

Essenzielle Rolle des Komplexes II der Atmungskette
bei der hypoxie-induzierten ROS-Produktion in den Gefäßwandzellen der Lungenstrombahn

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

vorgelegt von Ishaq, Barat
geb. in Kabul/Afghanistan

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Hecker

Tag der Disputation: 08.03.2023

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie der Lunge	1
1.1.1 Die intrapulmonalen Atemwege	1
1.1.2 Die Blutgefäße der Lunge	2
1.2 Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion	3
1.3 Die Suche nach dem Sensor: NADPH-Oxidasen und Mitochondrien	5
1.3.1 NADPH-Oxidasen als Sensor	5
1.3.2 Mitochondrien als Sensor	7
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies	8
1.5 Hypoxie-induzierter Anstieg der mitochondrialen ROS	9
1.6 Aufbau und Funktion der Mitochondrien	9
1.6.1 Die mitochondriale Atmungskette	10
1.7 Stickstoffmonoxid als Trigger der HPV	15
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	17
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Versuchstiere	17
2.1.2 Geräte und Laborbedarf	18
2.1.4 Puffer und Medien für die Organentnahme und die Kultivierung der PCLS	20
2.2 Organentnahme und Herstellung von PCLS aus Lungen der Maus	22
2.2.1 Entnahme des Thorax-Pakets, bestehend aus Herz und Lunge	22
2.2.2 Herstellung von PCLS	23
2.3 Nachweis von NO und ROS	23
2.3.1 Identifizierung von NO-produzierenden Zellen	23
2.3.2. Quantifizierung der NO-bildenden Zellen	24
2.3.3 Identifizierung von ROS-produzierenden Zelle	24
2.3.4 Quantifizierung der ROS-Produktion auf Einzelzellebene	24
2.4 Hemmung der Atmungskette	25
2.5 Die ROS-Produktion in Gegenwart eines Succinat-Überschusses	26

2.6 Histochemischer Nachweis der SDH-Aktivität in murinen Lungenschnitten	26
2.7 Statistische Auswertung	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Der Einfluss von Hypoxie auf die Freisetzung der Signalmoleküle NO und ROS	28
3.1.1 Einfluss von Hypoxie auf die Anzahl von NO-produzierenden Zellen in Lungengefäßen	28
3.1.2 Einfluss von Hypoxie auf die Anzahl ROS-produzierender Zellen in Lungengefäßen	29
3.2 Identifikation der Quelle der ROS der Lungengefäße	31
3.3 Die Bedeutung der einzelnen Komplexe der Atmungskette für die ROS-Bildung	33
3.3.1 Die Hemmung des Komplexes II durch 3-NPA oder TTFA unterdrückt selektiv die Hypoxie-induzierte ROS-Produktion	33
3.3.2 Hypoxie reduziert die SDH-Aktivität des Komplexes II der Atmungskette	34
3.3.3 Unterdrückung der hypoxie-induzierten ROS-Produktion durch Hemmung des Komplexes III mittels Antimycin A	37
3.3.4 Kein Einfluss der Hemmung des Komplexes IV mittels NaN_3 auf die ROS-Produktion	37
4. Diskussion	38
5 Zusammenfassung	49
6 Summary	50
7 Literaturverzeichnis	51
8 Erklärung	68
9 Publikation	69
10 Danksagung	69

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua dest	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CLSM	Konfokales Laserscanning-Mikroskop
CO ₂	Kohlendioxid
Cox	Cytochrom-c-Oxidase
Cu	Kupfer
DAF-2T	4,5-Diaminofluorescein-Triazole
DCF	2', 7'- Dichlorofluoreszein
DCFH	Dichlorodihydrofluoreszein
DCFH-DA	2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
DPI	Diphenyleneiodonium
ETK	Elektronentransportkette
FAD	Flavinadenindinucleotid
Fe ²⁺	Eisen (II) Ionen
Fe-S	Eisen-Schwefel-Cluster
FIH-I	Factor inhibiting HIF-1
FMN	Flavinmononucleotid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ R123	Dihydrorhodamin 123
HIF	Hypoxia inducible factor
HIF-PH	HIF-Prolylhydroxylase
HPV	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
MEM	Minimal Essential Medium
MRC	Mitochondrial respiratory chain
NaN ₃	Natriumazid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
3-NPA	3-Nitropropionsäure
NO	Stickstoffmonoxid

NOX	NADPH Oxidase
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
O ₂	molekularer Sauerstoff
PASMC	pulmonary arterial smooth muscle cells
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCLS	präzis geschnittene Lungenschnitte (precision cut lung slices)
PFA	Paraformaldehyd
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PP	Phosphatpuffer
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SOD	Superoxiddismutase
TfR	Transferrinrezeptor
TTFA	2-Theonoyltrifluoroacetone
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Lunge

Die Lunge erfüllt die lebensnotwendige Funktion der Atmung, indem sie den Gasaustausch zwischen Atemluft und Blut ermöglicht. Durch Diffusion kann Sauerstoff aus der Atemluft ins Blut aufgenommen bzw. CO₂ aus dem Blut an die Luft abgegeben werden. In ihren Alveolen findet der Gasaustausch durch Diffusion zwischen der eingeatmeten Luft und dem Blut in den Lungenkapillaren statt. Das Blut transportiert den Sauerstoff zu allen Geweben des Körpers, wo er durch Diffusion aus dem Kapillarblut in die Zellen gelangt. Gleichzeitig nimmt dieses Kapillarblut das Kohlendioxid (CO₂) auf, das im aeroben Stoffwechsel entsteht, und transportiert es zu den Lungen (Dunker, 1994).

1.1.1 Die intrapulmonalen Atemwege

Die 300-500 Millionen Alveolen der Lunge sind über einen in vielen Teilungsgenerationen aufgespalteten Bronchialbaum mit der Trachea verbunden. Bis zu den Endbronchiolen (Bronchioli terminales), die die letzte Strecke des rein konduktiven Luftwegs darstellen, werden je nach Lungensegment und Lungenregion 18-25 dichotome Teilungen ausgebildet, daran schließen sich noch mehrere Teilungsgenerationen von bereits Alveolen tragenden Bronchiolen (Bronchioli respiratorii) an. Aus den Bronchioli respiratorii gehen die Ductus alveolares als terminales Gangsystem hervor, die jeweils blind in Sacculi alveolares enden (Dunker, 1994). Obwohl die Lunge des Menschen und der Maus grundsätzlich ähnlich aufgebaut sind, unterscheiden sie sich in manchen Aspekten deutlich voneinander. So besteht beim Menschen der rechte Lungenflügel aus drei Lappen (Lobus superior, Lobus medius und Lobus inferior) und der linke Lungenflügel setzt sich aus Lobus superior und Lobus inferior zusammen. Bei der Maus besteht der rechte Lungenflügel aus vier Lappen und der linke Lungenflügel aus nur einem Lappen (Kellner et al. 2012, Pan et al. 2019). Während beim Menschen die Luftwege ein dichotomes, d.h. ein symmetrisches Verzweigungsmuster aufweisen, findet man bei Mäusen ein monopodiales Aufzweigungsmuster, das bedeutet, dass aus einem in die Peripherie ziehenden zentralen Bronchiolus laterale Bronchioli abzweigen. Desweiteren weisen die Bronchien der Maus im Gegensatz zu den humanen Bronchien keine Knorpelplatten in der Wandung auf und es werden oft keine Bronchioli respiratorii ausgebildet, so dass die Alveolen in direkter Fortsetzung der Bronchioli terminales ausgebildet werden (Suarez et al. 2012) Abbildung 1 (Abb.).

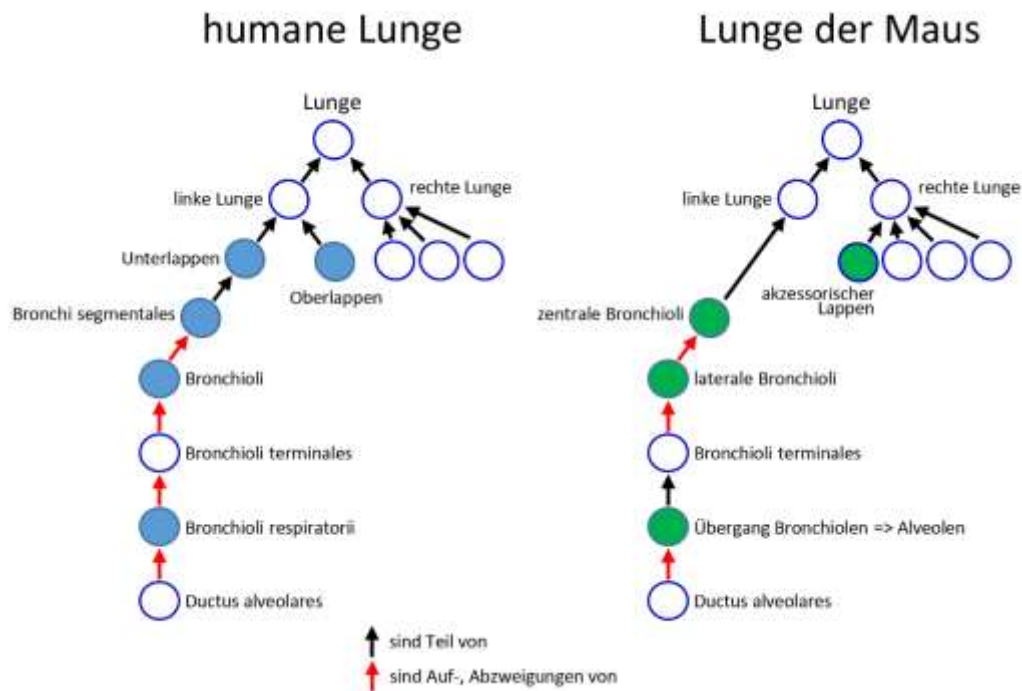


Abb. 1: Schematische Darstellung der leitenden Atemwege bei Mensch und Maus. Die Kreise ohne Farbe weisen auf eine ähnliche strukturelle Organisation und Terminologie hin. Diejenigen mit Farbe weisen auf Unterschiede in der strukturellen Organisation hin. Unterschiede zwischen Mensch und Maus in Bezug auf die Beziehungen zwischen Teilen und Verzweigungsteilen sind jeweils mit schwarzen und roten Pfeilen hervorgehoben, was die Unterschiede in Größe und Komplexität der Lunge von Menschen und Maus widerspiegelt. (nach Pan et al. 2019)

1.1.2 Die Blutgefäße der Lunge

Das Herz pumpt durch rhythmische Kontraktionen das Blut durch die Blutgefäße des Körpers. Die rechte Herzhälfte leitet das Blut in den Lungenkreislauf, wo CO_2 abgegeben und O_2 aufgenommen wird, und die linke Herzhälfte pumpt das Blut in den Körperkreislauf, um die Körperzellen mit O_2 und Nährstoffen zu versorgen bzw. CO_2 abzutransportieren. Da der Blutdruck im Lungenkreislauf deutlich niedriger ist als im Körperkreislauf (20/8 mmHg versus 120/80 mmHg), ist die Media in den Lungenarterien deutlich schwächer ausgebildet als in den Arterien des systemischen Kreislaufs. Beim Lungenkreislauf wird das Blut vom rechten Vorhof über die rechte Kammer in den Truncus pulmonalis geleitet, der sich in zwei Aa. pulmonales aufgabelt, die mit ihren Ästen die Vasa publica der Lunge darstellt. Die Äste dieser Gefäße folgen den Aufzweigungen des Bronchialbaums bis in die Peripherie. Aus den immer dünner werdenden Gefäßen gehen schließlich die Kapillaren hervor, die netzartig die Alveolen

umhüllen und damit den Gasaustausch ermöglichen. Die in der Peripherie verlaufenden Äste der Vv. pulmonales verlaufen zunächst unabhängig von den Arterien in den interlobulären und intersegmentales Bindegewebssepten. Erst wenn sie sich dem Lungenhilus nähern, treten sie in das peribronchiale Bindegewebe ein. Im Gegensatz zum Menschen lagern sich bei Mäusen die Venen sofort wieder dem Bronchialbaum an (Suarez et al. 2012). Eine weitere Besonderheit der Mauslunge ist, dass die kleinen Lungenarterien (Außendurchmesser von 20 µm) noch muskularisiert sind; beim Menschen wird eine Hülle aus glatten Muskelzellen bei diesem Gefäßkaliber als Ausdruck einer pulmonalen Hypertension angesehen (Suarez et al. 2012). Die Vasa privata versorgen beim Menschen die Bronchien, die Gefäße der Vasa publica und das umgebende Bindegewebe mit O₂ und Nährstoffen. Die 1-3 Rami bronchiales entspringen entweder direkt aus der Aorta thoracica oder aus den 3. oder 4. Interkostalarterien und folgen den Bronchi bis zu den Bronchioli terminales. Das Blut aus den Kapillarnetzen wird in Vv. bronchiales gesammelt und letztlich in die V. azygos bzw. hemiazygos eingeleitet.

1.2 Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

Bereits im Jahre 1894 beobachteten die britischen Forscher John Rose Bradford und Henry Percy Dean im Tierversuch an Hunden unter Hypoxie einen Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes. 1946 haben Ulf von Euler und Göran Liljestrand als Erste den Zusammenhang zwischen Ventilation und Perfusion der Lunge erkannt und entsprechend spricht man heute vom von-Euler-Liljestrand-Mechanismus bzw. der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HVP). Die HPV sorgt dafür, dass bei einer lokalen Minderbelüftung der Lunge das Blut durch Kontraktion der versorgenden Arterien aus den schlecht ventilierten in besser belüftete Lungenbereiche geleitet wird; es findet also eine Anpassung der Perfusion an die Ventilation statt (Dunham-Snary et al. 2017). Dieser sehr vorteilhafte Mechanismus kann allerdings zu einem Problem werden, wenn es zu einer generalisierten Hypoxie kommt, wie beispielsweise durch einen Aufenthalt in großer Höhe oder durch Erkrankungen wie COPD, Lungenfibrose oder Schlafapnoe. Dann kann sich in Folge der HPV eine pulmonale Hypertonie entwickeln, die zu einer erhöhten Belastung des rechten Herzens und letztlich zu einem lebensbedrohlichen Rechtsherzversagen führen kann (Sommer et al. 2015).

Eine HPV konnte in allen bisher untersuchten Säugetieren (Sylvester et al. 1980, Weissmann et al. 1995, Weissmann et al. 2004), in Vögeln (Fedde, 1998) und in Reptilien (Skovgaard et al. 2005) nachgewiesen werden.

Trotz intensiver Forschungsarbeiten konnten bis zum Beginn dieser Arbeit weder der Sauerstoff-Sensor noch der Signalweg, der zur HPV führt, endgültig identifiziert werden (Weissmann et al. 1995, Sommer et al. 2010, Paddenberg et al. 2012, Strielkov et al. 2017). Um Antworten auf die Frage nach dem Sauerstoff-Sensor bzw. dem Signalweg zu erhalten, wurden verschiedene Untersuchungsmodelle verwendet; z. Bsp. ist die HPV bei Mäusen *in vivo* als Anstieg des rechtsventrikulären Drucks nachweisbar, in isolierten Lungen der Maus als Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks, in isolierten intrapulmonalen Arterien als Erhöhung der Kontraktionskraft und in Präzisionsschnitten der Lunge (Precision-Cut Lung Slices; PCLS) als Abnahme der luminalen Fläche (Weissmann et al. 1995, Leach et al. 2001, Paddenberg et al. 2006, Strielkov et al. 2013). Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass sich der Ablauf der HPV in verschiedenen Spezies und verschiedenen Segmenten des pulmonal-arteriellen Systems unterscheidet. An Ringen von isolierten Pulmonalarterien der Ratte, die im Myographen eingespannt waren, wurde eine biphasische Antwort auf Hypoxie beobachtet: Auf eine rasch einsetzende, kurz anhaltende Kontraktion (Phase 1) erfolgte zunächst eine unvollständige Relaxation und dann eine länger anhaltende Tonuserhöhung (Phase 2). Interessanterweise erforderte nur die Phase 1-Reaktion ein intaktes Endothel des Gefäßrings (Bennie et al. 1991). Diese Befunde implizieren die Existenz unterschiedlicher Sauerstoff-Sensoren/Signalwege. Das Ausmaß der Kontraktion während der Phase 1 kann sehr variabel sein. Mehrere Studien zeigten einen Anstieg des Gefäßwiderstandes um 10-300% im Vergleich zu Ausgangswerten (Smith and Schumacker 2019).

Die HPV verläuft allerdings nicht in allen Gefäßen biphasisch. Beispielsweise haben Paddenberg et al. (2006) die HPV an PCLS der Mauslunge untersucht und beobachtet, dass intrapulmonale Arterien unter Hypoxie eine sofort beginnende, monophasische Kontraktion zeigen, die nach 20 bis 30 Minuten ihr Maximum erreicht, nach 40 Minuten nachlässt und nach 80 Minuten nicht mehr nachweisbar ist. Die HPV verläuft auch nicht in allen Gefäßabschnitten mit gleicher Intensität ab; besonders stark reagieren die kleinen intrapulmonalen Gefäße auf Hypoxie. Schwenke et al. 2007 haben an anästhesierten Ratten das Ausmaß der HPV intrapulmonaler Gefäße mit Durchmessern zwischen 100 µm und 500 µm untersucht und dabei die stärkste Reaktion (25% Abnahme des Durchmessers) bei Gefäßen mit Durchmessern von 200-300 µm beobachtet. An PCLS

der Maus war die HPV der kleinen intra-azinären Gefäße mit Durchmessern von 20–50 µm deutlich ausgeprägter als die der größeren, prä-azinären Gefäße mit Durchmessern von 51–100 µm (Paddenberg et al. 2006).

Chronische Hypoxie führt zu einem vaskulären Remodelling, d.h. es kommt u.a. zur verstärkten Proliferation der glatten Muskelzellen in den kleinen Pulmonalarterien und zur Einwanderung von Fibroblasten, so dass sich die Wandung der Gefäße verdickt mit der Folge eines erhöhten Lungenwiderstands (Stenmark et al. 2006). Auf diese Prozesse wird im Folgenden nicht mehr eingegangen.

1.3 Die Suche nach dem Sensor: NADPH-Oxidasen und Mitochondrien

Trotz intensiver Forschungsarbeiten war zu Beginn dieser Arbeit immer noch unklar, wie Änderungen des Sauerstoffpartialdruck (pO_2) gemessen und welche Signalwege unter Hypoxie zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien führen und damit letztlich die Vasokonstriktion auslösen. Als mögliche Kandidaten eines Sauerstoffsensors werden u.a. NADPH-Oxidasen und Mitochondrien diskutiert.

1.3.1 NADPH-Oxidasen als Sensor

NADPH-Oxidasen gehören zu den Proteinen, die als Sauerstoffsensor diskutiert werden. Ihr besonderes Kennzeichen ist, dass sie die einzige Enzym-Familie darstellen, deren alleinige Funktion die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist, und das sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen (Cave et al 2006).

NADPH-Oxidasen sind Multiproteinkomplexe, die Elektronen von NADPH auf molekularen Sauerstoff übertragen und ihn dadurch zum Superoxidanion reduzieren. Nachgeschaltet kann das hochreaktive Hyperoxidanion als Ausgangsprodukt für die Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies fungieren. So kann die Superoxid-Dismutase eine sogenannte Disproportionierung katalysieren, durch die das deutlich stabilere Wasserstoffperoxid entsteht, ein neutrales, wasserähnliches Molekül, das sehr leicht in Zellen eindringen kann. Wasserstoffperoxid kann durch Aufnahme von Elektronen zu einem Hydroxidion und einem Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$) zerfallen, das wiederum mit einer Vielzahl von Molekülen reagieren kann.

Die Familie der NADPH-Oxidasen umfasst insgesamt 7 Mitglieder: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 und Duox2. Funktionell kann man zwischen phagozytären und nicht-

phagozytären NADPH-Oxidasen unterscheiden. Die phagozytären NADPH-Oxidasen, die u.a. von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, produzieren auf ein bestimmtes Signal hin große Mengen von Superoxidanionen (O_2^-), die antibakteriell wirken. Dabei steigt der extramitochondriale O_2 -Verbrauch drastisch an, so dass man vom "respiratory burst" spricht (Forman und Torres 2002). Hauptvertreter der phagozytären NADPH-Oxidasen ist Nox2.

Alle NADPH-Oxidasen sind aus zwei membrangebundenen und mehreren zytosolischen Untereinheiten zusammengesetzt. Die Isoform Nox2 besteht aus den membrangebundenen Untereinheiten gp91phox (=Nox2) und p22phox, die zusammen den Flavozytochrom-b558-Komplex bilden, und den drei Untereinheiten p47phox, p67phox und p40phox, die sich im unstimulierten Zustand im Zytosol der Zelle befinden (Henderson and Chappel 1996, Clark 1999). Dabei steht die Bezeichnung „phox“ für „Phagozyten-Oxidase“. Die Untereinheit gp91phox bindet NADPH, FAD und zwei Häm und ist zuständig für den Elektronentransfer durch die Membran. Die zytosolischen Proteine gelangen nach Stimulation zur Plasmamembran und assoziieren mit dem Cytochrom b558. Kleine GTPasen wie z. Bsp. Rac2 sind an der Regulation der NADPH-Oxidasen beteiligt (Pick 2014).

Isoformen der NADPH-Oxidase kommen auch in nicht-phagozytären Zellen vor. NADPH-Oxidasen, die von Zellen der Blutgefäße exprimiert werden, werden unter dem Begriff „vaskuläre NADPH Oxidasen“ zusammengefasst und stellen die Hauptquelle von ROS im Gefäßsystem dar. Im Gegensatz zu den phagozytären NADPH-Oxidasen generieren die vaskulären Formen wesentlich geringere Mengen an ROS. Die Rate der Superoxidproduktion in vaskulären Zellen liegt im nano- bis mikromolaren Bereich; bei den Phagozyten im mikro- bis millimolaren Bereich (Rueckschloss et al. 2001).

