwischen einer Emphysemzunahme und einer Reduktion des lungenspezifischen L-Carnitin gefunden. L-Carnitin ist eine chemische Substanz, die aus den beiden Aminosäuren, Lysin und Methionin gebildet wird und ist für den Transport der langkettigen Fettsäuren in den Mitochondrien essentiell, da sie sich dort der β -Oxidation unterziehen ^{92; 208}. In isolierten ATII-Zellen wurde die Apoptose durch die Applikation der *Porcine Pancreatic Elastase* oder von H_2O_2 induziert, nach einer Behandlung mit L-Carnitin konnte jedoch eine deutlich niedrigere Apoptoserate nachgewiesen werden als Mäuse ohne eine L-Carnitin Behandlung ⁹². Zudem konnte eine andere Studie zeigen, dass eine L-Carnitin-Administration zu einer Reduzierung inflammatorischer Prozesse in der Tumorkachexie-Pathogenese (*Cancer Anorexia-Achexia Syndrome*) führte, die vor allem die Menge ausgeschütteter Zytokine reduzieren konnte ^{208; 228}. Die L-Carnitin-Mengen wurden nicht in dieser Arbeit analysiert, jedoch könnte dies von Bedeutung sein, um zu überprüfen, ob bei *Nox1^{-/-}*-Mäusen ein veränderter L-Carnitin-Metabolismus vorliegt. Eine L-Carnitin-Metabolismus Analyse könnte einen Erklärungsansatz für das Ausbleiben einer erhöhten Apoptoserate in den *Nox1^{-/-}* ATII-Zellen nach Zigarettenrauchexposition geben und auch eine mögliche Erklärung für die verminderte Lungendegradierung in diesen Mäusen liefern.

Mit einem veränderten Proliferationsverhalten der PASMCs wird die PH nach chronischer Zigarettenrauchexposition in den Mäusen assoziiert. Der Einfluss einer chronischen Zigarettenrauchexposition auf das Proliferationsverhalten der mPASMC konnte in dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht untersucht werden. Um die Proliferationsrate zwischen unbehandelten- und Zigarettenrauch-behandelten mPASMC vergleichen zu können, müssen gleiche Zellzahlen derselben Zellpassage zu Beginn des Assays vorliegen. Da Zigarettenrauch die Adhäsion der mPASMC in den 24-Well Platten beeinflusst hat, ist eine Vergleichbarkeit des Proliferations-Signals zwischen unbehandelten und Zigarettenrauch-behandelte mPASMC nicht aussagekräftig gewesen. Aus diesem Grund wurde lediglich der Einfluss des *Nox1*

Knockouts auf die Proliferation im Vergleich zu WT mPASCs untersucht. Interessanterweise konnten bereits unterschiedliche Proliferationsraten gemessen werden, indem die Proliferationsrate in unbehandelten PASCs von *Nox1*^{-/-}-Mäusen niedriger war als in den WT-Mäusen. Das Proliferationsverhalten in den PASCs der *Knockout* Mäuse wurde darüber hinaus mittels der Expression des Proliferationsmarkers *Pcna* untersucht. Die *Pcna*-Expression war bereits in unbehandelten *Nox1*^{-/-}-PASCs niedriger gewesen als im Wildtypen. Auch nach einer 10%igen CSE-Behandlung war der Proliferationsmarker in den *Knockout*-PASCs im Vergleich zu den WT-PASCs signifikant herunterreguliert gewesen. Nicht nur die *Pcna*-Expression, sondern die Anzahl PCNA-positiver Zellen wurde nach einer immunohistochemischen Färbung in Lungenparaffinschnitten ausgewertet. Diese zeigten, dass in den *Knockout* Mäusen nach chronischer Zigarettenrauchexposition weniger PCNA-positiv Zellen quantifiziert werden konnten. Weiterhin konnte eine Genexpressionsanalyse in den pulmonalen Gefäßen der *Nox1 Knockout* Mäuse eine verminderte *Bcl2*-Expression (anti-apoptotisch) zeigen, sodass die Ergebnisse der Proliferationsmessungen in PASCs durch eine veränderte *Bcl2*-Expression beeinflusst werden konnten. Die Studie von Bonnefoy-Berard und Kollegen fand heraus, dass *Bcl2* nicht nur anti-apoptotisch wirkt, sondern auch ein anti-proliferativen Effekt ausüben kann und über den Signaltransduktionsweg von ERK gesteuert wird ⁴⁸. In diesem Zusammenhang könnte man den MAPK-Pathway als möglichen mechanistischen Trigger dieser komplexen Signalkaskade nennen, da dieser Signalweg durch verschiedene extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen (ERK1/2, der p38 Familie und den c-jun N-Terminalen Kinasen (JNKs) gesteuert wird und dieser komplexe MAPK-Signalweg auch bei der COPD eine Rolle spielt ^{48; 280; 307}. Ein veränderter MAPK-*Pathway* hat Einfluss auf eine Vielzahl potentieller Effektoren im Zytosol und im Zellkern. Darunter fallen auch Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen und Apoptose-assoziierte Proteine ^{418; 280; 307}. Eine Aktivierung dieses *Pathways* beginnt gewöhnlicherweise an der Plasmamembran durch Tyrosinkinasen. Es folgt meist der Raf-MEK1/2-ERK-Signalweg, der von verschiedenen Faktoren abhängig ist und der Apoptose, Proliferation und Zell-Differenzierung triggert und aktiviert ^{4; 248; 274}. Anhand der Microarray-Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, fiel der bereits zuvor erwähnte veränderter MAPK-*Pathway* durch ein verändertes Expressionsmuster, Lungenkompartiment-, Zeit- und Genotyp-spezifisch, auf. Es wurden keine weiteren Untersuchungen auf Proteinexpressionsebene durchgeführt. Jedoch wäre es interessant, die Cyclin D1-Expression, einen Proliferationsmarker, in den *Knockout* sowie Wildtyp-Mäusen zu untersuchen. Dieser kann bei einer stärkeren Expression zu einer erhöhten Proliferationsrate in verschiedenen Zellen, wie z.B. Ratten-Leberzellen, führen ²⁷⁹.

Bei der Regulation von CyclinD1 spielt der Ras/MAP Signalweg eine Rolle, dabei zählt ERK1/2 als wichtigste Enzymkomponente bei der Kontrolle der Zellproliferation. ERK kann eine Cyclin D1 Hochregulierung induzieren, die durch die Phosphorylierung des *Myc* Transkriptionsfaktor verstärkt werden kann ⁷¹. Ein weiteres Mitglied des MAPK-Signalweg, das p38^{MAPK}, könnte in den *Nox1 Knockout* Mäusen von Bedeutung sein, da eine Gruppe beispielsweise in Zigarettenrauchextrakt-behandelten Mäusefibroblasten zeigen konnte, dass die p38-Aktivität erhöht war und dies mit einer veränderten Apoptoserate als auch Proliferationsrate in Korrelation stand ²¹³. Eine andere Studie identifizierte den MAPK-*Pathway* als ein besonders wichtiges Target in der Krebstherapie, da der MAPK-*Pathway* in vielen Krebsarten (Kolonkrebs oder Melanom) verändert ist und dabei die Kinasen wie z.B. auch das p38 in dieser komplexen Signalkaskade eine besondere Rolle spielt und bei der Behandlung von Krebs bedeutend sein könnte ³¹¹. Weitere molekularbiologische Untersuchungen könnten mehr Aufschluss über den Einfluss einer *Nox1* Deletion auf den MAPK-*Pathway* geben und damit eine Korrelation zu den Veränderungen des Apoptose- und Proliferationsverhaltens in AII-Zellen und PASMCs liefern. Weiterhin wäre es möglich, dass der JNK-*Pathway* ebenfalls am Signalweg beteiligt sein könnte, da man weiß, dass die Stimulierung von TNF-Rezeptor durch TNF α den NF κ B und JNK-Signalweg aktiviert ⁷⁸ und JNK1/2 durch TNF α phosphoryliert wird, das wiederum zur Phosphorylierung von c-Jun, c-Fos und AP-1 führt ²⁰⁰. Dadurch kommt es zur Inhibierung von JNK, das die TNF α -vermittelte NOX1-Induktion verhindert und damit auch die Bildung von ROS reduziert ²⁰⁰. Die zuvor genannten *Pathways*, ERK1/2, JNK und p38^{MAPK} beeinflussen sich gegenseitig. Diese *Pathways* könnten durch NOX1-NOX1-getriggert werden und lassen vermuten, dass die unterschiedlichen Apoptose-Proliferationsraten in den *Nox1 Knockout* Mäusen nach chronischer Zigarettenrauchexposition und fehlender Emphysembildung und PH, mit diesen komplexen Signalwegen in Verbindung stehen könnten. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit eine veränderte Expression der antioxidativen Häm-Oxygenase (*Hmox1*) gefunden. In den AII-Zellen von *Nox1 Knockout* Mäusen wurde *Hmox1* stärker exprimiert, jedoch nicht in den WT-Mäusen. Dieses Enzym ist für seine hemmende Wirkung in Entzündungsvorgängen bekannt und es reguliert die Apoptoserate ³⁸⁶. Daher könnte eine erhöhte Expression von *Hmox1* am protektiven Effekt vor einer Emphysementwicklung und einer PH-Entstehung in den *Nox1 Knockout* Mäusen beteiligt sein. Die neuronale Endopeptidase Nephilysin (NEP) konnte als weiterer interessanter Kandidat identifiziert werden. Studien zeigten, dass eine NEP-Inhibierung von bedeutender Rolle bei der Behandlung einer PH sein kann ^{188; 376}. NEP kann die natriuretischen Peptide, wie z.B. das

Atrial Natriuretic Peptid und das *Brain Natriuretic Peptid* (ANP/BNP) beeinflussen ⁶⁶. Diese Peptide vermitteln eine Vasodilatation, die die cGMP-Produktion durch den natriuretischen Peptidrezeptor (NPR-A) induzieren ¹⁸⁸. Über diesen Mechanismus könnte NEP ein Einfluss auf die PH-Entwicklung ausüben, da es beispielweise in Lungenlysat-Proben von COPD-Patienten, die unter einer PH leiden, herunterreguliert wurde und in gesunden Lungen die Neprilysin Expression unbeeinflusst blieb ⁴⁰¹. In dieser Arbeit konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden. Genexpressionsanalysen in den ATII-Zellen von *Noxol^{-/-}*-Mäusen, nach akuter CSE-Behandlung, zeigten eine signifikante Herunterregulierung dieses Enzyms. Jedoch blieb die *Nep*-Expression in den ATII-Zellen der WT-Mäuse auf dem Expressionsniveau der unbehandelten WT- und *Noxol^{-/-}*-ATII-Zellen. Eine Studie zeigte, dass eine *Nep*-Expression durch reaktive Sauerstoffspezies gestört werden kann ⁴⁰¹. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass der oxidative Stress in WT-Mäusen erhöht war und nicht in *Noxol^{-/-}*-Mäusen. Es könnte sein, dass eine akute CSE-Behandlung lediglich die *Nep*-Expression im *Noxol^{-/-}* beeinflusst und erst durch eine chronische Zigarettenrauchexposition Signalkaskaden induziert werden, die zu einer völlig anderen *Nep*-Expression in den verschiedenen Gruppen führen könnte. Wohlmöglich könnten im *Noxol^{-/-}* durch den Stimulus Rauch, in Form vom CSE-Extrakt, kompensatorische Mechanismen aktiviert werden, die protektiv auf eine PH-Entwicklung nach einer chronische Rauchexposition wirken. Dempsey und Kollegen zeigten in einer Studie, dass die PSMCs von Neprilysin *Knockout* Mäusen eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen und nach chronischer Hypoxie diese Mäuse eine schwere PH entwickeln, begleitend mit einer zunehmenden Muskularisierung der distalen Gefäße ¹⁰⁶. Andererseits konnten Wick und Kollegen auch die Bedeutung von Neprilysin in Lungen-Zelllysaten von COPD-Patienten zeigen, dass die *NEP*-Expression herunterreguliert war und *NEP* beim vaskulären Remodeling in COPD-Patienten involviert ist ⁴⁰¹. Daher wäre es wichtig die Rolle von Neprilysin in den ATII-Zellen und in den PSMCs nach chronischer Zigarettenrauchexposition in WT-Mäusen und in *Noxol^{-/-}*-Mäusen näher zu untersuchen. Im Zusammenhang zur Proliferation wurde der TF *Lama4* aus den Microarray-Ergebnissen identifiziert. In einer Studien war dieser TF an der Initiierung der Zellmigration und der Angiogenese in der Placenta beteiligt ³³⁵. Die veränderte *Lama4*-Expression in den *Noxol^{-/-}* *Knockout* Mäusen könnte darauf hinweisen, dass dieser TF am pulmonalvaskulären Gefäßumbau und damit einhergehenden zellulären Prozessen wie z-B der Proliferation involviert ist und am Schutz vor einer PH-Entstehung in den *Noxol^{-/-}* *Knockout* Mäusen nach Zigarettenrauchexposition beteiligt ist.

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Noxo1 Knockout* Mäuse vor der Entwicklung eines Zigarettenrauch-induzierten Emphysems und einer PH, zudem vor einem Gefäß-*Remodeling* geschützt waren. Aus den erlangten Daten kann man vermuten, dass NOXO1 als Untereinheit der NADPH-Oxidase NOX1, in die Entwicklung einer COPD involviert sein könnte. Ein *Noxo1 Knockout* schützt chronisch Zigarettenrauch-exponierte Mäuse vor einer Emphysembildung und einer PH-Entwicklung. Es scheint so, dass durch das Fehlen des NOX1 Organisators NOXO1, kompensatorische Signalwege aktiviert werden, die Einfluss auf wichtige Signalwege wie z.B. die Apoptose, die Proliferation und auf inflammatorische Prozesse ausüben und es schließlich mit einem protektiven Effekt in den *Knockout* Mäusen korreliert. Um zu entschlüsseln, ob die hier gefundenen Daten auf den Menschen und ganz speziell auf COPD-Patienten übertragbar sind, müssten weitere NOXO1-abhängige Untersuchungen durchgeführt werden. Hierbei sollte im nächsten Schritt die Möglichkeit eines kurativen Einflusses einer *Noxo1*-Deletion untersucht werden. In diesem Zusammenhang wäre es von großer Bedeutung herauszufinden, ob NOXO1 einen regenerativen Effekt auf ein bereits durch Zigarettenrauch-induziertes Emphysem ausübt oder gar auf eine etablierte COPD-Erkrankung haben könnte und darüber hinaus einen Effekt auf eine bereits entwickelte pulmonale Hypertonie. Weitere NOXO1-Studien wären von großem Nutzen, um neue Behandlungswege bei COPD-Patienten zu entwickeln. Im Fokus dieser Experimente sollte die Identifizierung spezifischer molekularbiologischer Signalwege stehen, die eine Verbindung zwischen NOXO1 und den pathogenetischen Signalwegen der COPD darstellen. Zukünftige Analysen sollten einerseits die Interaktionen wichtiger NOXO1-abhängiger Gene untersuchen und andererseits *up-* und *downstream*-Mechanismen näher beleuchten. Hierbei wäre es wichtig die chemischen Reaktionen, die durch NOXO1-iNOS induziert werden, detailliert zu untersuchen und gleichzeitig mögliche regulatorische Effekte auf Transkriptionsebene wie z.B. Promoter oder Enhancer zu untersuchen, die Signalwege wie z.B. die Gefäßkontraktion- sowie Relaxation, Angiogenese, Proliferation, Apoptose sowie Inflammation in PASMCs und ATII-Zellen modulieren. Nicht nur der kurative Ansatz wäre von hoher Wichtigkeit, um die genaue Pathophysiologie der COPD zu erforschen, sondern auch die Etablierung einer gewebespezifischen bzw. zellspezifischen *Noxo1 Knockout* Maus, um das Krankheitsbild besser zu erforschen. Als Beispiel wären alveoläre Epithelzellen oder pulmonalarterielle glatte Muskelzellen zu nennen, mit denen man einen tieferen Einblick in die NOXO1-abhängige Funktion hinsichtlich der COPD-Pathogenese erlangen könnte und um

Zelltypen zu identifizieren, die in der COPD/PH-Pathogenese von größter Bedeutung sind. Durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren, wie z.B. eines gezielten NOXO1-Inhibitors könnte es weiterhin ermöglicht werden, die einzelnen Aufgaben der verschiedenen NADPH-Oxidasen zu entschlüsseln und ihre Bedeutung für die Entwicklung bzw. Behandlung eines Emphysems und der pulmonalvaskulären Veränderungen aufzuklären.

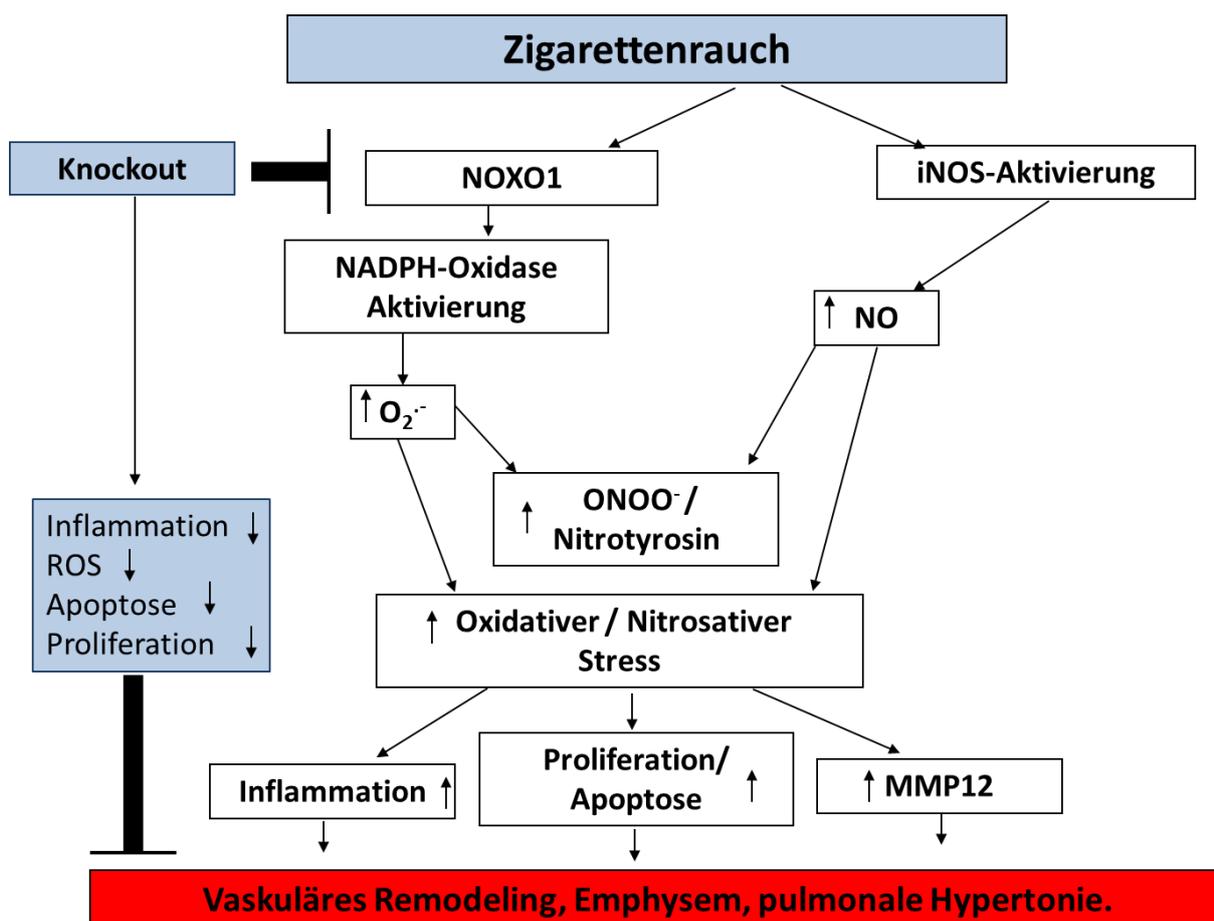


Abbildung 44: Überblick über die durch Zigarettenrauch-induzierte veränderte Protein-Regulationen und Signalprozesse, die einen Einfluss auf die Entwicklung einer PH und einem Emphysem ausüben. Durch eine *Noxo1*-Deletion wird dies verhindert

