Expression der NADPH-Oxidasen NOX1 und NOX4 in der Lunge des Kaninchens unter Normoxie und Hypoxie

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

> vorgelegt von Anne-Christine Selbitz geb. Scherer, aus Saarbrücken

> > Gießen 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Herr PD Dr. Jörg Hänze

Gutachter: Frau Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt

Tag der Disputation: 05.06.2008

Meinen Eltern und meinem Mann

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis				
Tabellenverzeichnis9				
Abkürzungsverzeichnis9				
1 Einleitung1	11			
1.1 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion 1	11			
1.1.1 Lokalisation der HPV 1	13			
1.1.2 Sensorzelle der HPV1	14			
1.1.3 Sensormechanismen der HPV1	14			
1.1.3.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle1	14			
1.1.3.2 Mitochondriale Atmungskette 1	15			
1.1.3.3 NADPH-Oxidoreduktasen1	15			
1.1.3.4 Cytochrom-P450-Enzyme1	16			
1.1.3.5 Hämoxygenase-2 1	16			
1.1.4 Mediatoren der HPV1	16			
1.1.4.1 Sauerstoffradikale 1	17			
1.1.4.2 Superoxiddismutase 1	17			
1.1.4.3 Stickstoffmonoxid (NO) und NO-Synthetase 1	17			
1.1.5 Gegenwärtige Vorstellung vom Effektormechanismus der HPV –				
Bedeutung von Ionenkanälen, Rho-Kinase und Calcium-Sensitivierung 1	18			
1.1.6 Störungen der HPV 2	20			
1.2 Pulmonale Hypertonie, Cor pulmonale und Vascular Remodeling 2	21			
1.2.1 Morphologische Veränderungen am pulmonalvaskulären System 2	21			
1.2.2 Bedeutung von Ionenkanälen für die chronische Hypoxie2	<u>2</u> 4			
1.2.3 Veränderungen der Genexpression2	25			
1.2.4 Mediatoren der chronischen Hypoxie2	26			
1.3 HPV, hypoxieinduziertes vaskuläres Remodeling und NADPH-				
Oxidasen2	27			
1.3.1 Leukozytäre NADPH-Oxidasen 2	27			

1.3.1.1 Isoformen der leukozytären NADPH-Oxidasen	29
1.3.1.1.1NOX1	29
1.3.1.1.2NOX2	29
1.3.1.1.3NOX3	31
1.3.1.1.4NOX4	31
1.3.1.1.5NOX5	31
1.3.1.1.6DUOX1 und DUOX2	32
1.3.1.2 Kofaktoren und Aktivierungsmodi	32
1.3.2 Hinweise auf die Beteiligung von NADPH-Oxidasen am Sauerstoff-	
sensing der HPV und des hypoxieinduzierten vaskulären Remodelings	32
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	35
2 Material	37
2.1 Geräte und Hilfsmittel	37
2.2 Pharmaka und Reagenzien	38
8 Methoden	39
3.1 Normoxie- und Hypoxieexposition der Versuchstiere	39
3.2 Narkose, Beatmung und Lungenentnahme	40
3.3 Mikrovaskuläre Präparation und Aufbewahrung der Proben	41
3.4 Homogenisation und RNA-Extraktion	44
3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung	45
3.6 DNase-Behandlung und Denaturierung der RNA	45
3.7 Reverse Transkription	45
3.8 Quantitative Real-time PCR	46
3.8.1 Formelableitung zur vergleichenden C _T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)	47
3.8.2 Verwendete Primer und Sonden	49
3.8.3 Auswertung, Statistik und Präsentation der Daten	50
Ergebnisse	51
4.1 Basale Expression von NOX1-mRNA in der Kaninchenlunge	51
4.2 Basale Expression von NOX4-mRNA in der Kaninchenlunge	54

4.3	Verhältnis der basalen NOX1- zur basalen NOX4-mRNA-Expression	ı 58
4.4	Regulation der NOX1-mRNA-Expression unter Hypoxie	_ 60
4.5	Regulation der NOX4-mRNA-Expression unter Hypoxie	_ 66
5 D	iskussion	_70
5.1	Untersuchungen zur basalen Expression von NOX1-mRNA und NOX4-mRNA in der Kaninchenlunge	_ 70
5.2	Untersuchungen zur Regulation der NOX1- und NOX4-mRNA- Expression unter Hypoxie	_ 74
5.3	Ausblick	_ 76
6 Z	usammenfassung	_77
7 S	ummary	_80
8 Li	iteraturverzeichnis	_82
Anha	ng	102
Pub	likationsverzeichnis	102
Erkl	ärung	103
Lebe	enslauf	104
Dan	ksagung	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2: Relative NOX1-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Trachea, Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 52 Abbildung 3: Relative NOX1-mRNA-Expression normoxischer Kaninchen für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, - venen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 53 Abbildung 4: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Rumonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Abbildung 7: Vergleich der relat
Trachea, Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 52 Abbildung 3: Relative NOX1-mRNA-Expression normoxischer Kaninchen für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, - venen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 53 Abbildung 4: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Racha, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression und der relativen 59 <tr< td=""></tr<>
Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie hilusnah und peripher 52 Abbildung 3: Relative NOX1-mRNA-Expression normoxischer Kaninchen für Proben 62 der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, - 53 venen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 53 Abbildung 4: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der 53 Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie 64 Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und 66 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und 56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und 56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 51 Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalarteriens, mittlerer und k
entnommenen Parenchyms. 52 Abbildung 3: Relative NOX1-mRNA-Expression normoxischer Kaninchen für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, - venen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 53 Abbildung 4: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression numd der relativen NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt. 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien und peripheren Lungenparenchyms. 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Versuchstiere 62
Abbildung 3: Relative NOX1-mRNA-Expression normoxischer Kaninchen für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, - venen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms53 Abbildung 4: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms
der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, - venen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms53 Abbildung 4: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression normoxisch und der relativen NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
 venen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms 53 Abbildung 4: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms
Abbildung 4: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression normoxisch und der relativen NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt. 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner
Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, 57 Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen 59 Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59
Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. 56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt. 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms. 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Sowie hilusnahen und 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen Sowie hilusnahen und 62
peripher entnommenen Parenchyms. 56 Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, 91 Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen 92 Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 61 einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet 92 wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 62
Abbildung 5: Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 61 einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 62
kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie 57 hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, 9 Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen 9 Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 61 einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet 9 Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 62
hilusnah und peripher entnommenes Parenchym. 57 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der 57 Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, 9 Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen 9 Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen 59 NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt. 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 61 einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet 9 Wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für 62
 Abbildung 6: NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Lungenparenchyms62
Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt 59 Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
Abbildung 7: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
peripheren Lungenparenchyms62 Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
Abbildung 8: Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für
einen drei haus vierzehn Terre unter Llunevie geheltener Vereuchetiere Verrieben
einen, drei bzw. vierzenn Tage unter Hypoxie genaltener versuchstiere. Verglichen
wurden Proben der Trachea sowie mittlerer und kleiner Bronchien 64
Abbildung 9: Vergleich der relativen NOX4-mRNA-Expression normoxisch und für
einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Verglichen
wurden Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis sowie mittlerer und kleiner
Pulmonalarterien und Pulmonalvenen67

Abbildung 10: Vergleich der relativen NOX4-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnahen und peripheren Parenchyms. ______69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchgeführte Tierversuche	40
Tabelle 2: Reverse Transkription	45
Tabelle 3: Quantitative PCR	47

Abkürzungsverzeichnis

Α.	Arteria
AESBF	4-(2-Aminoethyl-)benzensulfonylfluorid
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	copy-DNA
cGMP	Cyclo-Guanosinmonophosphat
СО	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
C⊤-Wert	Threshold-Cycle
DETC	Diethyldithiocarbaminsäure
DPI	Diphenyleneiodonium
DUOX	dual oxidases
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
HIF	hypoxia-inducible factor
hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
KG	Körpergewicht
mRNA	messenger-RNA
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitroblautetrazolium
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
NOXA1	NOX-Aktivator 1
NOXO1	NOX-Organizer 1

OD	optische Dichte
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
phox	Phagozytenoxidase
PvO ₂	gemischt-venöser Sauerstoffpartialdruck
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	reverse Transkription
SIRS	systemic inflammatory distress syndrome
SPASM-Zelle	small pulmonary artery smooth muscle-Zelle
Taq-Polymerase	hitzestabile DNA-Polymerase des Bakteriums Thermus
	aquaticus
TASK-Kanal	TWIK-related acid-sensitive K ⁺ channel
TETA	Triethylentetramin
TPRC	transient receptor potential channels
UNG	Uracil-N-Glykosylase
V.	Vena
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMCs	vascular smooth muscle cells

1 Einleitung

1.1 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) ist ein grundlegender Regulationsmechanismus, der in der Lunge unter physiologischen Bedingungen stets für ein optimales Verhältnis der lokalen Perfusion zur lokalen Ventilation sorgt. Obwohl auch schon früher in der Literatur beschrieben (28, 32), begann die moderne Untersuchung des Phänomens der HPV erst im Jahre 1946 mit den Beobachtungen von v. Euler und Liljestrand an der Katze (181). Die HPV wird daher heute auch als Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnet.

Auch unter physiologischen Bedingungen sind in der Lunge Ventilation und Perfusion ungleichmäßig verteilt. Gravitationsbedingt findet sich beim Menschen einerseits ein starker vertikaler Durchblutungsgradient in der aufrechten Lunge und andererseits eine Inhomogenität der Ventilation mit einer Hypoventilation der oberen Lungenabschnitte (153).

Die Verteilung der Lungenperfusion beim Menschen wird durch das 3-Zonen-Modell nach West beschrieben. In der oberen Zone 1 übersteigt der Alveolardruck den hier negativen Pulmonalarteriendruck, so dass in der Diastole keine Perfusion der kollabierten Gefäße stattfindet. In der Systole übersteigt der Kapillardruck dann den Alveolardruck, so dass die Kapillarperfusion synchron mit dem Herzschlag erfolgt. In Zone 2 ist der Pulmonalarteriendruck positiv und steigt linear von oben nach unten an. Parallel geht dies mit einem ebenfalls linearen Perfusionsanstieg einher. Im Bereich der Lungenbasis (Zone 3) übersteigen Pulmonalarterien- und Pulmonalvenendruck den Alveolardruck, so dass in dem stets offenen Kapillarbett kontinuierlich ein Blutfluss stattfinden kann. Mitunter wird auch noch eine Zone 4 nach Hughes und Mitarbeitern beschrieben, in der die Perfusion aufgrund einer Kompression der Blutgefäße durch den erhöhten interstitiellen Druck vermindert ist (93, 94, 126).

Für die Ventilation gilt, dass die Alveolen im Bereich der Lungenspitze ohnehin bereits mehr Luft enthalten als die abhängigen Lungenareale, sich also im oberen Teil der Druck-Volumen-Kurve befinden. Dies bedingt eine geringere Dehnbarkeit, so dass diese Alveolen auch nur einen geringeren Teil des Atemzugvolumens erhalten, während die Belüftung nach basal hin zunimmt (93, 94, 126). Da insgesamt der vertikale Ventilationsgradient weniger stark ausgebildet ist als der Perfusionsgradient, ist das Ventilations-Perfusionsverhältnis in den apikalen Lungenanteilen höher als in den basalen. Im Liegen existieren ebenfalls gravitationsbedingte Ventilations-Perfusions-Gradienten, die jedoch weniger ausgeprägt sind.

Solche, selbst in der gesunden Lunge stets vorhandenen, Inhomogenitäten beeinträchtigen die Effizienz des Gasaustausches, da hypoxische Areale nur in sehr geringem Maße - oder wie im Falle der Shuntperfusion auch gar nicht - zur Oxygenierung des Blutes beitragen. Dabei stellt die Shuntperfusion einen Extremfall dar. Hierbei wird venöses Blut aus überhaupt nicht ventilierten Lungenbereichen dem arterialisierten beigemischt (126, 153).

Ein erniedrigter alveolärer Sauerstoffpartialdruck im Bereich minderventilierter, beispielsweise auch atelektatischer Lungenareale ist Auslöser der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion, durch die es zur Widerstandserhöhung im Bereich kleiner präkapillärer Arterien kommt. Daraus resultiert eine Umverteilung des Blutes zugunsten besser ventilierter Lungenbereiche mit dem Ziel, eine optimale Sauerstoffanreicherung des Blutes durch Verminderung des Shuntblutes zu erreichen (126, 153).

Während der Entwicklung im Mutterleib gewährleistet der Gasaustausch in der Plazenta die Oxygenierung. Auch für den Feten ist der Euler-Liljestrand-Mechanismus überlebenswichtig. Die sehr niedrige Sauerstoffspannung in der fetalen Lunge wird durch die Pulmonalarterien mit einer maximalen Vasokonstriktion beantwortet. Gleichzeitig führt die Hypoxie zur Dilatation des Ductus arteriosus Botalli, so dass das Blut aus der A. pulmonalis an der Lunge vorbei in die Aorta fließt. Bei der Geburt erhöht sich mit den ersten Atemzügen der alveoläre Sauerstoffgehalt schlagartig und der hohe Widerstand in der Lungenstrombahn fällt ab. Parallel kommt es zur Konstriktion des Ductus arteriosus und das Blut aus dem rechten Herzen fließt wie beim Adulten durch die Lunge, wo der Gasaustausch initiiert wird. Funktionell schließt sich der Shunt meist innerhalb weniger Stunden post partum und obliteriert binnen weniger Wochen vollständig (194). Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion ist eine spezifische Reaktion der pulmonalen Zirkulation, wogegen sich im Bereich des systemischen Kreislaufs eine hypoxieinduzierte Vasodilatation nachweisen lässt (153).

Beim Vorkommen von Atelektasen, die bis zu einem gewissen Ausmaß auch unter physiologischen Bedingungen vorhanden sind, und Lungenerkrankungen wie der Pneumonie ist die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion lokal auf die erkrankten Bereiche begrenzt und stellt einen sinnvollen und notwendigen Mechanismus zur Gewährleistung einer ausreichenden globalen Sauerstoffversorgung des gesamten Organismus dar (33). Übermäßige Aktivierung, Störungen oder auch der Ausfall der HPV können jedoch mit erheblichen Problemen assoziiert sein.

1.1.1 Lokalisation der HPV

Versuche an isolierten Lungen und Isolaten von Pulmonalarterien zeigen eine vollständig erhaltene Hypoxieantwort, so dass Sauerstoffsensing, Signalübertragung und Effektormechanismen in der Lunge selbst lokalisiert sein müssen (62, 112, 196).

Aktuelle Arbeitshypothesen gehen davon aus, dass die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion überwiegend im Bereich der kleinen präkapillären pulmonalarteriellen Gefäße angesiedelt ist (9, 74, 161).

Insbesondere konnte für Mischlingshunde eine hypoxieinduzierte Vasokonstriktion in kleinen Lungenarteriolen und -venulen mit Durchmessern zwischen 30 und 70 μm nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Ventilations-Perfusionsanpassung im Lungenacinus, also im Bereich des gasaustauschenden Teils des Bronchialbaums, stattfindet (74). Hier haben Alveolargas und Blut in den Kapillarnetzen engsten räumlichen Kontakt, der den Gasaustausch durch Diffusion ermöglicht. Diese engen räumlichen Beziehungen und der unmittelbare alveolo-arterioläre Kontakt sind Voraussetzung für die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion, die spezifisch durch alveoläre Hypoxie induziert wird und vom alveolären Sauerstoffpartialdruck abhängig ist (161).

Obwohl auch das venöse System eine Kontraktionsantwort auf Hypoxiereize zeigt, ist der weitaus größte Anteil am Zuwachs des pulmonalen Gefäßwiderstands dem arteriellen Schenkel zuzuordnen. Der Anteil der venösen Vasokonstriktion am veränderten Gefäßwiderstand soll je nach Literatur und Größe der betrachteten Gefäße lediglich 4 bzw. 20 % betragen (4, 15).

1.1.2 Sensorzelle der HPV

Als Sensorzelle der HPV wird die glattmuskuläre Zelle der präkapillären pulmonalen Arterien (*small pulmonary artery smooth muscle cell*, SPASM-Zelle) angesehen, die auch gleichzeitig die Effektorzelle darstellt (74, 161). Ihre Kontraktion ist unmittelbar von der alveolären Sauerstoffspannung abhängig. So konnte für isolierte glattmuskuläre Zellen kleiner pulmonalarterieller Gefäße der Katze unter Hypoxie eine Verkürzung nachgewiesen werden (107).

Für eine zentrale Rolle der SPASM-Zellen beim Sauerstoffsensing spricht weiterhin die Beobachtung, dass in diesen die gleiche NADPH-Oxidase nachgewiesen werden kann, die in den sauerstoffreagiblen Zellen des Glomus caroticum in den Prozess des Sauerstoffsensing involviert zu sein scheint (109). Aber auch andere Zellen, wie z.B. Alveolarzellen, können derzeit als Sensorzellen nicht sicher ausgeschlossen werden (109, 161).

1.1.3 Sensormechanismen der HPV

Der eigentliche Sauerstoffsensor ist trotz umfangreicher Forschungsbemühungen bislang unbekannt. Unterschiedlichste Mechanismen sind diesbezüglich vorgeschlagen und untersucht worden:

1.1.3.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Diese Vorstellung geht von einer direkten Sauerstoffwirkung auf spannungsabhängige oder andere Kaliumkanäle aus.

Für die Beteiligung spannungsabhängiger K_V-Kanäle an der Entstehung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion spricht die Beobachtung, dass 4-

Aminopyridin, also ein Inhibitor spannungsabhängiger, aber nicht ATP-sensitiver Kaliumkanäle, eine pulmonale Vasokonstriktion hervorrufen kann (71). Außerdem konnten eine hypoxieinduzierte Inhibition des Kaliumausstroms sowie eine Membrandepolarisation an pulmonalarteriellen glattmuskulären Zellen des Hundes nachgewiesen werden (140).

Weithin anerkannt ist inzwischen, dass spannungsabhängige Kaliumkanäle in den Mechanismus der HPV involviert sind (Vgl. 1.1.5). Unklar ist jedoch, ob sie tatsächlich als Sauerstoffsensor oder lediglich als Effektor in der Signaltransduktion fungieren.

1.1.3.2 Mitochondriale Atmungskette

Die Redox-Theorie der HPV geht davon aus, dass die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies den der HPV zu Grunde liegenden Sauerstoffsensingmechanismus darstellt. Veränderungen im zellulären Redoxstatus sollen dann im Weiteren die Funktion von Ionenkanälen modifizieren und somit die HPV vermitteln (7, 8).

Als mögliches ROS-produzierendes System wird nach Ansicht verschiedener Autoren die mitochondriale Atmungskette angesehen (Review bei 199). Unklarheit herrscht in diesem Zusammenhang in der Frage, ob alveoläre Hypoxie in einer Zunahme (39, 72, 90, 102, 109, 192, 193, 200) oder aber Verminderung (8, 10, 132, 144) reaktiver Sauerstoffspezies resultiert.

1.1.3.3 NADPH-Oxidoreduktasen

Im Rahmen der Redox-Theorie wird auch die Beteiligung von Oxidoreduktasen am Sauerstoffsensingmechanismus diskutiert. Diese besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. Als mögliche Sauerstoffsensoren kämen prinzipiell phagozytäre NADPH-Oxidasen bzw. nicht-phagozytäre Isoformen in Frage (Vgl. 1.3).

1.1.3.4 Cytochrom-P450-Enzyme

Durch Cytochrom-P450-abhängige Hydroxylaseaktivität entstehen aus Arachidonsäure Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs) und durch Epoxygenase-aktivität die Epoxyeicosatriensäuren (EETs). Da die entsprechenden Monooxgenasen sauerstoffabhängig sind, wird ihre Beteiligung am Sauerstoffsensing der HPV diskutiert (82, 199, 211, 215).

1.1.3.5 Hämoxygenase-2

Ein neueres Konzept zum Sauerstoffsensing postuliert die Cytochrom-P450abhängige Hämoxygenase-2 als Sauerstoffsensor. In Anwesenheit von Sauerstoff spaltet diese Häm zu Kohlenmonoxid (CO), Biliverdin und Eisenionen. Das freiwerdende CO vermittelt als Signalmolekül in einem weiteren Schritt die Öffnung Calcium-aktivierter Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit, sogenannter BK-Kanäle. Unter hypoxischen Bedingungen wird die CO-Freisetzung im Rahmen des Hämabbaus gehemmt und somit die Öffnung der BK-Kanäle inhibiert (78, 207). Dieser Sauerstoffsensingmechanismus scheint zumindest in den Zellen des Glomus caroticum eine Rolle zu spielen. Ob ihm jedoch eine Bedeutung für das pulmonale Sauerstoffsensing zukommt, wird Gegenstand weiterer Forschungen sein (199).

1.1.4 Mediatoren der HPV

Zahlreiche Substanzen und Mediatoren des pulmonalen Vasotonus wirken modulierend auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. Dazu zählen die von Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen gebildeten Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels wie Prostaglandine und Thromboxan sowie Endothelin. Die genannten Substanzen scheinen jedoch keine Bedeutung für die akute Auslösung der HPV zu besitzen, sondern modulieren vielmehr den pulmonalen Vasotonus (198, 199).

Der grundlegende Mechanismus der HPV ist wahrscheinlich von endothelialen und neurohumoralen Faktoren unabhängig (6), wenn auch der Einfluss des Endothels auf die HPV-Antwort in der Literatur kontrovers diskutiert wird und für die chronische Hypoxie von einer Beteiligung des Endothels ausgegangen werden muss (1, 12, 48, 97, 102, 104, 155, 190, 214). Unabdingbar für die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion sind folgende Substanzen:

1.1.4.1 Sauerstoffradikale

Superoxid und sein durch Dismutation entstehender Metabolit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sind eindeutig an der Regulation der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion beteiligt (117, 196, 200).

1.1.4.2 Superoxiddismutase

Inhibition der Superoxiddismutase, welche die Konversion von Superoxid zu Wasserstoffperoxid katalysiert, blockiert die hypoxische Vasokonstriktion (200).