ROS spielen in allen Zelltypen der Blutgefäße eine wichtige Rolle: Beispielsweise sind sie in Endothelzellen an der Regulation von Apoptose und Angiogenese beteiligt (Taniyama und Griendling, 2003), und in glatten Muskelzellen und Fibroblasten spielen sie eine wichtige Rolle bei Proliferation und Migration (Rey und Pagano, 2002). Von den 7 NADPH-Oxidase-Isoformen sind 4 Isoformen in den Zellen der Gefäße nachweisbar: Nox1, Nox2, Nox4 und Nox5. Jeder Zelltyp zeigt dabei ein charakteristisches Expressionsmuster dieser Isoformen (Konior et al. 2014). Die zuerst in Phagozyten nachgewiesene Nox2 ist die am häufigsten vorkommende Isoform und wird von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten der Adventitia und perivaskulären Adipozyten exprimiert (Lassègue und Clempus 2003, Van Buul et al. 2005, Paravicini

und Touyz 2008). Nox1 und Nox4 wurden in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten nachgewiesen (Lassègue und Griendling 2010). Nox5 kommt in Endothelzellen und glatten Muskelzellen vor (Touyz et al. 2019).

Mittal et al. (2007) haben Mäuse für 3 Tage bzw. 3 Wochen unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen gehalten und anschließend die Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten Nox1, Nox2, Nox4, p22phox, p40phox, p47phox, p67phox sowie NoxO1 und NoxA1 mittels RT-PCR analysiert. Nur die mRNA der Untereinheit Nox4 war in den hypoxischen Mäusen im Vergleich zu den normoxischen Tieren signifikant erhöht. Immunhistochemisch konnten Mittal et al. Nox4 in der Media der kleinen Lungengefäße lokalisieren. 48-stündige Hypoxie führte bei isolierten, kultivierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (pulmonary arterial smooth muscle cells = PASMC) zu einer Hochregulation der *Nox4*-mRNA. Wurden PASMC mit entsprechender siRNA transfiziert, so war die *Nox4*-mRNA Menge signifikant verringert, die Proliferationsrate reduziert und die Zellen bildeten weniger ROS (Mittal et al. 2007). Hemmung der NADPH-Oxidasen mit Diphenyleneiodonium (DPI) führt an isolierten Pulmonalarterien der Ratte zum Verlust der Fähigkeit zur HPV (Thompson et al. 1998). Allerdings muss man dabei berücksichtigen, dass DPI auch ein potenter Inhibitor der NO-Synthese von Makrophagen und Endothelzellen ist und auch andere Flavoenzyme hemmt (Stuehr et al. 1991). Archer et al. (1999) haben Mäuse untersucht, denen die gp91phox Untereinheit der NADPH-Oxidase fehlt, und haben an isolierten Lungen keinen Unterschied in der HPV im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT) gefunden. Isolierte, perfundierte Lungen von Nox4 knock-out Mäusen zeigen die gleiche biphasische Hypoxie-Antwort wie WT-Mäuse (Veith et al. 2016). Diese und andere Studien implizieren, dass NADPH-Oxidasen möglicherweise in den durch Hypoxie ausgelösten Signalweg involviert sind, aber nicht den eigentlichen Sensor darstellen.

1.3.2 Mitochondrien als Sensor

Mitochondrien sind für den Hauptanteil des O₂-Bedarfs der Zelle verantwortlich und stellen damit einen idealen Kandidaten für die Funktion eines O₂-Sensors dar. Da Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Produktion von ATP spielen, wurde zunächst vermutet, dass ein Abfall des ATP-Spiegels aufgrund der verringerten oxidativen Phosphorylierung als Signal einer Hypoxie dienen kann. Studien an isolierten Zellen sowie an isolierten, perfundierten Lungen haben gezeigt, dass die hypoxie-induzierte Anpassung der Perfusion an die Ventilation bei pO₂-Werten von 25 bis 75 mmHg

eingeleitet wird (Murray et al. 1990, Madden et al. 1992, Weissmann et al. 1995, Sommer et al. 2010, Sommer et al. 2015). Die Atmungskette in den Mitochondrien arbeitet allerdings auch noch bei sehr niedrigen pO_2 -Werten; eine Abnahme der ATP-Produktion lässt sich erst bei pO_2 -Werten, die unter 7 mmHg liegen, detektieren (Chandel et al. 1998). Daher ist es unwahrscheinlich, dass eine Abnahme der ATP-Konzentration die Reaktion auf Hypoxie auslösen kann (Buescher et al. 1991). Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass es unter Hypoxie zu einer O_2 -abhängige Veränderung in der Bildung von ROS in den Mitochondrien kommt.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

ROS sind hochreaktive chemische Moleküle, die aufgrund der Elektronenakzeptanz des molekularen Sauerstoffs gebildet werden können. Zu den ROS gehören u.a. das Superoxid-Anion $O_2^{\cdot-}$, das Hydroxyl-Radikal OH^{\cdot} , der Singulett-Sauerstoff 1O_2 und das Wasserstoffperoxid H_2O_2 . Wichtige Entstehungsorte von ROS sind die mitochondriale Atmungskette (Loschen et al. 1973, Brand 2010) und membranständige NADPH-Oxidasen (D'Autréaux and Toledona 2007, Brandes et al. 2014). Früher wurden die in den Mitochondrien gebildeten ROS als toxisches Nebenprodukt der Elektronentransportkette (ETK) angesehen. Mittlerweile gibt es jedoch zahlreiche Studien, die belegen, dass ROS in niedriger Konzentration als physiologische Signalmoleküle eine wichtige Rolle spielen (McCord 1985, Cross et al. 1987, Brigelius-Flohé und Flohe 2011). Beispielsweise werden ROS von Immunzellen eingesetzt, um Viren und Bakterien zu eliminieren (Herb et al. 2019). Dabei ist es allerdings wichtig, dass die Menge an gebildeten ROS das physiologische Ausmaß nicht überschreitet, da es sonst zum sogenannten „oxidativen Stress“ kommen kann. Mögliche Folgen können Lipidperoxidation, Proteinoxidation und die Schädigung der DNA sein (von Zglinicki und Nikolaus 2007). In vaskulären Zellen gebildete ROS können redox-sensitive Prozesse wie Zellmigration, Wachstum, Apoptose, den Auf- bzw. Abbau extrazellulärer Matrixproteine und die Stimulation vieler Kinasen modulieren (Demiryurek et al. 1999, Touyz et al. 2004, Clempus et al. 2006). Eine Änderung in der Bildung von ROS spielt als Signalmechanismus bei der HVP vermutlich eine wichtige Rolle, denn über ROS können auch Prozessen wie die Ca^{2+} -Freisetzung und die Aktivierung von der AMP-Kinase moduliert werden. Strittig war allerdings längere Zeit, ob es unter Hypoxie zu einem Abfall oder zu einem Anstieg der ROS kommt.

1.5 Hypoxie-induzierter Anstieg der mitochondrialen ROS

Die ursprünglich von Archer und Kollegen vorgeschlagene Redoxtheorie der HPV postulierte, dass ROS durch die mitochondriale ETK in Reaktion auf Hypoxie in den glatten Muskelzellen der Lungenarterien als Folge des O₂-Abfalles abnimmt (Archer et al. 1989, Archer et al. 1993). Mittlerweile gibt es jedoch eine bedeutende Anzahl an Beweisen dafür, dass die ROS-Bildung unter Hypoxie in den Mitochondrien zunimmt und dass durch die ROS-Bildung in bestimmter Konzentration HPV ausgelöst wird (Leach et al. 2001, Liu et al. 2003, Guzy et al. 2005, Wang et al. 2007, Rathore et al. 2008, Waypa et al. 2006, 2010, 2013, Jung et al. 2013, Song et al. 2017, Smith and Schumacker 2019). Um die Veränderungen des Oxidationssignals bei Hypoxie zu verstehen, haben Waypa und Kollegen redox-sensitive Proteine gezielt in spezifischen subzellulären Kompartimenten von PSMCs beobachtet (Waypa et al. 2010). Diese Sensoren (roGFPs) sind Varianten von grün fluoreszierendem Protein, die ratiometrische Bewertungen der Thioloxydation liefern. Sie zeigen, dass die Oxidation während der Hypoxie in der mitochondrialen Matrix beträchtlich verringert, jedoch im mitochondrialen Intermembranraum und Cytosol deutlich erhöht ist (Waypa et al. 2010). Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung dieser Sensoren in murinen PCLS beobachtet (Desireddi et al. 2010).

Im Gegensatz zu PSMCs verringerte die akute Hypoxie die ROS-Bildung in Lungenfibroblasten je nach O₂-Konzentration mit abnehmender Tendenz (Pak et al. 2018).

1.6 Aufbau und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellenorganellen, die ursprünglich aus Bakterien stammen und von frühen eukaryotischen Zellen aufgenommen wurden (Lloreta-Trull und Seranno, 1998). Mitochondrien besitzen zwei Membranen, die die innen liegende Matrix begrenzen (Van der Laan et al. 2016). Die äußere Mitochondrienmembran grenzt das Mitochondrium zum Zytoplasma ab und enthält Kanäle für den Austausch von Molekülen und Ionen zwischen dem Mitochondrium und dem Zytosol. Aufgrund der Organisation der inneren Membran lassen sich 2 Typen von Mitochondrien unterscheiden: Bei steroidproduzierenden Zellen vorherrschend sind Mitochondrien vom tubulären Typ, bei denen die innere Membran in die Matrix ragende, schlauchförmige Ausstülpungen ausbildet. Die meisten Zellen unseres Körpers weisen jedoch Mitochondrien vom Cristae-Typ auf, bei dem die innere Membran leistenförmige Auffaltungen ausbildet, durch die ihre Oberfläche erheblich

vergrößert wird. In dieser Membran befinden sich u.a. die Enzymkomplexe der Atmungskette, die für die Produktion von ATP verantwortlich sind (Gilkerson et al. 2003, Pollard et al. 2003, Carr et al. 2005). Zwischen den beiden Membranen liegt der Intermembranraum.

1.6.1 Die mitochondriale Atmungskette

In der Atmungskette werden die Elektronen von den in der Glykolyse und dem Citratzyklus reduzierten Coenzymen über eine Kette von Oxidoreduktasen schrittweise auf Sauerstoff übertragen, um eine Knallgasreaktion zu verhindern. Dabei sind die Komplexe I – IV dafür zuständig, die Elektronen kaskadenartig weiterzuleiten und schließlich auf molekularen Sauerstoff zu übertragen. Gleichzeitig werden an drei Stellen der Reaktionskette Protonen durch die Membran in den Intermembranraum gepumpt; die Energie dieses Protonengradienten wird von der ATP-Synthase (Komplex V) für die Synthese von ATP genutzt (Abb. 2).

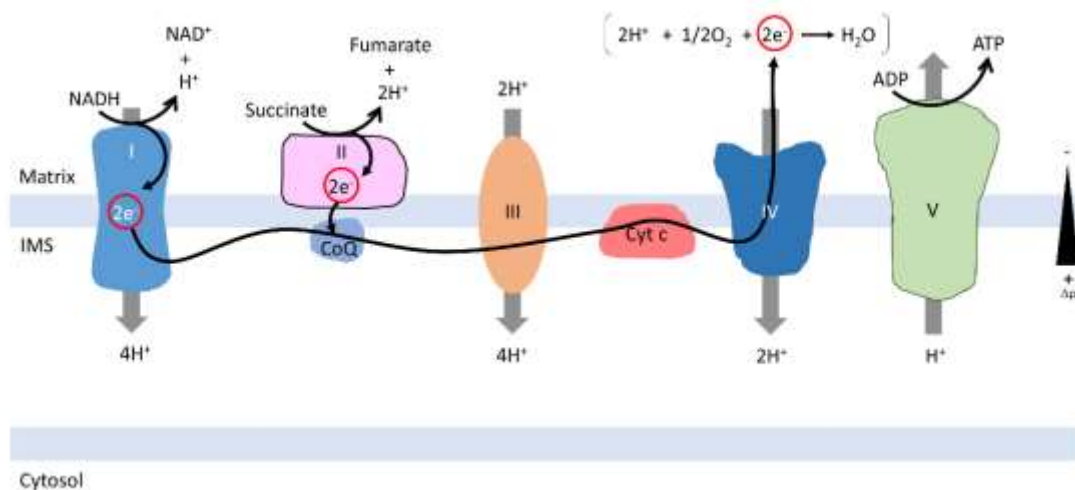
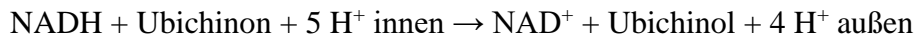


Abb. 2: Die Atmungskette besteht aus 5 Enzymkomplexen, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Die Komplexe I – IV stellen Redoxsysteme dar, über die Elektronen kaskadenartig weitergeleitet werden, bis schließlich molekularer Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor reduziert wird. Dabei nutzen die Komplexe I, III und IV die Energie, um Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu pumpen und damit einen elektrochemischen Protonengradienten aufzubauen. Die ATP-Synthase (Komplex V) nutzt diese protonenmotorische Kraft, um aus ADP und anorganischem Phosphat ATP und H₂O herzustellen. Von links nach rechts sind in dem Schema die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I), die Succinat-Ubiquinon-Reduktase (Komplex II), die Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III), die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) und die F₁-F₀-ATP-Synthase (Komplex V) dargestellt. Nach oben ragen die Komplexe in die Matrix, nach unten grenzen sie an den

Intermembranraum (IMS). Abkürzungen: ATP: Adenosin-5'-triphosphat, NADH: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid. (modifiziert nach Letts et al. 2017)

1.6.1.1 NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I)

Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) ist das erste Enzym der mitochondrialen Atmungskette. Er hat eine molekulare Masse von etwa 1 MDa und ist damit der größte bekannte Membranproteinkomplex. Komplex I verknüpft die Oxidation von NADH mit der Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol und verbindet das mit dem Transport von Protonen aus der Matrix (innen) in den Intermembranraum (außen) des Mitochondriums:



Bei der Oxidation von NADH in der Matrix werden die Elektronen über Flavinmononucleotid (FMN) und eine Reihe von Eisen-Schwefel-Cluster zu Ubichinon weitergeleitet, so dass Ubichinol entsteht (Zhu et al. 2016).

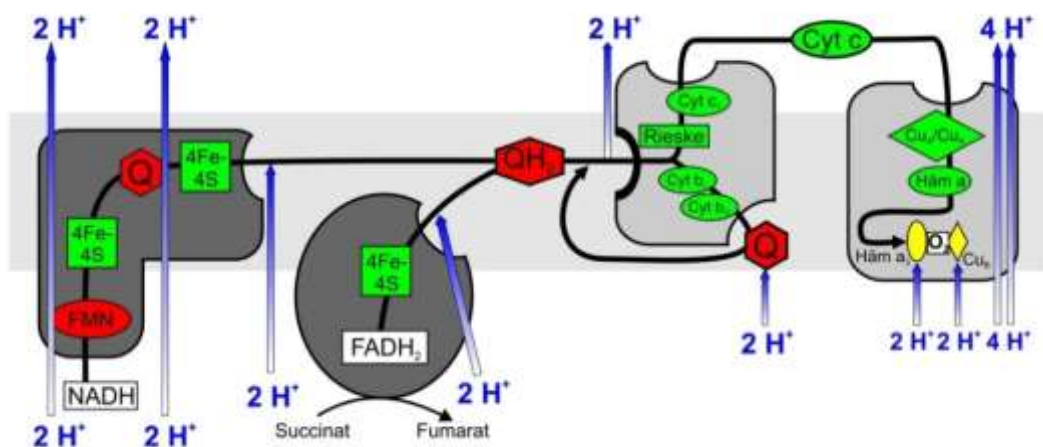


Abb. 3: Schematische Darstellung der mitochondrialen Elektronentransportkette. Elektronen werden von den Komplexen I und II über Ubichinon auf den Komplex III und weiter auf den Komplex IV übertragen. Innerhalb des Komplexes III gibt es eine Aufspaltung in zwei Richtungen der Weiterleitung der Elektronen: Das erste Elektron aus Ubichinon (Q) wird in den Eisen-Schwefel (Fe-S) -Cluster des Komplexes III überführt, wodurch Ubisemichinon entsteht, und das zweite Elektron wird von Ubisemichinon nach Cytochrome bL (cyt bL) und weiter zu Cytochrom bH (cyt bH). Die Reoxidation von CytbH erfolgt durch Ubichinon und Ubisemichinon. Römische Nummerierung der Komplexe I-IV

(von Onkel Dagobert, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Atmungskette_detail.jpg)

1.6.1.2 Succinat-Dehydrogenase (Komplex II)

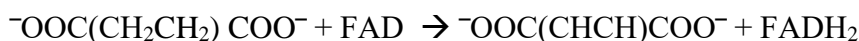
Komplex II (Succinat-Dehydrogenase, Succinat: Ubichinon-Oxidoreduktase) ist ein Enzym, das sowohl an der Atmungskette als auch am Citratzyklus beteiligt ist. Es koppelt die in der Matrix stattfindende Oxidation von Succinat zu Fumarat an die in der inneren Mitochondrienmembran ablaufende Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol (Abb. 3). Die Succinat-Dehydrogenase der Eukaryoten besteht aus den vier Untereinheiten SDHA, SDHB, SDHC und SDHD (Yankovskaya et al. 2003, Sun 2005). SDHA ist ein Flavoprotein, das FAD kovalent gebunden hat und die Bindungsstelle für Succinat enthält. SDHB ist ein Eisen-Schwefel-Cluster-Protein, das drei Fe-S-Cluster enthält. Zusammen bilden die hydrophilen Untereinheiten SDHA und SDHB die katalytische Domäne, die in den Matrixraum ragt. Die hydrophoben Untereinheiten SDHC und SDHD sind durch ein Häm b verbunden und bilden den Membrananker. Damit kann die Struktur von SDH in zwei Hauptmodule geteilt werden: SDHA und SDHB bilden die wasserlösliche extrinsische Membrandomäne, während SDHC und SDHD als nichtwasserlösliche Membrandomäne fungieren (Dibrov et al. 1998, Cecchini 2003).

Komplex II katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat und die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol. Dabei tritt das im Citratzyklus bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat als Wasserstoffüberträger entstehende FADH_2 – im Gegensatz zum NADH – nicht frei auf, sondern ist als prosthetische Gruppe an SDHA gebunden. Seine Reoxidation erfolgt durch die Nacheinanderschaltung der Übertragungen jeweils eines Elektrons beginnend bei den Eisen-Schwefel-Clustern Fe_2S_2 , Fe_4S_4 , Fe_3S_4 über Häm b auf Ubichinon. Interessant ist dabei, dass der Komplex II Wasserstoff von Succinat auf Ubichinon überträgt, ohne dass daran ein Protonentransport über die innere Mitochondrienmembran gekoppelt ist. Dadurch liegt die Änderung der freien Standardenthalpie (ΔG^0) fast bei Null, so dass die Reaktion grundsätzlich reversibel ablaufen kann. Manche Mikroorganismen machen sich diese Situation für die Konservierung von Energie zunutze (Karlson et al. 1994).

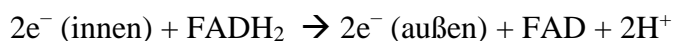
Zusammenfassend lässt sich die Funktion von Komplex II wie folgt beschreiben:

Komplex II katalysiert

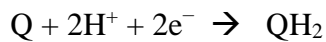
die Oxidation von Succinat zu Fumarat mit FAD als Oxidans:



den gleichzeitigen Transport von zwei Elektronen über die Membrangrenze:



mithilfe dieser Elektronen die Reduktion von Ubichinon (Q) zu Ubichinol (QH₂):



Aus wikipedia (<https://de.wikipedia.org/wiki/Succinat-Dehydrogenase>).

1.6.1.3 Cytochrom-bc₁-Komplex (Komplex III)

Komplex III (Cytochrom-bc₁-Komplex, Ubichinon: Cytochrom c-Oxidoreduktase) ist eine wesentliche und zentrale Komponente der Atmungskette. Er ist ein Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 240 kDa, das aus elf Untereinheiten aufgebaut ist. Für seine Funktion essenziell sind dabei nur drei katalytischen Untereinheiten mit insgesamt vier Kofaktoren: Cytochrom b mit zwei Häm b (bL und bH), Cytochrom c₁ mit einem Häm c und das Rieske Eisen-Schwefel-Protein mit einem 2Fe-2S-Cluster (Abb. 3).

Das Enzym fungiert als Oxidoreduktase, indem es in einer gekoppelten Reaktion die Oxidation von Ubichinol mit der Reduktion von Cytochrom c und der Translokation von Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum katalysiert. Diese gekoppelte Reaktion wird als Q-Zyklus bezeichnet. (Kim et al. 1998, Iwata et al. 1998, Berry et al. 2000, Crofts et al. 2004, Xia et al 2007, Hunte et al. 2008) (Abb. 4).

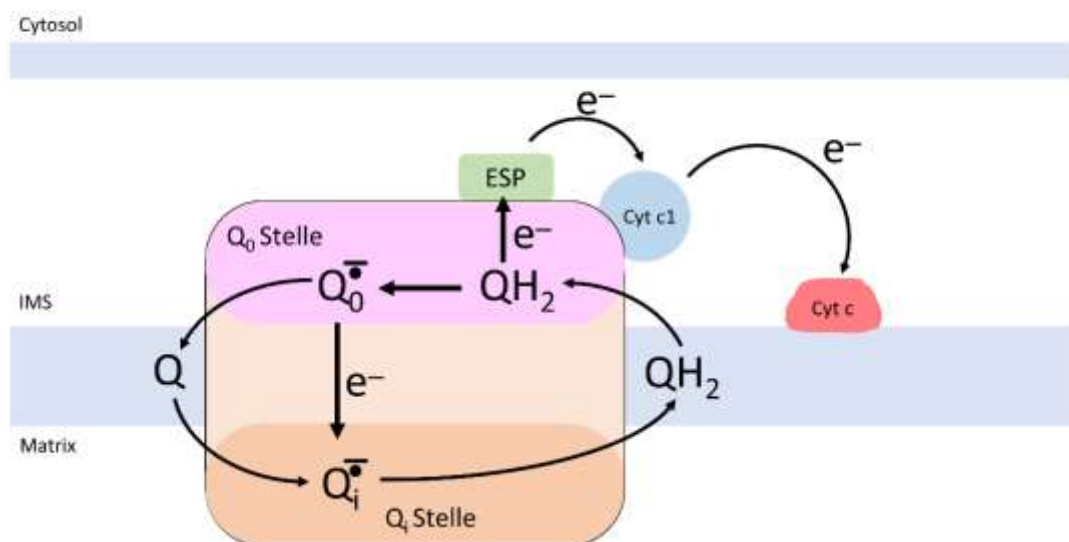


Abb. 4: Schematische Darstellung des Q-Zyklus am Komplex III der Atmungskette. Ein vereinfachtes Modell des Q-Zyklus bei Komplex III. Der Komplex III oxidiert das Coenzym Ubichinol (QH₂), dessen Zyklus als Q-Zyklus bezeichnet wird. Der erste Schritt

ist die Oxidation von QH_2 an der Q_0 -Stelle, bei der ein Elektron (e^-) auf das Eisen-Schwefel-Protein (ESP), Cytochrom c 1 (Cyt c 1) und Cytochrom c (Cyt c) übertragen wird, das es dann an den nächsten Komplex in der Elektronentransportkette, die Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV, in dieser Abb. nicht dargestellt), weitergibt. Durch die Oxidation von QH_2 zur Übertragung eines e^- in der ETK entsteht ein instabiles Semichinon ($Q\dot{o}^-$), das ein e^- über Leitungsbahnen von der Q_0 -Stelle zur Q_i -Stelle abgibt. An der Q_i -Stelle wird ein Coenzym Q-Molekül (Q) durch das gespendete e^- zu QH_2 reduziert, und der Zyklus beginnt erneut (modifiziert nach Karlson et al. 1994).

