

**Die Rolle von Cytochrom c Untereinheit 4 Isoform 2 (Cox4i2) in der chronisch
Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie**

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

vorgelegt von
Felix Theo Maria Jonas
aus Essen

Gießen, 2019

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Direktor: Prof. Dr. Werner Seeger

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
(Standort Gießen)

Gutachter: PD Dr. med. N. Sommer

Gutachter: Prof. Dr. R. Tikkanen

Tag der Disputation: 28.11.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Die Lunge	6
1.1.1 Aufbau und Funktion	6
1.1.2 Gasaustausch	6
1.1.3 Lungenkreislauf	7
1.1.4 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)	7
1.2 Pulmonale Hypertonie	8
1.2.1 Die klinische Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie	9
1.2.2 Pathophysiologische Merkmale der PH	11
1.2.3 Hypoxie und pulmonale Hypertonie	17
1.2.4 Warburg Hypothese	18
1.3 Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 Alpha (Hif-1 α)	18
1.3.1 Bedeutung von Hif-1 α an der Entstehung der Hypoxie-induzierten PH	19
1.3.2 Der Einfluss von Hif-1 α auf den Zellmetabolismus	20
1.4 Cytochrom c Untereinheit 4 Isoform 2 (Cox4i2)	20
1.4.1 Die Mitochondrien	20
1.4.2 Die mitochondriale Atmungskette	21
1.4.3 Regulation der mitochondrialen Atmungskette	22
1.4.4 Mitochondrien und ROS	23
1.4.5 Sauerstoffdetektion durch Mitochondrien	24
1.4.6 Cytochrom c Oxidase (COX)	26
1.4.7 Cytochrom c Oxidase Untereinheit 4 Isoform 2 (Cox4i2)	28
1.5 Zielsetzung der Arbeit	30
2. Material & Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Versuchsmäuse	32
2.1.2 Tierversuchsgenehmigung	32
2.1.3 Verwendete Geräte	33
2.1.4 Verwendete Materialien	36
2.1.5 Verwendete Kits und Antikörper	41
2.1.6 Verwendete Lösungen, Puffer und Gele	43
2.2 Methoden	45
2.2.1 Mausmodell: Chronische Hypoxie	45
2.2.2 Echokardiographie	46

2.2.3 Hämodynamische Messung (<i>closed-chest</i> Methode).....	49
2.2.4 Immunohistochemie	51
2.2.5 Isolation von PASMC aus Mauslungen	55
2.2.6 Zellkultur der mPASMC	56
2.2.7 <i>in vitro</i> -Experimente.....	57
2.2.8 Proteinisolation und Western Blot	61
2.2.9 RNA-Isolation und cDNA-Synthese.....	63
2.2.10 Quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion	64
3. Ergebnisse	68
3.1 <i>In vitro</i> -Experimente	68
3.1.1 Einfluss unterschiedlicher O ₂ -Konzentrationen auf die Proteinmenge von Cox4i2 und Hif-1α.....	68
3.1.2 Einfluss der O ₂ -Konzentration auf die mRNA-Expression von Cox4i2	70
3.1.3 Untersuchungen der Abhängigkeit von Cox4i2 und Hif-1α.....	70
3.1.4 Untersuchung der Proliferation von Cox4i2 ^{-/-} mPASMC unter chronischer Hypoxie.....	74
3.2 <i>in vivo</i> -Experimente.....	76
3.2.1 Echokardiographische Untersuchungen.....	76
3.2.2 Hämodynamische Untersuchungen	82
3.2.3 Immunohistochemische Untersuchungen	86
4. Diskussion	88
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	88
4.2 Kritische Betrachtung der verwendeten Modelle und Methoden.....	88
4.2.1 Das Mausmodell.....	89
4.2.2 Hämodynamische Messungen und Echokardiographie	90
4.2.3 <i>In vitro</i> Experimente.....	93
4.3 Diskussion der Ergebnisse.....	93
4.3.1 Die Regulation von Cox4i2 unter chronischer Hypoxie	94
4.3.2 Der Einfluss von Cox4i2 auf die Entwicklung der Hypoxie-induzierten PH	96
4.4 Fazit und Ausblick	103
5. Zusammenfassung	106
6. Summary	107
7. Bibliografie	108

8. Abbildungsverzeichnis	117
9. Tabellenverzeichnis	119
10. Abkürzungen.....	121
11. Veröffentlichungen.....	128
11.1 Poster-Präsentationen	128
11.2 Originalarbeiten.....	128
12. Erklärung zur Dissertation.....	129
13. Danksagung	130

1. Einleitung

1.1 Die Lunge

1.1.1 Aufbau und Funktion

Die Lunge liegt im Brustkorb des Menschen und ist in einen rechten und einen linken Lungenflügel gegliedert. Der rechte Lungenflügel unterteilt sich in drei, der linke Lungenflügel in zwei Lungenlappen (Klinke et al. 2010). Beide Lungenflügel besitzen zehn Lungensegmente, wobei häufig das siebte Lungensegment im linken Lungenflügel nicht ausgebildet ist (Aumüller et al. 2010). Die anatomische Gliederung der Lunge orientiert sich am dichotomem Verzweigungssystem, in dem sich der Hauptbronchus zunächst in die Lappen- und Segmentbronchien und schließlich in die Bronchiolen verzweigt. Weitere Verzweigungsgenerationen von Bronchiolen schließen sich an, bis schließlich die Bronchioli terminales (0,5-0,8 mm) erreicht sind. Hier endet der rein luftleitende Teil der Luftwege. Es schließen sich die Bronchioli respiratorii an. Diese sind bereits am Gasaustausch beteiligt. Über den Ductus alveolaris münden die Atemwege in die Alveolen (Durchmesser von 75-300 μm) (Klinke et al. 2010). Die Alveolen sind mit einem dichten Netz von Kapillaren umgeben und bilden mit einer Gesamtoberfläche von ca. 50-120 m^2 den Hauptort für den Gasaustausch.

In der Lunge findet die sogenannte „äußere Atmung“ statt. Hierbei erfolgt durch Diffusion eine Reoxygenierung des Hämoglobins in den Erythrozyten und die Entfernung von Kohlenstoffdioxid (CO_2) aus dem Blut. Sauerstoff (O_2) wird in den Erythrozyten, an Hämoglobin gekoppelt, im Blut transportiert. CO_2 hingegen wird zu 90% in Form von Bikarbonat im Blut transportiert. Die übrigen 10% des CO_2 liegen als physikalisch gelöste Form oder auch als Carbamat an Hämoglobin gebunden vor (Klinke et al. 2010). In der Zelle wird unter Verbrauch von O_2 und der Generation von CO_2 der lebenswichtige Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) gebildet. Die zelluläre Aufnahme von O_2 und Abgabe von CO_2 wird als „innere Atmung“ bezeichnet (Klinke et al. 2010).

1.1.2 Gasaustausch

Der Gasaustausch von O_2 und CO_2 findet ausschließlich über Diffusion statt (Klinke et al. 2010). Der Antrieb für die Diffusion resultiert aus der Partialdruckdifferenz (Δp) zwischen dem Gaspartialdruck von O_2 ($p\text{O}_2$) und CO_2 ($p\text{CO}_2$) im Alveolarraum und dem in der Lungenstrombahn. Für einen funktionierenden Gasaustausch ist zudem die

Austauschfläche und die Diffusionsstrecke, die Alveolarmembran, wichtig (Klinke et al. 2010). Ist die Austauschfläche reduziert, z.B. bei obstruktiven Lungenerkrankungen, oder die Diffusionsstrecke erhöht, folgt eine verminderte Diffusionskapazität und somit eine schlechtere Oxygenierung des Bluts (Klinke et al. 2010).

1.1.3 Lungenkreislauf

Neben einer ausreichenden Ventilation der Lunge ist die Lungenperfusion essentiell für einen funktionierenden Gasaustausch. Dabei wird Blut vom rechten Ventrikel entlang eines Druckgefälles durch den Lungenkreislauf in den linken Vorhof gepumpt.

Der Lungenkreislauf gehört zum Niedrigdrucksystem mit einem mittleren pulmonal-arteriellen Druck (mPAP) von 14 ± 3 mmHg in Ruhe (Galie et al. 2016). Die systolischen Druckwerte liegen bei 20-25 mmHg, die diastolischen Drücke bei 8-10 mmHg. Im Unterschied zum großen Kreislauf gibt es keine spezifischen Widerstandsgefäße. Der Gefäßwiderstand resultiert zu einem großen Teil aus den kleinen pulmonal-arteriellen Gefäßen und der Lungenkapazität bzw. Gefäßelastizität der vornehmlich mittleren und großen pulmonal-arteriellen Gefäße (Klinke et al. 2010, Mocerri et al. 2014). Der mPAP unterliegt nur geringen Schwankungen, auch unter körperlicher Arbeit. Die Durchblutung der Lungenkapillaren ist abhängig vom intravasalen hydrostatischen Druck und vom Luftdruck der Alveolen. Steigt der hydrostatische Druck bei körperlicher Arbeit können Lungenkapillaren zusätzlich rekrutiert und der mPAP gesenkt werden. In diesem Zusammenhang erhöht sich die am Gasaustausch teilnehmende Fläche und es kommt zu einer verminderten Flussgeschwindigkeit des Blutes, was in einer verlängerten Kontaktzeit der Erythrozyten in den Alveolen resultiert. Beides nimmt positiven Einfluss auf die Diffusion und Reoxygenierung des Hämoglobins (Klinke et al. 2010).

1.1.4 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Im Zuge verminderter Ventilation von Lungenabschnitten kann der Körper die Perfusion in den betroffenen Abschnitten verringern. Ziel ist die optimale Oxygenierung des Blutes. Zugrunde liegt der sogenannte Euler-Liljestrand-Mechanismus, welcher 1946 von Euler und Liljestrand veröffentlicht wurde. Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) tritt bereits bei geringer Hypoxie bei einem $pO_2 < 100$ mmHg (je nach Spezies) auf (Weissmann et al. 2006). Die Ausprägung der HPV ist dabei von unterschiedlichen Faktoren, wie z.B. Spezies, Alter, Geschlecht oder pO_2 , abhängig. Die in den präkapillären Arterien vorkommenden pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) wurden als O_2 -Sensor- und Effektorzellen identifiziert (Weissmann et al. 2006).

Dies zeigten Experimente mit isolierten PASMC. O_2 -Radikale scheinen in der verantwortlichen Signalkaskade eine zentrale Rolle zu spielen (Sommer et al. 2016). Die gegenwärtigen Theorien zur O_2 -Detektion und der Signalwege der HPV werden im weiteren Verlauf der Arbeit vorgestellt. Im Rahmen der chronischen Hypoxie gibt es Hinweise, dass Endothelzellen (EC, *endothelial cells*) und Fibroblasten die Aufrechterhaltung der prolongierten Vasokonstriktion modulieren können (Weissmann et al. 2006).

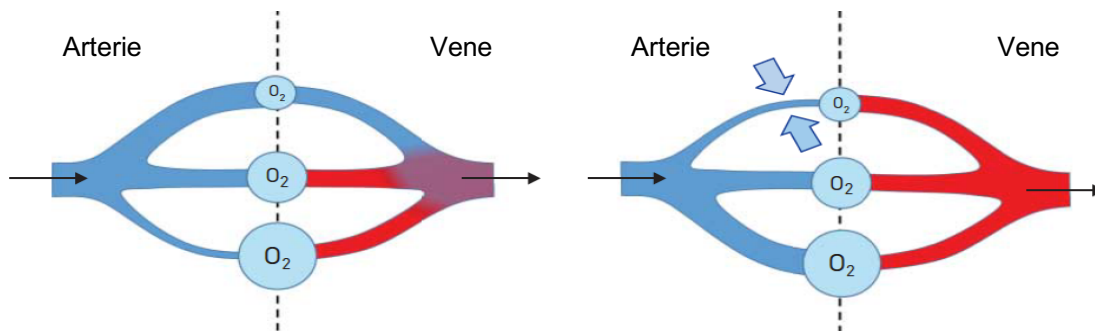


Abbildung 1: Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV).

Die HPV dient der Umverteilung von Blut in besser ventilerte Abschnitte der Lunge, sodass eine effizientere Blut-Oxygenierung erreicht werden kann. Das linke Bild demonstriert die verminderte Oxygenierung des Blutes bei Ausfall der HPV. Blaue Pfeile demonstrieren die Vasokonstriktion, schwarze Pfeile die Richtung des Blutflusses.

Reproduced with permission of the © ERS 2016. European Respiratory Journal Jan 2016, 47 (1) 288-303; DOI: 10.1183/13993003.00945-2015

1.2 Pulmonale Hypertonie

Die Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine chronisch progrediente Lungenerkrankung, die mit einem erhöhten mPAP und pulmonalen Gefäßwiderstand (PVR) im Lungenkreislauf einhergeht. Die PH wird über einen mPAP ≥ 25 mmHg, der durch einen Rechtsherzkatheter in Ruhelage gemessen wird (Galie et al. 2016), definiert.

Im Verlauf der Erkrankung kommt es durch den erhöhten mPAP und PVR zu einer chronischen Rechtsherzbelastung. Diese wird zunächst durch eine konzentrische Rechtsherzhypertrophie kompensiert (Bogaard et al. 2009). Die chronisch progressive Erhöhung des PVR im Lungenkreislauf kann der rechte Ventrikel dauerhaft nicht kompensieren. Es folgt der Übergang zu einer Ventrikeldilatation mit einem Abfall der Ventrikelkontraktilität und Erhöhung der Wandspannung. Aufgrund der erhöhten Wandspannung und Muskelmasse nimmt die koronare Perfusion des Herzmuskels ab, wodurch die Kontraktilität weiter sinkt und die Dilatation zunimmt. Ein Teufelskreis beginnt, der schließlich zur Rechtsherzinsuffizienz mit sinkendem Herzauswurfsvolumen

führt. Letztlich folgt das Rechtsherzversagen (Bogaard et al. 2009). Dies stellt die häufigste Todesursache bei Patienten mit PH dar (Vonk Noordegraaf et al. 2011). Die rechtsventrikuläre Pumpfunktion ist somit ein wichtiger Prognosemarker der Erkrankung (Chin et al. 2005).

Die klinische Symptomatik der PH ist sehr unspezifisch und ist vor allem durch die zunehmende Rechtsherzinsuffizienz charakterisiert. Häufig klagen Patienten über Müdigkeit, reduzierte körperliche Belastbarkeit, Belastungsdyspnoe, Schwäche und Synkopen, einem Zustand mit kurzzeitigem Bewusstseinsverlust ohne mnestiche Defizite (Galie et al. 2016).

1.2.1 Die klinische Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie

Die PH kann vielfältige Ursachen haben. Die Nizza-Klassifikation, aus dem Jahr 2013, teilt die PH entsprechend unterschiedlicher Ätiologien in fünf Klassen ein. Kriterien für die unterschiedliche Klassifizierung sind gemeinsame pathologische und hämodynamische Merkmale sowie therapeutische Strategien. Die Klassifikation dient der verbesserten Kommunikation über einzelne Patienten und der Standardisierung von Diagnose und Therapie. Zusätzlich können klinische Studien die unterschiedlichen Patientengruppen der Klassifikation besser untersuchen (Simonneau et al. 2004).

Tabelle 1: Aktualisierte Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (PH), Nizza, 2013.

<ol style="list-style-type: none">1. <u>Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)</u><ol style="list-style-type: none">1.1. Idiopathische PAH (IPAH)1.2. Hereditäre PAH<ol style="list-style-type: none">1.2.1. BMPR-2-Mutation1.2.2. Andere Genmutationen (ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3)1.2.3. Unbekannte Ursachen1.3. PAH assoziiert mit Medikamenten, Drogen, Toxinen1.4. PAH assoziiert mit<ol style="list-style-type: none">1.4.1. Bindegewebserkrankungen1.4.2. HIV- Infektionen1.4.3. Portaler Hypertension1.4.4. Angeborenen Herzfehlern1.4.5. Schistosomiasis1'. Pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose1''. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)2. <u>Pulmonale Hypertonie (PH) bei Linksherzerkrankungen</u><ol style="list-style-type: none">2.1. Systolische Dysfunktion2.2. Diastolische Dysfunktion2.3. Klappenerkrankungen2.4. Angeborene/erworbene Obstruktion des Linksherz-Ausflusstraktes und angeborene Kardiomyopathien

3. PH bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxämie
 - 3.1. Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
 - 3.2. Interstitielle Lungenerkrankungen
 - 3.3. andere Lungenerkrankungen mit gemischtem restriktiv-obstruktivem Muster
 - 3.4. Schlafbezogene Atemstörungen
 - 3.5. Alveoläre Hypoventilationssyndrome
 - 3.6. Chronischer Aufenthalt in großer Höhe
 - 3.7. Entwicklungsstörungen
4. Chronische thromboembolische PH (CTEPH)
 - 4.1. Typ 1 (20%): Thrombus im Hauptstamm
 - 4.2. Typ 2 (70%): Befall der Lappenarterien
 - 4.3. Typ 3 und 4 (10%): Weiter distal gelegene Veränderungen der Lungenarterien
5. PH unklarer und/oder multifaktorieller Genese (selten)
 - 5.1. Hämatologische Erkrankungen: chronisch hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
 - 5.2. Systemerkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose, Lymphangioliomyomatose
 - 5.3. Metabolische Erkrankungen: Glykogene Speicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
 - 5.4. Andere Erkrankungen: Tumoröse Obstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz mit Hämodialyse

Modifiziert nach Simonneau et al. (Simonneau et al. 2013).

Die erste Gruppe umfasst die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH). Dazu gehört die idiopathische PAH (IPAH), für welche die Ursachen unklar bleiben. Eine weitere Untergruppe stellt die hereditäre Form der PAH (HPAH) dar. In etwa 80% der Familien, in denen gehäuft Fälle von PAH auftreten, können genetische Mutationen des *bone morphogenic protein receptor type 2* (BMPR2) festgestellt werden. Auch andere Mutationen sind mit der HPAH in 5% der Patienten assoziiert worden (Simonneau et al. 2013). Hierbei sind die Genloci für folgende Proteine identifiziert worden: ALK-1 (*activin-like receptor kinase-1*), ENG (*endoglin*), Smad 9, CAV1 (*caveolin-1*) und KCNK3 (*potassium channel super family K member-3*). Weiterhin bildet die Medikamenten-assoziierte PH eine Untergruppe. Hierbei sind verschiedene Medikamente mit unterschiedlichem Risiko für die Entstehung einer PAH aufgelistet. Derivate von Fenfuramin, einem Appetitzügler, gelten als sichere Verursacher einer PAH. Eine weitere Untergruppe wird von PAH assoziierten Krankheiten gebildet. Hierzu zählen Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), Kollagenosen und Schistosomiasis. Außerdem umfasst sie die persistierende PH des Neugeborenen, die pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder die pulmonalkapilläre Hämangiomatose (Simonneau et al. 2004). Die Gruppe der PAH zeigt charakteristische histologische Veränderungen und wird häufig auch als Modellerkrankung aus der Gruppe der PH

herangezogen. Für diese Gruppe sind die meisten spezifischen medikamentösen Therapiemöglichkeiten entwickelt worden.

Erkrankungen des linken Herzens, welche zu einer PH führen, sind in der zweiten Gruppe zusammengefasst. Dabei steht die Verbesserung und Stabilisierung der Herzfunktion im Fokus der Therapie (Simonneau et al. 2004).

Die dritte Gruppe beschreibt PH-Formen, welche mit verschiedenen, meist chronischen Lungenerkrankungen bzw. chronischer Hypoxie-Exposition assoziiert sind. Insbesondere chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, z.B. COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) oder interstitielle Lungenerkrankungen, wie die Lungenfibrose, sind bekannte Verursacher. Zusätzlich gehören auch Patienten mit Schlafapnoe-Syndrom zu dieser Gruppe. Patienten, die in großen Höhen, wie den Anden oder dem Himalaya leben und aufgrund eines höhenbedingten niedrigen pO_2 , eine PH entwickeln, werden auch zu dieser Gruppe gezählt. Die gemeinsame Therapie dieser Gruppe besteht in der Behandlung der zugrundeliegenden Lungenerkrankung.

In der vierten Gruppe führen thromboembolische Ereignisse zu PH (Simonneau et al. 2004), die histologisch ähnliche Veränderungen wie bei der PAH zeigt. Diese Gruppe kann im kurativen Ansatz operativ behandelt werden.

Schließlich klassifiziert die fünfte Gruppe die PH mit unklarem bzw. multifaktoriellem Ursprung (Galie et al. 2016).

Bei Patienten mit Verdacht auf PH kann zunächst ein nicht-invasives *Screening* mittels transthorakaler Echokardiographie durchgeführt werden. Hierbei können bereits eingetretene Veränderungen des rechten Herzens bildlich dargestellt und mittels Farbdopplermessungen Aussagen zum pulmonalen Druck gemacht werden. Goldstandard für die endgültige Diagnose und Therapieplanung ist die Rechtsherzkatheter-Untersuchung (Galie et al. 2016). Ergänzende Diagnostik, wie z.B. Blut-Untersuchungen, Thorax-Röntgen, EKG, etc., sollten zur Abklärung der Ursachen und somit der Klassifizierung der PH durchgeführt werden (Galie et al. 2016).

1.2.2 Pathophysiologische Merkmale der PH

In Abhängigkeit der Ätiologie einzelner PH-Formen sind zum Teil ähnliche Pathomechanismen beteiligt. Generell sind die zu einem erhöhten PVR führenden Veränderungen durch eine Trias bestehend aus Vasokonstriktion, Thrombosierung und strukturellem Gefäßumbau (*vaskuläres Remodeling*), gekennzeichnet (Schermyly et al.

2011). Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Veränderungen überschneiden sich zum Teil und sind unterschiedlich gut verstanden. Im Folgenden werden die Mechanismen im Detail beschrieben, die insbesondere auf die PAH zutreffen und in unterschiedlichem Maße auch auf andere Formen der PH.

Pulmonal-arterielle Vasokonstriktion

Die pulmonal-arterielle Vasokonstriktion kann durch unterschiedliche Trigger ausgelöst werden. Hypoxie als direkter Auslöser und die physiologische Bedeutung der HPV wurden bereits weiter oben erläutert (1.1.4 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)). Alternativ kann ebenso im Rahmen einer links-atrialen Hypertonie über kardiopulmonale Reflexbögen eine Vasokonstriktion ausgelöst werden (Huber et al. 2015). In beiden Fällen führt eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung zur Vasokonstriktion. Die Ca^{2+} -Erhöhung kann durch extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom oder durch die Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern bedingt sein (Sommer et al. 2008). Unter Hypoxie und in IPAH Patienten wurde eine Herunterregulation bzw. Inhibition von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen (K_v -Kanäle), speziell $K_v2.1$, $K_v1.5$ und $K_v9.3$, in PASMC festgestellt (Sommer et al. 2008, Schermuly et al. 2011). Damit verbunden ist ein niedriges Zellmembranpotenzial mit Neigung zu häufiger Membrandepolarisation, welches den extrazellulären Einstrom von Ca^{2+} , durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VOCC), begünstigt. Dies sorgt wiederum für eine höhere Kontraktilität und Proliferation von PASMC (Rabinovitch 2008, Schermuly et al. 2011). Genetische Mutationen im KCNK3-Kanal, einem Hypoxie-sensitiven K^+ -Kanal, sind ebenfalls mit der Entwicklung einer schweren PAH assoziiert, was die Rolle von K^+ -Kanälen in der PH unterstreicht (Ma et al. 2013). Weiterhin kann die Vasokonstriktion durch parakrine Sekretion vasoaktiver Substanzen, im Rahmen einer Dysfunktion des Endothels, moduliert werden. Bei Patienten mit PAH wurde ein Überwiegen von Vasokonstriktoren, wie Thromboxan A_2 (TXA_2), Endothelin-1 (ET-1) und Serotonin (5-HT) gefunden, während Vasodilatoren, wie z.B. Prostaglandin I_2 (PGI_2), Stickstoffmonoxid (NO) und zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) reduziert waren (Schermuly et al. 2011).

Thrombosierung

Bei Patienten mit PAH wurde ein gehäuftes Auftreten von Thrombosen in pulmonalen Gefäßen festgestellt. Aufgrund des Nachweises vermehrter Fibrinpeptide, A- und D-Dimere, lässt sich indirekt auf eine vermehrte Fibrinolyse im Rahmen des Abbaus von Blutgerinnseln schließen. Ursachen könnten auch hier in der endothelialen Dysfunktion liegen (Humbert et al. 2004). Vermehrt endothelial produziertes TXA_2 wirkt

gerinnungsfördernd und steigert im Bereich verengter Gefäßlumen, wo eine geringere Blutflussgeschwindigkeit herrscht, die Bildung von Thromben. Auch konnte eine erhöhte Expression von von-Willebrand-Faktor nachgewiesen werden (Humbert et al. 2004). Eine Erhöhung der Scherkräfte oder eine beschädigte Endothelschicht, infolge des erhöhten pulmonal-arteriellen Drucks, könnten diese prokoagulativen Mechanismen aktivieren (Humbert et al. 2004, Mandegar et al. 2004). Aufgrund der Tatsache, dass auch Entzündungsprozesse eine Rolle in der Pathogenese der PH spielen und diese aktivierend auf das Gerinnungssystem wirken, bedarf es noch weiterer Untersuchungen der Bedeutung und Ursache von Thrombosierungen in der PH (Huber et al. 2015).

Pulmonales vaskuläres *Remodeling*

Die pulmonalen Gefäße unterliegen einem ständigen Gleichgewicht von Proliferation und Apoptose. Im Rahmen der PH kommt es zu einem Ungleichgewicht zugunsten der Proliferation, was schließlich zu einer Verdickung der Gefäßwand mit konsekutiver Einengung des Gefäßlumens und Erhöhung des PVR führt (Mandegar et al. 2004). Mit Zunahme der Gefäßdicke ist auch eine Abnahme der Compliance verbunden. Das bedeutet, dass das pulmonale Gefäßbett bei gesteigertem Herzschlagvolumen, z.B. unter körperlicher Belastung, nur bedingt das vermehrte Schlagvolumen durch Dilatation oder Gefäßrekrutierung aufnehmen kann (Mandegar et al. 2004). Das vaskuläre *Remodeling* betrifft EC, PASMC und Fibroblasten und somit alle Gefäßschichten (Mandegar et al. 2004).

Im Bereich der Intima kommt es zur endothelialen Dysfunktion. Diese umfasst, neben der vermehrten Ausschüttung vasokonstringierender Substanzen, eine unkontrollierte EC-Proliferation, Schädigung der Endothelbarriere und die Entstehung intravasaler Thromben (Mandegar et al. 2004). Die dysregulierte EC-Proliferation in Kombination mit Neoangiogenese führt in PAH-Patienten zu plexiformen Läsionen, welche den laminaren Blutfluss stören. Plexiforme Läsionen befinden sich häufig an Verzweigungsstellen von Arterien und bestehen aus endoluminal multiplen, gewundenen Kanälchen innerhalb der Pulmonalarterie (Tuder et al. 2007). Diese erhöhen im Rahmen des veränderten lokalen Blutflusses das Thromboserisiko. Aufgrund der geschädigten Endothelbarriere können im Blut zirkulierende pro-proliferative Mediatoren direkt auf die PASMC und Fibroblasten Einfluss nehmen, sodass Hypertrophie und ggf. Hyperplasie der Media und Adventitia die Folge sind (Mandegar et al. 2004).

Die Veränderungen der Adventitia umfassen in pulmonal-arteriellen Gefäßen mit einem Durchmesser von ca. 50 µm eine relative Zunahme der Adventitia am

Gefäßdurchmesser von 15 auf 29% (Tuder et al. 2007). Diese ist durch die sehr sensitive hyperproliferative Antwort adventitieller Fibroblasten auf vaskulären Stress bedingt. Dabei wandeln sich diese häufig auch in glatte Muskelzellen um und wandern in die Media ein. Außerdem sezernieren sie Wachstumsfaktoren, die die PASMC zur Proliferation stimulieren (Tuder et al. 2007). Weiterhin werden Fibroblasten in der Adventitia zu einer vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix, besonders von Kollagen, angeregt (Tuder et al. 2007).

Die hypertrophen Veränderungen im Bereich der Media finden sich am häufigsten im Bereich kleiner pulmonaler Arterien (70-500 µm Durchmesser) und präkapillärer Gefäße (< 70 µm Durchmesser). Dadurch können schon kleine Veränderungen des Vasotonus oder der Gefäßstruktur große Auswirkungen auf den PVR haben (Pak et al. 2007). Hypertrophie und auch Hyperplasie lassen den relativen Anteil der Media am Gesamtdurchmesser einer kleinen pulmonalen Arterie von durchschnittlich 10-15% auf 30-60% bei Patienten mit IPAH steigen (Tuder et al. 2007). Außerdem findet bei der IPAH eine Neo-Muskularisierung von ursprünglich nicht-muskularisierten kleinen Gefäße statt. Dies ist jedoch weniger der Hyperplasie von PASMC und vielmehr der Hypertrophie und Umwandlung möglicher Vorläuferzellen (z.B. Perizyten) zu PASMC geschuldet (Mandegar et al. 2004). Auch die Migration und Proliferation von PASMC, bei denen zum Teil eine Abstammung von Fibroblasten oder EC vermutet wird, spielen eine Rolle in der Hypertrophie und *de novo* Muskularisierung (Rabinovitch 2008).

Die Signalwege und Faktoren, die für das pulmonalvaskuläre *Remodeling* eine Rolle spielen, sind Gegenstand aktueller Forschung. Interessanterweise finden sich Ähnlichkeiten mit dem Wachstum von Tumoren. Im Folgenden werden einige der molekularen Signalwege vorgestellt. Abbildung 2 gibt einen graphischen Überblick.

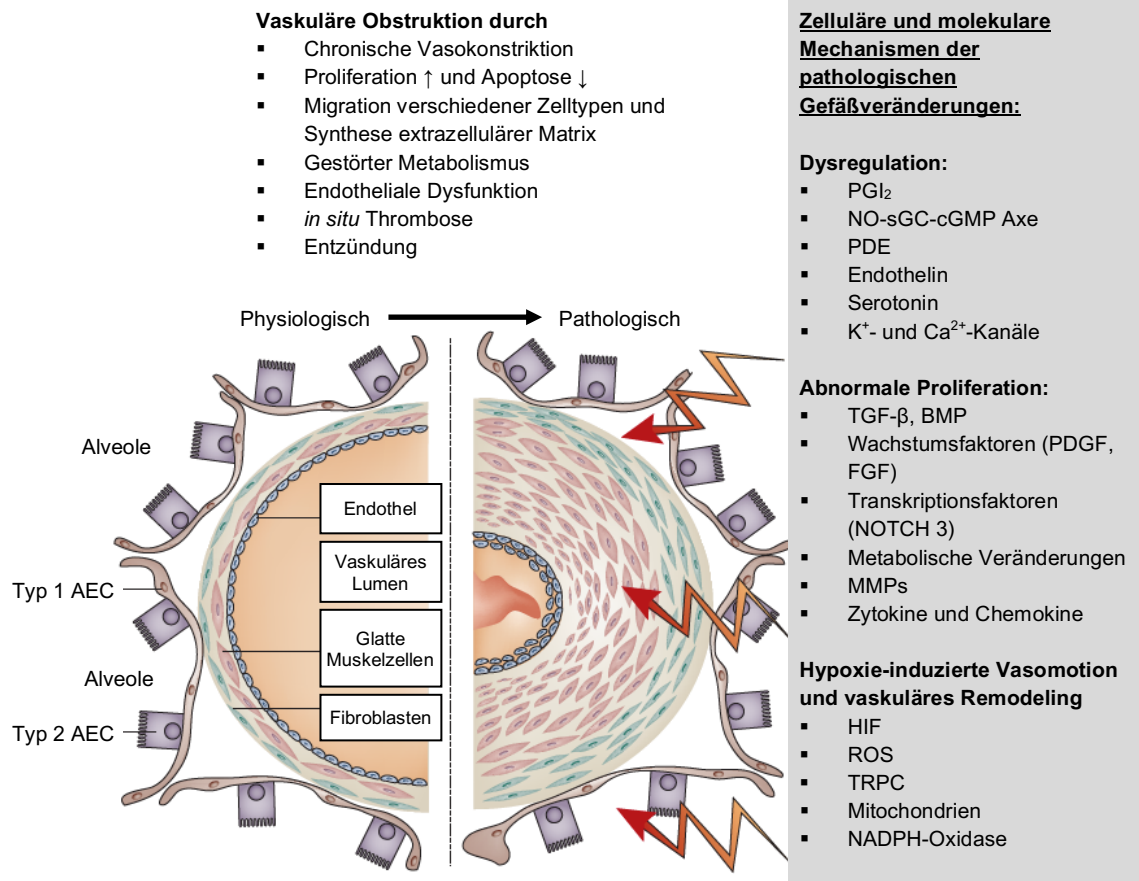


Abbildung 2: Vaskuläres Remodeling und zugrundeliegende Ursachen in pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH).

Abkürzungen: AEC, *alveolar epithelial cell*/Alveolarzelle; K⁻- und Ca²⁺-Kanäle, Kalium- und Kalziumkanäle; BMP, *bone morphogenetic protein*; cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*; EGF, *epidermal growth factor*; HIF, *hypoxia inducible factor*; MMPs, *matrix metalloproteinases*; NADPH, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*; NO, Stickstoffmonoxid; PDGF, *platelet-derived growth factor*; PGI₂, Prostaglandin I₂; sGC *soluble guanylate cyclase*; ROS, *reactive oxygen species*; TGF-β, *transforming growth factor-β*; TRPC, *transient receptor potential cation channels*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.

Übersetzte Abbildung mit Erlaubnis vom Springer Nature Verlag: *Nature; Mechanism of disease: pulmonary arterial hypertension*; Schermuly et al. ©2011.

Ca²⁺ ist, neben seiner Bedeutung in der Vasokonstriktion, auch wichtig für das Wachstum und die Proliferation von PASMC. Einige Ursachen der intrazellulären Ca²⁺-Erhöhung wurden bereits beschrieben. Durch die Ca²⁺-bedingte Ca²⁺/Calmodulin-Komplex Aktivierung können sowohl ruhende PASMC in den Zellzyklus eintreten als auch die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus moduliert werden (Mandegar et al. 2004). In EC führt Ca²⁺ zu einer vermehrten Synthese von AP-1 (*activating protein-1*), da die Geninduktion von AP-1 Ca²⁺-sensitiv ist (Mandegar et al. 2004). AP-1 stimuliert wiederum die vermehrte Synthese von ET-1, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und anderen Wachstumsfaktoren. Diese, auch als Onkogene bekannt, stimulieren Proliferation und Migration und hemmen die Apoptose (Mandegar et al. 2004).

Ein hohes Vorkommen von VEGF und VEGF-2-Rezeptor wurde auch in plexiformen Läsionen bei Patienten mit PAH gefunden (Schermyly et al. 2011). Es wurden weitere Wachstumsfaktoren beschrieben, die vermehrt exprimiert bzw. unter dem Verdacht stehen maßgeblich Einfluss auf die PH zu nehmen. Hierzu zählen *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *fibroblast growth factor-2* (FGF-2), *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *hepatocyte growth factor* (HGF) und *transforming growth factor β* (TGF- β) (Schermyly et al. 2011).

Einige der bereits oben genannten Vasokonstriktoren, welche vom Endothel ausgeschüttet werden, wirken auch pro-proliferativ auf PASMC. ET-1 regt über Endothelin Typ A (ETA) und B Rezeptoren (ETB) PASMC *in vitro* zu Proliferation an (Davie et al. 2002). Allerdings konnte mithilfe von selektiver Antagonisierung von ETA und ETB im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH gezeigt werden, dass ETA hauptverantwortlich für das *Remodeling* und die Entwicklung der PH zu sein scheint (Pullamsetti et al. 2009). Dies kann daran liegen, dass ETB vornehmlich auf Endothelzellen vorkommt, wo es sogar eine gegensätzliche Wirkung vermittelt und vasodilatorisch wirkt (Pullamsetti et al. 2009). ET-1 kann jedoch auch autokrin von PASMC sezerniert werden und führt so in isolierten PASMC unter moderater Hypoxie zu einer Ca^{2+} -Erhöhung und somit zur Induktion von pro-proliferativen Signalwegen (Pisarcik et al. 2013). Auch 5-HT wird eine pro-proliferative Wirkung zugesprochen (Schermyly et al. 2011).

Neben Gefäßmediatoren, Ionenkanälen und Wachstumsfaktoren sind auch inflammatorische Prozesse am vaskulären *Remodeling* beteiligt (Pullamsetti et al. 2011). Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und dendritische Zellen wurden in plexiformen und anderen vaskulären Läsionen bei PAH Patienten gefunden (Schermyly et al. 2011). Auch inflammatorische Zytokine, wie Interleukine (IL-1 β ; IL-6), oder Chemokine, welche für die positive Chemotaxis von Immunzellen verantwortlich sind, konnten in Lungen von IPAH Patienten gefunden werden (Schermyly et al. 2011). Transgene Überexpression von IL-6 in Mäusen führte zu pulmonaler Hypertonie in den Versuchstieren (Schermyly et al. 2011). Durch die Kombination dieser Faktoren werden zusätzlich vaskuläre Läsion verursacht, die wiederum das Risiko für *in situ* Thrombosen steigern (Schermyly et al. 2011). Im Hinblick auf die Infektions-assoziierte PH erklärt es den dortigen Gefäßumbau.

Weiterhin gibt es Hinweise, dass auch ein gestörter Zellmetabolismus eine zentrale Rolle in der Pathogenese der PH spielt. In diesem Zusammenhang haben die Mitochondrien

und *reactive oxygen species* (ROS) eine wichtige Bedeutung. Darauf wird im Rahmen dieser Arbeit noch im Detail eingegangen.

Zusammenfassend kommt es zur Proliferation von EC und PASMC sowie der Migration und Umwandlung von Fibroblasten. Gleichzeitig findet eine erhöhte Produktion extrazellulärer Matrix, besonders von Kollagen, statt. In Kombination von Vasokonstriktion und zunehmender Obliteration des Gefäßlumens steigen mPAP und PVR. Weiterhin leidet die Compliance unter dem vaskulären *Remodeling*. Das bedeutet, dass das pulmonale Gefäßbett bei gesteigertem Herzschlagvolumen, z.B. unter körperlicher Belastung, nur bedingt das vermehrte Schlagvolumen durch Dilatation oder Gefäßrekrutierung aufnehmen kann und insgesamt die Leistungsfähigkeit des Menschen sinkt (Mandegar et al. 2004).

1.2.3 Hypoxie und pulmonale Hypertonie

Physikalische Reize können als Auslöser für umstrukturierende Prozesse an den pulmonalen Gefäßen fungieren. Ein starker physikalischer Stimulus in Hinsicht auf Vasokonstriktion und vaskuläres *Remodeling* ist Hypoxie. Hypoxie bezeichnet ein Mangel an verfügbarem O₂. Dieser kann sich auf den ganzen Organismus, ein bestimmtes Gewebe oder eine einzelne Zelle beziehen. Dabei ist der Begriff Hypoxie relativ zu verstehen, da an unterschiedlichen Orten die O₂-Bedingungen generell sehr verschieden sein können (Welsh et al. 2013). Die Dauer der Hypoxie-Exposition ist ebenfalls relativ. Grundsätzlich unterscheidet man akute Hypoxie (Sekunden bis Tage) von chronischer Hypoxie (Tage bis Wochen). Die Auswirkungen der zeitlichen Exposition können je Beobachtungsschwerpunkt, ob Zelle oder ganzer Organismus, unterschiedlich ausfallen und der Übergang fließend sein (Welsh et al. 2013).