1.1.4.3 Stickstoffmonoxid (NO) und NO-Synthetase

Der Ruhetonus der Pulmonalgefäße stellt einen Gleichgewichtszustand zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation dar. Dabei ist dieses Gleichgewicht im physiologischen Ruhezustand stark auf der Seite der Vasodilatation lokalisiert und vom intrazellulären Calciumspiegel abhängig, der durch vasokonstriktive und vasodilatative Mechanismen beeinflusst wird. Ein solcher Mechanismus ist die Freisetzung des vasodilatatorisch wirksamen und früher auch als *endothelium derived relaxing factor* bezeichneten Stickstoffmonoxids (NO) (130).

NO wird durch verschiedene Isoformen der NO-Synthetase aus L-Arginin synthetisiert und führt zur Aktivierung einer Guanylatzyklase, welche aus GTP cGMP produziert. cGMP wiederum aktiviert eine Proteinkinase und führt schließlich zur Vasorelaxation (130).

NO trägt eindeutig zur "normoxischen Vasodilatation" bei, da die Inhibition der NO-Synthetase den pulmonalvaskulären Widerstand unter normoxischen Bedingungen erhöht (120, 138).

Es konnte gezeigt werden, dass der HPV eine Verringerung der Exhalation von Stickstoffmonoxid vorausgeht. Diese tritt spezifisch im Rahmen der HPV auf und

kann bei pharmakologisch induzierten pulmonalen Vasokonstriktionen nicht nachgewiesen werden. Außerdem steigert die Unterdrückung der exhalativen NO-Freisetzung die HPV signifikant stärker als nicht durch Hypoxie hervorgerufene Vasokonstriktionen (61). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen ebenfalls eine Verstärkung der HPV bei pharmakologisch blockierter NO-Synthese (13, 85, 138). Weiterhin scheinen NO-abhängige Guanylatzyklasen eine spezifische Rolle bei der Entstehung der HPV zu spielen (201).

Insgesamt gesehen besitzt die Produktion von Stickstoffmonoxid somit einen modulierenden Einfluss auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. Da selbst die komplette Inhibition der pulmonalen NO-Synthese jedoch keine hypoxische pulmonale Vasokonstriktion hervorrufen kann und auch bei blockierter NO-Synthese dieser Mechanismus noch aktiv ist (201, 202), scheint das NO-System nicht als einziger und grundlegender Mechanismus der HPV-Entstehung in Frage zu kommen.

1.1.5 Gegenwärtige Vorstellung vom Effektormechanismus der HPV – Bedeutung von Ionenkanälen, Rho-Kinase und Calcium-Sensitivierung

Unter Ruhebedingungen weist die Zellmembran der glattmuskulären pulmonalarteriellen Zelle ein vorwiegend von Kaliumkanälen abhängiges Membranpotential mit negativer Polarisierung auf der Zytosolseite auf. Alveoläre Hypoxie führt über einen noch unidentifizierten Mechanismus zur Inhibition spannungsabhängiger Kaliumkanäle (K_V-Kanäle) mit konsekutiver Membrandepolarisation (140, 212). Diese erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit eines spannungsabhängigen Calciumkanals vom L-Typ (Dihydropyridin-Rezeptor) und mündet in einen transmembranösen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum. Steigende intrazelluläre Calciumspiegel triggern die zusätzliche Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Calciuminduzierte Calciumfreisetzung) und münden schließlich in der Kontraktion der glattmuskulären Zellen, wenn die zytosolische Calciumkonzentration eine bestimmte Schwelle überschreitet (136).

Die hypoxieinduzierte Hemmung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle bzw. des Kaliumausstroms, die Veränderungen des Membranpotentials sowie die Zunahme des Calciumspiegels sind proportional zur Schwere der Hypoxie (128).

Neben spannungsabhängigen Kaliumkanälen scheinen auch sogenannte TASK-1-Kanäle an der hypoxischen Depolarisation beteiligt zu sein. Diese Kanäle gehören zur Familie der TASK-Kaliumkanäle, die aus zwei Poren-formenden Regionen und vier transmembranären Domänen gebildet werden. TASK-1 reguliert über einen Hintergrundkaliumstrom das Ruhemembranpotential der glattmuskulären pulmonalarteriellen Zelle. Unter Hypoxie kommt es zur Inaktivierung von TASK-1 und die Inhibition des Hintergrundkaliumeinstroms trägt zur Depolarisation der Sauerstoffsensorzelle bei (64, 129, 195). Offensichtlich besitzt TASK-1 selbst jedoch keine Fähigkeit zum Sauerstoffsensing. Eine interessante Arbeit konnte zeigen, dass NOX4 in bestimmten sauerstoffsensiblen Zellen zusammen mit TASK-1 exprimiert wird und offensichtlich in die sauerstoffabhängige Regulation der TASK-1-Aktivität involviert ist (98).

Die Endstrecke der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion hängt obligatorisch vom Calciumeinstrom über die bereits erwähnten spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L-Typ (*voltage-operated L-type Ca*²⁺ *channels*, VOCC), der Freisetzung intrazellulären Calciums und der Höhe des intrazellulären Calciumspiegels ab (54, 69, 152).

Für die Relevanz eines transmembranösen Calciumeinstroms sprechen zahlreiche Untersuchungen, die eine Inhibition der HPV durch Antagonisten am Calciumkanal vom L-Typ sowohl in vivo als auch an isolierten Lungen zeigen konnten (36, 88, 111, 143). Ebenfalls konnte eine Verstärkung der HPV durch einen Agonisten als L-Typ-Calciumkanal ausgelöst werden (113, 173). Untersuchungen, die eine nur inkomplette Inhibition der HPV durch Nifedipin nachweisen, führten zur Annahme eines alternativen Calciumeinstroms in die SPASM-Zelle über speichergesteuerte Calciumkanäle (*store-operated Ca*²⁺ *channels*, SOCC). Diese werden bei Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher über ein bislang unbekanntes Signal aktiviert und erlauben einen Einstrom von Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum (124, 186, 195).

Eine wesentliche Rolle spielt auch die Calciumsensitivierung, die zu einer Verstärkung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion durch gesteigerte Calciumempfindlichkeit der kontraktilen Proteine führt. Unter hypoxischen Bedingungen transloziert das monomere G-Protein RhoA in seiner aktiven Form an GTP gebunden zur Plasmamembran, wo es die Rho-Kinase aktiviert. Diese führt über eine Inhibition der Myosinphosphatase zum Ausbleiben der Myosinleichtkettendephosphorylierung und damit zu einer erhöhten Calciumempfindlichkeit der Myosionleichtketten (50, 96, 123, 147, 148, 188, 191, 209).

1.1.6 Störungen der HPV

Hohe klinische und insbesondere intensivmedizinische Relevanz haben Störungen oder sogar der vollständige Ausfall der HPV.

Einflüsse, die der HPV entgegen wirken, sind beispielsweise vasodilatatorisch wirkende Substanzen wie Prostaglandine (PGI₂, PGE₁), Nitroglycerin, Nitroprussid-Natrium, Isoproterenol, endogene Vasodilatatoren (z.B. Prostazyklin, NO), Aminophyllin, volatile Anästhetika und Opioide (93, 94, 125).

Aber auch Hypo- und Hyperkapnie inhibieren die HPV. Hypokapnie bewirkt eine direkte pulmonale Vasodilatation in allen Lungenarealen, auch den hypoventilierten, während Hyperkapnie eine Vasokonstriktion in regelrecht ventilierten Arealen mit konsekutivem Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes zur Folge hat. Diese hyperkapnisch induzierte Vasokonstriktion bedingt eine Umverteilung des Blutflusses zu minderbelüfteten Lungenbereichen mit der Folge einer druckpassiven Vasodilata-Ergebnis ein erhöhter intrapulmonaler Rechts-Links-Shunt tion. ist mit Oxygenierungsstörung. Beachtet werden müssen diese pathophysiologischen Zusammenhänge insbesondere bei lungenprotektiven Beatmungsformen mit kleinen Tidalvolumina, bei denen im Sinne einer permissiven Hyperkapnie erhöhte PaCO₂-Werte über 45 mmHg akzeptiert werden (125). Andererseits kann eine kontrollierte Hyperventilation mit respiratorischer Alkalose unter intensivmedizinischen Bedingungen und bei kardiochirurgischen Operationen zur Senkung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks ausgenutzt werden (29).

Störungen der HPV werden außerdem durch einen erhöhten gemischt-venösen Sauerstoffpartialdruck (PvO₂), beispielsweise in Folge einer hohen peripheren Shuntfraktion bei SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), Sepsis oder Leberinsuffizienz verursacht. Der erhöhte PvO₂ führt zum Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes in minderventilierten Lungenbereichen und konsekutiv zur Abschwächung der HPV im betroffenen Areal der Lunge (125). Schädigung des alveolären Surfactant-Systems und Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes, z. B. durch Volumenüberladung, katecholamininduzierte Vasokonstriktion oder Alkalose, sowie Hypothermie sind weitere negative Einflussfaktoren auf die HPV. Auch schwere pulmonale Infektionen (z.B. durch Pneumokokken) und das *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) können mit einer unzureichenden HPV einhergehen und über ein großes Shuntvolumen zu einer schlechten Oxygenierung trotz hoher inspiratorischer Sauerstoffkonzentration und einer optimalen, kontrollierten Ventilation beitragen (35, 93, 94, 125).

1.2 Pulmonale Hypertonie, Cor pulmonale und Vascular Remodeling

Erkrankungen, die mit einer generalisierten chronischen alveolären Hypoxie einhergehen, führen zu einer übermäßigen Aktivierung der HPV und einem extremen Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldrucks, der sog. pulmonalen Hypertonie. Zu diesen Erkrankungen zählen beispielsweise die chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Insuffizienzen der Atemmuskulatur, Thoraxdeformitäten oder -rigidität mit konsekutiver Hypoventilation sowie (schlafbezogene) Atemregulationsstörungen und die bei Hochlandbewohnern vorkommende atmosphärische Hypoxie.

Um die bei der pulmonalen Hypertonie dauerhaft erhöhte Nachlast zu kompensieren, hypertrophiert der rechte Ventrikel. Bei langsamem Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes und gesundem Herzen kann dadurch eine sehr effektive Adaptation an die veränderten Verhältnisse erreicht werden, während bei rascher Progression und im Stadium der Dekompensation die Dilatation des Ventrikels mit eingeschränkter systolischer Funktion droht. Als "chronisches Cor pulmonale" wird die Hypertrophie und/oder Dilatation des rechten Ventrikels aufgrund chronischer pulmonaler Widerstandserhöhung durch primäre Störung der Lungenfunktion oder Lungenstruktur bezeichnet (130, 183).

1.2.1 Morphologische Veränderungen am pulmonalvaskulären System

Im Zusammenhang mit der pulmonalen Hypertonie entstehen neben der Vasokonstriktion auch charakteristische strukturelle Veränderungen am pulmonalvaskulären System. Im Wesentlichen kommt es durch den hohen Druck zur Dilatation der großen hilusnahen Gefäße, im Extremfall bis hin zu aneurysmatischen Formen, während im Bereich der kleineren Gefäße ein auch als *vascular remodeling* bezeichneter markanter Umbau stattfindet. Die Vasokonstriktion ist vor allem zu Beginn des Krankheitsprozesses die wesentliche Ursache für die Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes, während später durch vaskuläres Remodeling die Verringerung der Gefäßlumina und des Gesamtgefäßquerschnittes sowie die Reduktion der Gefäßelastizität an Bedeutung gewinnen und die pulmonale Hypertonie "fixieren" (169).

Im Bereich der Intima bedingen Hypertrophie und Proliferation der Endothelzellen sowie die Zunahme der extrazellulären Matrix durch erhöhte Produktion und Ablagerung von Laminin, Fibronektin und Elastin eine Verdickung der Gefäßwand (24, 31, 114, 115, 130, 164). Die Glycocalix der Endothelzellen erscheint alteriert und diese produzieren weniger Heparansulfat, das ein wichtiger Inhibitor für die Proliferation glatter Muskelzellen ist (26, 130). Antithrombotische Eigenschaften des Endothels werden unter chronischer Hypoxie verringert, so dass die Entstehung der in-situ-Thrombosen im distalen Gefäßbaum gefördert wird (127, 130, 167, 170). Die Basalmembran kann in Übereinstimmung mit einer nachgewiesenen erhöhten Permeabilität der Gefäßwand für Plasmaproteine lokal fragmentiert sein (38, 130, 172). Die hierdurch in die Gefäßwand gelangenden Plasmaproteine scheinen ihrerseits verantwortlich für weitere Umbauprozesse (142). Die entstandenen Lücken der Gefäßwand ermöglichen das Einwachsen glatter Muskelzellen und Fibroblasten in die subendotheliale Schicht. Die Proliferation von als Myofibroblasten bezeichneten Zellen an dieser Stelle stellt das Korrelat der sogenannten Intimaproliferation und Intimafibrose dar (130).

Hinsichtlich der Media findet sich eine Verdickung durch Hypertrophie und Proliferation glattmuskulärer Zellen sowie durch Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine, v.a. von Kollagen und Elastin. Wegen der Fähigkeit der glattmuskulären Zellen zur Kontraktion ist die Verdickung der Media von besonderer pathophysiologischer Relevanz für die Entstehung der pulmonalen Hypertonie.

Die Verdickung der Adventitia wird vermutlich durch Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten verursacht. Außerdem findet eine Deposition extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen, Elastin, Fibronektion und Tenascin statt (83, 130, 164). Unter *distal extension of smooth muscle* oder *De Novo Muskularisation* versteht man das Einwachsen glatter Muskelzellen der Media nach distal, so dass auch kleinere Pulmonalarterien schließlich über eine komplette Muscularis verfügen. Diese glattmuskulären Zellen produzieren vermehrt extrazelluläre Matrixproteine, die wiederum eine Verdickung der Gefäßwand verursachen (26).

Zahlreiche Studien weisen auf eine Reduktion des Gefäßquerschnittes durch den Verlust kleiner Blutgefäße hin. Dieses Phänomen wird auch als *pruning* oder *rarefaction* bezeichnet (75, 76, 83, 116, 134).

Als weitere charakteristische Veränderung treten plexiforme Läsionen auf. Sie sind durch die Bildung multipler endoluminaler gewundener Kanäle in kleinen Pulmonalarterienästen gekennzeichnet und bestehen aus rasch proliferierenden Endothelzellen (130, 182).

Von den beschriebenen strukturellen Veränderungen werden in erster Linie das sog. *inward remodeling*, d.h. die Reduktion des Gefäßlumens durch Verdickung der Gefäßwand, sowie die Gefäßrarefizierung für die Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstandes und die Entstehung der pulmonalen Hypertonie verantwortlich gemacht. Diesem Konzept widersprechen jedoch verschiedene Untersuchungen, die zwar eine Dickenzunahme pulmonalarterieller Gefäße, jedoch keine Abnahme des luminalen Durchmessers finden (81, 177). Die Zunahme der Gefäßwand müsste demnach eher zu einem *outward remodeling* ohne Beeinflussung des Gefäßlumens führen (163).

Das Konzept der Gefäßrarefizierung wird neuerlich durch Berichte in Frage gestellt, die angiogenetische Effekte im pulmonalkapillären Stromgebiet als Antwort auf hypoxische Reize nachweisen. Diese Angiogenese soll die pulmonale Hypertonie begrenzen, indem sie den Strömungswiderstand im Lungenstromgebiet reduziert (80, 81). Unterstützt wird dieses Konzept durch die Beobachtung, dass Angiostatin eine pulmonale Hypertension in Mäusen, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt werden, verstärkt (135), während die Überexpression von VEGF in der Lunge einen gewissen Schutz gegenüber der Entstehung einer hypoxieinduzierten pulmonalen Hypertension darstellt (134).

Während lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass die pulmonale Hypertonie in erster Linie eine Erkrankung der distalen Lungenstrombahn darstellt, mehren sich die Erkenntnisse, dass gerade auch Veränderungen im Bereich der großen Pulmonalarterien von signifikanter Bedeutung für die rechtsventrikuläre Funktion sind. So führt die Verdickung der vaskulären Wand zu einem Complianceverlust, der auch als *stiffening* bezeichnet wird. Dieser trägt zu 30 - 40 % der erhöhten rechtsventrikulären Nachlast als Folge der pulmonalen Hypertonie bei. Weiterhin bedingt das *stiffening* einen Verlust der Windkesselfunktion großer Pulmonalarterien und damit letztendlich auch den Verlust des pulmonalen Blutflusses während der Diastole. Die insgesamt veränderten Widerstands- und Flussverhältnisse scheinen außerdem zu einer reduzierten NO-Freisetzung der distalen pulmonalarteriellen Endothelzellen zu führen, die in ihrer Funktion von einem stetigen pulsatilen Blutfluss abhängig sind (162).

1.2.2 Bedeutung von Ionenkanälen für die chronische Hypoxie

Neben den beschriebenen morphologischen Veränderungen am pulmonalen Gefäßsystem führt chronische alveoläre Hypoxie insgesamt zu einer erhöhten pulmonalvaskulären Reaktivität. So steigen der basale Gefäßtonus wie auch die Stärke einer durch vasoaktive Agonisten vermittelten Vasokonstriktion, während gleichzeitig die vom Endothel abhängige Vasodilatation an Bedeutung verliert (2, 157).

Auf zellulärer Ebene verursacht chronische Hypoxie eine Herunterregulation spannungsabhängiger Kaliumkanäle, eine Reduktion ihrer Aktivität und folglich eine anhaltende Membrandepolarisation. Diese Effekte scheinen über den konsekutiven Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in der SPASM-Zelle zur persistierenden pulmonalen Vasokonstriktion, zum vaskulären Remodeling und schließlich zur chronisch-hypoxischen pulmonalen Hypertonie zu führen. Obwohl der genaue Mechanismus des anhaltenden hypoxieinduzierten Calciumeinstroms über die Plasmamembran bislang noch nicht identifiziert werden konnte, scheinen in erster Linie spannungs<u>un</u>abhängige Calciumkanäle betroffen zu sein. Neuere Studien liefern Hinweise, dass die HIF-vermittelte Expression sogenannter TRPC-Kanäle (*transient receptor potential channels*) hier von Relevanz sein könnte (2, 187, 195).

1.2.3 Veränderungen der Genexpression

Der durch Hypoxie induzierbare Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) stellt eine wesentliche Schnittstelle bei der Vermittlung der Hypoxie auf die Ebene der genetischen Regulation dar. HIF ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer regulierenden α -Untereinheit und einer konstitutiven β -Untereinheit besteht. Während der Faktor unter normoxischen Bedingungen rasch durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert wird, stabilisiert er sich im hypoxia responsive elements (HREs), um schließlich die Expression verschiedener Gene zu supprimieren oder induzieren (34, 154, 184).

Ursprünglich wurde HIF-1 als der Faktor entdeckt, der unter Hypoxie das Erythropoietingen transkriptionell aktiviert (185). Inzwischen wird vermutet, dass HIF-1 möglicherweise sogar weit über 200 Gene des Menschen hypoxieabhängig kontrolliert (108). Insgesamt konnten bei Säugern bislang ca. 70 Zielgene identifiziert werden. Unter ihren Produkten finden sich beispielsweise die Wachstumsfaktoren VEGF (vascular endothelial growth factor) und PDGF (platelet derived growth factor) sowie die NO-Synthetase, Hämoxygenase-1, Endothelin-1 und Adrenomedullin, die für die Regulation der Vasomotorik wichtig sind, und außerdem zahlreiche Proteine, die den anaeroben Energiestoffwechsel und den Zellzyklus kontrollieren (205). Gut belegt ist auch die Bedeutung von HIF-1 für die pulmonale Hypoxiereaktion. So zeigen für HIF-1 α heterozygote Mäuse nach chronischer Hypoxieexposition eine signifikant verzögerte Entwicklung von Polyzythämie, rechtsventrikulärer Hypertonie, pulmonaler Hypertonie und pulmonalvaskulärem Remodeling (210) sowie eine verminderte hypoxieinduzierte Zelldepolarisation, eine geringere Reduktion des Kaliumstroms und eine geringfügigere Hypertrophie pulmonalarterieller glatter Muskelzellen (156).

Neben HIF-1 werden unter Hypoxie auch weitere Transkriptionsfaktoren aktiviert, die wahrscheinlich insgesamt aber eine geringere Relevanz für die pulmonale Hypoxieantwort haben (44).

1.2.4 Mediatoren der chronischen Hypoxie

In die Entstehung der chronisch-hypoxisch induzierten pulmonalen Hypertonie sind zahlreiche Faktoren involviert. Unter anderem scheinen Rho-Kinase (50, 81, 123), die Wachstumsfaktoren VEGF-a und VEGF-b (39, 105, 189), die Serotoninrezeptoren 5-HT_{1B} und -_{2B} sowie entsprechende Transporter (87, 96, 106, 121), Endothelin und Endothelinrezeptoren (40, 46, 57, 150, 166), Prostacyclin und Thromboxan (42, 55), Heparin (67), Stickstoffmonoxid (56, 165) sowie Calciumkanäle (101) eine Rolle zu spielen.

Während der grundlegende Mechanismus der HPV wahrscheinlich nicht an endotheliale und neurohumorale Faktoren gebunden ist (6), muss für die chronische Hypoxie von einer Beteiligung des Endothels ausgegangen werden (1, 104). Zahlreiche Versuche belegen eine biphasische Kinetik der HPV, bei der eine initial rasch einsetzende, transitorische Vasokonstriktion (Phase I) in eine teilweise Relaxation übergeht und von einem sich langsam entwickelnden Anstieg des Vasotonus (Phase II) abgelöst wird (27, 91, 97, 178, 197, 202, 203, 206).

Zumindest für die initiale Phase scheint ein intaktes Endothel nicht obligatorisch, da die Hypoxieantwort auch dann erhalten ist, wenn zuvor das Endothel von Pulmonalarterien entfernt wurde. Die maximale Ausprägung der Vasokonstriktion sowie Phase II bzw. die Reaktion auf chronische Hypoxie sind aber wahrscheinlich endothelabhängig (1, 12, 48, 97, 102, 104, 155, 190, 214).

Zahlreiche Studien weisen nach, dass eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies an der Entstehung der pulmonalen Hypertonie, der rechtsventrikulären Hypertrophie und des vaskulären Remodelings beteiligt ist (79, 103, 110). ROS führen zur Heraufregulation der Expression verschiedener Faktoren, die das vaskuläre Remodeling modifizieren. Dies sind u.a. der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (39), der *platelet activating factor* (PAF) (70, 99, 131) und die *mitogenactivated protein kinase* (MAPK) (65).