Komplex III hat zwei Bindungs- und Reaktionsstellen für Ubichinon, die jeweils zum Intermembranraum bzw. zur Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran orientiert sind. Wenn Ubichinol Wasserstoff abgibt, werden jeweils zwei H^+ -Ionen nach außen transportiert und dabei wandert ein Elektron schrittweise über das Rieske Eisen-Schwefel-Protein und über Cytochrom c_1 zum Cytochrom c und ein zweites Elektron reduziert Ubichinon zu Semichinon. Von hier aus wird das Elektron über die Kofaktoren Cytochrom b_{562} und Cytochrom b_{566} auf das matrixnah lokalisierte Ubichinon übertragen, so dass es zu Semichinon reduziert wird. Das kann nun ein Elektron vom Komplex II sowie zwei H^+ aus dem Matrixraum aufnehmen, so dass Ubichinol entsteht, das dem Komplex III als Substrat dient.

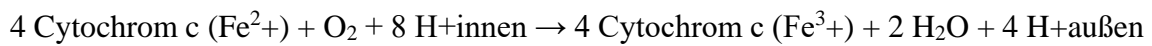
Damit werden in 2 Durchgängen des Q-Zyklus zwei Moleküle Cytochrom c reduziert und 4 Protonen in den Intermembranraum gepumpt (Trumpower 1990, Miyoshi 2001, Esser et al. 2004, Cape et al 2005).

1.6.1.4 Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV)

Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase, Cytochrom c: O_2 -Oxidoreduktase) bildet den terminalen Komplex der ETK und katalysiert in einer gekoppelten Reaktion 1. die Oxidation von Cytochrom c mit der Reduktion von elementarem Sauerstoff zu Wasser und 2. den Transport von 4 Protonen von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum. Dadurch trägt Komplex IV dazu bei, den Protonengradienten für die ATP-Synthese aufrechtzuerhalten (Abb. 3). Nach Beginn der vorliegenden Arbeit konnte die Rolle des Komplexes IV bei Sauerstoffsensormechanismus erweitert erhärtet werden (Sommer et al. 2017). Auf diese Arbeit wird in der Diskussion eingegangen.

Die Cytochrom c-Oxidase der Säuger ist ein multimeres Enzym, das von 14 Untereinheiten dualen genetischen Ursprungs gebildet wird (Papa et al. 2012, Timón-Gómez et al. 2017), von denen die größten, Cox1 - Cox3, im mitochondrialen Genom und die anderen im Kern kodiert sind. Die Cytochrom c-Oxidase enthält als prosthetische

Gruppen 2 Häm-Gruppen, die Cytochrome a und a₃ sowie zwei Kupfer-Zentren (CuA und CuB). Das CuA befindet sich an der Bindungsstelle für Cytochrom c und nimmt die löslichen Elektronen von Cytochrom c auf. Dann wird das Elektron über Cytochrom a zu Cytochrom a₃ weitergeleitet, wo es zusammen mit CuB die O₂-Reduktion katalysiert. Bei der Oxidation von vier Molekülen Cytochrom c kommt es zur Translokation von insgesamt 4 Protonen. Die Transportgleichung lässt sich wie folgt beschreiben:



Lit.: The Proton-translocating Cytochrome Oxidase (COX) Superfamily. In: https://de.wikipedia.org/wiki/Cytochrom-c-Oxidase#cite_note-4.

1.6.1.5 ATP-Synthase (Komplex V)

Komplex V besteht bei Säugern aus 16 verschiedenen Untereinheiten, die sich funktionell zu zwei Komplexen zusammenfassen lassen: Der hydrophile, globuläre Komplex F₁ katalysiert die Bildung von ATP und der hydrophobe, in die innere Mitochondrienmembran eingebaute Komplex F₀ transportiert Protonen. Daher wird der Komplex V auch als F₁F₀ ATP-Synthase bezeichnet. Nur die zwei Untereinheiten des F₀-Teils sind auf der mitochondrialen DNA kodiert; die anderen Untereinheiten sind auf der Kern-DNA verschlüsselt (Papa et al. 2012). Insgesamt hat Komplex V eine molekulare Masse von ca. 550 kDa. Er nutzt das elektrochemische Potenzial des Protonengradienten, um aus ADP und anorganischem Phosphat ATP zu bilden. Mechanistisch betrachtet besteht der Komplex V aus einem starren Anteil, der als Stator bezeichnet wird, und einer rotierenden Einheit, die man Rotor nennt. Durch den Protonengradienten wird der Rotor in Bewegung versetzt und sorgt dafür, dass sich die Konformation der katalytischen Untereinheit ändert und damit die Synthese und für die Freisetzung von ATP aus der Bindungsstelle des Enzyms ermöglicht wird (Papa et al. 2012) (Abb. 2).

1.7 Stickstoffmonoxid als Trigger der HPV

Stickstoffmonoxid (NO), das kleinste bekannte Signalmolekül, wird von drei Isoformen der NO-Synthase (NOS) in Gegenwart von Kofaktoren synthetisiert und gilt als der stärkste endogene Vasodilatator. Alle NOS verwenden L-Arginin und molekularen Sauerstoff als Substrate und benötigen die Cofaktoren reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADPH), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und (6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄). Alle NOS binden Calmodulin und enthalten Häm (Fleming und Busse 2003, Förstermann und Sessa 2012,

Li et al. 2012). Die Isoformen werden von drei verschiedenen Genen kodiert (Farah et al. 2018). Die neuronale NOS (nNOS oder NOS I) wird von Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert und spielt eine Rolle bei der neuronalen Plastizität sowie bei der zentralen Steuerung des Blutdrucks. Im peripheren Nervensystem fungiert von nNOS generiertes NO als Neurotransmitter, der u.a. an der Regulation der Darmperistaltik sowie der Vasodilatation beteiligt ist (Bredt et al. 1990, Förstermann und Sessa 2012, Van den Berg et al. 2018). Induzierbare NOS (iNOS oder NOS II) kann in vielen Zelltypen als Reaktion auf Lipopolysaccharid, Zytokine oder andere Wirkstoffe exprimiert werden. Induzierbare NOS erzeugt große Mengen an NO, die zytostatischen Wirkungen auf die parasitären Zielzellen haben. Induzierbare NOS trägt zur Pathophysiologie von Entzündungskrankheiten und septischem Schock bei (Radomski et al. 1990, Seimetz et al. 2011, Förstermann und Sessa 2012, Bayarri et al. 2021, Fysikopoulos et al. 2021). Endotheliale NOS (eNOS oder NOS III), die zuerst in Endothelzellen identifiziert wurde, ist für die vaskuläre Homöostase von entscheidender Bedeutung. Sie wird hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert.

NO ist zweifellos an der normoxischen Vasodilatation beteiligt, da der pulmonale Gefäßwiderstand unter normoxischen Bedingungen nach Hemmung der NOS erhöht wird. Der endotheliale NO-Stoffwechselweg wird in hohem Maße unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen reguliert, um das empfindliche Gleichgewicht zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation aufrechtzuerhalten (Boeger und Hannemann 2020). Viele kardiovaskuläre Risikofaktoren führen zu oxidativem Stress, eNOS-Entkopplung und endothelialer Dysfunktion im Gefäßsystem. Pharmakologisch kann der vaskuläre oxidative Stress durch Renin- und Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer, Angiotensin-Rezeptorblocker und Statine reduziert und die eNOS-Funktionalität wiederhergestellt werden. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen ebenfalls eine Verstärkung der HPV bei pharmakologisch blockierter NOS (Archer et al. 1989, Persson et al. 1990, Kantrow et al. 1997, Van den Berg et al. 2018). NO scheint die hypoxische Vasokonstriktion abzuschwächen, was darauf hindeutet, dass Personen mit beeinträchtigter NO-Produktion für die Entwicklung einer hypoxischen pulmonal-arteriellen Hypertonie anfälliger sind (Boeger and Hannemann 2020).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Mechanismen im Lungensystem, die für die Sauerstoffmessung und die Einleitung einer Hypoxie-induzierten Vasokonstriktion verantwortlich sind, sind trotz zahlreicher Untersuchungen noch nicht eindeutig identifiziert. Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden als frühe Mediatoren der hypoxischen Reaktion diskutiert. Studien zur hypoxie-regulierten NO-Produktion haben jedoch widersprüchliche Daten geliefert. Zusätzlich zu oder anstelle von NO können ROS wie das Superoxid anion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (OH^\cdot) als intrazelluläre Second Messenger fungieren, um Signalwege zu initiieren oder zu modulieren, die zur Vasokonstriktion der Zellen führen (Sauer et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir eine quantitative Analyse der NO- und ROS-Produktion durch Zellen in den Gefäßwänden der Mauslungen unter normoxischen bzw. hypoxischen Kulturbedingungen. Für diese Versuche wurden PCLS der Maus eingesetzt, bei denen einerseits die zelluläre Architektur der Gefäßwände erhalten blieb und andererseits Scherbeanspruchungen vermieden wurden. Die Lungenschnitte wurden in Gegenwart von 4,5-Diaminofluoresceindiacetat (DAF-2DA) oder 2,7-Dichlorofluoresceindiacetat (DCF-DA) als Fluoreszenzindikatoren für NO bzw. ROS inkubiert. Die fluoreszierenden Zellen innerhalb der Gefäßwände wurden quantifiziert. Die Quelle der normoxischen und hypoxischen ROS-Bildung wurde durch die Verwendung von Inhibitoren der Flavoproteine und der einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die FVB-Mäuse wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Paderborn, Deutschland) bezogen. Die Untersuchungen wurden an 41 vier bis sechs Wochen alten Mäusen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Die Tiertötung wurde vom Regierungspräsidium Giessen unter dem Aktenzeichen 19c 20/15c, GI 20/23 genehmigt. Die Tiere wurden bei einem 12 Stunden hell/dunkel Wechsel gehalten und hatten freien Zugang zu Nager-

Standardfutter und Wasser. Die Geschlechtszuordnung in den einzelnen Experimenten erfolgte zufällig.

2.1.2 Geräte und Laborbedarf

Geräte	Hersteller	Firmensitz
AxioVision 3.0-Software	Zeiss	D Wetzlar
Brutschrank	Typ BB 16, Heraeus	D Hanau
Druckpumpe	Alcatel Vacuum Tech.	Frankreich Annecy
Feinwaage	Sartorius	D Göttingen
Sterile 500 ml Einweg-Flaschenaufsatzfilter MF75, netzmittelfreies Celluloseacetat (SFCA), Porengröße 0,2 µm,	Nalgene Thermo Scientific	USA/ New York
Filterpapier	Schleicher + Schuell	D Dassel
Grobwaage	Sartorius	D Göttingen
Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 410	Zeiss	D Jena
Magnetrührer Ikamag	IKA Labortechnik	D Staufen
Mikrowelle	Siemens	D München
Multiwell-Platten (24 well)	Greiner Bio-One	D Frickenhausen
Operationsbesteck	Aesculap AG & Co. KG	D Tuttlingen
Porenfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius	D Göttingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf	D Hamburg
Sekundenkleber	UHU GmbH & Co. KG	D Bühl
Spritzen 10 ml, 1 ml	B. Braun	D Melsungen
SPSS Base 8.0	SPSS Software	D München
Venenverweilkanüle	B. Braun	D Melsungen
Vibratom	Leica	D Nussloch
Wärmeschrank	Typ B 5042, Heraeus	D Hanau
Wasserdestillationsanlage	Millipore GmbH	D Schwalbach

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Geräte, Software und des Laborbedarfs in alphabetischer Reihenfolge

2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Präparat	Firma	Firmensitz
Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (low melting agarose)	Bio-Rad	D München
Ammoniumnickelsulfat	Fluka Chemie AG	CH Buchs
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH & Co BioScience GmbH	D Karlsruhe
Antimycin A	Sigma-Aldrich	D München
4,5-Diaminofluoresceindiacetat (DAF-2DA)	Alexis Biochemicals	D Grünberg
2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat (DCF-DA)	Calbiochem-Novabiochem	D Bad Soden
Diphenyleneiodonium (DPI)	Alexis Biochemicals	D Grünberg
Dihydrorhodamin	Sigma-Aldrich	D Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	D Darmstadt
Dinatriumcarbonat	Merck	D Darmstadt
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	PAN-Biotech GmbH,	D Aidenbach
DMEM/F-12	Gibco	D Karlsruhe
Glycerol	Merck	D Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich	D Deisenhofen
Isoflorane	Abott	D Wiesbaden
Isopentan	Merck	D Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck	D Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck	D Darmstadt
L-Glutamin	PAN-Biotech GmbH	D Aidenbach
Minimal Essential Medium (MEM)	PAA Laboratories	D Coelbe
Natriumazid (NaN ₃)	Merck	D Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	D Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	D Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck	D Darmstadt
3-Nitropropionsäure (3-NPA)	Sigma-Aldrich	D München
Paraformaldehyd	Merck	D Darmstadt
Penicillin	PAN-Biotech GmbH	D Aidenbach
Pyruvat	PAN-Biotech GmbH	D Aidenbach
Rotenon	Sigma-Aldrich	D München
Saccharose	Merck	D Darmstadt
Streptomycin	PAN-Biotech GmbH	D Aidenbach
Thenoyltrifluoroacetone (TTFA)	Sigma-Aldrich	D München

Tab 2: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge

2.1.4 Puffer und Medien für die Organentnahme und die Kultivierung der PCLS

Agarose, Low-melting (3%):

0,6 g Low-melting Agarose werden in 20 ml Krebs-Ringer-Lösung eingewogen und im Mikrowellen-Ofen zum Sieden gebracht, so dass sich die Agarose vollständig löst. Um ein vorzeitiges Aushärten der Agarose zu vermeiden, wird sie zur Abkühlung in einen auf 37°C temperierten Wärmeschrank gestellt.

Gepuffertes Glycerol:

Glycerol und Puffer (50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung, mit 0,5 M Dinatriumcarbonat auf pH 8,6 eingestellt) werden im Verhältnis 2:1 gemischt.

Krebs-Ringer-Lösung:

0,35 g Kaliumchlorid, 7,8 g Natriumchlorid 0,21 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, 1,37 g Natriumhydrogencarbonat, 0,15 g Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) und 1,4 g D-Glukose werden in 1 l Aqua dest. aufgelöst. Der Puffer wurde 10 min mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begast, um einen pH-Wert von 7,4 einzustellen. Dann werden 2,8 ml einer 1 M Calciumchloridlösung zugefügt. Die Lösung wird durch einen 0,2 μm Porenfilter filtriert.

Paraformaldehyd (PFA, 4%) in 0,1 M Phosphatpuffer (PP):

40 g Paraformaldehyd werden in 500 ml Aqua des. langsam unter Rühren auf ca. 70°C erhitzt; die Zugabe von einigen Tropfen 2 M Natronlauge klärt die Lösung. Nach dem Abkühlen der Lösung werden 500 ml eines 0,2 M Phosphatpuffers zugegeben.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):

Zur Herstellung von Lösung A werden 27,6 g Natriumdihydrogenphosphat in einem Liter Aqua dest. gelöst; zur Herstellung von Lösung B werden 35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat in einem Liter Aqua dest. gelöst. Für die Gebrauchslösung werden 28,75 ml der Lösung A mit 96,20 ml der Lösung B vermischt. Nach Zugabe von

22,4 g Natriumchlorid wird die Lösung mit Aqua dest. auf 5000 ml aufgefüllt und es wird der pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Phosphatpuffer (0,2 M):

Dieser setzt sich aus 3,174 g Natriumdihydrogenphosphat in 115 ml H₂O (Lösung A) und 13,706 g Dinatriumdihydrogenphosphat in 385 ml H₂O (Lösung B) zusammen, deren Gemisch auf einen pH von 7,4 eingestellt wird. Der pH-Wert des Puffers wird auf 7,2 bis 7,4 eingestellt. Die Lösung wird durch einen 0,2 µm Porenfilter (Sartorius, Göttingen) membranfiltriert.

SDH-Reaktionslösung:

Der histochemische Nachweis der SDH-Aktivität in Lungenschnitten wurde in 2 verschiedenen Puffersystemen durchgeführt: in einem Kaliumphosphatpuffer und in einem Bikarbonatpuffer.

Die Herstellung der SDH-Reaktionslösung umfasst folgende Schritte:

Kaliumphosphatpuffer pH 7,6:

- 4,052 g K₂HPO₄ und 0,917 g KH₂PO₄ werden in 1,0 l Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt.

oder

Bikarbonatpuffer pH 7,6:

- 2,2 g NaHCO₃ und 0,14 g NaH₂PO₄ werden in 1 l H₂O gelöst und für 15 min mit Carbogen (5% CO₂, 95% O₂). begast. Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt.

Succinat-Puffer:

Zu jeweils 50 ml des Kaliumphosphat- bzw. Bikarbonatpuffers werden 150 µl einer 1 M MgCl₂ Stammlösung (Endkonzentration 3 mM MgCl₂) und 5 µl einer 100 mM NaN₃ Stammlösung gegeben (Endkonzentration 0,01 mM NaN₃). In 36 ml dieser Lösung werden 0,29 g Natrium-Succinat-Hexahydrat gelöst (Endkonzentration 30 mM Succinat) und die Lösung auf 37°C erwärmt.

Nitroblautetrazoliumchlorid/Penazinemethasulfat-Stammlösung (NBT/PMS SL): In 5 ml des Succinat-Puffers werden 28,5 mg NBT (Endkonzentration 5.7 mg/ml NBT) und 5 mg PMS (Endkonzentration 1 mg/ml PMS) gelöst und vor Licht geschützt auf Eis gelagert.

SDH-Reaktionslösung:

Direkt vor Gebrauch werden 36 ml Succinat-Puffer mit 4 ml NBT/PMS SL gemischt.

2.2 Organentnahme und Herstellung von PCLS aus Lungen der Maus

2.2.1 Entnahme des Thorax-Pakets, bestehend aus Herz und Lunge

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und zur Organentnahme in Rückenlage mittels Nadeln auf einer Styroporplatte fixiert. Das Fell der ventralen Körperseite wurde mit 70% EtOH desinfiziert und anschließend wurde die Haut entfernt. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden zum Ausbluten des Tieres die großen Gefäße (Aorta abdominalis, V. cava inferior) durchtrennt. Durch einen kleinen Schnitt ins Zwerchfell wurde der Kollaps der Lungen induziert, Rippen bzw. Clavicula wurden im Bereich der anterioren Axillarlinie beidseits durchtrennt und zusammen mit dem Sternum entfernt. Für das Befüllen der Lunge über die Trachea wurden die Glandula submandibularis und die infrahyalen Muskeln vor der Trachea entfernt und ein etwa 10 cm langer Zwirnsfaden zwischen Ösophagus und Trachea platziert. Anschließend wurde mit einer Federschere zwischen 2 benachbarten Knorpelspangen ein kleines Loch in die Luftröhre geschnitten. Nachdem der auf 37°C vorgewärmte, flexible Kunststoffkatheter einer Venenverweilkanüle 20G – 1,1 x 33 mm auf die mit der flüssigen Agarose gefüllten Spritze gesteckt, entlüftet und durch das kleine Loch in der Trachea platziert und mit dem Zwirnsfaden fixiert worden war, wurden die Lungen langsam mit der Agarose-Lösung gefüllt. Dieser Vorgang wurde beendet, wenn beide Lungen sich wieder zu einem der In vivo-Situation ähnlichem Volumen ausgedehnt hatten. Je nach Körpergewicht wurden dazu 1,2 ml bis 2 ml Agarose in die Lungen injiziert. Im nächsten Schritt wurden gleichzeitig der flexible Kunststoffkatheter aus der Trachea herausgezogen und der Zwirnsfaden zusammengezogen und verknotet, so dass keine Agarose aus der Trachea fließen konnte. Die Trachea wurde kranial der Ligatur durchtrennt, das Thorax-Paket bestehend aus Herz und Lunge aus dem Brustkorb herauspräpariert und zum Aushärten der Agarose in ein mit eiskaltem HEPES-Ringer-Puffer gefülltes Becherglas überführt.

2.2.2 Herstellung von PCLS

Die einzelnen Lungenlappen wurden voneinander getrennt und es wurde jeweils ein Lappen mittels Sekundenkleber auf dem Probenhalter eines Vibratoms fixiert. Ein ebenfalls aufgeklebtes Stückchen eines Korkens diente als Widerlager. Für die Herstellung der 200 µm dicken PCLS wurden folgende Einstellungen des Vibratoms gewählt: Geschwindigkeit: 12 = 1.2 mm/s; Frequenz: 100; Amplitude: 1.0). Die Lungenschnitte wurden in dem mit 4°C kaltem Hepes-Ringer-Puffer gefüllten Probentrog des Vibratoms gesammelt.