6 Zusammenfassung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) gehört zu der an der häufigsten vorkommenden Erkrankung weltweit mit steigender Mortalität und Morbidität. Bis dato können lediglich Symptom-lindernde Medikamente verordnet werden, die die Lebensqualität der Patienten verbessern. Um neue Therapieansätze zu entwickeln, müssen die zugrundeliegenden molekularbiologische Mechanismen und die Pathophysiologie der COPD ergründet werden. Oxidativer Stress spielt in der Pathogenese der COPD eine wichtige Rolle und in dem Zusammenhang wird die Rolle der Enzymfamilie der NADPH-Oxidasen als wichtigste Quelle von reaktiven Sauerstoffspeziesproduzenten in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die zytosolische NADPH-Untereinheit NOX-Organisator (NOXO1), einen entscheidenden Einfluss auf ein Zigarettenrauch-induziertes Emphysem und eine pulmonale Hypertonie ausübt. Mit Hilfe einer *Noxo1 Knockout* Maus und durch den Vergleich von WT- und *Noxo1 Knockout* Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein konstitutiver *Noxo1 Knockout* nach 3 und 8 Monaten Zigarettenrauchexposition die Bildung eines Lungenemphysems und einer pulmonalen Hypertonie verhindern konnte. Diese Aussage wurde zunächst durch funktionelle Messungen, wie z.B. der Lungenfunktion und der Messung des rechtsventrikulären Drucks überprüft. In *Noxo1 Knockout* Mäusen war keine Abnahme der Lungenfunktion (dynamische *Compliance*) nach 3- und 8-monatiger Zigarettenrauchexposition beobachtet worden. Zudem wiesen diese Mäuse keinen erhöhten systolisch rechtsventrikulären Druck nach Zigarettenrauchexposition auf. Im Gegensatz dazu war dies in den WT-Mäusen der Fall. Histologische Analysen unterstützten den protektiven Effekt einer strukturellen Veränderung in den Alveolen sowie des Lungenparenchyms nach chronischer Zigarettenrauchexposition. Beispielsweise konnte kein signifikanter Verlust von Alveolen in Lungenschnitten nach chronischer Zigarettenrauchbehandlung gemessen werden und auch mittels alveolar-morphometrischer Analyse wies keiner der Parameter (Septendicke, Gesamtluftraum sowie der mittlere Abstand zwischen Alveolarsepten) eine Emphysementwicklung nach. Hinsichtlich der Zigarettenrauch-induzierten pulmonalen Hypertonie konnte bei den *Noxo1 Knockout* Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition eine geringere Muskularisierung der kleinen Gefäße und ein Ausbleiben der Rechtsherzhypertrophie ermittelt werden. Zudem sollten einige weitere Ansatzpunkte erforscht werden, um den Mechanismus des protektiven Effekts durch eine *Noxo1*-Deletion auf das Zigarettenrauch-induzierte Lungenemphysem und PH erklären zu

können. Mit Hilfe der FMT- μ CT-Messung wurde die MMP-Aktivität, als inflammatorischer Marker und durch den Apoptose Marker, AnnexinV, das Apoptoseverhalten in der Lunge nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition in Echtzeit erfasst. Die Ergebnisse zeigten, dass *Noxo1 Knockout* Mäuse eine signifikant geringere Apoptoserate und eine geringere MMP-Aktivität nach chronischer Zigarettenrauchexposition aufwiesen. Der protektive Effekt vor der Emphysementwicklung und PH durch eine *Noxo1*-Deletion konnte weiterhin auf zellulärer Ebene durch die Messung des Apoptoserate in ATII-Zellen und durch die Quantifizierung inflammatorischer Zellen aus der bronchoalveolären Lavage (nach 8 Monaten Zigarettenrauchexposition) unterstützt werden. Da der oxidative Stress eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der COPD spielt, wurde dieser sowohl unter akuter sowie chronischer Zigarettenrauchexposition untersucht. Sowohl eine akute als auch eine chronische Zigarettenrauchexposition induzierten in isolierten ATII-Zellen aus WT-Mäusen eine erhöhte Superoxid-Produktion, nicht aber in *Noxo1 Knockout* Mäusen. Weiterhin konnte im Vergleich zu den WT-Lungenhomogenat Proben, in *Noxo1 Knockout* Lungenhomogenat signifikant geringere Nitrotyrosin-Proteinmengen nachgewiesen werden. Microarray-Analysen von Laser-mikrodissezierten pulmonalen Gefäßen sowie von den alveolären Septen konnten weiterhin zeigen, dass eine *Noxo1*-Deletion zu veränderten Genexpression im Endozytose- als auch im MAP-Kinase Signalweg sowie im Citratzyklus und in der Atmungskette führte. Neben veränderten Ergebnissen der Genexpression, wurden durch Zellkulturanalysen niedrigere Proliferationsraten in PASMCs als auch niedrigere Apoptosraten in ATII-Zellen von *Noxo1 Knockout* Mäusen gemessen.

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit lassen annehmen, dass NADPH-Oxidasen und besonders die zytosolische Untereinheit NOXO1, eine Schlüsselrolle bei der Entstehung eines Zigarettenrauch-induzierten Emphysems und einer PH in Mäusen spielt. Um den genauen Mechanismus diesen protektiven Effekts bei den Mäusen zu erklären wird in weiteren Studien die Rolle einer *Noxo1*-Deletion nach etablierter Emphysem- und PH-Entwicklung hinsichtlich eines regenerativen Effekts in der Lunge untersucht werden. Zudem könnte das therapeutische Potential einer NOXO1-Hemmung durch Verwendung entsprechender Inhibitoren in der COPD-Pathogenese untersucht werden.

7 Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the most common respiratory disease with increasing mortality and morbidity worldwide. To date only symptoms can be soothed by drugs to achieve slightly life quality improving conditions of COPD patients. For new therapeutic approaches the molecular biology and the pathogenesis of this disease need to be fully understood. Oxidative stress is an important aspect in COPD. Especially the role of NADPH-oxidases, enzymes that produce reactive oxygen species were investigated in this thesis.

In particular the cytosolic NADPH-oxidase subunit NOX-organzier (NOXO1) was identified as being essential in cigarette smoke induced emphysema and pulmonary hypertension (PH) in mice. Comparison of wildtype (WT) and *Noxo1 knockout* mice revealed that a constitutive *Noxo1 knockout* protected from the development of emphysema and pulmonary hypertension after 3 and 8 months of cigarette smoke exposure. Functional measurements like dynamic compliance after 3 and 8 months of cigarette smoke exposure showed no smoke-induced alternations in the *Noxo1 knockout* mice. In addition, *Noxo1 knockout* mice showed no elevated right systolic pressure, whereas the RVSP was increased in WT mice. Histological analysis supported the protective effect of a *Noxo1* deletion. Alveolar morphometry of lung slides confirmed structural maintenance of alveoli and lung parenchyma. There was no loss of alveoli and also none of the parameters (septal wall thickness, airspace, and mean linear intercept) indicated a development of emphysema. With regard to cigarette smoke-induced pulmonary hypertension there was a significantly reduced muscularisation of the small pulmonary vessels and the absence of right heart hypertrophy in cigarette smoke-exposed *Noxo1 knockout* mice after 8 months. To investigate the protective effect of a *Noxo1* deletion in detail, FMT- μ CT analysis was performed. This method detected the MMP-activity in the lung and it gave insights about the inflammatory status of the lung. Also apoptosis levels were detected and showed that after 8 months cigarette smoke exposure apoptosis and inflammation were not altered in *Noxo1 knockout* mice. The protective effect of developing emphysema and PH due to *Noxo1* deletion could be supported on the cellular level with significant lower apoptosis level in alveolar epithelial type II (ATII) cells and less inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) (after 8 months of smoke exposure). Oxidative stress is known to be increased in the pathogenesis of COPD. Under acute and chronic cigarette smoke exposure superoxide was elevated in isolated ATII cells of wildtype mice but not in *Noxo1 knockout* mice. Furthermore, a diminished oxidative stress level in *Noxo1 knockout* mice correlated with lower 3-nitrotyrosine protein levels in lung homogenate.

The microarray analysis from laser-microdissected pulmonary vessels and alveolar septa aimed at discovering potential upstream and downstream gene regulated mechanisms. These results revealed changes in the endocytosis and MAP-kinase pathway; also the citric acid cycle and the mitochondrial respiration were changed by *Nox1* deletion. Changes in the pathways could be linked to the changes of apoptosis and proliferation in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) and in alveolar type II (ATII) cells.

Notably, all together these results suggest that NADPH-oxidases, especially the subunit NOX1, play an essential role in cigarette smoke induced emphysema and PH in mice.

Taken together, this study could show that deletion of NOX1 prevents from cigarette smoke induced pulmonary hypertension and emphysema. Further studies are needed to elucidate the role of *Nox1* deletion after established emphysema and PH as to possible regenerative effects. Additionally, the therapeutic potential of a NOX1 inhibition by administration of selective inhibitors in the experimental setting of the COPD should to be addressed in detail.

8. Verzeichnisindex

Tabellenverzeichnis.....	VI
Formelverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII-XI
Literaturverzeichnis.....	XII-LIV

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Gemäß der GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) klassifizierten Schweregrade von COPD.</i>	6
<i>Tabelle 2: Enzymfamilie der NADPH-Oxidasen</i>	28
<i>Tabelle 3: Geräte</i>	33
<i>Tabelle 4: Software</i>	35
<i>Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien für Zellkultur/ molekularbiologische Untersuchungen/ Histologie/ physiologische Untersuchungen</i>	35
<i>Tabelle 6: Reagenzien/Chemikalien für Zellkultur/ Histologie/ molekularbiologische und physiologische Untersuchungen</i>	39
<i>Tabelle 7: Assays</i>	43
<i>Tabelle 8: Größenstandards</i>	43
<i>Tabelle 9: Verwendete Maus-spezifischer Primer</i>	45
<i>Tabelle 10: Verwendete Antikörper für Western Blots</i>	46
<i>Tabelle 11: Färbeprotokoll für die HE-Färbung an Mäuselungen</i>	59
<i>Tabelle 12: Färbeprotokoll für die Doppelfärbung mit Peroxidase</i>	61
<i>Tabelle 13: Elastika-Färbung nach Weigert mit Kernechtrot</i>	64
<i>Tabelle 14: Protokoll der PCNA Färbung</i>	65
<i>Tabelle 15: Protokoll zur Generierung der Ansätze</i>	68
<i>Tabelle 16: Zusammensetzung vom Krebs-Henseleit Puffer(KHB)</i>	68
<i>Tabelle 17: Substanzen für Gelherstellung</i>	72
<i>Tabelle 18 Transkriptionsfaktoren mit veränderter Expression in Septen und pulmonalen Gefäßen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition.</i>	120
<i>Tabelle 19: MicroRNAs mit veränderter Expression in den Septen und pulmonalen Gefäßen nach 8- monatiger Zigarettenrauchexposition.</i>	120

Formelverzeichnis

Formel 1	55
Formel 2	64

Abbildungsverzeichnis:

- Abbildung 1:** Darstellung der menschlichen Lunge. Sauerstoff (O₂)- und Kohlenstoffdioxid (CO₂)- Austausch in den Alveolen. (modifiziert aus www.julius-ecke.de) 2
- Abbildung 2:** Lungen- und Körperkreislauf des Blutes. Die Fließrichtung des Blutes ist durch die Pfeile angegeben. Sauerstoffarmes Blut ist in blauer Farbe und sauerstoffreiches Blut ist in roter Farbe dargestellt. (modifiziert aus onmeda.de© 2015) 3
- Abbildung 3:** Schematisches Bild der epithelialen Auskleidung eines Alveolus. ATI- und ATII-Zellen kleiden das alveoläre Epithel vorherrschend aus. Club- und bronchiale Epithelzellen sind für die Clearance- und Mukus-Produktion notwendig. 4
- Abbildung 4:** Schweregrad der COPD nach Symptomen (A-D). <https://www.copd-aktuell.de/wie-werden-die-copd-stadien-eingeteilt> abgerufen am 23.08.2020 7
- Abbildung 5:** Schematische Darstellung der wichtigsten Risikofaktoren für COPD. 9
- Abbildung 6:** Pathophysiologie der COPD. An der Krankheit beteiligte pathologische Effekte und Zellen (modifiziert aus ²⁹). 12
- Abbildung 7:** Pathophysiologie der COPD. Zusammenhang der Komponenten, die während der COPD auftreten (vereinfacht dargestellt. (Modifiziert aus ³⁹⁵)). 18
- Abbildung 8:** Darstellung verschiedener Lokalisation der NOX-Enzyme in der Lunge. Die spezifischen NOX/DUOX-Isoformen werden in unterschiedlichen Lungenzellen exprimiert (modifiziert aus ⁴²). 28
- Abbildung 9:** Zusammensetzung der unterschiedlichen NADPH-Oxidase mit katalytischen und regulatorischen Untereinheiten. 29
- Abbildung 10:** Zigarettenrauchmaschine mit Zigarettenrauchgenerator und Zigarettenrauchkammer 48
- Abbildung 11:** Darstellung der verschiedenen Versuchsgruppen. 49
- Abbildung 12:** 3D-Visualisierung mit PerkinElmer™ Sonden. <https://www.perkinelmer.com/de/category/bioluminescent-oncology-cell-lines> (abgerufen am 25.10.2020) 52
- Abbildung 13:** flexiVent Beatmungsgerät von SCIREQ 54
- Abbildung 14:** Bildanalyse der alveolären Morphometrie. Gelbe Farbe; Lungenparenchym, grau, von der Analyse ausgeschlossenes nichtparenchymatöse Areale. 60
- Abbildung 15:** (a-f) Bildanalyse der vaskulären Morphometrie. 63
- Abbildung 16:** Darstellung der Herstellung der 100 %igen Zigarettenrauchextrakt-Lösung. Eine 3R4F-Zigarette wurde für eine Minute unter Saugen der Pumpe abgeraucht wobei der Primärzigarettenrauch über den Schlauch direkt ins Medium geleitet wurde. 78
- Abbildung 17:** Dynamische Compliance-Messung in WT und *Nox1* Knockout Mäusen nach a) 3 und b) 8 Monaten Zigarettenrauchexposition. a) n=12 Mäuse pro Gruppe (ausgenommen in der Gruppe *Nox1*^{-/-} 3 Monate Zigarettenrauchexposition n=11). b) n=10 pro Gruppe (ausgenommen in der Gruppe *Nox1*^{-/-} 8 Monate Raumlufteexposition n=13 und n=12 in der Gruppe WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition). Statistik: a-b) 2 × 2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelten Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test 81
- Abbildung 18:** Alveolarmorphometrische Analyse von WT- und *Nox1*^{-/-}-Lungen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Die alveoläre Morphometrie wurde an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Lungenschnitten durchgeführt, um den Effekt der Zigarettenrauchexposition auf das Lungenparenchym in WT- und *Nox1*^{-/-}-Mäusen zu untersuchen. Dargestellt sind die Parameter a) Gesamtluftraum der Alveolen, b) mittlerer Abstand zwischen Alveolarsepten und c) die Septendicke. a-b) n=9 Lungen pro Gruppe (8-monatige Raumlufte-exponierte WT-Mäuse und 8-monatige Raumlufte-exponierte *Nox1*^{-/-}-Mäuse), ausgenommen sind 8-monatige Zigarettenrauch-exponierte WT-Mäuse n=6 und 8-monatige Zigarettenrauch-exponierte *Nox1*^{-/-}-Mäuse n=8. C) jeweils n=9 für Gruppen in Raumlufte, n=6 Lungen in der Gruppe WT 8-monatige Zigarettenrauchexposition und n=8 Lungen in der Gruppe

- NoxoI^{-/-}* 8-monatige Zigarettenrauchexposition. Statistik: a und c) 2×2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test, b) 2×2 faktorielles Modell bezogen auf logit-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test. 83
- Abbildung 19:** Repräsentative Bilder der HE-Färbung von der alveolären Morphometrie in Lungenschnitten nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Die Visualisierung der Alveolen erfolgte durch die HE-Färbung. a) und c) 8 Monate ohne Zigarettenrauchexposition (WT und *NoxoI^{-/-}*-Mäuse) sowie b) und d) beide Genotypen nach Zigarettenrauchexposition. 84
- Abbildung 20:** Stereologische Analyse von Lungenparaffinschnitten in WT- und *NoxoI^{-/-}*-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Dargestellt ist die Anzahl der Alveolen nach 8 Monaten Zigarettenrauchexposition. $n = 5$ pro Gruppe. Statistik: 2×2 faktorielle quasi-Poisson Modell. P- Werte stamen aus dem Chi-Quadrat Tests. Daten werden als individuelle Datenpunkte gezeigt, Mittelwert \pm SEM. 85
- Abbildung 21:** Quantifizierung des rechtsventrikulären Drucks und Rechtsherzgewichtsveränderungen in WT- und *NoxoI^{-/-}*-Mäusen. a) rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck (RVSP) nach 3 Monaten. b) rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck (RVSP) nach 8 Monaten. c) Verhältnis vom rechten Ventrikel zum linken Ventrikel plus Septum nach 3 Monaten und d) die Herzratio von rechten Ventrikel zum linken Ventrikel plus Septum nach 8 Monaten. a) $n = 12$ Mäuse pro Gruppe, ausgenommen $n = 10$ in der Gruppe *NoxoI^{-/-}* 3 Monate Zigarettenrauchexposition, b) $n = 10$ Mäuse pro Gruppe, ausgenommen $n = 12$ bei *NoxoI^{-/-}* 8 monatige Raumlufteexposition, c) $n = 12$ Mäuse pro Gruppe, ausgenommen $n = 11$ in der Gruppe *NoxoI^{-/-}* 3 Monate Zigarettenrauchexposition. d) $n = 10$ Mäuse pro Gruppe (WT 8 Monte Raumlufte), ausgenommen $n = 12$ in der Gruppe WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition und $n = 6$ in den beiden *NoxoI^{-/-}*-Gruppen. Statistik: a) P-Werte stammen vo Tukey HSD Test, unter Verwendung der log-umgewandelten Daten. b-d) 2×2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test. 86
- Abbildung 22:** Echokardiographische Endpunktmessung der systolischen Funktion des rechten Ventrikels im Modell der Zigarettenrauchexposition. a) Messung des Herzminutenvolumens (CO) und b) systolische Funktion des rechten Ventrikels (TAPSE). c) Abschätzung des rechtsventrikulären systolischen Blutdruckes durch Messung des pulmonalarteriellen Flusses (PAAT). a) $n = 10$ Mäuse pro WT-Gruppe, $n = 13$ Mäuse pro *NoxoI^{-/-}*-Gruppen, b) $n = 9$ in der Gruppe 8 monatige Raumlufte-exponierte WT Mäuse, $n = 10$ in der Gruppe 8 monatige Zigarettenrauch-exponierte WT-Mäuse, $n = 13$ in der Gruppe 8 monatige Raumlufte-exponierte *NoxoI^{-/-}*-Mäuse und $n = 11$ in der Gruppe 8 monatige Zigarettenrauch-exponierte *NoxoI^{-/-}*-Mäuse. c) $n = 11$ Mäuse pro WT-Gruppe und $n = 13$ pro *NoxoI^{-/-}*-Gruppe. a-c) 2×2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test. 88
- Abbildung 23:** Echokardiographische Bilder nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition/Raumluftebehandlung. Repräsentative Bilder der vorgenommenen Messungen, dargestellt in der Kurzachsenansicht des pulmonalen Flusses und der TAPSE a) der WT-Mäuse nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition, b) der *NoxoI^{-/-}*-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und c) die Kontrollgruppe ohne Zigarettenrauchexposition 89
- Abbildung 24:** Prozentuale Verteilung aller Muskularisierungsgrade in der Gesamtheit der kleinen pulmonalen Gefäße (20-70 μm) nach a) 3-monatiger Zigarettenrauchexposition und b) nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. a) $n = 4$ pro Gruppe. b) $n = 5$ pro Gruppe. Statistik: a-b) 2×2 faktorielles Modell bezogen auf logit-umgewandelte Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen T-Test. Daten werden als Einzelwerte repräsentiert, Mittelwert \pm SEM. 91
- Abbildung 25:** Repräsentative histologische Bilder des Muskularisierungsgrades pulmonaler Gefäße nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition in WT- und *NoxoI^{-/-}*-Mäusen. Paraffinschnitte wurden mit den Antikörpern gegen α -Smooth Muscle Actin und von-Willebrand-Faktor gefärbt. Der Muskularisierungsgrad wurde visulalisiert. Pro behandelte Gruppe ist ein Bild dargestellt. Rechts werden representative Bilder zweier Gefäße aus der linken Abbildung gezeigt. 92
- Abbildung 26:** Veränderung des mittleren Gefäßlumens in den pulmonalen Gefäßen nach Zigarettenrauchexposition. a) Zur Ermittlung der medialen Wandstärke wurden die Lungen nach Elastica-Kernechtrot gefärbt; $n = 3$ pro Gruppe. b-e)

repräsentative Bilder der Elastica-Kernechtrot-Färbung zur Visualisierung der Gefäßwandstärke. Pro Gruppe ist ein Bild abgebildet. Rechts wird jeweils eine vergrößerte Darstellung der markierten Gefäße aus der linken Abbildung gezeigt. Statistik: a) 2×2 faktorielles Modell bezogen auf log-umgewandelten Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test. Daten werden als Einzelwerte repräsentiert, Mittelwert \pm SEM. 94