1.3 HPV, hypoxieinduziertes vaskuläres Remodeling und NADPH-Oxidasen

Die Redoxtheorie postuliert, dass die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Abhängigkeit vom herrschenden Sauerstoffpartialdruck den grundlegenden Sauerstoffsensingmechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion darstellt (7, 8). ROS führen im Folgenden über bislang nicht identifizierte Mechanismen zur Inhibition spannungsabhängiger Kaliumkanäle, die in den bereits unter 1.1.5 beschriebenen Effektormechanismus mündet und schließlich zur HPV führt.

Die vorliegende Arbeit gründet auf der Annahme, dass eine NADPH-Oxidase am Sauerstoffsensing der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion sowie am hypoxieinduzierten vaskulären Remodeling beteiligt sein könnte und unter Hypoxie vermehrt ROS produziert. Sowohl phagozytäre als auch nichtphagozytäre Isoformen könnten dabei prinzipiell eine Bedeutung haben.

NADPH-Oxidasen, die auch als NADPH-Oxidoreduktasen bezeichnet werden, sind eine Gruppe von mit der Plasmamembran assoziierten Enzymen, die in einer Vielzahl von Zellen gefunden werden. Zunächst sollen die Eigenschaften und das Vorkommen der bislang bekannten NADPH-Oxidasen beleuchtet werden.

1.3.1 Leukozytäre NADPH-Oxidasen

Am Besten untersucht ist bislang die leukozytäre NADPH-Oxidase, die in professionellen Phagozyten und B-Lymphozyten nachgewiesen werden kann (16). Dort katalysiert sie im Verlauf des *respiratory burst* die Produktion von Superoxidanionen (O₂⁻) durch die Ein-Elektronenreduktion von extrazellulärem Sauerstoff, wobei intrazelluläres NADPH als Elektronenspender fungiert. Die so entstandenen Superoxidanionen bilden den Ausgangspunkt für eine Reihe der sog. *reactive oxygen species* (ROS). Durch Dismutation entsteht aus dem Superoxidradikal unter Mithilfe der Superoxiddismutase Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (16, 139). Die Entstehung der bakteriziden ROS ist in diesen Zellen ein erwünschter Mechanismus zur Abwehr eindringender Mikroorganismen.

Der Kern der leukozytären NADPH-Oxidase besteht aus fünf Komponenten, die als p40phox, p47phox, p67phox, p22phox und gp91phox bezeichnet werden, wobei phox für <u>Phagozytenox</u>idase steht. Drei dieser Komponenten, nämlich p40phox,

p47phox und p67phox, sind als zytoplasmatischer Komplex von den beiden übrigen getrennt. p22phox und gp91phox sind in der Membran sekretorischer Vesikel und spezifischer Granula lokalisiert, wo sie als heterodimeres Flavoprotein Cytochrom b₅₅₈ in Erscheinung treten. Die Trennung der Bestandteile ist vermutlich ein Schutzmechanismus, der sicherstellt, dass in der nicht aktivierten Zelle keine reaktiven Sauerstoffspezies gebildet werden. Für die Aktivierung der NADPH-Oxidase sind außerdem das im Zytoplasma befindliche Protein Rac2 und das membranständige Rap1 erforderlich. Letzteres kann zusammen mit Cytochrom b₅₅₈ isoliert werden (16, 17, 179).

Die Aktivierung eines Phagozyten führt zur Translokation der im Zytoplasma lokalisierten GTPase Rac2 sowie des zytoplasmatischen Komplexes aus p47phox und p67phox zur Plasmamembran. Gleichzeitig gelangen auch Cytochrom b₅₅₈ und Rap1A durch Fusion der Membranen der sekretorischen Vesikel und später der spezifischen Granula mit der Zellmembran an die Zelloberfläche. Dort assoziiert der zytoplasmatische Komplex mit Cytochrom b₅₅₈ und formiert die aktive NADPH-Oxidase. Während der Phagozytose wird die Plasmamembran internalisiert und bildet die Wand des Phagosoms, in dessen Inneres die fertige NADPH-Oxidase Superoxidanionen ausschüttet (16, 179).

Für die Redoxaktivität des Enzymes scheint gp91phox verantwortlich zu sein, während die zytoplasmatischen Faktoren wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der korrekten Formation des aktiven Enzymes, der Bindung des Substrates sowie dem Transport der Elektronen durch den Komplex spielen (16, 17, 179). Gp91phox wird auch als NOX2 bezeichnet.

Wie alle anderen biologischen Makromoleküle ist auch die phagozytäre NADPH-Oxidase im Laufe der Evolution entstanden. Schon recht früh wurde vermutet, dass sie jedoch keine Neuentwicklung darstellt, sondern sich im Laufe der Zeit als Mutation einer älteren Oxidase mit wesentlich geringerer Aktivität und weiterer Verbreitung im Gewebe entwickelt hat, deren Aufgabe die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zur Signalübertragung war (16).

1.3.1.1 Isoformen der leukozytären NADPH-Oxidasen

In den vergangenen Jahrzehnten konnte die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in niedrigen Konzentrationen auch in nichtphagozytären Zellen nachgewiesen werden. Die Rate der Superoxidproduktion in vaskulären Zellen wird beispielsweise von einigen Autoren auf etwa 1% der leukozytären geschätzt (77, 151). Diese ROS stellen nicht ein beiläufig entstandenes Nebenprodukt des Stoffwechsels dar, wie lange vermutet wurde, sondern besitzen offensichtlich spezifische Bedeutungen für die Signalübertragung. Quelle dieser ROS sind v.a. gp91phox-Homologe. Bislang wurden insgesamt sieben Isoformen der NOX-Familie beschrieben, die als NOX1-NOX5, DUOX1 und DUOX2 bezeichnet werden. Obwohl diese strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, finden sich signifikante Unterschiede hinsichtlich Gewebeverteilung, Kofaktoren, Aktivierungsmodi, Menge der Superoxidproduktion und Funktion (43).

1.3.1.1.1 NOX1

NOX1, das ursprünglich auch mox1 oder NOH-1 genannt wurde, zeigt die höchste Expressionsrate im Epithel des Kolons und kann weiterhin in Prostata, Uterus und glattmuskulären Gefäßzellen nachgewiesen werden (20, 84, 95, 133, 168, 169).

NOX1 scheint im vaskulären System wichtige Funktionen für die Mitogenese, Zelltransformation, Angiogenese und das normale Wachstum zu besitzen. Auffallend ist, dass in Tumorzellen erhöhte ROS-Spiegel gemessen werden, so dass eine Beteiligung bei der Entstehung von Tumoren ebenfalls vermutet werden kann (5, 14, 168). Das gp91phox-Homologe ist überdies offensichtlich an der Genese kardiovaskulärer Pathologien und Diabetes mellitus beteiligt, die mit erhöhten ROS-Spiegeln einhergehen (60, 84, 95, 133, 159, 168, 169, 204).

NOX1 wird von NOXO1 (*NOX organizer 1*) und NOXA1 (*NOX activator 1*) aktiviert. Die beiden für Funktion und ROS-Produktion durch NOX1 relevanten Proteine sind Homologe der klassischen Untereinheiten gp47phox und gp67phox der phagozytären NADPH-Oxidase (18).

1.3.1.1.2 NOX2

NOX2 ist identisch mit der traditionell als gp91phox bezeichneten Untereinheit der phagozytären NADPH-Oxidase. Diese ist zweifellos, wie unter 1.3.1 beschrieben,

ein für die mikrobielle Abwehr unerlässliches Enzym. Deutlich wird dies auch am Krankheitsbild der septischen Granulomatose (*chronic granulomatous disease*), das zu rezidivierenden bakteriellen und mykotischen Infektionen führt und durch einen Defekt der leukozytären NADPH-Oxidase hervorgerufen wird (47, 73, 149).

Die ursprüngliche Annahme, dass NOX2 ausschließlich in phagozytierenden Zellen vorkommt, wurde in den vergangenen Jahren durch zahlreiche Arbeiten widerlegt, die eine Expression, wenn auch in wesentlich niedrigeren Konzentrationen, in vielen anderen Geweben zeigen. NOX2 wird u.a. im Bereich des Endothels und der Adventitia von Blutgefäßen sowie in Kardiomyozyten exprimiert und ist dort eine Quelle für ROS (51, 58, 100, 145, 146). NOX2 kann spezifisch auch in VSMCs (*vascular smooth muscle cells*) von Widerstandsgefäßen (174), der Aorta und anderen großen Arterien (159, 175) sowie in der Pulmonalarterie und im Bereich der Koronarien (63) nachgewiesen werden.

Uneinigkeit herrscht jedoch in der Frage, in welchem Ausmaß NOX2 in diesen Gefäßen exprimiert wird. Während einige Autoren finden, dass NOX2 in VSMCs, die aus Aorten oder anderen großen Arterien isoliert wurden, nur in sehr geringem Ausmaß vorhanden ist (159, 175) und in Übereinstimmung damit NOX2 im venösen System in höherer Konzentration als im arteriellen (66) detektiert werden kann, sind andere davon überzeugt, dass die Expression im Bereich der A. pulmonalis der in Koronararterien ungefähr entspricht (63).

Da gp91phox-Knockout-Mäuse in den VSMCs ihrer Aorta weiterhin eine funktionsfähige NADPH-Oxidase exprimieren (22, 160), scheint NOX2 zumindest nicht der einzige und wesentliche ROS-produzierende Mechanismus in diesen Zellen zu sein (25). Unter chronischer Hypoxie könnte die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch NOX2 jedoch eine wesentliche Bedeutung haben und zu den pathologischen Veränderungen am pulmonalen Gefäßsystem und Herzen beitragen (63). Analog dazu gibt es zunehmend Hinweise, dass NOX2 an der Genese kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose, Hypertension, dem Fortschreiten der rechtsventrikulären Hypertrophie zum Herzversagen (84, 100, 159), sowie neurodegenerativen Syndrome (213) und HIV (180) beteiligt ist.

1.3.1.1.3 NOX3

NOX3 kann hauptsächlich in fetalen Nieren gefunden werden sowie in niedrigeren Konzentrationen auch in anderen fetalen Geweben, wie Leber, Lunge und Milz. Vermutet wird eine Funktion in der Signalübertragung während der fetalen Entwicklungsphase (41, 89). Weitere Untersuchungen zeigen ein Vorkommen von NOX3 auch im Bereich des cochleären und vestibulären Systems des Innenohres und legen nahe, dass die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch NOX3 im Zusammenhang mit Hörverlusten und Gleichgewichtsproblemen in Folge ototoxischer Substanzen stehen könnte (19).

1.3.1.1.4 NOX4

NOX4 wurde zunächst als Renox bekannt. Es kann in der Nierenrinde gefunden werden, hat die Fähigkeit zur Produktion von ROS und ist vermutlich am Sauerstoffsensing in der Niere im Rahmen der Erythropoetinsynthese beteiligt (52, 158).

Daneben kommt NOX4 in besonderem Maße im vaskulären Bereich vor, nämlich in Endothelzellen (3), der an glatten Muskelzellen reichen Media und in etwas geringerer Expression in Endothel und Intima. Dabei scheint das Verbreitungsmuster teilweise zum Vorkommen von gp91phox komplementär, d.h. NOX4 findet sich vor allem da, wo gp91phox nicht vorkommt (159). Außerdem kann NOX4 in zahlreichen fetalen und adulten Geweben wie Pankreas, Plazenta, Ovar, Hoden, Skelettmuskel, Osteoklasten, Fibroblasten und Astrozyten angetroffen werden (41, 92). Auch NOX4 scheint im Gefäßsystem wesentlich an der Entstehung von Erkrankungen beteiligt zu sein (84, 95, 133, 159, 168, 169).

1.3.1.1.5 NOX5

NOX5 lässt sich vorwiegend in lymphoidem Gewebe und dem Hoden isolieren (21). Seine genaue Funktion in den genannten Geweben ist jedoch weitgehend unbekannt. Vermutet werden u.a. eine Rolle in der Lymphozytendifferenzierung sowie der Spermatogenese (92).

1.3.1.1.6 DUOX1 und DUOX2

DUOX1 und DUOX2 sind die Homologe mit dem höchsten Molekulargewicht, da sie neben der zu gp91phox homologen Region zusätzlich eine Peroxidase-homologe Region besitzen. DUOX1 wird in Schilddrüse und Lunge, DUOX2 in Schilddrüse und Kolon exprimiert (37, 45, 49). Vermutet wird für beide Enzyme eine Beteiligung an der Schilddrüsenhormonsynthese. So sind Patienten mit seltenen Mutationen von DUOX2 hypothyreot (122). Aufgrund ihres Vorkommens im Bereich von Lungen- und Kolonepithelien scheint auch eine Abwehrfunktion möglich (53).

1.3.1.2 Kofaktoren und Aktivierungsmodi

Auf Kofaktoren und Aktivierungsmodi der gp91phox-Homologe soll hier nur am Rande eingegangen werden. Bemerkenswert ist, dass Untereinheiten der phagozytären NADPH-Oxidase (neben gp91phox auch p22phox, p47phox und p67phox) in Gefäßwänden nachgewiesen werden konnten (176). Ebenso gibt es Hinweise, dass z.B. NOX1 mit den Untereinheiten p22phox (68), p47phox und p67phox (18) der phagozytären NADPH-Oxidase interagieren kann wie auch mit zwei Homologen von p47phox und p67phox (18). Zumindest eine enge Korrelation bezüglich ihrer Expression im Gefäßsystem scheint für NOX4 und p22phox zu existieren (66).

1.3.2 Hinweise auf die Beteiligung von NADPH-Oxidasen am Sauerstoffsensing der HPV und des hypoxieinduzierten vaskulären Remodelings

Das Konzept einer NADPH-Oxidase als Sauerstoffsensor basiert wesentlich auf Experimenten mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Diphenyleneiodonium (DPI), der die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion spezifisch zu inhibieren vermag, sie aber nicht imitiert (62, 66, 109, 118, 171).

Diphenyleneiodonium blockiert möglicherweise aber auch andere Flavoproteine sowie die mitochondriale Atmungskette. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch AEBSF (4-(2-Aminoethyl-)benzensulfonylfluorid), ein spezifischer NADPH-Oxidase-Inhibitor, unabhängig von der NO-Synthese die HPV ausschaltet (200), während der mitochondriale Inhibitor Myxathiazol keinen Einfluss auf die HPV hat (109). Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Hypoxie die Zunahme reaktiver Sauerstoffspezies zur Folge hat (39, 72, 90, 102, 109, 192, 193, 200). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Zunahme und nicht die Abnahme reaktiver Sauerstoffspezies spezifisch in die HPV involviert ist. So inhibiert Nitroblautetrazolium (NBT), welches Superoxid bindet und damit seine weitere Konversion zu H₂O₂ ausschaltet, spezifisch die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (117, 196). Dies trifft ebenso auf die Superoxiddismutaseinhibitoren DETC (Diethyldithiocarbaminsäure) und TETA (Triethylentetramin) zu. Dabei ist der Einfluss von DETC unspezifisch und blockiert auch die Wirkung anderer vasokonstriktorischer Agenzien, während TETA ausschließlich die HPV beeinflusst (200).

Die Substanzen Superoxiddismutase und Tiron (4,5-Dihydroxy-1,3-Benzoldisulfonsäure), die beide die Bildung von H_2O_2 zulassen, üben hingegen keinen Effekt auf die hypoxische Vasokonstriktion aus (196).

Nicht nur in der Lunge, sondern auch in den Sauerstoffsensorzellen (Typ-I-Zellen) des Glomus caroticum gibt es Hinweise auf die Beteiligung einer NADPH-Oxidase am Sauerstoffsensing. So ist die ROS-Produktion normaler Typ-I-Zellen der Maus unter moderater Hypoxie erhöht und die Effekte des hochspezifischen NADPH-Oxidase-Inhibitors AEBSF unterstützen die Hypothese, dass diese erhöhte ROS-Produktion unter Hypoxie das Ergebnis einer vermehrten NADPH-Oxidase-Aktivität ist. Dafür sprechen auch Daten, die belegen, dass Hypoxie in p47phox-Knockout-Zellen keine Veränderung der ROS-Spiegel bewirkt, und die somit auch andeuten, dass der mitochondrialen Atmungskette offensichtlich - zumindest unter moderater Hypoxie – keine Bedeutung als Ursprung reaktiver Sauerstoffspezies zukommt (72). Genauestens bekannt ist heute die Bedeutung der phagozytären NADPH-Oxidase für die antimikrobielle Abwehr. In den vergangenen Jahren wurde mit Entdeckung der gp91phox-Isoformen, der Charakterisierung ihrer Funktionen und Gewebedistribution aber immer evidenter, dass die Mitglieder der sog. NOX-Familie in der kardiovaskulären Physiologie und Pathophysiologie erheblichen Stellenwert als Produzenten reaktiver Sauerstoffspezies haben. Die klassischen vaskulären NADPH-Oxidasen NOX1, NOX2 und NOX4 können in nahezu allen Zellen und Schichten der Gefäßwand angetroffen werden (3, 20, 51, 58, 63, 66, 84, 95, 133, 145, 146, 159, 168, 169, 174, 175), wo sie an der Genese und Progression von Pathologien wie Arteriosklerose, arterieller Hypertonie, der endothelialen Dysfunktion bei Diabetes mellitus, neurodegenerativer Erkrankungen und HIV mitwirken (60, 84, 95, 133, 159, 168, 169, 180, 213). Einige Autoren finden die höchsten Expressionsraten von NOX1 und NOX4 in VSMCs (204), die als Sensor- und Effektorzellen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion betrachtet werden (74, 161).

Gegen die Beteiligung der phagozytären NADPH-Oxidase NOX2 an der Regulation der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion spricht die Beobachtung, dass auch bei gp91phox-Knockout-Mäusen die Fähigkeit zum Sauerstoffsensing erhalten ist. Die Mäuse, die infolge des fehlenden Proteins an septischer Granulomatose leiden, zeigten eine erhaltene HPV nach sechsminütiger Hypoxieexposition. Allerdings fehlt bei den Knockout-Mäusen die basale ROS-Produktion in der Lunge, ein Hinweis darauf, dass unter physiologischen Bedingungen gp91phox die Hauptquelle von ROS sein könnte (11). Die Ergebnisse dieser Untersuchung beziehen sich aber lediglich auf die akute Phase der Hypoxie und sind mit der Annahme einer gp91phox-Isoform als Sauerstoffsensor vereinbar.

Unter chronischer Hypoxie könnte NOX2 jedoch sehr wohl Relevanz für die im Bereich des pulmonalen Gefäßsystems stattfindenden Veränderungen haben. Versuche mit isolierten intrapulmonalen Arterien von Mäusen zeigten nach einer dreiwöchigen Hypoxieexposition signifikant höhere Superoxidspiegel, wogegen bei gp91phox-Knockout-Mäusen nach identischer Hypoxieexposition keine erhöhte ROS-Produktion gemessen wurde. Bei den Knockout-Mäusen entwickelte sich im Gegensatz zu den Kontrolltieren auch kein pulmonalarterieller Hypertonus, kein vaskuläres Remodeling und es kam auch nicht zur Hypertrophie des rechten Ventrikels. Eine signifikante Heraufregulation auf genetischer Ebene, gemessen als höhere NOX2-mRNA-Konzentration, konnte von dieser Arbeitsgruppe jedoch genauso wenig nachgewiesen werden wie eine Expressionszunahme der übrigen Untereinheiten p22phox, p40phox, p47phox und p67phox (103).

Für die Beteiligung einer NADPH-Oxidase am Sauerstoffsensing sprechen auch weitere funktionelle Studien (23, 72, 90, 98, 109, 141, 199, 200):

So wird beispielsweise der offensichtlich an der hypoxischen Depolarisation beteiligte TASK-1-Kanal (Vgl. 1.1.5), der über einen Hintergrund-Kaliumstrom das Ruhemembranpotential der glattmuskulären pulmonalarteriellen Zelle reguliert und unter

34

hypoxischen Bedingungen inhibiert wird (64, 129, 195), in bestimmten sauerstoffreagiblen Zellen zusammen mit NOX4 in der Plasmamembran exprimiert. Die Sauerstoffsensitivität dieses Kanals scheint durch NOX4 reguliert zu werden. So zeigt der TASK-1-Kanal selbst eine nur moderate Hypoxieantwort, die aber durch NOX4 deutlich verstärkt wird, während NOX2 keine solchen Effekte ausübt. Außerdem steigert NOX4 die hypoxische Inhibition des TASK-1-Hintergrund-Kaliumstroms (98).

Bestimmungen an Typ-I-Zellen des Glomus caroticum normaler Mäuse lassen unter Hypoxie einen Anstieg der ROS-Produktion erkennen, während dieser bei p47phox-Knockout-Mäusen fehlt (72). Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass bei gp91phox-Knockout-Mäusen die HPV erhalten ist (11), deutet dies auf die mögliche Beteiligung einer Isoform der phagozytären NADPH-Oxidase am Sauerstoffsensing hin (23).

Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese der Beteiligung einer NADPH-Oxidase am Sensingmechanismus der HPV und am hypoxieinduzierten Gefäßremodeling, wobei die Zunahme und nicht Abnahme der Produktion von ROS und H₂O₂ einen wesentlichen Mechanismus darstellt.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Basierend auf den Erkenntnissen, dass NADPH-Oxidasen am Sensormechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion sowie am hypoxisch ausgelösten vaskulären Remodeling beteiligt sein könnten, sollte in dieser Arbeit die Genexpression der nicht-phagozytären NADPH-Oxidasen NOX1 und NOX4 in der Lunge des Kaninchens untersucht werden. Dabei standen die folgenden Fragestellungen im Mittelpunkt:

1. Wie werden NOX1 und NOX4 in verschiedenen Gewebspräparationen der Lunge auf mRNA-Ebene exprimiert?

Insbesondere sollten bei diesen Untersuchungen pulmonalarterielle und venö-

se Gefäße sowie Trachea, Bronchien, Lungenparenchym und die Aorta differenziert betrachtet werden.