PASMC reagieren auf Hypoxie mit einer Kontraktion. Der zugrundeliegende Euler-Liljestrand Mechanismus wurde bereits erläutert. Verschiedene Studien haben zudem gezeigt, dass Hypoxie durch Inhibition antimitogener Faktoren (NO, PGI₂) und Stimulation mitogener Faktoren (5-HT, ET-1, PDGF) pro-proliferativ auf EC, PASMC und Fibroblasten wirkt (Pak et al. 2007). Zusätzlich stimuliert Hypoxie die Ausschüttung inflammatorischer Faktoren und VEGF. Dies hat nicht nur Einfluss auf die Proliferation der Zellen aller drei Gefäßschichten, sondern auch die zusätzliche Biosynthese extrazellulärer Matrix (Pak et al. 2007). Hypoxie stabilisiert außerdem O₂-sensitive Transkriptionsfaktoren, wie Hif-1α (*hypoxia inducible factor 1 alpha*), die wiederum zu einer vermehrten Expression entsprechender Zielgene führen, die der Zelle zur Adaption

an Hypoxie dienen (Shimoda et al. 2011). Eine besondere Rolle als O₂-Sensor unter akuter Hypoxie wurde kürzlich für Cox4i2 herausgefunden (Sommer et al. 2017).

1.2.4 Warburg Hypothese

In der Pathogenese der PH wird ROS eine wichtige Rolle zugesprochen (Schermyly et al. 2011). Die Warburg Hypothese beschreibt eine Umstellung des zellulären Metabolismus von oxidativer Phosphorylierung zu anaerober Glykolyse, was insbesondere in Tumorzellen beobachtet werden kann (Ryan et al. 2015). Es wird angenommen, dass es dadurch zu einer verminderten Produktion mitochondrialer ROS kommt, welche die Resistenz gegenüber Apoptose erhöhen soll (Schermyly et al. 2011). Im Rahmen chronischer Hypoxie kommt es auch zu einer Hochregulation von Enzymen der Glykolyse und damit Umstellung des Energiehaushalts der Zelle. Einen wesentlichen Beitrag in der Induktion der Proteinexpression dieser Enzyme leistet Hif-1 α (Semenza 2011). In einer Studie, in der die oxidative Phosphorylierung mittels Dichloracetat gesteigert wurde, entwickelten die Versuchstiere eine deutlich mildere PH, was die Warburg Hypothese unterstütze (Michelakis et al. 2002, McMurtry et al. 2004). In den folgenden beiden Kapiteln werden Hif-1 α , Cox4i2 und somit auch die Rolle der Mitochondrien in Hinsicht auf Veränderungen des Zellmetabolismus besprochen.

1.3 Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 Alpha (Hif-1 α)

Hif-1 ist ein Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor, der in allen kernhaltigen Zellen vorkommt und durch die gegenwärtige O₂-Konzentration reguliert wird. Mittlerweile sind sehr viele Gene identifiziert, die durch Hif-1 reguliert werden (Shimoda et al. 2011). Ursprünglich wurde Hif-1 als Induktor des Erythropoetin(EPO)-Gens unter Hypoxie entdeckt (Semenza et al. 1992).

Hif-1 ist ein heterodimeres Protein bestehend aus zwei Untereinheiten: Hif-1 α und Hif-1 β . Beide Untereinheiten werden kontinuierlich exprimiert. Im Gegensatz zu Hif-1 β unterliegt Hif-1 α jedoch einem ständigen Abbau unter Normoxie. Unter Hypoxie erfährt Hif-1 α eine deutliche Stabilisierung (Shimoda et al. 2011). Es akkumuliert im Nukleus und dimerisiert mit Hif-1 β sowie weiteren Coaktivatoren, um schließlich an die Kern-DNA Bindungssequenz 5'-RCGTG-3' verschiedener Gene, z.B. VEGF, zu binden und deren Expression zu induzieren (Semenza 2000). Im sauerstoffreichen Milieu unterliegt Hif-1 α einer kontinuierlichen proteasomalen Degradierung durch *prolyl-4-hydroxylase domain proteins* (PHDs). Diese hydroxylieren Hif-1 α unter Verbrauch von molekularem O₂ und α -Ketoglutarat an zwei Prolinresten. Cofaktor in dieser Reaktion ist zweiwertiges Eisen

(Fe²⁺) am aktiven Zentrum der PHDs, welches zu dreiwertigem Eisen (Fe³⁺) oxidiert wird (Semenza 2011, Shimoda et al. 2011). Dadurch wird die Bindung von von-Hippel-Lindau Proteinen (vHLP) ermöglicht, welche wiederum eine Protein-Ligase zur Ubiquitinierung aktivieren. Diese markiert Hif-1 α für den proteasomalen Abbau (Semenza 2011). Eine weitere Regulation findet an der C-terminalen Transaktivierungsdomäne von Hif-1 α statt. Dort binden unter hypoxischen Bedingungen verschiedene Coaktivatoren, wie p300, CBP (*CREB binding protein*), SRC-1 (*steroid receptor coactivator-1*) und TIF2 (*transcriptional intermediary factor 2*) und stabilisieren Hif-1 α (Semenza 2000, Lando et al. 2002). Diese Bindung wird unter Normoxie durch O₂-abhängige Hydroxylierung des Asparaginrestes 803 durch *factor inhibiting Hif-1* (FIH-1) blockiert (Lando et al. 2002). Weitere Regulatoren von Hif-1 α umfassen Proteine, wie z.B. ET-1, welche sowohl von Hif-1 α stimuliert werden als auch umgekehrt über einen *feed-forward*-Mechanismus die Hif-1 α -Expression induzieren können. ET-1 induziert beispielsweise Hif-1 α über eine Erhöhung von ROS und Ca²⁺ in PASM (Pisarcik et al. 2013).

1.3.1 Bedeutung von Hif-1 α an der Entstehung der Hypoxie-induzierten PH

Hif-1 α reguliert eine Vielzahl von Genen, die für die Homöostase der Zelle und somit auch des entsprechenden Gewebes unter Hypoxie wichtig sind (Semenza 2017). Für eine detaillierte Auflistung aller Interaktionspartner von Hif-1 α wird, aufgrund des Umfangs, auf die Fachliteratur verwiesen (Semenza 2017). Es werden im Rahmen dieser Arbeit nur die wichtigsten Auswirkungen im Zusammenhang mit PH genannt. Hif-1 α steuert VEGF-induzierte Vaskularisierung, Erythropoese, Zellproliferation und -migration, Zellmetabolismus und den Energiehaushalt der Zelle (Ball et al. 2014). Zudem fördert Hif-1 α die Muskularisierung distaler pulmonaler Gefäße während chronischer Hypoxie-Exposition. Ein Verlust von Hif-1 α in glatten Muskelzellen führte in Mäusen zu einem verminderten *Remodeling* und somit einem milderem Verlauf einer durch chronische Hypoxie verursachten PH (Ball et al. 2014). Mäuse, die systemisch heterozygot für Hif-1 α waren, zeigten eine geringere Hypertrophie der PASM, ein geringeres vaskuläres *Remodeling*, eine geringere Expression von *tetratricopeptide repeat*(TPR)-Proteinen und eine unveränderte Dichte an membranständigen K_v-Kanälen. Dadurch entwickelten diese einen milderen Verlauf der PH (Shimoda et al. 2001, Ball et al. 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die alleinige Deletion von Hif-1 α in PASM, mit daraus resultierendem vermindertem vaskulärem *Remodeling* und PH, die Hypertrophie des rechten Herzventrikels nicht reduzierte. Daher ist der mPAP und PVR nicht alleiniger Stimulus für das *Remodeling* des rechten Herzventrikels. Es

wird vermutet, dass Hypoxie, durch Induktion spezifischer Gene wie Hif-1 α , für die strukturellen Umbauprozesse am Herzen mitverantwortlich ist (Ball et al. 2014). Dies hat Auswirkung auf zukünftige Therapien, da diese neben dem pulmonalen auch das kardiale *Remodeling* betreffen müssen.

1.3.2 Der Einfluss von Hif-1 α auf den Zellmetabolismus

Hif-1 α nimmt wesentlichen Einfluss auf den Energiemetabolismus der Zelle. Es inhibiert durch Induktion von Genen, wie der *pyruvate dehydrogenase (PDH) kinase 1 (PDK1)* und BNIP3, die oxidative Phosphorylierung und fördert die ATP-Generierung durch Glykolyse (Semenza 2011). Dadurch soll wahrscheinlich die Entstehung von ROS, wie das Superoxid-Anion (O₂⁻) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂), verhindert werden. In *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs), die einen homozygoten knockout am Genlocus für Hif-1 α hatten, kam es unter chronischer Hypoxie zu einem raschen Anstieg von ROS und baldigem Zelltod. Unter Gabe von Radikalfänger verbesserte sich die Überlebensrate deutlich (Semenza 2011).

1.4 Cytochrom c Untereinheit 4 Isoform 2 (Cox4i2)

1.4.1 Die Mitochondrien

Die Mitochondrien sind die Hauptproduzenten des zellulären Energieträgers ATP. Mittels oxidativer Phosphorylierung können sie mehr als fünfzehnmal so viel ATP wie die Glykolyse produzieren.

Ihre Größe und Gestalt sind sehr variabel, da sie dynamische Organellen sind, die sich bewegen, teilen und miteinander verschmelzen können. Der Aufbau ist jedoch einheitlich und besteht aus einer Außenmembran, dem intermembranösem Raum und der Innenmembran. Im Zentrum befindet sich die mitochondriale Matrix, welche Enzyme für verschiedene Stoffwechselforgänge beinhaltet, aber auch einen Pufferraum für Ca²⁺ darstellt (Nunnari et al. 2012).

Im Rahmen der Endosymbionten-Theorie wird vermutet, dass die Mitochondrien von aeroben Prokaryonten abstammen und als Symbionten in die eukaryotische Zelle aufgenommen wurden. Aufgrund einer eigenen ringförmigen DNA und RNA, welche sich in der Matrix befindet, können sie semiautonom arbeiten (Nunnari et al. 2012). Mitochondrien können zudem apoptotische Signalwege induzieren. Dies geschieht über

die Öffnung mitochondrialer Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTP) und damit Freisetzung von Cytochrom c (Sinha et al. 2013).

1.4.2 Die mitochondriale Atmungskette

Die Atmungskette besteht aus fünf Proteinkomplexen, die sich innerhalb der inneren Mitochondrienmembran befinden. Die Komplexe I, III und IV liegen häufig als Superkomplexe vor. Aufgenommene Fettsäuren und Zucker werden durch Prozesse, wie den Zitratzyklus und die β -Oxidation oder auch durch einzelne Enzyme, wie die Pyruvatdehydrogenase (PDH), unter Abspaltung von Protonen (Wasserstoffionen, H^+) zu CO_2 oxidiert. H^+ wird von Reduktionsäquivalenten (NAD^+ ; FAD) gebunden und so die Redoxenergie der Stoffwechselprozesse zwischengespeichert (Heinrich et al. 2006). An der mitochondrialen Atmungskette werden die Elektronen der Reduktionsäquivalenten entlang eines elektrochemischen Gradienten zu Komplex IV transportiert, um schließlich auf O_2 übertragen zu werden. Formal entspricht diese Reaktion der Knallgasreaktion ($H_2 + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow H_2O$; $\Delta G^0 = -235 \text{ kJ/mol}$) (Heinrich et al. 2006). Da dies eine stark exogene Reaktion ist, wird die Energie, durch schrittweise Übertragung der Elektronen auf O_2 , dafür genutzt Protonen von der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen. Dadurch wird die Redoxenergie in Form eines Protonengradienten konserviert und kann von der F_1/F_0 -ATP-Synthase zur Bildung von ATP aus ADP (Adenosindiphosphat) und anorganischem Phosphat genutzt werden. Diese Reaktion ist stark endogen (Nunnari et al. 2012). Die ATP-Synthase befindet sich an der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran und stellt den Komplex V dar.

Der Elektronentransport zwischen den Atmungskettenkomplexen wird durch Ubichinon, einem sehr hydrophoben Isoprenoid, und Cytochrom c, einem basischen Protein, welches ein kovalent gebundenes Häm c-Zentrum besitzt, vermittelt. Ubichinon kann zwei Elektronen aufnehmen, wodurch es zu Ubihydrochinon (=Ubiquinol) reduziert wird. Die Elektronen nimmt es von Komplex I, II und anderen Dehydrogenasen, z.B. der ETF (*electron transferring flavoprotein*): Ubichinon-Oxidoreduktase auf und diffundiert frei innerhalb der inneren Mitochondrienmembran zu Komplex III, wo es wieder zu Ubichinon oxidiert wird. Die Poolfunktion des Ubichinon bezeichnet die Fähigkeit als Redoxpuffer wirken zu können, da es stöchiometrisch im Überfluss vorliegt (Heinrich et al. 2006). Cytochrom c kann über das zentrale Eisenatom der Häm-Gruppe nur ein Elektron aufnehmen und befindet sich an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran. Es transportiert Elektronen zwischen Komplex III und Komplex IV (Heinrich et al. 2006).

Komplex I wird als NADH:Ubichinon Oxidoreduktase bezeichnet und ist der größte Atmungskettenkomplex. Es oxidiert NADH, welches zuvor im Zitratzyklus, in der β -Oxidation oder durch die PDH gebildet wurde, und reduziert Ubichinon. Die Redoxenergie wird zum Transport von vier Protonen in den Intermembranraum genutzt. Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase bezeichnet Komplex II. Diese ist Teil der Succinat-Dehydrogenase und somit des Zitratzyklus. Die Elektronen werden von FADH₂ direkt auf Ubichinon übertragen, ohne dass Protonen gepumpt werden. An Komplex III, der Ubichinon: Cytochrom c Oxidoreduktase, wird Ubihydrochinon wieder oxidiert und es werden Cytochrom b des Komplex III und Cytochrom c reduziert. Mithilfe der hierbei freiwerdenden Energie werden erneut zwei Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Am vorletzten Komplex (IV), der Cytochrom c Oxidase (COX), werden die Elektronen auf O₂ übertragen. Pro O₂-Atom („ $1/2$ O₂“) werden zwei Protonen aus dem Matrixraum gepumpt und zwei weitere Protonen für die Wasserbildung (H₂O) verbraucht (Heinrich et al. 2006). An Komplex V findet die bereits oben genannte ATP-Synthese statt, auf welche nicht weiter eingegangen wird. In der Summe werden pro oxidiertem NADH 10 und pro oxidiertem FADH₂ 6 Protonen über die Mitochondrienmembran gepumpt (Heinrich et al. 2006).

1.4.3 Regulation der mitochondrialen Atmungskette

Die Steuerung der Atmungskette wird im Wesentlichen allosterisch durch einen erniedrigten ATP/ADP-Quotienten an COX gesteuert. Ist viel ADP und anorganisches Phosphat vorhanden, wird vermehrt Substrat oxidiert und ATP generiert (Heinrich et al. 2006). Weiterhin kann die mitochondriale Atmungskette über den Phosphorylierungsstatus der einzelnen Komplexe, insbesondere COX, gesteuert werden. Dabei scheint die damit verbundene Aktivierung bzw. Inhibition der Atmungskette durch reversible Phosphorylierung von COX gewebsspezifisch und Untereinheiten-abhängig zu sein (Huttemann et al. 2008). Die Phosphorylierung findet innerhalb von COX hauptsächlich an Serin-, Tyrosin- und Threoninresten statt (Helling et al. 2012). Die verantwortlichen Signalwege involvieren cAMP und PKC (Huttemann et al. 2008). Die oben genannte allosterische Hemmung kann durch zellulären Stress und der damit verbundenen Dephosphorylierung von COX ausgesetzt werden (Kadenbach et al. 2015). Zu weiteren Stimuli der Atmungskette gehört eine Erhöhung des intrazellulären zytoplasmatischen Ca²⁺-Spiegels. Ca²⁺ gelangt über einen spezifischen Kationenkanal in die mitochondriale Matrix, wo es Enzyme des Zitratzyklus stimuliert (Heinrich et al. 2006). Außerdem gehören Proteine zu den Regulatoren, welche die Atmungskette entkoppeln können, z.B. Thermogenin. Dies führt, durch Erhöhung der

Permeabilität für H^+ , zu einem fehlenden Aufbau des H^+ -Gradienten und somit zu einer Inhibierung der ATP-Produktion, trotz arbeitender Atmungskettenkomplexe. Damit ist die Regulation durch den ATP/ADP-Quotienten ausgesetzt und es wird Energie in Form von Wärme produziert, z.B. im braunen Fettgewebe bei Säuglingen (Heinrich et al. 2006).

1.4.4 Mitochondrien und ROS

ROS kommen zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten, um die Pathogenese der PH weiter zu verstehen. ROS werden in verschiedenen Kompartimenten der Zelle gebildet und beschreiben sowohl freie Radikale als auch Oxidantien, welche auf molekularem Sauerstoff basieren (Turrens 2003). Das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) gehört, aufgrund eines ungepaarten Elektrons, zu den freien Radikalen und ist die häufigste Vorläuferstufe von weiteren ROS. Es entsteht durch Reduktion von einem der zwei freien ungepaarten Elektronen von molekularem O_2 . Mithilfe der Superoxid-Dismutase (SOD) kann $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 reduziert werden, was ein stabiles molekulares Oxidans darstellt. Wird H_2O_2 weiter reduziert kann sowohl H_2O als auch ein Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$) entstehen. Letzteres gehört zu den stärksten und reaktivsten Oxidantien (Turrens 2003). Die Mitochondrien gehören zu den Hauptproduzenten von intrazellulären ROS (Aggarwal et al. 2013). Die spezifischen Eigenschaften der mitochondrialen Atmungskette sind zelltypspezifisch und möglicherweise an die zelltypspezifische O_2 -Konzentration angepasst. Extreme Schwankungen der O_2 -Konzentration können zu einer Steigerung der ROS-Produktion führen (Semenza 2007). Es wird angenommen, dass sowohl hyper- als auch hypoxische Bedingungen die Freisetzung von ROS fördern.

Innerhalb der Atmungskette wurden die Flavoproteinbindungsstellen und Ubichinon-Reduktasen in Komplex I und die Ubihydrochinon-Oxidase des Komplex III als Hauptentstehungsort von ROS identifiziert (Aggarwal et al. 2013). Komplex II scheint jedoch ebenfalls ROS in größeren Mengen produzieren zu können, wenn Komplex I und III inhibiert sind. Dies zeigten Versuche in isolierten Mitochondrien von Ratten (Quinlan et al. 2012). Bestimmend für die Produktion von ROS sind die Konzentration an Proteinen oder auch Enzymen, welche die Fähigkeit zu einer Elektronenübertragung besitzen und in einer redoxaktiven Form vorliegen. Dies sind insbesondere die Reduktionsäquivalente NADH, $FADH_2$ oder Ubichinol. Weiterhin ist die Menge des lokal vorhandenen O_2 wichtig (Murphy 2009). Die ROS-Produktion an Komplex I findet beispielsweise am Flavinmononukleotid (FMN) statt. Wie weiter oben beschrieben oxidiert dies NADH und reduziert mit dem aufgenommenen Elektron Ubichinon zu Ubichinol. Kommt es infolge einer verlangsamten Respiration zu einer Ansammlung von

NADH und somit hohem NADH/NAD⁺-Verhältnis erhöht sich die Übertragung der Elektronen von reduziertem FMN auf O₂, welches dann als nächster Elektronenakzeptor genutzt wird. Ein weiterer Mechanismus ist der *reverse electron transfer* (RET). Dieser beschreibt den rückwärts-verlaufenden Transfer von Elektronen bei Vorliegen eines größtenteils reduzierten Ubichinon/Ubiquinol-Pools und hohem Protonengradienten. Infolge dessen kommt es an Komplex I durch einen Rückstau an Elektronen zu der Entstehung von Superoxiden (Murphy 2009). Die entstehenden Superoxide werden meist durch die SOD zu H₂O₂ konvertiert (Turrens 2003). Superoxide sind sehr kurzlebig, da sie hochreaktiv sind. Sie können durch Anionenkanäle in die extramitochondriale Umgebung diffundieren (Weissmann et al. 2006). H₂O₂ sind langlebiger und können frei durch die mitochondrialen Membranen aus der mitochondrialen Matrix ins Zytosol diffundieren (Weissmann et al. 2006). Sie können intra- als auch interzellulär wirken (Perez-Vizcaino et al. 2010). ROS können zelluläre Protein, Fette und Nukleinsäuren oxidieren. Dies führt zu Funktionsänderung und Beeinflussung zelluläre Signalwege (Semenza 2007). Hohe Konzentrationen an ROS können über den intrinsischen Weg die Apoptose einleiten, während moderate Erhöhungen als Stimulus für Wachstum und Proliferation identifiziert wurden (Turrens 2003, Day et al. 2006). Die chronisch Hypoxie-induzierte ROS-Entstehung an Komplex III scheint an der Stabilisierung von Hif-1 α beteiligt zu sein (Semenza 2007). Dieser Zusammenhang wird im Verlauf genauer erläutert. Neben Hif-1 α werden weitere Transkriptionsfaktoren, aber auch vasoaktive Substanzen (z.B. ET-1, TXA₂) und Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, PDGF) durch ROS beeinflusst. Hierdurch können Proliferation und Konstriktion der PSMCs gesteuert werden (Aggarwal et al. 2013).

1.4.5 Sauerstoffdetektion durch Mitochondrien

Zellen müssen über einen Mechanismus zur Detektion der O₂-Konzentration verfügen, um sich sowohl auf Zell- als auch Organebene an Hypoxie anpassen zu können. Im Gegensatz zur chronischen Hypoxie, für die bereits Hif-1 α als zentraler O₂-Sensor bekannt ist, ist der akute Sensormechanismus, der eine schnelle Antwort auf akute Hypoxie, wie z.B. die HPV auslöst, weiterhin nicht komplett aufgeklärt. Bezüglich der HPV haben Studien gezeigt, dass isolierte PSMC unter Hypoxie kontrahieren und somit über einen O₂-Sensor verfügen müssen (Waypa et al. 2005). Es ist anzunehmen, dass Mitochondrien, die die intrazellulären Hauptverbraucher von O₂ darstellen, über einen solchen Sensor verfügen (Waypa et al. 2005). Der Mechanismus wird mit einer Veränderung der ROS-Produktion assoziiert. Dabei existieren zwei grundlegend unterschiedliche Ansichten, wodurch die HPV ausgelöst werden kann:

Einige Studien haben über Chemilumineszenz gezeigt, dass es im Rahmen von akuter Hypoxie zu einem Abfall mitochondrialer ROS kommt. Dadurch fallen vermehrt Reduktionsäquivalente an, die mit verschiedenen intrazellulären Komponenten reagieren können, z.B. Ionenkanälen. Infolge dessen werden K_v -Kanäle geschlossen und es kommt durch eine zelluläre Membrandepolarisation zum Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} (Waypa et al. 2005). Es werden dabei den Mitochondrien eine ständige ROS-Produktion zugeschrieben, die unter Hypoxie, aufgrund des O_2 -Mangels, abfällt. Die verwendete Methode hat sich jedoch gegenüber Autooxidation als sehr fehleranfällig herausgestellt. Aufgrund der Erkenntnis, dass das Zytosol einen bereits generell reduzierten Redoxstatus aufweist, welcher wahrscheinlich durch weitere Reduktionsäquivalente nur unwesentlich beeinflusst wird, und konträrer Ergebnisse aus anderen Studien wird eher von einer Erhöhung von ROS unter Hypoxie ausgegangen (Waypa et al. 2005, Sommer et al. 2016).

Im Rahmen dieser zweiten These kommt es zu einem paradoxen Anstieg mitochondrialer ROS unter akuter Hypoxie. Dies wurde mittels Chemilumineszenz und *electron paramagnetic resonance* (EPR)-Spektrometrie festgestellt (Waypa et al. 2005). Erhöhte ROS können zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führen, wie dem endoplasmatischen Retikulum und der Mitochondrien selbst. Außerdem kommt es zur Depolarisation der Zellmembran, durch die Ca^{2+} -abhängige Schließung der K_v -Kanäle. Dies führt durch die Öffnung von VOCC-Kanälen zu zusätzlichem Einstrom von Ca^{2+} und konsekutiver Vasokonstriktion (Waypa et al. 2005, Sommer et al. 2016). Diese These konnte mittels Überexpression von Radikalfängern, wie der Gluthation-Peroxidase oder Katalase bestätigt werden. Die hypoxische Antwort im Sinne eines Ca^{2+} -Anstiegs konnte so in isolierten PSMCs verhindert werden (Sommer et al. 2016). Eine Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials scheint die Generation von mitochondrialer ROS unter Hypoxie zu verstärken (Sommer et al. 2016). In diesem Zusammenhang nimmt Cox4i2, welches eine Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotenzial unter Hypoxie bewirken kann, eine besondere Rolle ein (Sommer et al. 2017). In den folgenden Kapiteln wird darauf eingegangen. Neben dem bereits beschriebenen Einfluss von ROS auf die HPV wird auch ein Einfluss auf die Stabilisierung von Hif-1 α , dem wichtigsten Sauerstoffsensor für chronische Hypoxie, diskutiert. Wie bereits beschrieben, benötigt die PHD zur Hydroxylierung von Hif-1 α neben O_2 auch α -Ketoglutarat und zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}). Letzteres könnte bei erhöhter ROS-Produktion jedoch oxidiert werden und somit die Hydroxylierung und den Abbau von Hif-1 α hemmen (Tormos et al. 2010). Weiterhin kann es durch Hemmung der Atmungskette zu einer Inhibierung von Komplex II, welcher als Succinat-Dehydrogenase

Teil des Zitratzyklus ist und Succinat zu Fumarat oxidiert, kommen. Folglich kommt es zu einer Akkumulation von Succinat und konsekutiver Produktinhibition der PHD, welche im Rahmen der Hydroxylierung von Hif-1 α , α -Ketoglutarat zu Succinat decarboxyliert (Tormos et al. 2010). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Pak et al. zeigte jedoch, dass ROS nur in der akuten Hypoxie hochreguliert scheint, während es unter persistierender Hypoxie zu einem Abfall der ROS-Konzentration kommt (Pak et al. 2018). Diese Beobachtung wäre mit der Warburg Hypothese und Hif-1 α -induzierten Signalwege unter chronischer Hypoxie zu erklären, welche eine erhöhte Glukoseoxidation beschreiben. In Anbetracht dieser Ergebnisse könnten daher die Mitochondrien in akuter und chronischer Hypoxie eine unterschiedliche Rolle in der O₂-Detektion spielen.

1.4.6 Cytochrom c Oxidase (COX)

COX ist das terminale Enzym der mitochondrialen Atmungskette und das oxidative Zentrum, an dem Elektronen direkt auf O₂ übertragen werden. Mittels vier Elektronen wird O₂ zu H₂O reduziert. Die freiwerdende Energie wird genutzt, um vier Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu pumpen bzw. zu entfernen und so die Energie der Reduktionsreaktion in Form eines Protonengradienten zu speichern. Diese Energie kann schließlich von der ATP-Synthase genutzt werden (Kadenbach et al. 2000). Insgesamt verbraucht COX über 90% des zellulären O₂ (Huttemann et al. 2012).

COX ist als Dimer aufgebaut, bei dem jedes COX-Monomer aus 13 Untereinheiten besteht (Tsukihara et al. 1996). Die Untereinheiten I-III sind die größten Untereinheiten und bilden das katalytische Zentrum von COX. Dort findet auch der Elektronentransfer auf O₂ und das Pumpen der Protonen statt.

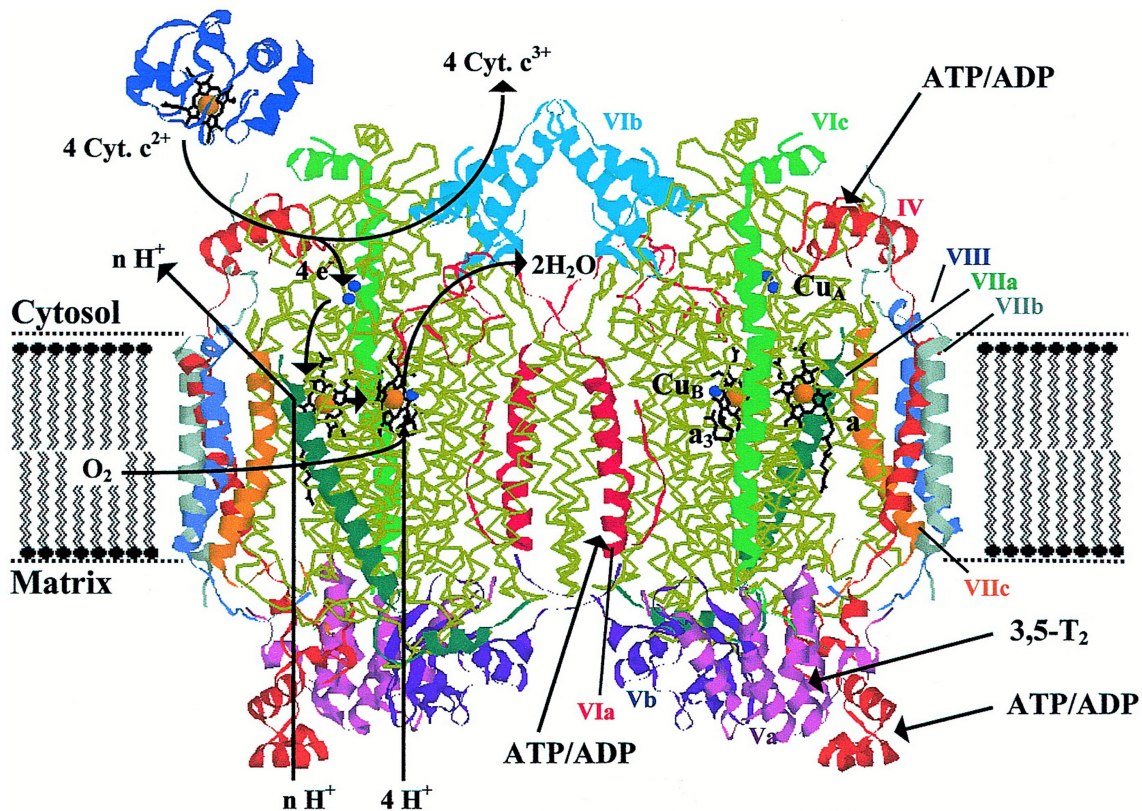


Abbildung 3: Die Cytochrom c Oxidase (COX)

Kristalline Struktur von COX im bovinen Herz. Darstellung von dimeren COX innerhalb der inneren Mitochondrienmembran. Auf der zytosolischen Seite ist Cytochrom c in dunkelblau dargestellt. Die Untereinheiten I-III sind zentral in Gelb dargestellt. Die Hämgruppen sind schwarz und die Kupfergruppen in Orange gekennzeichnet.

Abbildung übernommen von: *Gene*; Vol. 267; Kadenbach und Hüttemann; *Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase*; Seiten 111-123; © 2001. Mit Erlaubnis von Elsevier.

Die Proteine dieser drei Untereinheiten werden von der mitochondrialen DNA (mtDNA) kodiert (Kadenbach et al. 2015). Den restlichen zehn Untereinheiten, welche von nukleärer DNA kodiert sind, werden regulatorische Funktionen zugesprochen (Kadenbach et al. 2015).

Die Regulierung von COX erfolgt im Wesentlichen durch vier Mechanismen: Zum einen durch den elektrochemischen Protonengradienten bzw. das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$). Zum anderen wird die COX-Aktivität durch eine hohe Verfügbarkeit des Hauptsubstrats Cytochrom c gesteigert. Weiterhin ist die Verfügbarkeit von O_2 , als Elektronenakzeptor, für die Funktion von COX essentiell (Arnold et al. 1997). Schließlich wird COX durch die Expression gewebsspezifischer Isoformen der nukleär-kodierten Untereinheiten reguliert. Die Untereinheiten können mit Hormonen oder Nukleotiden interagieren, welche die Funktion und Aktivität von COX verändern. Dies geschieht durch Phosphorylierung. Es sind bisher 18 verschiedene reversible Phosphorylierungsstellen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten entdeckt

worden (Kadenbach et al. 2015). Die Untereinheit 4 (Cox4) spielt, aufgrund einer ATP/ADP-Bindungsstelle, bei der allosterischen Regulation von COX eine wichtige Rolle (Huttemann et al. 2012).

1.4.7 Cytochrom c Oxidase Untereinheit 4 Isoform 2 (Cox4i2)

Die Untereinheit 4 (Cox4) ist die größte der nukleär-kodierten Untereinheiten von COX und hat engen Kontakt zu den katalytischen Untereinheiten I und II (Huttemann 2001). Cox4 besitzt eine transmembrane Helix, die ATP oder ADP sowohl im Intermembranraum als auch auf Matrixseite binden kann (Kadenbach et al. 2015). ATP-Bindung an der zytosolischen Domäne führt, durch Erhöhung des K_m -Werts, zu einer niedrigeren Affinität von Cytochrom c (Kadenbach et al. 2015). Dadurch fällt ein wichtiger Elektronendonator für COX weg. Durch einen hohen ATP/ADP-Quotient auf Matrixseite, wird innerhalb von Cox4 gebundenes ADP durch ATP ersetzt und es folgt eine allosterische Hemmung von COX. Die allosterische Inhibition führt zu einem erniedrigten mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$), wodurch die ROS-Produktion beeinflusst wird (Kadenbach et al. 2000). Diese regulatorische Funktion kann auch durch Phosphorylierungsstellen im Bereich der Untereinheit 4 (Cox4), mittels cAMP-abhängiger Proteinkinasen, moduliert werden (Kadenbach et al. 2000, Kadenbach et al. 2015). Ca^{2+} -aktivierte Proteinphosphatasen können durch Dephosphorylierung den Mechanismus der allosterischen Hemmung deaktivieren. Dies kann im Rahmen von zellulärem Stress bzw. durch Hormone vermittelt werden. Außerdem kann die allosterische Hemmung durch eine hohe Verfügbarkeit von Cytochrom c ausgesetzt werden (Kadenbach et al. 2000). Folge ist ein erhöhtes $\Delta\Psi_m$, eine erhöhte Respiration und ROS-Produktion. Dies kann Apoptose und degenerative Prozesse fördern (Kadenbach et al. 2015). Cox4 hat somit einen wichtigen Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Zelle, da es die Atmungskette aktivieren bzw. inhibieren kann (Aras et al. 2013).

Es sind zwei Isoformen von Cox4 bekannt. Die Isoform 1 (Cox4i1) kommt in allen Geweben vor und ist ständig exprimiert. Das Vorläuferprotein besteht aus 169 Aminosäuren (Aras et al. 2013). Die Isoform 2 (Cox4i2) wurde erstmals in Thunfisch nachgewiesen und scheint in Säugetieren gewebsspezifisch und O_2 -abhängig exprimiert zu sein (Huttemann 2001). Besonders hohe Konzentrationen wurden in Lungengewebe, speziell in PASMIC und Bronchialepithel, gefunden. Weiterhin fand man Cox4i2 in Trachea und Plazenta. Geringe Spuren wurden auch in Herz und Gehirn festgestellt (Huttemann 2001, Misiak et al. 2010). Cox4i2 besteht aus 171 Aminosäuren. In der Struktur unterscheidet es sich zu Cox4i1 durch den Besitz von drei Cysteinresten. Zwei

der Cysteinreste befinden sich im Bereich der ATP-Bindungsstelle, wo sie durch Bildung einer Disulfidbrücke die allosterische Inhibition redox-abhängig modulieren könnten (Kadenbach et al. 2015). Der dritte Cystein-Rest (Cystein 109) befindet sich auf der zur Matrix gerichteten Seite der mitochondrialen Innenmembran, wo der O₂-Gradient am höchsten ist (Sommer et al. 2017).

Innerhalb des humanen Gens für Cox4i2 wurde in der proximalen Promoterregion ein *hypoxia responsive element* (HRE) entdeckt, welches eine erhöhte Transkription von Cox4i2 bei 4% O₂-Konzentration bewirkt (Huttemann et al. 2007). Als Bindungsfaktoren wurden die Induktoren RBPJ (*recombination signal sequence -binding protein J*) und CHCHD2 (*coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain 2*) sowie der Inhibitor CXXC5 (*CXXC finger protein 5*) identifiziert. Das HRE wurde als Bindungsstelle für Hif-1α ausgeschlossen (Aras et al. 2013). Fukuda et al. zeigten zuvor in einer Studie, dass im humanen Gen für Cox4i2 zwei weitere HREs existieren, welche von Hif-1α angesteuert werden könnten. Mithilfe von *luciferase reporter assay* wurde in HeLa- und 293T-Zellen eine Induktion der Transkription von Cox4i2 durch Hif-1α nachgewiesen (Fukuda et al. 2007). Weiterhin wurde in der Studie demonstriert, wie Hif-1α den *isoform-switch* von Cox4 als Anpassung an Hypoxie moduliert. Durch Aktivierung der Transkription mitochondrialer LON-Proteasen, welche ATP-abhängige Serin-Proteasen sind, wird Cox4i1 degradiert während Cox4i2-Expression induziert wird (Fukuda et al. 2007).

Die genaue Funktion von Cox4i2 ist bisher nicht eindeutig geklärt. In *loss-of-function* Experimenten, durch Transfektion von *short-hairpin RNA* gegen Cox4i2-mRNA, zeigten Fukuda et al., dass es durch Funktionsverlust von Cox4i2 zu verminderter COX-Aktivität und ATP-Synthese, Anstieg von ROS in Form von H₂O₂ und Caspase 3 in hypoxischen 293T-Zellen kommt. Zudem waren Cox4i2-defiziente 293T-Zellen weniger überlebensfähig unter Hypoxie (Fukuda et al. 2007). Die Generation von ATP hat speziell im Lungengewebe eine wichtige Bedeutung, da es im Vergleich mit Herz, Leber und Gehirn eine geringere Dichte an Mitochondrien besitzt. In funktionellen Untersuchungen von COX in Lungen- und Lebergewebe von Kühen konnte gezeigt werden, dass COX in der Lunge eine etwa zweimal so hohe Aktivität hat wie in der Leber, welche kein Cox4i2 besitzt (Huttemann et al. 2012). In Experimenten mit *Cox4i2-knockout* (Cox4i2^{-/-}) Mäusen fanden Hüttemann et al. eine um 50% reduzierte COX-Aktivität im Lungenhomogenat. Dies erklärte wahrscheinlich die zusätzlich reduzierten ATP-Levels (ca. 30%). Aufgrund des Energiemangels zeigten die Versuchstiere eine verminderte Atemwegsreaktion auf Atemwegsreizung durch Methacholin. Zusätzlich war die Konstriktion der Atemwege im Vergleich zur Kontrolle verringert (Huttemann et al. 2012). Sommer et al. identifizierten

schließlich die bislang wichtigste Bedeutung von Cox4i2. Demnach ist Cox4i2 essentiell für den O₂-Sensormechanismus in PASMC und Induktor der HPV in akuter Hypoxie. Cox4i2 induziert unter akuter Hypoxie, wahrscheinlich über eine Erhöhung des $\Delta\Psi_m$, eine vermehrte ROS-Produktion an Komplex III. ROS wiederum inhibiert Kv-Kanäle, wodurch VOCC geöffnet werden und es zur benötigten Ca²⁺-Elevation innerhalb der PASMC für die Vasokonstriktion kommt (Sommer et al. 2017). Die bereits beschriebenen Cysteinreste scheinen bei dem Prozess essentiell zu sein, da das Fehlen eines Restes die HPV inhibierte (Sommer et al. 2017). Kongruent zu diesen Beobachtungen konnte ebenfalls ein Zusammenhang von Cox4i2 und ROS in striatalen Astrozyten nachgewiesen werden. Unter hypoxischen Bedingungen kam es ebenfalls zu einer Hochregulation von Cox4i2 mit konsekutivem Anstieg von ROS, insbesondere von H₂O₂, und der katalytischen Aktivität von COX. Dies war mit einer vermehrten Degeneration und Nekrose der striatalen Astrozyten verbunden (Misiak et al. 2010).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Trotz der Beschreibung durch Huttemann et al. und der nachfolgend entstandenen Erkenntnisse, bezüglich der Struktur, des Expressionsmuster und der Funktion in akuter Hypoxie von Cox4i2, ist die Bedeutung der verstärkten Expression von Cox4i2 unter chronischer Hypoxie weiter unverstanden. Unsere Arbeitshypothese, basierend auf den oben genannten Vorkenntnissen, war daher, dass Cox4i2 unter chronischer Hypoxie ebenfalls die ROS-Konzentration beeinflusst, über welche möglicherweise Hif-1 α und damit das vaskuläre *Remodeling* in chronischer Hypoxie moduliert werden könnte. Im Rahmen dessen könnte Cox4i2, trotz multifaktorieller Genese der PH, ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung des pulmonalvaskulären Remodelings bei der PH, aber auch des rechtskardialen *Remodelings* unter chronischer Hypoxie sein.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die physiologische Bedeutung von Cox4i2 in chronischer Hypoxie zu untersuchen. Durch *in vivo* Experimente an Cox4i2^{-/-} Mäusen sollte untersucht werden, ob und wie Cox4i2 die Entstehung der chronischen Hypoxie-induzierten PH beeinflusst. Zusätzlich galt es mithilfe von *in vitro* Experimenten die Proteinexpression von Cox4i2, die Interaktion mit Hif-1 α und das Proliferationsverhalten von PASMC unter chronischer Hypoxie isoliert zu untersuchen.