Abbildung 27: Immunhistologische Quantifizierung des Proliferationsmarkers *PCNA* in WT- und *Noxo1*^{-/-}-deletierten Mäuselungen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. In Paraffin eingebetteten Lungen wurde eine spezifische immunohistologische Färbung gegen den Proliferationsmarker *PCNA* durchgeführt und die detaillierte Verteilung der *PCNA*-positiven Zellen in den verschiedenen Lungenkompartimenten ermittelt. n=5 Mäuse in den Raumlufte-xponierten Gruppen (RE), n=4 Mäuse in den Zigarettenrauch-eponierten Gruppen (ZE). Statistik: 2×2 allgemein lineares Modell der quasi-Poisson Familie mit log-Link. P-Werte stammen aus dem Chi-Quadrat Test. Abkürzungen (RE) = Raumlufteexposition, (ZE) = Zigarettenrauchexposition. 96

Abbildung 28: Auswirkungen einer *Noxo1*^{-/-}-Deletion auf die Apoptose- sowie Proliferationsrate in murinen ATII-Zellen. Mittels der Caspase 3/7-Aktivität wurde die Apoptoserate in a) ATII-Zellen unter Kontrollbedingungen und b) in ATII-Zellen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition ermittelt. Pro Tier wurden Duplikate gemessen. Staurosporin (Positivkontrolle, nicht im Graphen gezeigt); Zellen unbehandelt (diente als Negativkontrolle, nicht im Graphen gezeigt). Mittels des BrdU-Assays wurde die c) Proliferationsrate in ATII-Zellen unter Kontrollbedingungen gemessen. Pro Tier wurden Duplikate gemessen. Nur Zellen unbehandelt (diente als Negativkontrolle, nicht im Graphen gezeigt). a) n=4 beim WT und n=5 beim *Noxo1*^{-/-} (jeweils unabhängige Zellisolierungen beim WT und *Noxo1*^{-/-}), b) n=3 pro Gruppe, c) n=6 biologische Wiederholungen beim WT und n=8 beim *Noxo1*^{-/-} (biologische Wiederholungen), von 2–3 Zellisolierungen. Statistik: a-c) P-Werte stammen aus dem Tukey HSD Test unter Verwendung der log-umgewandelten Daten. Die Daten sind als Einzelwerte (Mittelwert \pm SEM) dargestellt. 97

Abbildung 29: Auswirkungen einer *Noxo1*^{-/-}-Deletion auf die Apoptose- sowie Proliferationsrate in murinen PSMC. Mittels der Caspase 3/7 Aktivität wurde die a) Apoptoserate in PSMCs unter Kontrollbedingungen gemessen. Staurosporin (diente als Positivkontrolle, wird aber nicht in Graphen dargestellt), Zellen allein (dienten als Negativkontrolle, nicht Graphen gezeigt). Mittels des BrdU Assays wurde die b) Proliferationsrate in PSMCs unter Kontrollbedingungen gemessen. n=6 jeweils beim WT (unabhängige Zellisolierungen) und n=7 jeweils für *Noxo1*^{-/-}, b) n=8 biologische Wiederholungen beim WT, n=7 biologische Wiederholungen beim *Noxo1*^{-/-} (von 2–3 verschiedenen Zellisolierungen). Statistik: a) und b) P-Werte stammen aus dem Tukey HSD Ttest unter Verwendung von log-umgewandelten Daten. Die Daten sind als individuelle Datenpunkte mit Mittelwert \pm SEM aufgeführt. 98

Abbildung 30: Anzahl inflammatorischer Zellen in der BAL von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. In der prozessierten BAL, dem Zytospin (je 100 μ l BAL), wurden inflammatorische Zellen mit Hämalaun gefärbt, visualisiert und gezählt (n=6 pro Gruppe). Statistik: 2×2 allgemein lineares Modell der quasi-Poisson Familie mit log-Link, P-Werte stammen aus dem Chi-Quadrat Test. 99

Abbildung 31: FMT- μ CT-Analyse nach 8 Monaten Zigarettenrauchexposition in WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. Repräsentative Bilder des aufgenommenen Fluoreszenzsignals während der FMT- μ CT-Untersuchung in der Lunge von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach Zigarettenrauchexposition oder unter Kontrollbedingungen. In a) nach *i.v.* Applikation von MMPsense 750 FAST; Messung fand nach 6 Stunden statt. b) Annexin Vivo 750; Messung fand 2 Stunden nach *i.v.* Injektion statt. c) Quantitative Messung einer *in vivo* Aktivität von MMPs in der Lunge nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition, nach *i.v.* Applikation der Substanz MMPsense750 FAST und d) Quantitative Analyse des proapoptose-Signals in der Lunge nach *i.v.* Applikation von der fluoreszenzmarkierten Substanz Annexin Vivo 750 nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Die Leber diente als Positivkontrolle für das Fluoreszenzsignal. Für die Messung wurden c) je n=7 Mäuse in den WT Gruppen und je n=5 Mäuse in den *Noxo1*^{-/-}, d) n=7 Mäuse in der 8-monatigen Raumlufte-behandelten WT-Gruppe, n=5 Mäuse in der 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT-Gruppe, n=3 Mäuse in der 8-monatigen Raumlufte-exponierten *Noxo1*^{-/-}-Gruppe und n=4 Mäuse in der 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten *Noxo1*^{-/-}-Gruppe. Statistik c) und d): 2×2 allgemein lineares Modell aus der quasi-Poisson Familie mit log-Link. P-Werte stammen aus dem Chi-Quadrat Test. 102

- Abbildung 32:** Zelluläre Superoxid Quantifizierung mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie in PAMSCs. a) gemessenes Superoxid (CMH+pSOD) aus isolierten PAMSCs von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT-Mäusen. b) gemessenes Superoxid aus mit 10 %igem CSE (24 Stunden) behandelten PAMSCs (CMH+pSOD), isoliert von WT und *Noxol^{-/-}*-Mäusen. (AU)= Arbitrary Units, a) n=6 (biologische Duplikate), aus 2–3 unabhängigen Zellisolierungen b) PAMSCs, n=5 je WT-Gruppe, aus unabhängigen Zellisolierungen. n=4 in der Gruppe *Noxol^{-/-}* ohne CSE-behandelte (-) und n=3 in der Gruppe *Noxol^{-/-}* mit CSE Behandlung (+). Statistik: a) P-werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test und b) 2 × 2 faktorielles Modell. P -Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test. 104
- Abbildung 33:** Zelluläre Superoxid Quantifizierung mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie in ATII-Zellen. A) Isolierte ATII-Zellen von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten Mäusen, verglichen mit 8-monatigen Raumluf-exponierten ATII-Zellen. a) n=9 für WT Raumlufexposition und n=8 Zigarettenrauchexposition (biologische Duplikate auf von 2–3 Zellisolierungen), b) ATII-Zellen aus WT und *Noxol^{-/-}*-Mäusen mit oder ohne CSE-Behandlung (in vitro). AU, arbitrary units, (n=7 in den Gruppen ohne CSE-Behandlung und n=6 in den Gruppen mit CSE-Behandlung. Statistik: a) P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test, b) 2 × 2 faktorielles Modell. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test 105
- Abbildung 34:** H₂O₂-Messung mittels des AmplexRed[®]-Assays in ATII-Zellen. Intra- und extrazellulär detektiertes Wasserstoffperoxid in isolierten ATII-Zellen aus 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxol^{-/-}*-Mäusen, n=3) Statistik: 2 × 2 faktorielles Modell unter Verwendung von log-umgewandelten Daten. P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test. 106
- Abbildung 35:** 3-Nitrotyrosin-Analyse in WT- und *Noxol^{-/-}*-Mäusen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Proteinexpression von 3-Nitrotyrosin-Produkten mittels Western Blot Analyse. a) Densitometrische Auswertung der 3-Nitrotyrosin-Expression, mit Normalisierung zum β-Aktin. Quantifizierung erfolgte aus unabhängigen 3 Blots, n=7 Lungen beim WT 8 Monate Raumluf, n=8 Lungen beim WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition sowie n=8 beim *Noxol^{-/-}* 8 Monate Raumlufexposition, n=7 Lungen *Noxol^{-/-}* 8 Monate Zigarettenrauchexposition. B) Repräsentativer Blot. Statistik: 2 × 2 faktorielles linear gemischtes Modell unter Verwendung von log-umgewandelten Daten. Die Membran wurde als zufälliger Faktor genutzt. P-Werte stammen aus dem Chi-Quadrat Test. Daten werden als Einzelwerte gezeigt (Mittelwert ± SEM). 107
- Abbildung 36:** Vorkommen nitrierter Proteine im Lungenhomogenat von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxol^{-/-}*-Mäusen nach massenspektrometrischer Analyse. Die für die Analyse benötigten Banden wurden nach der SDS-Gelelektrophorese mittels eines Skalpells ausgeschnitten und an die Firma Alphalyse für die LC-MS/MS (massenspektrometrische Analyse) geschickt. a) prozentuale Darstellungen in den ausgeschnittenen Banden vorkommender nitrierter Proteine. Ergebnisse wurden prozentual nach Häufigkeit (%) eines vorkommenden nitrerten Proteins pro n-Zahl pro Gruppe kategorisiert. (n=4 pro Gruppe). ACTA2=Alpha-Actin-2, ALDH1A1=Aldehyde Dehydrogenase, ALODA=Aldolase A, CCT2=Chaperonin Containing subunit 2, CS=Citratsynthase, DPSYL2=Dihydropyrimidinase Like 2, G6PDX=Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase X-linked, GLUD1=Glutamatdehydrogenase, GPI=Glucose-6-Phosphat Isomerase, Gsn=Gelsolin, GSTM1=Glutathione S-Transferase, HBA-A2=Hemoglobin Alpha, Adult Chain 2, HSP90ab1=Heat Shock Protein 90, MSN=Moesin, PRDX6=Peroxiredoxin 6, PKM=Pyruvate Kinase, VIM=Vimentin, WARS=Tryptophan- tRNA Ligase 108
- Abbildung 37:** Nitrat/Nitrit-Analysen in der BAL von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxol^{-/-}*-Mäusen. Bestimmung von Nitrit und Nitrat in der BAL nach a-b) nach 8 Monaten. Stickstoffmonoxid Synthase-Assay im Lungenhomogenat von 8-monatigen Zigarettenrauch-exponierten Mäusen. a) n=5 Lungen pro Gruppe, ausgenommen n=7 Lungen beim WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition und b) n=5 Lungen pro Raumluf Gruppe, ausgenommen n=7 Lungen in der Gruppe WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition, n=4 Lungen beim *Noxol^{-/-}* 8 Monate Zigarettenrauchexposition. Statistik: 2 × 2 faktorielles Modell unter Verwendung von log-umgewandelten Daten. P-Werte stammen aus einem zweiseitigen t-Test. 110
- Abbildung 38** *Mmp12* und *Timp3* Genexpressionsanalyse im Lungenhomogenat von chronisch Zigarettenrauchexponierten Mäusen. a) *Timp3* mRNA-Expression nach 3 Monaten und *Mmp12*-, *Tlr4* mRNA-Expression nach 8 Monaten im WT-

und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. Die Genexpressionsanalyse wurde mittels rtPCR in murinen Lungenhomogenat durchgeführt. mRNA-Expression ist zur *Pbgd* (Porphobilinogen deaminase) normalisiert.). *Timp3*: n=6 Lungen pro Gruppe, *Tlr4*: n=5 beim WT 8 Monate RaumlufTEXposition, n=4 beim WT 8 Monate Zigarettenrauchexposition, n=6 bei beiden *Noxo1*^{-/-}. *Mmp12*: n=6 pro Gruppe, außer n=5 beim *Noxo1*^{-/-} 8 Monate RaumlufTEXposition. Statistik: 2 × 2 faktorielles Modell basierend auf ΔC-Werten (analysiert pro Gen). P-Werte stammen aus dem zweiseitigen t-Test. 111

Abbildung 39: Relative Genexpression von ausgewählten Genen in isolierten Primärzellen von WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach CSE- Behandlung. a) ATII-Zellen und PASMCs von WT-Mäusen und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen nach einer CSE-Behandlung (10 %, 24 Stunden) n=3 pro Gruppe pro Gen *Tlr4*, *Ki67*, *Bcl*= *B-cell lymphoma 2* *Nep*= Neprilysin, *Hmox1*=Hämoxxygenase 1. Statistik: 2 × 2 faktorielles Modell basierend auf ΔC-Werten (pro Gen analysiert). P-Werte vom zweiseitigen t-Test. 113

Abbildung 40: *Pathway*-Analysen nach 3 und 8 Monaten Zigarettenrauchexposition in den alveolären Septen und in den pulmonalen Gefäßen von WT-Mäusen und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. Genexpressionsmuster spezifischer *Pathways* nach 3 Monaten a) in den Septen b) pulmonalen Gefäßen und nach 8 Monaten in c) Septen und d) pulmonalen Gefäßen. Der p-Wert ist durch Graustufen dargestellt, n=5 Lungen pro Gruppe. KO= *Knockout* WT=Wildtyp, 115

Abbildung 41: Interaktions-Plots der Microarray-Analyse in den alveolären Septen der WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäuse. Dargestellt ist die Expression der Gene a) *Casp3* b) *Ccl3* und c) *Mmp12* nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition bzw. RaumlufTEXposition. Die Regulation (als log₂ FC) ergibt sich jeweils aus der Differenz der gezeigten Expressionswerte. (*Casp3*=*Caspase 3*, *Ccl3*=C-C Motif Chemokine Ligand 3, *Mmp12*= Matrix Metalloproteinase 12). 117

Abbildung 42: Interaktions-Plots der Microarray-Analyse in den Gefäßen der WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. Darstellung der Expression von a) *Mapk14* b) *Mmp24* und c) *Mmp17* nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition bzw. RaumlufTEX-Behandlung in den pulmonalen Gefäßen. Die Regulation (als log₂ FC) ergibt sich jeweils aus der Differenz der gezeigten Expressionswerte. (*Mapk14*=Mitogen-Activated Protein Kinase 14, *Mmp24*=Matrix Metalloroteinase 24, *Mmp17*= Matrix Metalloproteinase 17). 118

Abbildung 43: Kompartiment- und zeitspezifische Transkriptom-Analyse zur Identifizierung von *Noxo1*^{-/-}-abhängigen Schutzmechanismen einer Emphysem- und PH-Entwicklung. Microarray-Daten von mikrodisektierten pulmonalen Gefäßen sowie alveolären Septen von 3- und 8-monatiger Zigarettenrauch-exponierten WT- und *Noxo1*^{-/-}-Mäusen. a) Transkriptionsfaktoren, Gensets mit Bindungsstellen für angegebene TF (Transkriptionsfaktoren). b) microRNAs, analysierte Gencluster mit zugehöriger miR. (je n=5), Signifikanz wird als Farbtiefe angegeben. miR= microRNA. 119

Abbildung 44: Überblick über die durch Zigarettenrauch-induzierte veränderte Protein-Regulationen und Signalprozesse, die einen Einfluss auf die Entwicklung einer PH und einem Emphysem ausüben. Durch eine *Noxo1*-Deletion wird dies verhindert 146

Literaturverzeichnis

- ¹ Abboud, T. (2008). Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 4. 361–367.
- ² Adeloye, D.; Chua, S.; Lee, C.; Basquill, C.; Papana, A.; Theodoratou, E.; Nair, H.; Gasevic, D.; Sridhar, D.; Campbell, H.; Chan, K.; Sheikh, A.; Rudan, I. (2015). Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *Journal of global health*. 2. 20415.
- ³ Aderem, A., Underhill, D. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*. 593–623.
- ⁴ Agell, N.; Bachs, O.; Rocamora, N.; Villalonga, P. (2002). Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cellular Signalling*. 8. 649–654.
- ⁵ Ago, T.; Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R.; Ito, T.; Kohda, D.; Sumimoto, H. (2003). Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 8. 4474–4479.
- ⁶ Agustí, A.; Noguera, A.; Sauleda, J.; Sala, E.; Pons, J.; Busquets, X. (2003). Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *The European Respiratory Journal*. 2. 347–360.
- ⁷ Alderton, W.; Cooper, C.; Knowles, R. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*. 3. 593–615.
- ⁸ Altenhöfer, S.; Kleikers, P.; Radermacher, K.; Scheurer, P.; Rob, H.; Schiffers, P.; Ho, H.; Wingler, K.; Schmidt, H. (2012). The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 14. 2327–2343.
- ⁹ Ambasta, R.; Kumar, P.; Griendling, K.; Schmidt, H.; Busse, R.; Brandes, R. (2004). Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 44. 45935–45941.
- ¹⁰ Ambasta, R.; Schreiber, J.; Janiszewski, M.; Busse, R.; Brandes, R. (2006). Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. *Free Radical Biology & Medicine*. 2. 193–201.