2. Wie werden NOX1 und NOX4 auf mRNA-Ebene in der Lunge unter Hypoxie reguliert?

Diese Fragestellung sollte an einem in vivo-Modell des Kaninchens untersucht werden. Dazu sollten Kaninchen über verschiedene Zeiträume in normobarischer Hypoxie gehalten werden und anschließend Bestimmungen von NOX1und NOX4-mRNA an Gewebspräparationen (wie unter Punkt 1) der Kaninchenlungen durchgeführt werden. Außerdem sollten die Bestimmungen im Vergleich zu in normoxischer Umgebung gehaltenen Kontrolltieren erfolgen.

Die quantitative mRNA-Bestimmung von NOX1- und NOX4-mRNA im Rahmen dieser Fragestellungen sollte nach reverser Transkription mittels Real-time PCR erfolgen.
2 Material

2.1 Geräte und Hilfsmittel

- Abi Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
- Blutgasanalysegerät ABL 330, Radiometer A/S (Brønshøj, Dänemark)
- Cat/Rabbit Ventilator UB 6025, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, Deutschland)
- Gase, Messer-Griesheim (Siegen, Deutschland)
- GeneAmp® PCR System 2400, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
- Glove Bag[™] Inflatable Glove Chamber, Glas-Col (Terre Haute, IN, USA)
- Kaltlichtquelle, Schott (Mainz, Deutschland)
- Ligaturen, Mersilene, Ethicon GmbH (Norderstedt, Deutschland)
- Mikropräparationsbesteck, Aesculap AG & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
- O₂ controller, Modell 4010, Labotect (Göttingen, Deutschland)
- Pelletmixer, Micropistill, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Perfusionskatheter, PVC-Schlauch, Sorin Biomedica (Düsseldorf, Deutschland)
- Photometer, Uvikon 922, Kontron Instruments AG (Basel, Schweiz)
- Pipetten, Pipetman®, Gilson, Inc. (Middleton, WI, USA)
- Pipettenspitzen, Gilson Inc. (Middleton, WI, USA) und Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
- Präparationsbesteck, Aesculap AG & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
- Reaktionsgefäße, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Stereomikroskop Leica MS5, Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
- Tierbeatmungsmaske, RFQ-Medizintechnik GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
- Venenpunktionsbesteck W.I.N. 25 G, Abbott (Sligo, Irland)
- Vortexer, Reax Top, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach, Deutschland)
- Zentrifuge, Centrifuge 5417R, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

2.2 Pharmaka und Reagenzien

- 5x First Strand Buffer, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
- Braunoderm[®], 2-Propanol, Povidon-Iod, Braun-Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
- Chloroform, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
- Dithiotreitol (DTT), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
- DNasel, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
- dNTP Mix, Finnzymes OY (Espoo, Finnland)
- Ethanol, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
- Isopropanol, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
- Ketanest® 50 mg, Ketaminhydrochlorid, Parke-Davis (Berlin, Deutschland)
- Liquemin® N 25 000, Heparin-Natrium, Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- MMLV-RT, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
- Perfusatlösung, Serag-Wiessner KG (Naila, Deutschland)
- random primer mix p(dN)6, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
- RNase freies Wasser, Aqua ad injectabilia, aliquotiert und autoklaviert, Baxter Deutschland GmbH (Unterschleißheim, Deutschland)
- RNase-Inhibitor, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
- RNazol B, WAK Chemie-Medical GmbH (Steinbach, Deutschland)
- Rompun® 2%, Xylazin, Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
- TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, Roche Molecular Systems Inc. (Brandburg, NJ, USA)
- Xylocain® 2%, Astra Chemicals GmbH, (Wedel/Holstein, Deutschland)

Die Reagenzien für die Herstellung der cDNA (MMLV RT, DTT, Puffer) wurden zusammen als Kit bezogen.

3 Methoden

3.1 Normoxie- und Hypoxieexposition der Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden zuvor vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Die Versuchstiere waren Kaninchen der Rasse Chinchilla Bastard beiderlei Geschlechts im Alter von vier bis fünf Monaten mit einem Körpergewicht zwischen 2,9 und 4,1 kg.

Zwei Tiere dienten als normoxische Kontrolltiere und blieben bis zur Lungenentnahme im normalen Versuchstierstall. Jeweils ein Tier wurde für einen, drei bzw. vierzehn Tage in speziell konstruierten, luftdicht von der Außenatmosphäre abgeschlossenen Einzelkäfigen einer kontrollierten normobarischen Normoxie ausgesetzt. Weiterhin wurden jeweils zwei Tiere für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter normobarischer Hypoxie gehalten.

Dabei wurden inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen von 21% bzw. 10% von einer selbstregulierenden Kontrolleinheit durch die Zufuhr von Sauerstoff und Stickstoff aufrechterhalten. Die Gaszusammensetzung wurde zusätzlich über regelmäßig entnommene Proben mittels eines Gasanalysegerätes überprüft. Überflüssige Feuchtigkeit in dem geschlossenen System wurde durch Kondensation in einem Kühlsystem entfernt. Die zirkulierenden Atemgase wurden zudem ständig während der Passage durch einen CO₂-Absorber mit Natronkalk von Kohlenstoffdioxid befreit. Einmal am Tag waren die Käfige zur Reinigung sowie Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser zu öffnen.

Zum Zeitpunkt der Lungenentnahme erhielten die zuvor einer normobarischen Normoxie bzw. Hypoxie ausgesetzten Tiere unmittelbar nach dem Herausnehmen aus den Käfigen eine spezielle Beatmungsmaske mit Gasreservoir. Über diese atmeten sie ein normoxisches (FiO₂ 0,21) bzw. hypoxisches Gasgemisch (FiO₂ 0,1). Die im normalen Versuchstierstall gehaltenen Kaninchen atmeten ohne eine solche Maske weiterhin Raumluft.

	Normoxieversuch	Hypoxieversuch	Kontrolltiere
1 Tag	n = 1	n = 2	
3 Tage	n = 1	n = 2	
14 Tage	n = 1	n = 2	
Gesamt	n = 3	n = 6	n = 2

Zusammenfassend wurden folgende Tierversuche durchgeführt:

Tabelle 1: Durchgeführte Tierversuche

3.2 Narkose, Beatmung und Lungenentnahme

Vorbereitend erfolgte bei allen Versuchstieren die Anlage eines venösen Zugangs durch Punktion und Kanülierung der Ohrrandvene mittels eines Butterflys. Die Narkoseeinleitung geschah durch Injektion einer Mischung aus Ketanest und Rompun. Zur Antikoagulation wurden 1.000 I.E. Heparin/kg KG als Bolus verabreicht. Nach Erreichen eines ausreichend tiefen Narkosestadiums unter erhaltener Spontanatmung wurden die Kaninchen auf dem Operationstisch fixiert und es erfolgte eine Rasur und Desinfektion von Halsregion, Thorax und Abdomen sowie eine prätracheale Infiltrationsanästhesie mit 2% igem Xylocain. Die Narkose wurde unter Erhalt der Spontanatmung kontinuierlich vertieft, bis die Kaninchen auf starke Schmerzreize keine Abwehrreaktion mehr zeigten. Schließlich wurde die Trachea durch vorsichtige, schichtweise Präparation unter Schonung der Halsgefäße und des Nervus vagus dargestellt und mobilisiert. Nun erfolgte eine Tracheotomie und endotracheale Intubation (Tubusinnendurchmesser 3 mm), wobei der Tubus durch eine Ligatur gegen Dislokation gesichert wurde. Der Tubus wurde dann mit einem Kleintierrespirator verbunden und die weitere Beatmung erfolgte volumenkontrolliert mit einem Atemzugvolumen von 30 ml und einer Frequenz von 30/min ohne positiven endexpiratorischen Druck. Je nach Versuchstier wurde dabei mit Raumluft, einem normoxischen (FiO₂ 0,21) oder hypoxischen Gasgemisch (FiO₂ 0,1) ventiliert. Unter kontrollierter Beatmung konnte die Narkose jetzt unter palpatorischer Kontrolle der Herzaktion im Verlauf von 5 - 10 Minuten bis zur nötigen chirurgischen Toleranz vertieft werden.

Nach erneuter Desinfektion von Abdomen und Thorax erfolgte unter sorgfältiger Präparation die Eröffnung des Bauchraumes. Das Diaphragma wurde mittels einer Klemme am Processus xiphoideus fixiert und stumpf von den Rippen getrennt. Der Thorax konnte nun von infradiaphragmal durch stumpfes Lösen des Diaphragmas vom Sternum ohne Verletzung von Cor und Pulmo eröffnet werden. Eine mediane Sternotomie sicherte einen weitgehenden Zugang zu den Thoraxorganen. Nach stumpfer Thymektomie und Eröffnung des Perikardbeutels wurden Aorta und Arteria pulmonalis jeweils mit einer Ligatur umschlungen. Nach Inzision konnte durch den rechten Ventrikel am noch schlagenden Herzens ein Perfusionskatheter in die Arteria pulmonalis vorgeschoben werden. Über diesen wurde die Lunge mit 4°C kaltem Perfusat von Blut freigespült. Um den pH-Wert des Perfusats zwischen 7,36 und 7,44 konstant zu halten, wurden dem Atemgas mit Beginn der Perfusion 4% CO₂ zugemischt. Die Spitze des linken Ventrikels musste nun sofort abgetrennt werden, um die Ausbildung eines Lungenödems aufgrund der plötzlichen Nachlasterhöhung zu verhindern. Der Tod des Tieres trat durch Ligatur der Aorta ein.

Nach Durchtrennen von Vena cava inferior, Vena cava superior, und Aorta konnte das Herz-Lungen-Paket mitsamt der Trachea unter laufender Perfusion und Ventilation mobilisiert und entnommen werden. Die ausreichend von Blut freigespülte Lunge wurde dann von Beatmung und Perfusion dekonnektiert und zügig zur weiteren Präparation in den vorbereiteten Glove Bag verbracht.

3.3 Mikrovaskuläre Präparation und Aufbewahrung der Proben

Der Glove Bag ist ein luftdicht zu schließender Kunststoffbeutel mit integrierten Handschuhen und einer Öffnung zum Einbringen benötigter Materialien. Er ermöglichte es, im Rahmen der weiteren Lungenpräparation unter einer kontrollierten, von der äußeren Umgebung unabhängigen, Atmosphäre zu arbeiten. Dazu wurde der Glove Bag mit einem normoxischen (FiO₂ 0,21) oder hypoxischen (FiO₂ 0,1) Gasgemisch bzw. im Falle der Kontrolltiere mit Raumluft gefüllt. Mit einem portablen Sauerstoffmessgerät im Innern des Glove Bag konnte die Sauerstoffkonzentration regelmäßig bestimmt und durch bedarfsadaptierte Gaszugabe über die ebenfalls im Bag befindliche Gaszuleitung konstant gehalten werden. Des Weiteren waren im Glove Bag folgende Materialien vorbereitet: Stereomikroskop, Kaltlichtquelle, Pinzetten, Scheren und Skalpelle zur Makro- und Mikropräparation, Lineal zur Abschätzung der Größe der präparierten Gefäße (in Kombination mit dem Fadenkreuzmikrometer des Stereomikroskops), Petrischalen, eine mit Aluminiumfolie überzogene Styroporplatte als Präparationsunterlage, Gefäße zum Sammeln und Aufbewahren der Präparate, RNazol B als Suspensionsmedium für die mikrovaskulären Präparate, Styroporbox mit Eis zur Kühlung der Proben, Behältnis mit flüssigem Stickstoff sowie Zellstoff zum Aufsaugen übermäßiger Flüssigkeit.

Pro Versuchstier wurden insgesamt 11 Gewebeproben genommen:

- Aorta
- Stamm der Arteria pulmonalis
- Mittelgroße Pulmonalarterien (Durchmesser ca. 200 300 μm)
- Kleine Pulmonalarterien (Durchmesser = 100 μm)
- Mittelgroße Pulmonalvenen (Durchmesser ca. 200 300 μm)
- Kleine Pulmonalvenen (Durchmesser = 100 μm)
- Trachea
- Mittelgroße Bronchien (Durchmesser ca. 200 300 μ m)
- Kleine Bronchien (Durchmesser = 100 μm)
- Hilusnahes Parenchym
- Peripheres Parenchym

Die Gewebeproben der mittelgroßen und kleinen Pulmonalarterien, Pulmonalvenen sowie der Bronchien wurden durch mikrovaskuläre Präparation gewonnen. Ausgehend von den großen Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien des Hilusbereiches wurde das Gewebe unter dem Stereomikroskop entlang der sichtbaren Gefäße bzw. Bronchien bis in die Lungenperipherie abpräpariert. Der Durchmesser der entnommenen Gefäße wurde unter Verwendung eines Lineales in Kombination mit dem Fadenkreuzmikrometer des Stereomikrokopes bestimmt.

Die Lunge des Kaninches besteht aus einem rechten und einem linken Lungenflügel. Der rechte Lungeflügel wird durch tiefe, aber nicht bis zum Hilus reichende Einschnitte in vier Lappen geteilt: Lobus cranialis, Lobus medius, Lobus caudalis (größter Lappen) und Lobus accessorius. Der linke Lungenflügel besteht nur aus zwei Lappen: Lobus cranialis und Lobus caudatus. Die Trachea teilt sich in Höhe des 4.-5. Brustwirbels in den rechten und linken Hauptbronchus, die sich alsbald wieder in die Lappenbronchien teilen, rechts in vier, links in zwei, von denen wieder in Abständen die Segementbronchien und von diesen wieder die Untersegmentbronchien abgehen.

Um eine möglichst gute Standardisierung der Gewinnung der Mikropräparate zu erreichen, wurden aus den einzelnen Lungenlappen jeweils 4-5 hilusnahe und hilusferne Proben mittelgroßer und kleiner Pulmonalartererien, Pulmonalvenen und Bronchien entnommen. Um möglichst reine Proben der Gewebe zu erhalten, war hierbei eine exakte Präparation des Gewebes mit sofortiger Sammlung der Proben in entsprechend vorbereiteten Gefäßen nötig.



<u>Abbildung 1:</u> Lunge des Kaninchens aus Popesko et al., A colour atlas of anatomy of small laboratory animals, Bailliere Tindall, 2003

Die Gewebeproben von Aorta, Stamm der Arteria pulmonalis, Trachea sowie die Lungenparenchymproben wurden unmittelbar nach der Lungenentnahme nativ in Reaktionsgefäßen schockgefroren. Die durch mikrovaskuläre Präparation gewonnenen Gewebeproben der kleinen Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und des Bronchialsystems wurden in Reaktionsgefäße mit RNazol B verbracht und während der weiteren Präparation auf Eis gelagert, bis eine ausreichend große Menge gesammelt war. Sodann wurden diese Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung aller Proben bei -80°C.

3.4 Homogenisation und RNA-Extraktion

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte nach der Guanidium-Thiocynanat-Phenol-Chloroform-Methode. Dazu wurde RNazol B, eine Fertiglösung bestehend aus Guanidinisothyocyanat und Phenol, benutzt.

Zunächst wurden die nativ schockgefrorenen Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, der Trachea und des Lungenparenchyms unter ständiger Zugabe flüssigen Stickstoffes zu einem feinen Pulver zermörsert und anschließend mit RNazol B versetzt (ca. 1ml/50µg Gewebe). Die Homogenisierung dieser und der bereits in RNazol B befindlichen mikrovaskulären Proben erfolgte nun mechanisch mit Pellet-mixern. Zur Entfernung des Proteinanteils wurde dann ca. ein Zehntel des vorhandenen Volumens an Chloroform hinzugegeben. Nach der Emulgierung mittels Vortexer erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis, anschließend zur Trennung der Phasen eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 14.000 rpm in der auf 4°C gekühlten Zentrifuge. Dabei gingen die Proteine in die untere Chloroformphase über und reicherten sich an der Trennschicht an. Die obere wässrige Phase mit der RNA wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und nach Mischung durch Invertieren für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde erneut für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand schließlich verworfen. Das verbleibende Pellet mit der Gesamt-RNA wurde mit 0,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, für 5 Minuten zentrifugiert, nach Abnahme des Überstandes an der Luft getrocknet und schließlich je nach Größe in 20 - 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Sollte die isolierte RNA nicht sofort weiter verwendet werden, erfolgte die Lagerung bei -80°C.

3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Gesamt-RNA-Ausbeute wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm im Photometer bestimmt. Dabei gilt für RNA: 1 OD = 40 μ g/ml = 0,04 μ g/ μ l. Die Reinheit der RNA kann durch Berechung des Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm bestimmt werden und sollte für RNA guter Qualität bei 1,7 - 2,0 liegen.

3.6 DNase-Behandlung und Denaturierung der RNA

Da durch die beschriebene RNA-Extraktionsmethode Verunreinigungen der Proben mit DNA möglich sind, erfolgte eine DNase-Behandlung aller Proben. Jeweils 1 µg RNA wurde auf 10 µl mit RNase-freiem Wasser verdünnt und mit 5 Einheiten DNase versetzt. Der 30-minütigen Verdaureaktion bei 37°C folgten 5 Minuten bei 75°C zur Inaktivierung der DNase und Denaturierung der RNA. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt.

3.7 Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription (RT) erfolgte die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA, die auch als copy-DNA oder cDNA bezeichnet wird. Dabei wurde zur Negativkontrolle für jede RNA-Probe auch ein RT-Ansatz verwendet, der statt reverser Transkriptase nur RNase-freies Wasser enthielt.

Pro RT-Ansatz wurden eingesetzt:

5 x First Strand Buffer	2 µl
Desoxyribonukleosidtriphosphat-(dNTP)-Mix	1 µl
Random Primer Mix PDN6	0,5 µl
Dithiotreitol (DTT)	0,5 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
Reverse Transkriptase MMLV-RT bzw. H ₂ O	0,5 µl

Tabelle 2: Reverse Transkription

Allen Reaktionsansätzen wurden jeweils 5 µl der vorher DNase-behandelten und denaturierten RNA zugegeben. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit reverser Transkriptase sowie die Negativkontrollen für 1 Stunde bei 39°C inkubiert.

Die Inaktivierung der reversen Transkriptase geschah für 2 Minuten bei 96°C. Danach kühlten die Proben auf Eis ab.

3.8 Quantitative Real-time PCR

Die Quantifizierung der cDNA und somit indirekt auch der *messenger*-RNA (mRNA) erfolgte mittels quantitativer Real-time PCR. Die Entstehung des spezifischen PCR-Produkts wird bei der Taqman®-PCR durch fluoreszierende Gensonden verfolgt, die für die Zielsequenz spezifisch sind. An die Gensonde sind ein Reporter- und ein Quencherfarbstoff gebunden. Dabei unterdrückt die Nähe des Quencherfarbstoffs die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs. Die bei der PCR eingesetzte TaqPolymerase besitzt neben der Fähigkeit DNA zu synthetisieren auch eine 5'-Nuklease-Aktivität, d.h. eine DNA-abbauende Aktivität, durch die der Reporterfarbstoff während der PCR-Reaktion von der Gensonde abgeschnitten wird. Dadurch wird sein Abstand zum Quencher vergrößert und seine Fluoreszenz erhöht.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung kann der Fortgang der PCR-Reaktion und somit der Anstieg der Fluoreszenz in Echtzeit verfolgt werden. Die Quantifizierung basiert dabei auf der Berechnung des so genannten Threshold-Cycles oder C_T-Wertes, also jenem PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Somit beruht die Quantifizierung nicht auf den absoluten Mengen des entstandenen PCR-Produkts, sondern vielmehr auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Der C_T-Wert wird während der exponentiellen Phase der Amplifikation bestimmt, wenn Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel und nachlassende Enzymaktivität die PCR noch nicht limitieren (137).

Die Auswertung der mittels quantitativer real-time PCR erhaltenen C_T-Werte erfolgte mit Hilfe der vergleichenden C_T-Methode, bei der die Zielsequenz und ein Standard jeweils in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen amplifiziert werden (137). Zielsequenz waren dabei jeweils NOX1 oder NOX4. Als Standard wurde das *housekeeping*-Gen hprt eingesetzt. Zur besseren statistischen Absicherung wurden alle Proben als Triplikate angesetzt. Weiterhin wurden für alle Proben Negativkontrollen mitgeführt.

Zunächst musste jedoch in einem Validierungsexperiment gezeigt werden, dass die Effizienzen der Reaktionen sowohl für die NOX1- und hprt-Primer als auch für die NOX4- und hprt-Primer praktisch gleich sind.

Zur quantitativen PCR wurden für jede Probe eingesetzt:

	NOX1	NOX4	hprt
Universal Master Mix	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Forward Primer	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Sonde	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
H ₂ O	9,25 µl	9,25 µl	10,25 µl
cDNA je Probe	2 µl	2 µl	1 µl

Tabelle 3: Quantitative PCR

Das Programm der quantitativen PCR begann mit einem zweiminütigen UNG-Verdau bei 50°C. Darauf folgte die Aktivierung der Taq-Polymerase in zehn Minuten bei einer Temperatur von 95°C. Es schlossen sich nun 50 Zyklen mit jeweils 95°C für 15 Sekunden und 60°C für eine Minute an. In diesem Protokoll wurden im Sinne einer two-step-PCR Annealing und Extension zu einem Schritt zusammengefasst. Das verwendete Protokoll erlaubt sowohl das Annealing der Primer und der spezifischen Fluoreszenzsonde sowie die Synthesereaktion des PCR-Produktes.