Anschließend wurden die PCLS zur Entfernung der Agarose in ein mit 37°C warmem Minimal Essential Medium (MEM) gefülltes Becherglas überführt. Das Becherglas wurde in einen 37°C warmen Wärmeschrank gestellt und das Medium über eine Stahlkanüle derart mit normoxischem Gasgemisch (21% O₂, 5.3% CO₂, 73.7% N₂) „beblubbert“, dass sich die Schnitte langsam in der Flüssigkeit bewegten. Nach etwa 2 Stunden war die Agarose aus den PCLS entfernt; das war daran zu erkennen, dass die Lungenschnitte, die anfangs auf der Flüssigkeitsoberfläche schwammen, sich am Boden des Becherglases abgesetzt hatten. Für die weiteren Schritte wurden die PCLS in Multiwell-Platten (24 Well) überführt.

2.3 Nachweis von NO und ROS

2.3.1 Identifizierung von NO-produzierenden Zellen

Zum Nachweis von NO-produzierenden Zellen im Lungengefäßsystem wurde DAF-2 DA verwendet. Nachdem das membrangängige DAF-2 DA in die Zellen eingedrungen ist, wird es durch intrazelluläre Esterasen zu DAF-2 hydrolysiert, das in Gegenwart von NO in das stark fluoreszierende 4,5-Diaminofluorescein-Triazol (DAF-2T) umgewandelt wird.

Durchführung:

Die PCLS wurden in je 500 µl MEM, 10 µM DAF-2 DA überführt und 3 Stunden entweder unter Normoxie (21% O₂, 5% CO₂ und Rest N₂) oder Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂ und Rest N₂) inkubiert. Anschließend wurden die PCLS 15 Minuten mit 4% PFA fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und in gepuffertem Glycerol eingebettet.

2.3.2. Quantifizierung der NO-bildenden Zellen

DAF-2T-positive Zellen innerhalb der Gefäßwände wurden mittels eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 488 nm sichtbar gemacht. Zur quantitativen Analyse von NO-generierenden Zellen wurden Querschnitte von Blutgefäßen (Innendurchmesser: 20-150 µm) im Phasenkontrast identifiziert und anschließend die Fluoreszenzbilder mit folgenden Mikroskop-Einstellungen aufgenommen: Kontrast 400 (Skala 2-999), Helligkeit 8,925 (Skala 0-9,999) und Lochblende 30 (Skala 0-255). Bei 400-facher Vergrößerung wurden allen DAF-2T-positiven Zellen eines Gefäßes in seinem dreidimensionalen Verlauf innerhalb des Lungenschnitts (200 µm dick) erfasst und die Fluoreszenz-Intensität bestimmt. Eine Zelle wurde als positiv eingestuft, wenn die Intensität der Fluoreszenz auf einer Skala von 0-255 über 150 lag. Die Anzahl der DAF-2T-positiven Zellen innerhalb eines solchen Gefäßsegmentes wurde als DAF-2T-positive Zellen pro Gefäß definiert. Pro Bedingung wurden jeweils zwei PCLS analysiert und der Mittelwert berechnet, der dann als ein Datenpunkt in die weitere Auswertung einging. Die Multiwell-Platte wurde vorher entsprechend nummeriert, um später die Auswertung blind durchführen zu können.

2.3.3 Identifizierung von ROS-produzierenden Zelle

Die Produktion von ROS wurde mit Hilfe des Indikators DCF-DA untersucht. Nach intrazellulärer Spaltung des Diacetats durch endogene Esterasen und Oxidation durch ROS wird die Verbindung zu einem stark fluoreszierenden Produkt.

Durchführung:

Zum Nachweis von ROS-produzierenden Zellen wurden frisch präparierte Lungenschnitte 3 Stunden lang unter entweder normoxischen (21% O₂, 5% CO₂ und der Rest N₂) oder hypoxischen (1% O₂, 5% CO₂, und der Rest N₂) Bedingungen in je 500 µl MEM, 20 µM DCF-DA inkubiert. Die Weiterverarbeitung der Organschnitte sowie die quantitative Auswertung erfolgten wie für die NO-Messungen beschrieben.

2.3.4 Quantifizierung der ROS-Produktion auf Einzelzellebene

Um die Intensität des DCF-Fluoreszenzsignal einzelner Zellen zu quantifizieren, wurden positive Zellen (Grauwert > 150 auf einer Skala von 0-255) in den Gefäßwänden umrissen und die durchschnittliche Helligkeit des umschlossenen Bereichs gemessen. Pro Bedingung wurden wie bei der Quantifizierung der NO-Produktion jeweils zwei PCLS analysiert. Pro Lungenschnitt wurden 15 Zellen ausgewertet und der Mittelwert der

durchschnittlichen Helligkeit der einzelnen Zellen berechnet, der dann als ein Datenpunkt in die weitere Auswertung einging.

2.4 Hemmung der Atmungskette

In Tabelle 3 sind die verwendeten Inhibitoren der Atmungskette mit ihren Wirkmechanismen und den eingesetzten Endkonzentrationen aufgelistet.

Substanz	Wirkung	Konzentration
DPI	Hemmung von Flavoproteinen	10 μ M
3-NPA	Inaktiviert irreversibel Komplex II (SDH)	5 mM
Rotenon	Hemmung von Komplex 1 (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase)	10 μ M
TTFA	Hemmung von Komplex II (Succinat-Dehydrogenase)	10 μ M
Antimycin A	Hemmung des Komplexes III (Ubichinon-Cytochrom-C-Oxidoreduktase)	3 μ g/ml
NaN ₃	Hemmung des Komplexes IV (Cytochrom-c-Oxidase)	1 mM

Tab. 3: Zusammenstellung der verwendeten Inhibitoren der Atmungskette

Die Zugabe der Inhibitoren zu den PCLS erfolgte zusammen mit dem DCF-DA. In Abb. 5 ist eine schematische Darstellung der Atmungskette zu sehen, in der die Angriffsorte der Inhibitoren markiert sind.

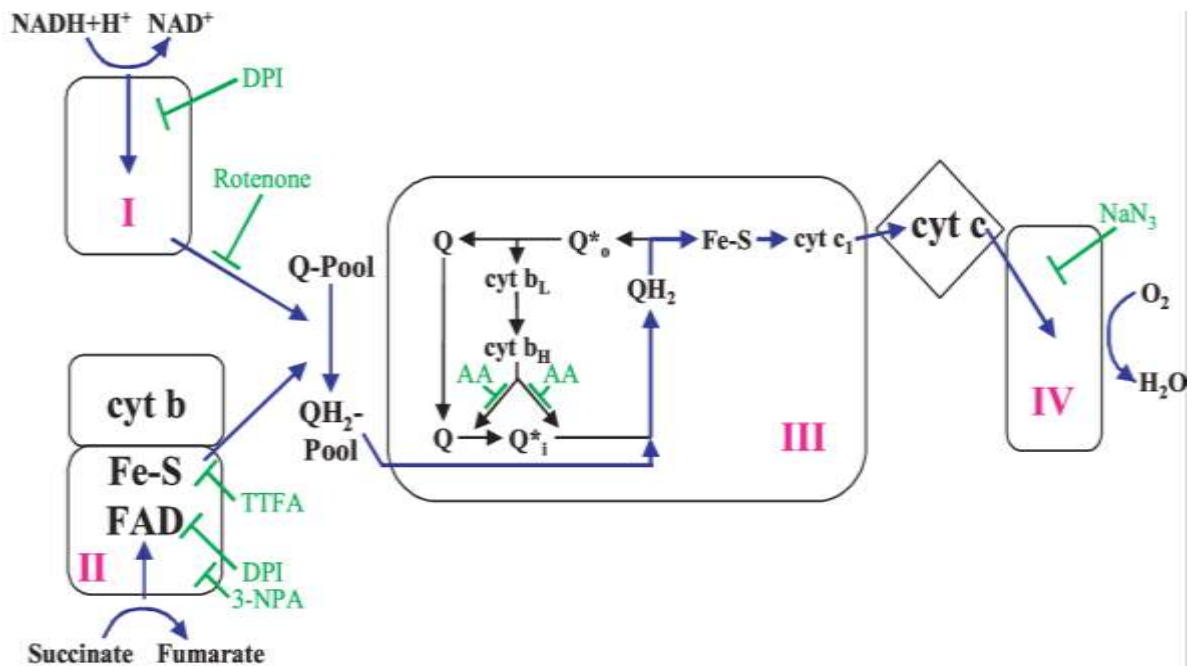


Abb. 5: Schematische Darstellung der mitochondrialen ETK bestehend aus den Komplexen I-IV (römische Zahlen in pink). Elektronen werden von den Komplexen I und II über Ubichinon auf den Komplex III und weiter auf den Komplex IV übertragen. Innerhalb des Komplexes III gibt es eine Aufspaltung in zwei Richtungen der Weiterleitung der Elektronen:

Das erste Elektron aus Ubichinon wird in den Eisen-Schwefel (Fe-S) -Cluster des Komplexes III überführt, wodurch Ubisemichinon entsteht, und das zweite Elektron wird von Ubisemichinon nach Cytochrome bL (cyt bL) und weiter zu Cytochrom bH (cyt bH) transferiert. Die Reoxidation von cyt bH erfolgt durch Ubichinon und Ubisemichinon. Die Orte der Hemmung der ETK durch Inhibitoren sind in grün eingezeichnet. Aus unserer Publikation (Paddenberg et al. 2003).

2.5 Die ROS-Produktion in Gegenwart eines Succinat-Überschusses

Um die Wirkung eines Überschusses an Substrat der SDH auf die ROS-Erzeugung zu untersuchen, wurden Inkubationen der PCLS in Gegenwart von 15 mM Succinat durchgeführt.

2.6 Histochemischer Nachweis der SDH-Aktivität in murinen Lungenschnitten

Mit Agarose gefüllte Mauslungen wurden zur Aushärtung der Agarose in ein Becherglass mit eiskaltem Hepes-Ringer-Puffer gegeben, dann wurden die einzelnen Lungenlappen voneinander getrennt, auf Filterpapier transferiert und mit Tissue-Tek überschichtet. Dann wurde das Gewebe zügig in mit flüssigem N₂ gekühltem Isopentan schockgefroren.

Anschließend wurden aus den einzelnen Lungenlappen am Kryostaten 500 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Lungenschnitte wurden 15 Minuten bei 37°C in MEM oder in MEM, 5 mM 3-NPA vorinkubiert, um durch Hemmung des Komplexes II die Spezifität des SDH-Assays zu überprüfen. Nach dem Waschen mit MEM wurden die Schnitte erneut in Isopentan eingefroren. Aus den 500 µm „dicken“ Lungenschnitten wurden 10 µm „dünne“ Gefrierschnitte (PCLS) hergestellt. Sie wurden auf Objektträgern 5 Minuten bei 37°C entweder an der Luft oder in einer mit N₂ begasten Kammer getrocknet, dann 5 Minuten mit kaltem Aceton bei 4°C fixiert und erneut wie oben beschrieben getrocknet. Zum Nachweis der SDH-Aktivität wurden die Schnitte 60 Minuten in frisch zubereiteter SDH-Lösung inkubiert. Die Inkubation wurden für 60 Minuten entweder bei Raumluft (= Normoxie) oder in einer mit N₂ durchströmten Kammer (= Hypoxie) durchgeführt. In einer zusätzlichen Reihe von Experimenten wurde mit einem physiologischeren Puffersystem gearbeitet. In diesem Fall wurden die Reagenzien für den Assay in Bikarbonat-gepuffertem MEM gelöst. Dazu wurden die Inkubationen in Kammern unter normoxischen Bedingungen 21% O₂, 5% CO₂, N₂ als Balance und unter hypoxischen Bedingungen, mit kontinuierlicher Gaszuleitung aus einer Gasflasche 1% O₂, 5% CO₂ und N₂ als Balance, durchgeführt. Die Reaktionen wurde durch 30 Sekunden dauerndes Waschen in 0,9% NaCl gestoppt, gefolgt von zwei 5-minütigen Waschschrinen in H₂O. Schließlich wurden die Schnitte in Kaiser-Glycerin-Gelatine eingebettet. Die Färbeintensität der Gefäßwände und der Keulenzellen im Epithel wurden mittels der AxioVision 3.0-Software quantifiziert und als relative Werte auf eine Skala von 0 bis 255 ausgedrückt.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SSPS Base 8.0 (SPSS Software, München, Deutschland) durchgeführt. In den Boxplots sind die Perzentilen 0, 25, 50, 75 und 100 dargestellt; dabei entspricht die mittlere horizontale Linie dem Medianwert, die obere und untere Linie der Box den Perzentilen 25 bzw. 75 und die Enden der senkrechten Striche den Perzentilen 0 und 100. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis- und dem Mann-Whitney-Test analysiert, wobei $P \leq 0,05$ als signifikant und $P \leq 0,01$ als hoch signifikant angesehen wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von Hypoxie auf die Freisetzung der Signalmoleküle NO und ROS

3.1.1 Einfluss von Hypoxie auf die Anzahl von NO-produzierenden Zellen in Lungengefäßen

Um die Wirkung von Hypoxie auf die NO-Produktion von Zellen des pulmonalen Gefäßsystems zu untersuchen, verwendeten wir PCLS, die entweder in normoxischem oder in hypoxischem Milieu kultiviert wurden. Die Abb. 6 und 7A zeigen die CLSM-Aufnahmen von NO-produzierenden Zellen, die durch DAF-2DA detektiert wurden.

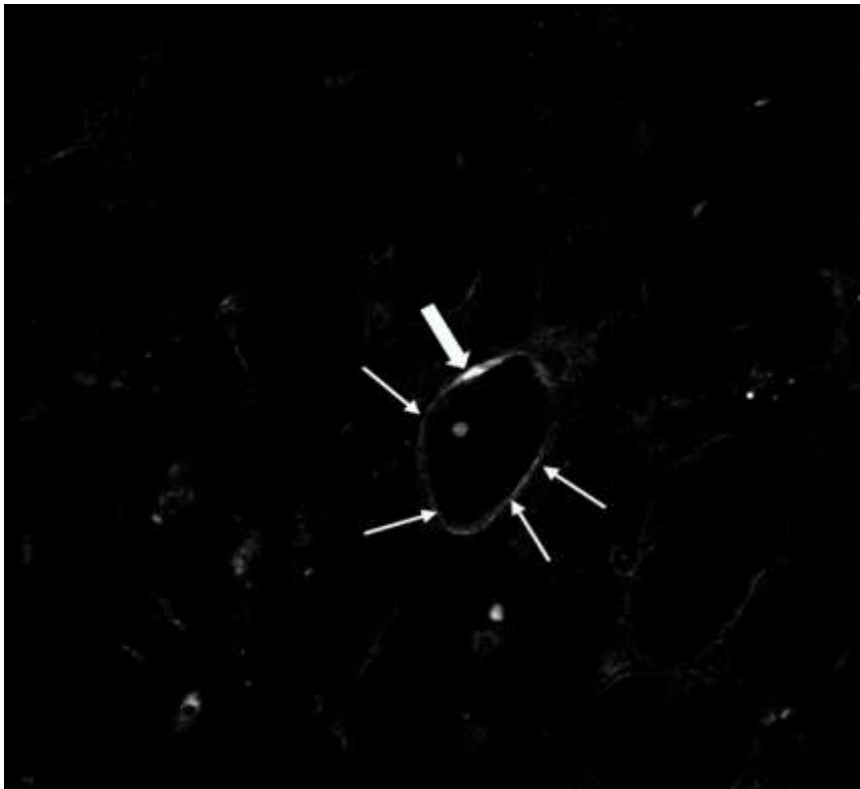


Abb. 6: Nachweis von NO-produzierenden Zellen in Lungenschnitten mittels DAF-DA. In der Wand eines quer geschnittenen Gefäßes (dünne Pfeile) ist eine positive Zelle (dicker Pfeil) zu sehen.

Eine quantitative Analyse zeigte, dass Hypoxie keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der NO-produzierenden Zellen in den Wänden von kleinen bis mittleren Blutgefäßen mit Innendurchmessern zwischen 20-150 μm besaß (Abb. 7B).

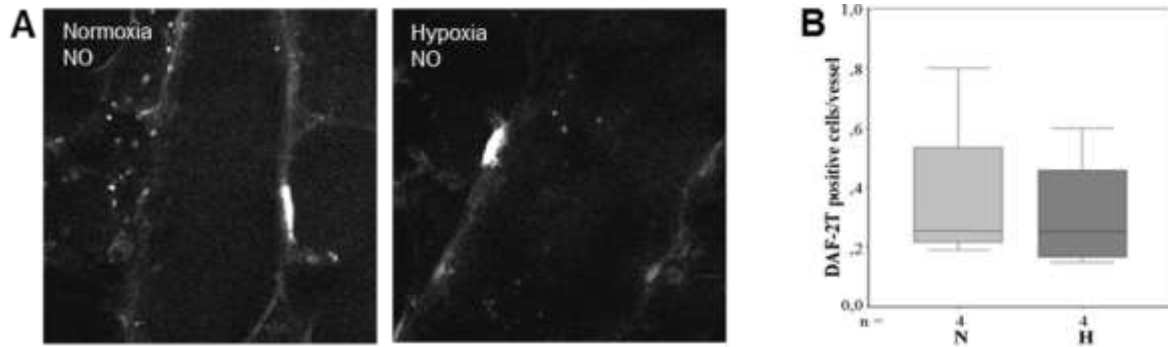


Abb. 7: Hypoxie induzierte keine Zunahme der NO-produzierenden Zellen der intrapulmonalen Gefäße. Lungenschnitte wurden für 3 Stunden unter normoxischen (N) oder hypoxischen (H) Bedingungen in Gegenwart von DAF-DA für den Nachweis von NO-produzierenden Zellen kultiviert. Fluoreszierende Zellen innerhalb der Gefäßwände wurden mittels eines CLSM sichtbar gemacht (A) und quantifiziert. In den in B gezeigten Boxplots sind die Daten einer quantitativen Analyse der Anzahl der NO-produzierenden Zellen pro Gefäß in Lungenschnitten zusammengefasst. n:4 Anzahl unabhängiger Experimente; (aus Paddenberg et al. 2003).

3.1.2 Einfluss von Hypoxie auf die Anzahl ROS-produzierender Zellen in Lungengefäßen

ROS-produzierende Zellen in Lungenschnitten wurden mittels DCF-DA detektiert (Abb. 8). Aufgrund der Morphologie und ihrer Lokalisation innerhalb der Gefäßwand identifizierten wir die Mehrzahl der positiven Zellen als Endothelzellen oder als glatte Muskelzellen. Darüber hinaus entdeckten wir große, teilweise unregelmäßig geformte Zellen in der Gefäßwand oder in der unmittelbaren Nachbarschaft, die nicht eindeutig klassifiziert werden konnten. Aufgrund ihrer Morphologie vermuteten wir, dass es sich um Makrophagen handeln könnte, denn phagozytierende Zellen besitzen in ihrer Zellmembran ROS-bildende NADPH-Oxidasen (Schröder 2019).

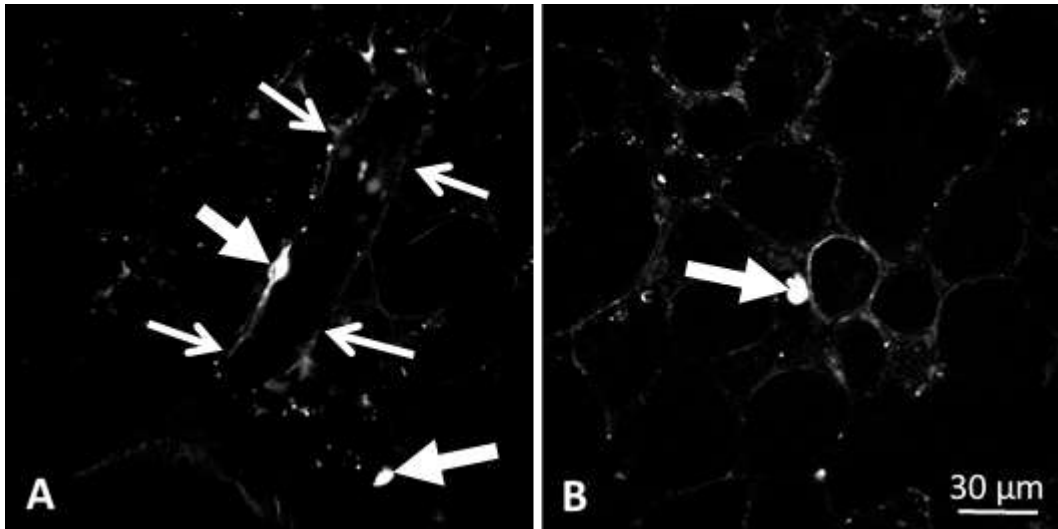


Abb. 8: Nachweis von ROS-produzierenden Zellen in Lungenschnitten mittels DCF-DA. (A) Eine positive Zelle (dicker Pfeil) sitzt in der Wand eines längs geschnittenen Gefäßes (dünne Pfeile) und eine weitere positive Zelle ist außerhalb des Gefäßes erkennbar. In (B) ist eine große, positive Zelle (dicker Pfeil) zu sehen, die der Gefäßwand außen aufsitzt. DCF-DA bei Normoxie.