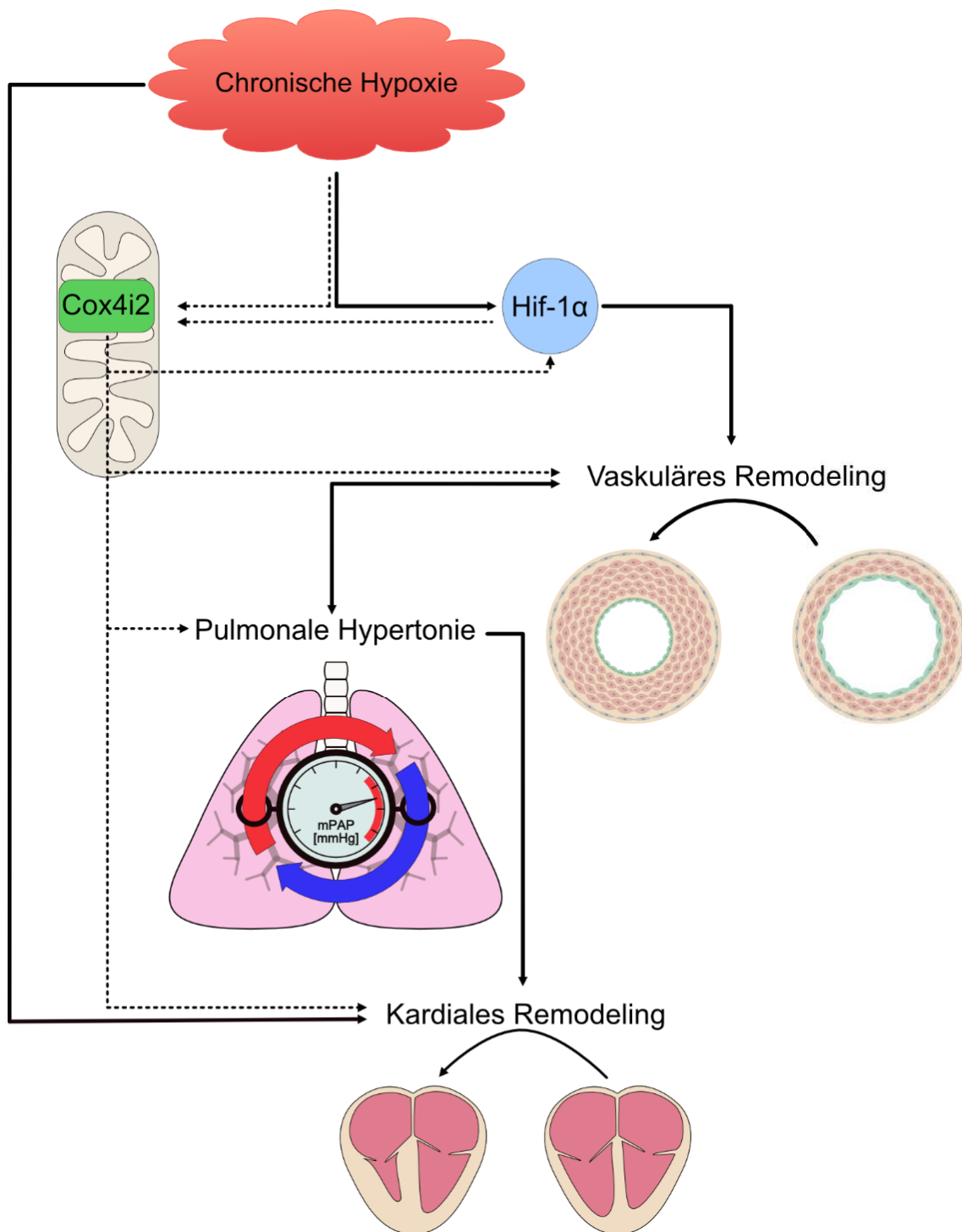


Abbildung 4: Schematische Übersicht der Arbeitshypothese

Schematische Abbildung der untersuchten Rolle von Cox4i2 unter chronischer Hypoxie auf die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie, sowie das vaskuläre und kardiale Remodeling. Auf zellulärer Ebene wurde der Einfluss von Cox4i2 auf Hif-1α getestet, welches eine bekannte prominente Rolle innerhalb der hypoxischen zellulären Homöostase spielt. Durchgezogene schwarze Pfeile kennzeichnen bekannte Signalwege und Interaktionen. Gestrichelte schwarze Pfeile kennzeichnen untersuchte Einflüsse von Cox4i2.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchsmäuse

Im *in vivo*-Experiment wurden männliche als auch weibliche homozygot negative (-/-) und positive (+/+) Cox4i2-Mäuse verwendet. Die zugrundeliegende Mauslinie B6.129-COX4-i2tm stammte aus der Arbeitsgruppe von Prof. Maik Hüttemann (*Wayne State University, School of Medicine, Detroit, USA*). Die genetische Entwicklung der Cox4i2^{-/-} Mäuse wurde durch Hüttemann et al. beschrieben (Huttemann et al. 2012). Das geschlechtliche Verhältnis innerhalb der Versuchsgruppen war gleich. Die Versuchstiere wurden mit einem Alter von 8-12 Wochen in die Versuchsbedingungen eingesetzt und während des Versuchszeitraums mit Wasser und Futter (Altromin®, Standarddiätfutter) versorgt. Zusätzlich wurden die Versuchstiere dreimal pro Woche gemäß des Tierversuchsantrages gewogen und der Gesundheitsstatus anhand eines vorgegebenen Beurteilungsbogens evaluiert.

Für die *in vitro*-Experimente wurden neben der Cox4i2^{-/-} und Cox4i2^{+/+} Mäuse männliche C57BL/6J-Mäuse verwendet. Diese wurden von der Firma Charles-River Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Die durchgeführten Experimente wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt und können unter folgenden Aktenzeichen eingesehen werden:

- GI 20/10 Nr. 94/2012 („COX IV-2 und Hypoxie-induzierte Mechanismen bei pulmonaler Hypertonie“)
- GI 20/10 Nr. A34/2011 („Die pathologischen und molekularbiologischen Mechanismen am Mausmodell der alveolären Hypoxie“)
- GI 20/10 Nr. 115/2014 („Isolation pulmonaler Zellen“)

2.1.3 Verwendete Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte für das Mausmodell der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie

X-Large White Polypropylene Animal Chamber with Clear Acrylic Door 66" W X 20" D X 20" H	BioSpherix Ltd., Lacona, NY, USA
A-Series Dynamic O ₂ -Controller	
OxyCycler Model A84XOV	
OxyCycler Model A84XOV Actuator Umbilical/Pod	
OxyCycler Model A84XOV Monitor Umbilical/Pod	
Desktop PC With LCD- Fully Configured For System-Internet Connection Required	
RS485 To USB Converter w/Adaptor	
Noise Reduction Filters	

Tabelle 3: Verwendete Geräte für Hämodynamik-Messungen

Matrx VIP 3000 Isofluran Vaporizer (Isofluranverdampfer)	Matrx by Midmark, Orchard Park, NY, USA
Millar-Katheter (Model SPR-671)	Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA
Hämatokrit-Zentrifuge Hämatokrit 210	Hettrich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
MiniVent Type 845 (Beatmungspumpe)	HSE – Harvard Apparatus, March, Deutschland
Narkosebox	Harvard Apparatus, March, Deutschland
Schott Kaltlichtquelle KL 200	Fiber Optics, Schott AG,

	Mainz, Deutschland
MS5 (Vergrößerungslupe)	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Wärmematte Thermolux®	Witte+Sutur GmbH, Murrhardt, Deutschland
Stativ	Eigenbau; Zum Halten der Spritzen während des Spülens

Tabelle 4: Verwendete Geräte für Echokardiographie

Vevo® 2100 System (Ultraschallgerät)	FujiFilm VisualSonics Inc., Amsterdam, Niederlande
Vevo 770 (EKG-Tisch)	VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada

Tabelle 5: Verwendete Geräte für Immunhistochemie

SAKURA IDent™ Cassette Printer	Sakura Finetek Europe B.V., Amsterdam, Niederlande
Objektträger-Strecktisch (HI1220)	Leica,
Paraffinstreckbad (HI1210)	Nussloch, Deutschland
Kühlplatte (EG1150C)	
Mikrotom (RM2165)	
Einbett Konsole (EG1140H)	
Gewebeinfiltrationsautomat (ASP300S)	
Wärmeschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Geräte für Molekularbiologie

Heizblock	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland
Hotplate/Stirrer (371)	VWR, Bruchsal, Deutschland
NanoDrop (ND-1000)	Kisker-Biotech,

	Steinfurt, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	LO - Laboroptik GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore Merck, Darmstadt, Deutschland
Vortexer MS1 <i>Minishaker</i>	IKA GmbH, Staufen, Deutschland
Zellinkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Mx3000P QPCR System, 230 Volt (RoHS, no computer)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Analysenwaage (TE214S)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge & Vortexer <i>Combi-Spin FVL-2400N</i>	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Schüttler <i>Kombi KL-2</i>	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad, München, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Western Blot Equipment)	
Mini Trans-Blot® Cell (Western Blot Equipment)	
ChemiDoc™ XRS+	
PX1™ PCR Plate Sealer	
DC™ Protein Assay	
Optically Clear Heat Seal	
Zentrifuge <i>Mikro 120</i>	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Rotina 420R (Kühlzentrifuge)	
Universal 320 R (Zentrifuge)	
Agfa CP1000 (Filmentwicklungsmaschine)	AGFA HealthCare, Mortsel, Belgien
Heizbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

Mikroskop (Leica DM IL)	Leica, Wetzlar, Deutschland
VACUBOY+VACUSAFE (Absaugsystem mit Vakuumpumpe)	Integra Biosciences, Konstanz, Deutschland
Präparier-Utensilien	Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Deutschland
Sicherheitswerkbank (NU480)	Nuair Inc., Plymouth, MA, USA
Tecan Infinite M200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
TPersonal Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

2.1.4 Verwendete Materialien

Tabelle 7: Verwendete Materialien für Hämodynamik-Messungen

Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Gefäßclip (Länge 9 mm; Öffnung 5 mm; Schließkraft 30-40G)	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Isofluran Baxter	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Messschieber	Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
Multivette® 600 K3E (Saugröhrchen)	Sarstedt GmbH & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Nadel-Elektroden für EKG-Messung	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Software: LabChart	
Spülkanüle für die Pulmonalarterie	HSE-Harvard Apparatus, March, Deutschland
Trachealtubus (aus Vasofix® Safety	B. Braun Melsungen AG,

20G gekürzt auf ca. 1,5 cm)	Melsungen, Deutschland
-----------------------------	------------------------

Tabelle 8: Verwendete Materialien für Echokardiographie

Aquage® (Ultraschallgel)	Parker Laboratories Inc., Fairfield, CT, USA
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Rektalthermometer	Indus Instruments, Webster, TX, USA
Vet Equip (Isofluranverdampfer)	KF Technology, Rom, Italien

Tabelle 9: Verwendete Materialien für Immunohistochemie

Ethanol 70%, 96% und 100%	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pertex	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Digest-All 2 Trypsin Concentrate and Diluent	Invitrogen, Frederick, MD, USA
Methylgrün	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Paraplast Plus® (Paraffin Einbettmedium)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Propanol	
Tissue-TREK® Uni-Cassette®	Sakura Finetek Germany GmbH,

	Staufen, Deutschland
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Mikrotomklingen S 35	PFMmedical AG, Köln, Deutschland

Tabelle 10: Verwendete Materialien für Molekularbiologie

Ammoniumpersulfat (APS)	Promega, Mannheim, Deutschland
Blotting-Papier Whatman	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Ethanol (reinst) für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	
PVDF-Membran Immobilon™ -P	Millipore Merck, Darmstadt, Deutschland
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Low-Profile 0.2 ml 8-Tube Strips without Caps	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Optical Flat 8-Cap Strips	
Multiplate™ PCR Plates, 96-well clear	

<i>Precision plus Protein™ Dual Color Standard</i>	
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	
Salzsäure (HCl)	
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	
Tris Pufferan®	
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid)	
Parafilm M®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	
Methanol	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	
Sodium Dodecyl Sufate solution (SDS) 10%	
Luminol Sodium Salt	
Para-Hydroxycoumarinsäure	
DMSO	
Sargold®Pro (Verpackungsfolie)	Sargold, Rorschacherberg, Schweiz
Cronex 5 Medical X-Ray Film	AGFA HealthCare, Mortsel, Belgien
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Limited, München, Deutschland
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific), MA, USA
----------------------------------	---

Tabelle 11: Verwendete Materialien für Zellkultur

Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Medium 199 (M199)	Gibco (Thermo Fisher Scientific), MA, USA
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
DPBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	
Trypsin/EDTA (1x)	
TC-Schale 20; 60	Sarstedt GmbH & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 24-Well	
Agarose, low gelling temperature	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eisen (II, III) -oxid, Pulver < 5 µm, 98%	
Kollagenose von <i>Clostridium histolyticum</i>	
Cellstar® Pipetten 5 ml; 10 ml; 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Falcon® Röhrchen 15 ml; 50 ml	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Normocin™	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

Ketamin 10%	Belapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9% Braun®	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Rompun® (Xylazin 2%)	Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland
Temgesic® (Buprenorphin)	Essex Pharma, München, Deutschland
Hepes Pufferan® > 99,5%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 12: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

0,9%ige NaCl-Lösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen	
Durapore® Medizinisches Klebeband	3M, St.Paul, MN, USA
Eppendorf Tubes (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt GmbH & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Feather® Disposal Scalpel	PFMmedical AG, Köln, Deutschland
Pur-Zellin® (Zellstofftupfer) 4 x 5 cm	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher	Tork, Mannheim, Deutschland

2.1.5 Verwendete Kits und Antikörper

Tabelle 13: Verwendete Kits für Immunohistochemie

Vector Viper Substrat Kit	Vector Laboratories Inc.,
---------------------------	---------------------------

DAB Substrate Kit	Burlingame, CA, USA
ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig	
Mouse-on-mouse HRP Polymer Kit	Biocare Medical, Concord, CA, USA

Tabelle 14: Verwendete Primärantikörper für Immunohistochemie

α -smooth muscle cell actin (A2547)	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Von-Willebrand-Faktor (A0082)	Dako Diagnostika, Hamburg, Deutschland

Tabelle 15: Verwendete Primärantikörper für Western Blot

β -Aktin (A5441)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hif-1 α (10006421)	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
Cox4i2 (H00084701-M01)	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA

Tabelle 16: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot

Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Conjugate (W4011)	Promega, Madison, WI, USA
Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate (W4021)	

2.1.6 Verwendete Lösungen, Puffer und Gele

Tabelle 17: 12%iges SDS Polyacrylamid-Gel (Vier Gele mit 1,5 mm Stärke) (Western Blot)

Trenngel 12%	H ₂ O	5,6 ml
	TRIS 1,5 M; pH 8,8	4,2 ml
	30%iges Acrylamid	6,6 ml
	10%iges SDS	0,165 ml
	TEMED	0,022 ml
	25%iges APS	0,022 ml
	Sammelgel 5%	H ₂ O
TRIS 0,5 M; pH 6,8		2,5 ml
30%iges Acrylamid		1,7 ml
10%iges SDS		0,1 ml
TEMED		0,02 ml
25%iges APS		0,02 ml

Tabelle 18: Blotting Puffer (Western Blot)

Methanol	200 ml
Tris Pufferan®	20 mM
Glycin	150 mM
H ₂ O	1000 ml

Tabelle 19: Elektrophorese-Puffer (Western Blot)

Tris Pufferan®	3,02 g
Glycin	18,8 g
SDS (w/v)	10%

H ₂ O	1000 ml
------------------	---------

Tabelle 20: PBS; pH 7,4 (Western Blot, Immunohistochemie)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O	1000 ml

Tabelle 21: Stripping-Puffer (Western Blot)

Glycin 1 M	5 ml
H ₂ O	10 ml
25%ige HCl	0,750 ml

Tabelle 22: 10x Laemmli Proben-Puffer (Western Blot)

TRIS-HCl	0,5 M
SDS	20% (w/v)
Bromphenolblau	1% (w/v)
Glycerol	50% (w/v)
β-Mercaptoethanol	1 M

Tabelle 23: Selbstgemachtes ECL-Detektionsreagenz (Western Blot)

Lösung	Substanz	Menge
A	Tris-HCl 0,1 M; pH 8,6	200 ml
	Luminol	0,050 g

B	Para-Hydroxycoumarinsäure	0,011 g
	DMSO	10 ml
Durchführung	1 ml Lösung A + 0,1 ml Lösung B + 0,003 ml H ₂ O ₂ (30%)	

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodell: Chronische Hypoxie

Um einen Effekt des *knockouts* von Cox4i2 auf die Entwicklung einer PH festzustellen, wurde das Modell der chronischen Hypoxie ausgewählt. Die Versuchstiere wurden 28 Tage chronischer Hypoxie (10% O₂, Umgebungsluft) ausgesetzt. Dafür wurde ein halboffenes System verwendet. Dieses bestand aus einer geschlossenen, normobaren Kammer, welche mit O₂ und Stickstoff belüftet wurde. Durch die Gaszufuhr konnte bei geschlossener Kammer die O₂-Konzentration von 10% konstant gehalten werden. Als Kontrolle diente die gleiche Anzahl an Versuchstieren, welche in eine baugleiche Kammer mit einer O₂-Umgebungsluftkonzentration von 21% gesetzt wurden. Die O₂-Konzentration wurde mittels Sauerstoffmessgerät „A-Series Dynamic O₂-Controller“ (BioSpherix, USA) kontinuierlich gemessen.

Insgesamt wurden 40 Versuchstiere verwendet, wovon jeweils 20 Versuchstiere für das Gen Cox4i2 homozygot positiv oder negativ waren. Folgende Verteilung auf die Versuchsbedingungen wurde gewählt:

Tabelle 24: Verteilung der Versuchsmäuse auf die Versuchsbedingungen

	Wildtyp (+/+)	<i>knockout</i> (-/-)
Normoxie	10 Tiere	10 Tiere
Hypoxie	10 Tiere	10 Tiere

An „Tag -1“ erfolgte die erste echokardiographische Messung, um Ausgangswerte zu bestimmen und mögliche Unterschiede in den Genotypen zu erfassen. Am „Tag 0“ wurden die Versuchstiere in die jeweiligen Versuchsbedingungen Normoxie (21% O₂, 79% N₂) und Hypoxie (10% O₂, 90% N₂) eingesetzt. Die zweite echokardiographische

Messung erfolgte an „Tag 27“. Der Versuch endete an „Tag 28“ mit der hämodynamischen Messung und Tötung der Versuchstiere.

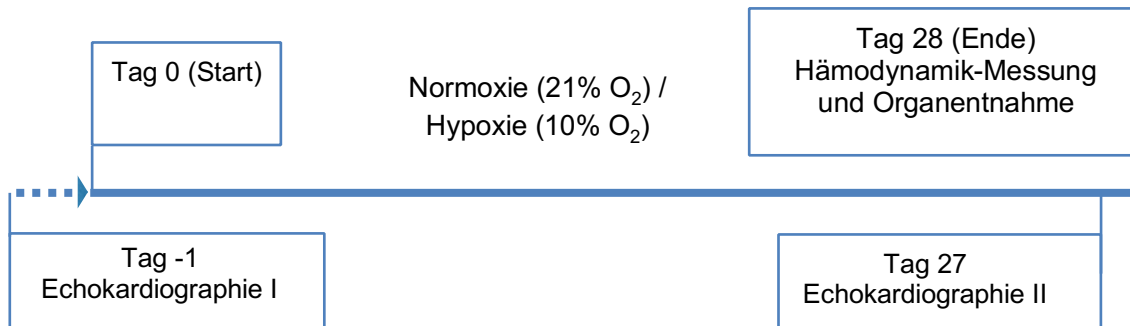


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des Mausmodells der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.

2.2.2 Echokardiographie

Die echokardiographische Messung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. med. vet. Simone Kraut.

Die transthorakale Doppler-/Echokardiographie dient als nicht-invasive Methode der Beurteilung der Herzfunktion.

Für die Untersuchung wurde die Versuchsmaus zunächst in einer Narkosekammer mit einem 3%igen Isofluran/O₂-Gemisch narkotisiert. Während der Untersuchung wurde die Narkose über eine Maskenbeatmung mit einem 1,5%igen Isofluran/O₂ Gasegemisch aufrechterhalten. Für die Untersuchung wurde das narkotisierte Tier auf einer Wärmeplatte an allen vier Extremitäten mithilfe eines Klebestreifens fixiert. Die Temperatur der Wärmeplatte wurde mittels einer rektalen Temperatursonde an die Körpertemperatur angepasst. Weiterhin war in die Wärmeplatte ein Elektrokardiogramm (EKG) integriert, wodurch ein Ein-Kanal-EKG abgeleitet werden konnte. Für ein verbessertes Schallfenster wurden auf dem ventralen Brustkorb und dem kranialen Bauchbereich das Fell mittels Rasur entfernt und Schallgel benutzt. Die echokardiographische Untersuchung wurde mit einem 30 MHz Doppler- und einem 30 MHz 2D-Linearschallkopf durchgeführt. Nach Beendigung der Untersuchung wurde die Maus zurück in ihren Käfig gesetzt und für fünfzehn Minuten beobachtet. Nach vollständigem Zurückerlangen ihres Bewusstseins und der motorischen Fähigkeiten wurde die Versuchsmaus zurück in die Versuchsbedingungen gebracht. Insgesamt dauerte die Untersuchung 30 bis 45 Minuten pro Versuchstier. Folgende Parameter wurden erhoben:

Cardiac Output (CO):

Der *Cardiac Output* beschreibt das Auswurfvolumen des Herzens. Die Einheit ist Milliliter pro Minute (ml/min). Berechnet wird es aus dem Produkt von Herzfrequenz (HF) und Schlagvolumen (SV). Das SV wird durch den Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstraktes (LVOT) und dem Integral der Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Aorta während der Systole (*Velocity Time Integral*, VTI) bestimmt. Als Formel ergibt sich:

$$CO = LVOT \times VTI \times HF$$

Cardiac Index (CI):

Der *Cardiac Index* ergibt sich aus dem CO bezogen auf das Körpergewicht (KGW) des Versuchstieres. Das KGW wird in Gramm (g) angegeben, somit ergibt sich als Einheit des CI Milliliter pro Minute pro Gramm (ml/min/g). Daraus leitet sich folgende Formel ab:

$$CI = \frac{CO}{KGW}$$

Ejektionsfraktion (EF)

Die Ejektionsfraktion ist ein Parameter, der zur Beurteilung der systolischen Funktion der Ventrikel herangezogen werden kann. Er gibt den relativen Wert des SV, bezogen auf das enddiastolische Blutvolumen (EDV), im Ventrikel an. Das SV ergibt sich aus der Differenz des endsystolischen (ESV) und EDV im Ventrikel. Die Einheit wird in Prozent angegeben (%). Die Formel lautet:

$$EF = \frac{(EDV - ESV)}{EDV} \times 100$$

Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE)

Mithilfe der TAPSE lässt sich eine Aussage über die systolische Funktion des rechten Ventrikels machen. Bei der echokardiographischen Untersuchung wird der eindimensionale M-Modus in der apikalen Vier-Kammer-Projektion des Herzens zu Bestimmung der TAPSE verwendet. Während einer Herzaktion wird dann die longitudinale Bewegung des lateralen Ansatzes der Trikuspidalklappe am Myokard in Richtung Herzspitze in Millimetern (mm) gemessen. Eine verminderte TAPSE geht mit einer vermehrten systolischen Dysfunktion des rechten Ventrikels (RV) einher (Aloia et

al. 2016). Die TAPSE ist ein prognostischer Marker in der Behandlung von Patienten mit PAH (Vonk Noordegraaf et al. 2011).

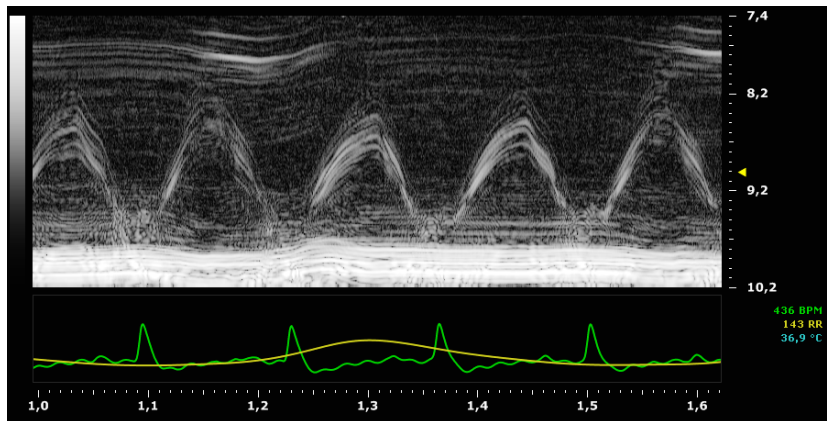


Abbildung 6: Repräsentative echokardiographische Darstellung der TAPSE im M-Modus.

Die Amplitude der dargestellten Kurve beschreibt die longitudinale Bewegung des lateralen Anteils der Trikuspidalklappe.

Verhältnis der pulmonalen Flussbeschleunigungs- und Ejektionszeit: PAT/PET-Quotient

Die PAT (*pulmonary acceleration time*) ist definiert als die Zeit von Beginn der Kontraktion des rechten Ventrikels bis zum Erreichen der maximalen Durchflussgeschwindigkeit in Höhe der Pulmonalklappe. Die PET (*pulmonary ejection time*) wird vom Beginn des rechtsventrikulären Auswurfs bis zum Sistieren des systolisch pulmonalen Blutflusses beschrieben (Yared et al. 2011). Beide Parameter werden in Höhe der Pulmonalklappe mittels Farbdopplermessung bestimmt. Ein erniedrigter PAT/PET-Quotient kann bei erhöhtem pulmonalem Widerstand gemessen werden. Außerdem ist eine Korrelation mit dem rechtsventrikulären Druck und somit auch Grad der pulmonalen Hypertonie bei Mäusen und Menschen beschrieben (Yared et al. 2011, Kohut et al. 2016).

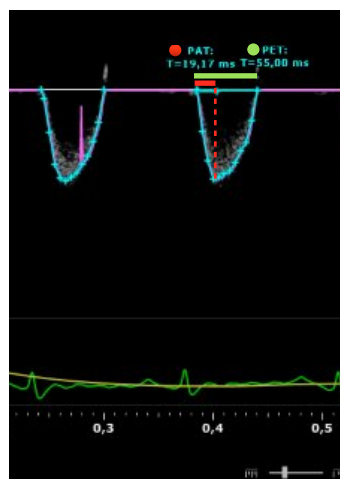


Abbildung 7: Repräsentative echokardiographische Bestimmung der PAT und PET.

Exemplarische echokardiographische Bestimmung von PAT (rot) und PET (grün) innerhalb einer Herzaktion. Im unteren Bild ist das Ein-Kanal-EKG abgebildet.

Beim Menschen wird in der Regel die Regurgitationsgeschwindigkeit über der Trikuspidalklappe bestimmt, um Rückschlüsse auf den systolischen PAP machen zu können. Da bei Mäusen diese nicht messbar ist, wird der PAT/PET Quotient mit ähnlicher Aussagekraft verwendet (Kohut et al. 2016).

Messung der rechtsventrikulären Wandstärke (RVWT)

Mittels Echokardiographie wurde als weiterer Parameter die rechtsventrikuläre Wandstärke in Millimeter (mm) gemessen. Dies erfolgte zum Nachweis hypertropher Veränderungen des Herzens.

2.2.3 Hämodynamische Messung (*closed-chest Methode*)

Die hämodynamische Messung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Karin Quanz.

Zunächst wurden auf dem Computer die Programme MPVS-Ultra und *Labchart* geöffnet. Der Katheter wurde an den Verstärker angeschlossen, auf 37°C erwärmt und mit der Software kalibriert. Das eingestellte Atemzugvolumen (in µl) für die Intubationsnarkose betrug das Zehnfache des Körpergewichts (KGW) der Maus (in g). Weiterhin wurde eine Atemfrequenz von 150 Atemzügen pro Minute eingestellt.

Die Versuchsmäuse wurden 30 Minuten vor Beginn der hämodynamischen Messung mit Buprenorphin in einer Dosierung von 0,1 mg/kgKGW analgesiert und anschließend mit 1,5% Isofluran vollnarkotisiert. Die Versuchsmäuse wurden ebenfalls auf einem Wärmetisch gelagert, dessen Temperatur über eine rektale Temperatursonde reguliert wurde. Der Operationsbereich wurde mit Braunoderm[®] desinfiziert und das Fell im Halsbereich aufgeschnitten. Die Speicheldrüsen wurden stumpf entfernt und die Trachea freigelegt. Über eine Inzision in der Trachea wurde die Maus intubiert und mit den oben genannten Werten beatmet.

Im nächsten Schritt wurde die rechte *V. jugularis* freipräpariert und mit zwei Fäden umfahren. Der kaudale Faden diente der Stauung der Vene durch Zug. Mit dem kranialen Faden wurde die Vene doppelt ligiert. Zwischen beiden Fäden wurde nun ein dritter platziert, welcher als lockere Schlaufe um das Gefäß gebunden war. Nun konnte

der Millar-Katheter über eine kleine Inzision in der *V. jugularis* eingeführt und mit dem mittleren Faden locker fixiert werden. Ein erfolgreiches Positionieren des Katheters im rechten Ventrikel zeigte sich in der Software durch einen typischen Druckkurvenverlauf (zwischen Null und 20 mmHg bei gesunden Versuchstieren). Es folgte die Messung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP) in mmHg. Eine direkte Messung des Blutdrucks in der *A. pulmonalis* war technisch nicht möglich, sodass der RVSP als nächstmöglicher Wert verwendet wurde, um Rückschlüsse auf den pulmonalen Gefäßwiderstand und Blutdruck zu erhalten. Anschließend wurde der Katheter wieder entnommen und das Gefäß mit dem mittleren Faden komplett ligiert.

Als Nächstes wurde die *A. carotis* auf der Gegenseite freipräpariert und im selben Verfahren mit zwei Fäden umfahren, wovon der kraniale Faden erneut der Gefäßligatur diene. Der kaudale Faden wurde zunächst als lockerer Knoten gebunden. Dann wurde mit einer Metallklemme das Gefäß in Höhe des kaudalen Fadens abgedrückt, sodass distal der Klemme keine Pulsationen mehr nachweisbar waren. Nach erneuter Kalibrierung des Katheters konnte der Katheter über eine Inzision in die *A. carotis* eingeführt werden. Die Klemme wurde gelöst, der Katheter vorgeschoben und mit dem proximalen Faden locker fixiert. Es folgte die Messung des systemischen arteriellen Drucks (SAP) in mmHg. Die Messung des SAP war wichtig, um allgemeine Veränderungen des Blutdrucks und einen Einfluss von Cox4i2 auf extrapulmonale Gefäße auszuschließen.

Nach Beendigung der hämodynamischen Messungen erfolgte eine Hämatokrit-Bestimmung. Die Tiertötung erfolgte durch Entblutung des Tieres über den Katheter in der *A. carotis*, sodass schließlich ein Herzkreislaufstillstand eintrat. Anschließend wurden Herz und Lunge für weitere Untersuchungen entnommen.

Hämatokrit

Mithilfe einer 10 µl Kapillare wurde Blut aus der *A. carotis* der Maus entnommen. Diese wurden dann für vier Minuten bei 16,060 g zentrifugiert. Der Hämatokrit wurde anhand einer analogen Skala abgelesen.

Herzratio

Nach Entnahme des Herzens wurden zunächst alle nicht-muskulären Gewebsanteile vorsichtig entfernt. Dann wurde der rechte Ventrikel (RV) vom restlichen Herzanteil, der sich aus linkem Ventrikel (LV) und Ventrikelseptum (VS) zusammensetzte, vorsichtig gelöst. Vor dem Wiegen wurden die Gewebestücke sorgfältig trocken getupft. Das

Gewicht wurde in der Einheit Gramm (g) gemessen. Folgender Quotient stellte die Herzratio dar und diente der Beurteilung einer rechtsventrikulären Hypertrophie:

$$\text{Herzratio} = \frac{\text{Gewicht RV}}{\text{Gewicht (LV + VS)}}$$

2.2.4 Immunohistochemie

Lungenentnahme und Fixierung

Nach Abschluss der hämodynamischen Messung wurde die ventilierte Lunge zunächst über einen Katheter im rechten Herzventrikel mit einer isotonischen Kochsalzlösung (0,9% NaCl) blutleer gespült. Dies erfolgte mit einem Perfusionsdruck von 15 cmH₂O. Daraufhin wurde die Lunge mit Formalin perfundiert und fixiert. Schließlich wurde die Ventilation der Lunge gestoppt und über einen endotrachealen Perfusionsschlauch von der alveolären Seite her mit Formalin fixiert. Insgesamt dauerte die Fixierung 20 Minuten. Anschließend folgte eine Entwässerungsreihe:

Tabelle 25: Überblick über den Ablauf der Entwässerungsreihe

Schritt	Inkubationszeit	Reagenz	Temperatur
1	24 h	Formalin	20°C (Raumtemperatur)
2		PBS	4°C
3		Ethanol 50%	4°C
4		Ethanol 70%	4°C

Paraffinieren und Einbetten der Lungen

Nachdem das Lungengewebe vom Gewebsinfiltrationsautomaten (Leica, APS300S) mit Paraffin infiltriert worden war, folgte die Einbettung. Dazu wurde ein Tropfen Paraffin auf ein Metallschälchen gegeben und die Lunge mit dorsaler Seite nach unten zentral darauf platziert. Um ein Verrutschen der Lunge zu verhindern, ließ man das Paraffin kurz auf der Kühlplatte erstarren und setzte dann die beschriftete Seite der Kassette auf das Metallschälchen. Es wurde erneut Paraffin auf die Lungen gegeben bis sie komplett eingeschlossen waren. Dabei wurde versucht Lufteinschlüsse zu vermeiden. Anschließend wurden sie auf eine Kühlplatte gestellt und solange gekühlt bis das gesamte Paraffin erstarrt war. Die eingebetteten Lungen wurden bei 4°C gelagert.

Lungenschnitte

Die histologischen Schnitte wurden mittels Mikrotoms angefertigt. Dazu wurde zunächst das Präparat mit 20 µm-Schnitten soweit bearbeitet, dass die gesamte Lunge samt Hilus angeschnitten war. Nun wurden Serienschnitte (Anzahl pro Lunge: 3) mit einer Schnittdicke von 3 µm angefertigt. Diese wurden nach dem Schneiden vorsichtig in ein Wasserbad (40°C) gegeben und mittig auf einem Objektträger platziert. Anschließend ließ man den Lungenschnitt auf einer Wärmeplatte (40°C) trocknen, bevor sie für 24 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Die histologischen Schnitte wurden trocken bei Raumtemperatur gelagert.

Färbeprotokoll Doppelfärbung/MM HRP Polymer Kit:

Die Färbung des Endothels und der PASMC erfolgte anhand des unten beschriebenen Protokolls. Zunächst wurden die PASMC mit einem Antikörper gegen α -Aktin gefärbt. In einem zweiten Färbeprozess wurde das Endothel mittels Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor markiert.

Tabelle 26: Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Schritt	Inkubationsdauer (in Minuten)	Reagenz	Anmerkung
1	60		Inkubation bei 58°C
2	10	Xylol	Ablösen des Paraffins
3	10	Xylol	
4	10	Xylol	
5	5	Ethanol 99,6%	Rehydrierungsreihe
6	5	Ethanol 99,6%	
7	5	Ethanol 96%	
8	5	Ethanol 70%	
9	20	H ₂ O ₂ -Methanol Gemisch 3%	Deaktivierung endogener Peroxidasen
10	5	Aqua dest.	Waschen

11	2x5	PBS	
12	15	Trypsin	Inkubation bei 37°C
13	3x5	PBS	Waschen
14	20	BSA 10%	
15	3x5	PBS	
16	30	Rodent Block M	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
17	3x5	PBS	Waschen
18	30	Primärantikörper (Mouse, α -Aktin)	Verdünnung: 1:800
19	4x5	PBS	Waschen
20	20	MM HRP Polymer	
21	3x5	PBS	Waschen
22		Vector Viper Substrat Kit	Entwicklung nach Augenmaß unter dem Mikroskop: 30 s – 2 min; violette Färbung der glatten Muskulatur
23	5	H ₂ O	Waschen
24	2x5	PBS	
25	20	BSA 10%	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
26	3x5	PBS	Waschen
27	20	Serumblock I: 2,5% Normal Horse Serum (ImmPRESS Kit Anti- Rabbit Ig)	

28	30	Primärantikörper (Rabbit) (von- Willebrand-Faktor)	Inkubation bei 37°C 1:1100
29	4x5	PBS	Waschen
30		DAB Substrat Kit	Entwicklung nach Augenmaß unter dem Mikroskop: 30 s – 1 min; braune Färbung des Endothels
31	5	H ₂ O	Waschen
32	3	Counterstain mit Methylgrün	Kernfärbung auf Heizplatte bei 60°C
33	1	Aqua dest.	Waschen
34	2	Ethanol 96%	Dehydrierungsreihe
35	2	Ethanol 96%	
36	5	Isopropylalkohol	
37	5	Isopropylalkohol	
38	5	Xylol	
39	5	Xylol	
40	5	Xylol	
41			Eindecken mit Pertex

Bestimmung Muskularisierung

Im Anschluss an die Färbung wurden die gefärbten Schnitte am Lichtmikroskop Leica DMLA mithilfe der Software QwinV3 auf den Grad der Muskularisierung untersucht und ausgewertet. Es wurden pro Mauslunge 100 Gefäße untersucht, welche sich wiederum in 85 kleine (20-70 µm), 10 mittelgroße (70-150 µm) und 5 große Gefäße (> 150 µm) unterteilten. Die Grade der Muskularisierung wurden in voll-muskularisiert (> 70% Muskularisierung), teil-muskularisiert (5-70% Muskularisierung) und nicht-muskularisiert

(< 5% Muskularisierung) unterschieden. Pro Mauslunge wurde, nach abgeschlossener Analyse, der Mittelwert der Muskularisierungsgrade in der jeweiligen Gefäßkategorie gebildet.