3.8.1 Formelableitung zur vergleichenden C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz wird beschrieben durch die Gleichung:

$$X_{n} = X_{0} \times (1 + E_{X})^{n}$$
 (1)

 X_n = Anzahl der Zielsequenzmoleküle nach n Zyklen X_0 = Anzahl der Zielsequenzmoleküle zu Beginn E_X = Effizienz der Zielsequenzamplifikation n = Anzahl der Zyklen

Beim Erreichen des Schwellenwertes (C_T -Wert) erreicht die Menge der amplifizierten Zielsequenzmoleküle einen vordefinierten, konstanten Wert und es gilt:

$$X_{T} = X_{0} \times (1 + E_{X})^{C_{T,X}} = K_{X}$$
 (2)

 X_T = Schwellenanzahl der Zielsequenzmoleküle X_0 = Anzahl der Zielsequenzmoleküle zu Beginn E_x = Effizienz der Zielsequenzamplifikation $C_{T,X}$ = Threshold der Zielsequenz K_x = Konstante

Für das Referenzgen trifft analog zu:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$
 (3)

- R_{T} = Schwellenanzahl der Referenzmoleküle
- R₀ = Anzahl der Referenzmoleküle zu Beginn
- E_X = Effizienz der Referenzmolekül-Amplifikation
- C_{T} = Threshold der Referenz

 $K_x = Konstante$

Die Division der Gleichungen (2) und (3) ergibt:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$
(4)

K = Konstante

Unter der Voraussetzung, dass die Effizienzen der Zielsequenz- und Referenzmolekülamplifikation gleich sind, vereinfacht sich die Gleichung wie folgt:

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1+E)^{C_{T,X}-C_{T,R}} = K$$
 (5)

Mit $\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$ und $X_N = \frac{X_0}{R_0}$ ergibt sich:

$$X_N \times (1+E)^{\Delta C_T} = K \tag{6}$$

Oder:

$$X_N = K \times (1+E)^{-\Delta C_T}$$
 (7)

Für eine Amplicon-Größe von < 150 bp liegt die Effizienz der Reaktionen ungefähr bei 1, so dass man die relative Expression des Zielgens im Verhältnis zur Referenz über folgende Formel berechnen kann:

$$X_{N} = \frac{X_{0}}{R_{0}} = K \times 2^{-\Delta C_{T}}$$
(8)

3.8.2 Verwendete Primer und Sonden

Folgende Primer- und Sondensequenzen wurden eingesetzt:

NOX1 forward Primer	5'-TGA TCT GCC TCC TCA CAG CTG-3'
NOX1 reverse Primer	5'-CCG CCG GCT TCT GCT-3'
NOX1 Sonde	5'-Fam-TCA TAT AAT CGC ACA CCT GTT TAA CTT
	TGA ACG CTA-Tamra-3'
NOX4 forward Primer	5'-TCA GCC TGT GCG TGG CT-3'
NOX4 reverse Primer	5'-TCA TCC AGC AGG GTG TTG AG-3'
NOX4 Sonde	5'-Fam-AGG CAT TGG AGT GAC TCC TTT TGC ATC
	GA-Tamra-3'
hprt forward Primer	5'-AGA TGG TCA AGG TCG CAA GC-3'
hprt reverse Primer	5'-AAC AAA GTC TGG CCT GTA TCC AA-3'
hprt Sonde	5'-Fam-TGC TGG TGA AAA GGA CCC CTC GAA G-
	Tamra-3'

3.8.3 Auswertung, Statistik und Präsentation der Daten

Die Rohdaten der quantitativen PCR wurden zunächst gesichtet. Eliminiert wurden sodann Wertepaare mit kontaminierter Negativkontrolle. Für NOX1 wurden schließlich alle Proben mit einem Schwellenwert (C_T -Wert) = 42, für NOX4 und hprt Proben mit einem Schwellenwert = 35 akzeptiert. Danach erfolgte für jede Gewebeart unter Berücksichtigung von Normoxie bzw. den unterschiedlichen Hypoxiezeiten der Ausschluss aller Werte außerhalb der 95%-Konfidenzintervalle.

Die Verarbeitung der verbliebenen Rohdaten erfolgte nun nach der oben beschriebenen vergleichenden CT-Methode, so dass schließlich für alle untersuchten Gewebe die relative mRNA-Expression der Zielgene NOX1 bzw. NOX4 im Verhältnis zum Referenzgen hprt (k x NOX1-mRNA/hprt-mRNA bzw. k x NOX4-mRNA/hprtmRNA) für Normoxie und die drei Hypoxiezeiten errechnet wurde.

In den Diagrammen des Ergebnisteils wurden die jeweiligen Mittelwerte dieser relativen NOX1- bzw. NOX4-mRNA-Expression dargestellt. Die Standardabweichung wurde als Fehlerindikator eingefügt.

Als statistischer Test wurde ein t-Test für unverbundene Stichproben mit zweiseitiger Fragestellung herangezogen. Die Annahme statistischer Signifikanz erfolgte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α = 0,05.

4 Ergebnisse

4.1 Basale Expression von NOX1-mRNA in der Kaninchenlunge

Untersucht wurde die basale Expression von NOX1-mRNA in verschiedenen Gewebeproben der Lunge zweier normoxischer Kontrolltiere und von drei Tieren, die jeweils für einen Zeitraum von einem, drei bzw. vierzehn Tagen unter normobarischer Normoxie gehalten wurden. Die entnommenen Gewebeproben umfassten pro Versuchstier jeweils eine Probe der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, Proben mittelgroßer und kleiner Pulmonalarterien sowie mittelgroßer und kleiner Pulmonalvenen, tracheales Gewebe, mittlere und kleine Bronchien und weiterhin hilusnah und peripher entnommenes Parenchym.

Eine Expression von NOX1-mRNA konnte in allen untersuchten Gewebeproben der Kaninchenlunge nachgewiesen werden.

Dabei fand sich statistisch signifikant die bei weitem höchste Expression in den Proben der Trachea.

Die zweithöchste NOX1-mRNA-Expression konnte in der Aorta nachgewiesen werden. In den arteriellen Gefäßen der pumonalen Strombahn dagegen lag die nachgewiesene Expression deutlich niedriger. Hier war auch eine Abnahme von Stamm der A. pulmonalis zu den mittleren und kleinen pulmonalarteriellen Gefäßen vorhanden, wobei sich zwischen den beiden letztgenannten kein signifikanter Expressionsunterschied nachweisen ließ.

Die gefundene Expression für den pulmonalvenösen Bereich lag in der Größenordnung der mittleren und kleinen pulmonalarteriellen Gefäße.

Bezüglich der Luftwege wurden Proben aus der Trachea mit mittelgroßen und kleinen Bronchien verglichen. Bereits erwähnt wurde die mit Abstand höchste Expression in der Trachea der Versuchstiere; die Werte für das Bronchialsystem lagen deutlich niedriger. Hier fand sich kein Unterschied zwischen mittleren und kleinen Bronchien. Ihre NOX1-mRNA-Expression lag jedoch signifikant über der pulmonalarteriell und pulmonalvenös nachweisbaren sowie der des Lungenparenchyms.

Im hilusnah entnommenen Parenchym fand sich eine höhere NOX1-mRNA-Expression als in peripherem; dieser Unterschied war statistisch allerdings nicht signifikant. Zusammenfassend fand sich bezüglich der basalen NOX1-mRNA-Expression normoxischer Tiere somit die höchste Expression in trachealem Gewebe, gefolgt von Proben der Aorta, des Bronchialsystem und schließlich des Pulmonalarterienstammes. Die geringsten Mengen an NOX1-mRNA beinhalteten mittlere und kleine Pulmonalarterien, mittlere und kleine Pulmonalvenen sowie hilusnah und peripher entnommene Parenchymproben (s. Abb. 2 und 3).



<u>Abbildung 2:</u> Relative NOX1-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Trachea, Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms.

Deutlich zu erkennen ist die in der Trachea statistisch signifikant höchste NOX1-mRNA-Expression ($\alpha = 0,05$ für Proben der Aorta; $\alpha = 0,01$ für den Stamm der A. pulmonalis; $\alpha = 0,001$ für mittlere und kleine Pulmonalarterien und –venen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnahes und peripheres Parenchym).

Die NOX1-mRNA-Expression der Aorta liegt über der mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, -venen und des Parenchyms (jeweils $\alpha = 0,05$).

(* Statistisch signifikanter Unterschied zur Trachea, † zur Aorta)



<u>Abbildung 3</u>: Relative NOX1-mRNA-Expression normoxischer Kaninchen für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, -venen und Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms.

In der Aorta kann eine signifikant höhere NOX1-mRNA-Expression nachgewiesen werden als in mittleren und kleinen Pulmonalarterien ($\alpha = 0,05$), Pulmonalvenen ($\alpha = 0,05$) sowie in den Lungenparenchymproben ($\alpha = 0,05$). Keine statistische Signifikanz ergibt sich im Vergleich des aortalen Gewebes zum Stamm der A. pulmonalis und zum Bronchialsystem.

Der Pulmonalarterienstamm zeigt eine signifikant höhere NOX1-mRNA-Expression als mittlere und kleine Pulmonalarterien ($\alpha = 0,05$), Pulmonalvenen ($\alpha = 0,01$) und peripheres Lungenparenchym ($\alpha = 0,01$).

Die Expression im Bronchialsystem liegt signifikant höher als im Bereich der mittleren und kleinen Pulmonalarterien und –venen (jeweils $\alpha = 0,01$), sowie des Lungenparenchyms ($\alpha = 0,05$). Kleine Bronchien zeigen eine höhere NOX1-mRNA-Expression als der Pulmonalarterienstamm ($\alpha = 0,05$).

Zwischen mittleren und kleinen Pulmonalarterien finden sich ebenso wie zwischen mittleren und kleinen Pulmonalvenen, mittleren und kleinen Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenem Parenchym keine relevanten Expressionsunterschiede für NOX1-mRNA.

(* signifikanter Unterschied zur Aorta, † zum Pulmonalarterienstamm und ‡ zum Bronchialsystem.)

4.2 Basale Expression von NOX4-mRNA in der Kaninchenlunge

Betrachtet wurde analog zur basalen NOX1-mRNA-Expression die basale Expression von NOX4-mRNA in verschiedenen Gewebeproben der Lunge zweier normoxischer Kontrolltiere und von drei Tieren, die jeweils für einen Zeitraum von einem, drei bzw. vierzehn Tagen unter normobarischer Normoxie gehalten wurden. Pro Versuchstier wurden jeweils eine Probe der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, Proben mittelgroßer und kleiner Pulmonalarterien sowie mittelgroßer und kleiner Pulmonalvenen, tracheales Gewebe, mittlere und kleine Bronchien und ferner hilusnah und peripher entnommenes Parenchym aufgearbeitet.

In allen untersuchten Gewebeproben der Kaninchenlunge normoxisch gehaltener Tiere bzw. der beiden Kontrolltiere fand eine Expression von NOX4-mRNA statt. Insgesamt fand sich die höchste NOX4-mRNA-Expression in den Proben der Aorta, die um ein Vielfaches über der aller übrigen Gewebe lag.

Die zweithöchste Expression war im pulmonalvenösen System anzutreffen. Sie lag in der Größenordnung des Pulmonalarterienstammes und Lungenparenchyms. Statistische Unterschiede zwischen den drei letztgenannten Geweben fanden sich nicht. Im Bereich der kleinen Pulmonalvenen schien die NOX4-mRNA-Expression ein wenig höher als bei den mittelgroßen Pulmonalvenen zu sein; dieser Effekt erlangte aber keine statistische Bedeutung. Ebenso wenig fand sich eine relevante Differenz zwischen hilusnah entnommenem Parenchym und Parenchym aus der Lungenperipherie.

Im Bereich der Luftwege unterschieden sich Trachea, mittlere und kleine Bronchien bezüglich der NOX4-mRNA-Expression kaum. Ihre Expression lag jeweils unterhalb der von Pulmonalvenen, des Parenchyms und Pulmonalarterienstammes.

Am wenigsten NOX4-mRNA wurde im Gebiet der mittleren und kleinen Pulmonalarterien exprimiert. Außer für die Trachea und das Bronchialsystem war dies für die gesamten anderen untersuchten Gewebe als statistisch signifikant anzusehen. Für die pulmonalarterielle Strombahn fand sich somit eine deutliche Abnahme vom Stamm der Arteria pulmonalis hin zu den mittleren und kleinen pulmonalarteriellen Gefäßpräparationen. Die letzteren beiden wiederum schienen sich nicht bzw. nur unwesentlich zu unterscheiden. Insgesamt fand sich somit die höchste NOX4-mRNA-Expression in der Aorta, gefolgt von der Gruppe der Pulmonalvenen, des Lungenparenchyms und Pulmonalarterienstammes. Unterhalb dieser Gewebe lagen die Luftwege, d.h. Bronchialsystem und Trachea. Die niedrigsten Werte waren für die mittelgroßen und kleinen Pulmonalarterien nachzuweisen (s. Abb. 4 und 5).



<u>Abbildung 4:</u> Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, der Trachea, mittlerer und kleiner Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenen Parenchyms. Zu sehen ist die in der Aorta signifikant höhere NOX4-mRNA-Expression im Vergleich zu mittleren und kleinen Pulmonalarterien ($\alpha = 0,001$), Pulmonalvenen ($\alpha = 0,01$), Trachea ($\alpha = 0,05$), Bronchialsystem ($\alpha = 0,001$) sowie Lungenparenchym ($\alpha = 0,01$). Bezüglich des Pulmonalarterienstammes lässt sich kein signifikanter Unterschied errechnen.

Die NOX4-mRNA-Expression im Stamm der A. pulmonalis liegt signifikant höher als im Bereich der mittleren und kleinen Pulmonalarterien ($\alpha = 0,001$) und des Bronchialsystems ($\alpha = 0,05$). Keine Signifikanz ergibt sich bezüglich der Unterschiede zu mittleren und kleinen Pulmonalvenen, der Trachea und dem Parenchym.

Weiterhin ist eine deutlich niedrigere NOX4-mRNA-Expression der mittleren und kleinen Pulmonalarterien im Vergleich zum pulmonalvenösen System ($\alpha = 0,001$) und zum Parenchym ($\alpha = 0,001$) festzustellen.

Mittlere und kleine Pulmonalvenen weisen außerdem eine höhere Expression als tracheales ($\alpha = 0,01$) sowie bronchiales Gewebe ($\alpha = 0,001$) auf, unterscheiden sich aber nicht signifikant vom Parenchym, während die Expression des Parenchyms allerdings über der trachealen ($\alpha = 0,05$) und bronchialen ($\alpha = 0,05$) liegt.

(* signifikanter Unterschied zur Aorta, † zum Pulmonalarterienstamm, ‡ zu mittleren und kleinen Pulmonalarterien, # zu mittleren und kleinen Pulmonalvenen und \$ zum Parenchym.)



<u>Abbildung 5:</u> Relative NOX4-mRNA-Expression normoxischer Tiere für mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Parenchym.

Keine statistisch relevanten Expressionsunterschiede für NOX4-mRNA finden sich zwischen mittleren und kleinen Pulmonalarterien, mittleren und kleinen Pulmonalvenen, mittleren und kleinen Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenem Parenchym.

4.3 Verhältnis der basalen NOX1- zur basalen NOX4-mRNA-Expression

Das Verhältnis der NOX1- zur NOX4-mRNA-Expression unter Normoxie in den unterschiedlichen Gewebeproben zeigte große Schwankungen. Als Maßstab hierfür kann der NOX4-/NOX1-mRNA-Quotient (k x NOX4-mRNA/hprt-mRNA dividiert durch k x NOX1-mRNA/hprt-mRNA) herangezogen werden, der im Folgenden auch als NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis bezeichnet wird.

Die Berechnung des Quotienten ergab je nach Gewebeprobe Werte zwischen 2 und 867 mit einem Mittelwert von 270. Er betrug für die Trachea 2, für mittlere und kleine Bronchien 36, für mittlere und kleine Pulmonalarterien 133 und 222 für die aus der Aorta gewonnenen Proben. Der Pulmonalarterienstamm hatte den Wert 254, das Verhältnis für das Lungenparenchym und die Pulmonalvenen lag mit 373 sowie 867 deutlich höher (s. Abb. 6).

Die Trachea, das Bronchialsystem sowie mittlere und kleine Pulmonalarterien zeigten demnach überproportional hohe Expressionsraten von NOX1-mRNA. Relativ hoch war die NOX1-mRNA-Expression weiterhin in der Aorta. Der Wert des Pulmonalarterienstammes war nur wenig niedriger als das mittlere NOX4-mRNA/NOX1-mRNA-Verhältnis. Parenchym und pulmonalvenöses System zeigten ein höheres Verhältnis, gleichbedeutend mit einer relativ hohen NOX4-mRNA-Expression. Auffallend war weiterhin, dass Arterien und Venen sich bezüglich des NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnisses offensichtlich unterschieden. Dieses lag sowohl für die Aorta, den Pulmonalarterienstamm, mittlere und kleine Pulmonalarterien weit unter dem zu mittleren und kleinen Pulmonalvenen gehörigen, die somit eine besonders hohe NOX4-mRNA-Konzentration vermuten ließen, während im arteriellen System überproportional viel NOX1-mRNA exprimiert wurde.



<u>Abbildung 6:</u> NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis normoxischer Tiere für Proben der Trachea, des Stammes der A. pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie zentral und peripher entnommenen Parenchyms als Quotient der relativen NOX4-mRNA-Expression und der relativen NOX1-mRNA-Expression bezüglich des Referenzgens hprt.

Die Berechnung des Quotienten der relativen NOX4-mRNA- zur NOX1-mRNA-Expression (k x NOX4mRNA/hprt-mRNA geteilt durch k x NOX1-mRNA/hprt-mRNA), ergibt je nach Gewebeprobe Werte zwischen 2 und 867 mit einem Mittelwert von 270.

Gemessen am NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis finden sich überproportional hohe Expressionsraten von NOX1-mRNA, d.h. ein kleiner NOX4-/NOX1-mRNA-Quotient, im Bereich der Trachea und des Bronchialsystems, gefolgt von mittleren und kleinen Pulmonalarterien. Der Pulmonalarterienstamm liegt im Bereich des Mittelwerts. In den Parenchymproben und Pulmonalvenen lässt sich in Bezug auf NOX1-mRNA eine relativ hohe NOX4-mRNA-Expression nachweisen.

4.4 Regulation der NOX1-mRNA-Expression unter Hypoxie

Gegenstand dieser Untersuchung war es, durch Hypoxie induzierte Veränderungen der NOX1-mRNA-Expression zu beleuchten. Dazu wurde die relative NOX1-mRNA-Expression normoxisch gehaltener Tiere mit der von Kaninchen verglichen, die zuvor für einen, drei oder vierzehn Tage einer normobarischen Hypoxie ausgesetzt wurden. Vergleichsgrundlage sind die unter Punkt 4.1 dargestellten Ergebnisse für die basale NOX1-mRNA-Expression normoxischer Tiere. Betrachtet wurden analog Gewebeproben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis, mittlere und kleine Pulmonalarterien, mittlere und kleine Pulmonalvenen, mittlere und kleine Bronchien sowie Parenchym aus der Nähe des Lungenhilus und aus der Peripherie der Lungen.

Über den gesamten Zeitverlauf konnte für sämtliche Proben sowohl in Normoxie als auch Hypoxie eine Expression von NOX1-mRNA nachgewiesen werden.

Für die großen Gefäßpräparationen der Aorta und des Pulmonalarterienstammes fand sich statistisch signifikant eine hypoxieinduzierte Expressionsabnahme nach einem, drei und vierzehn Tagen Hypoxiedauer.

Mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie mittlere und kleine Pulmonalvenen zeigten eine ähnliche Kinetik der NOX1-mRNA-Expression für eine Hypoxiedauer von einem bis zu drei Tagen. Nach eintägiger Hypoxie kam es im Vergleich zum Basalwert jeweils zu einer signifikanten Zunahme der NOX1-mRNA-Expression, die dann jedoch wieder abfiel und am dritten Tag Werte erreichte, die sogar unter dem Ausgangswert normoxischer Vergleichstiere lagen (signifikant für Pulmonalvenen, nicht signifikant für Pulmonalarterien). Für eine zweiwöchige Hypoxiedauer konnte allerdings keine eindeutige Aussage getroffen werden, da die Hälfte der Versuchstiere mit einer Heraufregulation, die andere Hälfte jedoch mit einer Herunterregulation reagierte.

Für die untersuchten Lungenparenchymproben galt, dass die gefundenen Expressionsunterschiede zu keinem Zeitpunkt statistische Signifikanz erlangten. Die ermittelten Werte lagen nach einem und vierzehn Tagen unter der Basalexpression, am dritten Tag leicht darüber.

Eine signifikante Heraufregulation der NOX1-mRNA-Expression war im Bereich der Trachea für alle Hypoxiezeitpunkte nachweisbar. Maximale Werte wurden hierbei nach einer Hypoxiedauer von einem Tag erreicht, danach fiel die Expression wieder stark ab, lag nach drei und vierzehn Tagen Hypoxie aber auch weiterhin über dem Ausgangswert.

Daneben wiesen mittlere und kleine Bronchien eindeutige Expressionsveränderungen unter Hypoxie auf, die denen der mittleren und kleinen Pulmonalarterien und Pulmonalvenen ähnlich waren. So fand sich eine signifikant gesteigerte Expression nach ein- und vierzehntägiger Hypoxie, die zum dritten Tag hin jedoch wieder abfiel. Signifikant war weiterhin die Expressionsabnahme nach eintägiger Hypoxie hin zu drei- und vierzehntägiger Hypoxieexposition (s. Abb. 7 und 8).



<u>Abbildung 7:</u> Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Betrachtet wurden Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, mittlerer und kleiner Pulmonalvenen sowie hilusnahen und peripheren Lungenparenchyms.

Für die Aorta ist insgesamt eine deutliche Abnahme der NOX1-mRNA-Expression unter Hypoxie zu erkennen. Dieser Effekt ist mit α = 0,05 als signifikant anzusehen. Gleiches gilt auch für den Pulmonalarterienstamm mit α = 0,01.

Im Bereich der mittelgroßen und kleinen Pulmonalarterien findet sich nach einer Hypoxiedauer von einem Tag eine Zunahme der NOX1mRNA-Expression ($\alpha = 0,05$); nach dreitägiger Hypoxie ist die NOX1-mRNA-Expression auf Werte unterhalb der normoxischer Vergleichstiere gefallen; dieser Effekt zeigt jedoch keine Signifikanz. Für eine vierzehntägige Hypoxieexposition kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Im Mittel liegt die NOX1-mRNA-Expression dann zwar über dem normoxischen Ausgangswert, bei genauer Betrachtung wird aber deutlich, dass die Hälfte der Tiere eine Heraufregulation, die andere jedoch eine Herunterregulation zeigt.

Mittlere und kleine Pulmonalvenen zeigen nach einem Tag einen Anstieg der NOX1-mRNA-Expression ($\alpha = 0,001$). Am dritten Hypoxietag liegt sie unter der normoxischer Tiere ($\alpha = 0,05$) und der des ersten Hypoxietages ($\alpha = 0,05$). Analog zu den mittleren und kleinen Pulmonalarterien verhalten sich auch für die vierzehntägige Hypoxiedauer bei den mittleren und kleinen Pulmonalvenen die Versuchstiere uneinheitlich, so dass keine sichere Beurteilung möglich ist.