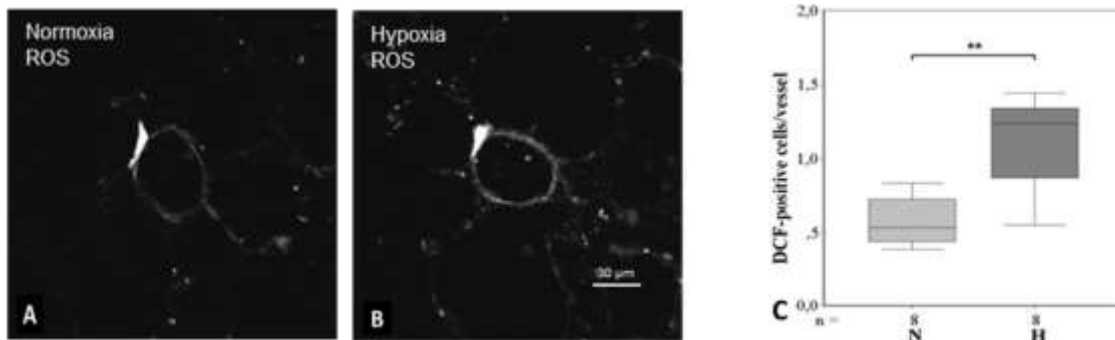


Abb. 9: Hypoxie induzierte eine Zunahme der ROS-produzierenden Zellen der intrapulmonalen Gefäße. Lungenschnitte wurden für 3 Stunden unter normoxischen (N) oder hypoxischen (H) Bedingungen in Gegenwart von DCF-DA für den Nachweis von ROS-produzierenden Zellen kultiviert. Fluoreszierende Zellen innerhalb der Gefäßwände wurden mittels eines CLSM sichtbar gemacht und quantifiziert (B). In den in C gezeigten Boxplots sind die Daten einer quantitativen Analyse der Anzahl der ROS-produzierenden Zellen pro Gefäß in Lungenschnitten zusammengefasst. n: 8 Anzahl unabhängiger Experimente; ** $P < 0,01$ (Mann-Whitney-Test). (aus Paddenberg et al. 2003).

Wurden die PCLS unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, stieg die Anzahl von ROS-erzeugenden Zellen gegenüber den normoxischen Kontrollen signifikant an (Abb. 9C). Die relative Intensität der DCF-Fluoreszenz der einzelnen Zellen wurde durch Hypoxie nicht signifikant verändert (siehe Kapitel 3.3.1).

3.2 Identifikation der Quelle der ROS der Lungengefäße

Eine regulierbare ROS-Produktion kann durch verschiedene Enzyme wie zum Beispiel in der Plasmamembran lokalisierte NADPH-Oxidasen (Hahner et al. 2020), das Xanthin/Xanthin-Oxidase-System oder die mitochondriale Atmungskette erfolgen (Ullrich und Bachschmid 2000). Um die Quelle der normoxischen und hypoxischen ROS-Produktion in den Lungengefäßen zu identifizieren, kultivierten wir PCLS in Gegenwart von DPI oder Rotenon und quantifizierten die Anzahl der DCF-positiven Zellen in den Gefäßwänden. DPI ist ein Inhibitor von Flavoproteinen, wie sie in den Komplexen I und II der Atmungskette, aber auch außerhalb der Mitochondrien, z. Bsp. in NADPH-Oxidasen, vorkommen. Rotenon ist ein selektiver Inhibitor des mitochondrialen Komplexes I, der den Elektronentransfer von Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) auf Ubichinon blockiert (siehe Abb. 3).

Sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie wurde die ROS-Erzeugung durch DPI und Rotenon nahezu vollständig blockiert (Abb. 10 A und B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die normoxische als auch die hypoxische ROS-Produktion innerhalb der Mitochondrien stattfindet und ein Einschleusen von Elektronen in die Atmungskette über den Komplex I erfordert.

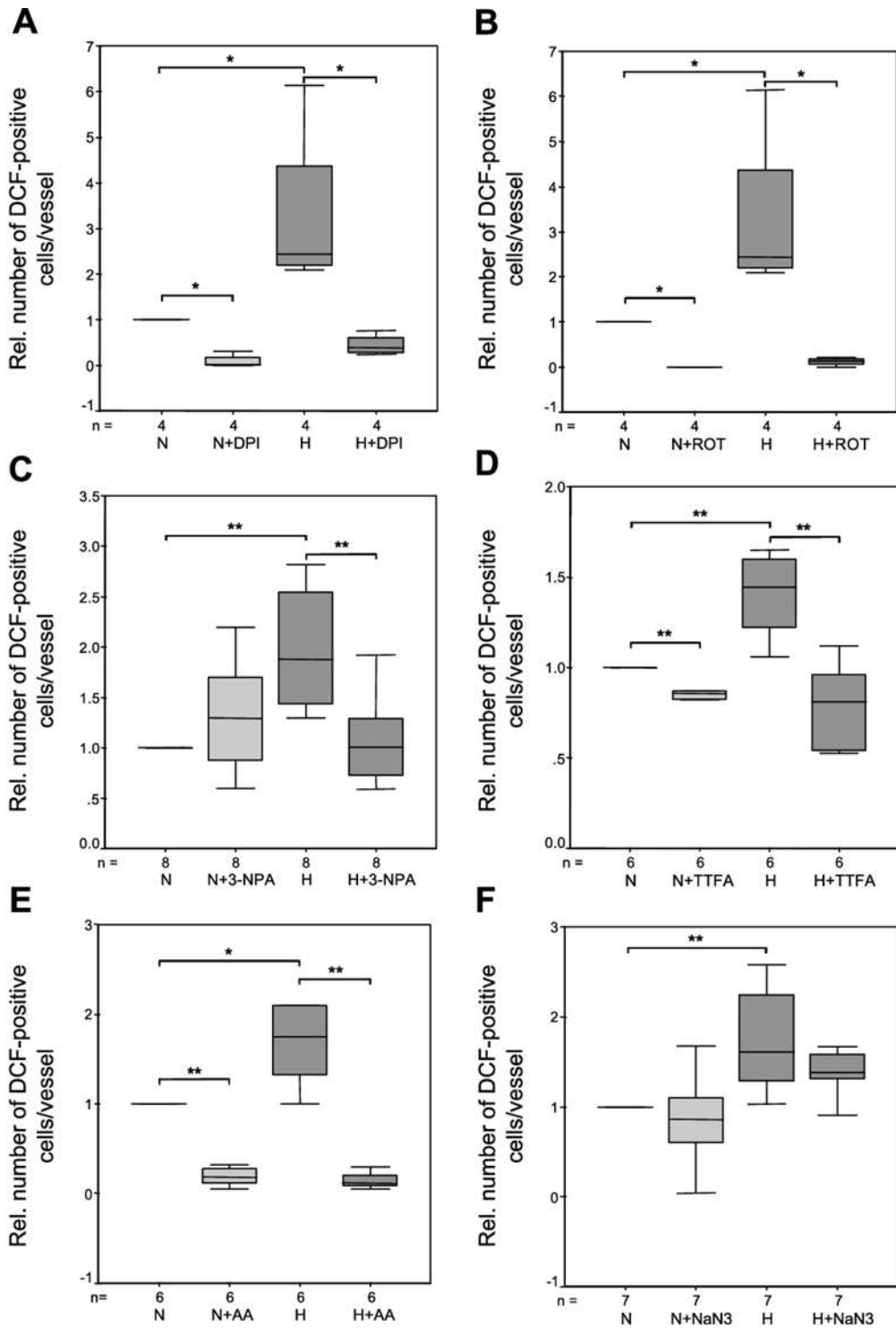


Abb. 10: Einfluss von Inhibitoren der Atmungskette auf die Anzahl der ROS-positiven Zellen in den Lungengefäßen. PCLS wurden bei Normoxie (N) oder Hypoxie (H) in Abwesenheit oder in Gegenwart des Flavoproteininhibitors DPI (A), des Komplex-I-Inhibitors Rotenon (Rot, B), der Komplex-II-Inhibitoren 3-NPA (C) und TTFA (D), des Komplex-III-Inhibitors Antimycin A (AA, E) oder des Komplex-IV-Inhibitors NaN₃ (F) inkubiert, anschließend wurde die Anzahl der ROS-produzierten Zellen/Gefäß quantifiziert. Die Hemmung der Komplexe I und III bewirkte sowohl bei Normoxie als

*auch bei Hypoxie eine Abnahme der Anzahl von ROS-produzierenden Zellen, wohingegen die Hemmung des Komplexes IV keinen Einfluss hatte. Die Inhibition des Komplexes II führte zu einer selektiven Unterdrückung des hypoxie-induzierten Anstiegs von ROS-produzierenden Zellen. n: 4-8 Anzahl unabhängiger Experimente * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (Mann-Whitney-Test). Aus unserer Publikation (Paddenberg et al. 2003).*

3.3 Die Bedeutung der einzelnen Komplexe der Atmungskette für die ROS-Bildung

Um die Rolle der einzelnen Komplexe der Atmungskette für die normoxische bzw. hypoxische ROS-Produktion zu klären, wurden PCLS in Gegenwart von selektiven Hemmstoffen der Komplexe II, III, und IV kultiviert, und ihr Einfluss auf die Anzahl der ROS-produzierenden Zellen/Gefäß quantifiziert.

3.3.1 Die Hemmung des Komplexes II durch 3-NPA oder TTFA unterdrückt selektiv die Hypoxie-induzierte ROS-Produktion

Die Komplex II Inhibitoren 3-NPA und TTFA wurden auf ihre Wirkung auf die Erzeugung von ROS unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen getestet. Unter normoxischen Bedingungen wurde die Anzahl der ROS-produzierenden Zellen innerhalb der Gefäßwände durch 3-NPA nicht signifikant verändert. Im Gegensatz dazu wurde die durch Hypoxie erhöhte Anzahl ROS-produzierender Zellen durch 3-NPA vollständig gehemmt (Abb. 10C).

In Gegenwart des Komplex-II-Inhibitors TTFA war die Anzahl von ROS-produzierenden Zellen bei Normoxie geringfügig, jedoch signifikant reduziert. Unter hypoxischen Bedingungen reduzierte TTFA die Anzahl der ROS-generierenden Zellen auf das Niveau, das bei Normoxie beobachtet wurde (Abb. 10D).

Um zu klären, ob Hypoxie auch einen Einfluss auf die Menge an ROS hat, die von den einzelnen Zellen gebildet wird, quantifizierten wir die Intensität des DCF-Signals auf Einzelzell-Ebene. In die Auswertung wurden nur Zellen eingeschlossen, deren Grauwert auf einer Skala von 0-255 bei über 150 lag. Sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie war die Fluoreszenzintensität in Gegenwart von TTFA signifikant verringert (Abb. 11). (Medianwert Norm: 245; Norm+ TTFA: 231; Medianwert Hyp: 244; Hyp + TTFA: 219). Wie in Abb. 11 zu sehen ist, führte die Gabe von TTFA auf Einzelzellebene unter normoxischen Bedingungen zu einer signifikanten Abnahme des ROS-Signals um etwa 5%. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die von Zhang und Farris (2002) beschriebene Hemmung von Esterasen sein, die für die intrazelluläre Spaltung des DCF-DA und damit für die Generierung des Fluoreszenzsignals erforderlich sind.

Unter hypoxischen Bedingungen bewirkte TTFA eine vergleichsweise stärkere Abnahme des ROS-Signals um etwa 10%.

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass eine Hemmung des Komplexes II sowohl zu einer Abnahme der Anzahl von ROS-produzierenden Zellen als auch zu einer Reduktion der ROS-Bildung auf Ebene der einzelnen Zelle führte.

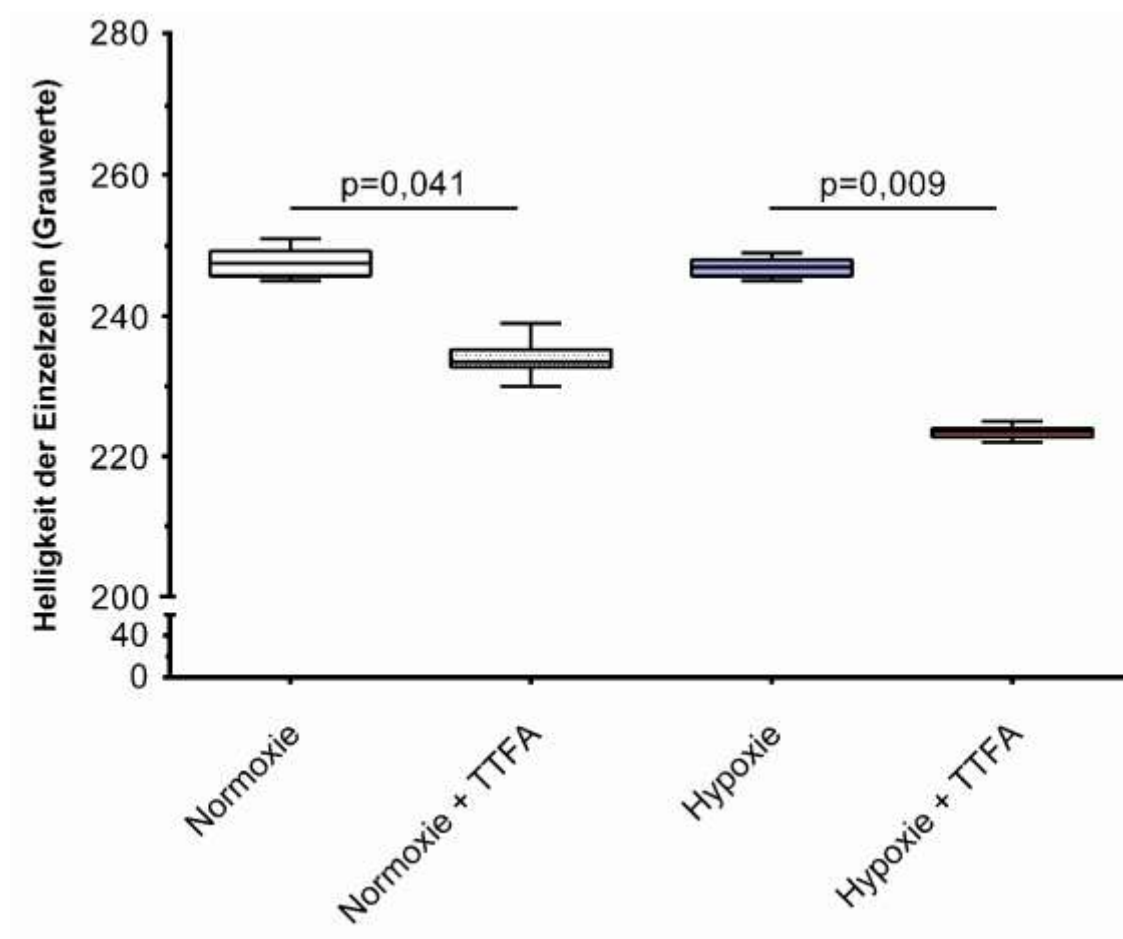


Abb. 11: Einfluss des Komplex-II Inhibitors TTFA auf die ROS-Produktion der einzelnen Zellen der Lungengefäße. Die durchschnittliche Helligkeit einzelner Zellen in den Gefäßwänden wurde als Grauwert quantifiziert. (Mann-Whitney-Test) n:5 Anzahl unabhängiger Experimente (Mann-Whitney-Test).

3.3.2 Hypoxie reduziert die SDH-Aktivität des Komplexes II der Atmungskette

Da die beschriebenen Daten darauf hinwiesen, dass der Komplex II eine wesentliche Rolle bei der hypoxie-induzierten, nicht aber bei der normoxischen ROS-Bildung spielt, untersuchten wir, ob sich die SDH-Aktivität des Komplexes II unter Normoxie und Hypoxie unterscheidet.

Für die Untersuchung der SDH-Aktivität von Zellen des Lungengewebes verwendeten wir ein histochemisches Nachweisverfahren. Um die Spezifität des Assays zu überprüfen,

wurden 500 µm dicke Lungenschnitte nach ihrer Herstellung mit oder ohne Zugabe des Komplex-II-Inhibitors 3-NPA vorinkubiert. PCLS, die aus mit 3-NPA vorinkubierten Lungenschnitten hergestellt wurden, waren nahezu ungefärbt (Abb. 12A). Daher befanden wir diesen Assay als spezifisch.

Die quantitative Analyse des SDH-katalysierten Farbumschlags ergab deutliche Unterschiede in der enzymatischen Aktivität verschiedener Zelltypen der Lunge. Während Keulenzellen des Bronchialepithels intensiv gefärbt waren, zeigten die Zellen der arteriellen Gefäßwände nur eine schwache Färbung (Abb. 12A). Offensichtlich leistet Komplex II in glatten Gefäßmuskelzellen im Vergleich zu Keulenzellen nur einen geringen Beitrag beim Einschleusen von Elektronen in die mitochondriale Atmungskette. Wenn die SDH-Reaktion in einer Stickstoffatmosphäre (Hypoxie) durchgeführt wurde, war das Signal signifikant verringert, was auf eine hypoxie-induzierte Abnahme der enzymatischen Aktivität in beiden Zelltypen hinweist. Der Median der relativen Färbeintensität von Gefäßwänden, die in einer Stickstoff-Atmosphäre inkubiert wurden, lag bei 73% im Vergleich zur Luft-Kontrolle und bei den Keulenzellen lag der Median bei 25% der Luftkontrolle (Abb. 12B). Eine vergleichbare Abnahme auf 62% wurde erzielt, wenn die Inkubationen in Bikarbonat-gepufferten Lösungen bei 21% O₂ oder 1% O₂ durchgeführt wurden (Median der relativen Färbeintensität der Gefäßwände bei 21% O₂: 69, Bereich 27,5–63); Median der relativen Färbeintensität der Gefäßwände bei 1% O₂: 43, Bereich 37,5–76,5); n = 4 - 5, in jedem Präparat wurden 10 Gefäße analysiert).

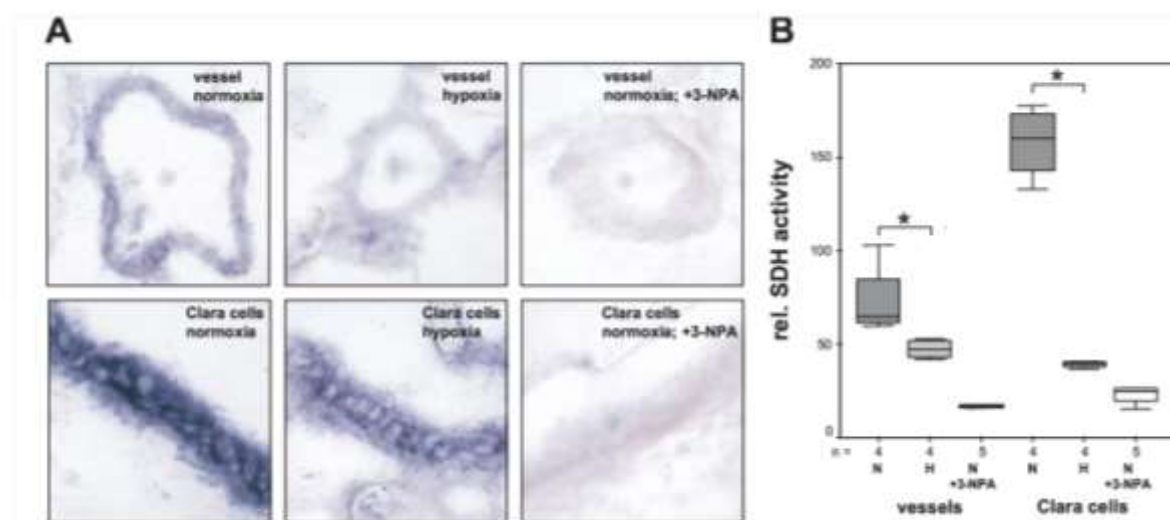


Abb. 12: Histochemischer Nachweis der hypoxie-induzierten Reduktion der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität in Lungenschnitten. Die enzymatische Reaktion wurde entweder an der Luft (= Normoxie) oder in einer mit N₂ begasten Kammer (= Hypoxie)

durchgeführt. Als Spezifitätskontrolle wurden Lungenschnitte mit dem Komplex II-Inhibitor 3-NPA vorinkubiert. (A) Farbbasierter Nachweis der SDH-Aktivität bei Normoxie, Hypoxie oder Normoxie in Gegenwart von 3-NPA in Gefäßwänden (obere Reihe) und in Keulenzellen (früher Clara-Zellen) des Bronchialepithels (untere Reihe). Alle Fotos wurden mit derselben Belichtungseinstellung aufgenommen. (B) Quantifizierung des Farbsignals in Gefäßen und in Keulenzellen. n: 4 - 5. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-Test). Aus unserer Publikation (Paddenberg et al. 2003).

Da einerseits die mit Komplex-II-Inhibitoren erhaltenen Daten auf eine erhöhte Aktivität unter Hypoxie hinwiesen, andererseits die SDH-Aktivität dieses Komplexes unter Hypoxie vermindert war, testeten wir, ob die inverse enzymatische Reaktion des Komplexes, d. h. eine Fumarat-Reduktase-Aktivität anstelle von SDH-Aktivität, zur hypoxischen ROS-Produktion beitrug. Dazu ließen wir den histochemischen Assay in Gegenwart eines Überschusses von Succinat (15 mM, d. h. einem dreifachen molaren Überschuss im Vergleich zu Glukose) ablaufen. Es ist zu erwarten, dass der Succinat-Überschuss die SDH-Aktivität erleichtert und gleichzeitig die Fumarat-Reduktase-Aktivität hemmt. Die Quantifizierung der DCF-positiven Zellen zeigte, dass Succinat unter normoxischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Anzahl der ROS-generierenden Zellen hat, während es bei Hypoxie zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl ROS-generierender Zellen kam (Abb. 13).

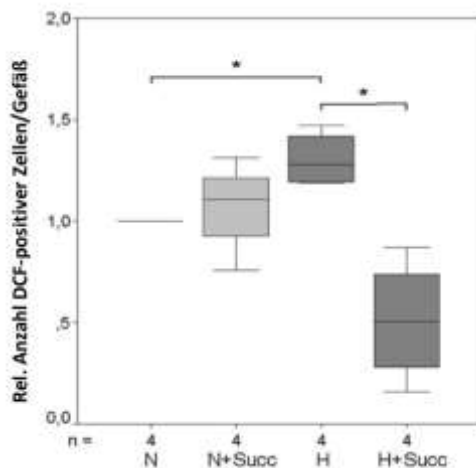


Abb. 13: Einfluss von Succinat (Succ), dem Substrat der SDH- und dem Endprodukt der Fumarat-Reduktase-Aktivität, auf die relative Anzahl ROS-produzierender Zellen in den Gefäßwänden. Der Mittelwert der Normoxie (N) jedes Experiments wurde auf 1 normiert. Die relative Anzahl DCF-positiver Zellen pro Gefäß blieb in Gegenwart von 15 mM Succinat bei Normoxie unverändert, während sie unter Hypoxie (H) signifikant verringert

wurde. $n =$ Anzahl unabhängiger Experimente. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney-Test). Aus unserer Publikation (Paddenberg et al. 2003).