- ¹¹ An, C.; Wang, X.; Lam, H.; Ifedigbo, E.; Washko, G.; Ryter, S.; Choi, A. (2012). TLR4 deficiency promotes autophagy during cigarette smoke-induced pulmonary emphysema. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 9. 748-57.
- ¹² Anderson, A.; Foraker, A. (1973). Centrilobular emphysema and panlobular emphysema: two different diseases 1. *Thorax*. 5. 547–550.
- ¹³ Angelis, N.; Porpodis, K.; Zarogoulidis, P.; Spyrtos, D.; Kioumis, I.; Papaiwannou, A.; Pitsiou, G.; Tsakiridis, K.; Mpakas, A.; Arikas, S.; Tsiouda, T.; Katsikogiannis, N.; Kougioumtzi, I.; Machairiotis, N.; Argyriou, M.; Kessisis, G.; Zarogoulidis, K. (2014). Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Thoracic Disease*. 6. 167-72.
- ¹⁴ Angelova, P.; Abramov, A. (2016). Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radical Biology & Medicine*. 81–85.
- ¹⁵ Antunes, M.; Rocco, P. (2011). Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 4. 1385–1396.
- ¹⁶ Anzalone, G.; Gagliardo, R.; Bucchieri, F.; Albano, G.; Siena, L.; Montalbano, A.; Bonanno, A.; Riccobono, L.; Pieper, M.; Gjomarkaj, M.; Profita, M. (2016). IL-17A induces chromatin remodeling promoting IL-8 release in bronchial epithelial cells: Effect of Tiotropium. *Life Sciences*. 152. 107–116.
- ¹⁷ Aoshiba, K.; Yokohori, N.; Nagai, A. (2003). Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 5. 555–562.
- ¹⁸ Apel, K.; Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55. 373–399.
- ¹⁹ Arakawa, N.; Katsuyama, M.; Matsuno, K.; Urao, N.; Tabuchi, Y.; Okigaki, M.; Matsubara, H.; Yabe-Nishimura, C. (2006). Novel transcripts of Nox1 are regulated by alternative promoters and expressed under phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. *The Biochemical Journal*. 2. 303–310.
- ²⁰ Arcasoy, S.; Christie, J.; Ferrari, V.; Sutton, M.; Zisman, D.; Blumenthal, N.; Pochettino, A.; Kotloff, R. (2003). Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in patients with advanced lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 5. 735–740.

- ²¹ Arnold, R.; He, J.; Remo, A.; Ritsick, D.; Yin-Goen, Q.; Lambeth, J.; Datta, M.; Young, A.; Petros, J. (2007). Nox1 expression determines cellular reactive oxygen and modulates c-fos-induced growth factor, interleukin-8, and Cav-1. *American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology*. 6. 2021–2032.
- ²² Austin, V.; Crack, P.; Bozinovski, S.; Miller, A.; Vlahos, R. (2016). COPD and stroke: are systemic inflammation and oxidative stress the missing links? *Clinical Science*. 13. 1039–1050.
- ²³ Babior, B. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *American Journal of Medicine*. 109. 33–44.
- ²⁴ Bals, R.; Hiemstra, P. (2004). Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European Respiratory Journal*. 2. 327–333.
- ²⁵ Bánfi, B.; Clark, R.; Steger, K.; Krause, K. (2003). Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *The Journal of Biological Chemistry*. 6. 3510–3513.
- ²⁶ Bánfi, B.; Maturana, A.; Jaconi, S.; Arnaudeau, S.; Laforge, T.; Sinha, B.; Ligeti, E.; Demaurex, N.; Krause, K. H. (2000). A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science*. 5450. 138–142.
- ²⁷ Bao, M.; Feng, X.; Zhang, Y.; Lou, X.; Cheng, Yu; Zhou, H. (2013). Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 11. 23086–23102.
- ²⁸ Barberà, J.; Peinado, V.; Santos, S. (2003). Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*. 5. 892–905.
- ²⁹ Barnes, P. (2000). Chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine*. 4. 269–280.
- ³⁰ Barnes, P. (2003). New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annual Review of Medicine*. 54. 113–129.
- ³¹ Barnes, P. (2004). Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacological Reviews*. 4. 515–548.
- ³² Barnes, P. (2004). Small airways in COPD. *The New England Journal of Medicine*. 26. 2635–2637.

- ³³ Barnes, P. (2014). Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinics in Chest Medicine*. 35. 71–86.
- ³⁴ Barnes, P. (2014). Chronic obstructive pulmonary disease. *Clinics in Chest Medicine*. 35. 13.
- ³⁵ Barnes, P. (2017). GOLD 2017: A New Report. *Chest*. 2. 245–246.
- ³⁶ Barnes, P.; Shapiro, S.; Pauwels, R. (2003). Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal*. 4. 672–688.
- ³⁷ Barry, M.; Bleackley, R. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*. 2. 401–409.
- ³⁸ Basu, S.; Fenton, M. (2004). Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 5. L887-92.
- ³⁹ Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.; Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*. 1. 1–48.
- ⁴⁰ Beckman, J. (2009). Understanding peroxynitrite biochemistry and its potential for treating human diseases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2. 114–116.
- ⁴¹ Bedard, K.; Krause, K. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 1. 245–313.
- ⁴² Bernard, K.; Hecker, L.; Luckhardt, T.; Cheng, G.; Thannickal, V. (2014). NADPH oxidases in lung health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 17. 2838–2853.
- ⁴³ Bernardo, I.; Bozinovski, S.; Vlahos, R. (2015). Targeting oxidant-dependent mechanisms for the treatment of COPD and its comorbidities. *Pharmacology & Therapeutics*. 155. 60–79.
- ⁴⁴ Bernasconi, L.; Ramenzoni, L.; Al-Majid, A.; Tini, G.; Graber, S.; Schmidlin, P.; Irani, Sarosh (2015). Elevated Matrix Metalloproteinase Levels in Bronchi Infected with Periodontopathogenic Bacteria. *Public Library of Science Pathogens*. 12. 0144461.
- ⁴⁵ Bernstein J.; Alexis N.; Bacchus H.; Bernstein IL.; Fritz P.; Horner E.; Li N.; Mason S.; Nel A.; Oullette J.; Reijula K.; Reponen T.; Seltzer J.; Smith A.; Tarlo SM. (2008). The health effects of non-industrial indoor air pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 121. 585–591.
- ⁴⁶ Blanchette, C.; Gross, N.; Altman, P. (2014). Rising Costs of COPD and the Potential for Maintenance Therapy to Slow the Trend. *American health & Drug Benefits*. 2. 98–106.

- ⁴⁷ Block, K.; Gorin, Y. (2012). Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. *Nature Reviews. Cancer.* 9. 627–637.
- ⁴⁸ Bonnefoy-Berard, N.; Aouacheria, A.; Verschelde, C.; Quemeneur, L.; Marçais, A.; Marvel, J. (2004). Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2-3. 159–168.
- ⁴⁹ Bosken, C. H.; Hards, J.; Gatter, K.; Hogg, J. C. (1992). Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *The American Review of Respiratory Disease.* 145. 911–917.
- ⁵⁰ Bracke, K.; D'hulst, A.; Maes, T.; Moerloose, K.; Demedts, I.; Lebecque, S.; Joos, G.; Brusselle, G. (2006). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *Journal of Immunology.* 7. 4350–4359.
- ⁵¹ Brand, M. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology & Medicine.* 100. 14–31.
- ⁵² Brandes, R. (2010). Vascular functions of NADPH oxidases. *Hypertension.* 1. 17–21.
- ⁵³ Brandes, R.; Kreuzer, J. (2005). Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular Research.* 1. 16–27.
- ⁵⁴ Brandes, R.; Schröder, K. (2008). Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 1. 15–19.
- ⁵⁵ Brandes, R.; Weissmann, N.; Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases in mechano-transduction: mechanisms and consequences. *Antioxidants & Redox Signaling.* 6. 887–898.
- ⁵⁶ Brindicci, C; Ito, K.; Torre, O.; Barnes, P.; Kharitonov, S. (2009). Effects of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on nitric oxide production and its metabolites in healthy control subjects, healthy smokers, and COPD patients. *Chest.* 135. 353–367.
- ⁵⁷ Browne, R.; Mannino, D.; Khoury, M. (1996). Alpha 1-antitrypsin deficiency deaths in the United States from 1979-1991. An analysis using multiple-cause mortality data. *Chest.* 1. 78–83.
- ⁵⁸ Buist, A.; Vollmer, W.; McBurnie, M.A (2008). Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The burden of obstructive lung disease (BOLD) initiative. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* 12. 703–708.

- ⁵⁹ Buist, S.; McBurnie, M.; Vollmer, W.; Gillespie, S.; Burney, P.; Mannino, D.; Menezes, A.; Sullivan, S.; Todd, L.; Weiss, K.; Jensen, R.; Marks, G.; Gulsvik, A.; Nizankowska-Mogilnicka, E. (2007). International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*. 370. 741–750.
- ⁶⁰ Burgel, P. (2011). The role of small airways in obstructive airway diseases. *European Respiratory Review*. 119. 23–33.
- ⁶¹ Busso, I.; Silva, G.; Carreras, H. (2016). Organic compounds present in airborne particles stimulate superoxide production and DNA fragmentation: role of NOX and xanthine oxidase in animal tissues. *Environmental Science and Pollution Research International*. 23. 16653–16660.
- ⁶² Caito, S.; Aschner, M. (2015). Mitochondrial Redox Dysfunction and Environmental Exposures. *Antioxidants & Redox Signaling*. 6. 578–595.
- ⁶³ Calabrese, F.; Giacometti, C.; Beghe, B.; Rea, F.; Loy, M.; Zuin, R.; Marulli, G.; Baraldo, S.; Saetta, M.; Valente, M. (2005). Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respiratory Research*. 6. 14.
- ⁶⁴ Campbell, N.; Reece, J. 2006. *Biologie*. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag; 1996.
- ⁶⁵ Caporali A, Emanuelli C. (2011). MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascular Pharmacology*. 4. 79–86.
- ⁶⁶ Casserly, B.; Klinger, J. (2009). Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent. *Drug Design, Development and Therapy*. 3. 269–287.
- ⁶⁷ Cataldo, D.; Tournoy, K.; Vermaelen, K.; Munaut, C.; Foidart, J.; Louis, R.; Noël, A.; Pauwels, R. (2002). Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen-induced airway inflammation. *The American Journal of Pathology*. 2. 491–498.
- ⁶⁸ Cawston, T.; Carrere, S.; Catterall, J.; Duggleby, R.; Elliott, S.; Shingleton, B.; Rowan, A. (2001). Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Foundation symposium*. 205-18; discussion 218-28.

- ⁶⁹ Cedikova, M.; Pitule, P.; Kripnerova, M.; Markova, M.; Kuncova, J. (2016). Multiple roles of mitochondria in aging processes. *Physiological research. Supplementum 5*. 519.
- ⁷⁰ Cevik, M.; Katsuyama, M.; Kanda, S.; Kaneko, T.; Iwata, Kazumi; Ibi, M.; Matsuno, K.; Kakehi, T.; Cui, W.; Sasaki, Mika; Yabe-Nishimura, C. (2008). The AP-1 site is essential for the promoter activity of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme: Possible involvement of the ERK1/2-JunB pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2. 351–355.
- ⁷¹ Chambard, J.; Lefloch, R.; Pouysségur, J.; Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 8. 1299–1310.
- ⁷² Chamseddine, A.; Miller, F. (2003). Gp91phox contributes to NADPH oxidase activity in aortic fibroblasts but not smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 6. 2284-9.
- ⁷³ Chamulitrat W.; Schmidt R.; Tomakidi P.; Stremmel W.; Chunglok W.; Kawahara T.; Rokutan K. (2003). Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. *Oncogene*. 22. 6045-53.
- ⁷⁴ Chang, S.; Jiang, W.; Smith, I.; Glazer, C.; Sun, W.; Mithani, S.; Califano, J. (2010). Chronic cigarette smoke extract treatment selects for apoptotic dysfunction and mitochondrial mutations in minimally transformed oral keratinocytes. *International Journal of Cancer*. 1. 19–27.
- ⁷⁵ Chaouat, A.; Bugnet, A.; Kadaoui, N.; Schott, R.; Enache, I.; Ducoloné, A.; Ehrhart, M.; Kessler, R.; Weitzenblum, E. (2005). Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2. 189–194.
- ⁷⁶ Chaudhary, S.; Nanda, S.; Tripathi, A.; Sawlani, K.; Gupta, K.; Himanshu, D.; Verma, A. (2016). Prevalence of psychiatric comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Lung India*. 2. 174–178.
- ⁷⁷ Chaudhuri, R.; McSharry, C.; Brady, Je.; Donnelly, I.; Grierson, C.; McGuinness, S.; Jolly, L.; Weir, C.; Messow, C.; Spears, M.; Miele, G.; Nocka, K.; Crowther, D.; Thompson, J.; Brannigan, M.; Lafferty, J.; Sproule, Michael; MacNee, William; Connell, Martin; Murchison, John T.; Shepherd, Malcolm C.; Feuerstein, Giora; Miller, Douglas K.; Thomson, Neil C. (2012). Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive

pulmonary disease and asthma: relationship to disease severity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 3. 655-663.

⁷⁸ Chen, G.; Goeddel, D. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 5573. 1634–1635.

⁷⁹ Chen, R. (2008). Passive smoking exposure and risk of COPD in China. *The Lancet*. 9608. 201.

⁸⁰ Chen, R. (2008). Passive smoking exposure and risk of COPD in China. *Lancet*. 371. author reply 201-2.

⁸¹ Chen, T.; Gokhale, J.; Shofer, S.; Kuschner, W. (2007). Outdoor air pollution: nitrogen dioxide, sulfur dioxide, and carbon monoxide health effects. *The American journal of the medical sciences*. 4. 249–256.

⁸² Chen W.; Shang W.; Adachi Y.; Hirose K.; Ferrari D.; Kamata T. (2008). A possible biochemical link between NADPH oxidase (Nox) 1 redox-signalling and ERp72. *Biochemical Journal*. 16. 55–63.

⁸³ Cheng, G.; Diebold, B.; Hughes, Y.; Lambeth, D. (2006). Nox1-dependent Reactive Oxygen Generation Is Regulated by Rac1. *Journal of Biological Chemistry*. 26. 17718–17726.

⁸⁴ Cheng, G.; Lambeth, J. (2004). NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *Journal of Biological Chemistry*. 279. 4737–4742.

⁸⁵ Cheng, G.; Lambeth, J. (2005). Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of Nox1 and Nox3. *Human Molecular Genetics*. 356. 118–126.

⁸⁶ Cheng G.; Cao Z.; Xu X.; Van Meir E.; Lambeth J. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Human Molecular Genetics*. 269. 131–140.

⁸⁷ Christman, B.; McPherson, C.; Newman, J.; King, G.; Bernard, G.; Groves, B.; Loyd, J. (1992). An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 2. 70–75.

⁸⁸ Churg, A.; Sin, D.; Wright, J. (2011). Everything prevents emphysema: are animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease any use? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 6. 1111–1115.

- ⁸⁹ Churg, A.; Wang, R.; Wang, X.; Onnervik, P.; Thim, K.; Wright, J. (2007). Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax*. 8. 706–713.
- ⁹⁰ Clemmensen N.; Jacobsen L.; Rørvig S.; Askaa B.; Christenson K.; Iversen M.; Jørgensen M.; Larsen M.; Van Deurs B.; Ostergaard O.; Heegaard N.; Cowland J.; Borregaard N. (2011). Alpha-1-antitrypsin is produced by human neutrophil granulocytes and their precursors and liberated during granule exocytosis. *European Journal of Haematology*. 86. 517–530.
- ⁹¹ Comhair, S.; Xu, W.; Ghosh, S.; Thunnissen, F.; Almasan, A.; Calhoun, W.; Janocha, A.; Zheng, L.; Hazen, S.; Erzurum, S. (2005). Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. *The American Journal of Pathology*. 3. 663–674.
- ⁹² Conlon, T.; Bartel, J.; Ballweg, K; Günter, S.; Prehn, C.; Krumsiek, J.; Meiners, S.; Theis, F.; Adamski, J.; Eickelberg, O.; Yildirim, A. (2016). Metabolomics screening identifies reduced L-carnitine to be associated with progressive emphysema. *Clinical Science*. 4. 273–287.
- ⁹³ Cooper, S.; Green, C.; Hodimont, E. (2015). A fluorescent bimolecular complementation screen reveals MAF1, RNF7 and SETD3 as PCNA-associated proteins in human cells. *Cell Cycle*. 4. 2509–2519.
- ⁹⁴ Corn P.; El-Deiry W. (2007). Microarray analysis of p53-dependent gene expression in response to hypoxia and DNA damage. *Cancer Biology and Therapy*. 12. 1858–1866.
- ⁹⁵ Corrigan, C.; Kay, A. (1991). The roles of inflammatory cells in the pathogenesis of asthma and of chronic obstructive pulmonary disease. *The American Review of Respiratory Disease*. 143. 1165–1168.
- ⁹⁶ Cosio, M.; Ghezzi, H.; Hogg, J. C.; Corbin, R.; Loveland, M.; Dosman, J.; Macklem, P. T. (1978). The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *The New England Journal of Medicine*. 23. 1277–1281.
- ⁹⁷ Cosio, M.; Saetta, M.; Agusti, A. (2009). Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine*. 23. 2445–2454.
- ⁹⁸ Curkendall S.; DeLuise C.; Jones J.; Lanes S.; Stang M.; Goehring E.; She D. (2006). Cardiovascular disease in patients with chronic obstructive pulmonary disease, Saskatchewan Canada cardiovascular disease in COPD patients. *Annals of Epidemiology*. 16. 63–70.

- ⁹⁹ D'Autreaux B.; Toledano M. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8. 813–824.
- ¹⁰⁰ de la Peña, S.; Sampieri, C.; Ochoa-Lara, M.; León-Córdoba, K.; Remes-Troche, J. (2014). Expression of the matrix metalloproteases 2, 14, 24, and 25 and tissue inhibitor 3 as potential molecular markers in advanced human gastric cancer. *Disease Markers*. 285906.
- ¹⁰¹ Debbabi, M.; Kroviarski, Y.; Bournier, O.; Gougerot-Pocidallo, M.; El-Benna, J.; Dang, P. (2013). NOXO1 phosphorylation on serine 154 is critical for optimal NADPH oxidase 1 assembly and activation. *Federation of American Societies For Experimental Biology*. 4. 1733–1748.
- ¹⁰² Dee U. Silverthorn. 2009. *Physiologie*. 4., aktualisierte Auflage. Pearson Studium. München.
- ¹⁰³ Demarco, V.; Whaley-Connell, A.; Sowers, J.; Habibi, J.; Dellsperger, K. (2010). Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World Journal of Cardiology*. 10. 316–324.
- ¹⁰⁴ Demedts, I.; Demoor, T.; Bracke, K.; Joos, G.; Brusselle, G. (2006). Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research*. 53.
- ¹⁰⁵ Demkow, U.; van Overveld, F. (2010). Role of elastases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: implications for treatment. *European Journal of Medical Research*. 27–35.
- ¹⁰⁶ Dempsey, E.; Wick, M.; Karoor, V.; Barr, E.; Tallman, D.; Wehling, C.; Walchak, S.; Laudi, S.; Le, M.; Oka, M.; Majka, S.; Cool, C.; Fagan, K.; Klemm, D.; Hersh, L.; Gerard, N.; Gerard, C.; Miller, Y. (2009). Nephylisin null mice develop exaggerated pulmonary vascular remodeling in response to chronic hypoxia. *The American Journal of Pathology*. 3. 782–796.
- ¹⁰⁷ Desouki M.; Kulawiec M.; Bansal S.; Das G.; Singh K. (2005). Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. *Cancer Biology and Therapy*. 4. 1367–1373.
- ¹⁰⁸ Di Stefano, A.; Capelli, A.; Lusuardi, M.; Balbo, P.; Vecchio, C.; Maestrelli, P.; Mapp, C.; Fabbri, L.; Donner, C.; Saetta, M. (1998). Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 4. 1277–1285.

