

**Molekulare, durch NoxO1-Defizienz induzierte  
Regenerationsmechanismen eines Zigarettenrauch-induzierten  
Lungenemphysems und einer pulmonalen Hypertonie im  
Mausmodell**

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

vorgelegt von **Yan Peng Zhao**  
aus Erlenbach am Main

Gießen 2021

---

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik II,  
Excellence Cluster Cardio-Pulmonary Institute (CPI)

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Gutachter: PD Dr. Pöling

Tag der Disputation:  
09.12.2021

---

## Erklärung zur Dissertation

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	7
1.1.1 Definition .....	7
1.1.2 Epidemiologie .....	9
1.1.3 Risikofaktoren .....	10
1.1.4 Pathophysiologie .....	12
1.1.5 Lungenentwicklung und -regeneration.....	18
1.2 NADPH-Oxidasen.....	20
1.2.1 Die NADPH-Oxidasen-Familie .....	20
1.2.2 NoxO1 als Regulator der NADPH-Oxidasen.....	22
1.3 Vorarbeiten.....	23
1.3.1 NoxO1-Depletionsfähigkeit mithilfe des Cre/loxP-Systems und Rauch-induziertes Emphysem .....	23
1.3.2 Reversibilität der COPD bei iNOS-Hemmung, Riociguat als Prävention.....	26
1.3.3 Resistenz gegen COPD bei Fehlen von NoxO1 .....	26
1.3.4 Daten aus physiologischen Versuchen.....	27
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....	28
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.1 Material .....	30
2.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	30
2.1.2 Benutzte Antikörper für Western Blot Analyse .....	30
2.1.3 Geräte und Software für Histologie .....	31
2.1.4 Verbrauchsmaterialien für Histologie .....	31
2.1.5 Kits / Chemikalien für Histologie .....	31
2.1.6 Antikörper für Immunfärbung.....	32
2.1.7 Geräte und Software für Proteinextraktion, Proteinkonzentrationsbestimmung, SDS-PAGE und Western Blot.....	33
2.1.8 Verbrauchsmaterialien für Proteinextraktion, Proteinkonzentrationsbestimmung, SDS-PAGE und Western Blot.....	33
2.1.9 Kits/ Chemikalien für Proteinextraktion, Proteinkonzentrationsbestimmung, SDS-PAGE und Western Blot.....	33
2.1.10 Geräte und Software für RNA-Isolierung, cDNA Transkription und Real-Time PCR	34

2.1.11	Verbrauchsmaterialien für RNA-Isolierung, cDNA Transkription und Real-Time PCR.....	35
2.1.12	Kits/ Chemikalien für RNA-Isolierung, cDNA Transkription und Real-Time PCR	35
2.1.13	Primer für Real-Time PCR.....	35
2.1.14	Geräte und Verbrauchsmaterialien für Lasermikrodissektion .....	37
2.1.15	Geräte, Software und Chemikalien für Mikroarray Analyse .....	37
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Histologie .....	38
2.2.2	Proteinanalyse .....	43
2.2.3	DNA-Microarray Analyse.....	45
2.2.4	RNA-Analyse.....	47
2.2.5	Statistische Analyse.....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
3.1	Histologische Validierung der Lungen-Regeneration durch post-Rauch-induzierte NoxO1-Defizienz .....	50
3.1.1	Emphysemrückbildung in NoxO1-defizienten Mäusen.....	50
3.1.2	Regeneration in Wandstärke und Muskularisierungsgrad der Lungengefäße bei NoxO1-defizienten Mäusen nach vorher bestehender pulmonaler Hypertonie .....	51
3.2	Untersuchung der NoxO1 Protein- und mRNA-Menge nach KO-Induktion .	53
3.3	Untersuchung der molekularen Regenerations-Vorgänge .....	54
3.3.1	Veränderung der Proteinexpression von Nitrotyrosin, MMP9, TIMP3 und FGF10 nach Tamoxifen-induzierter NoxO1-Defizienz .....	54
3.3.2	Genexpressionistischer Effekt der Lungenregeneration durch NoxO1-Defizienz	56
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
4.1	Wahl des Modells „Zigarettenrauch-exponierte Maus“ und seine Vergleichbarkeit zur COPD des Menschen .....	69
4.2	Das Tamoxifen-induzierbare NoxO1-KO Mausmodell und seine Limitationen	71
4.3	Validierung des durchgeführten NoxO1-Knockouts durch Tamoxifengabe ..	72
4.4	NoxO1-KO nach Zigarettenrauch führt zu Verminderung der Rechtsherzbelastung und Lungencompliance .....	72
4.5	Histologische Bestätigung der Veränderung der Lungenmorphologie im Sinne einer potenziellen Regeneration nach NoxO1 <i>Knockout</i> post-Rauch .....	73
4.6	Exploration der molekularbiologischen Effekte einer NoxO1-KO-Induktion nach Rauchexposition .....	75
4.6.1	Regulation von NADPH-Oxidasen Untereinheiten und Nitrotyrosinbildung.	75
4.6.2	qPCR Ergebnisse bestätigen Effekte der KO-Fähigkeit und Effekte eines NoxO1-KOs ohne Interaktion mit Zigarettenrauchwirkung .....	76
4.6.3	Matrix-Metalloproteasen, ein potenzieller Angriffspunkt der NoxO1-KO-Induktion nach Rauchexposition.....	77
4.6.4	FGF10 als mögliches Schlüsselprotein der Lungen-Regeneration .....	78