3.3.3 Unterdrückung der hypoxie-induzierten ROS-Produktion durch Hemmung des Komplexes III mittels Antimycin A

In Gegenwart des Komplex-III-Inhibitors Antimycin A waren sowohl die normoxische als auch die hypoxische ROS-Bildung blockiert. In Abb. 10E ist das Ergebnis der Quantifizierung dargestellt.

Gleichzeitig war auch die Intensität des DCF-Signals auf Einzelzellebene unter Normoxie und Hypoxie stark abgeschwächt (Abb. 14). Das Ausmaß der Abnahme des DCF-Signals in Gegenwart von Antimycin A war unter den beiden Bedingungen vergleichbar.

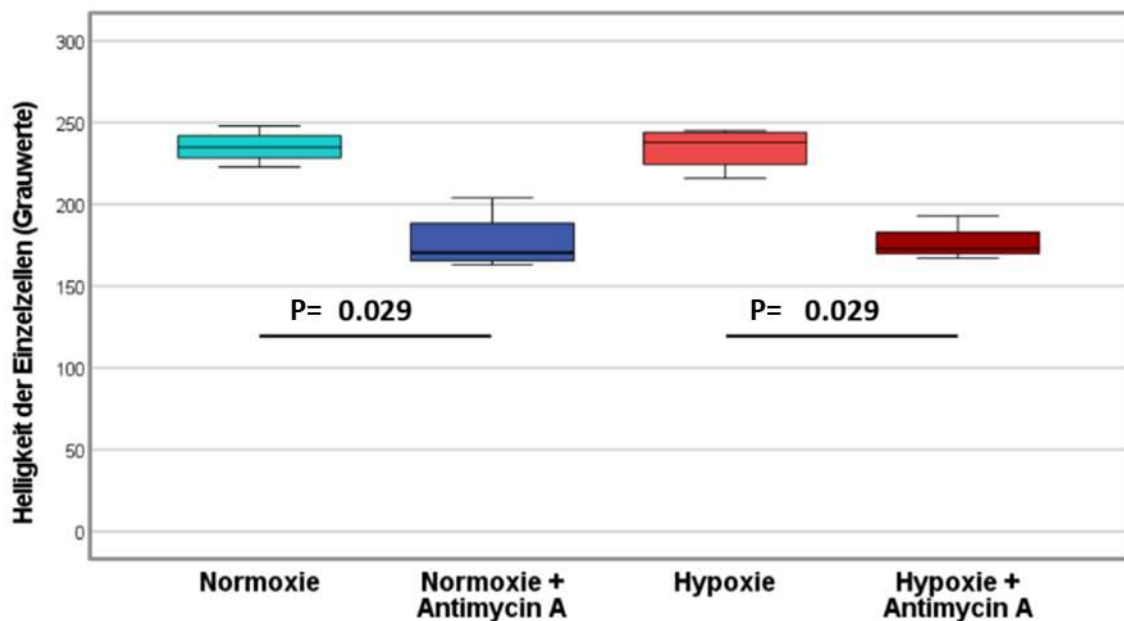


Abb. 14: Einfluss des Komplex-III-Inhibitors Antimycin A auf die ROS-Produktion der einzelnen Zellen der Lungengefäße. Die durchschnittliche Helligkeit einzelner Zellen in den Gefäßwänden wurde als Grauwert quantifiziert. $n: 4$ Schnittpräparate, in jedem Präparat wurden 30 positive Zellen analysiert.

3.3.4 Kein Einfluss der Hemmung des Komplexes IV mittels NaN_3 auf die ROS-Produktion

Natriumazid (NaN_3) ist ein nichtkompetitiver Inhibitor der Cytochrom-c-Oxidase des Komplexes IV (Duranteau et al. 1998). Die Inhibition dieses Komplexes hatte keinen Einfluss auf die normoxische bzw. hypoxische ROS-Produktion (Abb. 10F). Das impliziert, dass unter beiden Bedingungen die ROS-Produktion unabhängig von Komplex IV erfolgt.

4. Diskussion

In der Literatur lassen sich zahlreiche Beispiele für die Verwendung von PCLS für wissenschaftliche Untersuchungen finden: PCLS wurden z. Bsp. dafür eingesetzt, die Reaktionen einzelner Abschnitte des luftleitenden Systems (Bronchien, Bronchioli) und der pulmonalen Gefäße auf verschiedene Medikamente zu untersuchen (Liu et al. 2019, Kim et al. 2020). Richter et al. (2000) setzten PCLS ein, um den Metabolismus eines tabakspezifischen Nitrosamins und seiner proximalen Metaboliten zu analysieren.

Da diese und andere Berichte zeigten, dass sich Lungenschnitte in vielerlei Hinsicht wie intakte Lungen verhielten, beschlossen wir, PCLS für die Untersuchung der NO- und ROS-Produktion durch Zellen intrapulmonaler Gefäße zu verwenden und dabei auch den Einfluss von Hypoxie auf die Bildung dieser „messenger“ Moleküle zu analysieren. Da aus einer Mauslunge in der Regel 14 PCLS hergestellt werden konnten, war es möglich, die Wirkung verschiedener Sauerstoffkonzentrationen bzw. den Einfluss von Inhibitoren auf benachbarte Bereiche derselben Lunge zu vergleichen. Darüber hinaus führte die Verwendung der PCLS entsprechend der Richtlinie des „3R“ Prinzips (Replace [Vermeiden], Reduce [Verringern] und Refine [Verbessern]) zu einer deutlichen Reduktion der benötigten Versuchstiere.

Ein Vorteil der PCLS gegenüber Zellkultursystemen ist, dass die zelluläre Architektur der Gefäßwände erhalten bleibt und die Gefäße in ihrer natürlichen histologischen Umgebung verbleiben (Liu et al. 2019). Außerdem ist es möglich, NO- oder ROS-produzierende Zellen innerhalb der Gefäßstrecke der Lunge zu erfassen, die hauptsächlich für die hypoxische Vasokonstriktion verantwortlich ist (Semenza et al. 1999, Quinlan et al 2000, Sauer et al. 2001), d. h. in den Wänden kleiner intrapulmonaler Arterien. Im Vergleich zu isolierten perfundierten Lungen ermöglicht die Verwendung von PCLS die Untersuchung von Gefäßen ohne den Einfluss des Blutflusses, der durch die erzeugte Scherspannung selbst die NO- und ROS-Produktion moduliert. So wurde gezeigt, dass in kultivierten Endothelzellen Scherspannung zu einer erhöhten ROS- (Hsieh et al. 1998) und NO-Freisetzung (Noris et al. 1995) führt. In unserer Studie kam zum Nachweis von NO-produzierenden Zellen DAF-2-DA als Indikator zur Anwendung. In den Gefäßen von PCLS, die 3 Stunden lang unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, konnten wir keinen Unterschied in der Anzahl der NO-generierenden Zellen feststellen. Wir gehen daher davon aus, dass NO in Abwesenheit von Scherkräften nicht an kurzfristigen Reaktionen auf Hypoxie beteiligt ist.

Die ROS-Produktion wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Indikators DCFH-DA untersucht. DCFH-DA ist die am häufigsten verwendete Substanz zum Nachweis von intrazellulärem H_2O_2 und oxidativem Stress. Dieser Indikator kann die Zellmembran passieren und wird intrazellulär zu DCFH hydrolysiert, welches die Zelle nicht mehr verlassen kann. Eine Zwei-Elektronen-Oxidation von DCFH führt schließlich zur Bildung des fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF), das durch verschiedene fluoreszenzbasierte Techniken (z. B. konfokale Mikroskopie, Durchflusszytometrie) detektiert werden kann (Kotamraju et al. 2003, Zmijewski et al. 2005, Lee et al. 2009, Kalyanaraman et al. 2012). Es wurden jedoch mehrere Einschränkungen und Artefakte im Zusammenhang mit dem DCF zur Messung von intrazellulärem H_2O_2 beschrieben (Bonini et al. 2006). Kalyanaraman et al. (2012) nannten folgende Probleme bei der Verwendung von DCFH-DA zum ROS-Nachweis:

1. DCFH reagiert nicht direkt mit H_2O_2 , um das fluoreszierende Produkt DCF zu bilden. Daher kann die DCF-Fluoreszenz nicht als direkte Messung von H_2O_2 verwendet werden.
2. Mehrere ein-elektronen-oxidierende Spezies oxidieren DCFH ebenfalls zu DCF.
3. Das Zwischenradikal DCF^\cdot , das bei der Ein-Elektronen-Oxidation von DCFH entsteht, reagiert schnell mit O_2 und bildet Superoxid (O_2^\cdot). Diese Dismutation von O_2 führt zu zusätzlichem H_2O_2 (Folkes et al. 2009) und damit zu einer artefaktischen Verstärkung des Fluoreszenzsignals.
4. Cytochrom c, ein Hämprotein, das während der Apoptose aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt wird, ist in der Lage, DCFH direkt oder indirekt über einen peroxidase-artigen Mechanismus zu oxidieren und DCF zu bilden (Karlsson et al. 2010). Die Zunahme der DCF-Fluoreszenz, die während der Apoptose von Zellen auftritt, die mit DCFH-DA beladen sind, wurde häufig mit einer erhöhten Oxidationsmittelproduktion in Verbindung gebracht.
5. Redoxaktive Metalle (z. Bsp. Fe^{2+}) fördern die DCFH-Oxidation in Gegenwart von Sauerstoff oder H_2O_2 (Qian et al. 1999).

Nichtbeachtung dieser Einschränkung kann zu falscher Interpretation der Befunde führen. Selbst wenn Unterschiede in der DCF-Fluoreszenz unter kontrollierten und experimentellen Bedingungen dokumentiert werden, muss man daher die verschiedenen oben aufgeführten Vorbehalte für eine korrekte Interpretation der Daten berücksichtigen. (Kalyanaraman et al. 2012).

Trotz dieser Einschränkungen kann man festhalten, dass mit diesem Indikator wichtige Redox-Signalmechanismen erforscht werden konnten (Kotamraju et al. 2003 und 2004,

Karlsson et al. 2010). Frühere Studien implizierten eine Rolle von redoxaktivem Eisen bei der intrazellulären Oxidation von DCFH zu DCF (Lebel et al. 1992), obwohl der Ursprung des zellulären Eisens nicht bekannt war. In früheren Studien wurde gezeigt, dass die H₂O₂- und lipidhydroperoxid-induzierte intrazelluläre DCFH-Oxidation zu DCF durch die vom Transferrinrezeptor (TfR) abhängige Aufnahme von Eisen vermittelt wird (Tampo et al. 2003, Kotamraju et al. 2003, Kotamraju et al. 2004). Die intrazelluläre DCF-Fluoreszenz wurde durch den monoklonalen Anti-TfR-Antikörper der IgA-Klasse gehemmt, der die TfR-Endozytose und die Eisenaufnahme blockierte. Diese Studien zeigten auch, dass die peroxidabhängige DCF-Fluoreszenz entscheidend von den intrazellulären Glutathionspiegeln abhängt (Tampo et al. 2003). DCFH-DA wurde als Indikator für die mitochondriale Erzeugung von Oxidationsmitteln und Peroxynitrit in Endothelzellen verwendet, die mit oxidiertem Lipoprotein niedriger Dichte (oxLDL) behandelt wurden (Zmijewski et al. 2005). Hinsichtlich der oxLDL-abhängigen DCF-Fluoreszenz diskutierte man die Rolle des Eisens, der eNOS-Aktivität und Komplex-II-Aktivität (Kooy et al. 1997, Zmijewski et al. 2005, Lee et al. 2009). DCFH-DA kann als Redoxindikator verwendet werden, welcher auf Veränderungen in der intrazellulären Eisensignalisierung oder Peroxynitritbildung reagiert. Die vorliegenden Experimente wurden bis zum Jahr 2003 durchgeführt. Zu dem Zeitpunkt standen anderen Verfahren, die heute zum Einsatz kommen, noch nicht zur Verfügung.

Es gibt weitere Verfahren zur Messung von ROS, zum Beispiel die spektrophotometrische Messung der Cytochrom-c-Reduktion, die Fluoreszenzquantifizierung von Dihydroethidium und Methoden zur Bewertung von oxidativen Gewebeschäden (Dikalov et al. 2007, Dikalov et al. 2011, Dikalov und Harrison 2012, Berg et al. 2014). Eine der vielversprechenden verfügbaren Methoden zur Quantifizierung der ROS-Menge in Geweben ist die quantitative paramagnetische Elektronenresonanz (EPR) (Dikalov et al. 2007, Berg et al. 2014).

Im Gegensatz zur Anzahl der NO-produzierenden Zellen war die der ROS-bildenden Zellen innerhalb der Gefäßwände durch Hypoxie signifikant erhöht. Unter Verwendung spezifischer Inhibitoren identifizierten wir die mitochondriale Atmungskette als zelluläre Quelle von ROS. Diese Ergebnisse stimmen mit Berichten anderer Arbeitsgruppen überein, die eine Erhöhung der mitochondrialen ROS-Produktion bei reduzierter Sauerstoffversorgung beschreiben (Duranteau et al. 1998, Chandel et al. 1998, Richter et al. 2000, Wang et al. 2007, Rathore et al. 2008, Jung et al. 2013, Waypa et al. 2013, Song et al. 2017, Smith und Schumacker 2019). Desireddi et al. (2010) demonstrierten durch

ein anderes Nachweissystem, u.a den redoxsensitiven Proteinsensor RoGFP, dass akute Hypoxie die Oxidationssignale im Zytosol der präkapillären pulmonalen Arterienzellen in Mäuselungen erhöht. Die wichtigste in den Zellen produzierte ROS-Spezies ist Superoxid (O_2^-), das entweder enzymatisch oder spontan zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) dismutiert wird.

Sommer et al. (2017) zeigten, dass der Sauerstoffsensor- und Signalmechanismus der HPV im Wesentlichen von der Isoform 2 der Untereinheit 4 der Cytochrom-c-Oxidase im mitochondrialen Komplex IV abhängt. Die Arbeitsgruppe von Sommer konnte nachweisen, dass die mitochondriale COX-Untereinheit 4i2 in Maus- und Human-PASMCs für die akute O_2 - Messung im Lungengefäßsystem unerlässlich ist. Deren Daten deuteten darauf hin, dass Cox4i2 als Reaktion auf Hypoxie erforderlich ist, um Mitochondrien von PASMCs mit einem anschließenden Superoxidanstieg zu hyperpolarisieren, was an einer Depolarisation der Zellmembran mitwirkt, die schließlich zu einem intrazellulären Kalziumanstieg und HPV führt.

Die mitochondriale ETK besteht aus vier Komplexen (Abb. 2). Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) und Komplex II (Succinat-Ubichinon-Reduktase) oxidieren NADH bzw. Succinat, um Ubichinon zu Ubichinol zu reduzieren. Ein Elektron des Ubichinols wird auf das Eisen-Schwefel-Protein und anschließend auf das Cyt-c1 des Komplexes III übertragen. Das reduzierte Cyt-c1 gibt das Elektron über Cytochrom c an den Komplex IV weiter. Letztendlich fungiert molekularer Sauerstoff als finaler Elektronenakzeptor und es kann - in Gegenwart von Protonen - H_2O gebildet werden. Das zweite Elektron aus Ubichinol fließt in den Q-Zyklus ein, wo es nacheinander auf CytbL und CytbH übertragen wird. Das freie Radikal Ubisemichinon kann überall dort auftreten, wo eine Reduktion von Ubichinon oder eine Oxidation von Ubichinol stattfindet, d. h. an den Komplexen I, II und III.

Es wird angenommen, dass Ubisemichinon auch Elektronen an O_2 abgeben und damit zur Bildung von ROS führen kann (Turrens et al. 1985). Während des ETK-Transportes können Elektronen vorzeitig entweichen und es kann zur Entstehung von ROS kommen (Mazat et al. 2020). Mitochondrien sind das Hauptkompartiment des Sauerstoffmetabolismus, in dem ca. 90% des Sauerstoffs der Zelle verbraucht werden. In der ETK werden im Normalfall 4 Elektronen auf Sauerstoff übertragen (Chance et al. 1979, Shigenaga et al. 1994). Unter bestimmten Umständen kann es zur unvollständigen Reduktion des Sauerstoffs kommen und es werden ROS als Nebenprodukt gebildet. Schätzungsweise führen etwa 1-2% aller Elektronen, die die Atmungskette durchlaufen,

zur Bildung von Superoxidanionen, die anschließend in andere ROS, wie zum Beispiel Hydroxylradikale (OH^\cdot) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt werden (Boveris et al. 1977) Die Bildung von Superoxid erfolgt durch die Übertragung eines freien Elektrons auf molekularen Sauerstoff. Diese Reaktion findet an bestimmten Stellen der ETK, die sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet, statt. Obwohl in den meisten Fällen niedermolekulare Elektronenträger wie NADH oder CoQH_2 nicht mit O_2 reagieren, um das Superoxidanion $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu bilden, kann es an redoxaktiven prosthetischen Gruppen innerhalb von ETK-Proteinen stattfinden, wenn Elektronenträger wie CoQH_2 an Proteine gebunden sind (Murphy 2009). Murphy lässt den Komplexen I und III eine besondere Rolle im Bezug auf ROS-Produktion zukommen. Turrens et al. (1985) zeigten, dass es auch unter Normoxie zu ROS-Bildung an Komplex III kommt. Die mitochondriale ROS-Bildung hängt von vielen Faktoren ab, wie dem Membranpotential, dem Zelltyp und den Atmungssubstraten. ROS kann Lipide, Proteine und DNA in der Zelle schwer schädigen. Daher enthalten Mitochondrien mehrere antioxidative Abwehrsysteme zum Schutz vor den freien Radikalen, wie beispielsweise Glutathion und entgiftende Enzyme, zu denen die Peroxidasen sowie Katalasen für die Entsorgung von Wasserstoffperoxid sowie die Superoxid-Dismutasen (SOD) für die Beseitigung des Superoxid-Anionradikals gehören (Boveris und Chance 1973, Turrens und Boveris 1980, Turrens et al. 1982). Eine übermäßige ROS-Produktion in den Mitochondrien führt zu oxidativen Schäden und kann in einer Reihe menschlicher Pathologien als ätiologischer Faktor betrachtet werden (Monsalve et al. 2007, Liu et al. 2017, Chistiakov et al. 2018, Angelova et al. 2018).

In Übereinstimmung mit dem möglichen Auftreten von Ubisemichinon in den Komplexen I, II und III, jedoch nicht in Komplex IV, beobachteten wir Veränderungen der ROS-Produktion, wenn Inhibitoren eingesetzt wurden, die einen der Komplexe I bis III hemmen (DPI, Rotenon, 3-NPA, TTFA, Antimycin A), jedoch nicht, wenn der Komplex IV durch NaN_3 inhibiert wurde. Unsere Ergebnisse implizieren jedoch Unterschiede in der Beteiligung der einzelnen Komplexe am Elektronenfluss und an der ROS-Erzeugung unter Normoxie bzw. Hypoxie.

In Abb. 15 ist graphisch zusammengefasst, wie wir uns aufgrund der gewonnenen Befunde den Elektronenfluss in der Atmungskette unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen vorstellen. Unter Normoxie (Abb. 15A) gelangen die zur ROS-Bildung beitragenden Elektronen fast ausschließlich über den Komplex I in die Atmungskette, da die ROS-Erzeugung

1. in Gegenwart von Rotenon, das den Elektroneneintritt über den Komplex I blockiert, nahezu vollständig aufgehoben wurde, und

2. unbeeinflusst von der Inhibition des Komplexes II durch 3-NPA war und nur geringfügig durch die Hemmung des Komplexes II durch TTFA vermindert wurde.

Diese leichte Verringerung der Anzahl von ROS-erzeugenden Zellen durch TTFA kann gut durch die von Zhang und Fariss (2002) beschriebene hemmende Wirkung auf Esterasen erklärt werden, die für die intrazelluläre Spaltung von DCF-DA verantwortlich sind. Wichtig ist dabei, dass die Hemmung von Komplex II und von Esterasen im gleichen Konzentrationsbereich von TTFA erfolgen.

Das schwache Farbsignal in den Gefäßwänden, das wir im histochemischen Nachweis der SDH-Aktivität beobachteten, unterstützt die Vermutung, dass der Komplex II in den Zellen der Lungengefäße eher eine untergeordnete Rolle im Energiestoffwechsel spielt. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Befunden von Thaete und Malkinson (1990), in denen eine deutliche SDH-Aktivität in Epithelzellen der Bronchiolen, aber nicht in der Wand von Lungenarterien beschrieben wird.