2.2.5 Isolation von PASMC aus Mauslungen

Vorbereitung

Zunächst wurden 30 mg Agarose sowie eine Mischung aus 15 mg Agarose und 15 mg Eisenoxid-Pulver abgewogen. Die abgewogenen Mengen wurden jeweils in 3 ml Medium 199 (1% P/S) gelöst. Die Lösungen wurden im heißen Wasserbad bei 70°C für 10 Minuten erhitzt und dann bei 40°C auf einer Heizplatte warmgehalten. Weiterhin wurden 10 ml Kollagenase (80 U/ml) angesetzt und im Wasserbad bei 36,5°C warm gestellt.

Präparation

Die Versuchsmaus wurde mittels intraperitonealer Injektionsnarkose, bestehend aus 100 mg/kgKGW Ketamin (10%, 100 mg/l) und 20 mg/kgKGW Xylazin (2%, 20 mg/ml) narkotisiert. Zusätzlich wurden die Versuchsmäuse mit 50000 I.E. Heparin/kgKGW (Heparin Natrium 250000 I.E./10ml) antikoaguliert. Die Injektionslösung wurde in einer 1 ml-Mischspritze angesetzt (0,1 ml Xylazin, 0,1 ml Ketamin, 0,2 ml Heparin) und mit 0,6 ml isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) verdünnt. 0,1 ml dieser Injektionslösung waren somit für 10 g Maus kalkuliert. Nach ungefähr 10 Minuten wurden der Zwischenzehen- und Schwanzreflex getestet. Nach Feststellung des Reflexausfalls wurde mit der Präparation begonnen. Bauch- und Brusthöhle wurden von kaudal beginnend bis zum Hals eröffnet, ohne dabei innere Organe zu verletzen. *Aorta abdominalis* und *V. cava caudalis* wurden eröffnet, was zum Ausbluten, konsekutivem Herzkreislaufstillstand und dem definitiven Tod der Versuchsmaus führte. Der Thymus, die Parotis und die Halsmuskulatur wurden stumpf entfernt und die Trachea dargestellt. Die Trachea wurde mit einer losen Schlaufe umfahren. Nach Einführung eines endotrachealen Tubus über eine Schnittinzision, wurde der Tubus durch Festbinden der Schlaufe fixiert. Im nächsten Schritt wurde eine lockere Schlaufe um die *A. pulmonalis* gebunden. Danach folgten zwei Inzisionen in jede der beiden Herzkammern. Der entlüftete Herzkatheter wurde nun durch die rechte Inzision in die rechte Herzkammer und weiter in die *A. pulmonalis* vorgeschoben und durch Festziehen der Schlaufe sicher fixiert. Die Lunge wurde zunächst mit DPBS, einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung mit einem physiologische pH-Wert von 7,4, gespült. Die Spülflüssigkeit

konnte über die linke Herzinzision abfließen, sodass ein Lungenödem vermieden wurde. Im nächsten Schritt wurde die Agarose-Eisen-Mischung über den Katheter appliziert. Aufgrund der Eisenpartikelgröße lagerten sich diese im präkapillaren Bereich ab und ermöglichten eine Isolation präkapillärer PSMCs. Es wurde auf eine gleichmäßige Anreicherung der Lunge mit Eisenpartikeln geachtet. Nach Beendigung der Infusion wurde der Katheter entfernt und die *A. pulmonalis* komplett ligiert. Die Agarose-Lösung wurde nun über den Endotrachealtubus appliziert bis sich alle Lungenlappen entfaltet hatten. Der Endotrachealtubus wurde entfernt und die Trachea ligiert. Im Anschluss an die Lungenentnahme wurde die Lunge in ca. 4°C kaltes, steriles DPBS gelegt, um die Agarose gelieren zu lassen.

Isolation der glatten Gefäßmuskelzellen

Die folgenden Arbeiten fanden alle unter der Steril-Werkbank statt: Das Lungengewebe wurde zunächst von Herz und restlichem Gewebe gesäubert. Mithilfe der Drei-Scheren-Technik wurde das Lungengewebe mechanisch, in sterilem DPBS, zerkleinert. Das eisenbehaftete Lungengewebe wurde dreimal mittels eines *Magnetic Particle Concentrators* in DPBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden 10 ml einer Kollagenase-Lösung (80 U/ml) hinzugefügt und die Zell-Kollagenase-Mischung für etwa 60 Minuten inkubiert (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂ und 90-95% Luftfeuchtigkeit). Die Kollagenase-Aktivität wurde anschließend durch Applikation von Medium 199 (M199), welches mit 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und 10%igem fertilem Kälberserum (FCS) versetzt war, gestoppt. Durch die Anwendung von 15G- und 18G-Kanülen wurde mittels mechanischer Scherkräfte das angedaute Gewebe weiter zerkleinert. Anschließend folgte mit M199 (1% P/S, 10% FCS) und unter Anwendung des *Magnetic Particle Concentrators* ein erneutes dreimaliges Waschen des Eisenpartikel-enthaltenden Lungengewebes. Nach dem letzten Waschen wurden die Eisenpartikel in einem Milliliter *smooth muscle cell* (SMC)-Vollmedium, welches sich aus *smooth muscle cell growth medium 2*, Wachstumsfaktoren (Supplement-Mix), einem antimikrobiellen Reagenz (Normocin®) und 15% FCS zusammensetzte, resuspendiert und mit weiteren 3 ml SMC-Vollmedium auf eine Zellkulturschale (TC-Schale 60) ausgesät (Aussaat 1, Passage 0). Anschließend wurden die Zellen inkubiert (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂ und 90-95% Luftfeuchtigkeit).

2.2.6 Zellkultur der mPASMCMC

Die Zellkultur erfolgte im oben beschriebenen SMC-spezifischen Vollmedium. Dieses Selektivmedium hatte den Zweck das Wachstum anderer Zellen, wie Endothelzellen, zu

unterbinden. Nach etwa einer Woche waren die mPASCs aus den isolierten Gefäßstücken herausgewachsen, sodass eine erneute Aussaat der Gefäßstücke möglich war. Hierfür wurde das Zellkulturmedium samt Eisenpartikeln in ein *Falcon* überführt, so dass die Zellkulturschalen nur noch die ausgesprossenen und adhärenen mPASCs enthielten. Unter Einsatz des *Magnetic Particle Concentrators* wurden die sich im *Falcon* befindlichen Eisenpartikeln und adhärenen Gefäßstücke mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Eisenpartikel mit den Gefäßstücken in SMC-Vollmedium resuspendiert, auf eine neue Zellkulturschale ausgesät (Aussaat 2, Passage 0) und inkubiert. Nach weiteren drei bis fünf Tagen konnte eine dritte Aussaat gemacht werden (Aussaat 3, Passage 0). Sobald eine Konfluenz der ausgesprossenen mPASCs von 80-90% unter dem Mikroskop zu beobachten war oder drei Wochen vergangen waren, wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden die mPASCs zunächst mit DPBS gewaschen, um eine optimale Aktivität des Trypsins zu gewährleisten. Die anschließende Inkubation mit Trypsin diente der Zelllösung von der Kulturschale. Insgesamt wurden die Zellen eine Minute mit Trypsin im Inkubator (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit) behandelt. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Trypsins mittels SMC-Vollmediums und Überführung des PASC-haltigen SMC-Vollmediums in ein *Falcon*-Röhrchen, welches schließlich zentrifugiert (5 min; 1200 rpm; 20°C) wurde. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in einem Milliliter SMC-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und es folgte eine erneute Aussaat von etwa 5x10³ bis 1x10⁴ Zellen/cm² (Passage 1). Mit der Zellkultivierung wurde fortgefahren bis eine erneute Passagierung möglich war, spätestens nach etwa einer Woche (Passage 2). Durch regelmäßige Fluoreszenz-Färbungen von α -smooth-muscle-actin (α SMA) und von Willebrand-Faktor (vWF) wurde gewährleistet, dass es sich bei den kultivierten Zellen um PASCs handelte.

2.2.7 *in vitro*-Experimente

Sauerstofffreie Normoxie/Hypoxie

Die mPASCs aus C57BL/6J-Mäusen wurden nach Erreichen von Passage 2 für weitere 24 Stunden unter Normoxie inkubiert (37°C, 5% CO₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit). Anschließend wurden die Zellen für 36 Stunden unter Normoxie (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit) oder Hypoxie (37°C, 5% CO₂, 1-6% O₂, 94-89% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit) im Zellkulturinkubator kultiviert. Aufgrund der technischen Gegebenheiten wurde jeweils zwei O₂-Reihen getrennt durchgeführt.

Tabelle 27: Experimentelles Design beider O₂-Reihen

O ₂ -Reihe	O ₂ -Konzentration					Expositionsdauer
1	21% O ₂	1% O ₂	2% O ₂	4% O ₂	5% O ₂	36 h
2			3% O ₂	5% O ₂	6% O ₂	

Anschließend wurden die mPASCs für Western Blot-Versuche bzw. quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (q(RT)-PCR) verwendet (s. Kapitel 2.2.8 Proteinisolation und Western)

Hif-1 α -knockdown mittels *small-interfering RNA*(siRNA)-Transfektion

mPASCs aus C57BL/6J-Mäusen wurden bis Passage 2 kultiviert und für weitere 24 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit). Eine Stunde vor Transfektion wurden die mPASCs in SMC-Nullmedium (SMC-Vollmedium ohne 15% FCS) inkubiert. Der Hif-1 α -knockdown in den PASCs erfolgte mit einer modifizierten ON-TARGETplus SMARTpool Hif-1 α siRNA (L-040638-00-0005; Horizon Discovery, Cambridge, UK). Die fünf Zielsequenzen der siRNA waren gegen die unterschiedlichen Hif-1 α Transkriptionsvarianten gerichtet. Als Kontrolle wurde eine Zellkulturplatte mit unspezifischer siRNA (siRandom, siR, Kontrolle; SR-CL000-005, Eurogentec, Lüttich, Belgien) transfiziert. Diese zeichnete sich durch keinerlei Ähnlichkeit zu eukaryotischen Genen aus und sollte daher keinen Einfluss auf die Expression von Hif-1 α nehmen. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin[®]2000 (Invitrogen[™]).

Hierzu wurde zunächst das SMC-Nullmedium abgesaugt und durch 1,8 ml frisches Nullmedium ersetzt. Pro Zellkulturplatte (TC-Schale 60) wurden gemäß Hersteller 0,5 μ l/cm² Lipofectamin[®]2000 Reagent in 10 μ l/cm² Opti-Mem Medium (Gibco[™]) verdünnt. Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 100 nM siRNA hinzugegeben und eine erneute Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur folgte. Pro Zellkulturplatte wurden 200 μ l des hergestellten Transfektionsgemisches appliziert und die mPASCs für acht Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit). Schließlich wurden das Transfektionsgemisch zusammen mit dem SMC-Nullmedium abgesaugt und durch SMC-Vollmedium ersetzt. Im Anschluss wurden die transfizierten Zellkulturplatten unter Hypoxie (37°C, 5% CO₂, 1% O₂, 94% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit) für 24, 36 oder 48 Stunden inkubiert.

Tabelle 28: Experimentelles Design des Hif-1 α -knockdowns mittels siRNA

Transfizierte mPASC	O ₂ -Konzentration	Expositionsdauer		
siR		48 h		
siHif-1 α	1% O ₂	24 h	36 h	48 h

Normoxische und hypoxische Exposition von Cox4i2^{+/+}- und Cox4i2^{-/-}-mPASC

Es wurden mPASC aus Cox4i2^{+/+}- und Cox4i2^{-/-}-Mäusen isoliert und bis Passage 2 kultiviert. 24 Stunden nach Erreichen der Passage 2 wurden die mPASC für 36 Stunden in Hypoxie (37°C, 5% CO₂, 1% O₂, 94% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Anschließend fand die Proteinisolation statt (s. Kapitel 2.2.8 Proteinisolation und Western).

Tabelle 29: Experimentelles Design der Hypoxie-Exposition von Cox4i2 mPASC

mPASC	O ₂ -Konzentration		Expositionsdauer
Cox4i2 ^{+/+}	21% O ₂	1% O ₂	36 h
Cox4i2 ^{-/-}			

Proliferationsassay

Es wurde das Click-iT® Plus Alexa Fluor® 488 Imaging Kit verwendet. Dies basierte auf der Färbung proliferierender Zellen mittels 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU), einem Fluoreszenz-markiertem Nukleotid, welches für Thymidin in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut wird. Anhand des gemessenen EdU Signals konnten so indirekt Rückschlüsse auf die Proliferation gemacht werden.

Die mPASC wurden aus Cox4i2^{+/+}- und Cox4i2^{-/-}-Mäusen isoliert und auf 12-Well Kulturplatten ausgesät (Aussaat 1, Passage 0). Je Versuchsprobe (n-Zahl) wurde ein Doppelansatz für Normoxie (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit) und Hypoxie (37°C, 5% CO₂, 1% O₂, 94% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit) pipettiert. Die mPASC wurden sofort in die Versuchsbedingungen überführt und für 120 Stunden inkubiert. Nach 90 Stunden wurden die Eisenpartikel entfernt und es wurde ein Milliliter einer Lösung aus EdU und SMC-Vollmedium, in einer Verdünnung von 1:1000, pro Well appliziert.

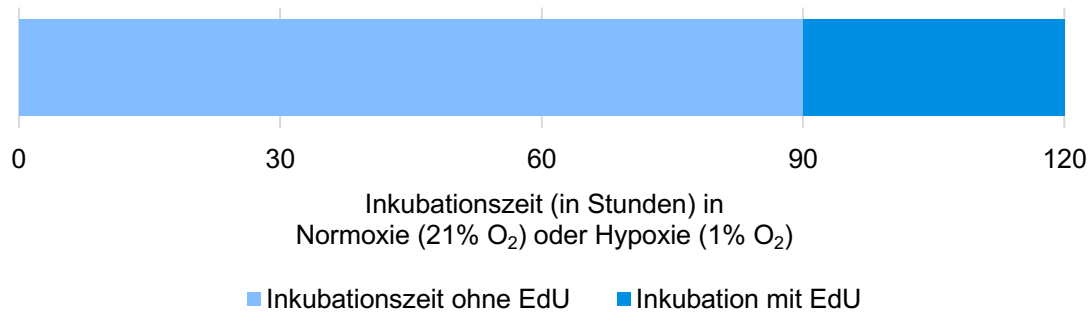


Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Proliferations-assays.

Inkubationsdauer (in Stunden, h) der Cox4i2 mPASCs unter Normoxie und Hypoxie. Nach 90 h wurden die mPASCs zusätzlich mit EdU inkubiert.

Für die hypoxische Versuchsreihe wurde das SMC-Medium zuvor hypoxisch begast. Die mPASCs wurden für weitere 30 Stunden inkubiert und anschließend fixiert.

Die Fixierung erfolgte mittels eiskalter Aceton-Methanol-Lösung (Verhältnis 1:1), welche, nach einem einmaligen Waschschriff mit kaltem DPBS, auf die Zellen gegeben wurde. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Fixierlösung abdekantiert und eine zwanzigminütige Inkubation mit 3%igem BSA im Inkubator (37°C, 5% CO₂, 21% O₂, 74% N₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit) folgte. Diese sollte unspezifische Bindungen blockieren. Im Anschluss wurden die Wells dreimal mit einer 0,1%igen BSA-Lösung gespült. Schließlich wurde das eingebaute EdU mit einem Fluorophor gekoppelt und somit unter Fluoreszenz detektierbar gemacht. Das dafür verwendete lichtsensible Reaktionsgemisch wurde in einem lichtundurchlässigen Falcon angesetzt. Jedes Well wurde mit dem Reaktionsgemisch für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurde das erfolgreiche Koppeln von EdU und Fluorophor unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Das Fluorophor emittierte, unter Anregung von Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm, grünes Licht mit einer Wellenlänge von 519 nm. Die DNA-Färbung erfolgte anschließend in fünfminütiger Inkubation mit Hoechst® (1:1000) in Dunkelheit. Die Wells wurden erneut mit DPBS gewaschen und die Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert. Hoechst® emittierte blaues Licht (465 nm Wellenlänge), wenn es von Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm angeregt wurde.

Für die Auswertung wurden Bilder mithilfe eines Leica-Lichtmikroskops (DFC420 C), eines Fluoreszenzgerätes und der Software LAS angefertigt. Pro Well wurden mindestens acht Aufnahmen gemacht. Jede Aufnahme bestand aus zwei Bildern, wovon eines das Hoechst®-Signal und das zweite zusätzlich das EdU-Signal beinhaltete.

Mithilfe der Software *paint.net* wurden beide Bilder ausgezählt und die EdU- zu den Hoechst®-markierten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Dies ermöglichte eine relative Aussage über den unterschiedlichen Proliferationsgrad unter Normoxie und Hypoxie machen zu können.

$$\text{Relative Proliferation} = \frac{\text{Anzahl (EdU – markierte Zellen)}}{\text{Anzahl (Hoechst – markierte Zellen)}}$$

Pro Versuchstier und -bedingung wurde der Mittelwert der relativen Proliferation aller ausgewerteten Bilder gebildet.

2.2.8 Proteinisolation und Western Blot

Proteinisolation und Quantifizierung

Für die Isolation der Proteine wurden die mPASC, nach Beendigung des Versuches, einmalig mit 4°C kaltem DPBS gewaschen und mit 150 µl Zellyse-Puffer (Cell Signaling Technology), welcher Proteaseinhibitoren beinhaltet, für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten mPASC mechanisch von der Zellkulturplatte gelöst und für zehn Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit den Zelldebris verworfen. Die Konzentration des Proteinextrakts wurde im nächsten Schritt mittels *DC Protein Assay* bestimmt. Die Errechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels einer Standardkurve. Die Quantifizierung erfolgte durch spektrophotometrische Messung bei 450 nm-Wellenlänge im *MicroReader* und der Software *i-control*. Die Proteinextrakte wurden anschließend kurzzeitig bei -20°C gelagert.

Western Blot

Zunächst wurden 12%ige SDS-Polyacrylamid Gele angefertigt. Nicht sofort verwendete Gele wurden in Frischhaltefolie gewickelt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Für die Western Blot Analyse wurde eine Zielproteinkonzentration von 25-30 µg/µl pro Geltasche angestrebt. Das pipettierte Probenvolumen umfasste 20 µl und setzte sich aus Proteinextrakt, Zellyse-Puffer und 2 µl Laemmli-Puffer (10-fach konzentriert) zusammen. Der Laemmli-Puffer sorgte für die Denaturierung der Proteine in ihre Primärstruktur. Weiterhin erhielten die Proteine eine einheitliche negative Ladung. Die Vorbereitung der Proben fand auf Eis statt. Danach wurden die Proteinproben auf einer Heizplatte für zehn Minuten bei 96°C denaturiert und anschließend für zwei Minuten auf

Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Im nächsten Schritt fand die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung der Proteine statt. Dafür wurden die Geltaschen mit jeweils 20 µl Proteinprobe und die erste Geltasche mit 5 µl Proteinstandard geladen. Insgesamt lief die Gelelektrophorese über 1,5 Stunden bei 120 V und 400 A. Die Proteine wurden anschließend im Blotting-Verfahren (100 V, 400 A, 60 min) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Pore-Size=0,45 µl) übertragen. Die Membranen waren kurz vorher eine Minute lang mit Methanol aktiviert und mit Blotting-Puffer gewaschen worden. Nach Abschluss des Proteintransfers wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran, durch eine sechzigminütige Inkubation mit einer 5%igen Magermilch-Lösung abgesättigt. Über Nacht wurden die Membranen schließlich mit dem entsprechenden Primäantikörper bei 4°C inkubiert.

Tabelle 30: Verdünnung der Primäantikörper für Western Blot Analyse

Hif-1α polyklonaler Antikörper	1: 1000
Cox4i2 monoklonaler Antikörper	1: 1000
β-Aktin monoklonaler Antikörper	1: 50 000

Primäantikörper

Verdünnung

Am Folgetag wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten mit PBST gewaschen. PBST bestand aus einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung, welche mit Tween 20 versetzt war. Der Zusatz Tween 20 sollte unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen blocken. Anschließend wurden die Membranen mit dem Sekundäantikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugiert war, eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 31: Verdünnung der Sekundäantikörper für die Western Blot Analyse

Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Konjugat	1:5000
Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Konjugat	1:5000

Sekundäantikörper

Verdünnung

Im Folgenden wurden die Membranen erneut dreimal für fünfzehn Minuten mit PBST gewaschen.

Die Detektion der Antikörper gegen Cox4i2 und Hif-1α fand mithilfe des *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* statt, welches auf einer Luminol-basierten Chemilumineszenzreaktion beruhte. Für die Entwicklung von β-Aktin wurde eine selbstgemachte ECL-Lösung (s. Kapitel: Verwendete Materialien) verwendet.

Nachfolgend wurde die Lumineszenz mittels eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilms detektiert.

Um die Membran erneut zu verwenden, wurden die Antikörperbindung an die Proteinepitope durch eine dreißigminütige Inkubation mit einem *Stripping*-Puffer bei Raumtemperatur gelöst. Im Anschluss erfolgt ein erneutes zweimaliges zehninütiges Waschen mit PBST. Danach wurden die Membranen erneut für 30 Minuten lang mit 5%iger Milchlösung geblockt, bevor sie für einen weiteren Antikörper nutzbar waren.

Auswertung

Die entwickelten Röntgenfilme wurden im *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS* eingescannt und die Proteinbanden mithilfe des Softwareprogramms *ImageJ* densitometrisch gemessen. Dann wurden die gemessenen Intensitäten zur Ladungskontrolle (β -Aktin) in Relation gesetzt und die Werte zur Versuchskontrolle normalisiert.

2.2.9 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem *RNeasy MiniKit*. Dazu wurden die mPASCs zunächst mit 4°C kaltem DPBS gewaschen und mit 350 μ l β -Mercaptoethanol-haltigem RLT-Puffer (v/v 1:100) lysiert. Im nächsten Schritt der RNA Extraktion wurden 350 μ l Ethanol (70%) je Probe hinzugefügt. Das Ethanol-Proben Gemisch wurde auf eine *RNeasy MinElute spin column* pipettiert und mit verschiedenen Pufferlösungen mehrmals gewaschen. Jeder Waschgang endete mit einer einminütigen Zentrifugation bei 8000 rpm, wonach das Eluat verworfen wurde. Im letzten Schritt inkubierte man die Silicamembran für zwei Minuten mit 30 μ l RNase-freiem Wasser und zentrifugierte ein weiteres Mal. Das Eluat enthielt schließlich die isolierte RNA.

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge am *NanoDrop*. Zur Evaluierung der Qualität der RNA-Proben wurde zusätzlich der Quotient aus beiden Wellenlängen gebildet. Im Anschluss wurden die Proben bei -80°C eingelagert.

cDNA-Synthese

Das Umschreiben der mRNA in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit dem *iScript cDNA Synthesis Kit*. Das Kit arbeitete unspezifisch, sodass jede Form

der RNA revers transkribiert wurde. Ziel der Methode war es mRNA in eine cDNA Kopie umzuschreiben, um diese dann im Anschluss in der q(RT)-PCR mit spezifischen Primern zu vervielfältigen. Mithilfe des Umschreibens von mRNA in cDNA wurde das Amplifizieren genomischer DNA während der q(RT)-PCR verhindert.

Es wurden 15 µl der RNA-Probe (ca. 200 ng RNA) mit 4 µl *iScript Reaction Mix* und 1 µl reverse Transkriptase in einem *Low Tube Strip* gemischt. Der *iScript Reaction Mix* bestand aus einer Mischung aus Oligo-dT-Nukleotiden und zufälligen Hexamer Primern. Dadurch ließ sich zunächst ein komplementärer DNA-Einzelstrang synthetisieren. In einem weiteren Schritt wurde der RNA-Strang durch eine RNase abgebaut. Mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase wurde nun ein komplementärer DNA-Strang zum cDNA-Einzelstrang synthetisiert, sodass man eine doppelsträngige cDNA erhielt. Das Umschreiben der RNA in cDNA fand im Thermocycler statt.

Tabelle 32: cDNA-Synthese-Schritte im Thermocycler

1.	5 Minuten	25°C
2.	30 Minuten	42°C
3.	5 Minuten	85°C
Schritt	Zeit	Temperatur

Die fertig umgeschriebene cDNA wurde auf Eis gelagert und sofort für die quantitative PCR verwendet. Danach wurde die nicht verwendete cDNA bei -80°C eingelagert.

2.2.10 Quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung von DNA (*templates*). Durch das Einsetzen spezifischer Primer können Kopien von DNA-Sequenzen erstellt werden. Das Grundprinzip der PCR besteht aus Zyklen, die sich ständig wiederholen. Ein Zyklus besteht aus drei Abschnitten: Zunächst erfolgt das Denaturieren der DNA-Doppelstränge bei 94°C. Dies führt dazu, dass Primer an die spezifischen DNA-Sequenzen der Einzelstränge binden können. Das Anlagern der Primer (*annealing*) findet bei 50-60°C statt. Im nächsten Schritt lagern sich Polymerasen an den Primern an und die Vervielfältigung beginnt (Elongation). Man verwendet dazu hitzestabile Polymerasen, wie die Taq-DNA-Polymerase, aus *Thermus aquaticus*. Diese arbeitet enzymatisch am besten bei einer Temperatur von 72°C, wo die DNA noch im denaturierten Zustand

vorliegt. Im Anschluss beginnt ein neuer Zyklus. Neben dem *template*, der Polymerase und den Primern sind außerdem Magnesiumionen, Nukleotide und ein Puffer nötig.

Prinzip der q(RT)-PCR

Das Prinzip der quantitativen real-time Polymerase Kettenreaktion q(RT)-PCR besteht darin, Aussagen über DNA-Produktakkumulation in Echtzeit zu machen und gleichzeitig Rückschlüsse auf die Produktmenge gewinnen zu können. Die Quantifizierung der neu synthetisierten DNA-Menge wird durch den Einbau von Fluoreszenzsonden, wie z.B. SYBR Green, gemessen. Diese werden während der *annealing*-Phase eingebaut. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur neu gebildeten Produktmenge.

Primer

Es wurden ein Primer für Cox4i2 und ein Primer für β_2 -Mikroglobulin (β_2 M), welches als Referenzgen („*housekeeping gene*“) genutzt wurde, verwendet. Das Referenzgen sollte durch den Versuch nicht beeinflusst und konstant exprimiert werden. Eine Arbeit von Malczyk et al. hatte gezeigt, dass β_2 M Hypoxie-unabhängig exprimiert wird (Malczyk et al. 2013). Anhand des Referenzgens ließ sich so eine Aussage über die Quantität des zu untersuchenden Gens machen.

Die Primer wurden von Metabion GmbH (Steinkirchen, Deutschland) synthetisiert und nachfolgenden Kriterien ausgewählt:

- Introns werden überspannt
- Länge (18-22 Basenpaare)
- Zu amplifizierender Genabschnitt maximal 100-150 bp lang

Die verwendeten Primersequenzen sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 33: Sequenzen der für die q(RT)-PCR verwendeten Primer

Primer	Amplikonlänge	Sequenz
Cox4i2	119 bp	FP: 5' -GGT GAT TTG GTG GCA GCG AG-3'
		RP: 5'-GCC CTG TAT GGG GTT GCT CT- 3'
β_2 M	126 bp	FP: 5'-AGC CCA AGA CCG TCT ACT GG-3'

RP: 5'-TTC TTT CTG CGT GCA TAA ATT-3'
--

FP: *forward* Primer (Vorwärtsprimer); RP: *reverse* Primer (Rückwärtsprimer)

Durchführung

Jede Probe wurde als Doppelansatz im 96-Well vorbereitet. Pro Well wurden 2 µl cDNA-Probe zusammen mit 18 µl Reaktionsmix (10 µl *SYBR Green*; 7 µl RNase-/DNase-freies Wasser; 1 µl Primer) pipettiert. Im Anschluss wurde die 96-Well Platte mit einer Folie versiegelt und die q(RT)-PCR im Mx3000^RQPCR System gestartet. Diese begann zunächst mit der initialen Denaturierung bei 95°C für 600 Sekunden. Dann folgten 40 Amplifikationszyklen, bestehend aus Denaturierung (10 s; 95°C), *annealing* (20 s; 59°C) und Elongation (10 s; 72°C). Zum Abschluss wurde eine Schmelzkurvenanalyse (Ein Zyklus: Denaturierung 60 s bei 95°C, dann Hybridisierung 30 s bei 55°C) durchgeführt. Diese hatte den Sinn die Spezifität der amplifizierten Fragmente zu bestimmen, da *SYBR Green* unspezifisch an DNA bindet. Die Schmelztemperatur eines amplifizierten Produkts ist als die Temperatur definiert, an der der stärkste Fluoreszenz-Signalabfall geschieht. Dadurch, dass die spezifisch amplifizierten DNA-Fragmente doppelsträngig vorlagen und eine spezifische Schmelztemperatur aufwiesen, konnten Signale mit *SYBR Green* von unspezifischen DNA-Produkten, die aufgrund von unterschiedlichen Fragmentlängen verschiedene Schmelztemperaturen und somit abweichende Schmelzkurven hatten, unterschieden werden (Wilhelm et al. 2003).

Auswertung

Zur Auswertung wurde der C_T -Wert (*Cycle Threshold*) verwendet. Dieser Wert beschreibt die Zykluszahl, in der das Fluoreszenzsignal sich erstmals signifikant vom Hintergrund abhebt. Die Vermehrung der Produkte, während der Amplifikation, wurde durch eine anfänglich langsame Phase, die über eine exponentielle Phase in eine zum Ende hin lineare Phase übergeht, beschrieben. Die langsame Startphase beruht auf der geringen Menge an vorhandenen Templates. Dadurch ist die Chance, dass Primer, Polymerase und Template aufeinandertreffen, gering. Am Ende stagniert die Amplifikation aufgrund von Produkthemmung und Substratmangel. Der C_T -Wert liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve und somit in der Phase der höchsten Aktivität. Aufgrund der Anzahl an Amplifikationskurven wurde der gemeinsame Schwellenwert (*Threshold*) festgelegt, der bei allen Amplifikationskurven die exponentielle Phase erfasst. Der Schnittpunkt mit der jeweiligen Amplifikationskurve

ergab den C_T -Wert. Da jede Probe als Doppelansatz analysiert worden war, wurde pro Probe der Mittelwert der C_T -Werte gebildet.

Das Ziel der q(RT)-PCR war es eine Aussage über die Gen-Expression von Cox4i2 unter Hypoxie zu machen. Eine Quantifizierung der mRNA-Expression von Cox4i2 war durch Normalisierung zum Referenzgen möglich. Dies wurde durch den delta C_T -Wert(ΔC_T) beschrieben:

$$\Delta C_T = C_T(\beta_2M) - C_T(\text{Cox4i2})$$

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die in dieser Arbeit erstellten Graphen wurden mit der Software *GraphPad Prism 6* erstellt. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM - *standard error of the mean*) dargestellt. Weiterhin wurden signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert von $< 0,05$ mit einem „*“ oder „#“ gekennzeichnet. Die Anzahl der Messungen bzw. verwendeten Tiere pro Versuch wurde mit „n“ abgekürzt. Es wurden unterschiedliche statistische Analysemethoden verwendet. Der t-Test nach *Student* wurde zum Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen verwendet. Wurde der Effekt einer unabhängigen Variabel in mehr als zwei Gruppen (z.B. unterschiedliche Hypoxiegrade) auf eine abhängige Variabel (z.B. Proteinexpression) untersucht, wurde eine *one-way Anova* durchgeführt. Die Statistik wurde durch *post-hoc* Analysen ergänzt. *Dunnnett's post-hoc test* wurde verwendet, um Unterschiede verschiedener Gruppen zu einer Kontrollgruppe zu untersuchen. Zur Analyse von Unterschieden zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde *Tukey's post-hoc test* angewendet. Die *two-way Anova* wurde bei dem Vorhandensein von mindestens zwei unabhängigen Variablen (z.B. O_2 -Konzentration und Cox4i2-Genexpression) und einer abhängigen Variabel (z.B. rechtsventrikulärer Druck) verwendet. Hierbei wurde das *post-hoc* Testverfahren nach Bonferroni verwendet. Je nach Versuchsaufbau wurden die Daten gepaart oder ungepaart getestet. Für Daten, die mittels *two-way Anova* analysiert wurden, wurden nur statistische Signifikanzen aus der *post-hoc* Analyse in den Graphen angezeigt, andere Signifikanzen (d.h. Effekt einer unabhängigen auf eine abhängige Variable) werden nur im Text beschrieben.

3. Ergebnisse

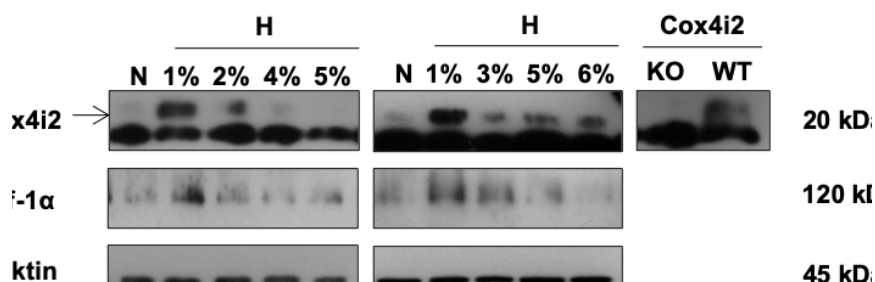
Cox4i2 wurde als Hypoxie-abhängige Isoform von Cox4 identifiziert und wird vermehrt in PASMC in der Lunge exprimiert (Huttemann 2001). Sommer et al. beschrieben erstmals die wichtige Rolle von Cox4i2 als O₂-Sensor und Initiator der HPV in akuter Hypoxie (Sommer et al. 2017). In dieser Arbeit sollte die Funktion von Cox4i2 in der Pathogenese der chronischen Hypoxie-induzierten PH untersucht werden. Hierbei waren insbesondere der Einfluss eines Cox4i2 *knockouts* auf die Höhe des RVSP und das pulmonale vaskuläre Remodeling nach Hypoxie-Exposition von Interesse. Weiterhin galt es auf zellulärer Ebene die Interaktion mit Hif-1α, welches eine bedeutende Rolle in diesen Prozessen spielt, zu untersuchen.

3.1 *In vitro*-Experimente

3.1.1 Einfluss unterschiedlicher O₂-Konzentrationen auf die Proteinmenge von Cox4i2 und Hif-1α

Das Ziel des ersten Experimentes war es im Rahmen einer 36-stündigen Exposition von mPAMSC in unterschiedlichen O₂-Konzentrationen (1-6% O₂ im SMC-Vollmedium) den Einfluss der O₂-Konzentration auf die Cox4i2- und Hif-1α-Proteinmenge zu untersuchen.

Die Experimente zeigten eine gesteigerte Proteinmenge von Cox4i2 und Hif-1α mit abnehmender O₂-Konzentration (Abbildung 9). Die höchste Proteinmenge erreichten beide untersuchten Proteine bei 1% O₂.



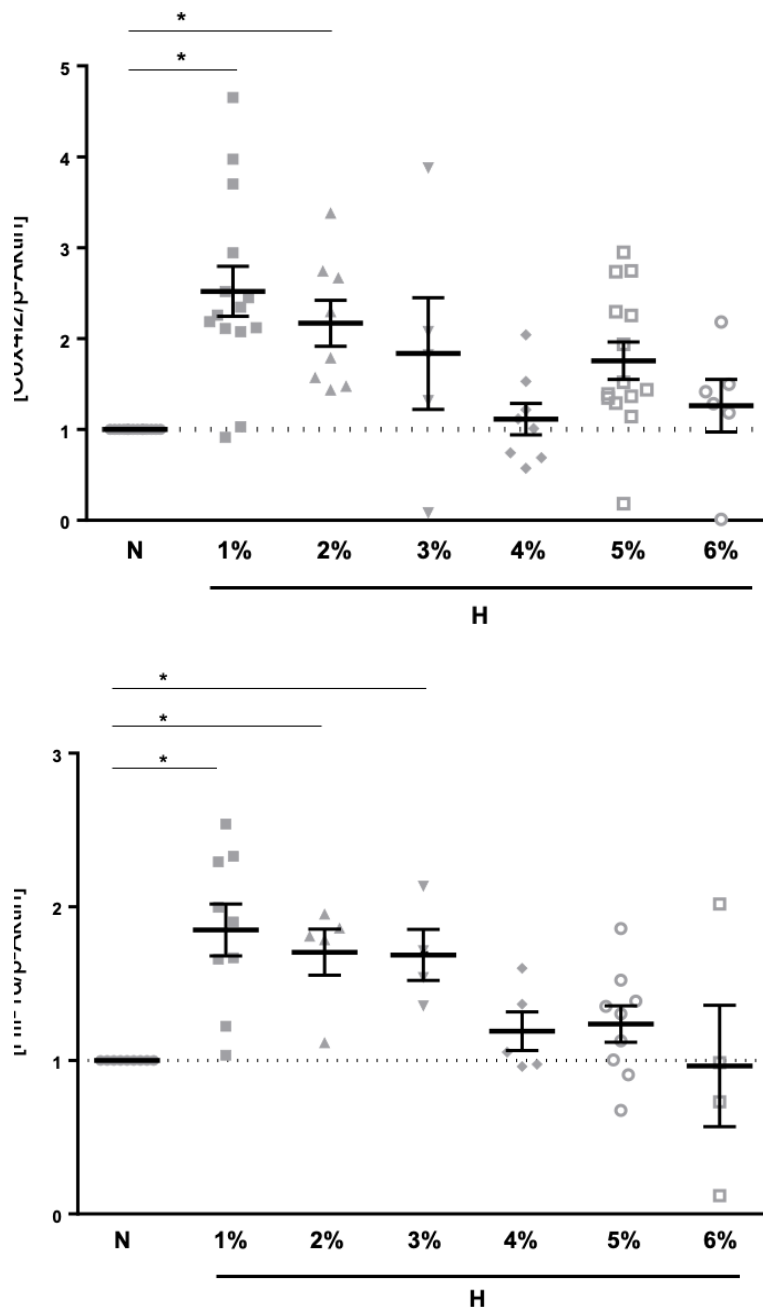


Abbildung 9: Hypoxie-abhängige Proteinmenge von Cox4i2 und Hif-1α.

A: Repräsentativer Western Blot der Cox4i2- und Hif-1α-Proteinmenge in mPASC je zellisolierter Versuchsmaus (n = 4-14) nach 36 h unter Normoxie (N, 21% O₂) oder unterschiedlichen hypoxischen Bedingungen (H, O₂-Konzentration in Prozentzahlen). Als Kontrolle für die Bandenidentifikation von Cox4i2 diene Lungenhomogenat von Cox4i2^{+/+}(WT) und Cox4i2^{-/-}(KO) Mäusen. **B und C:** Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) zur Kontrolle (Normoxie) sind mit einem * dargestellt. Die hypoxischen Werte sind auf die jeweilige normoxische Kontrolle bezogen.