Die Expressionsunterschiede bezüglich des Parenchyms zeigen keine statistische Bedeutung.

(* Signifikante Veränderungen der NOX1-mRNA-Expression unter Hypoxie.)



<u>Abbildung 8:</u> Vergleich der relativen NOX1-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Verglichen wurden Proben der Trachea sowie mittlerer und kleiner Bronchien.

Bezüglich der Trachea findet sich für alle drei Hypoxiezeitpunkte eine signifikante Expressionszunahme mit $\alpha = 0,001$ für einen bzw. $\alpha = 0,01$ für drei und vierzehn Tage Hypoxiedauer. Weiterhin ist eine Abnahme der NOX1-mRNA-Expression vom ersten zum dritten Hypoxietag zu erkennen, die statistische Signifikanz erlangt ($\alpha = 0,05$).

Im Bereich des Bronchialsystems sind die für einen und vierzehn Tage beobachteten Werte signifikant höher als für normoxische Vergleichstiere (jeweils $\alpha = 0,01$). Nach drei Tagen liegt die Expression oberhalb des Normoxiewertes, dieser Unterschied ist allerdings nicht statistisch bedeutsam.

Signifikanz erlangt wiederum der Expressionsabfall nach eintägiger Hypoxie hin zur drei- und vierzehntägigen Hypoxieexposition ($\alpha = 0.05$).

(* signifikante Expressionszunahme unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie, † signifikante Expressionsabnahme im Vergleich zu eintägiger Hypoxie)

4.5 Regulation der NOX4-mRNA-Expression unter Hypoxie

Anhand von Gewebeproben der Aorta, des Stammes der Arteria pulmonalis, mittlerer und kleiner Pulmonalarterien, Pulmonalvenen und Bronchien sowie hilusnahen und peripheren Parenchyms wurden normoxisch gehaltene Versuchstiere Kaninchen aus ein-, drei- und vierzehntägigen Hypoxieversuchen gegenübergestellt. Ziel war es, hypoxieinduzierte Veränderungen der Expression für NOX4-mRNA nachzuweisen.

Eine Expression von NOX4-mRNA konnte dabei in allen untersuchten Gewebeproben sowohl unter Normoxie als auch nach unterschiedlich langer Hypoxieexposition nachgewiesen werden.

Die zur systemischen Zirkulation gehörige Aorta wies insgesamt einen hypoxieinduzierten Anstieg der NOX4-mRNA-Expression auf. Nach einer eintägigen Hypoxieexposition wurden maximale Werte beobachtet, die schließlich zum dritten Tag hin wieder ungefähr auf das Ausgangsniveau normoxischer Tiere abfielen, um dann bis zu einer Hypoxiedauer von vierzehn Tagen erneut anzusteigen.

Der Pulmonalarterienstamm unterlag ebenfalls einer Heraufregulation der NOX4mRNA-Expression mit maximalen Werten nach vierzehntägiger Hypoxie.

Eine statistische Signifikanz fand sich hinsichtlich dieser Effekte jedoch weder für die Aorta noch für den Pulmonalarterienstamm.

Mittlere und kleine Pulmonalarterien zeigten eine diskrete hypoxieinduzierte Herunterregulation mit minimalen Werten nach eintägiger Hypoxie. Zum dritten Tag hin war ein signifikanter Wiederanstieg zu registrieren. Uneinheitlich verhielten sich die Versuchstiere mit vierzehntägiger Hypoxieexposition; hier fanden sich sowohl Herauf- als auch Herunterregulation.

Im pulmonalvenösen Gefäßabschnitt ließ sich eine signifikante Herunterregulation der NOX4-mRNA-Expression für ein- und dreitägige Hypoxie nachweisen. Genau wie im Bereich kleiner und mittlerer Pulmonalarterien konnte aber auch hier keine eindeutige Aussage für eine vierzehntägige Hypoxiedauer getroffen werden.

Nur minimale Expressionsveränderungen, die insgesamt als nicht signifikant angesehen werden mussten, kennzeichneten die Trachea, mittlere und kleine Bronchien sowie hilusnah und peripher entnommenes Lungenparenchym (s. Abb. 9 und 10).



<u>Abbildung 9:</u> Vergleich der relativen NOX4-mRNA-Expression normoxisch und für einen, drei bzw. vierzehn Tage unter Hypoxie gehaltener Versuchstiere. Verglichen wurden Proben der Aorta, des Stammes der A. pulmonalis sowie mittlerer und kleiner Pulmonalarterien und Pulmonalvenen.

Aortales Gewebe zeigt unter Hypoxie einen deutlichen Anstieg der NOX4-mRNA-Expression nach einem Tag, um dann am dritten Tag wieder ungefähr auf den Ausgangswert abzufallen. Zum vierzehnten Tag hin zeigt sich ein erneuter Anstieg der NOX4-mRNA-Expression. Diese Effekte erreichen jedoch keine statistische Signifikanz.

Für den Pulmonalarterienstamm findet sich insgesamt eine - ebenfalls nicht signifikante - Heraufregulation der NOX4-mRNA-Expression unter Hypoxie.

Eine geringgradige hypoxieinduzierte Abnahme der NOX4-mRNA-Expression ist nach einem Tag im Bereich mittlerer und kleiner Pulmonalarterien zu erkennen. Vom ersten zum dritten Hypoxietag steigt die Expressionsrate dann signifikant an ($\alpha = 0,05$). Da nach vierzehn Tagen einige der Tiere eine Heraufregulation, andere aber eine Herunterregulation zeigen, ist für diese Zeit keine sichere Aussage zu treffen. Mittlere und kleine Pulmonalvenen weisen sowohl nach ein- als auch nach dreitägiger Hypoxiedauer eine Herunterregulation der NOX4-mRNA-Expression auf (jeweils $\alpha = 0,01$). Wie für den mittleren und kleinen pulmonalarteriellen Bereich ist auch für pulmonalvenöse Gefäße eine eindeutige Aussage bezüglich der vierzehntägigen Hypoxie nicht möglich, da gegensätzliche Reaktionen der Versuchstiere zu verzeichnen sind.

(* signifikanter Expressionsanstieg von eintägiger hin zu dreitägiger Hypoxie, † signifikante Expressionsabnahme unter Hypoxie.)





Die zu erkennenden Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von der Dauer der Hypoxieexposition erreichen für keines der untersuchten Gewebe statistische Signifikanz.

5 Diskussion

5.1 Untersuchungen zur basalen Expression von NOX1-mRNA und NOX4-mRNA in der Kaninchenlunge

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die basale mRNA-Expression der gp91phox-Homologe NOX1 und NOX4 in der Lunge normoxischer Kaninchen zu charakterisieren. Betrachtet wurden dabei die Luftwege mit Trachea, mittleren und kleinen Bronchien, der Stamm der A. pulmonalis, mittlere und kleine Lungenarterien sowie Lungenvenen, hilusnah und in der Lungenperipherie entnommenes Parenchym und außerdem die Aorta als Gefäß der systemischen Zirkulation.

Eine wichtige Erkenntnis aus den vorliegenden Untersuchungen ist, dass NOX1- und NOX4-mRNA in allen untersuchten Gewebeproben der Lungen normoxischer Tiere nachgewiesen werden konnten und dass sie eine charakteristische Verteilung in diesen Geweben aufwiesen. Dabei waren die NOX1-mRNA-Konzentrationen insgesamt weitaus niedriger als die NOX4-mRNA-Konzentrationen.

Die höchste NOX1-mRNA-Konzentration konnte in der Trachea gefunden werden, mit deutlichem Abstand gefolgt von der Aorta, dem Bronchialsystem und dem Pulmonalarterienstamm. Mittlere und kleine Pulmonalarterien, Pulmonalvenen sowie das Lungenparenchym enthielten nur sehr geringe Mengen an NOX1-mRNA.

Bei Betrachtung des vaskulären Systems fiel zunächst die relativ hohe NOX1-mRNA-Expression in der Aorta auf, während die pulmonalen Gefäße, hier repräsentiert durch den Pulmonalarterienstamm, mittlere und kleine Pulmonalarterien und Pulmonalvenen, nur einen Bruchteil der aortalen NOX1-mRNA-Konzentration aufwiesen. Innerhalb der Lungenstrombahn nahm die NOX1-mRNA-Expression vom Stamm der A. pulmonalis zu den mittleren und kleinen Pulmonalarterien hin ab; mittlere und kleine Pulmonalvenen lagen im Bereich der entsprechenden Pulmonalarterien.

Diese Beobachtungen widersprechen Studien, in denen eine vaskuläre Expression von NOX1 überhaupt nicht gefunden werden kann (63, 66). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnten Unterschiede der Expression bei den verschiedenen untersuchten Spezies sein.

Die Mehrzahl der Autoren geht jedoch von einer wichtigen Rolle von NOX1 für das Gefäßsystem aus und beobachtet ebenfalls eine, wenn auch niedrige, vaskuläre Expression (159, 168, 169). Die höchste NOX1-Expression im Bereich des Gefäßsystems kann in VSMCs angetroffen werden. In aortalen VSMCs kann die Expression von NOX1 durch platelet derived growth factor (PDGF) induziert werden und NOX1 scheint hier wichtige Funktionen für Mitogenese, Zelltransformation und (168). Auch das normale Wachstum zu besitzen Angiotensin und $PGF_{2\alpha}$ (Prostaglandin $F_{2\alpha}$), d.h. weitere Mechanismen, welche die Superoxidproduktion stimulieren, vermögen neben PDGF die Expression von NOX1 in VSMCs zu verstärken. Die Transfektion von VSMCs mit NOX1-antisense-mRNA inhibiert diese durch Agonisten induzierte vermehrte NOX1-Expression und erhöhte Superoxidproduktion. Diese Ergebnisse sind mit einer Beteiligung von NOX1 an der durch Agonisten stimulierten ROS-Produktion vereinbar (86, 95, 168, 208).

NOX1 ist überdies offensichtlich in die Genese kardiovaskulärer Erkrankungen wie Arteriosklerose und Hypertonie involviert, bei welchen erhöhte ROS-Spiegel detektiert werden können (60, 84, 95, 133, 159, 168, 169), und scheint weiterhin eine Rolle bei der endothelialen Dysfunktion bei Diabetes mellitus zu spielen (204).

Die größte Spannbreite der NOX1-mRNA-Expression zeigten die Luftwege mit sehr hohen Konzentrationen in der Trachea und recht geringen in mittleren und kleinen Bronchien. Die NOX1-mRNA-Expression im bronchialen Bereich lag insgesamt aber signifikant über der mittlerer und kleiner Pulmonalarterien und Pulmonalvenen bzw. der des Parenchyms.

Die NOX1-mRNA-Konzentrationen in der Trachea waren verblüffend hoch. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von NOX1 mit NOX2 und seinem hohen Vorkommen im Kolon, wo es mit normalen und pathogenen Bakterien in Kontakt kommt, erscheint dort auch eine Rolle in der mikrobiellen Abwehr wahrscheinlich (20, 30, 168). Eine Abwehrfunktion von NOX1 ist sicherlich auch für die Trachea denkbar, in die Bakterien, Viren und andere Pathogene mit der Atemluft gelangen können.

Die basale NOX4-mRNA-Verteilung unterschied sich grundlegend von der NOX1mRNA-Distribution. Die Aorta wies hier die höchsten Expressionsraten auf und übertrifft alle anderen Gewebe um ein Vielfaches. Die nächst höchsten Raten fanden sich in den Pulmonalvenen, dem Pulmonalarterienstamm und im Lungenparenchym. Recht niedrige Mengen konnten in den Luftwegen, d.h. der Trachea, mittleren und kleinen Bronchien, sowie mittleren und kleinen Pulmonalarterien detektiert werden.

Für die pulmonalarterielle Strombahn galt, dass die NOX4-mnRNA-Expression vom kaliberstarken Stamm der A. pulmonalis hin zu mittleren und kleinen Pulmonalarterien signifikant abnahm. Die Aorta als systemisches Gefäß zeigte insgesamt eine bedeutend höhere Expression als alle Pulmonalgefäße. Weiterhin fiel auf, dass mittlere und kleine Pulmonalvenen eine signifikant höhere Expression hatten als mittlere und kleine Pulmonalarterien.

Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen überein, die NOX4 in hohem Maße ubiquitär im Gefäßbett und in allen vaskulären Zellen nachweisen (3, 84, 95, 119, 159, 169, 174, 208). Am größten scheint die Expression aber in VSMCs (95, 159, 169, 208) und der an ihnen reichen vaskulären Media zu sein (159, 169). NOX4 scheint hier - zusammen mit NOX1 - für die erhöhte Superoxidproduktion in vaskulären Pathologien wie der Arteriosklerose und Hypertonie verantwortlich zu sein (84, 95, 133, 159, 168, 169). Eine weitere Arbeitsgruppe weist NOX4 in etwas höheren Konzentrationen im Bereich arterieller Gefäße als in der venösen Strombahn nach (66). Andere finden, dass sich die Expressionsraten in A. pulmonalis und Koronargefäßen stark ähneln (63).

Die Luftwege Trachea, mittelgroße und kleine Bronchien differierten nur unwesentlich hinsichtlich ihrer NOX4-mRNA-Expression.

Die Gewebeverteilungsmuster von NOX1- und NOX4-mRNA wiesen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf.

Bezüglich des vaskulären Systems fanden sich jeweils in der Aorta die höchsten Expressionsraten. Der Stamm der A. pulmonalis hatte höhere NOX1- und NOX4mRNA-Expressionsraten als mittlere und kleine Pulmonalarterien. Bezüglich NOX1mRNA bestand zwischen mittleren und kleinen Pulmonalarterien und –venen kein Unterschied; dagegen war die NOX4-mRNA-Expression der Venen signifikant höher als die der Arterien. Die Luftwege, d.h. Trachea und Bronchien, differierten hinsichtlich NOX1-mRNA gravierend, wogegen sie in ihrer NOX4-mRNA-Expression beinahe identisch waren.
Bei Betrachtung der relativen NOX4- zur NOX1-mRNA-Expression wurde deutlich, dass einige Gewebe überproportional viel NOX1-mRNA exprimierten. Die Berechnung des Quotienten der relativen NOX4- zur NOX1-mRNA-Expression (k x NOX4mRNA/hprt-mRNA geteilt durch k x NOX1-mRNA/hprt-mRNA), ergab je nach Gewebeprobe Werte zwischen 2 und 867 mit einem Mittelwert von 270. Dieser Quotient betrug für die Trachea 2, für mittlere und kleine Bronchien 36, für mittlere und kleine Pulmonalarterien 133 und 222 für die aus der Aorta gewonnenen Proben. Der Quotient bewegte sich für den Pulmonalarterienstamm mit 254 im Bereich des Mittelwertes, lag aber für das Lungenparenchym mit 373 sowie 867 für die Pulmonalvenen deutlich darüber.

Es fanden sich also überproportional hohe Expressionsraten von NOX1-mRNA vor allem im Bereich der Trachea und des Bronchialsystems, gefolgt von mittleren und kleinen Pulmonalarterien. Der Pulmonalarterienstamm bewegte sich im Bereich des Mittelwerts, wogegen die relative NOX4-/NOX1-mRNA-Expression im Parenchym und pulmonalvenösen System zu Gunsten von NOX4-mRNA verschoben war.

NOX1- und NOX4-mRNA verhielten sich zum Teil geradezu komplementär zueinander, d. h. dort, wo die Expression von NOX1-mRNA hoch war, kam NOX4-mRNA in geringerer Expression vor und umgekehrt. Dies schien einerseits für die Trachea und das Bronchialsystem zuzutreffen, wo jeweils viel NOX1-, aber wenig NOX4-mRNA detektiert wurde, und andererseits für das pulmonalvenöse System und Lungenparenchym mit vergleichsweise hohen NOX4-, aber niedrigen NOX1-mRNA-Konzentrationen.

Expressionsunterschiede fanden sich auch zwischen arteriellem und venösem System. In den untersuchten Proben der Aorta, des Pulmonalarterienstammes sowie der mittleren und kleinen Pulmonalarterien ließ sich jeweils ein deutlich geringeres NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnis nachweisen als in mittleren und kleinen Pulmonalvenen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass im arteriellen System überproportional viel NOX1-mRNA exprimiert wird, und steht im Kontrast zu einer Untersuchung, bei der im Vergleich humaner Venen (V. saphena) und Arterien (A. mammaria interna) ein Trend der NOX4-Expression zu höheren Werten im arteriellen System System festgestellt wurde (66).

73

5.2 Untersuchungen zur Regulation der NOX1- und NOX4-mRNA-Expression unter Hypoxie

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben eindeutig eine Regulation der NOX1mRNA-Expression unter Hypoxie, die vom untersuchten Gewebe und zum Teil auch von der Dauer der Hypoxieexposition abhängig war.

In der Aorta und dem Stamm der A. pulmonalis fand sich eine signifikante Abnahme der NOX1-mRNA-Expression zu allen drei untersuchten Zeitpunkten, d. h. nach einer Hypoxiedauer von einem, drei und vierzehn Tagen.

Genau entgegengesetzt reagierten Trachea und Bronchialsystem. Hier ließ sich jeweils eine Heraufregulation der NOX1-mRNA-Expression zu allen Zeitpunkten nachweisen.

Das Bild bei den untersuchten mikrovaskulären Gewebeproben stellte sich weniger einheitlich dar. Sowohl mittlere und kleine Pulmonalarterien als auch mittlere und kleine Pulmonalvenen zeigten nach eintägiger Hypoxie eine signifikante Expressionszunahme von NOX1-mRNA, nach drei Tagen dann aber eine ebenfalls signifikante Abnahme, die aber lediglich für die Pulmonalvenen Signifikanz erreichte. Für die vierzehntägig exponierten Tiere ließ sich keine eindeutige Aussage treffen, da jeweils die Hälfte der Tiere ein Herauf-, die andere Hälfte jedoch eine Herunterregulation zeigte.

Keine signifikante Veränderung unter Hypoxieexposition zeigten dagegen Proben aus hilusnah und peripher entnommenem Lungenparenchym.

Bisher adressieren nur wenige Untersuchungen den Einfluss der Hypoxie auf die NOX1-Expression. Eine Induktion von NOX1 unter Hypoxie in Verbindung mit vermehrter ROS-Produktion konnte für die humane Pulmonalepithelzellreihe A549 nachgewiesen werden. Weitere Hinweise auf die Beteiligung von NOX1 ergeben sich aus Versuchen mit Zellen, die NOX1 überexprimieren und aus Transfektionsversuchen mit NOX1-antisense-Vektoren. Ebenso konnte in den untersuchten Zellen in Verbindung mit dem Vorkommen und der Aktivität von NOX1 die Expression des NOX-Organizers 1 (NOXO1) und NOX-Aktivators 1 (NOXA1) nachgewiesen werden (59). NOXO1 und NOXA1 sind Homologe der klassischen Untereinheiten gp47phox und gp67phox der phagozytären NADPH-Oxidase und relevant für die Funktion und ROS-Produktion durch NOX1 (18).

Auch bezüglich der NOX4-mRNA-Expression war in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe eine hypoxieinduzierte Regulation zu konstatieren.

Eine Heraufregulation der NOX4-mRNA-Expression fand sich für aortales Gewebe. Nach einer Hypoxiedauer von einem und vierzehn Tagen lagen die detektierten mRNA-Konzentrationen über dem Vergleichswert. Die gemessenen Werte nach dreitägiger Hypoxie lagen immer noch leicht über dem Basalwert normoxisch gehaltener Tiere, waren aber niedriger als nach eintägiger Hypoxie. Insgesamt wurde eine statistische Relevanz bezüglich der Expressionsveränderungen in der Aorta in den vorliegenden Untersuchungen jedoch knapp verfehlt.

Der Stamm der A. pulmonalis wies zu allen drei Hypoxiezeiten eine - ebenfalls nicht signifikante - Expressionszunahme auf, während die mikrovaskulären Präparationen mittlerer und kleiner Pulmonalarterien und -venen analog zur NOX1-mRNA-Expression uneinheitlich reagierten. Nach eintägiger Hypoxie ließen sowohl Arterien als auch Venen eine Herunterregulation erkennen. Nach drei Tagen stieg die NOX4-mRNA-Expression der mittleren und kleinen Pulmonalarterien wieder an und lag leicht über dem Ausgangswert. Im Bereich mittlerer und kleiner Pulmonalvenen dagegen bestand die Herunterregulation auch noch nach drei Tagen. Zur Veränderung der Expression nach vierzehntägiger Hypoxie war, wie zuvor bezüglich der NOX1-mRNA, weder für die arteriellen noch die venösen Proben eine eindeutige Aussage möglich, da auch hier die Versuchstiere jeweils zu 50% eine Herauf- oder Herunterregulation erkennen ließen. Trachea, Bronchien und Parenchym zeigten keine Veränderungen, die Signifikanz erreichen.

Besonders interessant ist die Feststellung, dass NOX1- und NOX4-mRNA im vaskulären System scheinbar eine gegensinnige Regulation besaßen.

So wurde NOX1-mRNA in der Aorta und im Stamm der A. pulmonalis zu allen Zeiten herunterreguliert, NOX4-mRNA jedoch heraufreguliert. Eine Heraufregulation der NOX1-mRNA-Expression und gleichzeitige Herunterregulation der NOX4-mRNA-Expression fand sich in mittleren und kleinen Pulmonalarterien und -venen nach einem Hypoxietag, während nach drei Tagen die NOX1-mRNA-Konzentrationen in mittleren und kleinen Pulmonalarterien und kleinen NOX4-mRNA-einem Hypoxietag, während nach drei Tagen die NOX1-mRNA-Konzentrationen in mittleren und kleinen Pulmonalarterien unter dem Basalwert, die von NOX4-mRNA jedoch darüber lagen. Eine Ausnahme von dieser gegensinnigen Regulationsweise stellte der dritte Tag bei mittleren und kleinen Pulmonalvenen dar, an dem sowohl

NOX1 als auch NOX4 signifikant niedrigere mRNA-Konzentrationen aufwiesen als unter Normoxie.

Bemerkenswert ist auch, dass die NOX1-mRNA-Expression in der Trachea und im Bronchialsystem offensichtlich unter Hypoxie deutlich anstieg, sich für NOX4-mRNA aber keine signifikanten Veränderungen detektieren ließen.