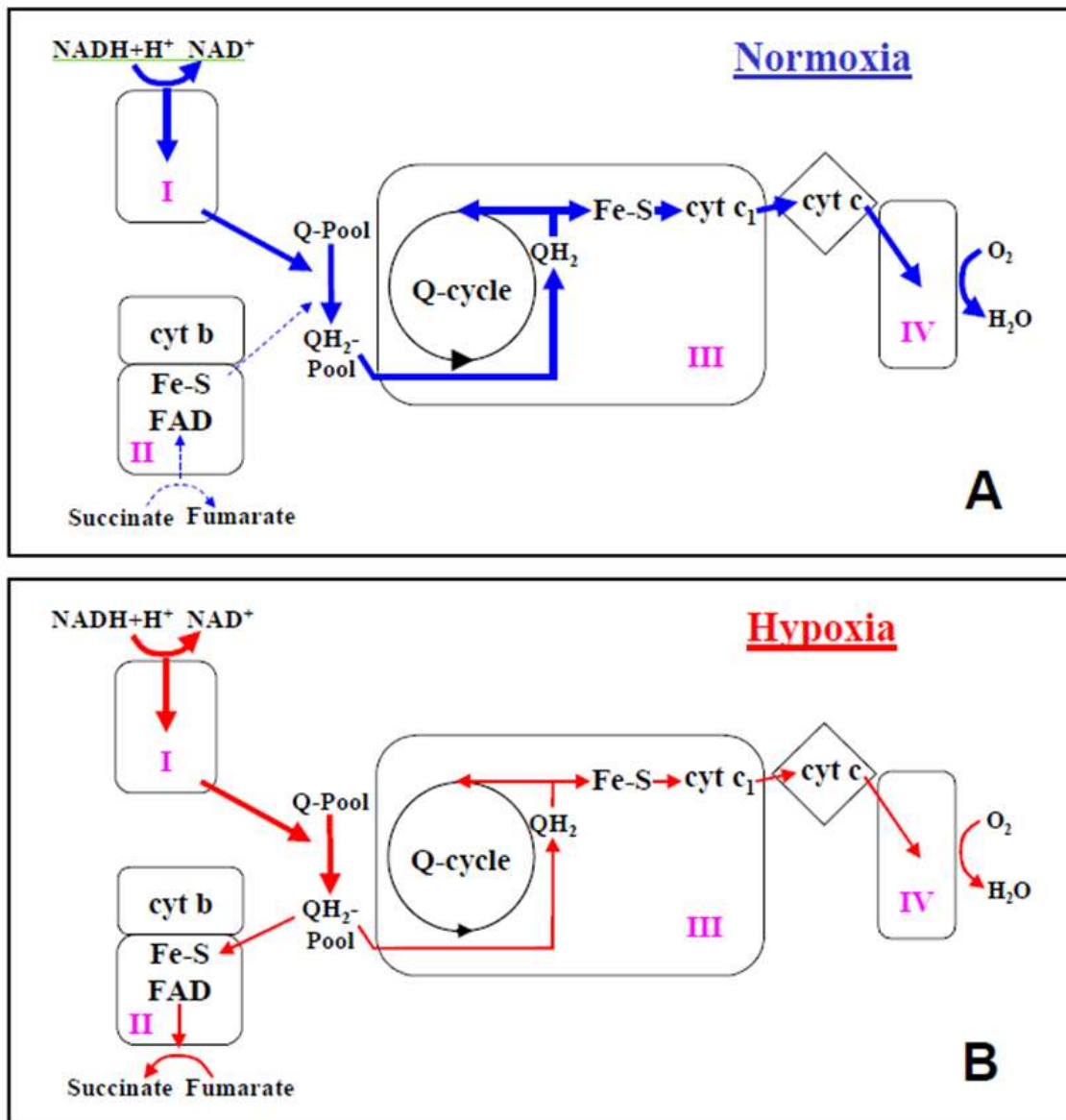


Abb. 15: Modell einer sauerstoffabhängigen Änderung des Elektronenflusses in der mitochondrialen Atmungskette. Bei Normoxie (A) werden Elektronen hauptsächlich von Komplex I über Ubichinol zu Komplex III und weiter zu Komplex IV übertragen. Bei Hypoxie (B) wird die Aktivität von Komplex II von Succinat Dehydrogenase (SDH) auf Fumaratreduktase umgekehrt; jetzt fungiert Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor und erhält seine Elektronen aus dem Ubichinol-Pool, der durch Komplex I gespeist wird. Aus unserer Publikation (Paddenberg et al. 2003).

Die exakte Stelle der Atmungskette, an der ROS während der Normoxie erzeugt werden, kann aus den vorliegenden Experimenten nicht abgeleitet werden. Aus den Experimenten mit den Inhibitoren wird aber deutlich, dass die ROS Bildung

1. aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Rotenon Elektronen erfordert, die über Komplex I eingespeist werden, und

2. aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Antimycin A, das die Reoxidation von cytb_H durch Ubichinon und Ubisemichinon blockiert (Trumpower et al. 1990), einen intakten Q-Zyklus des Komplexes III erfordert.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Inhibitoren Rotenon und Antimycin A je nach Zelltyp und untersuchtem Organ die normoxische ROS-Produktion entweder verringern oder verstärken können. Dabei überwiegen die Angaben zu einer Reduktion der ROS-Produktion wie sie auch von uns beobachtet wurde. Demgegenüber führt die Gabe von Rotenon in sensorischen Neuronen der Ratte, in Phäochromozytomzellen der Ratte (Höhler et al. 1999) und Nierenarterien der Ratte (Michelakis et al. 2002) zu einem deutlichen Anstieg der ROS-Erzeugung (Henrich et al. 2002). Antimycin A-Gabe erhöht die ROS-Produktion in den meisten Zelltypen, wie z. B. in Kardiomyozyten (Duranteau et al. 1998, Raha et al. 2000), in Hepatomzellen (Chandel et al. 1998) und in Ratten-Nierenarterien (Michelakis et al. 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass die durch Antimycin A induzierte Kontraktion kultivierter glatter Muskelzellen aus Lungengefäßen und der transiente Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes in perfundierten Lungen mit einer erhöhten ROS-Produktion zusammenhängen könnten (Waypa et al. 2001). Diese Vermutung steht jedoch im Widerspruch zu der Beobachtung, dass Rotenon, das die mitochondriale ROS-Produktion in Gefäßzellen senkt, genau wie Antimycin A eine transiente pulmonale Vasokonstriktion verursacht (Rounds und McMurtry 1981). Direkte Messungen zeigten, dass Antimycin A die normoxische ROS-Produktion in Lungenarterien der Ratte (Archer et al. 1993, Michelakis et al. 2002) und der Maus (diese Studie) sowie auch in HL-60-Zellen (Armstrong und Jones 2002) reduziert. Möglicherweise tragen auch Unterschiede in der Funktion von Mitochondrien verschiedener Organe und/oder Gefäßbetten zu den voneinander abweichenden Befunden bei (Michelakis et al. 2002).

Unserer Daten zeigen, dass unter Hypoxie der Komplex II eine wesentliche Rolle bei der ROS-Bildung spielt, und dass dieser Komplex möglicherweise den Sauerstoffsensor darstellt. Der Komplex II ist sowohl Bestandteil des Krebszyklus als auch der mitochondrialen ETK. Er ist mit einer Molekülmasse von 140 kD der kleinste Komplex der Atmungskette und besteht aus vier Proteinen: Der katalytische Kern ist aufgebaut aus zwei hydrophilen Untereinheiten mit einem FAD (SDHA) und drei Eisen-Schwefel-Clustern S1-S3 (SDHB). Er ist durch die beiden hydrophoben Untereinheiten SDHC (15

kDa) und SDHD (12 kDa) in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Diese beiden Untereinheiten formen das Hämprotein Cytochrom b (Belyaeva 2018; Hägerhäll 1997). Als Bestandteil des Krebszyklus oxidiert dieser Komplex Succinat zu Fumarat, wodurch der Atmungskette durch Reduktion von Ubichinon zwei Elektronen zugeführt werden. Die SDH-Aktivität variiert deutlich zwischen verschiedenen Organen bzw. Zelltypen; eine hohe SDH-Aktivität wurde zum Beispiel in Kardiomyozyten und Keulenzellen des Bronchiolarepithels nachgewiesen, während sie zum Beispiel in Axonterminalen des Nervensystems oder in Lungengefäßen niedrig ist oder sogar fehlt (Hajos et al. 1971, Thaete et al. 1990, Punkt et al. 1995, und diese Studie).

Unter bestimmten Bedingungen können Elektronen auch in umgekehrter Richtung fließen, so dass der Komplex II als Fumarat-Reduktase statt als SDH arbeitet (Hägerhäll 1997). Ein solcher Funktionswechsel wurde bei aufgereinigtem Komplex II aus Rinderherz-Mitochondrien beobachtet, wenn die Enzymaktivität unter anaeroben Bedingungen analysiert wurde (Yu et al. 1987). Die in-vitro-Daten von Rinderherzen werden untermauert durch die Beobachtung, dass die SDH-Aktivität in Rattenherzen unter Hypoxie abnimmt (Punkt et al. 1995). Wiesner et al. (1988) führten Messungen von Metaboliten in Rattenherzen durch, die mit Puffer perfundiert wurden, der mit 95% N₂, 5% CO₂ begast worden war. Unter diesen Bedingungen stieg der Gehalt an Succinat von $0,08 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht in den Kontrollherzen auf $0,45 \pm 0,11 \mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht in den hypoxischen Herzen. Da dies deutlich niedriger ist als die Succinat-Konzentration (15 mM), die in unseren Experimenten zur Hemmung der ROS-Produktion angewendet wurde, nehmen wir an, dass Komplex II selbst bei anhaltender Hypoxie als Fumarat-Reduktase wirken kann. Während die Eigenschaften der Fumarat-Reduktase in Säugetier-Mitochondrien noch nicht vollständig verstanden sind, ist bekannt, dass die Fumarat-Reduktase von *Escherichia coli* einen äußerst effektiven Generator von O₂- darstellt (Imlay 1995, Maklashina et al. 2018).

Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass der Komplex II seine Funktion unter Hypoxie von SDH auf Fumarat-Reduktase umstellen kann, wodurch vermehrt ROS gebildet und Succinat angereichert wird. Unsere eigenen Befunde sprechen dafür, dass dies auch in den Zellen der Lungengefäße der Fall ist. Durch die Hemmung von Komplex II wird selektiv die durch Hypoxie induzierte ROS-Produktion reduziert. Das impliziert, dass es unter Hypoxie zu einer Aktivierung von Komplex II kommt. Allerdings kann diese Aktivierung nicht zu einer verstärkten SDH-Aktivität führen, denn wir beobachteten unter Hypoxie histochemisch eine verminderte, nicht eine erhöhte SDH-

Aktivität. Desweiteren führte die Zugabe des Substrats der SDH, d.h. von Succinat, zu einer verminderten statt zu einer erhöhten ROS-Bildung. Diese hemmende Wirkung von Succinat auf die hypoxische ROS-Bildung lässt sich am besten dadurch erklären, dass der Komplex II als Fumarat-Reduktase wirkt, die durch einen Überschuss seines Metaboliten Succinat gehemmt werden kann. Um als Fumarat-Reduktase zu arbeiten, muss der Komplex II mit Elektronen versorgt werden. Diese Elektronen können von NADH bereitgestellt werden (Yu et al. 1987, Zhu et al. 2016).

Übereinstimmend mit diesem Modell führte auch die Hemmung der NADH-Dehydrogenase (= Komplex I) durch Rotenon zu einer Blockierung des durch Hypoxie induzierten Anstiegs der ROS-Produktion. Offensichtlich ist auch ein intakter Q-Zyklus des Komplexes III erforderlich, da seine Hemmung durch Antimycin A ebenfalls die durch Hypoxie induzierte ROS-Erzeugung verhinderte. Wir vermuten, dass nicht alle in die Transportkette eingespeisten Elektronen direkt über den Komplex II zu Fumarat als terminalem Elektronenakzeptor transferiert werden, sondern dass parallel der Elektronentransfer über das Eisen-Schwefel-Protein und Cyt c1 in Richtung des Komplexes IV erfolgen kann. Die genaue Rolle des Komplexes III unter diesen Bedingungen muss jedoch noch geklärt werden.

Mutationen in Genen, die für die Proteine des Komplexes II kodieren, und die daraus resultierenden Phänotypen, unterstützen unsere These, dass der Komplex II eine wesentliche Rolle bei der Sauerstoffmessung und/oder des nachgeschalteten Signalwegs spielt. Bei einer Mutante des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, bei der eine inverse Korrelation zwischen Lebensdauer und Sauerstoff-Konzentration in der Umgebung beobachtet wurde, wurde eine Missense-Mutation im SDHC-Gen gefunden (Ishii et al. 1998). Cawthon et al. (2001) führten Studien an Mitochondrien durch, die sie aus Masthühnern isolierten, die das pulmonale Hypertonie-Syndrom aufweisen. Dieses Syndrom ist eine hohe Kosten verursachende Erkrankung, die auf einem Ungleichgewicht zwischen dem Herzzeitvolumen und der anatomischen Kapazität des Lungengefäßsystems basiert (Cawthon et al. 2001, Wideman et al. 2013). Die Autoren verwendeten verschiedene Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette und konnten einen Defekt am Komplex II bzw. am Ubichinon nachweisen. Hereditäre Tumore des Glomus caroticum, das an der Karotisgabel sitzt und der Messung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks dient, sind seltene, normalerweise gutartige und langsam wachsende Tumore. Sie weisen mehrere Merkmale auf, die auch im Glomus caroticum von Personen zu finden sind, die in großen Höhen unter chronischer Hypoxämie leben.

Die Tumoren werden durch Mutationen in den Genen von SDHB, SDHC und am häufigsten in SDHD verursacht (Baysal et al. 2001).

Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Hypoxie zu einem Anstieg der ROS-Produktion in den Zellen der pulmonalen Gefäße führt. Dabei kommt dem Komplex II der mitochondrialen Atmungskette eine essenzielle Rolle zu.

5 Zusammenfassung

Bei der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) verengen sich die intrapulmonalen Arterien als Reaktion auf eine alveoläre Hypoxie und leiten das Blut in besser ventilerte Lungenbereiche um, es findet also eine Anpassung der Perfusion an die Ventilation statt. Weder die molekulare Natur des Sauerstoffsensors noch der Signalweg, der zu einer HPV führt, waren zu Beginn dieser Arbeit vollständig entschlüsselt, wobei aber Hinweise auf eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) oder vermutlich in den Mitochondrien gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vorlagen. Ziel der Arbeit war daher die quantitative Erfassung zellulärer NO- und ROS-Produktion in pulmonalarteriellen Gefäßen unter Norm- und Hypoxie. Dazu wurden 200 µm dicke lebende Schnitte von Mauslungen in Gegenwart der fluoreszierenden Indikatoren DCF-DA (Nachweis von ROS) bzw. DAF-2DA (Nachweis von NO) unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend die positiven Zellen und ihre Signalstärke in den Wänden der Gefäße fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert. Die Succinatdehydrogenase-Aktivität (SDH-Aktivität) des mitochondrialen Komplexes II wurde mittels eines histochemischen Verfahrens quantitativ analysiert.

Während die Anzahl NO-produzierender Zellen in der Gefäßwand durch Hypoxie nicht verändert wurde, war die Anzahl der ROS-generierenden Zellen signifikant erhöht. Die Zugabe spezifischer Inhibitoren (DPI zur Hemmung von Flavoproteinen, Rotenon zur Hemmung von Komplex I, 3-NPA und TTFA von Komplex II, Antimycin A von Komplex III und NaN_3 von Komplex IV) ergab, dass die mitochondriale Atmungskette die Quelle von ROS war. Die Beteiligung der einzelnen Komplexe unterschied sich in der normoxischen und hypoxischen ROS-Bildung. Während für die normoxische ROS-Erzeugung die Komplexe I und III erforderlich waren, erforderte die hypoxische ROS-Bildung zusätzlich den Komplex II. Die histochemisch nachweisbare SDH-Aktivität von Komplex II in Zellen der intrapulmonalen Arterien nahm unter Hypoxie ab. Die Hemmung der umgekehrten enzymatischen Reaktion der SDH, d.h. die Fumarat-Reduktase, durch Zugabe von Succinat verhinderte spezifisch die hypoxische, nicht aber die normoxische ROS-Bildung. Somit spielt Komplex II eine wesentliche Rolle bei der hypoxischen ROS-Produktion. Vermutlich wechselt seine katalytische Aktivität bei verringertem Sauerstoffpartialdruck von SDH zu Fumarat-Reduktase, wodurch die Richtung des Elektronenflusses moduliert wird.

6 Summary

In hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV), the intrapulmonary arteries narrow in response to alveolar hypoxia and redirect the blood to the better ventilated areas of the lungs. So perfusion is matched with ventilation. Neither the molecular nature of the oxygen sensor nor the signaling and effector pathways that lead to HPV had been fully deciphered at the start of this work, but there was evidence for the involvement of nitric oxide (NO) and of reactive oxygen species (ROS), likely derived from the mitochondrial respiratory chain. Thus, the present study aimed to quantify cellular NO and ROS production in pulmonary vascular cells in normoxia and hypoxia. To this end, murine living precision-cut lung sections (200 μm thick) were exposed to the fluorescent indicators DAF-2DA (for NO) and DCF-DA (for ROS) under normoxic or hypoxic conditions. The number of positive cells in the vessel wall and their fluorescence intensity were subsequently quantified with aid of a fluorescence microscope. Moreover, succinate dehydrogenase (SDH) activity of mitochondrial complex II was quantitatively analyzed by a histochemical method.

Whereas the number of NO-producing cells was not altered by hypoxia, the number of ROS-generating cells increased significantly. Addition of specific pharmacological inhibitors (DPI to inhibit flavoproteins, rotenone to inhibit complex I, 3-NPA and TTFA to inhibit complex II, antimycin A to inhibit complex III, and NaN_3 to inhibit complex IV) revealed that the mitochondrial respiratory chain was the major source of ROS. The contribution of the individual mitochondrial complexes differed in normoxic and hypoxic ROS generation. Whereas normoxic ROS production was dependent on complexes I and III, hypoxic ROS generation additionally required complex II. Histochemical analyses demonstrated that SDH activity of complex II decreased in the arterial wall during hypoxia. Inhibition of the reversed enzymatic reaction of SDH, i.e., fumarate reductase, by application of succinate specifically abolished hypoxic, but not normoxic, ROS generation. Thus, complex II plays an essential role in hypoxic ROS production. Presumably, its catalytic activity switches from SDH to fumarate reductase at reduced oxygen tension, thereby modulating the directionality of the electron flow.

7 Literaturverzeichnis

Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett.* 2018; 592:692-702.

Archer SL, Huang J, Henry T, Peterson D, Weir EK. A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res.* 1993; 73:1100-12.

Archer S, Michelakis E. The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O₂ sensors, and controversies. *News Physiol Sci.* 2002; 17:131-7.

Archer SL, Tolins JP, Raj L, Weir EK. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 164:1198-205.

Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, Puttagunta L, Waite R, Nelson DP, Dinauer MC, Weir EK. O₂ sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:7944-9.

Armstrong JS, Jones DP. Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. *FASEB J.* 2002; 16:1263–1265.

Bayarri MA, Milara J, Estornut C, Cortijo J. Nitric Oxide System and Bronchial Epithelium: More Than a Barrier. *Front Physiol.* 2021; 12:687381.

Baysal BE, Rubinstein WS, Taschner PEM. Phenotypic dichotomy in mitochondrial complex II genetic. *J Mol Med.* 2001; 79:495–503.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87:245-313.

Belyaeva EA. Respiratory complex II in mitochondrial dysfunction-mediated cytotoxicity: Insight from cadmium. *J Trace Elem Med Biol.* 2018; 50:80-92.

Bennie RE, Packer CS, Powell DR, Jin N, Rhoades RA. Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am J Physiol.* 1991; 261:L156-63.

Berg K, Ericsson M, Lindgren M, Gustafsson H. A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies. *PLoS One.* 2014; 9:e90964.

Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang L, Crofts AR.: Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69:1005–1075.

Boeger R, Hannemann J.: Dual role of the L-arginine-ADMA-NO pathway in systemic hypoxic vasodilation and pulmonary hypoxic vasoconstriction. *Pulm Circ.* 2020; 10:23-30.

Bonini MG, Rota C, Tomasi A, Mason RP.: The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free Radic Biol Med.* 2006; 40:968-75.

Boveris A.: Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol.* 1977; 78:67–82.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973; 134:707-16.

Brand M.: The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 2010; 45:466-472.

Brandes RP, Weissmann N, Schröder K.: NADPH-Oxidasen der Nox-Familie: Molekulare Aktivierungsmechanismen. *Freie Radikale Biologie & Medizin.* 2014; 76: 208-226.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH, Localization of nitric oxide synthase 1219 indicating a neural role for nitric oxide, *Nature.* 1990; 347:768-70.

Brigelius-Flohé R, Flohé L.: Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15:2335-81.

Buescher PC, Pearse DB, Pillai RP, Litt MC, Mitchell MC, Sylvester JT.: Energy state and vasomotor tone in hypoxic pig lungs. *J Appl Physiol (1985).* 1991; 70:1874-81.

Burger G, Lang BF, Reith M, Gray MW.: Genes encoding the same three subunits of respiratory complex II are present in the mitochondrial DNA of two phylogenetically distant eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:2328-2332.

Cape JL, Strahan JR, Lenaeus MJ, Yuknis BA, Le TT, Shepherd JN, Bowman MK, Kramer DM.: The respiratory substrate rholoquinol induces Q-cycle bypass reactions in the yeast cytochrome bc (1) complex: mechanistic and physiological implications. *J Biol Chem.* 2005; 280:34654-34660.

Carr HS, Maxfield AB, Horng YC, Winge DR.: Functional analysis of the domains in Cox11. *J Biol Chem.* 2005; 280:22664-9.

Cawthon D, Beers K, and Bottje WG.: Electron transport chain defect and inefficient respiration may underlie pulmonary hypertension syndrome (ascites)-associated mitochondrial dysfunction in broilers. *Poult Sci.* 2001, 80: 474–484.

Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM.: NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006:691-728.

Cecchini G.: Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72:77–109.

Chance B, Sies H, Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59 :527-605.

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, and Schumacker PT.: Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 11715–11720.

Chistiakov DA, Shkurat TP, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN.: The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann Med.* 2018, 50, 121–127.

Clark RA.: Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis.* 1999; 179 Suppl 2: S309-17.

Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2006; 71: 216-25.

Crofts AR.: The cytochrome bc 1 complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol.* 2004, 66:689–733.

Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D.: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 1987; 107: 526-45.

D’Auréaux B, Toledona MB.: ROS as signaling molecules: mechanisms that generate, specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, vol. 8, 813-824.

Demiryurek AT, Wadsworth RM. Superoxide in the pulmonary circulation. *Pharmacol Ther.* 1999; 84:355-65.

Desireddi JR, Farrow KN, Marks JD, Waypa GB, Schumacker PT.: Hypoxia increases ROS signaling and cytosolic Ca₍₂₊₎ in pulmonary artery smooth muscle cells of mouse lungs slices. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12:595-602.

Dibrov E, Fu S, Lemire BD.: The *Saccharomyces cerevisiae* TCM62 gene encodes a chaperone necessary for the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase (complex II). *J Biol Chem*. 1998, 273:32042–32048.

Dikalov SI, Harrison DG.: Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20:372-82.

Dikalov SI, Kirilyuk IA, Voinov M, Grigor'ev IA.: EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free Radic Res*. 2011; 45:417-30.

Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG.: Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 2007; 49:717-27.

Dikalov SI, Li W, Mehranpour P, Wang SS, Zafari AM.: Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochem Pharmacol*. 2007; 73:972-80.