3.1.2 Einfluss der O₂-Konzentration auf die mRNA-Expression von Cox4i2

Aufgrund der Hypoxie-induzierten Hochregulation der Proteinmenge von Cox4i2, wurden auch potentielle Veränderungen der Genexpression von Cox4i2 mit gleichem experimentellem Aufbau untersucht.

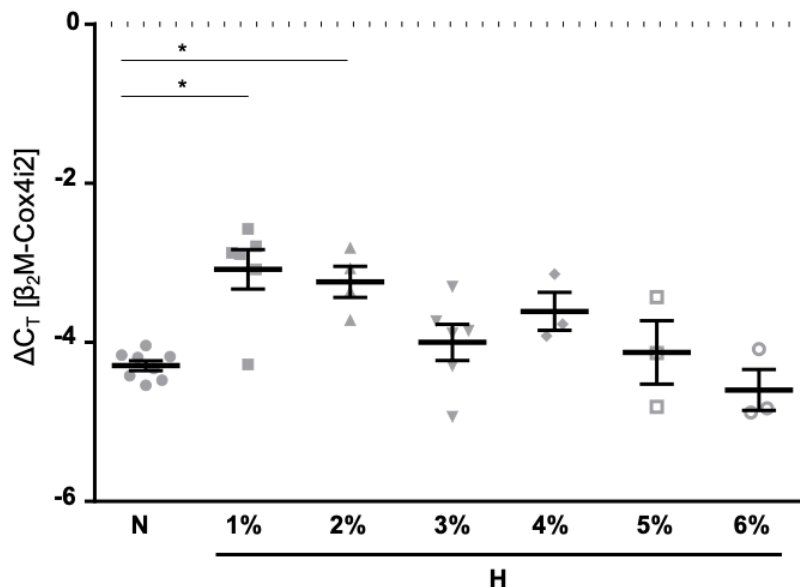


Abbildung 10: Hypoxie-abhängige mRNA-Expression von Cox4i2.

Quantitative real-time PCR der Cox4i2-mRNA-Expression in mPASC je zellisolierter Versuchsm Maus (n = 3-7) nach 36 h unter Normoxie (N, 21% O₂) oder verschiedenen hypoxischen Bedingungen (H, O₂-Konzentration in Prozentzahlen). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) zur Kontrolle (Normoxie) sind mit einem * gekennzeichnet.

Eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von Cox4i2 wurde bei 1% und 2% O₂-Konzentration festgestellt. Mit steigender O₂-Konzentration erlangte die Cox4i2-mRNA-Expression das normoxische Niveau wieder (Abbildung 10). Sowohl die mRNA- als auch die Proteinmenge von Cox4i2 zeigten eine ähnliche Hypoxie-abhängige Induktion.

3.1.3 Untersuchungen der Abhängigkeit von Cox4i2 und Hif-1α

Die Proteinmenge von Cox4i2 und Hif-1α zeigte eine ähnliche Abhängigkeit von der umgebenden O₂-Konzentration. In einer früheren Studie hatten Fukuda et al. einen möglichen Mechanismus in HeLa-Zellen demonstriert, worüber Hif-1α die Cox4i2-Expression steuert (Fukuda et al. 2007). Daher galt es im nächsten Experiment eine mögliche Abhängigkeit auch in mPASC festzustellen. In zwei verschiedenen Experimenten wurden entweder Hif-1α oder Cox4i2 gezielt ausgeschaltet.

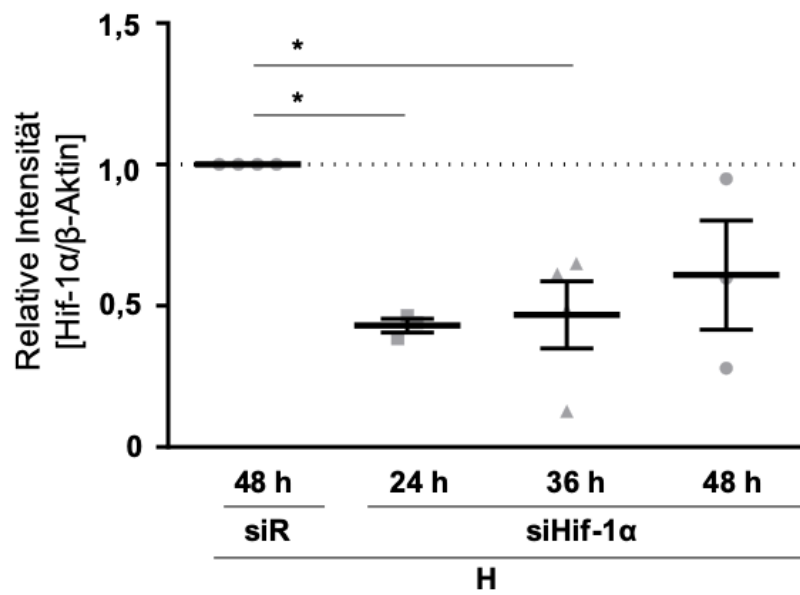
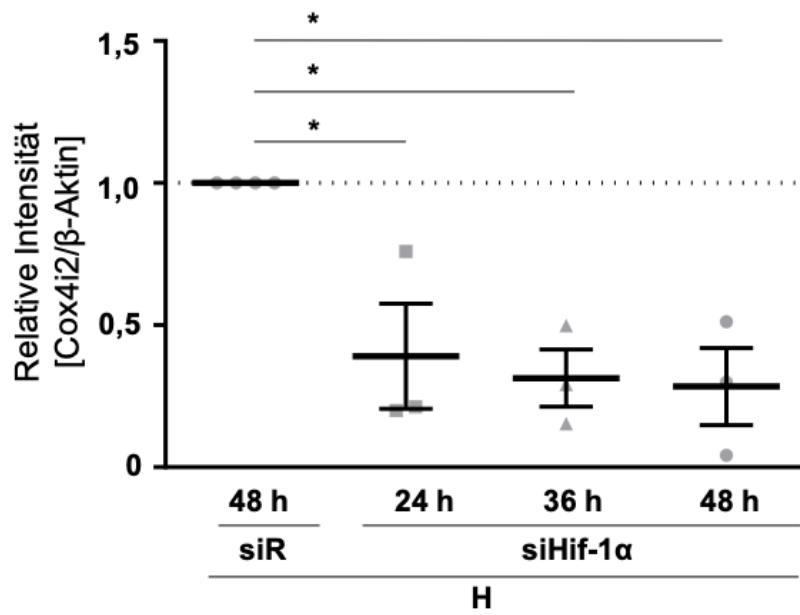
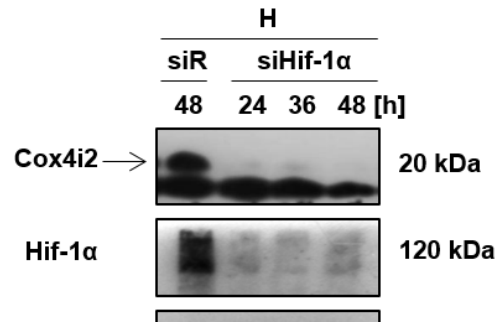


Abbildung 11: Die Cox4i2-Proteinmenge wird durch Hif-1a reguliert.

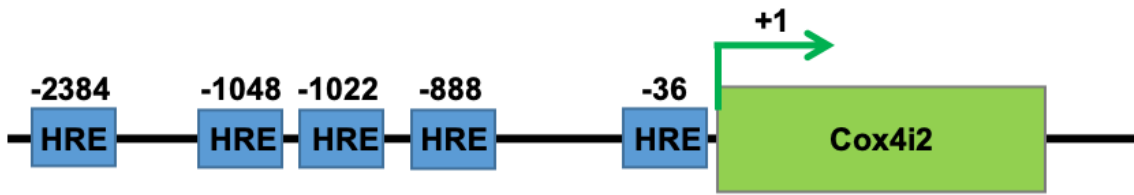
Hif-1 α -*knockdown* mittels siRNA-Transfektion (siHif-1 α ; siR) in mPASC. Untersuchung der Cox4i2 Proteinmenge in hypoxischen (H, 1% O₂) mPASC je zellisierter Versuchsmaus (n = 2-4) nach Hif-1 α *knockdown* für 24, 36 und 48 Stunden (h) im Vergleich zur Kontrolle (siR). A: Repräsentativer Western Blot von B und C. **B und C:** Densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle sind mit einem * gekennzeichnet.

Zunächst wurde der Effekt eines *silencing* des Hif-1 α -Genes auf die Cox4i2-Proteinmenge untersucht. Hierzu wurden mPASC mit siRNA gegen Hif-1 α transfiziert, wodurch die intrazelluläre Proteinmenge von Hif-1 α verringert wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation der transfizierten PASC unter Hypoxie (1% O₂ im SMC-Vollmedium). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit zufälliger siRNA (siR) transfiziert worden waren.

Die Ergebnisse des Versuchs zeigten neben der prominenten Herunterregulation von Hif-1 α , dass der Hif-1 α *knockdown* mit einer deutlich reduzierten Cox4i2 Proteinmenge unter chronischer Hypoxie korrelierte, während in der Kontrollgruppe Cox4i2 unverändert exprimiert wurde (Abbildung 11).

Durch Bindung an *hypoxia responsive elements* (HRE) steuert Hif-1 α die Genexpression einer Vielzahl von Proteinen und damit Signalwegen in der hypoxischen Zelle. Daher wurde die murine Promoterregion von Cox4i2 auf mögliche HREs untersucht. Die Sequenz der HRE wurde den humanen HREs entnommen, welche im EPO-Gen von Semenza et al. (Semenza et al. 1996) beschrieben worden waren. Die Kernbindungssequenz des HRE für Hif-1 α lautet 5⁰-RCGTG-3⁰ und ist in Maus und Mensch identisch (Wenger et al. 2005). In einer Studie von Fukuda et al. wurde die Promoterregion des humanen Cox4i2-Gens auf potentielle HREs untersucht, wobei zwei HREs identifiziert wurden (Fukuda et al. 2007). Bei der Untersuchung der murinen Promotersequenz von Cox4i2 konnten in dieser Arbeit insgesamt fünf potentielle HREs identifiziert werden.

Hif-1 α -Bindungsstellen in der Promotersequenz von Cox4i2



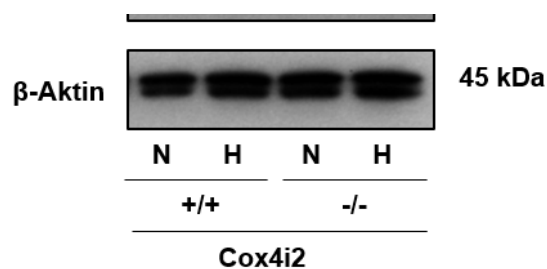
HRE: **cacgtggt**

Core Binding Site: **cggtg**

Cox4i2.

Die untersuchte Gensequenz der murinen Promoterregion von Cox4i2 betrug etwa 2500 Basen. Dabei wurden fünf mögliche *hypoxia responsive elements* (HRE, Kernbindungssequenz: 5⁰-RCGTG-3⁰) identifiziert. Deren Positionen sind graphisch entsprechend ihrer nummerierten Position dargestellt. Das eigentliche Cox4i2-Gen beginnt bei „+1“. Die untersuchte Promotersequenz von Cox4i2 stammte aus dem Genregister der Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84682>.

In einem gegensätzlichen Versuch wurde der Einfluss von Cox4i2 auf die Hif-1 α Proteinmenge untersucht (Abbildung 13). Hierfür wurden Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} mPASC für 36 Stunden unter Hypoxie (1% O₂) oder Normoxie inkubiert. Sowohl in Cox4i2^{+/+} als auch Cox4i2^{-/-} mPASC war die Proteinmenge von Hif-1 α unter chronischer Hypoxie (1% O₂) erhöht. Es war kein Unterschied zwischen Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} festzustellen.



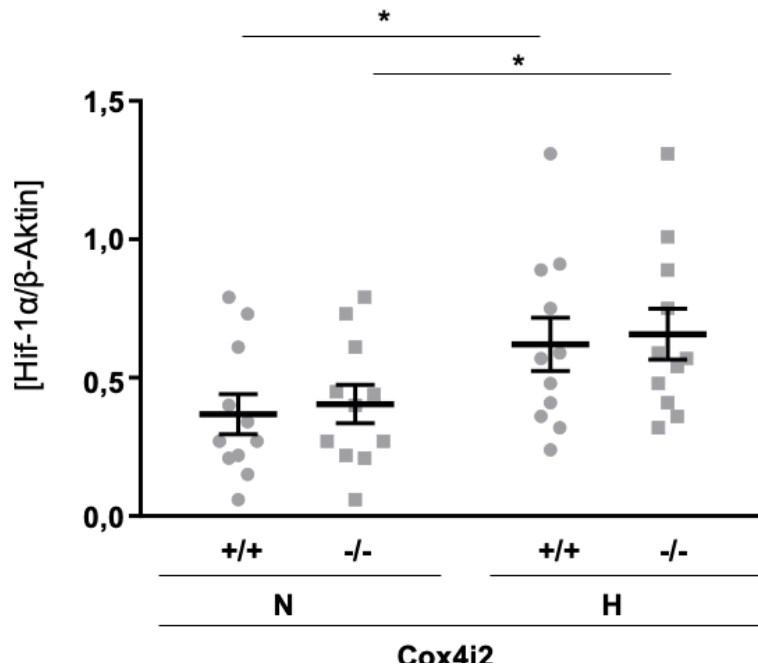


Abbildung 13: Proteinmenge von Hif-1 α in Cox4i2^{-/-} mPASC.

A: Repräsentativer Western Blot **B:** Densitometrische Auswertung der Western Blot-Analyse der Hif-1 α Proteinmenge in Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} mPASC je zellisolierter Versuchsm Maus (n = 11) nach 36 h in Normoxie (N, 21% O₂ in SMC-Vollmedium) und chronischer Hypoxie (1% O₂ in SMC-Vollmedium). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

Die funktionelle Bedeutung von Cox4i2 unter chronischer Hypoxie ist bisher wenig untersucht worden. Im Rahmen der chronischen Hypoxie-induzierten PH spielt die Proliferation von PASC beim pulmonalen *Remodeling* eine wichtige Rolle. Aufgrund der erhöhten Proteinmenge von Cox4i2 unter Hypoxie wurde in einem weiteren Experiment das Proliferationsverhalten von murinen Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} mPASC unter chronischer Hypoxie untersucht.

3.1.4 Untersuchung der Proliferation von Cox4i2^{-/-} mPASC unter chronischer Hypoxie

Cox4i2^{-/-} und Cox4i2^{+/+} mPASC wurde für 120 Stunden Normoxie (21% O₂ in SMC-Vollmedium) oder Hypoxie (1% O₂ in SMC-Vollmedium) ausgesetzt. Die Auswertung des Proliferationsassays zeigte eine signifikant erhöhte Proliferation der Cox4i2^{+/+} mPASC nach chronischer Hypoxie-Exposition (Abbildung 14). Die Cox4i2^{-/-} PASC proliferierten tendenziell unter Hypoxie mehr als in Normoxie. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Proliferation von Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} PASC nach Hypoxie-Exposition ergab sich allerdings nicht.

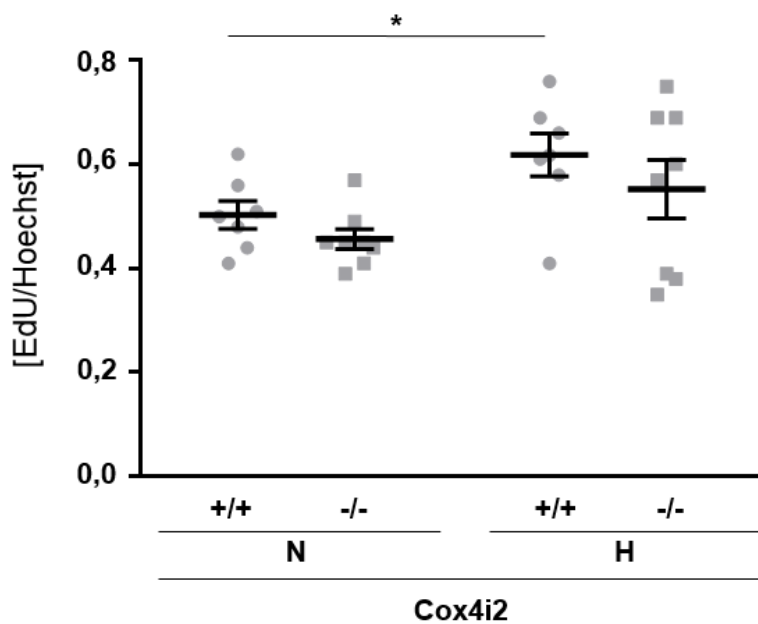
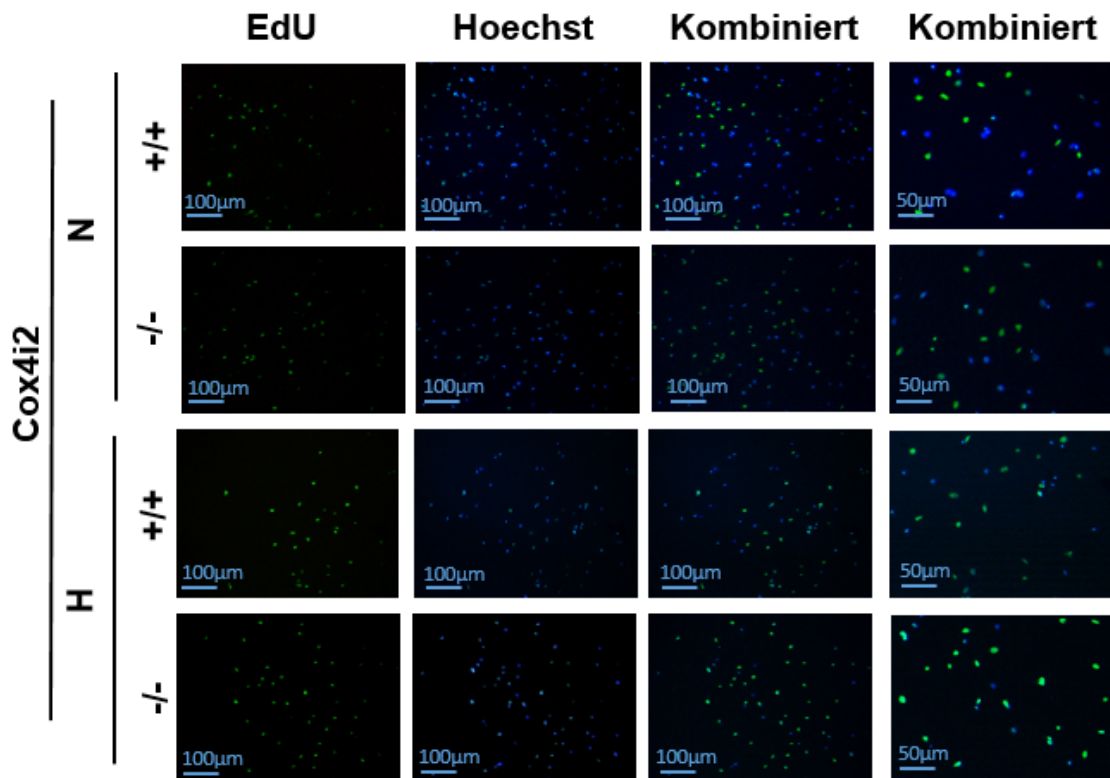


Abbildung 14: Proliferation von Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} mPASC unter Hypoxie.

Es wurde die Proliferation von Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} mPASC je zellisolierter Versuchsmaus (n = 7-8) unter Normoxie (N, 21% O₂ in SMC-Vollmedium) und Hypoxie (H, 1% O₂ in SMC-Vollmedium) untersucht. Der Quotient der EdU- und Hoechst-positiven mPASC ergab die relative Proliferation. A: Repräsentative Darstellung der Färbung der Zellen mit EdU (grün) und Hoechst (blau) sowie der kombinierten Bilder. Die Bilder sind mit einem Maßstab von 100 oder 50 μm gekennzeichnet. B: Statistische Auswertung des Proliferationsassays. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im *post-hoc* Test wurden mit einem * gekennzeichnet. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der *in vitro* Versuche eine Hochregulation der Proteinmenge von Cox4i2 unter Hypoxie, die mit der Proteinmenge von Hif-1 α korrelierte. Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} mPASCs zeigten ein vergleichbares Proliferationsverhalten unter Normoxie und chronischer Hypoxie. Zur weiteren Untersuchung der (patho-)physiologischen Funktion von Cox4i2 im Gesamtorganismus wurden *in vivo* Experimente durchgeführt.

3.2 *in vivo*-Experimente

In vorangegangenen *in vivo* Studien konnte ein Verlust der HPV in Cox4i2^{-/-} Mäusen unter akuter Hypoxie festgestellt werden (Huttemann et al. 2012, Sommer et al. 2017). Ziel dieser Arbeit war es die mögliche pathophysiologische Bedeutung von Cox4i2 bei der Hypoxie-induzierten PH bei Mäusen zu untersuchen. Dafür wurden Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäuse 28 Tage lang Hypoxie (10% O₂-Luftkonzentration) ausgesetzt. Eine Kontrollgruppe befand sich für denselben Zeitraum in normoxischer Raumluft. In früheren Studien zeigten Wildtyp-Mäuse nach dreiwöchiger hypoxischer Exposition Veränderung der Gefäße sowie die Manifestation einer PH (Roth et al. 2009).

3.2.1 Echokardiographische Untersuchungen

Verschiedene echokardiographische Parameter zur Bestimmung der Herzfunktion und als Korrelat für die Entwicklung einer PH wurden in den Mäusen nach 27 Tagen hypoxischer/normoxischer Exposition gemessen. Diese Messungen erfolgten mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. med. vet. Simone Kraut und Frau Karin Quanz.

Die TAPSE korreliert mit der systolischen rechtsventrikulären Funktion, welche im Rahmen der pulmonalen Hypertonie eingeschränkt sein kann (Vonk Noordegraaf et al. 2011). Nach Beendigung der Hypoxie-Exposition zeigte sich eine Hypoxie-abhängige Reduktion der TAPSE in beiden Genotypen. Allerdings ergab die *post-hoc* Analyse nur innerhalb der Cox4i2^{-/-}-Versuchsgruppen einen signifikanten Unterschied (Abbildung 15). Dort war die TAPSE nach Hypoxie-Exposition mit 0,85 mm (\pm 0,04 mm) gegenüber 1,12 mm (\pm 0,09 mm) in der normoxischen Cox4i2^{-/-} Versuchsgruppe signifikant reduziert. Zwischen Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen bestand kein Unterschied bezüglich des Hypoxie-Effektes auf die veränderte TAPSE („Interaktion“).

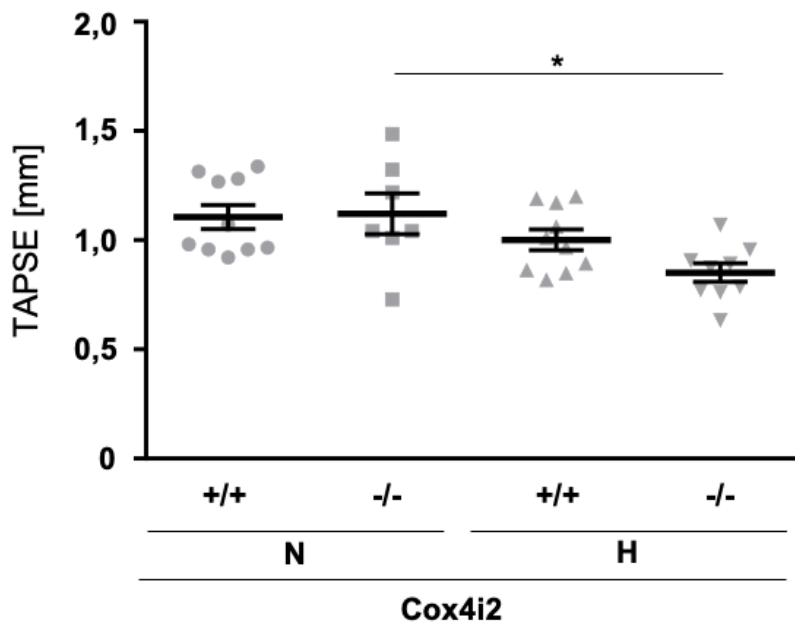


Abbildung 15: TAPSE (*Tricuspid annular plane systolic excursion*) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.

Die TAPSE wurde 27 Tage nach normoxischer (N, 21% O₂ in Raumluft) oder hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumluft) Exposition von Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen echokardiographisch in Millimeter (mm) gemessen. Auswertung der TAPSE in beiden Genotypen (n = 6-10). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

Als weiterer Parameter wurde der PAT/PET-Quotient bestimmt. Dieser hatte sich als wichtiger nicht-invasiver Parameter in der Beurteilung der PH herausgestellt (Yared et al. 2011). Ähnlich wie bei der TAPSE hatte die Hypoxie-Exposition insgesamt einen signifikanten Effekt auf beide Genotypen. Nach Hypoxie-Exposition war der PAT/PET-Quotient in beiden Genotypen signifikant im Vergleich zur normoxischen Kontrolle reduziert. Interessanterweise war der Effekt des Genotyps ebenso signifikant, d.h. dass die Cox4i2^{-/-} Versuchsmäuse insgesamt einen geringeren PAT/PET-Quotienten als die Cox4i2^{+/+} aufwiesen (Abbildung 16).

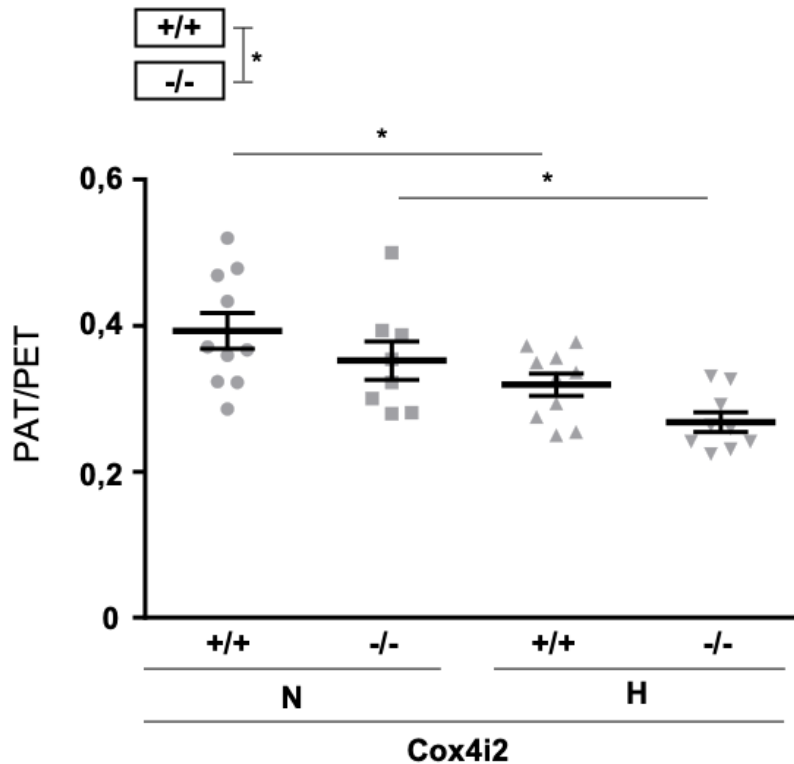


Abbildung 16: PAT/PET-Quotient nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.

Nach 27 Tage normoxischer (N, 21% O₂ in Raumluft) oder hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumluft) Exposition von Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen, wurde echokardiographisch die *pulmonary acceleration time* (PAT) und *pulmonary ejection time* (PET) bestimmt und der Quotient gebildet. Auswertung des PAT/PET-Quotienten in beiden Genotypen (n = 8-9). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Zudem zeigte die *Two-Way ANOVA* Analyse einen signifikanten Effekt des Genotyps auf den PAT/PET-Quotienten. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

Im Rahmen der PH kommt es zu einer erhöhten Nachlast des rechten Ventrikels. Das Herz reagiert auf die chronische Druckbelastung zunächst mit einer Hypertrophie der rechtsventrikulären Muskulatur (Schermyly et al. 2011). Weiterhin gibt es Hinweise, dass das rechtsventrikuläre *Remodeling* möglicherweise unabhängig vom mPAP ist (Ball et al. 2014). Über die Funktion von Cox4i2 innerhalb des Myokards ist bisher wenig bekannt. Um daher die morphologischen Veränderungen am rechten Ventrikel festzustellen wurde zunächst die rechtsventrikuläre Wandstärke (RVWT) echokardiographisch gemessen.

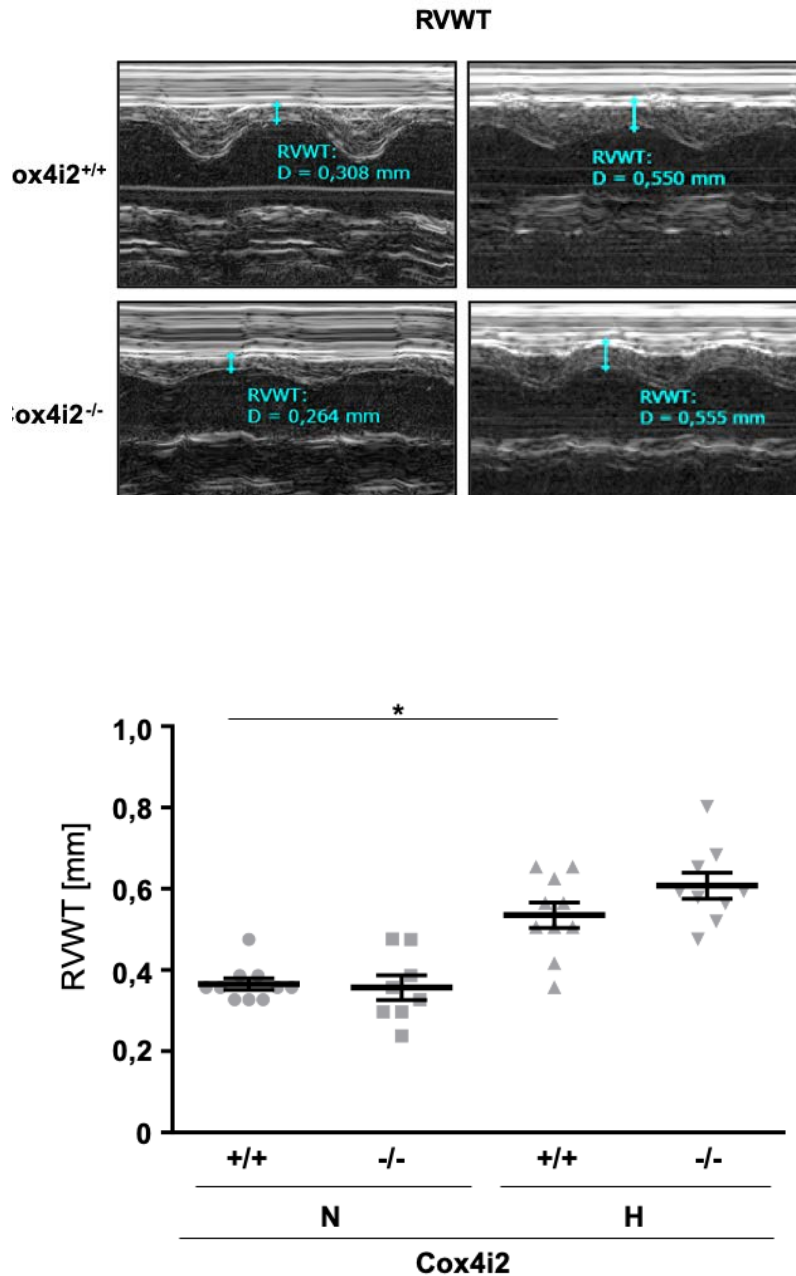


Abbildung 17: RVWT (Right ventricular wall thickness) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.

A: Repräsentative echokardiographische Messungen der RVWT (in Millimeter, mm) einer Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Versuchsmaus nach 27 Tagen normoxischer (N, 21% O₂ in Raumluft) oder hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumluft) Exposition. Wandstärke (D in mm) und Messmarkierung sind in die Bilder eingetragen. **B:** Auswertung der RVWT der Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen (n = 7-10). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

Beide Genotypen zeigten, nach Hypoxie-Exposition, echokardiographisch ein ähnliches kardiales *Remodeling* mit Hypertrophie des rechten Ventrikels (Abbildung 17). Die Wanddicke der Cox4i2^{+/+} Versuchsmäuse nahm von durchschnittlich 0,36 mm (± 0,01

mm) auf 0,54 mm (\pm 0,03 mm) zu. Bei den *Cox4i2*^{-/-} Versuchsmäusen nahm die Wanddicke von 0,36 mm (\pm 0,03 mm) auf 0,61 mm (\pm 0,03 mm) zu. Es wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Genotyps festgestellt.

Aufgrund der morphologischen Veränderungen am Herzen, die der Kompensation des erhöhten mPAPs dienen, wurden zur weiteren Charakterisierung der Herzleistung der *Cardiac Output* (CO) und der auf das Gewicht bezogene kardiale Index bestimmt (Abbildung 18 und Abbildung 19). Letzterer war insofern interessant, da von Hüttemann et al. vorher beschrieben war, dass die *Cox4i2*^{-/-} Mäuse insgesamt ein niedrigeres Körpergewicht als die Wildtyp-Mäuse besitzen. Somit konnte eine bessere Vergleichbarkeit der Herzleistung beider Genotypen erzielt werden (Hüttemann et al. 2012).

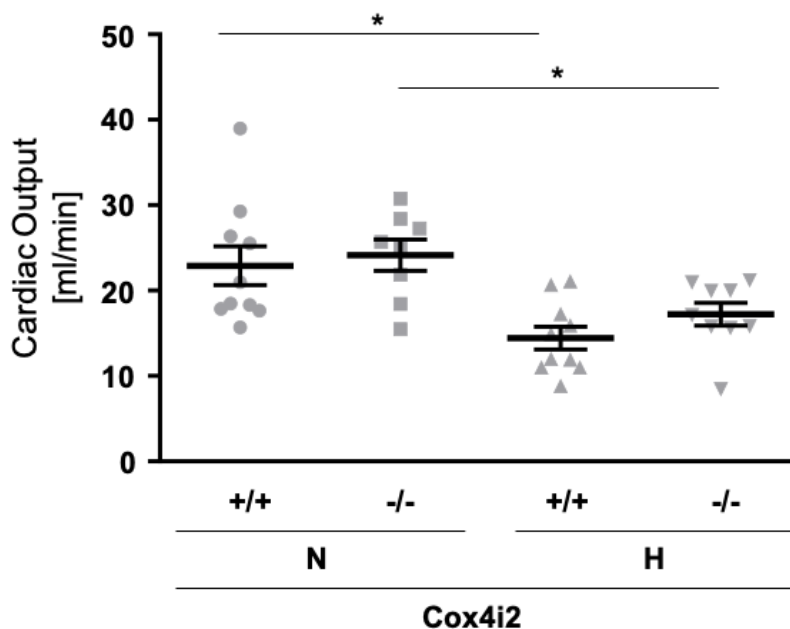


Abbildung 18: Kardiale Auswurfleistung (*Cardiac Output*, CO) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.

Der *Cardiac Output*, gemessen in Milliliter pro Minute (ml/min), wurde nach 27 Tagen normoxischer (N, 21% O₂ in Raumluft) oder hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumluft) Exposition von *Cox4i2*^{+/+} und *Cox4i2*^{-/-} Mäusen echokardiographisch bestimmt. Auswertung des CO in beiden Genotypen (n = 8-10). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

Die Auswertung dieser beiden Parameter ergab, dass Hypoxie in beiden Genotypen einen Effekt auf die kardiale Auswurfleistung hatte. Der Genotyp machte keinen Unterschied.

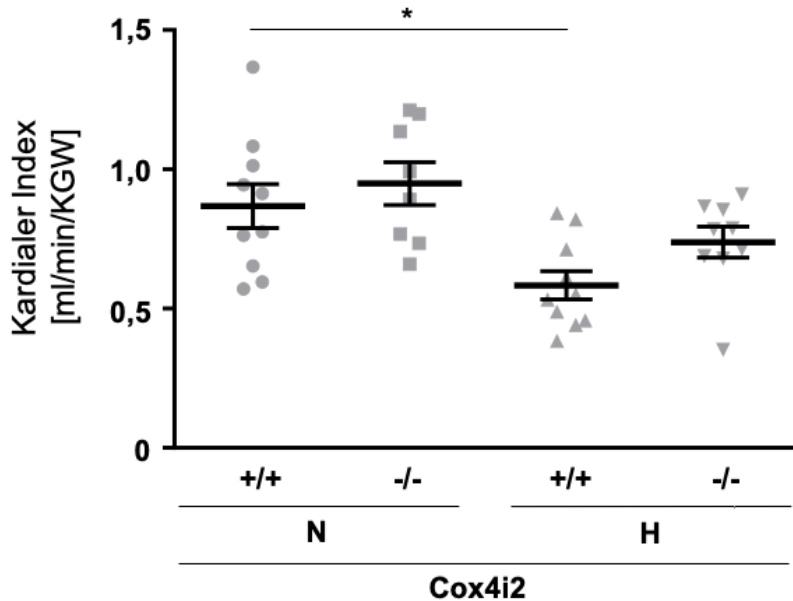


Abbildung 19: Kardialer Index (Cardiac Index, CI) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.

Der kardiale Index beschreibt das gewichtsadaptierte kardiale Auswurfvolumen und wird in Milliliter pro Minute pro Kilogramm (ml/min/kg) angegeben. Die echokardiographische Messung erfolgte nach 27 Tagen normoxischer (N, 21% O₂ in Raumluft) oder hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumluft) Exposition der Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen. Auswertung des kardialen Indexes in beiden Genotypen (n = 8-10). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

Sowohl der CO als auch der kardiale Index waren gemäß der *post-hoc* Analyse, innerhalb der Cox4i2^{+/+} Versuchsmäuse, nach Hypoxie-Exposition, signifikant reduziert. Bei den Cox4i2^{-/-} Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Zur Komplettierung der Untersuchung der kardialen Leistung wurde zusätzlich die linksventrikuläre EF bestimmt, um einen Effekt der Hypoxie-Exposition auf den linken Ventrikel zu untersuchen. Es ergaben sich keine Unterschiede durch die Behandlung oder den Genotyp.