- ¹⁰⁹ Dias-Junior, C. .; Cau, S.; Tanus-Santos, J. . (2008). Papel do óxido nítrico na regulação da circulação pulmonar: implicações fisiológicas, fisiopatológicas e terapêuticas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 6. 412–419.
- ¹¹⁰ Dikalov, S.; Griendling, K.; Harrison, D. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 49. 717–727.
- ¹¹¹ Domej, W.; Oettl, K.; Renner, W. (2014). Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 1207–1224.
- ¹¹² Drummond G.; Sobey C. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends in endocrinology and metabolism*. 25. 452–463.
- ¹¹³ Dupont, L.; Glynos, C.; Bracke, K.; Brouckaert, P.; Brusselle, G. (2014). Role of the nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 1. 1–6.
- ¹¹⁴ Dupuy, C.; Kaniewski, J.; Dème, D.; Pommier, J.; Virion, A. (1989). NADPH-dependent H₂O₂ generation catalyzed by thyroid plasma membranes. Studies with electron scavengers. *European Journal of Biochemistry*. 3. 597–603.
- ¹¹⁵ Dutta S, Rittinger K. (2010). Regulation of NOXO1 activity through reversible interactions with p22 and NOXA1. *Public Library of Science Pathogens*. 5. e10478.
- ¹¹⁶ Eckert, R. 2002. *Tierphysiologie*. Vol. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.
- ¹¹⁷ Egeblad, M.; Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews. Cancer*. 3. 161–174.
- ¹¹⁸ El-Benna, J.; Dang, P.; Gougerot-Pocidalo, M.; Marie, J.; Braut-Boucher, F. (2009). p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Experimental & Molecular Medicine*. 4. 217–225.
- ¹¹⁹ El-Benna, J.; Dang, P.; Gougerot-Pocidalo, M.; Elbim, C. (2005). Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*. 53. 199–206.
- ¹²⁰ Ellisen, L. (2010). Smoking and emphysema: the stress connection. *Nature Medicine*. 7. 754–755.

- ¹²¹ Fehrenbach, H. (2002). Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: some critical remarks. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 5. 277–283.
- ¹²² Ferrer E.; Peinado V.; Castañeda J.; Prieto-Lloret J.; Olea E.; González-Martín M.; Vega-Agapito M.; Díez M.; Domínguez-Fandos D.; Obeso A.; González C.; Barberà J. (2011). Effects of cigarette smoke and hypoxia on pulmonary circulation in the guinea pig. *European Respiratory Journal*. 38. 617–627.
- ¹²³ Filip-Ciubotaru, F.; Manciuc, C.; Stoleriu, G.; Foia, L. (2016). NADPH OXIDASE: STRUCTURE AND ACTIVATION MECHANISMS (REVIEW). NOTE I. *Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași*. 1. 29–33.
- ¹²⁴ Flannery, C. (2006). MMPs and ADAMTSs: functional studies. *Frontiers in Bioscience*. 544–569.
- ¹²⁵ Foo, J.; Landis, S.; Maskell, J.; Oh, Y.; van der Molen, T.; Han, M.; Mannino, D.; Ichinose, M.; Punekar, Y. (2016). Continuing to Confront COPD International Patient Survey: Economic Impact of COPD in 12 Countries. *Public Library of Science Pathogens*. 4. e0152618.
- ¹²⁶ Ford, E.; Murphy, L.; Khavjou, O.; Giles, W.; Holt, J.; Croft, J. (2015). Total and state-specific medical and absenteeism costs of COPD among adults aged ≥ 18 years in the United States for 2010 and projections through 2020. *Chest*. 1. 31–45.
- ¹²⁷ Fowles, J.; Dybing, E. (2003). Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. *Tobacco control*. 4.
- ¹²⁸ Freeman, C.; Han, M.; Martinez, F.; Murray, S.; Liu, L.; Chensue, S.; Polak, T.; Sonstein, J.; Todt, J.; Ames, T.; Arenberg, D.; Meldrum, C.; Getty, C.; McCloskey, L.; Curtis, J. (2010). Cytotoxic potential of lung CD8(+) T cells increases with chronic obstructive pulmonary disease severity and with in vitro stimulation by IL-18 or IL-15. *Journal of Immunology*. 11. 6504–6513.
- ¹²⁹ Fujita, J.; Nelson, N.; Daughton, D.; Dobry, C.; Spurzem, J.; Irino, S.; Rennard, S. (1990). Evaluation of elastase and antielastase balance in patients with chronic bronchitis and pulmonary emphysema. *The American Review of Respiratory Disease*. 1. 57–62.
- ¹³⁰ Gadek, J.; Fells, G.; Crystal, R. (1979). Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science*. 4424. 1315–1316.

- ¹³¹ Galiè, N.; Humbert, M.; Vachiery, J.; Gibbs, S.; Lang, I.; Torbicki, A.; Simonneau, G.; Peacock, A.; Vonk Noordegraaf, A.; Beghetti, M.; Ghofrani, A.; Gomez Sanchez, M.; Hansmann, G.; Klepetko, W.; Lancellotti, P.; Matucci, M.; McDonagh, T.; Pierard, L.; Trindade, P.; Zompatori, M.; Hoeper, M. (2015). 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *The European Respiratory Journal*. 4. 903–975.
- ¹³² Gallagher, S.; Winston, S.; Fuller, S.; Hurrell, J. (2011). Immunoblotting and immunodetection. *Current Protocols in Cell Biology*. 6.
- ¹³³ Gao, W.; Li, L.; Wang, Y.; Zhang, S.; Adcock, I.; Barnes, P.; Huang, M.; Yao, X. (2015). Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology*. 5. 722–729.
- ¹³⁴ Geiszt, M.; Lekstrom, K.; Brenner, S.; Hewitt, S.; Dana, R.; Malech, H.; Leto, T. (2003). NAD(P)H Oxidase 1, a Product of Differentiated Colon Epithelial Cells, Can Partially Replace Glycoprotein 91phox in the Regulated Production of Superoxide by Phagocytes. *The Journal of Immunology*. 1. 299–306.
- ¹³⁵ Geiszt, M.; Lekstrom, K.; Witta, J.; Leto, T. (2003). Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 22. 20006–20012.
- ¹³⁶ Gilowska, I.; Kasper, Ł.; Bogacz, K.; Szczegieliński, J.; Szymasek, T.; Kasper, M.; Czerwinski, M.; Sładek, K.; Majorczyk, E. (2018). Impact of Matrix Metalloproteinase 9 on COPD Development in Polish Patients: Genetic Polymorphism, Protein Level, and Their Relationship with Lung Function. *BioMed research international*. 6417415.
- ¹³⁷ Global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) (2015). COPD. Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. www.goldcopd.org/guidelines-global-strategy-for-diagnosis.management.html.
- ¹³⁸ Gregory, C.; Devitt, A.; Moffatt, O. (1998). Roles of ICAM-3 and CD 14 in the recognition and phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. *Biochemical Society Transactions*. 26. 644–649.

- ¹³⁹ Griendling K.; Sorescu D.; Ushio-Fukai M. (2000). NAD(P)H Oxidase Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research*. 86. 494–501.
- ¹⁴⁰ Groneberg, D.; Chung, K. (2004). Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*. 1. 18.
- ¹⁴¹ Grootendorst, D.; Gauw, S.; Verhoosel, R.; Sterk, P.; Hospers, J.; Bredenbröker, D.; Bethke, T.; Hiemstra, P.; Rabe, K. (2007). Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD. *Thorax*. 12. 1081–1087.
- ¹⁴² Guerassimov, A.; Hoshino, Y.; Takubo, Y.; Turcotte, A.; Yamamoto, M.; Ghezzi, H.; Triantafillopoulos, A.; Whittaker, K.; Hoidal, J.; Cosio, M. (2004). The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 9. 974–980.
- ¹⁴³ Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*. 2. 312–322.
- ¹⁴⁴ Hansel N.; McCormack M.; Kim V. (2015). The Effects of Air Pollution and Temperature on COPD. *COPD*. 18. 1–8.
- ¹⁴⁵ Hatem, E.; Berthonaud, V.; Dardalhon, M.; Lagniel, G.; Baudouin-Cornu, P.; Huang, M.; Labarre, J.; Chdin, S. (2014). Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 25. 25-6.
- ¹⁴⁶ Helmcke, I.; Heumüller, S.; Tikkanen, R.; Schröder, K.; Brandes, R. (2009). Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity. *Antioxidants & Redox Signaling*. 6. 1279–1287.
- ¹⁴⁷ Hermans, E.; Saad Bhamla, M.; Kao, P.; Fuller, G.; Vermant, J. (2015). Lung surfactants and different contributions to thin film stability. *Soft Matter*. 41. 8048–8057.
- ¹⁴⁸ Hiemstra, P.; van Wetering, S.; Stolk, J. (1998). Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *The European Respiratory Journal*. 5. 1200–1208.
- ¹⁴⁹ Hilenski, L.; Clempus, R.; Quinn, M.; Lambeth, J.; Griendling, K. (2004). Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 4. 677–683.

- ¹⁵⁰ Hill, B.; Dranka, B.; Bailey, S.; Lancaster, J.; Darley-Usmar, V. (2010). What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *The Journal of Biological Chemistry*. 26. 19699–19704.
- ¹⁵¹ Hillas, G.; Perlikos, F.; Tsiligianni, I.; Tzanakis, N. (2015). Managing comorbidities in COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 10. 95–109.
- ¹⁵² Hirano, K.; Sakamoto, T.; Uchida, Y.; Morishima, Y.; Masuyama, K.; Ishii, Y.; Nomura, A.; Ohtsuka, M.; Sekizawa, K. (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*. 5. 748–752.
- ¹⁵³ Hoffmann, R.; Zarrintan, S.; Brandenburg, S.; Kol, A.; de Bruin, H; Jafari, S.; Dijk, F.; Kalicharan, D.; Kelders, M.; Gosker, H.; Ten Hacken, N.; Van der Want, J.; van Oosterhout, A.; Heijink, I. (2013). Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. *Respiratory Research*. 14. 97.
- ¹⁵⁴ Hogg, J. (2004). Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*. 9435. 709–721.
- ¹⁵⁵ Hogg, J. (2008). Lung structure and function in COPD. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 5. 467–479.
- ¹⁵⁶ Hogg, J.; Macklem, P.; Thurlbeck, W. (1968). Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *The New England Journal of Medicine*. 25. 1355–1360.
- ¹⁵⁷ Hogg J.; Senior R. (2002). Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*. 57(9). 830–834.
- ¹⁵⁸ Holguin, F. (2013). Oxidative stress in airway diseases. *Annals of the American Thoracic Society*. 150–157.
- ¹⁵⁹ Hothorn, T.; Bretz, F.; Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical journal. Biometrische Zeitschrift*. 3. 346–363.
- ¹⁶⁰ Hou, H.; Cheng, S.; Chung, K.; Kuo, M.; Yeh, C.; Chang, B.; Lu, H.; Wang, H.; Yu, C. (2014). Elastase induces lung epithelial cell autophagy through placental growth factor: a new insight of emphysema pathogenesis. *Autophagy*. 9. 1509–1521.
- ¹⁶¹ Houghton, A.; Quintero, P.; Perkins, D.; Kobayashi, D.; Kelley, D.; Marconcini, L.; Mecham, R.; Senior, R.; Shapiro, S. (2006). Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *The Journal of Clinical Investigation*. 3. 753–759.

- ¹⁶² Hsia, C.; Hyde, D.; Ochs, M.; Weibel, E. (2010). An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 4. 394–418.
- ¹⁶³ <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/november/when-are-mice-considered-old#> (zuletzt abgerufen am 01.07.2020). When are mice considered old?
- ¹⁶⁴ <https://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/> (abgerufen am 01.08.2020). WHO Burden of COPD. <https://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/>.
- ¹⁶⁵ Huertas A, Palange P. (2011). COPD: a multifactorial systemic disease. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 5. 217–224.
- ¹⁶⁶ Hunninghake, G.; Cho, M.; Tesfaigzi, Y.; Soto-Quiros, M.; Avila, L.; Lasky-Su, J.; Stidley, C.; Melén, E.; Söderhäll, C.; Hallberg, J.; Kull, I.; Kere, J.; Svartengren, M.; Pershagen, G.; Wickman, M.; Lange, C.; Demeo, D.; Hersh, C.; Klanderman, B.; Raby, B.; Sparrow, D.; Shapiro, S.; Silverman, E.; Litonjua, A.; Weiss, S.; Celedón, J. (2009). MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *The New England Journal of Medicine*. 27. 2599–2608.
- ¹⁶⁷ Hunninghake, G.; Davidson, J.; Rennard, S.; Szapiel, S.; Gadek, J.; Crystal, R. (1981). Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science*. 4497. 925–927.
- ¹⁶⁸ Hurdman, J.; Condliffe, R.; Elliot, C.; Swift, A.; Rajaram, S.; Davies, C.; Hill, C.; Hamilton, N.; Armstrong, I.; Billings, C.; Pollard, L.; Wild, J.; Lawrie, A.; Lawson, R.; Sabroe, I.; Kiely, D. (2013). Pulmonary hypertension in COPD: results from the ASPIRE registry. *The European Respiratory Journal*. 6. 1292–1301.
- ¹⁶⁹ Husgafvel-Pursiainen, K. (2004). Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutat. Res. Mutation Research*. 567. 427–445.
- ¹⁷⁰ Imai, K.; Mercer, B.; Schulman, L.; Sonett, J.; D'Armiento, J. (2005). Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *The European Respiratory Journal*. 2. 250–258.
- ¹⁷¹ Ishii, T.; Abboud, R.; Wallace, A.; English, J.; Coxson, H.; Finley, R.; Shumansky, K.; Paré, P.; Sandford, A. (2014). Alveolar macrophage proteinase/antiproteinase expression in lung function and emphysema. *The European Respiratory Journal*. 1. 82–91.

- ¹⁷² Janciauskiene, S.; Bals, R.; Koczulla, R.; Vogelmeier, C.; Köhnlein, T.; Welte, T. (2011). The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respiratory Medicine*. 8. 1129–1139.
- ¹⁷³ John, G.; Kohse, K.; Orasche, J.; Reda, A.; Schnelle-Kreis, J.; Zimmermann, R.; Schmid, O.; Eickelberg, O.; Yildirim, A. (2014). The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models. *Clinical Science*. 3. 207–221.
- ¹⁷⁴ Joo, J.; Oh, H.; Kim, M.; An, E.; Kim, R.; Lee, S.; Kang, D.; Kang, S.; Keun Park, C.; Kim, H.; Lee, D.; Seol, J.; Bae, Y. (2016). NADPH Oxidase 1 Activity and ROS Generation Are Regulated by Grb2/Cbl-Mediated Proteasomal Degradation of NoxO1 in Colon Cancer Cells. *Cancer Research*. 4. 855–865.
- ¹⁷⁵ Joos, L.; He, J.; Shepherdson, M.; Connett, J.; Anthonisen, N.; Paré, P.; Sandford, A. (2002). The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Human Molecular Genetics*. 11. 569–576.
- ¹⁷⁶ Jung, O.; Schreiber, J.; Geiger, H.; Pedrazzini, T.; Busse, R.; Brandes, R. (2004). gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation*. 14. 1795–1801.
- ¹⁷⁷ Kamata, H.; Honda, S.; Maeda, S.; Chang, L.; Hirata, H.; Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 5. 649–661.
- ¹⁷⁸ Kasahara, Y.; Tuder, R.; Cool, C.; Lynch, D.; Flores, S.; Voelkel, N. (2001). Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 163. 737–744.
- ¹⁷⁹ Kawahara, T.; Ritsick, D.; Cheng, G.; Lambeth, J. (2005). Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *The Journal of Biological Chemistry*. 36. 31859–31869.
- ¹⁸⁰ Keatings, V.; Collins, P.; Scott, D.; Barnes, P. (1996). Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2. 530–534.

- ¹⁸¹ Kelly, F. (2011). Air pollution and airway disease. *Clinical & Experimental Allergy*. 8. 1059–1071.
- ¹⁸² Kharitonov, S.; Barnes, P. (2003). Nitric oxide, nitrotyrosine, and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2. 121–129.
- ¹⁸³ Kidokoro, Y.; Kravis, T.; Moser, K.; Taylor, J.; Crawford, I. (1977). Relationship of leukocyte elastase concentration to severity of emphysema in homozygous alpha1-antitrypsin-deficient persons. *The American Review of Respiratory Disease*. 5. 793–803.
- ¹⁸⁴ Kim, S.; Cheres, P.; Jablonski, R.; Williams, D.; Kamp, D. (2015). The Role of Mitochondrial DNA in Mediating Alveolar Epithelial Cell Apoptosis and Pulmonary Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 9. 21486–21519.
- ¹⁸⁵ Kim Y.; Morgan M.; Choksi S.; Liu Z. (2007). TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Molecular and Cellular Biology*. 26. 675–687.
- ¹⁸⁶ King, P. (2015). Inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and its role in cardiovascular disease and lung cancer. *Clinical and Translational Medicine*.
- ¹⁸⁷ Klein, E.; Castagnino, P.; Kothapalli, D.; Yin, L.; Byfield, F.; Xu, T.; Levental, I.; Hawthorne, E.; Janmey, P.; Assoian, R. (2009). Cell Cycle Control by Physiological Matrix Elasticity and In Vivo Tissue Stiffening. *Current biology : CB*. 18. 1511–1518.
- ¹⁸⁸ Klinger, J.; Petit, R.; Warburton, R.; Wrenn, D.; Arnal, F.; Hill, N. (1993). Neutral endopeptidase inhibition attenuates development of hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Journal of Applied Physiology*. 4. 1615–1623.
- ¹⁸⁹ Klune, J.; Dhupar, R.; Cardinal, J.; Billiar, T.; Tsung, A. (2008). HMGB1: endogenous danger signaling. *Molecular Medicine*. 7-8. 476–484.
- ¹⁹⁰ Knoop, B.; Argyropoulou, V.; Becker, S.; Ferté, L.; Kuznetsova, O. (2016). Multiple Roles of Peroxiredoxins in Inflammation. *Molecules and cells*. 1. 60–64.
- ¹⁹¹ Köhnlein T, Welte T. (2008). Alpha-1 antitrypsin deficiency: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *American Journal of Medicine*. 121. 3–9.
- ¹⁹² Konior, A.; Schramm, A.; Czesnikiewicz-Guzik, M.; Guzik, T. (2014). NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxidants & Redox Signaling*. 17. 2794–2814.

- ¹⁹³ Koyama, S.; Sato, E.; Haniuda, M.; Numanami, H.; Nagai, S.; Izumi, T. (2002). Decreased level of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage fluid of normal smokers and patients with pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 3. 382–385.
- ¹⁹⁴ Kratzer, A.; Salys, J.; Nold-Petry, C.; Cool, C.; Zamora, M.; Bowler, R.; Koczulla, A.; Janciauskiene, S.; Edwards, M.; Dinarello, C.; Taraseviciene-Stewart, L. (2013). Role of IL-18 in second-hand smoke-induced emphysema. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 6. 725–732.
- ¹⁹⁵ Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*. 1. 99–163.
- ¹⁹⁶ Kruger, P.; Saffarzadeh, M.; Weber, A.; Rieber, N.; Radsak, M.; Bernuth, H.; Benarafa, C.; Roos, D.; Skokowa, J.; Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *Public Library of Science Pathogens*. 3. e1004651.
- ¹⁹⁷ Krüger, K.; Gessner, D.; Seimetz, M.; Banisch, J.; Ringseis, R.; Eder, K.; Weissmann, N.; Mooren, F. (2013). Functional and muscular adaptations in an experimental model for isometric strength training in mice. *Public Library of Science Pathogens*. 11. e79069.
- ¹⁹⁸ Kuhn, C.; Yu, S.; Chraplyvy, M.; Linder, H.; Senior, R. M. (1976). The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 4. 372–380.
- ¹⁹⁹ Kumar, M.; Phougat, N.; Ruhil, S.; Dhankhar, S.; Balhara, M.; Chhillar, A. (2013). Genomics of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD); Exploring the SNPs of Protease-Antiprotease Pathway. *Current Genomics*. 3. 204–213.
- ²⁰⁰ Kuwano, Y.; Tominaga, K.; Kawahara, T.; Sasaki, H.; Takeo, K.; Nishida, K.; Masuda, K.; Kawai, T.; Teshima-Kondo, S.; Rokutan, K. (2008). Tumor necrosis factor alpha activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 12. 1642–1652.
- ²⁰¹ Laennec, R. (1829). A treatise on the diseases of the chest and on mediate auscultation. *Thorax*. 36. 81–90.
- ²⁰² Lambeth, J. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews. Immunology*. 3. 181–189.