Dunham-Snary KJ, Wu D, Sykes EA, Thakrar A, Parlow LRG, Mewburn JD, Parlow JL, Archer SL.: Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: From Molecular Mechanisms to Medicine. *Chest*. 2017; 151:181-192.

Dunker HR.: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen Band 1, Atemapparat, Benninghoff Anatomie, Drenckhahn D. und Zenker W., 15. Auflage, Urban und Schwarzenberg 1994.

Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT.: Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 1998, 273: 11619–11624.

Esser L, Quinn B, Li YF, Zhang M, Elberry M, Yu L, Yu CA, Xia D.: Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome bc₁ complex. *J Mol Biol*. 2004, 341:281–302.

Farah C, Michel LYM, Balligand JL.: Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2018; 15:292-316.

Fedde MR.: Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poult Sci.* 1998; 1130–1138.

Fleming I, Busse R.: Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284: R1-12.

Förstermann U, Sessa WC.: Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012; 33:829-37, 837a-837d.

Folkes LK, Patel KB, Wardman P, Wrona M.: Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells. *Arch Biochem Biophys.* 2009; 484:122-6.

Forman HJ, Torres M.: Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: S4-8.

Fysikopoulos A, Seimetz M, Hadzic S, Knoepp F, Wu CY, Malkmus K, Wilhelm J, Pichl A, Bednorz M, Tadele Roxlau E, Ghofrani HA, Sommer N, Gierhardt M, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N, Kraut S.: Amelioration of elastase-induced lung emphysema and reversal of pulmonary hypertension by pharmacological iNOS inhibition in mice. *Br J Pharmacol.* 2021; 178(1):152-171.

Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA the cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 2003; 546:355–358.

Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, et al.: Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 2005; 1:401–408.

Hägerhäll C.: Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1320:107-41.

Hahner F, Moll F, Schröder K.: NADPH- Oxidases in the differentiation of endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2020; 116 (2): 262–268.

Hajos F, Kerpel-Fronius S.: Electron microscope histochemical evidence for a partial or total block of the tricarboxylic acid cycle in the mitochondria of presynaptic axon terminals. *J Cell Biol.* 1971, 51: 216–222.

Henderson LM, Chappel JB.: NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1273:87-107.

Henrich M, Hoffmann K, König P, Gruss M, Fischbach T, Gödecke A, Hempelmann G, Kummer W.: Sensory neurons respond to hypoxia with NO production associated with mitochondria. *Mol Cell Neurosci*. 2002; 20: 307–322.

Herb M, Gluschko A, Wiegmann K, Farid A, Wolf A.: Mitochondrial reactive oxygen species enable proinflammatory signaling through disulfide linkage of NEMO. *Sci Signal*. 2019; 12:568.

Höhler B, Lange B, Holzapfel B, Goldenberg A, Hänze J, Sell A, Testan H, Möller W, Kummer W.: Hypoxic upregulation of tyrosine hydroxylase gene expression is paralleled, but not induced, by increased generation of reactive oxygen species in PC12 cells. *FEBS Lett*. 1999, 457: 53–56.

Hsieh HJ, Cheng CC, Wu ST, Chiu JJ, Wung BS, Wang DL. Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. *J Cell Physiol*. 1998; 175:156-62.

Hunte C, Solmaz S, Palsdóttir H, Wenz T.: A structural perspective on mechanism and function of the cytochrome bc (1) complex. *Results Probl Cell Differ*. 2008; 45:253-78.

Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, SenooMatsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K.: A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*. 1998, 394: 694–697.

Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK.: Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science*. 1998, 281:64–71.

Jung HJ, Kim Y, Chang J, Kang SW, Kim JH, Kwon HJ. Mitochondrial UQCRB regulates VEGFR2 signaling in endothelial cells. *J Mol Med (Berl)*. 2013; 91:1117-28.

Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ 2nd, Ischiropoulos H.: Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52:1-6.

Kantrow SP, Huang YC, Whorton AR, Grayck EN, Knight JM, Millington DS, Piantadosi CA.: Hypoxia inhibits nitric oxide synthesis in isolated rabbit lung. *Am J Physiol.* 1997; 272: L1167-73.

Karlson P, Doenecke D, Koolman J.: Atmungskette und Photosynthese In. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14. Auflage, 1994, Thieme Verlag Stuttgart. New York).

Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson CI.: What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem J.* 2010; 428:183-90.

Kellner M, Heidrich M, Beigel R, Lorbeer RA, Knudsen L, Ripken T, Heisterkamp A, Meyer H, Kühnel MP, Ochs M. Imaging of the mouse lung with scanning laser optical tomography (SLOT). *J Appl Physiol.* 2012; 113(6): 975-83.

Kim H, Xia D, Yu CA, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J.: Inhibitor binding changes domain mobility in the iron–sulfur protein of the mitochondrial bc1 complex from bovine heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, 95:8026–8033.

Kim SY, Mongey R, Griffiths M, Hind M, Dean CH.: An Ex Vivo Acid Injury and Repair (AIR) Model Using Precision-Cut Lung Slices to Understand Lung Injury and Repair. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2020; 10:e85.

Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ.: NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20:2794-2814.

Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H.: Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic Res.* 1997; 27:245-54.

Kotamraju S, Kalivendi SV, Konorev E, Chitambar CR, Joseph J, Kalyanaraman B.: Oxidant-induced iron signaling in Doxorubicin-mediated apoptosis. *Methods Enzymol.* 2004; 378:362-82.

Kotamraju S, Tampo Y, Keszler A, Chitambar CR, Joseph J, Haas AL, Kalyanaraman B.: Nitric oxide inhibits H₂O₂-induced transferrin receptor-dependent apoptosis in endothelial cells: Role of ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:10653-8.

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S.: Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70:343-54.

Lassègue B, Clempus RE.: Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285:R277-97.

Lassègue B, Griendling KK.: NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:653-61.

Leach RM, Hill HM, Snetkov VA, Robertson TP, Ward JP.: Divergent roles of glycolysis and the mitochondrial electron transport in the hypoxic pulmonary vasoconstriction of the rat: identity of the oxygen sensor. *J Physiol.* 2001, 536: 211–224.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC.: Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5:227-31.

Lee S, Gharavi NM, Honda H, Chang I, Kim B, Jen N, Li R, Zimman A, Berliner JA.: A role for NADPH oxidase 4 in the activation of vascular endothelial cells by oxidized phospholipids. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47:145-51.

Letts JA, Sazanov LA.: Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain; *Nat Struct Mol Biol.* 2017; 24:800–808.

Li H, Xia N, Förstermann U.: Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide.* 2012; 26:102-10.

Liu G, Betts C, Cunoosamy DM, Åberg PM, Hornberg JJ, Sivars KB, Cohen TS.: Use of precision cut lung slices as a translational model for the study of lung biology. *Respir Res.* 2019; 20:162.

Liu X, Chen Z.: The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases. *J Transl Med.* 2017; 15:207.

Liu JQ, Sham JS, Shimoda LA, Kuppusamy P, Sylvester JT.: Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 285: L322-33.

Lloreta-Trull J, Serrano S.: Biology and pathology of the mitochondrion; *Ultrastruct Pathol.* 1998. 22:357- 367.

Loschen G, Azzi A, Flohé L.: Mitochondrial H₂O₂ formation at site II. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1973; 354:791-4. PMID: 4372155.

Madden JA, Vadula MS, Kurup VP.: Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1992; 263:L384-93.

Maklashina E, Rajagukguk S, Iverson TM, Cecchini G.: The unassembled flavoprotein subunits of human and bacterial complex II have impaired catalytic activity and generate only minor amounts of ROS. *J Biol Chem.* 2018; 293:7754-7765.

Mazat JP, Devin A, Ransac S.: Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cell Mol Life Sci.* 2020; 77:455-465.

McCord JM.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985; 312:159-63.

Michelakis ED, Hampl V, Nsair A, Wu X, Harry G, Haromy A, Gurtu R, Archer SL.: Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circ Res.* 2002, 90: 1307–1315.

Mittal M, Roth M, König P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, Selbitz AC, Schermuly RT, Ghofrani HA, Kwapiszewska G, Kummer W, Klepetko W, Hoda MA, Fink L, Hänze J, Seeger W, Grimminger F, Schmidt HH, Weissmann N.: Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circ Res.* 2007; 101:258-67.

Miyoshi H.: Probing the ubiquinone reduction site in bovine mitochondrial complex I using a series of synthetic ubiquinones and inhibitors. *J Bioenerg Biomembr.* 2001; 33:223-31.

Monsalve M, Borniquel S, Valle I, Lamas S.: Mitochondrial dysfunction in human pathologies. *Front Biosci.* 2007; 12:1131-53.

Murphy MP.: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009; 417:1-13.

Murray TR, Chen L, Marshall BE, Macarak EJ.: Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990; 3:457-65.

Nisimoto Y, Ogawa H, Kadokawa Y, Qiao S.: NADPH oxidase 4 function as a hydrogen peroxide sensor. *J Biochem.* 2018; 163(4):489-501.

Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A.: Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res.* 1995, 76: 536–543.

Paddenberg R, König P, Faulhammer P, Goldenberg A, Pfeil U, Kummer W.: Hypoxic vasoconstriction of partial muscular intra-acinar pulmonary arteries in murine precision cut lung slices. *Respir. Res.* 2006; 7: 93–109.

Paddenberg R, Tiefenbach M, Faulhammer P, Goldenberg A, Gries B, Pfeil U, Lips KS, Piruat JI, López-Barneo J, Schermuly RT, Weissmann N, Kummer W.: Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction of intra- but not of pre-acinar arteries. *Cardiovasc. Res.* 2012; 93: 702–710.

Pak O, Scheibe S, Esfandiary A, Gierhardt M, Sydykov A, Logan A, Fysikopoulos A, Veit F, Hecker M, Kroschel F, Quanz K, Erb A, Schäfer K, Fassbinder M, Alebrahimdehkordi N, Ghofrani HA, Schermuly RT, Brandes RP, Seeger W, Murphy MP, Weissmann N, Sommer N.: Impact of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2018; 1701024.

Pan Huaquin, Deutsch GH, Wert SE.: Comprehensive anatomic ontologies for lung development: A comparison of alveolar formation and maturation within mouse and human lung. *Comparative Study J Biomed Semantics.* 2019, P: 1- 21.

Papa S, Martino PL, Capitanio G, Gaballo A, De Rasmio D, Signorile A, Petruzzella V.: The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 942:3-37.

Paravicini TM, Touyz RM.: NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008; 31 Suppl 2: S170-80.

Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedqvist P.: Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol Scand.* 1990; 140:449-57.

Pick E.: Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task. *Small GTPases.* 2014;5: e27952.

Suarez, C.J., Dintzis, S.M., Frevert, C.W., 9 - Respiratory, in Comparative Anatomy and Histology, P.M. Treuting and S.M. Dintzis, Editors. 2012, Academic Press: San Diego. p. 121-134.

Pollard PJ, Wortham NC, Tomlinson IP.: The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase und succinate dehydrogenase. *Ann Med.* 2003; 35: 632-639.

Punkt K, Welt K, Schaffranietz L.: Changes of enzyme activities in the rat myocardium caused by experimental hypoxia with and without ginkgo biloba extract EGb 761 pretreatment. A cytophotometrical study. *Acta Histochem.* 1995; 97: 67–79.

Qian SY, Buettner GR.: Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:1447-56.

Quinlan TR, Li D, Laubach VE, Shesely EG, Zhou N, Johns RA.: eNOS-deficient mice show reduced pulmonary vascular proliferation and remodeling to chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279: L641–L650.

Raha S, McEachern GE, Myint T, Robinson BH.: Superoxide from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29: 170–180.

Rathore R, Zheng YM, Niu CF, Liu QH, Korde A, Ho YS, Wang YX.: Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45:1223-31.

Rey FE and Pagano PJ.: "The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1962-71.

Richter E, Friesenegger S, Engl J, Tricker AR.: Use of precision-cut tissue slices in organ culture to study metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by hamster lung, liver and kidney. *Toxicology.* 2000; 144: 83–91.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.: Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:10043-7.

Rounds S, McMurtry IF.: Inhibitors of oxidative ATP production cause transient vasoconstriction and block subsequent pressor responses in rat lungs. *Circ Res.* 1981; 48: 393–400.

Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H.: Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation.* 2001; 104:1767-72.

Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J.: Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2001; 11:173–86.

Schröder K. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Dosis facit venenum. *Exp Physiol.* 2019; 104(4):447-452.

Schwenke DO, Pearson JT, Tsuchimochi H, Kangawa K, Shirai M.: Pulmonary vascular reactivity of spontaneously hypertensive rats is exacerbated in response to the central administration of exogenous nitric oxide. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34:88-94.

Schwenke DO, Pearson JT, Umetani K, Kangawa K, Shirai M.: Imaging of the pulmonary circulation in the closed-chest rat using synchrotron radiation microangiography. *J Appl Physiol (1985).* 2007; 102:787-93.

Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Veit F, Kwapiszewska G, Weisel FC, Milger K, Egemnazarov B, Turowska A, Fuchs B, Nikam S, Roth M, Sydykov A, Medebach T, Klepetko W, Jaksch P, Dumitrascu R, Garn H, Voswinckel R, Kostin S, Seeger W, Schermuly RT, Grimminger F, Ghofrani HA, Weissmann N.: Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell.* 2011; 147(2):293-305.

Semenza GL.: Perspectives on oxygen sensing. *Cell.* 1999; 98:281-284.

Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN.: Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:10771-8.

Skovgaard N, Abe AS, Andrade DV, Wang T.: Hypoxic pulmonary vasoconstriction in reptiles: a comparative study of four species with different lung structures and

pulmonary blood pressures. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005; 1280–1288.

Smith KA, Schumacker PT. Sensors and signals: the role of reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Physiol*. 2019; 597:1033-1043.

Sommer N, Pak O, Schörner S, Derfuss T, Krug A, Gnaiger E, Ghofrani HA, Schermuly RT, Huckstorf C, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N.: Mitochondrial cytochrome redox states and respiration in acute pulmonary oxygen sensing. *Eur Respir J*. 2010; 36:1056-66.

Sommer N, Strielkov I, Pak O, Weissmann N.: Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur Respir J*. 2016; 47:288-303.

Sommer N, Hüttemann M, Pak O, Scheibe S, Knoepp F, Sinkler C, Malczyk M, Gierhardt M, Esfandiary A, Kraut S, Jonas F, Veith C, Aras S, Sydykov A, Alebrahimdehkordi N, Giehl K, Hecker M, Brandes RP, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Schermuly RT, Grossman LI, Weissmann N.: Mitochondrial Complex IV Subunit 4 Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing. *Circ Res*. 2017; 121(4):424-438.

Song T, Zheng YM, Wang YX.: Cross Talk Between Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Sarcoplasmic Reticulum Calcium in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 967:289-298.

Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG.: Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*. 2006; 99: 675-91.

Strielkov IV, Kizub IV, Khromov AS, Soloviev AI.: Evidence for the role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Vascul Pharmacol*. 2013; 58:292-8.

Strielkov I, Pak O, Sommer N, Weissmann N. Recent advances in oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol (1985)*. 2017; 123:1647-1656.

Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R, Nathan CF.: Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J*. 1991; 5: 98-103.

Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, Rao Z.: Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*. 2005; 121:1043–1057.

Sylvester JT, Harabin AL, Peake MD, Frank RS.: Vasodilator and constrictor responses to hypoxia in isolated pig lungs. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1980; 49:820-5.

Tampo Y, Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Keszler A, Joseph J, Kalyanaraman B.: Oxidative stress-induced iron signaling is responsible for peroxide-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein in endothelial cells: role of transferrin receptor-dependent iron uptake in apoptosis. *Circ Res*. 2003; 92:56-63.

Taniyama Y, Griendling KK.: Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003; 42:1075-81.

Thaete LG, Malkinson AM.: Differential staining of normal and neoplastic mouse lung epithelia by succinate dehydrogenase histochemistry. *Cancer Lett*. 1990; 52:219–227.

Thompson JS, Jones RD, Rogers TK, Hancock J, Morice AH.: Hemmung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion in isolierten Lungenarterien der Ratte durch Diphenyleniodonium (DPI). *Pulm Pharmacol Ther*. 1998; 11:71-5.

Timón-Gómez A, Nývltová E, Abriata LA, Vila AJ, Hosler J, Barrientos A.: Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. *Semin Cell Dev Biol*. 2018; 76:163-178.

Touyz RM, Anagnostopoulou A, Camargo LL, Rios FJ, Montezano AC.: Vascular Biology of Superoxide-Generating NADPH Oxidase 5-Implications in Hypertension and Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2019; 30:1027-1040.

Touyz RM, Schiffrin EL.: Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122:339-52.

Trumpower BL.: The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem*. 1990; 265: 11409–11412.

Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL.: Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237: 408–414.

Turrens JF, Boveris A.: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980, 191:421–427.

Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD.: The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.* 1982; 217:401–410.

Ullrich V, Bachschmid M.: Superoxide as a messenger of endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 278:1-8.

Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL.: Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7:308-17.

Van den Berg MP, Meurs H, Gosens R. Targeting arginase and nitric oxide metabolism in chronic airway diseases and their co-morbidities. *Curr Opin Pharmacol.* 2018; 40:126-133.

Van der Laan M, Horvath SE, Pfanner N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr Opin Cell Biol.* 2016; 41:33-42.

Veith C, Kraut S, Wilhelm J, Sommer N, Quanz K, Seeger W, Brandes RP, Weissmann N, Schröder K.: NADPH oxidase 4 is not involved in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Pulm Circ.* 2016; 6:397-400.

Von Euler U, Liljestrand G.: Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand.* 1946; (12), 301–320.

Von Zglinicki T., Nikolaus T. Alter und Altern. In: Schmidt R.F., Lang F. (eds) *Physiologie des Menschen.* Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg. 2007

Wang QS, Zheng YM, Dong L, Ho YS, Guo Z, Wang YX.: Role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia-dependent increase in intracellular calcium in pulmonary artery myocytes. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42:642-53.

Waypa GB, Marks JD, Guzy RD, Mungai PT, Schriewer JM, Dokic D, Ball MK, Schumacker PT.: Superoxide generated at mitochondrial complex III triggers acute responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187:424-32.

Waypa GB, Marks JD, Guzy R, Mungai PT, Schriewer J, Dokic D, Schumacker PT.: Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2010; 106(3):526-35.

Waypa GB, Guzy R, Mungai PT, Mack MM, Marks JD, Roe MW, Schumacker PT.: Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res.* 2006; 99:970-8.

Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT.: Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res.* 2001; 88:1259–1266.

Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W.: Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol.* 1995; 100:159-69.

Weissmann N, Akkayagil E, Quanz K, Schermuly RT, Ghofrani HA, Fink L, Hänze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F.: Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004; 139:191-202.

Wideman RF, Rhoads DD, Erf GF, Anthony NB.: Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: a review. *Poult Sci.* 2013; 92:64-83.

Wiesner RJ, Rosen P, Grieshaber MK.: Pathways of succinate formation and their contribution to improvement of cardiac function in the hypoxic rat heart. *Biochem Med Metab Biol.* 1988; 40: 19–34.

Xia D, Esser L, Yu L, Yu CA.: Structural basis for the mechanism of electron bifurcation at the quinol oxidation site of the cytochrome bc 1 complex. *Photosynth Res.* 2007; 92:17–34.

Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S.: Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science.* 2003; 299:700–704.

Yu L, Xu JX, Haley PE, Yu CA.: Properties of bovine heart mitochondrial cytochrome b560. *J Biol Chem.* 1987; 262:1137–1143.

Zhang JG, Fariss MW.: Thenoyltrifluoroacetone, a potent inhibitor of carboxylesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63:751–754.

Zhu J, Vinothkumar KR, Hirst J.: Structure of mammalian respiratory complex I. Nature. 2016; 536:354-358.

Zmijewski JW, Moellering DR, Le Goffe C, Landar A, Ramachandran A, Darley-Usmar VM.: Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 289:H852-61.

8 Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt 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.“

Koblenz, 14.06.2022

Barat Ishaq

9 Publikation

Paddenberg R, Ishaq B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, Braun-Dullaeus RC, Kummer W. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 284(5): L710-9

10 Danksagung

Im Jahr 1999 hat mich Herr Prof. Dr. Wolfgang Kummer in den Kreis seiner Doktoranden aufgenommen, wofür ich ihm außerordentlich dankbar bin. Seither hat er mir mit großer Geduld bei allen Problemen weitergeholfen, die bei der Anfertigung meiner Dissertation aufgetreten sind. Dies geschah zuerst in regelmäßigen Arbeitsgruppenbesprechungen und später auch in ausführlichen persönlichen Gesprächen. Beides war unerlässlich, um mir die Einordnung meines Themas in einen größeren Gesamtzusammenhang zu verdeutlichen.

Die ins Detail gehende Arbeit an dem speziellen Thema meiner Dissertation hätte ich ohne die motivierende Ermunterung durch Frau Dr. Renate Paddenberg nicht bewältigen können. Sie hat mir über die Jahre hinweg unermüdlich und mit viel Verständnis und Geduld zur Seite gestanden und mir mit Ausdauer und Genauigkeit ermöglicht, meine Dissertation Schritt für Schritt zu Papier zu bringen. Dafür danke ich ihr ganz besonders. Alle Gespräche, die ich mit Herrn Prof. Kummer und Frau Dr. Paddenberg führen durfte, waren für mich nicht nur aufbauend, lehrreich und prägend, sondern haben mir auch immer große Freude bereitet. Deshalb werde ich die vergangenen Jahre niemals vergessen und immer mit großer Dankbarkeit an meine Zeit in Gießen zurückdenken.

Ich möchte an dieser Stelle auch meinen Dank den nachstehenden Personen aussprechen, die auf unterschiedlichste Art und Weise zur Erstellung dieser Arbeit beitrugen: Frau Patricia Berger, Frau Anna Goldberg, Petra Faulhammer, Herr Martin Bodenbenner, Annika Sebastian, Herr Dr. Muhammad Aslam, Herr Dr. Martin Haunschild, Prof. Dr. Helga Luckenbach, Professor Dr. Dursun Gündüz.

Ganz besonders möchte ich zum Schluß meiner Familie für ihr Verständnis und ihre Geduld danken. Ihre außergewöhnliche Unterstützung war während des Schreibens dieser Arbeit für mich äußerst hilfreich.