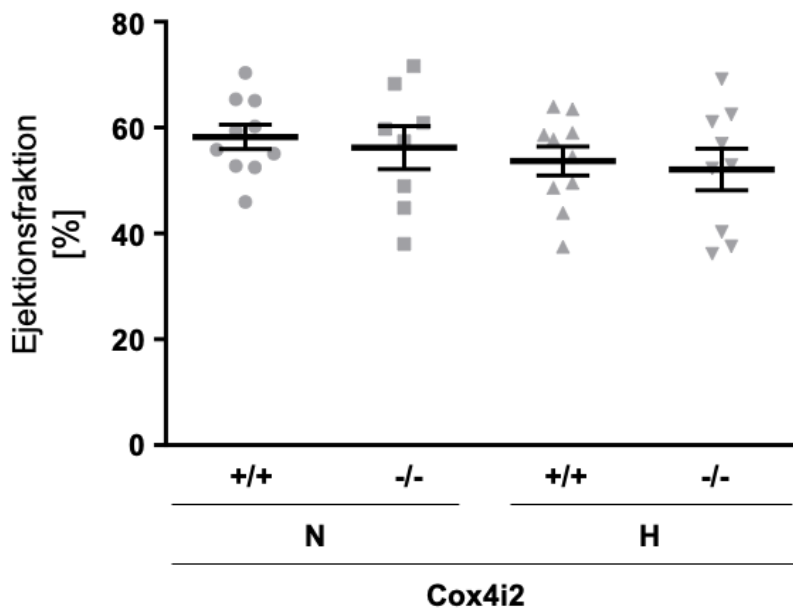


Abbildung 20: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, angegeben in Prozent (%), wurde nach 27 Tagen normoxischer (N, 21% O₂ in Raumlufte) und hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumlufte) Exposition in Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen echokardiographisch bestimmt. Auswertung der EF in beiden Genotypen (n = 7-10). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

3.2.2 Häodynamische Untersuchungen

Die echokardiographische Beurteilung der rechtsventrikulären Funktion und Morphologie gewinnt zunehmend an Bedeutung in der Diagnostik der PH, insbesondere da es sich um eine nicht-invasive Diagnostik handelt. Jedoch bleibt die invasive Messung aktuell die einzige Möglichkeit die Drücke in der pulmonalen Strombahn und damit auch den pulmonalvaskulären Widerstand als definitionsbestimmendes Kriterium für die PH zu messen. In der Maus besteht aktuell die Möglichkeit mittels Millar-Katheter den RVSP als Korrelat für den PAP zu bestimmen.

Es zeigte sich in allen hypoxischen Versuchsgruppen ein gegenüber der normoxischen Kontrolle signifikant erhöhter RVSP. Im Vergleich der beiden Genotypen besaßen die Cox4i2^{-/-} Mäuse einen insgesamt signifikant höheren RVSP als die Cox4i2^{+/+} Mäuse. Der mittlere RVSP der Cox4i2^{+/+} Mäusen lag mit 35,9 mmHg (± 1,7 mmHg) tendenziell niedriger als der mittlere RVSP der Cox4i2^{-/-} mit 43,7 mmHg (± 2,5 mmHg) nach 28-tägiger Hypoxie-Exposition (Abbildung 21). Ein signifikanter Unterschied der Genotypen innerhalb der hypoxischen Versuchsgruppe bestand aber nicht.

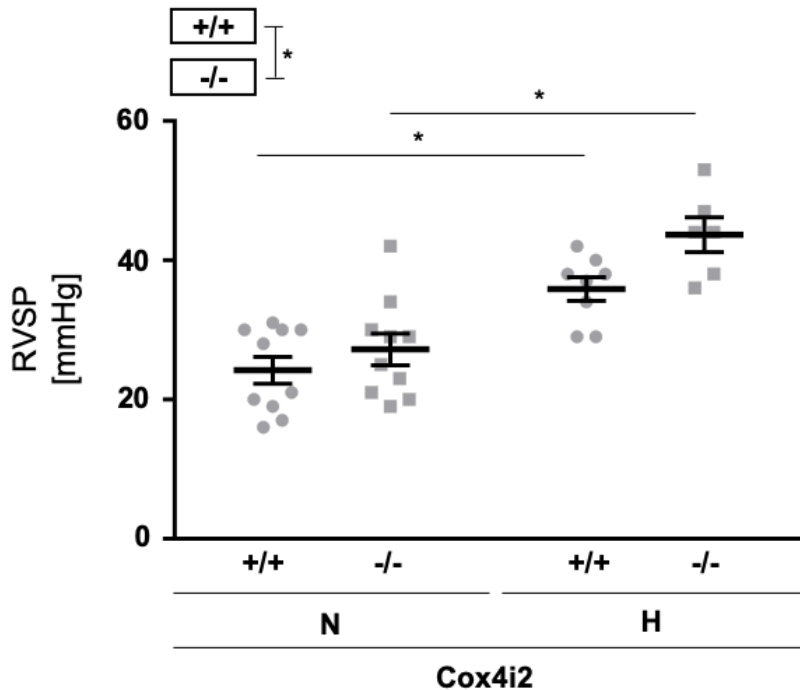


Abbildung 21: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (*Right ventricular systolic pressure*, RVSP) nach 28 Tagen Normoxie/Hypoxie.

Der RVSP, gemessen in Millimeter-Quecksilbersäule (mmHg), wurde nach 28 Tagen normoxischer (N, 21% O₂ in Raumlaut) oder hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumlaut) Exposition in Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen mittels Millar-Katheter bestimmt. Abbildung zeigt die Gesamtauswertung des veränderten RVSP in beiden Genotypen (n = 6-10) nach Hypoxie-Exposition. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Zudem zeigte die *Two-Way* ANOVA Analyse einen signifikanten Effekt des Genotyps auf den RVSP. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

In einer weiteren Messung wurde zudem der system-arterielle Druck (SAP) in der *A. carotis* gemessen. Diese Untersuchung diente vornehmlich der Kontrolle, um allgemeine, durch den Genotyp oder die Behandlung bedingte, systemische Kreislaufveränderungen auszuschließen, die auch Einfluss auf die pulmonale Strombahn haben könnten. Wie Abbildung 22 zeigt, blieb der SAP mit nahezu konstanten Werten in beiden Versuchsgruppen unbeeinflusst.

Nach Organentnahme wurde die Herzratio zur weiteren Charakterisierung des kardialen *Remodelings* bestimmt (Abbildung 23).

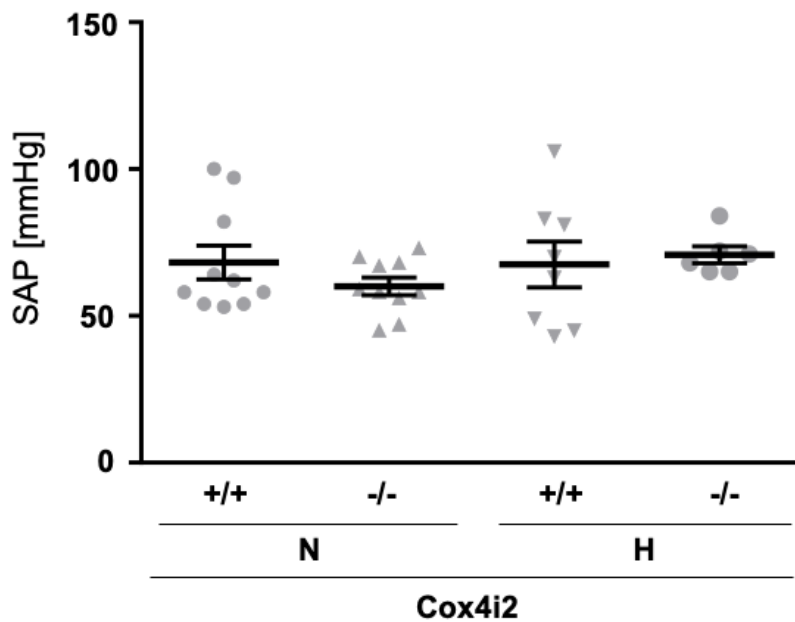


Abbildung 22: System-arterielle Druck (Systemic arterial pressure, SAP) nach 28 Tagen Normoxie/Hypoxie.

Der SAP, gemessen in Milliliter-Quecksilbersäule (mmHg), wurde nach 28 Tagen normoxischer (N, 21 O₂ in Raumluft) und hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumluft) Exposition in Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen mittels Millar-Katheter bestimmt. Auswertung des SAP in beiden Genotypen (n = 6-10). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

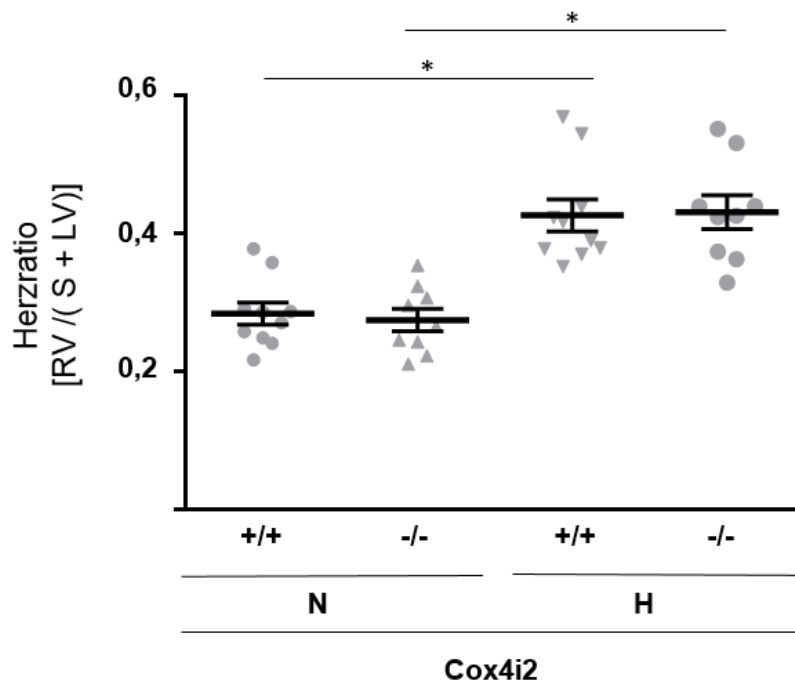


Abbildung 23: Herzratio (HR) nach 28 Tagen Normoxie/Hypoxie.

Die Herzratio wurde nach 28 Tagen normoxischer (N, 21% O₂ in Raumluft) oder hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumluft) Exposition von Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen anhand der entnommenen Herzen bestimmt.

Auswertung der HR in beiden Genotypen (n = 9-10). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. Eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

Die echokardiographisch nachgewiesene rechtsventrikuläre Hypertrophie konnte mithilfe der Herzratio bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutliche Gewichtszunahme des rechten Ventrikels und somit signifikant erhöhte Herzratio in der hypoxischen Versuchsgruppe im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe.

Eine weitere Hypoxie-bedingte Veränderung fand sich in der Bestimmung des Hämatokrits (Hkt). Insgesamt war der Hkt der hypoxischen Versuchsgruppen gegenüber der normoxischen Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 24). Die hypoxischen *Cox4i2*^{-/-} Mäusen zeigten die höchsten Hkt-Werte mit 62,4% ($\pm 0,9\%$). Diese waren gegenüber der hypoxischen *Cox4i2*^{+/+} Mäusen, dessen Hkt infolge der Hypoxie-Exposition auf 56,1% ($\pm 1,5\%$) anstieg, signifikant höher. Hierbei war eine positive Interaktion und ein Einfluss des Genotyps auf die Höhe des Hkt nachweisbar.

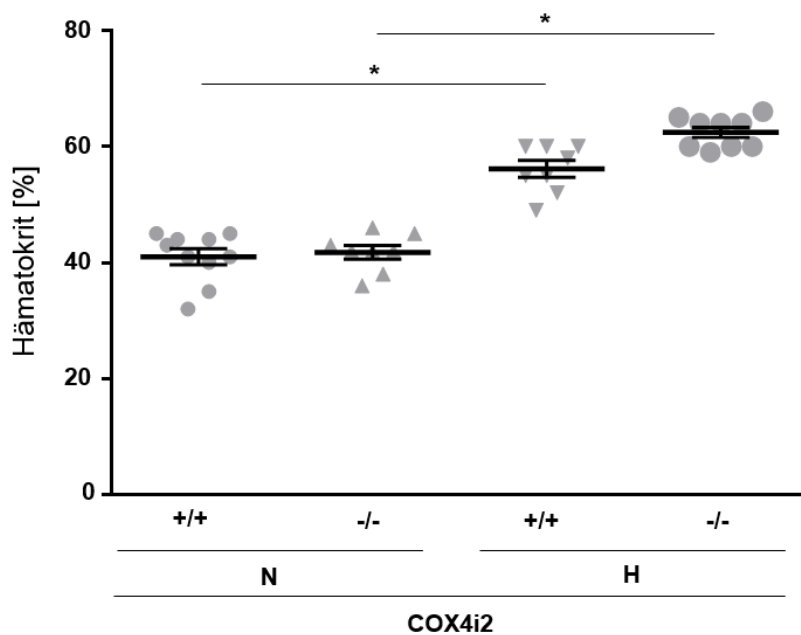


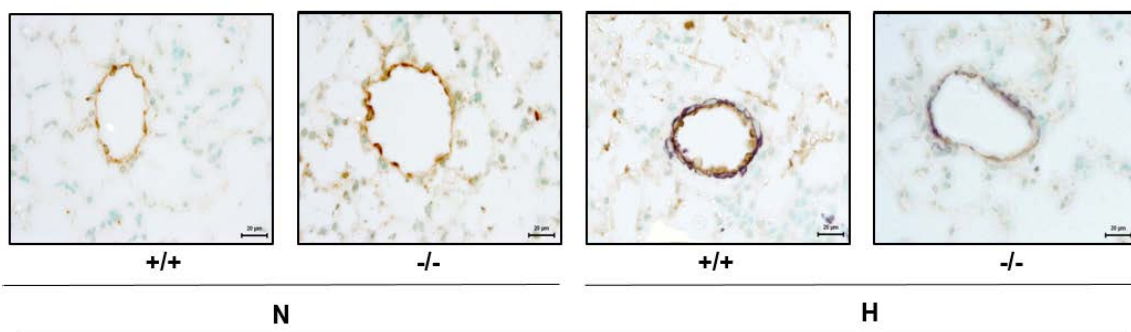
Abbildung 24: Hämatokrit (Hkt) nach 28 Tagen Normoxie/Hypoxie.

Der Hämatokrit, angegeben in Prozent (%), wurde nach 28 Tagen normoxischer (N, 21% O₂ in Raumluft) und hypoxischer (H, 10% O₂ in Raumluft) Exposition von *Cox4i2*^{+/+} und *Cox4i2*^{-/-} Mäusen im Blut bestimmt. Auswertung des Hkt in beiden Genotypen (n=6-10). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im *post-hoc* Test sind mit einem * gekennzeichnet. *Two-Way* ANOVA Analyse ergab neben einem signifikanten Effekt der Hypoxie auch einen Effekt des Genotyps auf den Hkt. Insgesamt wurde eine positive Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung festgestellt.

3.2.3 Immunohistochemische Untersuchungen

Um einen Einfluss von Cox4i2 auf das pulmonalvaskuläre *Remodeling* festzustellen, wurden die Lungen immunhistochemisch ausgewertet. Der Muskularisierungsgrad der kleinen Gefäße (20-70 µm) lag hierbei im Fokus, da diese den Hauptteil der präkapillären Gefäßen darstellen und hauptsächlich an der Erhöhung des pulmonalen Widerstands beteiligt sind. Sie sind zudem von Prozessen wie der Neo-Muskularisierung betroffen (Pak et al. 2007). Abbildung 25A zeigt exemplarisch die Zunahme der Muskularisierung der kleinen Gefäße nach chronischer Hypoxie-Exposition.

Die Auswertung des Muskularisierungsgrades ergab, dass der Anteil der nicht-muskularisierten Gefäße in beiden Genotypen nach Hypoxie-Exposition gegenüber den normoxischen Kontrollgruppen signifikant reduziert war. Der Anteil der nicht-muskularisierten Gefäße der Cox4i2^{-/-} Mäuse war jedoch mit 41,5% (± 4,6%) tendenziell weniger vom *Remodeling* betroffen als die der Cox4i2^{+/+} Mäusen, dessen Anteil an nicht-muskularisierten Gefäßen sich auf 30,5% (± 2,9%) reduzierte. Der Anteil der teilweise-muskularisierten Gefäße war in beiden hypoxischen Genotypen etwa gleich groß. Innerhalb der hypoxischen Versuchsgruppe der Cox4i2^{+/+} Mäuse erhöhte sich der Anteil der voll-muskularisierten Gefäße signifikant auf 25,9% (± 3,7%), während die hypoxischen Cox4i2^{-/-} Mäuse eine geringere Voll-Muskularisierung mit 16,9% (± 2,7%) entwickelten. Dieser Unterschied war im direkten Vergleich der hypoxischen Genotypen signifikant (Abbildung 25).



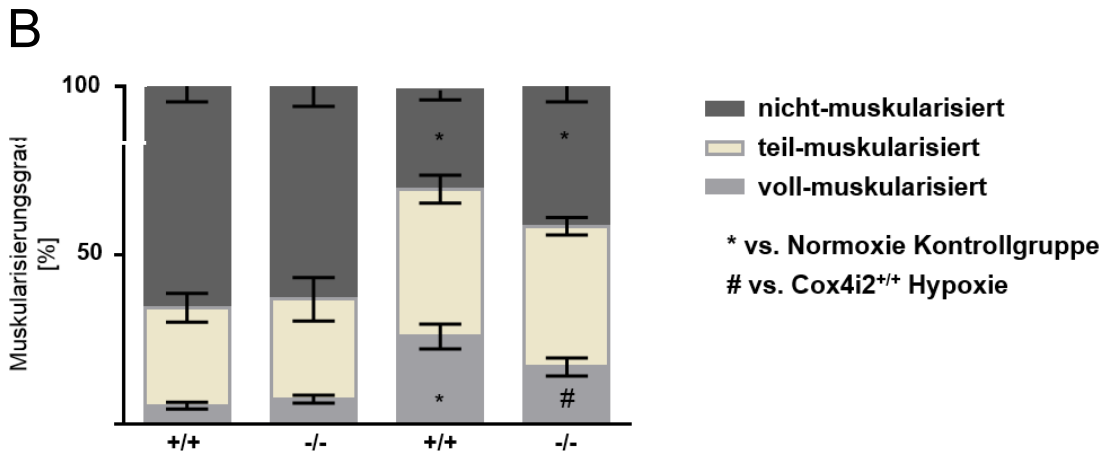


Abbildung 25: Effekt der chronischen Hypoxie auf den Muskularisierungsgrad der kleinen pulmonalen Gefäße.

Der Muskularisierungsgrad der kleinen Gefäße (20-70 µm) wurde immunhistochemisch nach 28 Tagen normoxischer (N, 21% O₂) oder hypoxischer (H, 10% O₂) Exposition von Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} Mäusen ermittelt. **A:** Repräsentative immunhistochemische Bilder. Bräunliche Färbung (von-Willebrand Faktor) markiert das Endothel. Die Media ist durch eine lila Färbung (α-Aktin) gekennzeichnet. Der eingetragene Maßstab beträgt 20 µm. **B:** Auswertung des Muskularisierungsgrad der kleinen Gefäße (20-70 µm) je Lungenschnitt pro Versuchsmouse (n = 7-10). Die Einteilung des Muskularisierungsgrad ist unterteilt in „nicht“ (< 5%), „teilweise“ (5-70%), „voll“ (> 70%). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im *post-hoc* Test sind mit einem * bzw. # gekennzeichnet.

Insgesamt konnte in den *in vivo* Versuchen kein protektiver Effekt des Cox4i2 *knockouts* auf die Entwicklung einer PH nachgewiesen werden. Sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie zeigten die Cox4i2^{-/-} Mäuse einen leicht höheren RVSP als die Cox4i2^{+/+} Mäuse bei ähnlichem kardialen *Remodeling*. Der *knockout* zeigte einen spezifischen Effekt unter Hypoxie auf den Hkt und das pulmonalvaskuläre *Remodeling*, wobei ersteres in Cox4i2^{-/-} Mäusen signifikant erhöht und letzteres im Vergleich zu den Cox4i2^{+/+} Mäusen signifikant verringert war.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die HPV und das vaskuläre *Remodeling* sind maßgeblich an der Entwicklung der Hypoxie-induzierten PH beteiligt. Die zugrundeliegenden Signalwege scheinen dabei in enger Beziehung zur mitochondrialen Atmungskette und der Produktion von Sauerstoffradikalen zu stehen. Cox4i2 ist in diesem Zusammenhang als Hypoxie-abhängig exprimierte Isoform 2 der Untereinheit 4 des Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette in PASMC und als Regulator der HPV in akuter Hypoxie identifiziert worden (Sommer et al. 2017). Diese Arbeit untersuchte den Effekt von Cox4i2 auf die Lungen- und Herzfunktion von Versuchsmäusen unter chronischer Hypoxie. Zusätzlich wurde durch *in vitro* Experimente in primären mPASMCs die Interaktion von Cox4i2 mit Hif-1 α sowie das Proliferationsverhalten von Cox4i2^{-/-} mPASMCs unter Hypoxie untersucht. Es zeigte sich eine Hypoxie-abhängige Proteinmenge von Cox4i2, welche mit sinkender O₂-Konzentration stieg. Zudem schien die Cox4i2-Proteinmenge von der Anwesenheit von Hif-1 α abhängig zu sein. Cox4i2^{-/-} mPASMC zeigten nach chronischer Hypoxie-Exposition eine unveränderte Proliferationsrate gegenüber Cox4i2^{+/+} mPASMC. Allerdings zeigten die hypoxischen Cox4i2^{-/-} Mäuse in den *in vivo* Versuchen ein geringeres vaskuläres *Remodeling* im Vergleich zu den Cox4i2^{+/+} Mäusen nach Hypoxie-Exposition. Die hämodynamischen Messungen konnten bei allen untersuchten Mäusegruppen die Entwicklung einer ähnlichen PH nach chronischer Hypoxie-Exposition nachweisen. Unterschiede ergaben sich in der Hypoxie-induzierten Hkt-Erhöhung und dem basalen und Hypoxie-induzierten RVSP.

4.2 Kritische Betrachtung der verwendeten Modelle und Methoden

Die Pathogenese der PH ist ein multifaktorieller und somit komplexer Prozess, welcher vereinfacht durch die pathologische Trias von Vasokonstriktion, Thrombose und vaskulärem *Remodeling* charakterisiert werden kann (Schermyly et al. 2011). Aufgrund der bereits in der Einleitung beschriebenen Komplexität der Pathogenese der PH sind zur Simulation vor allem *in vivo* Tiermodelle geeignet. Insbesondere das Mausmodell mit der Möglichkeit der Generation von *knockout* Mäusen erlaubte in dieser Arbeit die Beurteilung der Auswirkung eines globalen (d.h. in allen Zelltypen) Cox4i2-Verlustes auf die PH. Reine *in vitro* Experimenten hätten systemische Faktoren, wie z.B. endokrinologische, metabolische und inflammatorische Einflüsse sowie die Interaktion

von Herz und Lungengefäßen nicht ausreichend berücksichtigt. Trotzdem sind *in vitro* Experimente für das bessere Verständnis molekularer Prozesse einzelner Zelltypen wichtig und wurden für diese Untersuchungen angewendet.

4.2.1 Das Mausmodell

Das hier verwendete Modell der Hypoxie-induzierten PH ist eines der am häufigsten genutzten *in vivo* Modelle der PH und simuliert einzelne Aspekte der verschiedenen Formen der PH. Es dient insbesondere als Modell für die humane Hypoxie-induzierte PH (Gruppe 3 nach WHO-Klassifikation). Alternativ wird auch das Monocrotalin-Modell der PH verwendet, welches auf einer intraperitonealen Injektion von Monocrotalin, einem Pflanzentoxin, beruht und eine Entzündungsreaktion, durch direkte Schädigung des Endothels, verursacht. Die Entzündung induziert wiederum das vaskuläre *Remodeling* der Lungengefäße (Pak et al. 2007). Dieses Modell hat allerdings den Nachteil, dass es eine stark entzündliche Komponente hat und nur in Ratten angewendet werden kann, so dass eine Untersuchung von *Cox4i2* in *knockout* Mäusen nicht möglich gewesen wäre. Darüber hinaus sollte aufgrund der Vorarbeiten zur akuten Hypoxie speziell der Effekt der chronischen Hypoxie in *Cox4i2*^{-/-} Mäusen untersucht werden. Allerdings hat das Modell der chronischen Hypoxie-induzierten PH auch Limitationen, welche beachtet werden müssen. Hierzu gehört beispielsweise die Tatsache, dass in diesem Mausmodell die Versuchstiere keine plexiformen Läsionen entwickeln, was ein wichtiges Merkmal der besonders progressiv verlaufenden PAH des Menschen ist. Somit wird am ehesten eine moderate PH simuliert (Stenmark et al. 2009). Versuchsmäuse zeigen zudem eine geringere Proliferation von PASMC und vaskulärem *Remodeling* im Vergleich mit anderen Tiermodellen, z.B. der Ratte oder jungen Kälbern (Stenmark et al. 2009). Weiterhin scheint das Ausmaß der induzierten PH in Mäusen von weiteren Hypoxie-unabhängigen Faktoren beeinflusst zu werden. So konnte gezeigt werden, dass Lungengefäße junger Mäuse stärker auf Hypoxie reagieren als die von älteren Tieren. Als Ursache dafür kommen nicht abgeschlossene Wachstumsprozesse infrage (Stenmark et al. 2009). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Experimenten mit einem Mäusestamm ist zudem, aufgrund der häufig Mäusestamm-spezifischen genetischen Variabilität, nicht immer auf einen anderen Mäusestamm und nur eingeschränkt auf den Menschen möglich.

Charakteristika des *Cox4i2*-Mäusestamms

Die *Cox4i2*^{-/-} Mäuse wurden erstmals von Hüttemann et al. beschrieben und verschiedene Auffälligkeiten dieses Mäusestamms beobachtet (Hüttemann et al. 2012).

Insbesondere zeigten sich vermehrt granulomatöse Infiltrate in der Lunge mit steigendem Alter bei Cox4i2^{-/-} Mäusen (Huttemann et al. 2012). Aufgrund dessen wurden die in dieser Arbeit genutzten Cox4i2 Mäuse bereits im Alter von 8-12 Wochen für die Experimente verwendet. Weiterhin wurde in der immunhistochemischen Auswertung auf entzündliche Veränderungen geachtet. Infiltrate oder andere inflammatorische Zeichen konnten jedoch nicht beobachtet werden. In der Literatur fanden sich außerdem geschlechtsspezifische Unterschiede von Cox4i2^{-/-} gegenüber den Cox4i2^{+/+} Mäusen (Huttemann et al. 2012). Dies betraf hauptsächlich die weiblichen Cox4i2^{-/-} Mäuse, welche ein geringeres Gewicht (12% Reduktion) und Muskelkraft (14% Reduktion) als die entsprechenden Cox4i2^{+/+} Mäuse aufwiesen. Dies spiegelte sich auch in dem niedrigeren O₂-Gesamtbedarf (8% Reduktion) der weiblichen Cox4i2^{-/-} Mäusen gegenüber der weiblichen Wildtypen wider. Dieser Unterschied war jedoch, wenn man den O₂-Gesamtverbrauch auf das jeweilige Gewicht untersuchte, nicht mehr auffällig (Huttemann et al. 2012). Die Glukosetoleranz war in den weiblichen Cox4i2^{-/-} Mäusen erhöht und es zeigte sich ein niedrigerer Blutzuckerspiegel. Weiterhin besaßen weibliche, sowohl Cox4i2^{+/+} als auch Cox4i2^{-/-} Mäuse, gegenüber den jeweiligen männlichen Mäusen des gleichen Genotyps erhöhte Basallevel an IgE.

Unter Berücksichtigung der spezifischen Charakteristika der Cox4i2^{-/-} Mäuse war das Modell der chronischen Hypoxie-induzierten PH, trotz der beschriebenen Limitationen, ein geeignetes Modell zur weiteren Evaluierung der *in vivo* Funktion von Cox4i2. Insgesamt trägt die vorliegende Arbeit somit zum weiteren Verständnis von Cox4i2 bei. Allerdings müssen Limitationen in der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Spezies und ggf. auch andere Mäusestämme berücksichtigt werden.

4.2.2 Hämodynamische Messungen und Echokardiographie

Druckmesskatheter

Der verwendete Druckmesskatheter (SPR-671, Millar Instruments, Houston, USA) wurde zur invasiven hämodynamischen Druckmessung verwendet. Es wurde neben dem RVSP auch der SAP bestimmt. Die Bestimmung des RVSP mittels Rechtsherzkatheter gilt als der Gold-Standard in der Quantifizierung des PAH im Mausmodell, sofern eine Stenose der Pulmonalklappe ausgeschlossen ist (Ma et al. 2016). Neben der in dieser Arbeit verwendeten und bereits beschriebenen *closed-chest* Methode existiert als Alternative die *open-chest* Methode. Bei dieser wird ein *Conductance*-Katheter verwendet, welcher eine genaue Druck-Volumen-Beziehung und somit eine detailliertere Information über die hämodynamischen Verhältnisse und die

rechtsventrikuläre Funktion darstellen kann (Ma et al. 2016). Zur Verwendung des *Conductance*-Katheters muss allerdings der Mausthorax eröffnet und der Katheter über eine Inzision im rechten Ventrikel eingeführt werden. Infolge der Thoraxeröffnung wird eine aktive Beatmung mittels positivem Beatmungsdruck benötigt. Bei beiden Methoden endet die Untersuchung im Mausmodell mit dem Versterben des Versuchstieres, sodass eine Erhebung von Ausgangswerten nicht möglich ist. Die Vorteile, der in dieser Arbeit verwendeten *closed-chest* Methode lagen vor allem in der geringeren Invasivität und der damit verbundenen Erhaltung einer möglichst physiologischen Ausgangssituation. Im Gegensatz zur *open-chest* Methode wurden die negativen intrathorakalen Drücke nicht verändert, welche Einfluss auf die Herzfüllung und intrapulmonale Hämodynamik haben (Ma et al. 2016). Limitationen der *closed-chest* Methode ergaben sich in der komplexen Handhabung der Instrumente und Sondierung des rechten Ventrikels. Die Untersuchung erfolgte daher durch eine erfahrene Untersucherin, sodass das Risiko für Gefäß- oder Herzperforationen und damit der Verlust von Versuchstieren und verwertbaren Messergebnissen möglichst geringgehalten werden konnte. Aufgrund der Bestimmung des RVSP im rechten Herzventrikel waren nur indirekt Rückschlüsse auf den mPAP möglich. Der RVSP wird durch die rechtsventrikuläre Nachlast bestimmt, welche wiederum von Faktoren wie dem alveolären Druck, der intrapulmonalen Blutverteilung, der Lungenkapazität, des pulmonalen Gefäßwiderstandes, des Hämatokrits und der Herzfunktion abhängt. Daher spiegelt der RVSP den pulmonalvaskulären Widerstand bei bekannter Herzfunktion, die über die Echokardiographie gemessen wurde, wider (Pinsky 2016). Als Einschränkung besteht allerdings die Tatsache, dass RVSP und Herzfunktion nicht gleichzeitig, sondern zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurde. Eine Pulmonalklappenstenose, welche den RVSP beeinflussen kann, wurde durch echokardiographische Untersuchungen ausgeschlossen. Weiterhin musste die Untersuchung in Narkose durchgeführt werden, wodurch eine Beeinträchtigung der gemessenen hämodynamischen Parameter durch applizierte Medikamente nicht vollständig auszuschließen war. Auf diesen Aspekt wird in einem separaten Abschnitt weiter unten ausführlich eingegangen.

Transthorakale Echokardiographie

Mithilfe der transthorakalen Echokardiographie konnten verschiedene Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion ermittelt werden. Diese umfassten die Auswurfleistung, Myokardveränderungen und spezifische Parameter, wie z.B. die TAPSE oder den PAT/PET-Quotienten, welche zur Beurteilung der pulmonalen Hypertonie genutzt wurden.

Ähnlich der Untersuchung beim Menschen ist ein wichtiger Vorteil die nicht-invasive Methodik. Dies ermöglicht auch im Mausmodell die Durchführung von Untersuchungen zu mehreren Zeitpunkten. Dadurch konnten intraindividuelle Veränderungen durch die Hypoxie-Exposition erfasst werden. Weiterhin ließen sich Herzwandbewegungen und Herzmorphologie in Echtzeit am lebenden Organismus beurteilen. Zu den Schwierigkeiten der Methodik gehörten die kleine Herzgröße, die hohe Herzfrequenz und die Rotation der Herzachse im Mausmodell. Aufgrund Letzterem ergibt sich eine eingeschränkte Beurteilbarkeit des rechten Ventrikels, da die Einstellung des benötigten apikalen Schallfensters durch die vertikale Ausrichtung der Herzachse im Thorax erschwert ist (Scherrer-Crosbie et al. 2008). Der rechte Ventrikel hat zudem eine komplexe halbmondförmige und flache Konfiguration. Dadurch wird eine quantitative und funktionelle Analyse weiter erschwert (Kohut et al. 2016). Die transthorakale Echokardiographie der Maus erfordert in Anbetracht der Anatomie und Physiologie zudem gewisse technische Anforderung. Im Rahmen einer durchschnittlichen Herzfrequenz von 500-600 Schlägen pro Minute benötigt man zur funktionellen Beurteilung von Systole und Diastole eine Bildfrequenz von 15 Bildern pro Herzzyklus, somit eine Bildrate von ca. 150 Hz. Außerdem werden Hochfrequenz-Schallköpfe im Bereich von 30 MHz für eine hohe räumliche Auflösung, z.B. zur Beurteilung des Myokards, benötigt (Scherrer-Crosbie et al. 2008). Somit besteht eine hohe Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers, dem Versuchstier und der Technik. Dies kann die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Ergebnisse der transthorakalen Echokardiographie einschränken. Ähnlich wie bei der invasiven Hämodynamik-Messung waren auch hierbei Einflüsse auf die Herzfunktion durch die Verwendung narkotisierender Medikamente nicht auszuschließen. Eine Aussage über den PVR war aufgrund der unterschiedlichen Messzeitpunkte von Echokardiographie und hämodynamischer Messung nicht möglich.

In dieser Arbeit lieferte die Echokardiographie wichtige Informationen bezüglich der kardialen Veränderungen durch die PH oder des *Cox4i2 knockouts*.

Narkoseverfahren

Die Kriterien für die Wahl des Narkosemittels umfassten eine möglichst geringe Beeinträchtigung der Herz- und Lungenfunktion. In Anbetracht der aktuellen Studienlage wurde sich für eine Inhalationsnarkose mittels Isofluran entschieden. Diese wurde verwendet, da gezeigt werden konnte, dass Isofluran kaum Einfluss auf die Herz- und Atemfrequenz sowie die Oxygenierung des Blutes nimmt (Low et al. 2016). Einzig eine Senkung des Blutdrucks infolge einer Dilatation peripherer Arteriolen ist beschrieben

(Eger 1981). Alternative Möglichkeiten der Narkose mittels Phenobarbital oder auch die Kombination von Ketamin und Xylazin hätten, aufgrund deutlich negativer chrono- und inotroper Effekte, die Messungen verfälscht (Yang et al. 1999). Aufgrund der fehlenden analgetischen Komponente von Isofluran, wurde bei der invasiven hämodynamischen Messung zusätzlich Buprenorphin intraperitoneal appliziert. Bei diesem Medikament kann es über die Wirkung am μ -Rezeptor zu einer Bradykardie kommen, welche jedoch nicht beobachtet wurde.

Allgemeine Hinweise zu den verwendeten Methoden

Neben der größtmöglichen Präzision bei der Durchführung der Methoden durch erfahrenes Personal, wurde die Aussagekraft der erhobenen Messparameter zusätzlich durch ähnlich erhobene Parameter mit anderen Methoden gestützt. Somit war es möglich systematische Messstörungen einer Methode weitgehend auszuschließen. Mittels anschließender Organentnahme von Herz und Lunge sollten vaskuläre Veränderungen und eine Rechtsherzhypertrophie verifiziert werden.

4.2.3 *In vitro* Experimente

Mittels der *in vitro* Experimente konnte das Expressionsmuster von Cox4i2 unter Hypoxie analysiert und die Abhängigkeit von Hif-1 α untersucht werden. Zudem konnte so die Auswirkung der Cox4i2-Gendefizienz auf das hypoxische Proliferationsverhalten von mPASMCM unter Hypoxie isoliert betrachtet werden. Dadurch konnte der Einfluss von Cox4i2 auf das vaskuläre *Remodeling* spezifisch in mPASMCMs untersucht werden. Die Berücksichtigung möglicher systemischer Einflüsse oder anderer Zelltypen auf die Expression von Cox4i2 unter Hypoxie waren bei diesen Experimenten allerdings nicht möglich.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen, die zur Entstehung der chronisch Hypoxie-induzierten PH beitragen, sind weiterhin nicht vollständig verstanden. Insbesondere die primären O₂-Sensor-Mechanismen und die davon abhängigen Signalwege sind nicht vollständig aufgeklärt. Dies gilt besonders für die akute Hypoxie und die HPV, aber auch für die chronische Hypoxie, bei der zwar die Regulation von Hif-1 α über O₂-abhängige Prolylhydroxylasen als O₂-Sensor-Mechanismus eine zentrale Rolle spielt, die aber möglicherweise auch durch andere Mechanismen reguliert wird. Diese Mechanismen umfassen wahrscheinlich mitochondriale Faktoren, welche über

Mediatoren wie ROS Transkriptionsfaktoren, z.B. Hif-1 α , beeinflussen könnten. Darüber hinaus ist unbekannt, ob sich die Mechanismen der akuten und chronischen Hypoxie-Antwort der Lungengefäße überschneiden. PASMC sind bei der Erforschung der HPV in den Mittelpunkt gerückt, da sie sowohl den O₂-Sensor, die Transduktionswege als auch die Exekutiv-Mechanismen zur Vasokonstriktion beinhalten (Sylvester et al. 2012). Lange Zeit wurde der O₂-Sensor innerhalb der mitochondrialen Atmungskette, dem Hauptverbraucher von O₂, innerhalb der Zelle vermutet. Sommer et al. zeigten nun, dass Cox4i2 des Komplex IV eine essentielle Rolle bei akuten O₂-Sensorprozessen spielt. Akute Hypoxie führt zu einer Cox4i2-abhängigen Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran, und einer vermehrten ROS-Freisetzung an Komplex III. Diese führt durch Inhibition von K_v-Kanälen zu einer Depolarisation der Zellmembran und dadurch zu dem für die Vasokonstriktion nötigen Ca²⁺-Einstrom (Sommer et al. 2017). Die hier vorliegende Arbeit hatte zum Ziel die Funktion und Bedeutung von Cox4i2 auf die Entwicklung der PH und des damit verbundenen vaskulären *Remodelings* unter chronischer Hypoxie zu untersuchen.

4.3.1 Die Regulation von Cox4i2 unter chronischer Hypoxie

Im Rahmen einer O₂-Reihe konnte eine erhöhte mRNA-Expression und Proteinmenge von Cox4i2 mit sinkender O₂-Konzentration in mPASMC beobachtet werden. Die maximale Konzentration wurde bei 1% O₂-Gehalt im SMC-Vollmedium festgestellt.

Cox4i2 wurde in Gewebe von Säugetieren (Mensch, Ratte und Maus) mit besonders hohem Vorkommen in pulmonalen Gefäßen und Bronchien beschrieben (Huttemann 2001). In Studien zur Untersuchung der Funktion der nukleär-kodierten Untereinheiten von COX in Hefestämmen konnte die Untereinheit CoxV nachgewiesen werden, welche unter Berücksichtigung dessen Primärsequenz und kristallinen Struktur ein Homolog zu Cox4 in Säugetieren darstellt (Burke et al. 1998). Dabei konnten für CoxV zwei Isoformen, CoxVa und CoxVb, identifiziert werden, welche O₂-abhängig exprimiert waren und die Aktivität von COX zu regulieren schienen (Allen et al. 1995). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die unterschiedliche O₂-abhängige Expression der Isoformen von Cox4 in Säugetierzellen von Fukuda et al. untersucht. Sie demonstrierten eine erhöhte mRNA-Expression von Cox4i2 in mPASMC nach Hypoxie-Exposition (1% O₂) und stellten eine mögliche Regulation durch Hif-1 α dar (Fukuda et al. 2007).