- ²⁰³ Lanciano, P.; Khalfaoui-Hassani, B.; Selamoglu, N.; Ghelli, A.; Rugolo, M.; Daldal, F. (2013). Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 11-12. 1332–1339.
- ²⁰⁴ Laratta, Cheryl R.; van Eeden, Stephan (2014). Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: cardiovascular links. *BioMedical Research International*. 528789.
- ²⁰⁵ Lassègue, Bernard; Griendling, K. (2010). NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 4. 653–661.
- ²⁰⁶ Laurell, C.; Eriksson, S. (2013). The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency. 1963. *COPD*. 3–8.
- ²⁰⁷ Laurindo, F.; Araujo, T.; Abrahão, T. (2014). Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. *Antioxidants & Redox Signaling*. 17. 2755–2775.
- ²⁰⁸ Laviano, A.; Molino, A.; Seelaender, M.; Frascaria, T.; Bertini, G.; Ramaccini, C.; Bollea, M.; Citro, G.; Rossi Fanelli, F. (2011). Carnitine administration reduces cytokine levels, improves food intake, and ameliorates body composition in tumor-bearing rats. *Cancer Investigation*. 10. 696–700.
- ²⁰⁹ Lavigne, M.; Eppihimer, M. (2005). Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1. 194–203.
- ²¹⁰ Leco, K.; Waterhouse, P.; Sanchez, O.; Gowing, K.; Poole, A.; Wakeham, A.; Mak, T.; Khokha, R. (2001). Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *Journal of Clinical Investigation*. 6. 817–829.
- ²¹¹ Lee, H.; Um, S.; Kim, Y.; Kim, D.; Jang, A.; Choi, H.; Kim, T.; Yoo, K.; Jung, K. (2016). Association of the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio with Lung Function and Exacerbations in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Public Library of Science Pathogens*. 6. e0156511.
- ²¹² Lee, Haemi; Lee, Yoo Jeong; Choi, Hyeonjin; Ko, Eun Hee; Kim, Jae-Woo (2009). Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *The Journal of Biological Chemistry*. 16. 10601–10609.

- ²¹³ Lee, Hanbyeol; Park, Jeong-Ran; Kim, Eun-Jeong; Kim, Woo Jin; Hong, Seok-Ho; Park, Sung-Min; Yang, S. (2016). Cigarette smoke-mediated oxidative stress induces apoptosis via the MAPKs/STAT1 pathway in mouse lung fibroblasts. *Toxicology letters*. 1. 140–148.
- ²¹⁴ Lee, M. Y; San Martin, A.; Mehta, P.; Dikalova, A.; Garrido, A.; Datla, S.; Lyons, E.; Krause, K.; Banfi, B.; Lambeth, J.; Lassègue, B.; Griendling, K. (2009). Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 4. 480–487.
- ²¹⁵ Leifeld, L.; Fink, K.; Debska, G.; Fielenbach, M.; Schmitz, V.; Sauerbruch, T.; Spengler, U. (2006). Anti-apoptotic function of gelsolin in fas antibody-induced liver failure in vivo. *The American Journal of Pathology*. 3. 778–785.
- ²¹⁶ Leliefeld, P.; Wessels, C.; Leenen, L.; Koenderman, L.; Pillay, J. (2016). The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Critical Care*. 1. 73.
- ²¹⁷ Leto, T.; Geiszt, M. (2006). Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxidants & Redox Signaling*. 9-10. 1549–1561.
- ²¹⁸ Leusen, J.; Boer, M.; Bolscher, B.; Hilarius, P.; Weening, R.; Ochs, H.; Roos, D.; Verhoeven, A. (1994). A point mutation in gp91-phox of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *The Journal of Clinical Investigation*. 5. 2120–2126.
- ²¹⁹ Li, J.; Qin, C.; Lv, J.; Guo, Y.; Bian, Z.; Zhou, W.; Hu, J.; Zhang, Y.; Chen, J.; Cao, W.; Yu, C.; Li, L. (2019). Solid Fuel Use and Incident COPD in Chinese Adults: Findings from the China Kadoorie Biobank. *Environmental Health Perspectives*. 5.
- ²²⁰ Li, J.; Shah, A. (2002). Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 22. 19952–19960.
- ²²¹ Li, L.; Shoji, W.; Takano, H.; Nishimura, N.; Aoki, Y.; Takahashi, R.; Goto, S.; Kaifu, T.; Takai, T.; Obinata, M. (2007). Increased susceptibility of MER5 (peroxiredoxin III) knockout mice to LPS-induced oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 3. 715–721.
- ²²² Li, L.; Wang, Y.; Gao, W.; Yuan, C.; Zhang, S.; Zhou, H.; Huang, M.; Yao, X. (2015). Klotho Reduction in Alveolar Macrophages Contributes to Cigarette Smoke Extract-induced

Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 46. 27890–27900.

²²³ Li, M.; Zhong, X.; He, Z.; Wen, M.; Li, J.; Peng, X.; Liu, G.; Deng, J.; Zhang, J.; Bai, J. (2012). Effect of erythromycin on cigarette-induced histone deacetylase protein expression and nuclear factor- κ B activity in human macrophages in vitro. *International Immunopharmacology*. 4. 643–650.

²²⁴ Li M.; Chen H.; Chen L.; Chen Y.; Liu X.; Mo D. (2016). miR-709 modulates LPS-induced inflammatory response through targeting GSK-3 β . *International Immunopharmacology*. 36. 333–338.

²²⁵ Lim, S.; Roche, N.; Oliver, B.; Mattos, W.; Barnes, P.; Chung, K. (2000). Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 4. 1355–1360.

²²⁶ Liu, J.; Zelko, I.; Erbynn, E.; Sham, J.; Folz, R. (2006). Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1. 2-10.

²²⁷ Liu, S.; Bae, Y.; Yu, C; Monslow, J.; Hawthorne, E.; Castagnino, P.; Branchetti, E.; Ferrari, G.; Damrauer, S.; Puré, E.; Assoian, R. (2015). Matrix metalloproteinase-12 is an essential mediator of acute and chronic arterial stiffening. *Scientific Reports*. 17189.

²²⁸ Liu, S.; Wu, H.; Zhang, Z.; Chen, Q.; Liu, B.; Wu, J.; Zhu, L. (2011). L-carnitine ameliorates cancer cachexia in mice by regulating the expression and activity of carnitine palmitoyl transferase. *Cancer Biology and Therapy*. 2. 125–130.

²²⁹ Liu, S.; Zhou, Y.; Wang, X.; Wang, D.; Lu, J.; Zheng, J.; Zhong, N.; Ran, P. (2007). Biomass fuels are the probable risk factor for chronic obstructive pulmonary disease in rural South China. *Thorax*. 10. 889–897.

²³⁰ Lomas, D. (2016). Does Protease-Antiprotease Imbalance Explain Chronic Obstructive Pulmonary Disease? *Annals of the American Thoracic Society*. 130–137.

²³¹ Lopez A.; Mathers C.; Ezzati M.; Jamison D.; Murray C. (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*. 367. 1747–1757.

- ²³² López-Campos J.; Ruiz-Ramos M.; Soriano J. (2014). Mortality trends in chronic obstructive pulmonary disease in Europe, 1994-2010: a joinpoint regression analysis. *Lancet Respiratory Medicine*. 1. 54–62.
- ²³³ Lorenz, J.; Robbins, J. (1997). Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse. *The American Journal of Physiology*. 272. 1137–1146.
- ²³⁴ Lozano, R.; Naghavi, M.; Foreman, K.; Lim, S.; Shibuya, K.; Aboyans, V.; Abraham, J.; Adair, T.; Aggarwal, R.; Ahn, S.; Alvarado, M.; Anderson, H.; Anderson, L.; Andrews, K.; Atkinson, C.; Baddour, L.; Barker-Collo, S.; Bartels, D.; Bell, M.; Benjamin, E.; Bennett, D.; Bhalla, K.; Bikbov, B.; Bin Abdulhak, A.; Birbeck, G.; Blyth, F.; Bolliger, I.; Boufous, S.; Bucello, C.; Burch, M.; Burney, P.; Carapetis, J.; Chen, H.; Chou, D.; Chugh, S.; Coffeng, L.; Colan, S.; Colquhoun, S.; Colson, K.; Condon, J.; Connor, M.; Cooper, L.; Corriere, M.; Cortinovis, M.; Vaccaro, K.; Couser, W.; Cowie, B.; Criqui, M.; Cross, M.; Dabhadkar, K.; Dahodwala, N.; Leo, D.; Degenhardt, L.; Delossantos, A.; Denenberg, J.; Des Jarlais, D.; Dharmaratne, S.; Dorsey, E.; Driscoll, T.; Duber, H.; Ebel, B.; Erwin, P.; Espindola, P.; Ezzati, M.; Feigin, V.; Flaxman, A.; Forouzanfar, M.; Fowkes, F.; Franklin, R.; Fransen, M.; Freeman, M.; Gabriel, S.; Gakidou, E.; Gaspari, F.; Gillum, R.; Gonzalez-Medina, D.; Halasa, Y.; Haring, D.; Harrison, J.; Havmoeller, R.; Hay, R.; Hoen, B.; Hotez, P.; Hoy, D.; Jacobsen, K.; James, S.; Jasrasaria, R.; Jayaraman, S.; Johns, N.; Karthikeyan, G.; Kassebaum, N.; Keren, A.; Khoo, J.; Knowlton, L.; Kobusingye, O.; Koranteng, A.; Krishnamurthi, R.; Lipnick, M.; Lipshultz, S.; Ohno, S.; Mabweijano, J.; MacIntyre, M.; Mallinger, L.; March, L.; Marks, G.; Marks, R.; Matsumori, A.; Matzopoulos, R.; Mayosi, B.; McAnulty, J.; McDermott, M.; McGrath, J.; Mensah, G.; Merriman, T.; Michaud, C.; Miller, M.; Miller, T.; Mock, C.; Mocumbi, A.; Mokdad, A.; Moran, A.; Mulholland, K.; Nair, M.; Naldi, L.; Narayan, K.; Nasseri, K.; Norman, P.; O'Donnell, M.; Omer, S.; Ortblad, K.; Osborne, R.; Ozgediz, D.; Pahari, B.; Pandian, J.; Rivero, A.; Padilla, R.; Perez-Ruiz, F.; Perico, N.; Phillips, D.; Pierce, K.; Pope, C.; Porrini, E.; Pourmalek, F.; Raju, M.; Ranganathan, D.; Rehm, J.; Rein, D.; Remuzzi, G.; Rivara, F.; Roberts, T.; León, F.; Rosenfeld, L.; Rushton, L.; Sacco, R.; Salomon, J.; Sampson, U.; Sanman, E.; Schwebel, D.; Segui-Gomez, M.; Shepard, D. S.; Singh, D.; Singleton, J.; Sliwa, K.; Smith, E.; Steer, A.; Taylor, J.; Thomas, B.; Tleyjeh, I.; Towbin, J.; Truelsen, T.; Undurraga, E.; Venketasubramanian, N.; Vijayakumar, L.; Vos, T.; Wagner, G.; Wang, M.; Wang, W.; Watt, K.; Weinstock, M.; Weintraub, R.; Wilkinson, J.; Woolf, A.; Wulf, S.; Yeh, P.; Yip, P.; Zabetian, A.; Zheng, Z.; Lopez, A.; Murray, C. .; AlMazroa, M.; Memish, Z. (2012). Global and regional mortality

from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 9859. 2095–2128.

²³⁵ Ludders, J. (1992). Advantages and guidelines for using isoflurane. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. 2. 328–331.

²³⁶ Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. 2014. *Der Experimentator Immunologie*. 4. Springer Spektrum. Berlin, Heidelberg.

²³⁷ Macleod, J.; Robertson, R.; Copeland, L.; McKenzie, J.; Elton, R.; Reid, P. (2015). Cannabis, tobacco smoking, and lung function: a cross-sectional observational study in a general practice population. *The British Journal of General Practice*. 631. 89–95.

²³⁸ MacNee, W. (2001). Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European Journal of Pharmacology*. 1-3. 195–207.

²³⁹ Mahadeva, R.; Shapiro, S. (2005). Animal models of pulmonary emphysema. *Current Drug Targets. Inflammation and allergy*. 6. 665–673.

²⁴⁰ Mahdavi, R.; Faramarzi, E.; Seyedrezazadeh, E.; Mohammad-Zadeh, M.; Pourmoghaddam, M. (2009). Evaluation of oxidative stress, antioxidant status and serum vitamin C levels in cancer patients. *Biological Trace Element Research*. 1. 1–6.

²⁴¹ Maio, S.; Sherrill, D.; MacNee, W.; Lange, P.; Costabel, U.; Dahlén, S.; Sybrecht, G.; Burghuber, O.; Stevenson, R.; Tønnesen, P.; Haeussinger, K.; Hedlin, G.; Bauer, T.; Riedler, J.; Nicod, L.; Carlsen, K.; Viegi, G. (2012). The European Respiratory Society spirometry tent: a unique form of screening for airway obstruction. *The European Respiratory Journal*. 6. 1458–1467.

²⁴² Malczyk, M.; Veith, C.; Fuchs, B.; Hofmann, K.; Storch, U.; Schermuly, R.; Witznath, M.; Ahlbrecht, K.; Fecher-Trost, C.; Flockerzi, V.; Ghofrani, H.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Gudermann, T.; Dietrich, A.; Weissmann, N. (2013). Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 12. 1451–1459.

²⁴³ Mannino, D.; Homa, D.; Akinbami, L.; Ford, E.; Redd, S. (2002). Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 6. 1–16.

²⁴⁴ Mannino D.; Buist S. (2007). Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet*. 370. 765–773.

- ²⁴⁵ Maranzana, E.; Barbero, G.; Falasca, A.; Lenaz, G.; Genova, M. (2013). Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxidants & Redox Signaling*. 13. 1469–1480.
- ²⁴⁶ March, T.; Wilder, J.; Esparza, D.; Cossey, P.; Blair, L.; Herrera, L.; McDonald, J.; Campen, M.; Mauderly, J.; Seagrave, J. (2006). Modulators of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in A/J mice. *Toxicological Sciences*. 2. 545–559.
- ²⁴⁷ Marco, R. de; Accordini, S.; Cerveri, I.; Corsico, A.; Sunyer, J.; Neukirch, F.; Künzli, N.; Leynaert, B.; Janson, C.; Gislason, T.; Vermeire, P.; Svanes, C.; Anto, J.; Burney, P. (2004). An international survey of chronic obstructive pulmonary disease in young adults according to GOLD stages. *Thorax*. 2. 120–125.
- ²⁴⁸ Marshall, C. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 2. 179–185.
- ²⁴⁹ Martin, E.; Moyer, B.; Pape, M.; Starcher, B.; Leco, K.; Veldhuizen, R. (2003). Negative impact of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 null mutation on lung structure and function in response to sepsis. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 6. 1222-32.
- ²⁵⁰ Martin J.; Tamaoka M. (2006). Rat models of asthma and chronic obstructive lung disease. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 19. 377–385.
- ²⁵¹ Martín-Alonso, M.; García-Redondo, A.; Guo, D.; Camafeita, E.; Martínez, F.; Alfranca, A.; Méndez-Barbero, N.; Pollán, Á.; Sánchez-Camacho, C.; Denhardt, D.; Seiki, M.; Vázquez, J.; Salaices, M.; Redondo, J.; Milewicz, D.; Arroyo, A. (2015). Deficiency of MMP17/MT4-MMP proteolytic activity predisposes to aortic aneurysm in mice. *Circulation Research*. 2. 13–26.
- ²⁵² Martinez, F.; Curtis, J.; Scirba, F.; Mumford, J.; Giardino, N.; Weinmann, G.; Kazerooni, E.; Murray, S.; Criner, G.; Sin, D.; Hogg, J.; Ries, A.; Han, M.; Fishman, A.; Make, B.; Hoffman, E.; Mohsenifar, Z.; Wise, R. (2007). Sex differences in severe pulmonary emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 3. 243–252.
- ²⁵³ Mason R.; Williams M.; Widdicombe J. (1983). Fluid and electrolyte transport across monolayers of alveolar type II cells in vitro. *The American Review of Respiratory Disease*. 127. 24–28.

- ²⁵⁴ Matalon S. (1991). Mechanisms and regulation of ion transport in adult mammalian alveolar type II pneumocytes. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 261. 727–738.
- ²⁵⁵ Mathers, C. ; Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *Public Library of Science Pathogens*. 11. e442.
- ²⁵⁶ Matsuno, K.; Yamada, H.; Iwata, K.; Jin, D.; Katsuyama, M.; Matsuki, M.; Takai, S.; Yamanishi, K.; Miyazaki, M.; Matsubara, H.; Yabe-Nishimura, C. (2005). Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation*. 17. 2677–2685.
- ²⁵⁷ Matthay, M.; Robriquet, L.; Fang, X. (2005). Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 3. 206–213.
- ²⁵⁸ Matute J.; Arias A.; Dinauer M.; Patiño P. (2005). p40phox: The last NADPH oxidase subunit. *Food Cells, Molecules and Diseases*. 35. 291–302.
- ²⁵⁹ Mauderly, J.; Bechtold, W.; Bond, J.; Brooks, A.; Chen, B.; Cuddihy, R.; Harkema, J.; Henderson, R.; Johnson, N.; Rithidech, K. (1989). Comparison of 3 methods of exposing rats to cigarette smoke. *Experimental Pathology*. 1-4. 194–197.
- ²⁶⁰ Mehrotra P.; Hollenbeck A.; Riley J.; Li F.; Patel R.; Akhtar N.; Goenka S. (2013). Poly (ADP-ribose) polymerase 14 and its enzyme activity regulates T(H)2 differentiation and allergic airway disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 131. 521–531.
- ²⁶¹ Meloche, J.; Le Guen, M.; Potus, F.; Vinck, J.; Ranchoux, B.; Johnson, I.; Antigny, F.; Tremblay, E.; Breuils-Bonnet, S.; Perros, F.; Provencher, S.; Bonnet, S. (2015). miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 6. 363-72.
- ²⁶² Mercado, N.; Ito, K.; Barnes, P. (2015). Accelerated ageing of the lung in COPD: new concepts. *Thorax*. 5. 482–489.
- ²⁶³ Miao, L.; St Clair, D. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 4. 344–356.
- ²⁶⁴ Mills, P.; Huetteman, D.; Brockway, B.; Zwiers, L.; Gelsema, A.; Schwartz, R.; Kramer, K. (2000). A new method for measurement of blood pressure, heart rate, and activity in the mouse by radiotelemetry. *Journal of Applied Physiology*. 5. 1537–1544.