Veränderungen des NOX4-/NOX1-mRNA-Verhältnisses unter Hypoxie wurden nicht gesondert dargestellt, da sie sich alle aus den gefundenen Expressionsveränderungen der NOX1- und NOX4-mRNA ergaben und keine weiteren neuen Erkenntnisse lieferten.

5.3 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass NOX1- und NOX4-mRNA in verschiedenen Präparationen der Atemwege und Lungengefäße exprimiert und unter Hypoxie in unterschiedlicher Weise reguliert werden.

Beobachtungen aus funktionellen Studien, die NADPH-Oxidasen eine wichtige Funktion beim Sauerstoffsensing zuschreiben, werden durch die Ergebnisse dieser Studie gestützt.

Die Regulationsmechanismen der Expression von NOX1- und NOX4-mRNA unter Hypoxie sind jedoch noch nicht verstanden. Ebenso konnten bislang die Signalwege und relevanten Transkriptionsfaktoren in diesem Zusammenhang noch nicht identifiziert werden. Hieraus könnten sich Ansatzpunkte nachfolgender Untersuchungen ergeben.

Weiterführende Studien sollten auch die Regulation der Proteinexpression von NOX1 und NOX4 sowie ihre Beteiligung an der Bildung eines enzymatisch aktiven NADPH-Oxidase-Komplexes in zellspezifischer Weise berücksichtigen. Dies wäre von maßgeblicher Bedeutung, um zu ergründen, inwieweit NOX1- oder NOX4enthaltende NADPH-Oxidasen tatsächlich Sauerstoffsensoren darstellen und wie sich ihre ROS-Produktion unter Hypoxie verändert.

6 Zusammenfassung

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion gewährleistet unter physiologischen Bedingungen stets eine optimale Anpassung der lokalen Perfusion an die Ventilationsverhältnisse der Lunge und sorgt somit für eine bestmögliche Oxygenierung des pulmonalarteriellen Blutes. Auslöser der HPV ist eine lokale alveoläre Hypoventilation, die in minderbelüfteten Lungenbezirken zur reflektorischen pulmonalarteriellen Vasokonstriktion und somit einer Umleitung des Blutflusses zu besser belüfteten Lungenarealen führt. Chronische alveoläre Hypoxie führt dagegen zu pulmonaler Hypertonie, Cor pulmonale und einem charakteristischen vaskulären Remodeling.

Trotz umfassender Forschungsbemühungen, die mit der Beschreibung des Phänomens der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion durch v. Euler und Liljestrand im Jahre 1946 begannen, sind bis heute der genaue Sauerstoffsensor und Sensingmechanismus sowohl für die akute HPV als auch für die unter chronischer Hypoxie auftretenden Effekte am pulmonalvaskulären System unbekannt. Zahlreiche Untersuchungen weisen auf die Beteiligung einer nichtphagozytären NADPH-Oxidase am Sensormechanismus der HPV sowie am hypoxisch ausgelösten vaskulären Remodeling hin. NADPH-Oxidasen könnten sogar den primären Sauerstoffsensor darstellen und unter Hypoxie vermehrt reaktive Sauerstoffspezies produzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von NOX1 und NOX4, die Isoformen der phagozytären gp91phox-NADPH-Oxidase-Untereinheit darstellen, in der Lunge des Kaninchens untersucht. Zunächst wurde die basale NOX1- und NOX4-Expression auf mRNA-Ebene in Gewebepräparationen pulmonalarterieller und - venöser Gefäße sowie Trachea, Bronchialsystem, Lungenparenchym und Aorta normoxisch gehaltener Kontrolltiere charakterisiert. NOX1- und NOX4-mRNA wurden in allen untersuchten Gewebeproben exprimiert und wiesen eine charakteristische Distribution auf, wobei die NOX4-mRNA in wesentlich höheren Konzentrationen als NOX1-mRNA gefunden wurde. Die größte NOX1-mRNA-Expression war in der Trachea nachweisbar, gefolgt von Aorta, Bronchialsystem und Pulmonalarterienstamm. Im Bereich mittlerer und kleiner Pulmonalarterien und -venen sowie im Lungenparenchym waren jeweils nur sehr geringe NOX1-mRNA-Mengen nachweisbar.

Grundlegend anders stellte sich die basale NOX4-mRNA-Verteilung dar. In der Aorta fanden sich weitaus höhere Expressionsraten als in allen übrigen Geweben; mit großem Abstand folgten dann Pulmonalvenen, Pulmonalarterienstamm und Lungenparenchym. Eine relativ niedrige NOX4-mRNA-Expression hatten die Luftwege mit Trachea, mittleren und kleinen Bronchien.

Zur Untersuchung der Regulation der NOX1- und NOX4-mRNA-Expression unter Hypoxie wurde ein in vivo-Modell des Kaninchens gewählt, in dem Kaninchen über verschiedene Zeiträume in normobarischer Hypoxie gehalten wurden. Anschließend erfolgten quantitative Bestimmungen von NOX1- und NOX4-mRNA an Gewebepräparationen pulmonalarterieller und -venöser Gefäße sowie Trachea, Bronchialsystem, Lungenparenchym und der Aorta nach reverser Transkription mittels Realtime PCR, die mit den Bestimmungen bei in normoxischer Umgebung gehaltenen Kontrolltieren verglichen wurden.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben eindeutig eine Regulation der NOX1- und NOX4-mRNA-Expression unter Hypoxie. Bezüglich NOX1-mRNA fand sich in der Aorta und im Pulmonalarterienstamm eine Herunterregulation nach einer Hypoxiedauer von einem, drei und vierzehn Tagen, während sich in Trachea und Bronchialsystem eine Heraufregulation zu allen drei Zeitpunkten nachweisen ließ. Mittlere und kleine Pulmonalarterien sowie -venen zeigten nach eintägiger Hypoxie eine Expressionszunahme und eine Abnahme nach drei Tagen.

NOX4-mRNA wurde unter Hypoxie in der Aorta und im Pulmonalarterienstamm heraufreguliert. Mittlere und kleine Pulmonalarterien und -venen reagierten nach eintägiger Hypoxie mit einer Herunterregulation. Nach drei Tagen stieg die NOX4mRNA-Expression mittlerer und kleiner Pulmonalarterien wieder an, während sie bei den entsprechenden Pulmonalvenen auch nach drei Tagen noch herunterreguliert blieb.

NOX1-mRNA wurde in der Trachea und im Bronchialsystem unter Hypoxie vermehrt exprimiert. Gleichzeitig zeigte die NOX4-mRNA-Expression hier keine Veränderungen zur Normoxie. Mittlere und kleine Pulmonalarterien und -venen wiesen nach eintägiger Hypoxie ebenfalls eine Heraufregulation der NOX1-mRNA aber eine Herunterregulation NOX4-mRNA auf.

Bezüglich NOX4-mRNA belegen die Ergebnisse eine hypoxieinduzierte Heraufregulation in der Aorta und dem Pulmonalarterienstamm sowie für eine dreitägige Hypoxieexposition in mittleren und kleinen Pulmonalarterien. Parallel wurde die NOX1-mRNA-Expression herunterreguliert.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für eine Regulation der NOX1- und NOX4-mRNA-Expression unter Hypoxie und unterstützen die Hypothese, dass NOX1 und NOX4 am Sensormechanismus der HPV sowie am hypoxisch ausgelösten vaskulären Remodeling beteiligt sein könnten.

7 Summary

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) matches lung perfusion to ventilation and thus optimizes oxygenation of pulmonary arterial blood. HPV is triggered by localized alveolar hypoventilation which causes pulmonary arteries in poorly ventilated lung areas to constrict and redistributes blood flow to better ventilated lung segments. Chronic alveolar hypoxia leads to pulmonary hypertension, cor pulmonale and a characteristic vascular remodeling.

Despite extensive efforts of study beginning with the description of the phenomenon of HPV by von Euler and Liljestrand in 1946 the precise oxygen sensor and sensing mechanism underlying acute HPV and the effects of chronic hypoxia to the pulmonary vascular system remain unresolved. Many studies suggest the involvement of a non-phagocytic NADPH oxidase in the sensing mechanisms of HPV and hypoxia-induced vascular remodeling. NADPH oxidases may even present the primary oxygen sensor and produce higher amounts of reactive oxygen species under hypoxic conditions.

The present study examines the expression of NOX1 and NOX4 which present isoforms of the phagocytic NADPH oxidase subunit gp91phox in rabbit lung.

At first the basal expression of NOX1 and NOX4 was characterized at the mRNA level in preparations of pulmonary arterial and venous vessels, trachea, lung parenchyma and the aorta of animals kept under normoxic conditions. NOX1 and NOX4 were found to be expressed in all examined tissues with a distinct distribution and NOX4 mRNA was expressed in much more abundant concentrations than NOX1 mRNA. The greatest expression of NOX1 mRNA was detected in the trachea, followed by the aorta, the bronchial airway system and the stem of the pulmonary artery. Only small amounts of NOX1 mRNA were detectable in medium sized and small pulmonary arteries and veins as well as in lung parenchyma.

The distribution of NOX4 mRNA was fundamentally different. The expression rates in the aorta were far higher than in all other tissues. Pulmonary veins, the pulmonary arterial stem and lung parenchyma followed with much lower levels. The airway system, i.e. trachea, medium-sized and small bronchial tubes, only displayed relatively low expression rates of NOX4 mRNA.

In order to examine the regulation of NOX1 and NOX4 expression at the mRNA level under hypoxic conditions an in vivo model of rabbits was chosen. Rabbits were exposed to normobaric hypoxia for certain periods of time. Subsequently, concentrations of NOX1 und NOX4 mRNA in preparations of pulmonary arterial and venous vessels, the trachea, bronchial system, lung parenchyma and the aorta were quantified by the use of reverse transcription and real-time PCR and finally compared to the concentrations of animals kept under normoxic conditions.

The presented study demonstrates a regulation of NOX1 and NOX4 mRNA expression under hypoxia. Concerning NOX1 the aorta and the stem of the pulmonary artery displayed a downregulation after hypoxic exposure for one, three and fourteen days, whereas trachea and bronchial system showed an upregulation after identical times of hypoxic exposure. Medium-sized and small pulmonary arteries and veins showed an increased expression after one day of hypoxia as well as a decreased expression after three days.

Hypoxia lead to an upregulation of NOX4 mRNA expression in the aorta and pulmonary arterial stem. Medium-sized and small pulmonary arteries and veins reacted with a downregulation after one day. After three days the NOX4 mRNA expression of medium-sized and small pulmonary arteries increased again while it remained downregulated in equally sized pulmonary veins.

Under hypoxic conditions NOX1 mRNA was expressed in greater amounts in the trachea and the bronchial system. At the same time no differences in the expression of NOX4 mRNA were noted in those tissues compared to normoxia. Medium-sized and small pulmonary arteries and veins showed an upregulation of NOX1 but a downregulation of NOX4 mRNA after one-day hypoxia.

In regard to NOX4 the study ascertains a hypoxia-induced upregulation in the aorta and the pulmonary arterial stem. This is also applicable for a three-day hypoxic exposure in medium-sized and small pulmonary arteries. At the same time NOX1 mRNA expression was downregulated in those tissues.

As a conclusion the results of the present study provide evidence for a regulation of NOX1 and NOX4 mRNA expression under hypoxia and support the hypothesis that NOX1 and NOX4 could be involved in the sensing mechanism of HPV and hypoxia-induced vascular remodeling.

8 Literaturverzeichnis

- Aaronson PI, Robertson TP, Ward JP. Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction. Resp Physiol Neurobiol 2002; 132: 107-120
- 2 Aaronson PI. TRPC channel upregulation in chronically hypoxic pulmonary arteries: The HIF-1 bandwagon gathers steam. Circ Res 2006; 98: 1465-1467
- 3 Ago T, Kitazono T, Oobishi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. Circulation 2004; 109: 227-233
- 4 Al-Tinawi A, Krenz GS, Rickaby DA, Linehan JH, Dawson CA. Influence of hypoxia and serotonin on small pulmonary vessels. J Appl Physiol 1994; 76: 56-64
- 5 Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kliroy S, Arnold RS, Lambeth JD. Reactive oxygen species generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 715-720
- Archer S, Michelakis E. The mechanim(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O₂ sensors, and controversies. News Physiol Sci 2002; 17: 131-137
- 7 Archer S, Will J, Weir EK. Redox status in the control of pulmonary vascular tone. Herz 1986; 11: 127-141
- 8 Archer SL, Huang J, Henry T, Peterson D, Weir EK. A redox-based O₂-sensor in rat pulmonary vasulature. Circ Res 1993; 73: 1100-1112
- 9 Archer SL, Huang JM, Reeve HL, Hampl V, Tolarová S, Michelakis E, Weir EK. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. Circ Res 1996; 78: 431-432
- Archer SL, Nelson DP, Weir EK. Simultaneous measurement of O₂ radicals and pulmonary vascular reactivity in rat lung. J Appl Physiol 1989; 67: 1903-1911
- 11 Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, Puttaganta 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 USA 1999; 96: 7944-7949

- 12 Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El Yaagoubi A, Nguyen-Huu L, Reeve HL, Hampl V. Molecular identification of the role of voltage-gated K+ channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. J Clin Invest 1998; 101: 2319-2330
- 13 Archer SL, Tolins JP, Raij L, Weir EK. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by the inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. Biochem Biophys Res Commun 1989; 164: 1198-1205
- 14 Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA, Lambeth JD. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 5550-5555
- 15 Audi SH, Dawson CA, Rickaby DA, Linehan JH. Localization of the sites of pulmonary vasomotion by use of arterial and venous occlusion. J Appl Physiol 1991; 70: 2126-2136
- 16 Babior M. NADPH Oxidase: An update. Blood 1999; 93: 1464-1476
- 17 Babior M. NADPH oxidase. Curr Opin Immunol 2004; 16: 42-47
- 18 Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. J Biol Chem 2003; 278: 3510-3513
- 19 Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3: A superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. J Biol Chem 2004; 279: 46065-46072
- 20 Banfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B, Ligeti E, Demaurex N, Krause KH. A mammalian H+ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. Science 2000; 287: 138-142
- 21 Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N, Krause KH. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen and lymph nodes. J Biol Chem 2001; 276: 37594-37601
- 22 Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ETH, Runge MS. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. J Clin Invest 2001; 108: 1513-1522

- 23 Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 2007; 87: 245-313
- 24 Belknap JK, Orton EC, Ensley B, Tucker A, Stenmark KR. Hypoxia increases bromodeoxyuridine labeling indices in bovine neonatal pulmonary arteries. Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 16: 366-371
- 25 Bengtsson SHM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. Clin Exp Pharmacol Physiol 2003; 30: 849-854
- 26 Benitz WE, Bernfield M. Endothelial cell proteoglycans: possible mediators of vascular responses to injury. Am J Respir Cell Mol Biol 1990; 2: 407-408
- 27 Bennie RE, Packer CS, Powell DR, Jin N, Rhoades RA. Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. Am J Physiol 1991; 261: 156-163
- 28 Beyne J. Influence de l'anoxemie sur la grande circulation et sur la circulation pulmonaire. CR Soc Biol (Paris) 1942; 136: 399
- 29 Bindslev L, Jolin-Carlsson A, Santesson J, Gottlieb I. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in man: effects of hyperventilation. Acta Anaestesiol Scand 1985; 29: 574-551
- Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leulocytes any more!
 Trends Biochem Sci 2003; 28: 502-508
- 31 Botto L, Beretta E, Daffara R, Miserocchi G, Palestini P. Biochemical and morphological changes in endothelial cells in response to hypoxic interstitial edema. Respir Res 2006; 7:7
- 32 Bradford J, Dean H. The pulmonary circulation. J Physiol 1894; 16: 34-96
- 33 Brimioulle S, LeJeune P, Naeije R. Effects of hypoxic pulmonary vasoconstriction on pulmonary gas exchange. J Appl Physiol 1996; 81: 1535-1543
- 34 Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev 1996; 76: 839-885
- Burchardi H. Respiratorische Störungen. In: Burchardi H, Larsen R, Schuster HP, Suter PM (Hrsg.) Die Intensivmedizin. 9. Auflage. Springer; Berlin, Heidelberg 2004; 377-397
- 36 Burghuber OC. Nifedipine attenuates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respiration 1987; 52: 86-93

- 37 Caillou B, Dupuy C, Lacroix L, Nocera M, Talbot M, Ohayon R, Deme D, Bidart JM, Schlumberger M, Virion A. Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (ThoX, LNOX, Duox) genes and proteins in human thyroid tissues. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 3351-3358
- 38 Carpenter TC, Schomberg S, Stenmark KR. Endothelin-mediated increases in lung VEGF content promote vascular leak in young rats exposed to viral infection and hypoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 289: 1075-1082
- 39 Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11715-11720
- 40 Chen YF, Oparil S. Endothelin and pulmonary hypertension. J Cardiovasc Pharmacol 2000; 35: 49-53
- 41 Cheng G, Cao Z, Xu X, Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. Gene (Amst.) 2001; 269: 131-140
- 42 Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King JA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. N Engl J Med 1992; 327: 70-75
- 43 Clark RA., Epperson TK, Valente AJ. Mechanisms of Activation of NADPH Oxidases. Jpn J Infect Dis 2004; 57: 22-23
- 44 Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. Pflugers Arch – Eur J Physiol 2005; 450: 363-371
- 45 De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. J Biol Chem 2000; 275: 23227-23233
- 46 DiCarlo VS, Chen SJ, Meng QC, Durand J, Yano M, Chen YF, Oparil S. ETAreceptor antagonist prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1995; 269: 690-697
- 47 Dinauer MC. Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. Hematology 2005; 89-95

- 48 Dipp M, Nye PCG, Evans AM. Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L318-L3251
- 49 Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, Lambeth JD. Tyrosine crosslinking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. J Cell Biol 2001; 154: 879-891
- 50 Fagan KA, Oka M, Bauer MR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG, McMurtry IF. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 287: 656-664
- 51 Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB. PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. Circ Res 2002; 90: 1012-1019
- 52 Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8010-8014
- 53 Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defence. FASEB J 2003; 17: 1502-1504
- 54 Gelband CH, Gelband H. Ca²⁺-release from intracellular stores is an initial step in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat pulmonary artery resistance vessels. Circulation 1997; 96: 3647-3654
- 55 Geraci MW, Gao B, Shepherd DC, Moore MD, Westcott JY, Fagan KA, Alger LA, Tuder RM, Voelkel NF. Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. J Clin Invest 1999; 103: 1509-1515
- Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med 1995; 333: 214–2 21.
- 57 Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel R, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid W, Stewart D. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med 1993; 328: 1732–1739.

- 58 Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. Circ Res 2000; 87: 26-32
- 59 Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schmidt HHW, Seeger W, Hänze J. Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase un reactive oxygen species. Free Rad Biol Med 2004; 36: 1279-1288
- 60 Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. Heart 2004; 90: 491-493
- Grimminger F, Spriesterbach R, Weissmann N, Walmrath D, Seeger W. Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs.
 J Appl Physiol 1995; 78: 1509-1515
- 62 Grimminger F, Weissmann N, Spriesterbach R, Becker E, Rosseau S, Seeger W. Effects of NADPH oxidase inhibitors on hypoxic vasoconstriction in bufferperfused rabbit lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1995; 12: L747-L752
- 63 Gupte SA, Kaminski PM, Floyd B, Agarwal R, Ali N, Ahmad M, Edwards J, Wolin MS. Cytosolic NADH may regulate differences in basal Nox oxidasederived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 288: 13-21
- 64 Gurney AM, Osipenko ON, MacMillan D, McFarlane KM, Tate RJ, Kempsill FE. Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. Circ Res 2003; 93: 957–964.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu O, Holbrook NJ. Activation of mitogenactivated protein kinase by H2O2: role in cell survival following oxidant injury. J Biol Chem 1996; 271: 4138–4142
- 66 Guzik TJ, Sadowski J, Kapelak B, Jopek A, Rudzinski P, Pillai R, Korbut R, Channon KM. Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and Nox isoforms in human arteries and veins. Arterioscl Thromb Vasc Biol 2004; 24: 1614-1620
- Hales CA, Kradin RL, Brandstetter RD, Zhu YJ. Impairment of hypoxic pulmonary artery remodeling by heparin in mice. Am Rev Respir Dis 1983; 128: 747-751

- Hanna IR, Hilenski LL, Dikalova AE, Taniyama Y, Dikalov S, Lyle A, Quinn MT, Lassegue B, Griendling KK. Functional association of nox1 with p22phox in vascular smooth muscle cells. Free Radic Biol Med 2004; 37: 1542-1549
- Harder DR, Madden JA, Dawson C. Hypoxic induction of Ca²⁺-dependent action potentials in small pulmonary arteries of the cat. J Appl Physiol 1985; 59: 1389-1393
- 70 Hartung HP, Parnham MJ, Winkelmann J, Englberger W, Hadding U. Platelet activating factor (PAF) induces the oxidative burst in macrophages. Int J Immunopharmacol 1983; 5: 115-121
- 71 Hasunuma K, Rodmann D, McMurtry I. Effects of K⁺-channel blockers on vascular tone in the perfused rat lung. Am Rev Respir Dis 1991; 144: 884-887
- 72 He L, Dinger B, Sanders K, Hoidal J, Obeso A, Stensaas L, Fidone S, Gonzalez C. Effect of p47phox gene deletion on ROS production and oxygen sensing in mouse carotid body chemoreceptor cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 289: 916-924
- 73 Heilig B, Gause A, Staib P, Diehl V. Einführung in die klinische Immunologie. In: Classen, M., V. Diehl and K. Kochsiek (Hrsg.) Innere Medizin. 4. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1998; 435-474
- Hillier SC, Graham JA, Hanger CC, Godbey PS, Glenny RW, Wagner WW Jr.
 Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. J Appl Physiol 1997; 59: 1084-1090
- 75 Hislop A, Reid L. New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxiainduced pulmonary hypertension. Br J Exp Pathol 1976; 57: 542-554
- Hislop A, Reid L. Changes in the pulmonary arteries of the rat during recovery from hypoxia-induced pulmonary hypertension. Br J Exp Pathol 1977; 58: 653-662
- 77 Hohler B, Holzapfel B, Kummer W. NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. Histochem Cell Biol 2000; 114: 29-37
- Hoshi T, Lahiri S. Oxygen Sensing: It's a gas! Science 2004; 306: 2050-2051