Die jetzt durchgeführte Arbeit bestätigte die bestehenden Daten hinsichtlich des unterschiedlichen Expressionsmusters von Cox4i2 unter Hypoxie in mPASMC und zeigte erstmals eine Hypoxie-abhängige Proteinexpression von Cox4i2, die umgekehrt

zur exponierten O₂-Menge korrelierte. In Anbetracht der ebenfalls erhöhten mRNA von Cox4i2 ist daher von einer Regulation auf Transkriptionsebene auszugehen, wobei ein verminderter Abbau unter Hypoxie nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Das Expressionsprofil korrelierte weitestgehend mit dem von Hif-1 α , sodass eine Hif1 α abhängige Regulation möglich erschien. Mittels *Silencing* von Hif-1 α konnte erstmals ein direkter Einfluss von Hif-1 α auf die Proteinexpression von Cox4i2 in mPASCs unter Hypoxie (1% O₂ in SMC-Vollmedium) gezeigt werden. Dies äußerte sich in einer deutlichen Herunterregulation von Cox4i2 in Abwesenheit von Hif-1 α . Umgekehrt war die Hif-1 α -Expression in Cox4i2^{-/-} mPASCs nach Hypoxie-Exposition unbeeinflusst. In der anschließenden Untersuchung des Promoters des murinen Cox4i2-Gens wurden fünf HREs identifiziert, welche potentielle Hif-1 α Bindungsstellen darstellen könnten. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Cox4i2 unter Hypoxie durch Hif-1 α reguliert wird, Cox4i2 jedoch keinen Einfluss auf die Expression oder Stabilisierung von Hif-1 α zu haben scheint.

In der Literatur wurden bereits eine Reihe von Signalwegen und Proteinen beschrieben, welche in Zusammenhang mit Hif-1 α stehen (Semenza 2000, Semenza 2017). Hif-1 α wird eine aktive Rolle in der Pathogenese der PH und eine regulierende Funktion des mitochondrialen Metabolismus zugesprochen (Semenza 2011, Shimoda et al. 2011). Der Mechanismus, durch den Hif-1 α aktiviert bzw. stabilisiert wird, involviert, wie in der Einleitung bereits beschrieben, möglicherweise mitochondriale ROS. Durch Oxidation von Fe²⁺ im Rahmen einer erhöhten ROS-Produktion kann die Hydroxylierung durch PHD und somit der Abbau von Hif-1 α gehemmt werden (Tormos et al. 2010). Ein intakter Elektronentransport innerhalb der mitochondrialen Atmungskette und eine erhaltene Integrität der einzelnen Komplexe ist dabei essentiell für die Stabilisierung von Hif-1 α (Schroedl et al. 2002, Mansfield et al. 2005). Ergänzend zu diesen Erkenntnissen wurde die wichtige Bedeutung eines intakten mitochondrialen Membranpotenzials für die mitochondriale ROS-Produktion und damit verbundenen Hif-1 α -Stabilisierung gezeigt (Martinez-Reyes et al. 2016). Neben dem Einfluss auf mitochondriale ROS kann eine Störung der mitochondrialen Respiration den Zitratzyklus und somit auch das Vorhandensein von α -Ketoglutarat, welches für die Funktion von PHD benötigt wird, beeinflussen. Dadurch kann der Abbau von Hif-1 α gehemmt werden (Tormos et al. 2010). Schließlich kann Hif-1 α auch über Proteine, wie z.B. ET-1, mittels *feed-forward*-Mechanismus induziert werden (Pisarcik et al. 2013). Die von Sommer et al. demonstrierten Effekte von Cox4i2 unter akuter Hypoxie umfassten einen Teil der genannten möglichen Regulatoren von Hif-1 α : Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotenzials, Erhöhung mitochondrialer ROS und Ca²⁺ (Sommer et al. 2017).

Trotzdem konnte in dieser Studie kein Einfluss des Cox4i2^{-/-} auf die Hif-1 α -Regulation gezeigt werden. Eine gegensätzliche Regulation von Cox4i2 durch Hif-1 α zeigten Fukuda et al. erstmals in HeLa-Zellen (Fukuda et al. 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit den Erkenntnissen von Fukuda et al. vereinbar, dass es sich um eine unidirektionale Regulation von Cox4i2 durch Hif-1 α unter Hypoxie handelt. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit nur die Beziehung zwischen beiden Proteinen bei einem O₂-Gehalt von 1% im SMC Vollmedium untersucht. Schroedl et al. zeigten, dass ab 1,5% O₂-Sättigung mitochondriale ROS Hif-1 α stabilisieren können (Schroedl et al. 2002). Weiterhin hatten Mansfield et al. gezeigt, dass bei Anoxie, aber auch bei 0-1% O₂-Konzentration, Hif-1 α ROS-unabhängig, durch die direkte Inhibition der PHD infolge des O₂-Mangel, stabilisiert werden kann (Mansfield et al. 2005). In Anbetracht dessen wäre eine ähnliche Untersuchung bei beispielsweise 2% O₂ im SMC-Vollmedium interessant gewesen. In der Studie von Fukuda et al. konnte weiterhin ein Hif-1 α vermittelter *isoform-switch* mittels LON-Proteasen von Cox4i1 zu Cox4i2 nachgewiesen werden, was die Induktion von Cox4i2 durch Hif-1 α weiter unterstützt (Fukuda et al. 2007). Trotzdem scheint die alleinige Regulation von Cox4i2 durch Hif-1 α fraglich. Dies zeigt der Nachweis weiterer Transkriptionsfaktoren, wie den Induktoren RBPJ und CHCHD2 sowie dem Inhibitor CXXC5, die an das HRE im Promoterbereich des humanen Cox4i2-Gens binden (Huttemann et al. 2007). Hüttemann et al. zeigten zudem mittels Reporter-Gen-Assays, dass eine Reporter-Gen für drei Hif-1 α -regulierte Elemente im Bereich 0-1% O₂ die höchste Aktivität aufwies, während die Reporter-Gen-Aktivität für Cox4i2 bei 4% O₂ am höchsten war (Huttemann et al. 2007). Infolge dieser konträren Beobachtungen wären weitere Untersuchungen in mPASCs zur Interaktion zwischen Cox4i2 und Hif-1 α unter Hypoxie (> 1% O₂-Konzentration im SMC-Medium) interessant.

4.3.2 Der Einfluss von Cox4i2 auf die Entwicklung der Hypoxie-induzierten PH

Mithilfe des Mausmodells der chronischen Hypoxie-induzierten PH war es möglich, Cox4i2-spezifische Veränderungen hinsichtlich der Entwicklung einer PH und des vaskulären *Remodelings in vivo* zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass auch die Cox4i2^{-/-} Versuchsmäuse unter chronischer Hypoxie eine PH entwickelten. Dabei stieg der RVSP in beiden Genotypen nach Hypoxie-Exposition ähnlich an, lag jedoch bei den Cox4i2^{-/-} Mäusen sowohl nach normoxischer als auch hypoxischer Exposition etwas höher als die der entsprechenden Vergleichsgruppe der Cox4i2^{+/+} Versuchsmäuse. Ein unterschiedlicher Effekt der Hypoxie-Exposition auf den RVSP ergab sich hinsichtlich

des Genotyps aber nicht. Diese Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit dem PAT/PET-Quotienten, welcher ähnlich erniedrigte Werte sowohl in den Cox4i2^{-/-} als auch den Cox4i2^{+/+} Versuchsmäusen nach Hypoxie-Exposition zeigte. Eine negative Korrelation von RVSP und PAT/PET ist, infolge einer Verkürzung der PAT, beschrieben (Wang et al. 2018). Die TAPSE war nach Hypoxie-Exposition in beiden hypoxischen Versuchsgruppen im Vergleich zu den jeweiligen normoxischen Kontrollgruppen vermindert, was mit der Entwicklung einer Hypoxie-induzierten PH und Rechtsherzinsuffizienz korrelierte. Die Erniedrigung der TAPSE erreichte jedoch nur innerhalb der Cox4i2^{-/-} Versuchsgruppe eine Signifikanz. In Kongruenz mit den erhobenen Parametern der PH konnte in beiden Genotypen mittels immunhistochemischer Färbung von Gefäßintima und -media eine veränderte Muskularisierung, im Sinne eines vaskulären *Remodelings*, der präkapillären Gefäße (20-70 µm Durchmesser) nach Hypoxie-Exposition *in vivo* nachgewiesen werden. Die hypoxischen Cox4i2^{-/-} Versuchsmäuse entwickelten allerdings einen signifikant geringeren Anteil voll-muskularisierter kleiner Gefäße (20-70 µm Durchmesser) verglichen mit den hypoxischen Cox4i2^{+/+} Versuchsmäusen. Ein ergänzend durchgeführter Proliferationsassay konnte nur eine tendenziell niedrigere Proliferationsrate von Cox4i2^{-/-} gegenüber Cox4i2^{+/+} mPASMCM unter Hypoxie feststellen. In Anbetracht einer hohen Streuung der Messwerte der Proliferationsrate der hypoxischen Cox4i2^{-/-} Mäusen sollten weiterführende Untersuchungen erfolgen. Neben dem vaskulären *Remodeling* konnte infolge der hypoxischen Exposition in beiden Genotypen ebenfalls ein kardiales *Remodeling* nachgewiesen werden. Dieses stellte sich durch eine rechtsventrikuläre Hypertrophie mit Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz (CO, CI) dar. Interessanterweise entwickelten die Cox4i2^{-/-} Versuchsmäuse nach Hypoxie-Exposition einen signifikant höheren Hkt als die hypoxischen Cox4i2^{+/+} Versuchsmäuse. Die Ursache dafür bleibt vorerst unklar. Möglicherweise haben die Cox4i2^{-/-} Versuchsmäuse einen niedrigeren arteriellen pO₂ aufgrund der fehlenden HPV, sodass die Erythropoetin-Ausschüttung stärker aktiviert wird. In dieser Studie wurde allerdings keine Messung des arteriellen pO₂ unter chronischer Hypoxie durchgeführt. Weiterhin ergab sich zumindest kein Hinweis darauf, dass die Hypoxieantwort in der Niere, die die Erythropoetinausschüttung reguliert, durch Cox4i2^{-/-} beeinträchtigt war.

Weissmann et al. hatten in einer Studie die mögliche Bedeutung mitochondrialer Signalwege für die HPV unter prolongierter Hypoxie (etwa 120 Minuten) anhand von Experimenten an der isolierten perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge gezeigt. Insbesondere COX schien in der Aufrechterhaltung der HPV bei längerer hypoxischer Ventilation eine wichtige Rolle zu spielen. Als Ursache wurde eine Veränderung der

mitochondrialen ROS-Produktion vermutet (Weissmann et al. 2006). Weitere Studien wiesen eine aktive Rolle mitochondrialer ROS im pulmonalen *Remodeling*, der Konstriktion von PASMC und eines erhöhten RVSP nach (Aggarwal et al. 2013, Jernigan et al. 2017). Schließlich wurde Cox4i2 als O₂-Sensor der HPV unter akuter Hypoxie identifiziert, dessen Wirkmechanismus die vermehrte Freisetzung mitochondrialer ROS an Komplex III der ETC umfasst (Sommer et al. 2017). Mittels mitochondrialer SOD-2 werden die an Komplex III produzierten ROS, vornehmlich Superoxide, in H₂O₂ umgewandelt, welches schließlich Cystein-Thiol-Reste von Proteinen oxidieren kann. Dadurch kann wesentlicher Einfluss auf zelluläre Signalwege, Transkriptionsfaktoren und auch Ionenkanäle genommen werden (Aggarwal et al. 2013, Veit et al. 2015). Infolge des veränderten zellulären Redoxstatus kommt es zu einer Hemmung und Schließung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (K_v-1.5 Kanälen). Die folgende Membrandepolarisation führt zu einer Öffnung von VOCC-Kanälen, wodurch es zu einem extrazellulären Ca²⁺-Einstrom kommt. Zudem ist eine direkte Steuerung der α 1-Untereinheit der VOCC-Kanäle durch ROS mittels Oxidation von Cystein-Resten bekannt. Hierbei ist sowohl eine Hemmung als auch Aktivierung der Ca²⁺-Kanäle beschrieben (Veit et al. 2015). Der intrazelluläre Ca²⁺-Anstieg wirkt sich, neben einer Induktion der Vasokonstriktion, auch stimulierend auf das Proliferationsverhalten von PASMC aus (Shimoda et al. 2010). Weiterhin werden infolge eines erhöhten oxidativen Stresses vermehrt Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF-2 und PDGF) produziert und sowohl p38MAPK als auch ERK1/2 induziert. Letztere wirken beide ebenfalls proliferativ (Aggarwal et al. 2013, Pisarcik et al. 2013). Infolge der Reduktion von Hypoxie-induzierten mitochondrialen ROS in Cox4i2^{-/-} Mäusen und damit reduzierter HPV in akuter Hypoxie wurde eine ebenso protektive Wirkung auf das vaskuläre *Remodeling* und damit die Entwicklung einer PH unter chronischer Hypoxie angenommen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass ein Cox4i2 *knockdown* nur einen geringen Effekt auf die Entwicklung des Hypoxie-induzierten vaskulären *Remodelings* und keinen Effekt auf die Hypoxie-induzierte Erhöhung des RVSP hatte. Die Cox4i2^{-/-} Versuchsmäuse zeigten unter Normoxie und Hypoxie einen insgesamt höheren RVSP als die Cox4i2^{+/+} Versuchsmäuse, allerdings ohne Genotyp-spezifischen Effekt der Hypoxie auf die RVSP-Erhöhung. Als Ursache für den unterschiedlichen RVSP kommen verschiedene Ursachen in Frage. Der RVSP hängt von der systolischen Auswurfleistung und dem pulmonalen Gefäßwiderstand ab. Unter Berücksichtigung des Hagen-Poiseuille-Gesetzes, welches aufgrund seiner standardisierten Untersuchungen zu laminären Strömungen Newton'scher Flüssigkeiten in geraden Glasrohren nur in Teilaspekten auf das Blutgefäßsystem des Menschen anwendbar ist, nimmt neben dem

Gefäßdurchmesser auch die Viskosität des Blutes Einfluss auf den pulmonalvaskulären Widerstand (Hoffman 2011). Auf Letzteres wird weiter unten eingegangen. Der einzelne Gefäßdurchmesser eines pulmonal-arteriellen Blutgefäßes wird durch den Gefäßtonus und das vaskuläre *Remodeling* bestimmt. Die Summe dieser pulmonal-arteriellen Gefäßveränderungen führt zu einer Reduktion des pulmonalen Gesamtgefäßdurchschnitts, was schließlich zur Entwicklung der PH beiträgt. Zusätzlich beeinflusst das vaskuläre *Remodeling* die Elastizität der großen Gefäße. Das *Remodeling* der kleinen Gefäße unter Hypoxie ist insbesondere durch eine vermehrte Muskularisierung der kleinen pulmonal-arteriellen Gefäße charakterisiert, dessen Anteil jedoch in den Cox4i2^{-/-} Versuchsmäusen nach Hypoxie-Exposition gegenüber der hypoxischen Wildtypen signifikant vermindert war, sodass dies im Gegensatz zum erhöhten RVSP stand. Die Gefäßelastizität betrifft vor allem die mittleren und großen pulmonal-arteriellen Gefäße, wodurch das ventrikuloarterielle *Coupling* zwischen rechtem Ventrikel und *A. pulmonalis* beeinflusst wird. Das ventrikuloarterielle *Coupling* ist für die Umwandlung eines pulsatilen in einen gleichmäßigen Blutfluss wichtig (Moceri et al. 2014). Der Einfluss von Cox4i2 auf die pulmonal-arterielle Gefäßelastizität wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, sodass ein negativer Effekt eines *knockout* von Cox4i2 auf die Gefäßelastizität nicht auszuschließen war. Eine reduzierte Gefäßelastizität hätte analog zum vaskulären *Remodeling* eine höhere rechtsventrikuläre Druckbelastung zur Folge (Moceri et al. 2014). Es ist bekannt, dass eine Druckbelastung des rechten Ventrikels zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie führt (Moceri et al. 2014). Dies konnte in den untersuchten hypoxischen Versuchsmäusen festgestellt werden. Allerdings unterschied sich die Herzfunktion zwischen den Genotypen nicht signifikant, sodass dies als Ursache für den unterschiedlichen RVSP in den Genotypen unwahrscheinlich erscheint. Neben dem direkten physischen Stimulus, also der erhöhten rechtsventrikulären Nachlast, konnte in Studien das kardiale *Remodeling* unabhängig der Entwicklung einer PH durch Hypoxie ausgelöst werden (Ball et al. 2014). Zudem finden sich in der Literatur Hinweise auf eine Beteiligung mitochondrialer ROS am kardialen *Remodeling* (Wong et al. 2013). Dies wurde kürzlich durch den Einsatz von MitoQ, einem spezifischen mitochondrialen Antioxidans, welches in Versuchsmäusen protektiv auf das Hypoxie-induzierte kardiale *Remodeling* wirkt, bestärkt (Pak et al. 2018). Die Rolle von Cox4i2 im kardialen *Remodeling* ist bisher nicht genau untersucht, sodass über mögliche Wirkmechanismen nur spekuliert werden kann. In dieser Arbeit wurde in beiden Genotypen eine signifikante Zunahme des rechtsventrikulären Myokards mittels Bestimmung der HR und RVWT nach Hypoxie-Exposition beobachtet. Es fanden sich dabei keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Dies spricht insgesamt gegen eine bedeutende Rolle von Cox4i2 im kardialen *Remodeling*, was in

Einklang mit einer bekanntlich geringen kardialen Expression von Cox4i2 steht (Huttemann 2001). Neben den kardiovaskulären Veränderungen könnte der signifikant erhöhte Hkt der Cox4i2^{-/-} Versuchsmäuse, im Sinne einer Erhöhung der Blutviskosität, den höheren RVSP nach Hypoxie-Exposition erklären. Ein hoher Hkt ist mit einer erhöhten kardialen Nachlast und pulmonalen Widerstand assoziiert (Schreier et al. 2014). Allerdings konnte in bisherigen Studien durch Reduktion des Hkt kein eindeutiger positiver Effekt auf die Entwicklung der Hypoxie-induzierten PH im Mausmodell nachgewiesen werden. Eine Reduktion des Hkt verbesserte jedoch das kardiale Auswurfvolumen, was möglicherweise mit einer besseren Prognose verbunden sein könnte, sodass weitere spezielle Untersuchungen zum Einfluss von Cox4i2 auf den Hkt interessant wären (Schreier et al. 2014).

Auf zellulärer und molekularer Ebene könnte der eher geringe Effekt eines Cox4i2 *knockouts* auf das vaskuläre *Remodeling* und die damit verbundene Entwicklung einer PH durch die ersatzweise Produktion von ROS durch alternative intrazelluläre ROS-Quellen erklärt werden. Neben den Mitochondrien sind die NADPH-Oxidasen (NOX) maßgeblich an der ROS-Produktion beteiligt (Veit et al. 2015, Huetsch et al. 2019). Insbesondere die Untereinheit NOX4 ist in humanen PASMC unter chronischer Hypoxie überexprimiert und produziert hauptsächlich H₂O₂ (Mittal et al. 2007, Green et al. 2012). Von NOX4 produziertes H₂O₂ hemmt PPAR, dessen Herunterregulation mit Proliferation und Migration von SMC verbunden ist, und fördert den extrazellulären Ca²⁺-Einstrom (Green et al. 2012). Sowohl durch die Verwendung eines allgemeinen NOX-Inhibitors, Diphenyleneiodonium (DPI), als auch die Durchführung eines gezielten *knockdown* von NOX4 mittels siRNA konnte eine Hemmung der Proliferation von mPASMC unter Hypoxie demonstriert werden (Mittal et al. 2007, Ma et al. 2016). Interessanterweise zeigten Green et al., dass mithilfe des spezifischen oralen NOX4-Hemmer GKT138731 Versuchsmäuse im Modell der chronisch Hypoxie-induzierten PH ein geringeres vaskuläres und auch kardiales *Remodeling* entwickelten. Unabhängig vom reduzierten *Remodeling* entwickelten die Versuchstiere jedoch eine PH mit erhöhtem RVSP (Green et al. 2012). Im Widerspruch zu dem von Green et al. festgestellten protektiven Effekt eines NOX4 *knockdown* auf das vaskuläre *Remodeling* stehen die Ergebnisse von Veith et al. in einer jüngeren Studie. In dieser wurden NOX4 *knockout* Versuchsmäuse im Modell der Hypoxie-induzierten PH untersucht. Nach 21 Tagen Hypoxie-Exposition zeigten diese neben der Entwicklung einer PH auch ein vaskuläres *Remodeling*, sodass von einer untergeordneten Bedeutung von NOX4 in der Entstehung der Hypoxie-induzierten PH ausgegangen werden muss (Veith et al. 2016). Diese Ergebnisse werden in einer Studie von Zhang et al. unterstützt, welche die Bedeutung von p22phox, einer

konstitutiven Untereinheit von NOX1, 2 und 4, untersuchte. Diese ergab eine wesentliche Rolle für p22phox in der Entstehung der Hypoxie-induzierten PH. Zum einen schien p22phox auf Molekularebene an der Regulierung von Hif-1 α und einer Erhöhung intrazellulärer ROS unter Hypoxie beteiligt zu sein, zum anderen entwickelten p22phox defiziente Versuchsmäuse weder eine PH und noch ein vaskuläres *Remodeling* im Modell der Hypoxie-induzierten PH. Interessanterweise waren in p22phox defizienten Versuchsmäusen NOX1 und NOX2 nach Hypoxie-Exposition negativ dysreguliert, während NOX4 weiterhin überexprimiert war (Zhang et al. 2019). Diese Beobachtung suggeriert ebenfalls eine untergeordnete Rolle von NOX4 in der PH, weist jedoch auf die Bedeutung der übrigen NOX-Isoformen in der Hypoxie-induzierten PH hin. In Anbetracht dieser Studienergebnisse könnten die von NOX produzierten ROS die infolge eines Cox4i2 *knockout* mutmaßlich reduzierte mitochondriale ROS-Produktion gegenregulatorisch ersetzen. Hierdurch könnte der nur geringe Effekt eines Cox4i2 *knockouts* auf das vaskuläre *Remodeling* erklärt werden. Inwieweit Cox4i2 und NOX miteinander interagieren und die ROS-Produktion in chronischer Hypoxie beeinflussen muss genauer untersucht werden, da bisher kaum Untersuchungen diesbezüglich existieren. Zhang et al. demonstrierten in ihrer Studie weiterhin eine generelle Abnahme von ROS unter Hypoxie, welche durch Defizienz von p22phox weiter verstärkt wurde (Zhang et al. 2019). Somit wird angenommen, dass NOX eine Mindestmenge intrazellulärer ROS, welche für das zelluläre Überleben unter Hypoxie notwendig sind, gewährleistet (Zhang et al. 2019). Mitochondriale ROS scheinen hingegen, unter chronischer Hypoxie, weniger Einfluss auf das pulmonale Gefäßsystem zu haben. Dies unterstützt eine kürzlich veröffentlichte Studie von Pak et al., welche die Rolle mitochondrialer ROS mittels MitoQ, einem spezifischen mitochondrialen Radikalfänger, unter chronischer Hypoxie untersuchte. Hierbei wurde eine Abnahme mitochondrialer ROS unter chronischer Hypoxie festgestellt, sodass MitoQ keinen Einfluss auf die Hypoxie-induzierte PH hatte (Pak et al. 2018). Beide genannten Studien wären somit im Einklang mit älteren Studien, welche eine Abnahme von ROS unter chronischer Hypoxie postulierten (Waypa et al. 2010). Eine Ursache für die verminderte mitochondriale ROS-Produktion unter chronischer Hypoxie (im Gegensatz zu akuter Hypoxie) spielt möglicherweise die Umstellung von zellulärer Glukoseoxidation zur anaeroben Glykolyse, welche durch Hif-1 α vermittelt wird (West 2017).

In vitro Experimente zeigten, dass Hif-1 α depletierte embryone murine Fibroblastenzellen infolge hoher ROS-Konzentrationen unter chronischer Hypoxie eine gesteigerte Apoptose entwickelten (Semenza 2012). Gleichzeitig hatten diese Zellen verglichen mit normoxischen *Wildtype*-Zellen eine interessanterweise höhere ATP-

Produktion, sodass eine vermeintlich geringere Energieversorgung der Zelle infolge eines Substratmangels an O₂ unter Hypoxie nicht der Grund der metabolischen Umstellung sein kann. Vielmehr soll dadurch eine vermehrte toxische ROS-Produktion durch die Mitochondrien verhindert werden (Semenza 2012). In diesem Kontext lässt sich auch die unter chronischer Hypoxie beobachtete Hif-1α vermittelte mitochondriale Autophagie erklären (Zhang et al. 2008). Die weitere prominente Bedeutung von Hif-1α zeigte sich zudem in der abgeschwächten Entwicklung einer Hypoxie-induzierten PH in Versuchsmäusen, welche eine partielle Gendefizienz für Hif-1α besaßen (Shimoda et al. 2001). Diese Studien unterstreichen die bedeutende Rolle von Hif-1α unter chronischer Hypoxie und legen nahe, dass die Summe der Hif-1α-abhängigen Signalwege den möglichen Einfluss eines Cox4i2 Verlustes auf die Hypoxie-induzierte PH überlagern könnte. In humanen PASMC konnte die Hif-1α-abhängige Regulation einer Untereinheit eines Ca²⁺-sensitiven K⁺-Kanals, welcher zur Vasokonstriktion beiträgt, nachgewiesen werden (Ahn et al. 2012). Weiterhin nehmen die von Hif-1α vermittelten Signalwege signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten von PASMCs (Veith et al. 2016). Dieser Einfluss zeigte sich mittels selektivem *knockout* von Hif-1α in mPASMC *in vivo*, wodurch eine deutliche Abschwächung des vaskulären Remodelings erreicht wurde (Ball et al. 2014). Aufgrund der multiplen Signalwege von Hif-1α, welche beispielsweise Wachstumsfaktoren (PDGF, FGF-2) und *micro-RNAs* umfassen, sind die wesentlichen hauptverantwortlichen Signalwege bisher nur wenig verstanden (Schultz et al. 2006, Zeng et al. 2015). Ein wichtiger identifizierter Mechanismus von Hif-1α, innerhalb von mPASMC, liegt in der Hochregulation von TRPC (classical *transient receptor potential*)1- und NHE (*Na⁺/H⁺-exchanger*)1-Kanälen sowie einer Herunterregulation von K_v1.5-Kanälen. Dies führt zu einer konsekutiven intrazellulären Ca²⁺-Erhöhung und Alkalisierung des Zytoplasmas von mPASMC. Beide Veränderungen gelten als proliferationsfördernd, jedoch sind die Funktionsmechanismen noch nicht vollständig geklärt (Veith et al. 2016). In Anbetracht einer multifaktoriellen Genese des vaskulären *Remodelings*, welches neben autokrinen auch parakrine Signalwegen umfasst und der Tatsache, dass Hif-1α in allen kernhaltigen Zellen vorkommt, könnten auch Hif-1α-abhängige Transkriptionsfaktoren in EC entsprechende Signalwege induzieren (Veith et al. 2016). Die Bedeutung der deutlichen Heraufregulation von Cox4i2 durch Hif-1α könnte bei erniedrigtem O₂-Angebot unter Hypoxie der Aufrechterhaltung einer physiologischen ROS-Produktion dienen.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit nur einen geringen Einfluss von Cox4i2 auf die chronisch Hypoxie-induzierte PH zeigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen daher die These, dass der akut-hypoxischen HPV und der chronisch Hypoxie-

induzierten PH unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Die Bedeutung der O₂-abhängigen Hochregulation von Cox4i2 unter chronischer Hypoxie bleibt weiter nur unvollständig verstanden und erfordert weitere Untersuchungen.

4.4 Fazit und Ausblick

Die hier vorliegende Arbeit untersuchte die Rolle von Cox4i2 in der Pathogenese der chronisch Hypoxie-induzierten PH. Infolge der Identifizierung als essentiellen Bestandteil des O₂-Sensormechanismus in akuter Hypoxie und somit bei der HPV (Sommer et al. 2017), wurde eine wichtige Rolle unter chronischer Hypoxie postuliert.

Die Arbeit demonstrierte, dass Cox4i2 nur eine geringe Bedeutung in der Pathogenese der Hypoxie-induzierten PH besitzt und die verantwortlichen pathophysiologischen Mechanismen in akuter und chronischer Hypoxie unterschiedlich sind.

Es bestand eine stark erhöhte Protein- und mRNA-Expression von Cox4i2 unter chronischer Hypoxie, welche von Hif-1 α reguliert war. Die Funktion dieser Regulation ist aktuell unklar. Möglicherweise dient diese der Aufrechterhaltung der ROS-Produktion bei erniedrigtem O₂-Angebot. Durch den knockdown von Cox4i2 wird das vaskuläre *Remodeling* nur gering beeinflusst, da wahrscheinlich noch multiple andere Signalwege zum *Remodeling* beitragen und Cox4i2 *downstream* von dem wichtigsten Sensor der chronischen Hypoxie, Hif-1 α , ist.

Zu dieser Hypothese passt, dass unter den untersuchten Bedingungen die Hif-1 α Proteinmenge nicht durch Cox4i2 reguliert war. Allerdings untersuchte diese Arbeit nicht den Effekt eines Cox4i2 *knockouts* auf die Hif-1 α Proteinexpression bei einer O₂-Konzentration von mehr als 2%, wo eine ROS-abhängige Hif-1 α Regulation beschrieben worden war (Schroedl et al. 2002). Weiterhin können mögliche gegenregulatorische Prozesse unter einem Cox4i2 *knockdown*, wie z.B. die Hochregulation anderer ROS produzierender Enzyme, z.B. NOX, eine Rolle spielen.

Das Verständnis der einzelnen Proteine, welche zur zellulären Homöostase unter Hypoxie beitragen, ist essentiell, um das vaskuläre *Remodeling*, das zum Krankheitsbild der PH führt, zu erfassen und neue Therapien zu entwickeln. In Anbetracht der limitierten therapeutischen Möglichkeiten der pulmonalen Hypertonie stellt die Grundlagenforschung in diesem Bereich weiterhin eine wichtige Säule für die Therapieentwicklung dar. Cox4i2 scheint, aufgrund seiner zellspezifischen und Hypoxie-abhängigen Expression, ein interessantes therapeutisches Ziel zu sein. Diese Arbeit und die Studie von Sommer et al. (2017) haben jedoch gezeigt, dass Cox4i2 in einem

komplexen Zusammenhang wirkt und zwischen akuter und chronischer Hypoxie differenziert werden muss. Es sind daher weitere Untersuchungen nötig, um die Funktion von Cox4i2 in Hypoxie vollständig zu verstehen. Außerdem kann eine Rolle von Cox4i2 bei Formen der PH, welche nicht durch Hypoxie ausgelöst sind, nicht ausgeschlossen werden.

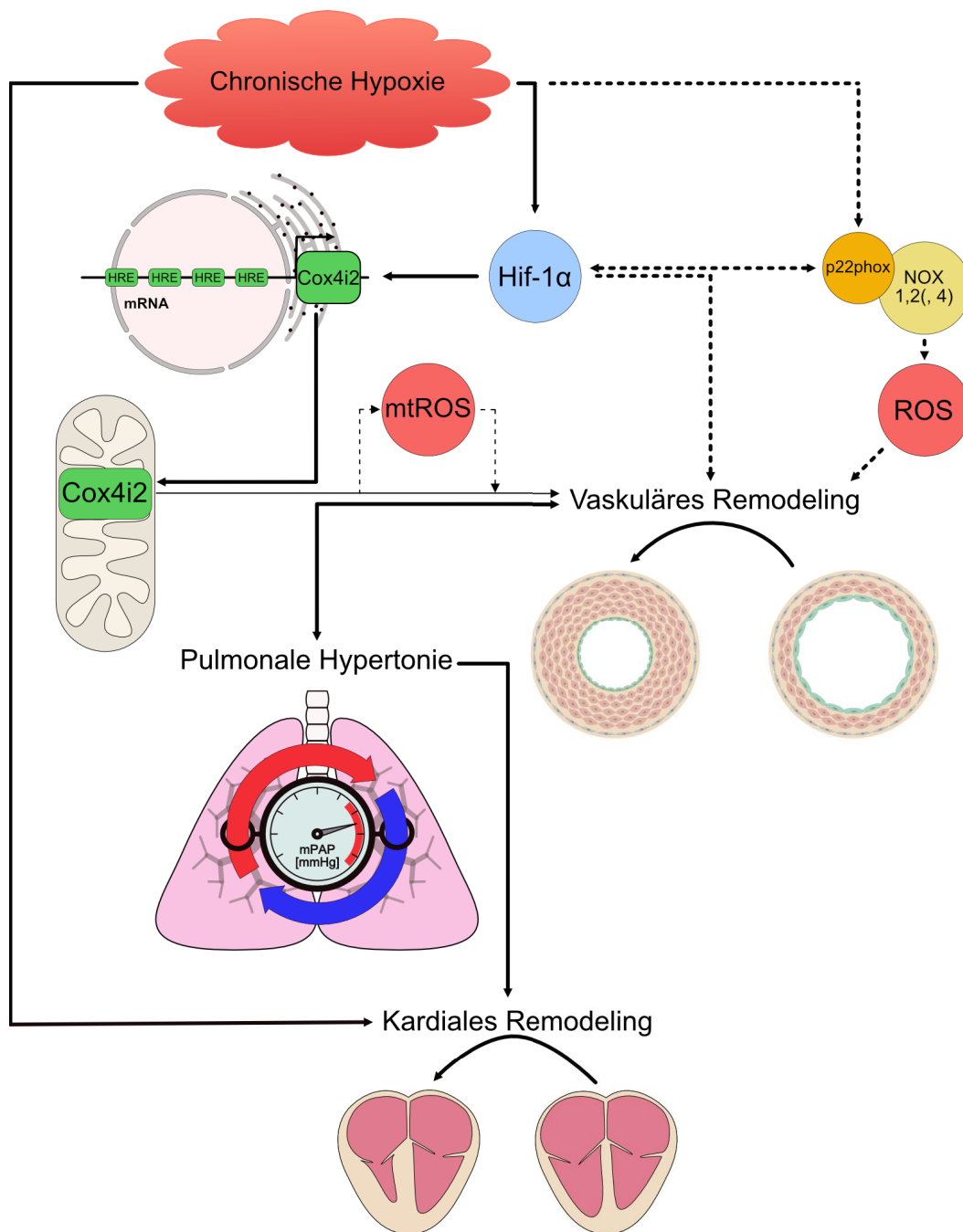


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit

Die Expression von Cox4i2 ist unter chronischer Hypoxie Hif-1 α -abhängig erhöht. Die Entwicklung einer chronisch Hypoxie-induzierten PH wird durch den *knockout* von Cox4i2 allerdings nicht beeinflusst, während das vaskuläre *Remodeling* gering vermindert wird. Möglicherweise findet dies, analog zur akuten Hypoxie, über mitochondriale ROS statt. Allerdings scheinen diese unter chronischer Hypoxie nur eine geringe Bedeutung zu haben. Alternativ wird der mögliche Ausfall mitochondrialer ROS in Cox4i2^{-/-} Versuchsmäusen durch weitere intrazelluläre ROS-Quellen, hier beispielsweise NOX, ersetzt. Darüber hinaus spielen wahrscheinlich Cox4i2-unabhängige Mechanismen, welche durch Hif-1 α aktiviert werden, eine wichtige Rolle beim vaskulären und kardialen *Remodeling*. Abkürzungen: mtROS: mitochondriale ROS. NOX: NADPH-Oxidasen. p22phox ist eine Untereinheit von NOX1,2 und 4. Kräftige Linien signalisieren eine gesicherte Beziehung. Schmale Linien demonstrieren eine geringe Interaktion. Eine gestrichelte Linie stellt eine vermutete bzw. in der Literatur beschriebene Beziehung dar. Eine Pfeilspitze steht für Induktion.

5. Zusammenfassung

Die Exposition gegenüber chronischer Hypoxie führt zu pulmonalem vaskulärem *Remodeling* und der Entwicklung einer PH. Unbehandelt kommt es zu chronischer Rechtsherzinsuffizienz und Rechtsherzversagen. Pulmonal-vaskuläres *Remodeling* ist gekennzeichnet durch Proliferation von pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC). Mitochondrien scheinen in diesem Prozess eine wichtige Rolle zu spielen. Erst kürzlich wurde die lungenspezifische und Hypoxie-regulierte mitochondriale Cytochrom c Untereinheit 4 Isoform 2 (Cox4i2) als essentieller Bestandteil des O₂-Sensormechanismus unter akuter Hypoxie identifiziert. Das Ziel dieser Arbeit war es daher die Funktion von Cox4i2 in der chronischen Hypoxie-induzierten PH zu untersuchen. Zusätzlich galt es die Interaktion zwischen Cox4i2 und dem Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α (Hif-1 α) zu untersuchen.

PASMC wurden aus Wildtyp(^{+/+}) Mäusen isoliert und für 36 Stunden in Normoxie (21% O₂) oder einer hypoxischer Atmosphäre (1-6% O₂) inkubiert. Das Maximum der Protein- und mRNA-Expression von Cox4i2 zeigte sich bei 1% O₂. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte Hif-1 α . Die Hif-1 α -Stabilisation war in hypoxischen mPASMC von Cox4i2 *knockout*(^{-/-}) Mäusen nicht verändert, jedoch war die Cox4i2 Proteinexpression infolge eines *knockdowns* von Hif-1 α in mPASMC stark vermindert. In *in vivo* Experimenten mit Cox4i2^{-/-} Mäusen und entsprechenden Cox4i2^{+/+} Mäusen, welche für 28 Tage entweder Normoxie (21% O₂) oder Hypoxie (10% O₂) exponiert wurden, konnte die Entwicklung einer PH mit einem ähnlichen Schweregrad in beiden Genotypen festgestellt werden. Dies gelang mittels hämodynamischer und echokardiographischer Messungen. Der Muskularisierungsgrad der kleinen Gefäße (20-70 μ m) war in Cox4i2^{-/-} Mäusen gegenüber Cox4i2^{+/+} Mäusen leicht reduziert. Ein Proliferationsassay zeigte keinen Unterschied im Proliferationsverhalten.

Zusammenfassend demonstriert diese Arbeit eine stark erhöhte Expression von Cox4i2 in chronischer Hypoxie in mPASMC, die Hif-1 α abhängig war. Ein globaler *knockout* von Cox4i2 hatte nur einen geringen Einfluss auf das Hypoxie-induzierte pulmonal-vaskuläre *Remodeling*. Insgesamt sind weitere Untersuchungen zur Rolle von Cox4i2 in der chronischen Hypoxie-induzierten PH nötig.

6. Summary

Exposure of the pulmonary vasculature to chronic hypoxia results in pulmonary vascular remodeling and development of pulmonary hypertension (PH) ultimately leading to right heart failure and death. Mitochondria have been suggested to be involved in proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) underlying pulmonary vascular remodeling. Recently it was shown that the lung-specific and hypoxia-regulated mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2 (Cox4i2) is essential for acute oxygen sensing in pulmonary vasculature. We thus aimed to investigate the role of Cox4i2 in chronic hypoxia-induced PH. Additionally, we examined the interaction between Cox4i2 expression and cellular concentration of hypoxia-inducible factor 1 α (Hif-1 α), which is strongly involved in hypoxic signaling within the cell.