- ²⁶⁵ Minai, O.; Benditt, J.; Martinez, F. (2008). Natural history of emphysema. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 4. 468–474.
- ²⁶⁶ Miravitlles, M.; Vogelmeier, C.; Roche, N.; Halpin, D.; Cardoso, J.; Chuchalin, A.; Kankaanranta, H.; Sandström, T.; Śliwiński, P.; Zatloukal, J.; Blasi, F. (2016). A review of national guidelines for management of COPD in Europe. *The European Respiratory Journal*. 2. 625–637.
- ²⁶⁷ Miyano, K.; Ueno, N.; Takeya, R.; Sumimoto, H. (2006). Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *The Journal of Biological Chemistry*. 31. 21857–21868.
- ²⁶⁸ Molet, S.; Belleguic, C.; Lena, H.; Germain, N.; Bertrand, C.; Shapiro, S.; Planquois, J.; Delaval, P.; Lagente, V. (2005). Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation Research*. 1. 31–36.
- ²⁶⁹ Moncada S.; Erusalimsky J. (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3. 214–220.
- ²⁷⁰ Moodie, F.; Marwick, J.; Anderson, C.; Szulakowski, P.; Biswas, S.; Bauter, M.; Kilty, I.; Rahman, I. (2004). Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *Federation of American Societies For Experimental Biology*. 15. 1897–1899.
- ²⁷¹ Mura, M.; Binnie, M.; Han, B.; Li, C.; Andrade, C.; Shiozaki, A.; Zhang, Y.; Ferrara, N.; Hwang, D.; Waddell, T.; Keshavjee, S.; Liu, M. (2010). Functions of type II pneumocyte-derived vascular endothelial growth factor in alveolar structure, acute inflammation, and vascular permeability. *The American Journal of Pathology*. 4. 1725–1734.
- ²⁷² Murray, C.; Lopez, A. (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 9064. 1498–1504.
- ²⁷³ Musiał, K.; Zwolińska, D. (2011). Matrix metalloproteinases and soluble Fas/FasL system as novel regulators of apoptosis in children and young adults on chronic dialysis. *Apoptosis. An International Journal on Programmed Cell Death*. 7. 653–659.
- ²⁷⁴ Muyal, J; Kotnala, S.; Bhardwaj, H.; Tyagi, A. (2014). Effect of recombinant human keratinocyte growth factor in inducing Ras-Raf-Erk pathway-mediated cell proliferation in emphysematous mice lung. *Inhalation Toxicology*. 13. 761–771.

- ²⁷⁵ Naeije, R. (2005). Pulmonary hypertension and right heart failure in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 1. 20–22.
- ²⁷⁶ Naeije, R.; Barberà, J. (2001). Pulmonary hypertension associated with COPD. *Critical Care*. 6. 286–289.
- ²⁷⁷ Nayernia, Z.; Jaquet, V.; Krause, K. (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxidants & Redox Signaling*. 17. 2815–2837.
- ²⁷⁸ Ndengele, M.; Cuzzocrea, S.; Esposito, E.; Mazzon, E.; Di Paola, R.; Matuschak, G.; Salvemini, D. (2008). Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. *Federation of American Societies For Experimental Biology*. 9. 3154–3164.
- ²⁷⁹ Nelsen, C.; Rickheim, D.; Tucker, M.; Hansen, L.; Albrecht, J. (2003). Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 6. 3656–3663.
- ²⁸⁰ Noguchi, T.; Ishii, K.; Fukutomi, H.; Naguro, I.; Matsuzawa, A.; Takeda, K.; Ichijo, H. (2008). Requirement of reactive oxygen species-dependent activation of ASK1-p38 MAPK pathway for extracellular ATP-induced apoptosis in macrophage. *The Journal of Biological Chemistry*. 12. 7657–7665.
- ²⁸¹ Nour A.; Balmas J.; Mehta S.; Cheema U.; Sood A. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Secondary to Household Air Pollution. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 36. 408–421.
- ²⁸² Nurwidya, F.; Damayanti, T.; Yunus, F. (2016). The Role of Innate and Adaptive Immune Cells in the Immunopathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 1. 5–13.
- ²⁸³ O'Donnell, R.; Breen, D.; Wilson, S.; Djukanovic, R. (2006). Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*. 5. 448–454.
- ²⁸⁴ Okada, Y.; Watanabe, S.; Nakanishi, I.; Kishi, J.; Hayakawa, T.; Watorek, W.; Travis, J.; Nagase, H. (1988). Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *Federation of European Biochemical Societies*. 1. 157–160.

- ²⁸⁵ Opitz, N.; Drummond, G.; Selemidis, S.; Meurer, S.; Schmidt, H. (2007). The 'A's and 'O's of NADPH oxidase regulation: a commentary on "Subcellular localization and function of alternatively spliced Nox1 isoforms". *Free Radical Biology & Medicine*. 2. 175–179.
- ²⁸⁶ O'Shaughnessy, T.; Ansari, T.; Barnes, N.; Jeffery, P. (1997). Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 3. 852–857.
- ²⁸⁷ Oshima, H.; Ishikawa, T.; Yoshida, G.; Naoi, K.; Maeda, Y.; Naka, K.; Ju, X.; Yamada, Y.; Minamoto, T.; Mukaida, N.; Saya, H.; Oshima, M. (2014). TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene*. 29. 3820–3829.
- ²⁸⁸ Otani, A.; Slike, B.; Dorrell, M.; Hood, J.; Kinder, K.; Ewalt, K.; Cheresch, D.; Schimmel, P.; Friedlander, M. (2002). A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1. 178–183.
- ²⁸⁹ Pacher, P.; Beckman, J.; Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*. 1. 315–424.
- ²⁹⁰ Panday, A.; Sahoo, M.; Osorio, D.; Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & Molecular Immunology*. 1. 5–23.
- ²⁹¹ Pandey, R.; Singh, M.; Singhal, U.; Gupta, K.; Aggarwal, S. (2013). Oxidative/Nitrosative Stress and the Pathobiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*. 3. 580–588.
- ²⁹² Pauwels, R.; Buist, A.; Calverley, P.; Jenkins, C.; Hurd, S. ((2001)). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am.J.Respir.Crit.Care Med*. 163. 1256–1276.
- ²⁹³ Peinado, V.; Pizarro, S.; Barberà, J. (2008). Pulmonary vascular involvement in COPD. *Chest*. 134. 808–814.
- ²⁹⁴ Peto, R.; Lopez, A.; Boreham, J.; Thun, M.; Heath, C. (1992). Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet*. 339. 1268–1278.

- ²⁹⁵ Pope, C.; Burnett, R.; Thurston, G.; Thun, M.; Calle, E.; Krewski, D.; Godleski, J. (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 1. 71–77.
- ²⁹⁶ Powell, W.; Fingleton, B.; Wilson, C.; Boothby, M.; Matrisian, L. (1999). The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol*. 9. 1441–1447.
- ²⁹⁷ Price, D.; West, D.; Brusselle, G.; Gruffydd-Jones, K.; Jones, R.; Miravittles, M.; Rossi, A.; Hutton, C.; Ashton, V.; Stewart, R.; Bichel, K. (2014). Management of COPD in the UK primary-care setting: an analysis of real-life prescribing patterns. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 9. 889–904.
- ²⁹⁸ Pryor, W. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annual review of physiology*. 48. 657–667.
- ²⁹⁹ Pryor, W.; Stone, K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*. 686. 12–28.
- ³⁰⁰ Puertollano, M.; Puertollano, E.; De Cienfuegos, G.; de Pablo, M. (2011). Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 14. 1752–1766.
- ³⁰¹ Rabinovich, R.; Vilaró, J. (2010). Structural and functional changes of peripheral muscles in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2. 123–133.
- ³⁰² Raffetto, J.; Khalil, R. (2007). Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Vascular Remodeling and Vascular Disease. *Biochemical pharmacology*. 2. 346–359.
- ³⁰³ Randall D.; Eckert R.; Burggren W.; French K. 2002. *Tierphysiologie*. 4., durchgesehene Auflage. Thieme.
- ³⁰⁴ Rangasamy, T.; Cho, C.; Thimmulappa, R.; Zhen, L.; Srisuma, S.; Kensler, T.; Yamamoto, M.; Petrache, I.; Tuder, R.; Biswal, S. (2004). Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 9. 1248–1259.
- ³⁰⁵ Rangasamy, T.; Misra, Vikas; Zhen, L.; Tankersley, Clarke G.; Tuder, R.; Biswal, S. (2009). Cigarette smoke-induced emphysema in A/J mice is associated with pulmonary

oxidative stress, apoptosis of lung cells, and global alterations in gene expression. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 6. 888–900.

³⁰⁶ Reed, J.; Cawley, George F.; Backes, W. (2011). Inhibition of cytochrome P450 1A2-mediated metabolism and production of reactive oxygen species by heme oxygenase-1 in rat liver microsomes. *Drug Metabolism Letters*. 1. 6–16.

³⁰⁷ Renda, T.; Baraldo, S.; Pelaia, G.; Bazzan, E.; Turato, G.; Papi, A.; Maestrelli, P.; Maselli, R.; Vatrella, A.; Fabbri, L. M.; Zuin, R.; Marsico, S. A.; Saetta, M. (2008). Increased activation of p38 MAPK in COPD. *The European Respiratory Journal*. 1. 62–69.

³⁰⁸ Repine, J.; Bast, A.; Lankhorst, I. (1997). Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2 Pt 1. 341–357.

³⁰⁹ Ricciardolo, F.; Caramori, G.; Ito, K.; Capelli, A.; Brun, P.; Abatangelo, G.; Papi, A.; Chung, K.; Adcock, I.; Barnes, P.; Donner, C.; Rossi, A.; Di Stefano, A. (2005). Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 5. 1028–1035.

³¹⁰ Rigutto, S.; Hoste, C.; Grasberger, H.; Milenkovic, M.; Communi, D.; Dumont, J.; Corvilain, B.; Miot, F.; Deken, X. (2009). Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 11. 6725–6734.

³¹¹ Roberts, P.; Der, C. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 22. 3291–3310.

³¹² Roemer, E.; Ottmueller, T.; Zenzen, V.; Wittke, S.; Radtke, F.; Blanco, I.; Carchman, R. (2009). Cytotoxicity, mutagenicity, and tumorigenicity of mainstream smoke from three reference cigarettes machine-smoked to the same yields of total particulate matter per cigarette. *Food and Chemical Toxicology*. 8. 1810–1818.

³¹³ Roffel, M.; Bracke, K.; Heijink, I.; Maes, T. (2020). miR-223: A Key Regulator in the Innate Immune Response in Asthma and COPD. *Frontiers in Medicine*.

³¹⁴ Rosenberg, S.; Kalhan, R.; Mannino, D. Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Prevalence, Morbidity, Mortality, and Risk Factors. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 36. 457–469.

- ³¹⁵ Rovina, N.; Koutsoukou, A.; Koulouris, N. (2013). Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? *Mediators of Inflammation*. 2013. 413735.
- ³¹⁶ Rubin L. (1997). Primary pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*. 336. 111–117.
- ³¹⁷ Russell, R.; Thorley, A.; Culpitt, S.; Dodd, S.; Donnelly, L.; Demattos, C.; Fitzgerald, M.; Barnes, P. (2002). Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 4. 867-73.
- ³¹⁸ Saetta, M.; Baraldo, S.; Corbino, L.; Turato, G.; Braccioni, F.; Rea, F.; Cavallesco, G.; Tropeano, G.; Mapp, C.; Maestrelli, P.; Ciaccia, A.; Fabbri, M. (1999). CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 160. 711–717.
- ³¹⁹ Saetta, M.; Turato, G.; Facchini, F.; Corbino, L.; Lucchini, R.; Casoni, G.; Maestrelli, P.; Mapp, C.; Ciaccia, A.; Fabbri, L. (1997). Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 5. 1633–1639.
- ³²⁰ Sandhaus, R.; Turino, G. (2013). Neutrophil elastase-mediated lung disease. *COPD*. 60–63.
- ³²¹ Santos, S.; Peinado, V.; Ramírez, J.; Melgosa, T.; Roca, J.; Rodriguez-Roisin, R.; Barberà, J. (2002). Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *The European Respiratory Journal*. 4. 632–638.
- ³²² Satoh, K.; Kobayashi, T.; Misao, T.; Hitani, Y.; Yamamoto, Y.; Nishiyama, Y.; Ohkawa, M. (2001). CT assessment of subtypes of pulmonary emphysema in smokers. *Chest*. 3. 725–729.
- ³²³ Sauler, M.; Leng, L.; Trentalange, M.; Haslip, M.; Shan, P.; Piecychna, M.; Zhang, Y.; Andrews, N.; Mannam, P.; Allore, H.; Fried, T.; Bucala, R.; Lee, P. (2014). Macrophage migration inhibitory factor deficiency in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 6. 487-96.
- ³²⁴ Scherle W. (1970). A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 26. 57–60.

- ³²⁵ Schieber, M.; Chandel, N. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. 10. 453-62.
- ³²⁶ Schröder K. (2014). NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration. *Antioxidants & Redox Signaling*. 20. 2043–2058.
- ³²⁷ Schroths S.; Koczulla R.; Herr C.; Greulich T.; Walthers E.; Vogelmeier C.; Bals R. (2009). Alpha-1-Antitrypsin Deficiency: Diagnosis and Therapy of the Lung Disease. *Pneumologie*. 63. 335–345.
- ³²⁸ Schönemann H.; Woodhead M.; Anzueto A.; Buist S.; Macnee W.; Rabe F.; Heffner J. (2012). A guide to guidelines for professional societies and other developers of recommendations: introduction to integrating and coordinating efforts in COPD guideline development. An official ATS/ERS workshop report. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 5. 215–218.
- ³²⁹ Sedeek, M.; Nasrallah, R.; Touyz, R.; Hébert, R. (2013). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *Journal of the American Society of Nephrology*. 10. 1512–1518.
- ³³⁰ Seifart, C.; Plagens, A. (2007). Genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2. 541–550.
- ³³¹ Seimetz, M. Regulation von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen in einem Zigarettenrauch-induzierten COPD-Mausmodell. Dissertation.
- ³³² Seimetz, M.; Parajuli, N.; Pichl, A.; Veit, F.; Kwapiszewska, G.; Weisel, F.; Milger, K.; Egemnazarov, B.; Turowska, A.; Fuchs, B.; Nikam, S.; Roth, M.; Sydykov, A.; Medebach, T.; Klepetko, W.; Jaksch, P.; Dumitrascu, R.; Garn, H.; Voswinkel, R.; Kostin, S.; Seeger, W.; Schermuly, R.; Grimminger, F.; Ghofrani, H.; Weissmann, N. (2011). Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell*. 2. 293–305.
- ³³³ Seimetz, M.; Sommer, N.; Bednorz, M.; Pak, O.; Veith, C.; Hadzic, S.; Gredic, M.; Parajuli, N.; Kojonazarov, B.; Kraut, S.; Wilhelm, J.; Knoepp, F.; Henneke, I.; Pichl, A.; Kanbagli, Z.; Scheibe, S.; Fysikopoulos, A.; Wu, C.; Klepetko, W.; Jaksch, P.; Eichstaedt, C.; Grünig, E.; Hinderhofer, K.; Geiszt, M.; Müller, N.; Rezende, F.; Buchmann, G.; Wittig, I.; Hecker, M.; Hecker, A.; Padberg, W.; Dorfmueller, P.; Gattenlöhner, S.; Vogelmeier, C.; Günther, A.; Karnati, S.; Baumgart-Vogt, E.; Schermuly, R.; Ghofrani, H.; Seeger, W.;

Schröder, K.; Grimminger, F.; Brandes, R.; Weissmann, N. (2020). NADPH oxidase subunit NOXO1 is a target for emphysema treatment in COPD. *Nature Metabolism*. 1–15.

³³⁴ Selemidis, S.; Sobey, C.; Wingler, K.; Schmidt, H.; Drummond, G. (2008). NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacology & Therapeutics*. 3. 254–291.

³³⁵ Shan N.; Zhang X.; Xiao X.; Zhang H.; Tong C.; Luo X.; Chen Y.; Liu X.; Yin N.; Deng Q.; Qi H. (2015). Laminin $\alpha 4$ (LAMA4) expression promotes trophoblast cell invasion, migration, and angiogenesis, and is lowered in preeclamptic placentas. *Placenta*. 8. 809–820.

³³⁶ Shapiro, S. (1999). The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 5. 29–32.

³³⁷ Shapiro, S. (2003). Proteolysis in the lung. *The European Respiratory Journal*. 30–32.

³³⁸ Shapiro, S.; Goldstein N.; Houghton M.; Kobayashi K.; Kelley D. (2003). Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *American Journal of Pathology*. 163. 2329–2335.

³³⁹ Shapiro, S.; Ingenito, E. (2005). The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 5. 367–372.

³⁴⁰ Sharma, G.; Goodwin, J. (2006). Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. *Clinical Interventions in Aging*. 1. 253–260.

³⁴¹ Sharpe, M.; Olsson, R.; Stewart, V.; Clark, J. (2002). Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics. *The Biochemical Journal*. 1. 97–107.

³⁴² Shen, Y.; Godlewski, J.; Zhu, J.; Sathyanarayana, P.; Leaner, V.; Birrer, M.; Rana, A.; Tzivion, G. (2003). Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors. *The Journal of Biological Chemistry*. 29. 26715–26721.

³⁴³ Shimoda, L.; Laurie, S. (2013). Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 3. 297–309.

³⁴⁴ Sikkeland, L.; Johnsen, H.; Riste, T.; Alexis, N.; Halvorsen, B.; Søyseth, V.; Kongerud, J. (2016). Sputum neutrophils are elevated in smelter workers, and systemic

neutrophils are associated with rapid decline in FEV1. *Occupational and Environmental Medicine*. 73. 459–466.

³⁴⁵ Silbernagel, A. 2003. *Taschenatlas der Physiologie*. 6. Thieme. Stuttgart.

³⁴⁶ Silverman, E. (2001). Genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Foundation symposium*. 45-58; discussion 58-64.

³⁴⁷ Silverman, E.; Spira, A.; Paré, P. (2009). Genetics and genomics of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 6. 539–542.

³⁴⁸ Simon H.; Haj-Y.; Levi-Schaffer F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis. An International Journal on Programmed Cell Death*. 5. 415–418.

³⁴⁹ Simon P.; Schwartzstein R.; Weiss J.; Fencel V.; Teghtsoonian M.; Weinberger S. (1990). Distinguishable types of dyspnea in patients with shortness of breath. *The American Review of Respiratory Disease*. 142. 1009–1014.

³⁵⁰ Simonneau, G.; Galiè, N.; Rubin, L.; Langleben, D.; Seeger, W.; Domenighetti, G.; Gibbs, S.; Lebrec, D.; Speich, R.; Beghetti, M.; Rich, S.; Fishman, A. (2004). Clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 12 Suppl S. 5S-12S.

³⁵¹ Simonneau, G.; Gatzoulis, M.; Adatia, I.; Celermajer, D.; Denton, C.; Ghofrani, A.; Gomez Sanchez, M.; Krishna Kumar, R.; Landzberg, M.; Machado, R.; Olschewski, H.; Robbins, I.; Souza, R. (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 25 Suppl. D34-41.

³⁵² Simonneau, G.; Montani, D.; Celermajer, D.; Denton, C.; Gatzoulis, M.; Krowka, M.; Williams, P.; Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal*. 1.

³⁵³ Sin D.; Man S. (2005). Chronic obstructive pulmonary disease: A novel risk factor for cardiovascular disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 83. 8–13.

³⁵⁴ Singh, D., Agusti, A., Anzueto, A., Barnes, P., Bourbeau, J., Celli, B., Criner, G., Frith, P., Halpin, D.; Han, M., López Varela, M., Martinez, F., Montes de Oca, M., Papi, A., Pavord, I., Roche, N., Sin, D., Stockley, R., Vestbo, J., Wedzicha, J., Vogelmeier, C. (2019). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: the GOLD science committee report 2019. *The European Respiratory Journal*. 5.