- 79 Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, Tanita T, Chida M, Song C, Noda M, Tabata T, Voelkel NF, Fujimura S. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. J Appl Physiol 2001; 90: 1299-1306
- 80 Howell K, Preston RJ, McLoughlin P. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. J Physiol 2003; 547: 133-145
- 81 Hyvelin JM, Howell K, Nichol A, Costello CM, Preston RJ, McLoughlin P. Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. Circ Res 2005; 97: 185-191
- Jacobs ER, Zeldin DC. The lung HETEs (and EETs) up. Am J Physiol Heart
 Circ Physiol 2001; 280: H1-10
- 83 Jones R, Reid L. Vascular remodeling in clinical and experimental hypertensions. In: Bishop JE, Reeves JT, Laurent GJ (editors). Pulmonary Vascular Remodeling. Portland Press Ltd, London 1995: 47-116
- 84 Kalinina N, Agrotis A, Tararak E, Antropova Y, Kanellakis P, Ilyinskaya O, Quinn MT, Smirnov V, Bobik A. Cytochrome b558–dependent NAD(P)H oxidase–phox units in smooth muscle and macrophages of atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 2037-2043
- 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 Lung Cell Mol Physiol 1997; 272: L1167-L1173
- 86 Katsuyama M, Fan C, Yabe-Nishimura C. NADPH oxidase is involved in prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF_{2\alpha}. J Biol Chem 2002; 277: 13438-13442
- 87 Keegan A, Morecroft I, Smilie D, Hicks MN, MacLean MR. Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)receptor antagonist GR127935. Circ Res 2001, 89: 1231-1239
- 88 Kennedy T, Summer W. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by nifedipine. Am J Cardiol 1982; 50: 864-868
- 89 Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, Fukumoto M. NADPH oxidase subunit, gp91phox homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. Gene (Amst.) 2000; 254: 237-243

- 90 Killilea DW, Hester R, Balczon R, Babal P, Gillespie MN. Free radical production in hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 279: L408-L412
- 91 Kovitz KL, Aleskowitch TD, Sylvester JT, Flavahan NA. Endothelium-derived contracting and relaxing factors contribute to hypoxic responses of pulmonary arteries. Am J Physiol 1993; 265: 1139-1148
- 92 Krause KH. Tissue Distribution and Putative Physiological Function of NOX Family NADPH Oxidases. Jpn J Infect Dis 2004; 57: 28-29
- 93 Larsen R. Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie. 6. Auflage. Springer; Berlin, Heidelberg 2005
- 94 Larsen R. Anästhesie. 7. Auflage Springer; Berlin, Heidelberg 2002
- 95 Lassègue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II–induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. Circ Res 2001; 88: 888-894
- 96 Launay JM, Herve P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, Etienne N, Drouet L, Humbert M, Simonneau G, Maroteaux L. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary circulation. Nat Med 2002; 8: 1129-1135
- 97 Leach RM, Robertson TP, Twort CH, Ward JP. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. Am J Physiol 1994; 266: 223-231
- 98 Lee Y, Kim B, Chun Y, So I, Choi H, Kim M, Park J. NOX4 as an oxygen sensor to regulate TASK-1 activity. Cellular Signaling 2006; 18: 499-507
- 99 Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman G. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. J Clin Invest 1988; 82: 2045-2055
- Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. Hypertension 2002; 40: 477-484
- 101 Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, Yang XR, Yip KP, Tse CM, Sham JS. Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca2+ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. Circ Res 2004; 95: 496-505

- 102 Liu JQ, Sham JSK, 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: 322-333
- 103 Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JSK, Folz RJ. Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006; 290: 2-10
- 104 Liu Q, Sham JS, Shimoda LA, Sylvester JT. Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: 856-865
- 105 Louzier V, Raffestin B, Leroux A, Branellec D, Caillaud JM, Levame M, Eddahibi S, Adnot S. Role of VEGF-B in the lung during development of chronic hypoxic pulmonary hypertension. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 284: 926-937
- 106 MacLean M, Sweeney G, Baird M, McCulloch KM, Houslay M, Morecroft I. 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. Br J Pharmacol 1996; 119: 917-930
- 107 Madden JA, Vadula MS, Kurup VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1992; 263: 384-393
- 108 Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. Blood 2005; 105: 659-669
- 109 Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 15: 633-644
- 110 Matsui H, Shimosawa T, Itakura K, Guanqun X, Ando K, Fujita T. Adrenomedullin can protect against pulmonary vascular remodeling induced by hypoxia. Circulation 2004; 109: 2246-2251
- 111 McMurtry IF, Davidson AB, Reeves JT, Grover RF. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. Cir Res 1976; 38: 99-104
- 112 McMurtry IF. Angiotensin is not recquired for hypoxic constriction in salt solution-perfused rat lungs. J Appl Physiol 1984; 56: 375-380

- 113 McMurtry IF. BAY K 8644 potentiates and A23187 inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rat lungs. Am J Physiol 1985, 249: H741-H746
- 114 Meyrick B, Reid L. Endothelial and subintimal changes in rat hilar pulmonary artery during recovery from hypoxia. A quantitative ultrastructural study. Lab Invest 1980; 42: 603-615
- 115 Meyrick B, Reid L. Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall. Am J Pathol 1979; 96: 51-70
- 116 Meyrick B, Reid L. Pulmonary hypertension. Anatomic and physiologic correlates. Clin Chest Med 1983; 4: 199-217
- 117 Mohazzab-H KM, Wolin MS. Properties of superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO₂-sensor. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1994; 11: L823-L831
- 118 Mohazzab-H., KM, Fayngersh RP, Kaminiski PM, Wolin MS. Potential role of NADH oxidoreductase-derived reactive O₂ species in calf pulmonary arterial PO₂-elicited responses. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1995; 269: L637-L644
- 119 Mollnau H, Wendt M, Scöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components if nitric oxidase/cGMP signaling. Circ Res 2002; 90: 58-65
- 120 Monaco JA, Burke-Wolin T. NO and H₂O₂ mechanisms of guanylate cyclase activation in oxygen-dependent responses of rat pulmonary circulation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1995; 268: L546-550
- 121 Morecroft I, Heeley RP, Prentice HM, Kirk A, Maclean MR. 5hydroxytryptoamine receptors mediating contraction in human small pulmonary arteries: importance of the 5-HT1B receptor. Br J Pharmacol 1999; 128: 730-734.
- Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyreodism. N Engl J Med 2002; 347: 95-102

- 123 Nagaoka T, Gebb SA, Karoor V, Homma N, Morris KG, McMurtry IF, Oka M. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in pulmonary hypertension of the fawn-hooded rat. J Appl Physiol 2006; 100: 996-1002
- 124 Ng LC, Gurney AM. Store-operated channels mediate Ca2+ influx and contraction in rat pulmonary artery. Circ Res 2001; 89: 923-929
- 125 Oczenski W. Hypoxische pulmonale Vasikonstriktion (HPV). In: Oczenski W, Andel H, Werba A. Atmen – Atemhilfen. Atemphysiologie und Beatmungstechnik. 7. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2006; 68-69
- 126 Oczenski W. Verteilung der Lungendurchblutung. In: Oczenski W, Andel H,
 Werba A. Atmen Atemhilfen. Atemphysiologie und Beatmungstechnik. 7.
 Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2006; 58-61
- Ogawa S, Clauss M, Kuwabara K, Shreeniwas R, Butura C, Koga S, Stern D.
 Hypoxia induces endothelial cell synthesis of membrane-associated proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 9897-9901
- 128 Olschewski A, Hong Z, Nelson DP, Weir EK. Graded response of K⁺ current, membrane potential, and [Ca2⁺]_i to hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 283: 1143-1150
- 129 Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir EK, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W, Olschewski H. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. Circ Res 2006; 98:1072-1080
- 130 Olschewski H, Seeger W. Pulmonale Hypertonie. Pathophysiologie, allgemeine Maßnahmen und Entwicklung einer pulmonal selektiven Therapie.
 1. Auflage. UNI-MED, Bremen, London, Boston 2000
- 131 Ono S, Westcott JY, Voelkel NF. PAF antagonists inhibit pulmonary vascular remodeling induced hypobaric hypoxia in rats. J Appl Physiol 1992;
 73: 1084-1092
- 132 Paky A, Michael JR, Burke-Wolin T, Wolin MS, Gurtner GH. Endogenous production of superoxide by rabbit lungs: effects of hypoxia or metabolic inhibitors. J Appl Physiol 1993 74: 2868-2874
- 133 Paravicini TM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. Circ Res 2002; 91: 54-61

- 134 Partovian C, Adnot S, Raffestin B, Louzier V, Levame M, Mavier IM, Lemarchand P, Eddahibi S. Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23: 762-771
- 135 Pascaud MA, Griscelli F, Raoul W, Marcos E, Opolon P, Raffestin B, Perricaudet M, Adnot S, Eddahibi S. Lung overexpression of angiostatin aggravates pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 29: 449-457
- Peiper U. Muskulatur. In: Klinke R, Silbernagl S. (Hrsg.) Lehrbuch der Physiologie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1996; 79-104
- 137 PE Applied Biosystems. User Bulletin # 2. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. December 11, 1997
- 138 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: 449-457
- 139 Petrides PE. Blut. In: Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie.5. Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1997; 878-947
- 140 Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Am J Physiol Cell Physiol 1992; 262: C882-C890
- 141 Prabhakar NR. Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. J Appl Physiol 2000; 88: 2287-2295
- 142 Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix.Clin Chest Med 2001; 22: 433-449
- 143 Redding GJ, Tuck R, Escourrou P. Nifedipine attenuates hypoxic pulmonary vasoconstriction in awake piglets. Am Rev Respir Dis 1984; 129: 785-789
- 144 Reeve HL, Michelakis E, Nelson DP, Weir EK, Archer SL. Alterations in a redox oxygen sensing mechanism in chronic hypoxia. J Appl Physiol 2001; 90: 2249-2256
- 145 Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL, Pagano PJ. Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: Role of gp91 (phox). Circulation 2002; 106: 2497-2502

- 146 Rey FE, Pagano PJ. The Reactive Adventitia: Fibroblast oxidase in vascular function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 1962-1971
- 147 Robertson TP, Aaronson PI, Ward JPT. Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca2+ in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca2+ sensitization. Am J Physiol 1995; 268: H301-H307.
- 148 Robertson TP, Dipp M, Ward JP, Aaronson PI, Evans AM. Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. Br J Pharmacol 2000; 131: 5-9
- 149 Roitt I. Essential Immunology. 9. Edition. Blackwell Science Ltd 1997
- 150 Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski H-D, Schutheiss H-P, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. Chest 2001; 120: 1562-1569.
- 151 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 hydroxymethyglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. Circulation 2001; 104: 1767-1772
- 152 Salvaterra C, Goldman W. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1993; 264: 323-328
- 153 Scheid P. Atmung. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.) Lehrbuch der Physiologie.2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1996; 213-268
- 154 Semenza GL. HIF-1, O2, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. Cell 2001; 107:1-3
- 155 Sham JS, Crenshaw BR, Deng LH, Shimoda LA, Sylvester JT. Effects of hypoxia in porcine pulmonary arterial myocytes: roles of K_V- channel and endothelin-1. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 279: 262-272
- 156 Shimoda LA, Manalo DJ, Sham JS, Semenza GL, Sylvester JT. Partial HIF-1α deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L202-L208
- 157 Shimoda LA, Sham JS, Sylvester JT. Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung. Physiol Res 2000; 49: 549-560

- 158 Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H. A novel superoxide–producing NAD(P)H oxidase in kidney. J Biol Chem 2001 276: 1417-1423
- 159 Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Scocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, VegaJD, Taylor WR, Griendling KK. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. Circulation 2002; 105: 1429-1435
- 160 Souza HP, Laurindo FR, Ziegelstein RC, Berlowitz CO, Zweier JL. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. Am J Physiol eart Circ Physiol 2001; 280: 658-667
- 161 Staub NC. Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. Chest 1985; 88: 240S-245S
- 162 Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced Pulmonary Vascular Remodeling: Cellular and Molecular Mechanisms. Circ Res 2006; 99: 675-691
- 163 Stenmark KR, McMurtry IF. Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: a time for reappraisal? Circ Res 2005; 97: 95-98
- 164 Stenmark KR, Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. Annu Rev Physiol 1997; 59: 89-144
- 165 Steudel W, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Weimann J, Huang PL, Jones RC, Picard MH, Zapol WM. Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. J Clin Invest 1998; 101: 2468-2477
- 166 Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? Ann Intern Med 1991; 114: 464-469.
- 167 Strukova S. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulationdependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. Front Biosci 2006 11: 59-80
- 168 Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xiangxi X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature 1999; 401: 79-82

- 169 Szöcs K, Lassègue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 21-27
- 170 Ten VS, Pinsky DJ. Endothelial response to hypoxia: physiologic adaptation and pathologic dysfunction. Curr Opin Crit Care 2002; 8: 242–250
- 171 Thomas HM III, Carson RC, Fried ED, Novitch RS. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by diphenyleneiodonium. Biochem Pharmacol 1991; 42: R9-R12
- 172 Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, van de Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. J Exp Med 2004; 200: 1395-1405
- 173 Tolins M, Weir EK, Chesler E, Nelson DP, From AH. Pulmonary vascular tone is increased by a voltage-dependent calcium channel potentiator. J Appl Physiol 1986; 60: 942-948
- 174 Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: Regulation by angiotensin II. Circ Res 2002; 90: 1205-1213
- 175 Ushio-Fukai M, Zafari AN, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1996; 271: 317-321
- 176 Van Heerebeek L, Meischl C, Stooker W, Meijer CJLM, Niessen HWM, RoosD. NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? J Clin Pathol 2002; 55: 561-568
- 177 van Suylen RJ, Smits JF, Daemen MJ. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1423-1428
- 178 Vejlstrup NG, Dorrington KL. Intense slow hypoxic pulmonary vasoconstriction in gas-filled and liquid-filled lungs: an in vivo study in the rabbit. Acta Physiol Scand 1993; 148: 305-313
- 179 Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. Cell Mol Life Sci 2002; 59: 1428-1459

- 180 Vilhardt F, Plastre O, Sawada M, Suzuki K, Wiznerowicz M, Kiyokawa E, Trono D, Krause KH.x The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. J Biol Chem 2003; 277: 42136-42143
- 181 Von Euler US, Liljestrand G. Observations on the pulmonary artery blood pressure in the cat. Acta Physiol Scand 1946; 12: 301-320
- 182 Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. In: Matthys H, Seeger W (Hrsg.).Klinische Pneumologie. 3. Auflage. Springer, Berlin 2006
- 183 Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. Erkrankungen des Lungenkreislaufs.
 In: Classen, M., V. Diehl, K. Kochsiek (Hrsg.) Innere Medizin. 4. Auflage.
 Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore 1998; 1369-1490
- 184 Wang GL, Jiang BH, Rue E, Semenza GL. Hypoxiainducible factor 1 is a basic-helix–loop– helix–PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 5510-5514
- 185 Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxiainducible factor 1. J Biol Chem 1995; 270: 1230-1237
- 186 Wang J, Shimoda LA, Weigand L, Wang W, Sun D, Sylvester JT. Acute hypoxia increases intracellular [Ca2+] in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca2+ entry. Am J Physiol 2005; 288: L1059-L1069
- 187 Wang J, Weigand I, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. Circ Res 2006; 98: 1528-1537
- 188 Wang Z, Lannér MC, Jin N, Swartz D, Li L, Rhoades RA. Hypoxia inhibits myosin phosphatase in pulmonary arterial smooth muscle cells. Role of Rhokinase. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 29: 465-471
- 189 Wanstall JC, Gambino A, Jeffery TK, Cahill MM, Bellomo D, Hayward NK, Kay GF. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. Cardiovasc Res 2002; 55: 361-368
- 190 Ward JP, Robertson TP. The role of the endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Exp Physiol 1995; 80: 793-801
- 191 Ward JP, Knock GA, Snetkov VA, Aaronson PI. Protein kinases in vascular smooth muscle tone - role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction. Pharmacol Ther 2004; 104: 207-231

- 192 Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypocix pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. Circ Res 2001; 88: 1259-1266
- 193 Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. Circ Res 2002; 91: 719-726
- 194 Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. J Appl Phys 2005: 98: 404-414
- 195 Weir EK, Olschewski A. Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia. Cardiovasc Res 2006; 71: 630-641
- 196 Weissmann N, Grimminger F, Voswinckel R, Conzen J, Seeger W. Nitro blue tetrazolium inhibits but does not mimic hypoxic vasoconstriction in isolated rabbit lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1998; 274: L721-L727
- 197 Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. Respir Physiol 1995; 100: 159-169
- 198 Weissmann N, Seeger W, Conzen J, Kiss L, Grimminger F. Effects of arachidonic acid metabolism on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. Eur J Pharmacol 1998; 356: 231-237
- 199 Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Cardiovasc Res 2006; 71: 620-629
- 200 Weissmann N, Tadic A, Hänze J, Rose F, Winterhalder S, Nollen M, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H₂O₂? Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 279: L683-L690
- 201 Weissmann N, Voswinckel R, Tadic A, Hardebusch T, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F. Nitric oxide (NO)-dependent but not NO-independent guanylate cyclase activation attenuates hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23: 222-227
- 202 Weissmann N, Winterhalder S, Nollen M, Voswinckel R, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F. NO and reactive oxygen species are involved in biphasic hypoxic vasoconstriction of isolated rabbit lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 280: 638-645

- 203 Welling KL, Sanchez R, Ravn JB, Larsen B, Amtorp O. Effect of prolonged alveolar hypoxia on pulmonary arterial pressure and segmental vascular resistance. J Appl Physiol 75: 1194-1200
- 204 Wendt MC, Daiber A, Kleschyov AL, Mulsch A, Sydow K, Schulz E, Chen K, Keany JF Jr, Lassegue B, Walter U, Griendling KK, Munzel T. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. Free Radic Biol Med 2005; 39: 381-391
- 205 Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression. FASEB J 2002; 16: 1151-1162
- 206 Wiener CM, Sylvester JT. Effects of glucose on hypoxic vasoconstriction in isolated ferret lungs. J Appl Physiol 1991; 70: 439-446
- 207 Williams SEJ, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, Kemp PJ. Hemoxygenase-2 Is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. Science 2004; 306: 2093-2097
- 208 Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. Free Radic Biol Med 2001; 31: 1456-1464
- 209 Wojciak-Stothard B, Tsang LYF, Paleolog E, Hall SM, Haworth SG. Rac1 and RhoA as regulators of endothelial phenotype and barrier function in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006; 290: 1173-1182
- 210 Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. J Clin Invest 1999; 103: 691-696
- 211 Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Inhibition of cytochrome P-450 reduces voltage-gated K+ currents in pulmonary arterial myocytes. Am J Physiol 1995; 268: 259-270
- 212 Yuan XJ., Goldmann WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. Am J Physiol 1993; 264: 116-123

- Zekry D, Epperson TK, Krause KH. A role for NOX NADPH oxidases in
 Alzheimer's disease and other types of dementia? IUBMB Life 2003; 55: 307-313
- 214 Zhang F, Carson RC, Zhang H, Gibson G, Thomas HM 3rd. Pulmonary artery smooth muscle cell [Ca2⁺]_i and contraction: responses to diphenyleneiodonium and hypoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1997; 273: 603-611
- 215 Zhu D, Birks EK, Dawson CA, Patel M, Falck JR, Presberg K, Roman RJ Jacobs ER. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is modified by P-450 metabolites. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 279: 1526-1533

Anhang

Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

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, Hanze 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: 258-267

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Lebenslauf

Anne-Christine Selbitz, geb. Scherer geb. am 15.11.1976 in Saarbrücken verheiratet

Schulische Ausbildung

1993 – 1994	South High School, Minneapolis, USA
1996	Allgemeine Hochschulreife am Arnold-Janssen-
	Gymnasium St. Wendel

Akademische Ausbildung

1996 – 2002	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig- Universität Gießen
2000	Beginn der vorliegenden Arbeit
2002 – 2003	Praktisches Jahr an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz - Klinikum Kemperhof Koblenz und an der Universi- tät Bern - Regionalspital Emmental Burgdorf
2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004	Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

06/2003 – 07/2006	Ärztin im Praktikum/Assistenzärztin der Abteilung für
	Anästhesie und Intensivmedizin am Katholischen Klinikum
	Marienhof/St. Josef in Koblenz, Chefärzte Dr. med. R.
	Bilden und PD Dr. med. M. Silomon

08/2006 - 03/2008	Assistenzärztin der Klinik für Anästhesiologie und
	operative Intensivmedizin am Helios Klinikum Siegburg,
	Chefarzt PD Dr. med. B. Zickmann
seit 01/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Experimen-
	telle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universi-
	tätsklinikums Bonn, Direktor Prof. Dr. med. J. Oldenburg

Danksagung

Der tierexperimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Mai bis August 2000 im Labor Seltersberg (Haus C) der Medizinischen Klinik II (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Norbert Weissmann) durchgeführt. Die molekularbiologischen Untersuchungen fanden zwischen August 2000 und April 2002 im molekularbiologischen Labor der Medizinischen Klinik II (Arbeitsgruppe PD Dr. Jörg Hänze) statt.

Mein Dank gilt dem Direktor der Medizinischen Klinik II, Herrn Prof. Dr. Werner Seeger, der mir diese wissenschaftliche Arbeit ermöglichte.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. Jörg Hänze für die Themenstellung sowie seine hervorragende und engagierte Betreuung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herzlicher Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Norbert Weißmann, der mich vor allem während des tierexperimentellen Teiles ausgezeichnet unterstützte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn PD Dr. Ludger Fink möchte ich für die fruchtbaren Gespräche und Anregungen danken.

Herrn Dr. Matthias Nollen und Frau Dr. Nadine Ebert sei für ihre wertvollen Hinweise und die praktische Einarbeitung in die Hypoxieversuche und die Methoden der Lungenpräparation gedankt.

Besonderer Dank gilt auch Frau Christiane Hild, Frau Karin Quanz und Frau Marlene Stein, die mich in der praktischen Durchführung der Arbeit unterstützten.

Bei Frau Dr. Anne Schulze vom Veterinär-Anatomischen Institut der Universität Leipzig bedanke ich mich für die Bilder zur Anatomie der Kaninchenlunge.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinem Mann für ihre Unterstützung und die motivierenden Gespräche.