PASMC were isolated from wild-type (WT) mice and incubated for 36 hours in normoxia (21% O₂) or different degree of hypoxia (1-6% O₂). The maximum of Cox4i2 protein and mRNA expression, as well as Hif-1 α stabilization was detected at 1% O₂. However, chronic hypoxia-induced Hif-1 α stabilization was preserved in PASMC isolated from Cox4i2 knockout mice whereas Cox4i2 protein expression was diminished by knockdown of Hif-1 α in WT PASMC. *In vivo* studies in Cox4i2 knockout or respective WT mice, which were exposed to normoxia (21% O₂) or chronic hypoxia (10% O₂) for 28 days, revealed that both strains developed PH to a similar degree as determined by hemodynamic measurements and echocardiography. The degree of muscularization of small pulmonary vessels (20-70 μ m) was slightly reduced in Cox4i2 knockout mice compared to WT. However, there was no difference in hypoxia-induced proliferation of WT and Cox4i2 knockout PASMCs.

This study demonstrates the prominent hypoxia-dependent regulation of Cox4i2 in isolated primary murine PASMCs. Furthermore, it suggests an underlying regulation by Hif-1 α . However, global knockout of Cox4i2 showed only slightly reduced pulmonary vascular remodeling. The role of Cox4i2 in PASMC under chronic hypoxia needs to be further evaluated.

7. Bibliografie

Aggarwal, S.; Gross, C. M.; Sharma, S.; Fineman, J. R.; Black, S. M. (2013). "Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling." Comprehensive Physiology 3(3): 1011-1034.

Ahn, Y. T.; Kim, Y. M.; Adams, E.; Lyu, S. C.; Alvira, C. M.; Cornfield, D. N. (2012). "Hypoxia-inducible factor-1 α regulates KCNMB1 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells." American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 302(3): L352-359.

Allen, L. A.; Zhao, X.-J.; Caughey, W.; Poyton, R. O. (1995). "Isoforms of Yeast Cytochrome c Oxidase Subunit V Affect the Binuclear Reaction Center and Alter the Kinetics of Interaction with the Isoforms of Yeast Cytochrome c." The Journal of Biological Chemistry 270(6): 110-118.

Aloia, E.; Cameli, M.; D'Ascenzi, F.; Sciaccaluga, C.; Mondillo, S. (2016). "TAPSE: An old but useful tool in different diseases." International Journal of Cardiology 225: 177-183.

Aras, S.; Pak, O.; Sommer, N.; Finley, R., Jr.; Huttemann, M.; Weissmann, N.; Grossman, L. I. (2013). "Oxygen-dependent expression of cytochrome c oxidase subunit 4-2 gene expression is mediated by transcription factors RBPJ, CXXC5 and CHCHD2." Nucleic Acids Research 41(4): 2255-2266.

Arnold, S.; Kadenbach, B. (1997). "Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase." European Journal of Biochemistry 249(1): 350-354.

Aumüller, G.; Engele, J.; Kirsch, J.; Mense, S. (2010). Duale Reihe: Anatomie, Georg Thieme Verlag KG.

Ball, M. K.; Waypa, G. B.; Mungai, P. T.; Nielsen, J. M.; Czech, L.; Dudley, V. J.; Beussink, L.; Dettman, R. W.; Berkelhamer, S. K.; Steinhorn, R. H.; Shah, S. J.; Schumacker, P. T. (2014). "Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 α ." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 189(3): 314-324.

Bogaard, H. J.; Abe, K.; Vonk Noordegraaf, A.; Voelkel, N. F. (2009). "The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension." Chest 135(3): 794-804.

Burke, P. V.; Poyton, R. O. (1998). "Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase." Journal of Experimental Biology 201(Pt 8): 1163-1175.

Chin, K. M.; Kim, N. H.; Rubin, L. J. (2005). "The right ventricle in pulmonary hypertension." Coronary Artery Disease 16(1): 13-18.

Davie, N.; Haleen, S. J.; Upton, P. D.; Polak, J. M.; Yacoub, M. H.; Morrell, N. W.; Wharton, J. (2002). "ETA and ETB receptors modulate the proliferation of human

pulmonary artery smooth muscle cells. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 165(3): 398-405.

Day, R. M.; Suzuki, Y. J. (2006). "Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione." Dose Response 3(3): 425-442.

Eger, E. I. (1981). "Isoflurane: A Review." Anesthesiology 55(5): 559-576.

Fukuda, R.; Zhang, H.; Kim, J. W.; Shimoda, L.; Dang, C. V.; Semenza, G. L. (2007). "HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells." Cell 129(1): 111-122.

Galie, N.; Humbert, M.; Vachiery, J. L.; Gibbs, S.; Lang, I.; Torbicki, A.; Simonneau, G.; Peacock, A.; Vonk Noordegraaf, A.; Beghetti, M.; Ghofrani, A.; Gomez Sanchez, M. A.; Hansmann, G.; Klepetko, W.; Lancellotti, P.; Matucci, M.; McDonagh, T.; Pierard, L. A.; Trindade, P. T.; Zompatori, M.; Hoeper, M.; Aboyans, V.; Vaz Carneiro, A.; Achenbach, S.; Agewall, S.; Allanore, Y.; Asteggiano, R.; Paolo Badano, L.; Albert Barbera, J.; Bouvaist, H.; Bueno, H.; Byrne, R. A.; Carerj, S.; Castro, G.; Erol, C.; Falk, V.; Funck-Brentano, C.; Gorenflo, M.; Granton, J.; lung, B.; Kiely, D. G.; Kirchhof, P.; Kjellstrom, B.; Landmesser, U.; Lekakis, J.; Lionis, C.; Lip, G. Y.; Orfanos, S. E.; Park, M. H.; Piepoli, M. F.; Ponikowski, P.; Revel, M. P.; Rigau, D.; Rosenkranz, S.; Voller, H.; Luis Zamorano, J. (2016). "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)." European Heart Journal 37(1): 67-119.

Green, D. E.; Murphy, T. C.; Kang, B. Y.; Kleinhenz, J. M.; Szyndralewicz, C.; Page, P.; Sutliff, R. L.; Hart, C. M. (2012). "The Nox4 inhibitor GKT137831 attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular cell proliferation." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 47(5): 718-726.

Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L. (2006). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Helling, S.; Huttemann, M.; Ramzan, R.; Kim, S. H.; Lee, I.; Muller, T.; Langenfeld, E.; Meyer, H. E.; Kadenbach, B.; Vogt, S.; Marcus, K. (2012). "Multiple phosphorylations of cytochrome c oxidase and their functions." Proteomics 12(7): 950-959.

Hoffman, J. I. (2011). "Pulmonary vascular resistance and viscosity: the forgotten factor." Pediatric Cardiology 32(5): 557-561.

Huber, L. C.; Bye, H.; Brock, M.; Swiss Society of Pulmonary, H. (2015). "The pathogenesis of pulmonary hypertension - an update." Swiss Medical Weekly 145: w14202.

Huetsch, J. C.; Suresh, K.; Shimoda, L. A. (2019). "Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation by NADPH Oxidases in Pulmonary Hypertension." Antioxidants 8(3).

Humbert, M.; Morrell, N. W.; Archer, S. L.; Stenmark, K. R.; MacLean, M. R.; Lang, I. M.; Christman, B. W.; Weir, E. K.; Eickelberg, O.; Voelkel, N. F.; Rabinovitch, M. (2004). "*Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension.*" Journal of the American College of Cardiology 43(12, Supplement): 13S-24S.

Huttemann, M.; Lee, I.; Gao, X.; Pecina, P.; Pecinova, A.; Liu, J.; Aras, S.; Sommer, N.; Sanderson, T. H.; Tost, M.; Neff, F.; Aguilar-Pimentel, J. A.; Becker, L.; Naton, B.; Rathkolb, B.; Rozman, J.; Favor, J.; Hans, W.; Prehn, C.; Puk, O.; Schrewe, A.; Sun, M.; Hofler, H.; Adamski, J.; Bekeredjian, R.; Graw, J.; Adler, T.; Busch, D. H.; Klingenspor, M.; Klopstock, T.; Ollert, M.; Wolf, E.; Fuchs, H.; Gailus-Durner, V.; Hrabe de Angelis, M.; Weissmann, N.; Doan, J. W.; Bassett, D. J.; Grossman, L. I. (2012). "*Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2-knockout mice show reduced enzyme activity, airway hyporeactivity, and lung pathology.*" FASEB Journal 26(9): 3916-3930.

Huttemann, M.; Lee, I.; Liu, J.; Grossman, L. I. (2007). "*Transcription of mammalian cytochrome c oxidase subunit IV-2 is controlled by a novel conserved oxygen responsive element.*" FEBS Journal 274(21): 5737-5748.

Huttemann, M.; Lee, I.; Pecinova, A.; Pecina, P.; Przyklenk, K.; Doan, J. W. (2008). "*Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease.*" Journal of Bioenergetics and Biomembranes 40(5): 445-456.

Huttemann, M. K., B; Grossman, L. I.; (2001). "*Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase.*" Gene 267(1): 111-123.

Jernigan, N. L.; Naik, J. S.; Weise-Cross, L.; Detweiler, N. D.; Herbert, L. M.; Yellowhair, T. R.; Resta, T. C. (2017). "*Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.*" PLOS ONE 12(6): e0180455.

Kadenbach, B.; Huttemann, M. (2015). "*The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase.*" Mitochondrion 24: 64-76.

Kadenbach, B.; Hüttemann, M.; Arnold, S.; Lee, I.; Bender, E. (2000). "*Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase.*" Free Radical Biology and Medicine 29(3-4): 211-221.

Klinke, R.; Pape, H.-C.; Kurtz, A.; Silbernagel, S. (2010). Physiologie, Georg Thieme Verlag KG.

Kohut, A.; Patel, N.; Singh, H. (2016). "*Comprehensive echokardiographic assessment of the right ventricle in murine models.*" Journal of Cardiovascular Ultrasound 24(3): 229-238.

Lando, D.; Peet, D. J.; Gorman, J. J.; Whelan, D. A.; Whitelaw, M. L.; Bruick, R. K. (2002). "*FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.*" Genes & Development 16(12): 1466-1471.

Low, L. A.; Bauer, L. C.; Klaunberg, B. A. (2016). "*Comparing the Effects of Isoflurane and Alpha Chloralose upon Mouse Physiology.*" PLOS ONE 11(5): e0154936.

Ma, L.; Ambalavanan, N.; Liu, H.; Sun, Y.; Jhala, N.; Bradley, W. E.; Dell'Italia, L. J.; Michalek, S.; Wu, H.; Steele, C.; Benza, R. L.; Chen, Y. (2016). "*TLR4 regulates pulmonary vascular homeostasis and remodeling via redox signaling.*" Frontiers in Bioscience 21(2): 397-409.

Ma, L.; Roman-Campos, D.; Austin, E. D.; Eyries, M.; Sampson, K. S.; Soubrier, F.; Germain, M.; Tregouet, D. A.; Borczuk, A.; Rosenzweig, E. B.; Girerd, B.; Montani, D.; Humbert, M.; Loyd, J. E.; Kass, R. S.; Chung, W. K. (2013). "*A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension.*" New England Journal of Medicine 369(4): 351-361.

Ma, Z.; Mao, L.; Rajagopal, S. (2016). "*Hemodynamic Characterization of Rodent Models of Pulmonary Arterial Hypertension.*" Journal of Visualized Experiments(110).

Malczyk, M.; Veith, C.; Fuchs, B.; Hofmann, K.; Storch, U.; Schermuly, R. T.; Witzernath, M.; Ahlbrecht, K.; Fecher-Trost, C.; Flockerzi, V.; Ghofrani, H. A.; 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 188(12): 1451-1459.

Mandegar, M.; Fung, Y. C.; Huang, W.; Remillard, C. V.; Rubin, L. J.; Yuan, J. X. (2004). "*Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension.*" Microvascular Research 68(2): 75-103.

Mansfield, K. D.; Guzy, R. D.; Pan, Y.; Young, R. M.; Cash, T. P.; Schumacker, P. T.; Simon, M. C. (2005). "*Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation.*" Cell Metabolism 1(6): 393-399.

Martinez-Reyes, I.; Diebold, L. P.; Kong, H.; Schieber, M.; Huang, H.; Hensley, C. T.; Mehta, M. M.; Wang, T.; Santos, J. H.; Woychik, R.; Dufour, E.; Spelbrink, J. N.; Weinberg, S. E.; Zhao, Y.; DeBerardinis, R. J.; Chandel, N. S. (2016). "*TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions.*" Molecular Cell 61(2): 199-209.

McMurtry, M. S.; Bonnet, S.; Wu, X.; Dyck, J. R.; Haromy, A.; Hashimoto, K.; Michelakis, E. D. (2004). "*Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis.*" Circulation Research 95(8): 830-840.

Michelakis, E. D.; McMurtry, M. S.; Wu, X.-C.; Dyck, J. R. B.; Moudgil, R.; Hopkins, T. A.; Lopaschuk, G. D.; Puttagunta, L.; Waite, R.; Archer, S. L. (2002). "*Dichloroacetate, a Metabolic Modulator, Prevents and Reverses Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats: Role of Increased Expression and Activity of Voltage-Gated Potassium Channels.*" Circulation 105(2): 244-250.

Misiak, M.; Singh, S.; Drewlo, S.; Beyer, C.; Arnold, S. (2010). "*Brain region-specific vulnerability of astrocytes in response to 3-nitropropionic acid is mediated by cytochrome c oxidase isoform expression.*" Cell and Tissue Research 341(1): 83-93.

Mittal, M.; Roth, M.; Konig, P.; Hofmann, S.; Dony, E.; Goyal, P.; Selbitz, A. C.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Kwapiszewska, G.; Kummer, W.; Klepetko, W.; Hoda,

M. A.; Fink, L.; Hanze, J.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Schmidt, H. H.; Weissmann, N. (2007). "*Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature.*" Circulation Research 101(3): 258-267.

Mocerri, P.; Baudouy, D.; Chiche, O.; Cerboni, P.; Bouvier, P.; Chaussade, C.; Ferrari, E. (2014). "*Imaging in pulmonary hypertension: Focus on the role of echocardiography.*" Archives of Cardiovascular Diseases 107(4): 261-271.

Murphy, M. P. (2009). "*How mitochondria produce reactive oxygen species.*" Biochemical Journal 417(1): 1-13.

Nunnari, J.; Suomalainen, A. (2012). "*Mitochondria: in sickness and in health.*" Cell 148(6): 1145-1159.

Pak, O.; Aldashev, A.; Welsh, D.; Peacock, A. (2007). "*The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature.*" European Respiratory Journal 30(2): 364-372.

Pak, O.; Scheibe, S.; Esfandiary, A.; Gierhardt, M.; Sydykov, A.; Logan, A.; Fysikopoulos, A.; Veit, F.; Hecker, M.; Kroschel, F.; Quanz, K.; Erb, A.; Schafer, K.; Fassbinder, M.; Alebrahimdehkordi, N.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Brandes, R. P.; Seeger, W.; Murphy, M. P.; Weissmann, N.; Sommer, N. (2018). "*Impact of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ on hypoxia-induced pulmonary hypertension.*" European Respiratory Journal 51(3).

Perez-Vizcaino, F.; Cogolludo, A.; Moreno, L. (2010). "*Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle.*" Respiratory Physiology & Neurobiology 174(3): 212-220.

Pinsky, M. R. (2016). "*The right ventricle: interaction with the pulmonary circulation.*" Critical Care 20(1): 266.

Pisarcik, S.; Maylor, J.; Lu, W.; Yun, X.; Udem, C.; Sylvester, J. T.; Semenza, G. L.; Shimoda, L. A. (2013). "*Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1.*" American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 304(8): L549-561.

Pullamsetti, S. S.; Savai, R.; Janssen, W.; Dahal, B. K.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Ghofrani, H. A.; Weissmann, N.; Schermuly, R. T. (2011). "*Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension.*" Clinical Microbiology and Infection 17(1): 7-14.

Pullamsetti, S. S.; Schermuly, R. T. (2009). "*Endothelin receptor antagonists in preclinical models of pulmonary hypertension.*" European Journal of Clinical Investigation 39(s2): 3-13.

Quinlan, C. L.; Orr, A. L.; Perevoshchikova, I. V.; Treberg, J. R.; Ackrell, B. A.; Brand, M. D. (2012). "*Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions.*" Journal of Biological Chemistry 287(32): 27255-27264.

Rabinovitch, M. (2008). "*Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.*" Journal of Clinical Investigation 118(7): 2372-2379.

Roth, M.; Rupp, M.; Hofmann, S.; Mittal, M.; Fuchs, B.; Sommer, N.; Parajuli, N.; Quanz, K.; Schubert, D.; Dony, E.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Sausbier, U.; Rutschmann, K.; Wilhelm, S.; Seeger, W.; Ruth, P.; Grimminger, F.; Sausbier, M.; Weissmann, N. (2009). "*Heme oxygenase-2 and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: lung vascular effects of hypoxia.*" American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 180(4): 353-364.

Ryan, J.; Dasgupta, A.; Huston, J.; Chen, K. H.; Archer, S. L. (2015). "*Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension.*" Journal of Molecular Medicine 93(3): 229-242.

Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Wilkins, M. R.; Grimminger, F. (2011). "*Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension.*" Nature Reviews Cardiology 8(8): 443-455.

Scherrer-Crosbie, M.; Thibault, H. B. (2008). "*Echocardiography in translational research: of mice and men.*" Journal of the American Society of Echocardiography 21(10): 1083-1092.

Schreier, D. A.; Hacker, T. A.; Hunter, K.; Eickoff, J.; Liu, A.; Song, G.; Chesler, N. (2014). "*Impact of increased hematocrit on right ventricular afterload in response to chronic hypoxia.*" Journal of Applied Physiology 117(8): 833-839.

Schroedl, C.; McClintock, D. S.; Budinger, G. R.; Chandel, N. S. (2002). "*Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 α requires mitochondrial reactive oxygen species.*" American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 283(5): L922-931.

Schultz, K.; Fanburg, B. L.; Beasley, D. (2006). "*Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells.*" American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 290(6): H2528-2534.

Semenza, G. L. (2000). "*HIF-1 and human disease: one highly involved factor.*" Genes & Development 14(16): 1983-1991.

Semenza, G. L. (2007). "*Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1.*" Biochemical Journal 405(1): 1-9.

Semenza, G. L. (2011). "*Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning.*" Biochimica et Biophysica Acta 1813(7): 1263-1268.

Semenza, G. L. (2012). "*Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine.*" Cell 148(3): 399-408.

Semenza, G. L. (2017). "*A compendium of proteins that interact with HIF-1 α .*" Experimental Cell Research 356(2): 128-135.

Semenza, G. L.; Jiang, B.-H.; Leung, S. W.; Passantino, R.; Concordet, J.-P.; Maire, P.; Giallongo, A. (1996). "*Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1.*" Journal of Biological Chemistry 271(51): 32529-32537.

Semenza, G. L.; Wang, G. L. (1992). "*A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation.*" Molecular and Cellular Biology 12(12): 5447-5454.

Shimoda, L. A.; Manalo, D. J.; Sham, J. S. K.; Semenza, G. L.; Sylvester, J. T. (2001). "*Partial HIF-1 α deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia.*" American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 281(1): L202-L208.

Shimoda, L. A.; Semenza, G. L. (2011). "*HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease.*" American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 183(2): 152-156.

Shimoda, L. A.; Udem, C. (2010). "*Interactions between calcium and reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle responses to hypoxia.*" Respiratory Physiology & Neurobiology 174(3): 221-229.

Simonneau, G.; Galie, N.; Rubin, L. J.; 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 43(12, Supplement): 5S-12S.

Simonneau, G.; Gatzoulis, M. A.; Adatia, I.; Celermajer, D.; Denton, C.; Ghofrani, A.; Gomez Sanchez, M. A.; Krishna Kumar, R.; Landzberg, M.; Machado, R. F.; Olschewski, H.; Robbins, I. M.; Souza, R. (2013). "*Updated clinical classification of pulmonary hypertension.*" Journal of the American College of Cardiology 62(25, Supplement): D34-41.

Sinha, K.; Das, J.; Pal, P. B.; Sil, P. C. (2013). "*Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis.*" Archives of Toxicology 87(7): 1157-1180.

Sommer, N.; Dietrich, A.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Gudermann, T.; Schulz, R.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Weissmann, N. (2008). "*Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms.*" European Respiratory Journal 32(6): 1639-1651.

Sommer, N.; Huttemann, M.; Pak, O.; Scheibe, S.; Knopp, F.; Sinkler, C.; Malczyk, M.; Gierhardt, M.; Esfandiary, A.; Kraut, S.; Jonas, F. T.; Veith, C.; Aras, S.; Sydykov, A.; Alebrahimdehordi, N.; Giehl, K.; Hecker, M.; Brandes, R. P.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Grossman, L. I.; Weissmann, N. (2017). "*Mitochondrial Complex IV Subunit 4 Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing.*" Circulation Research 121(4): 424-438.

Sommer, N.; Strielkov, I.; Pak, O.; Weissmann, N. (2016). "*Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction.*" European Respiratory Journal 47(1): 288-303.

Stenmark, K. R.; Meyrick, B.; Galie, N.; Mooi, W. J.; McMurtry, I. F. (2009). "*Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure.*" American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 297(6): L1013-1032.

Sylvester, J. T.; Shimoda, L. A.; Aaronson, P. I.; Ward, J. P. (2012). "*Hypoxic pulmonary vasoconstriction.*" Physiological Reviews 92(1): 367-520.

Tormos, K. V.; Chandel, N. S. (2010). "*Inter-connection between mitochondria and HIFs.*" Journal of Cellular and Molecular Medicine 14(4): 795-804.

Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. (1996). "*The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8Å.*" Science 272(5265): 1136 - 1144.

Tuder, R. M.; Marecki, J. C.; Richter, A.; Fijalkowska, I.; Flores, S. (2007). "*Pathology of Pulmonary Hypertension.*" Clinics in Chest Medicine 28(1): 23-42.

Turrens, J. F. (2003). "*Mitochondrial formation of reactive oxygen species.*" Journal of Physiology 552(Pt 2): 335-344.

Veit, F.; Pak, O.; Brandes, R. P.; Weissmann, N. (2015). "*Hypoxia-dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation: focus on ion channels.*" Antioxidants & Redox Signaling 22(6): 537-552.

Veith, C.; Kraut, S.; Wilhelm, J.; Sommer, N.; Quanz, K.; Seeger, W.; Brandes, R. P.; Weissmann, N.; Schroder, K. (2016). "*NADPH oxidase 4 is not involved in hypoxia-induced pulmonary hypertension.*" Pulmonary Circulation 6(3): 397-400.

Veith, C.; Schermuly, R. T.; Brandes, R. P.; Weissmann, N. (2016). "*Molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor-induced pulmonary arterial smooth muscle cell alterations in pulmonary hypertension.*" Journal of Physiology 594(5): 1167-1177.

Vonk Noordegraaf, A.; Galie, N. (2011). "*The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension.*" European Respiratory Reviews 20(122): 243-253.

Wang, Y. C.; Huang, C. H.; Tu, Y. K. (2018). "*Pulmonary Hypertension and Pulmonary Artery Acceleration Time: A Systematic Review and Meta-Analysis.*" Journal of the American Society of Echocardiography 31(2): 201-210 e203.

Waypa, G. B.; Schumacker, P. T. (2005). "*Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing.*" Journal of Applied Physiology 98(1): 404-414.

Waypa, G. B.; Schumacker, P. T. (2010). "*Hypoxia-induced changes in pulmonary and systemic vascular resistance: where is the O₂ sensor?*" Respiratory Physiology & Neurobiology 174(3): 201-211.

Weissmann, N.; Sommer, N.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Seeger, W.; Grimminger, F. (2006). "Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction." Cardiovascular Research 71(4): 620-629.

Weissmann, N.; Zeller, S.; Schafer, R. U.; Turowski, C.; Ay, M.; Quanz, K.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Fink, L.; Seeger, W.; Grimminger, F. (2006). "Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 34(4): 505-513.

Welsh, D. J.; Peacock, A. J. (2013). "Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation." High Altitude Medicine & Biology 14(2): 111-116.

Wenger, R. H.; Stiehl, D. P.; Camenisch, G. (2005). "Integration of oxygen signaling at the consensus HRE." Science's STKE 2005(306): re12.

West, J. B. (2017). "Physiological Effects of Chronic Hypoxia." New England Journal of Medicine 376(20): 1965-1971.

Wilhelm, J.; Pingoud, A. (2003). "Real-Time Polymerase Chain Reaction." ChemBioChem 4(11): 1120-1128.

Wong, C. M.; Bansal, G.; Pavlickova, L.; Marcocci, L.; Suzuki, Y. J. (2013). "Reactive oxygen species and antioxidants in pulmonary hypertension." Antioxidants & Redox Signaling 18(14): 1789-1796.

Yang, X.-P.; Liu, Y.-H.; Rhaleb, N.-E.; Kurihara, N.; Kim, H. E.; Carretero, O. A. (1999). "Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice." American Journal of Physiology -Heart and Circulatory Physiology 277(5): H1967-H1974.

Yared, K.; Noseworthy, P.; Weyman, A. E.; McCabe, E.; Picard, M. H.; Baggish, A. L. (2011). "Pulmonary artery acceleration time provides an accurate estimate of systolic pulmonary arterial pressure during transthoracic echocardiography." Journal of the American Society of Echocardiography 24(6): 687-692.

Zeng, Y.; Liu, H.; Kang, K.; Wang, Z.; Hui, G.; Zhang, X.; Zhong, J.; Peng, W.; Ramchandran, R.; Usha Raj, J.; Gou, D. (2015). "Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of miR-322: potential role in proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells." Scientific Reports 5: 12098.

Zhang, H.; Bosch-Marce, M.; Shimoda, L. A.; Tan, Y. S.; Baek, J. H.; Wesley, J. B.; Gonzalez, F. J.; Semenza, G. L. (2008). "Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia." Journal of Biological Chemistry 283(16): 10892-10903.

Zhang, Z.; Trautz, B.; Kracun, D.; Vogel, F.; Weitnauer, M.; Hochkogler, K.; Petry, A.; Gorlach, A. (2019). "Stabilization of p22phox by Hypoxia Promotes Pulmonary Hypertension." Antioxidants & Redox Signaling 30(1): 56-73.

8. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV).....</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 2: Vaskuläres Remodeling und zugrundeliegende Ursachen in pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH).....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 3: Die Cytochrom c Oxidase (COX).....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 4: Schematische Übersicht der Arbeitshypothese.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des Mausmodells der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 6: Repräsentative echokardiographische Darstellung der TAPSE im M-Modus.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 7: Repräsentative echokardiographische Bestimmung der PAT und PET. .</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Proliferationsassays.....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 9: Hypoxie-abhängige Proteinmenge von Cox4i2 und Hif-1α.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 10: Hypoxie-abhängige mRNA-Expression von Cox4i2.</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 11: Die Cox4i2-Proteinmenge wird durch Hif-1a reguliert.</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 12: Mögliche Hif-1α-Bindungsstellen in der murinen Promotersequenz von Cox4i2.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 13: Proteinmenge von Hif-1α in Cox4i2^{-/-} mPASC.</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 14: Proliferation von Cox4i2^{+/+} und Cox4i2^{-/-} mPASC unter Hypoxie.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 15: TAPSE (Tricuspid annular plane systolic excursion) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 16: PAT/PET-Quotient nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 17: RVWT (Right ventricular wall thickness) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.....</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 18: Kardiale Auswurfleistung (Cardiac Output, CO) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 19: Kardialer Index (Cardiac Index, CI) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 20: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) nach 27 Tagen Normoxie/Hypoxie.....</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 21: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (Right ventricular systolic pressure, RVSP) nach 28 Tagen Normoxie/Hypoxie.....</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 22: System-arterielle Druck (Systemic arterial pressure, SAP) nach 28 Tagen Normoxie/Hypoxie.</i>	<i>84</i>

<i>Abbildung 23: Herzratio (HR) nach 28 Tagen Normoxie/Hypoxie.</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 24: Hämatokrit (Hkt) nach 28 Tagen Normoxie/Hypoxie.</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 25: Effekt der chronischen Hypoxie auf den Muskularisierungsgrad der kleinen pulmonalen Gefäße.</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 26: Schematische Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit.....</i>	<i>105</i>

9. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Aktualisierte Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (PH), Nizza, 2013. ...</i>	9
<i>Tabelle 2: Verwendete Geräte für das Mausmodell der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie.....</i>	33
<i>Tabelle 3: Verwendete Geräte für Hämodynamik-Messungen.....</i>	33
<i>Tabelle 4: Verwendete Geräte für Echokardiographie.....</i>	34
<i>Tabelle 5: Verwendete Geräte für Immunhistochemie</i>	34
<i>Tabelle 6: Verwendete Geräte für Molekularbiologie.....</i>	34
<i>Tabelle 7: Verwendete Materialien für Hämodynamik-Messungen</i>	36
<i>Tabelle 8: Verwendete Materialien für Echokardiographie</i>	37
<i>Tabelle 9: Verwendete Materialien für Immunhistochemie</i>	37
<i>Tabelle 10: Verwendete Materialien für Molekularbiologie</i>	38
<i>Tabelle 11: Verwendete Materialien für Zellkultur.....</i>	40
<i>Tabelle 12: Allgemeine Verbrauchsmaterialien</i>	41
<i>Tabelle 13: Verwendete Kits für Immunhistochemie</i>	41
<i>Tabelle 14: Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemie.....</i>	42
<i>Tabelle 15: Verwendete Primärantikörper für Western Blot.....</i>	42
<i>Tabelle 16: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot.....</i>	42
<i>Tabelle 17: 12%iges SDS Polyacrylamid-Gel (Vier Gele mit 1,5 mm Stärke) (Western Blot).....</i>	43
<i>Tabelle 18: Blotting Puffer (Western Blot).....</i>	43
<i>Tabelle 19: Elektrophorese-Puffer (Western Blot)</i>	43
<i>Tabelle 20: PBS; pH 7,4 (Western Blot, Immunhistochemie)</i>	44
<i>Tabelle 21: Stripping-Puffer (Western Blot)</i>	44
<i>Tabelle 22: 10x Laemmli Proben-Puffer (Western Blot)</i>	44
<i>Tabelle 23: Selbstgemachtes ECL-Detektionsreagenz (Western Blot)</i>	44
<i>Tabelle 24: Verteilung der Versuchsmäuse auf die Versuchsbedingungen</i>	45
<i>Tabelle 25: Überblick über den Ablauf der Entwässerungsreihe</i>	51
<i>Tabelle 26: Protokoll der immunhistochemischen Färbung.....</i>	52
<i>Tabelle 27: Experimentelles Design beider O₂-Reihen.....</i>	58
<i>Tabelle 28: Experimentelles Design des Hif-1α-knockdowns mittels siRNA</i>	59
<i>Tabelle 29: Experimentelles Design der Hypoxie-Exposition von Cox4i2 mPASMCM</i>	59
<i>Tabelle 30: Verdünnung der Primärantikörper für Western Blot Analyse</i>	62
<i>Tabelle 31: Verdünnung der Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse</i>	62
<i>Tabelle 32: cDNA-Synthese-Schritte im Thermocycler.....</i>	64

Tabelle 33: Sequenzen der für die q(RT)-PCR verwendeten Primer 65

10. Abkürzungen

*	Signifikanzen
#	Signifikanzen
%	Prozent
°C	Grad Celsius
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
Abb.	Abbildung
Abb.	Abbildung
ALK-1	<i>activin-like reseptor-1</i>
AP-1	<i>activating protein-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B ₂ M	β ₂ -Mikroglobulin
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMPR2	<i>bone morphogenic protein receptor type 2</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAV1	<i>caveolin-1</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat

CHPH	chronisch-hypoxisch induzierte pulmonale Hypertonie
CI	Cardiac Index
cm	Zentimeter
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO	<i>Cardiac Output</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
COX	Cytochrom C Oxidase
Cox4i2	Cytochrom C Oxidase Untereinheit 4 Isoform 2
Cox4i2 ^{-/-}	<i>Cox4i2-knockout</i>
Cox4i2 ^{+/+}	Cox4i2-Wildtyp
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution</i>
EC	<i>endothelial cells</i> (Endothelzellen)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
E _m	Zellmembranpotenzial
ENG	<i>endoglin</i>
ERC	<i>electron respiratory chain</i>
ET-1	Endothelin-1
ETA	Endothelin Typ A Rezeptor
ETB	Endothelin Typ B Rezeptor

FCS	Fetales Kälberserum
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
FGF-2	<i>fibroblast growth factor-2</i>
FIH-1	<i>factor inhibiting Hif-1</i>
H	Hypoxie
h	Stunde(n)
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
Hif-1α	<i>hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPAH	Hereditäre pulmonal-arterielle Hypertonie
HPV	Hypoxische Vasokonstriktion
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPAH	Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie
KCNK3	<i>potassium channel super family K member-3</i>
K _v -Kanäle	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
m	Meter
M	Männlich

m ²	Quadratmeter
MEF	<i>mouse embryo fibroblast</i>
Mhz	Megahertz
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metallo Protease
mPAP	<i>mean pulmonary artery pressure</i>
mPASMCM	murine PASMCM
mtROS	mitochondriale ROS
N	Normoxie
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
O ₂	Sauerstoff
P/S	Penicillin/Streptomycin Lösung
p300	Name einer Histon Acetyltransferase
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PASMC	<i>pulmonary arterial smooth muscle cell</i> (pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen)
PAT/PET	Quotient der <i>pulmonary accerleration time</i> und <i>pulomonyary ejection time</i>
PBST	Phophatgepufferte Salzlösung mit Tween
pCO ₂	Partialdruck von Kohlenstoffdioxid
PDE	Phophodiesterase
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>

PDH	Pyruvat Dehydrogenase
PDK	Pyruvat Dehydrogenase Kinase
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PH	Pulmonale Hypertonie
PHD	<i>prolyl-4-hydroxylase domain protein</i>
pO ₂	Partialdruck von Sauerstoff
PPAR _γ	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time PCR</i> (Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
ROCC	Rezeptor regulierte Kalziumkanäle (<i>receptor operated calcium channels</i>)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Sauerstoffradikale)
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RVP	<i>right ventricular pressure</i>
RVWT	<i>right ventricular wall thickness</i>
s	Sekunden
SAP	<i>systemic arterial pressure</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
sGC	<i>soluble guanylate cyclase</i> (lösliche Guanylatzyklase)

siHif-1 α	siRNA gegen Hif-1 α
siR	zufällige siRNA
siRNA	<i>small interference RNA</i>
Smad 9	<i>Smad family member 9</i>
SMC-Medium	<i>smooth muscle cell</i> Nährmedium
SOCC	Speichervermittelt regulierte Kalziumkanäle (<i>store-operated calcium channels</i>)
SRC-1	<i>steroid receptro coactivator-1</i>
TAPSE	<i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TIF2	<i>transcriptional intermediary factor-2</i>
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
TRPC	<i>transient receptor potential cation channel</i>
TXA ₂	Thromboxan A ₂
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vHPL	von-Hippel-Lindau Protein
VOCC	Spannungsabhängige Kalziumkanäle
W	Weiblich
z.B.	zum Beispiel
α	alpha
α SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
β	beta
ΔG^0	Freie Standardreaktionsenthalpie
Δp	Partialdruckdifferenz
μ l	Mikroliter

μm

Mikrometer

Ψ_m

mitochondriales Membranpotenzial

11. Veröffentlichungen

11.1 Poster-Präsentationen

57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (Leipzig, 2016): **Jonas F.**, Veith C., Kraut S., Quanz K., Gierhardt M., Seeger W., Weißmann N., Sommer N. *The role of cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2 (Cox4i2) in the cause of chronic-hypoxia induced pulmonary hypertension.*

11.2 Originalarbeiten

Sommer, N.; Huttemann, M.; Pak, O.; Scheibe, S.; Knopp, F.; Sinkler, C.; Malczyk, M.; Gierhardt, M.; Esfandiary, A.; Kraut, S.; **Jonas, F. T.**; Veith, C.; Aras, S.; Sydykov, A.; Alebrahimdehkordi, N.; Giehl, K.; Hecker, M.; Brandes, R. P.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Grossman, L. I.; Weissmann, N. (2017). "Mitochondrial Complex IV Subunit 4 Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing." Circulation Research 121(4): 424-438.

12. Erklärung zur Dissertation

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

Heidelberg, 03.03.2020

Ort, Datum



Felix Jonas

13. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir bei der Durchführung und dem Abschließen meiner Dissertation geholfen und mich unterstützt haben:

- Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Natascha Sommer für die Themavergabe und Integration in das Cox4i2-Projekt bedanken. Weiterhin für die Hilfestellungen im anschließenden Verfassen der Dissertation und den vielen hilfreichen Korrekturvorschlägen.
- Ich danke Prof. Dr. Norbert Weißmann, dass ich in seiner Arbeitsgruppe und mit seiner apparativen und finanziellen Unterstützung diese Arbeit durchführen durfte.
- Ein großer Dank gebührt auch Dr. Christine Veith-Berger, welche mir intensiv in dem Erlernen der notwendigen Labortechniken half und jederzeit bereit war mir beim Troubleshooting zu helfen. Ebenso möchte ich mich für die Hilfestellungen in Bezug auf die statistische Auswertung und das Korrekturlesen des Methoden-, Materialien- und Ergebnisteils bedanken. Durch Natascha und dich war eine engmaschige Betreuung möglich, welche ich sehr zu schätzen wusste.
- Dr. Oleg Pak und Dr. Monika Malczyk möchte ich danken, dass ich euch jederzeit bei Fragen spontan konsultieren konnte.
- Für die technische und fachliche Unterstützung im Rahmen der Echokardiographie und Versuchstierhaltung danke ich Dr. med. vet. Simone Kraut. Vielen Dank auch für die Bereitstellung der echokardiografischen Bilder.
- Ich bedanke mich bei Karin Quanz für die Hilfestellung in organisatorischen Fragestellungen rund um das Labor und die technische Unterstützung bei den hämodynamischen Messungen.
- Weiterer Dank gilt Ingrid Breitenborn-Müller, Carmen Homberger, Elisabeth Kappes, Ewa Bieniek und Lisa Fröhlich für die zahlreichen und geduldigen Erklärungen und technischen Hilfestellung in der Molekularbiologie, der Zellkultur und Immunhistologie.

- Insgesamt möchte ich dem gesamten ECCPS-Team für die offene und freundschaftliche Atmosphäre danken, welche angesichts der nervenaufreibenden Versuche für die notwendige Motivation sorgte, um am folgenden Tag wieder im Labor zu erscheinen. Ihr wart ein tolles Team!
- Der Justus-Liebig-Universität möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Prägraduierten-Kollegs bedanken. Zudem war das zusätzlich vorhandene wissenschaftliche Rahmenprogramm eine tolle Ergänzung für das Forschungssemester.
- Last but not least möchte ich mich bei meinen Freunden, meiner Familie und meiner Freundin Svenja bedanken. Ihr hattet immer ein offenes Ohr, wenn es nicht so lief wie es sein sollte und habt mich motiviert weiter dranzubleiben. Insbesondere möchte ich Svenja danken, die immer die erste Anlaufstelle war, wenn es Fortschritt oder auch Probleme im Rahmen meiner Dissertation gab. Obwohl du mit deiner eigenen Dissertation ziemlich zu kämpfen hast, hattest du trotzdem immer motivierende und aufbauende Worte für mich. Ich hoffe und bin fester Zuversicht, dass auch du deine Dissertation zu einem erfolgreichen Abschluss führen wirst! Danke!