- ³⁵⁵ Siu, K.; Gao, L.; Cai, H. (2016). Differential Roles of Protein Complexes NOX1-NOXO1 and NOX2-p47phox in Mediating Endothelial Redox Responses to Oscillatory and Unidirectional Laminar Shear Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 16. 8653–8662.
- ³⁵⁶ Sliwinski, P.; Macklem, P. (1997). Inspiratory muscle dysfunction as a cause of death in COPD patients. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica fisiologica e malattie apparato respiratorio, Università di Napoli, Secondo ateneo*. 4. 380–383.
- ³⁵⁷ Smith, B.; Austin, J.; Newell, J.; D'Souza, B.; Rozenshtein, A.; Hoffman, E.; Ahmed, F.; Barr, R. (2014). Pulmonary emphysema subtypes on computed tomography: the MESA COPD study. *The American journal of medicine*. 1. 94.e7-23.
- ³⁵⁸ Sommer, N.; Pak, O.; Schörner, S.; Derfuss, T.; Krug, A.; Gnaiger, E.; Ghofrani, H.; Schermuly, R.; Huckstorf, C.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Weissmann, N. (2010). Mitochondrial cytochrome redox states and respiration in acute pulmonary oxygen sensing. *The European Respiratory Journal*. 5. 1056–1066.
- ³⁵⁹ Sorescu, D.; Weiss, D.; Lassègue, B.; Clempus, R.; Szöcs, K.; Sorescu, G.; Valppu, L.; Quinn, M.; Lambeth, J.; Vega, J.; Taylor, W.; Griendling, K. (2002). Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 12. 1429–1435.
- ³⁶⁰ Stănescu, D.; Sanna, A.; Veriter, C.; Kostianev, S.; Calcagni, P.; Fabbri, L.; Maestrelli, P. (1996). Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*. 3. 267–271.
- ³⁶¹ Stein, P.; Carrell, R. (1995). What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nature Structural Biology*. 2. 96–113.
- ³⁶² Stevens, H.; Deng, L.; Grant, J.; Pinel, K.; Thomas, M.; Morrell, N.; MacLean, M.; Baker, A.; Denby, L. (2016). Regulation and function of miR-214 in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*. 1. 109–117.
- ³⁶³ Stone, S. (1967). Cellular commitments to immune responses. *Annual Review of Microbiology*. 21. 181–204.
- ³⁶⁴ Suárez, Y.; Sessa, W. (2009). MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circulation Research*. 4. 442–454.

- ³⁶⁵ Suh Y.; Arnold R.; Lassegue B.; Shi J.; Xu X.; Sorescu D.; Chung A.; Griendling K.; Lambeth J. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 401. 79–82.
- ³⁶⁶ Sumimoto H. (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 275. 3249–3277.
- ³⁶⁷ Sundar, I.; Yao, H.; Rahman, I. (2013). Oxidative stress and chromatin remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and smoking-related diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15. 1956–1971.
- ³⁶⁸ Suzuki, T.; Moraes, T.; Vachon, E.; Ginzberg, H.; Huang, T.; Matthay, M.; Hollenberg, M.; Marshall, J.; McCulloch, C.; Abreu, M.; Chow, C.; Downey, G. (2005). Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 3. 231–247.
- ³⁶⁹ Takeya, R.; Taura, M.; Yamasaki, T.; Naito, S.; Sumimoto, H. (2006). Expression and function of Noxo1gamma, an alternative splicing form of the NADPH oxidase organizer 1. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. 16. 3663–3677.
- ³⁷⁰ Takeya, R.; Ueno, N.; Kami, K.; Taura, M.; Kohjima, M.; Izaki, T.; Nunoi, H.; Sumimoto, H. (2003). Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *The Journal of Biological Chemistry*. 27. 25234–25246.
- ³⁷¹ Talhout, R.; Schulz, T.; Florek, E.; van Benthem, J.; Wester, P.; Opperhuizen, A. (2011). Hazardous compounds in tobacco smoke. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2. 613–628.
- ³⁷² Tan, W.; Lo, C.; Jong, A.; Xing, L.; Fitzgerald, M.; Vollmer, W.; Buist, S.; Sin, D. (2009). Marijuana and chronic obstructive lung disease: a population-based study. *Canadian Medical Association Journal*. 8. 814–820.
- ³⁷³ Taraseviciene-Stewart, L.; Voelkel, N. (2008). Molecular pathogenesis of emphysema. *The Journal of Clinical Investigation*. 2. 394–402.
- ³⁷⁴ Thannickal, V.; Fanburg, B. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology Lung Cellular Molecular Physiology*. 279. 1005–1028.

- ³⁷⁵ Theruvath, T. P.; Jones, J.; Ikonmidis, J. (2012). Matrix metalloproteinases and descending aortic aneurysms: parity, disparity, and switch. *Journal of Cardiac Surgery*. 1. 81–90.
- ³⁷⁶ Thompson, J.; Morice, A. (1996). Neutral endopeptidase inhibitors and the pulmonary circulation. *General Pharmacology*. 4. 581–585.
- ³⁷⁷ Tominaga, K.; Kawahara, T.; Sano, T.; Toida, K.; Kuwano, Y.; Sasaki, H.; Kawai, T.; Teshima-Kondo, S.; Rokutan, K. (2007). Evidence for cancer-associated expression of NADPH oxidase 1 (Nox1)-based oxidase system in the human stomach. *Free Radical Biology & Medicine*. 12. 1627–1638.
- ³⁷⁸ Trifunovic, A.; Wredenberg, A.; Falkenberg, M.; Spelbrink, J.; Rovio, A.; Bruder, C.; Bohlooly-Y, M.; Gidlöf, S.; Oldfors, A.; Wibom, R.; Törnell, J.; Jacobs, H.; Larsson, N. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 6990. 417–423.
- ³⁷⁹ Trojanek, J.; Cobos-Correa, A.; Diemer, S.; Kormann, M.; Schubert, S.; Zhou-Suckow, Z.; Agrawal, R.; Duerr, J.; Wagner, C.; Schatterny, J.; Hirtz, S.; Sommerburg, O.; Hartl, D.; Schultz, C.; Mall, M. (2014). Airway mucus obstruction triggers macrophage activation and matrix metalloproteinase 12-dependent emphysema. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 5. 709–720.
- ³⁸⁰ Tudor, R.; Petrache, I. (2012). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 8. 2749–2755.
- ³⁸¹ Tudor, R.; Yoshida, T.; Arap, W.; Pasqualini, R.; Petrache, I. (2006). State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 6. 503–510.
- ³⁸² Tzima, E.; Reader, J.; Irani-Tehrani, M.; Ewalt, K.; Schwartz, M.; Schimmel, P. (2003). Biologically active fragment of a human tRNA synthetase inhibits fluid shear stress-activated responses of endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 25. 14903–14907.
- ³⁸³ Ueyama, T.; Geiszt, M.; Leto, T. (2006). Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Molecular and Cellular Biology*. 6. 2160–2174.

- ³⁸⁴ Ueyama, T.; Lekstrom, K.; Tsujibe, S.; Saito, N.; Leto, T. (2007). Subcellular localization and function of alternatively spliced Nox1 isoforms. *Free Radical Biology & Medicine*. 2. 180–190.
- ³⁸⁵ Ushio-Fukai, M.; Zafari, A.; Fukui, T.; Ishizaka, N.; Griendling, K. (1996). p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 38. 23317–23321.
- ³⁸⁶ Van Bon L.; Cossu M.; Scharstuhl, A.; Pennings B.; Vonk M.; Vreman H.; Lafyatis R.; Van den Berg, Wim W., Frank A.; Radstake, T. (2016). Low heme oxygenase-1 levels in patients with systemic sclerosis are associated with an altered Toll-like receptor response: another role for CXCL4? *Rheumatology*. 55. 2066–2073.
- ³⁸⁷ Van der Toorn, M.; Slebos, D.; Bruin, H.; Leuvenink, H.; Bakker, S.; Gans, R.; Koeter, G.; van Oosterhout, A.; Kauffman, H. (2007). Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 5. 1211-8.
- ³⁸⁸ Van der Vaart, H.; Postma, Dirkje S.; Timens, Wim; Hylkema, Machteld N.; Willemse, Brigitte W M; Boezen, H. Marike; Vonk, Judith M.; de Reus, Dorothea M; Kauffman, H.; ten Hacken, Nick H T (2005). Acute effects of cigarette smoking on inflammation in healthy intermittent smokers. *Respiratory Research*. 6. 22.
- ³⁸⁹ Van Schayck, C.; Chavannes, N. (2003). Detection of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in primary care. *European Respiratory Journal*. Supplement 39. 16–22.
- ³⁹⁰ Veronese, F.; Caliceti, P.; Schiavon, O.; Sergi, M. (2002). Polyethylene glycol–superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 4. 587–606.
- ³⁹¹ Verschoor, C.; Puchta A.; Bowdish D. (2012). The macrophage. *Methods in Molecular Biology*. 844. 139–156.
- ³⁹² Vignais, P. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 9. 1428–1459.
- ³⁹³ Vivona M.; Matthay M.; Chabaud M.; Friedlander G.; Clerici C. (2001). Hypoxia reduces alveolar epithelial sodium and fluid transport in rats: reversal by beta-adrenergic agonist treatment. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 25. 554–561.

- ³⁹⁴ Voelkel, N.; Gomez-Arroyo, J.; Mizuno, S. (2011). COPD/emphysema: The vascular story. *Pulmonary Circulation*. 3. 320–326.
- ³⁹⁵ Vogelmeier, C.; Koczulla, R.; Fehrenbach, H.; Bals, R. (2006). Pathogenese der COPD. *Der Internist*. 9. 885-6, 888-90, 892-4.
- ³⁹⁶ Vollmer, W.; Gíslason, T.; Burney, P.; Enright, P. L.; Gulsvik, A.; Kocabas, A.; Buist, A. (2009). Comparison of spirometry criteria for the diagnosis of COPD: results from the BOLD study. *The European Respiratory Journal*. 3. 588–597.
- ³⁹⁷ Wang, Y.; Wang, G.; Rabinovitch, P.; Tabas, I. (2014). Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in macrophages. *Circulation Research*. 3. 421–433.
- ³⁹⁸ Weitzenblum, E.; Hirth, C.; Ducolone, A.; Mirhom, R.; Rasaholinjanahary, J.; Ehrhart, M. (1981). Prognostic value of pulmonary artery pressure in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 10. 752–758.
- ³⁹⁹ West, J. 2011. *Respiratory Physiology: The Essentials*. 9th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore.
- ⁴⁰⁰ White, K.; Lu Y.; Annis, S.; Hale A.; Chau B.; Dahlman, J.; Hemann C.; Opotowsky A.; Vargas S.; Rosas, I.; Perrella M.; Osorio, J.; Haley K.; Graham B.; Kumar R.; Saggari R.; Wallace W.; Ross D.; Khan O.; Bader A.; Gochuico B.; Matar M.; Polach K.; Johannessen N.; Prosser H.; Anderson D.; Langer R.; Zweier J.; Bindoff L.; Systrom D.; Waxman A.; Jin Ri.; Chan S. (2015). Genetic and hypoxic alterations of the microRNA-210-ISCU1/2 axis promote iron-sulfur deficiency and pulmonary hypertension. *EMBO Molecular Medicine*. 6. 695–713.
- ⁴⁰¹ Wick, M.; Buesing, E.; Wehling, C.; Loomis, Z.; Cool, C.; Zamora, M.; Miller, York E.; Colgan p.; Hersh, L.; Voelkel, N.; Dempsey, E. (2011). Decreased neprilysin and pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 3. 330–340.
- ⁴⁰² Wong, J.; Magun, B.; Wood, L. (2016). Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 1391–1401.
- ⁴⁰³ World Health Organization (2004). Annex Table 2 Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, a estimate for 2002. *World Health Report Statistical Annex 2004*. 120–124.

- ⁴⁰⁴ Wright, J.; Churg, A. (1990). Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *The American Review of Respiratory Disease*. 142. 1422–1428.
- ⁴⁰⁵ Wright, J.; Churg, A. (2008). Short-term exposure to cigarette smoke induces endothelial dysfunction in small intrapulmonary arteries: analysis using guinea pig precision cut lung slices. *Journal of Applied Physiology*. 5. 1462–1469.
- ⁴⁰⁶ Wright, J.; Churg, A. (2010). Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 6. 723–734.
- ⁴⁰⁷ Wright, J.; Cosio, M.; Churg, A. (2008). Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1. 1–15.
- ⁴⁰⁸ Wright J.; Churg A. (2008). Animal models of COPD: Barriers, successes, and challenges. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 5. 696–698.
- ⁴⁰⁹ Wright J.; Tai H.; Churg A. Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig. *Journal of Applied Physiology*. 100. 672–678.
- ⁴¹⁰ www.goldcopd.org. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Bethesda/Geneva, National Institutes of Health/World Health Organization, 2007.
- ⁴¹¹ Wyllie A.; Kerr J.; Currie A. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*. 68. 251–306.
- ⁴¹² Wziątek-Nowak W.; Gierczyński J.; Dąbrowiecki P.; Gałązka-Sobotka M.; Fal A.; Gryglewicz J.; Badyda A. (2016). Socioeconomic Effects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease from the Public Payer's Perspective in Poland. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 885. 53–66.
- ⁴¹³ Xia Y.; Zweier J. (1997). Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94. 6954–6958.
- ⁴¹⁴ Yamamoto, A.; Takeya, R.; Matsumoto, M.; Nakayama, K.; Sumimoto, H. (2013). Phosphorylation of Nox1 at threonine 341 regulates its interaction with Nox1 and the superoxide-producing activity of Nox1. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. 20. 5145–5159.

- ⁴¹⁵ Yanai, M.; Sekizawa, K.; Ohru, T.; Sasaki, H.; Takishima, T. (1992). Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *Journal of Applied Physiology*. 3. 1016–1023.
- ⁴¹⁶ Yao, H.; Edirisinghe, I.; Yang, S.; Rajendrasozhan, S.; Kode, A.; Caito, S.; Adenuga, D.; Rahman, I. (2008). Genetic ablation of NADPH oxidase enhances susceptibility to cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *The American Journal of Pathology*. 5. 1222–1237.
- ⁴¹⁷ Yokohori, N.; Aoshiba, K.; Nagai, A. (2004). Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest*. 2. 626–632.
- ⁴¹⁸ Yoon, S.; Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 1. 21–44.
- ⁴¹⁹ Yoshida, T.; Tuder, R. (2007). Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiological Reviews*. 3. 1047–1082.
- ⁴²⁰ Youn, J.; Gao, L.; Cai, H. (2012). The p47phox- and NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1)-dependent activation of NADPH oxidase 1 (NOX1) mediates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling and endothelial dysfunction in a streptozotocin-induced murine model of diabetes. *Diabetologia*. 7. 2069–2079.
- ⁴²¹ Yousefi, S.; Cooper, P.; Mueck, B.; Potter, S.; Jarai, G. (2000). cDNA representational difference analysis of human neutrophils stimulated by GM-CSF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2. 401–409.
- ⁴²² Yu, G.; Chen, X.; Chen, S.; Ye, W.; Hou, K.; Liang, M. (2016). MiR-19a, miR-122 and miR-223 are differentially regulated by hepatitis B virus X protein and involve in cell proliferation in hepatoma cells. *Journal of Translational Medicine*. 1. 122.
- ⁴²³ Yu, L.; DeLeo, F.; Biberstine-Kinkade, K.; Renee, J.; Nauseef, W.; Dinauer, M. (1999). Biosynthesis of Flavocytochrome b558 . gp91(phox) Is Synthesized as a 65-kDa Precursor (p65) in the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. 7.
- ⁴²⁴ Yu, X.; Zhang, J.; Zhao, Fei; Pan, X. (2014). Relationships of COX2 and MMP12 genetic polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*. 12. 8149–8162.

- ⁴²⁵ Yu, Y.; Xiong, Y.; Montani, J.; Yang, Z.; Ming, X. (2016). En Face Detection of Nitric Oxide and Superoxide in Endothelial Layer of Intact Arteries. *Journal of Visualized Experiments*. 108. 53718.
- ⁴²⁶ Zeng, H.; Kong, X.; Peng, H.; Chen, Y.; Cai, S.; Luo, H.; Chen, P. (2012). Apoptosis and Bcl-2 family proteins, taken to chronic obstructive pulmonary disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 6. 711–727.
- ⁴²⁷ Zeng, Y.; Zhang, X.; Kang, K.; Chen, J.; Wu, Z.; Huang, J.; Lu, W.; Chen, Y.; Zhang, Jie; Wang, Zhiwei; Zhai, Yujia; Qu, Junle; Ramchandran, R.; Raj, J. Usha; Wang, J.; Gou, Deming (2016). MicroRNA-223 Attenuates Hypoxia-induced Vascular Remodeling by Targeting RhoB/MLC2 in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Scientific Reports*. 24900.
- ⁴²⁸ Zhang, H.; Wang, X.; Lin, J.; Sun, Y.; Huang, Y.; Yang, T.; Zheng, S.; Fan, M.; Zhang, J. (2013). Reduced regional gray matter volume in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a voxel-based morphometry study. *American Journal of Neuroradiology*. 2. 334–339.
- ⁴²⁹ Zhang, X.; Shan, P.; Jiang, G.; Cohn, L.; Lee, P. (2006). Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *The Journal of Clinical Investigation*. 11. 3050–3059.
- ⁴³⁰ Zheng, T.; Zhu, Z.; Wang, Z.; Homer, R. J.; Ma, B.; Riese, R. J.; Chapman, H. A.; Shapiro, S.; Elias, J. A. (2000). Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *The Journal of Clinical Investigation*. 9. 1081–1093.

9. Eigenständigkeitserklärung

„Ich, Mariola Bednorz, erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten 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.

Datum:

Unterschrift:

Danksagung

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. Norbert Weißmann für die Möglichkeit, die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am „*Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System/ Cardio-Pulmonary Institute*“ durchzuführen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Lakes-Harlan vom Institut der Integrativen Sinnesphysiologie für die Betreuung im Fachbereich Biologie.

Ebenso möchte ich Dr. Michael Seimetz für seine Unterstützung in der Endphase der Dissertation danken.

Ein großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Weißmann, insbesondere den technischen Assistentinnen Frau Karin Quanz (Physiologie), Frau Ingrid Breitenborn-Müller (Molekularbiologie), Frau Elisabeth Kappes, Frau Carmen Homberger (Zellkultur), Frau Miriam Schmidt und Frau Lisa Fröhlich (Histologie), Frau Sabine Hurka (Tierzucht), Frau Ewa Bienek (Histologie) und Aydin Keskin für die hervorragende Organisation im Labor und die Unterstützung bei verschiedenen Versuchen.

Auch ein Dank an Dr. Oleg Pak für die Unterstützung während der Endphase der Dissertation, für Diskussionsbereitschaft in allen Fragen, den freundschaftlichen Umgang und die Ratschläge.

Dr. Baktybek Konjonazararov danke ich für die Durchführung der Echokardiographie bei meinen Versuchstieren.

Ferner danke ich meinen Kolleginnen Frau Dr. Elsa Tadele, Dr. Azadeh Esfandiary, Frau Dr. Susan Scheibe und Frau Dr. Monika Brosien für die tolle Zeit im Doktorandenbüro, die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen sowie für die Zeit auf diversen Konferenzen und Fortbildungen.

Ferner möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Werner Seeger und Dr. Rory E. Morty für die Aufnahme in das Graduiertenprogramm „Molecular Biology and Medicine of the Lung“ (MBML) bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Adrian Stebel. Ich danke ihm für seine Unterstützung, Geduld, Ausdauer im privaten Lebensbereich und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatte.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, allen voran meiner allerliebsten Mama, für die Geduld und Unterstützung während meines gesamten Studiums sowie der Promotion bedanken. Ich danke meiner Mutter, dass sie mir ermöglicht hat zu studieren und dass sie immer an mich geglaubt hat.