---

4.6.5	Lungenkompartimente im Vergleich .....	78
<b>5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>114</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>122</b>
<b>13</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>123</b>

---

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Adrbk2	<i>G-protein-coupled receptor kinase 3</i>
AEC	<i>Alveolar Epithelial Cells</i>
ATII	Typ 2 Pneumozyten
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BOLD	<i>Burden of Obstructive Lung Diseases</i>
bp	<i>Base pairs</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAT	<i>COPD assessment test</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
Ccna1	Cyclin A1
CD68	<i>Cluster of differentiation 68</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
Cdk2	<i>Cyclin dependant Kinase 2</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
COX	Cyclooxygenase
Cre	<i>Cyclization recombinase</i>
CSF2	<i>Colony-stimulating factor 2</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DALY	<i>Disability Adjusted Life Year</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Duox	<i>Dual oxidase</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
eNOS	<i>Endothelial NO-Synthase</i>
ER	<i>Estrogene receptor</i>
et al.	Und andere
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FEV <sub>1</sub>	Expiratorische Einsekundenkapazität
FGF10	<i>Fibroblast growth factor 10</i>
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GADD45α	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible protein alpha</i>
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDAC2	Histondeacetylase 2
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hg.	Herausgeber
HHIP	<i>Hedgehog interacting protein</i>

---

HO1	Hämoxygenase 1
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
iNOS	<i>Inducible NO-Synthase</i>
KANSL1	<i>KAT8 regulatory NSL Komplexe</i>
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	<i>Knockout</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat
loxP	<i>Locus of X-over P1</i>
LV	Linker Ventrikel
m	Meter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
miRNA	MicroRNA
Mki67	<i>Proliferation marker protein Ki-67</i>
mL	Milliliter
MLI	<i>Mean linear intercept</i>
mM	Millimolar
MMP12	Matrixmetalloprotease 12
MMP9	Matrixmetalloprotease 9
mMRC	<i>Modified British Medical Research Council</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Reduzierte Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEP	Neprilysin
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
Nox	NADPH Oxidase
NoxA1	<i>NADPH Oxidase Aktivator 1</i>
NoxO1	<i>NADPH Oxidase Organisier 1</i>
Nrf2	<i>Nuclear erythroid 2-related factor 2</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
OH	Hydroxyl-
Olf47	<i>Olfactory receptor 47</i>
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAH	Pulmonal arterielle Hypertonie
PH	Pulmonale Hypertonie
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
Pde1c	<i>Calcium/calmodulin-dependent-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C</i>
PEN	<i>Polyethylene naphthalate</i>
phox	phagocytic oxidase
Prkg2	<i>Protein kinase cGMP-dependent 2</i>

---

RAC	<i>Rho-like small GTPase</i>
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpl32	<i>Ribosomal protein L32</i>
rpm	Rounds per minute
RV	Rechter Ventrikel
RVID	Innendurchmesser des rechten Ventrikels
RVSP	Rechtsventrikulärer systolischer Druck
s	Sekunden
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SE	<i>Smoke exposure</i>
SOD	Superoxiddismutase
SPIA	<i>Single primer isothermal amplification</i>
SPP1	Osteopontin
Tam	Tamoxifen
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tx	<i>Tamoxifen knockout</i>
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	Vergleiche
Vol.	Volumen
vWF	Von Willebrand Faktor
W	Watt
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
z.B	Zum Beispiel

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

### 1.1.1 Definition

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (englisch: *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, COPD) ist eine Erkrankung, die durch eine progressive Limitation des Atemstroms charakterisiert ist. Sie ist assoziiert mit einer abnormalen Entzündungsreaktion gegenüber Zigarettenrauch, anderen toxischen Gasen oder Partikeln [2]. Die pulmonale Schädigung geschieht dabei einerseits durch Entzündungen der Bronchiolen mit begleitender Fibrosierung (obstruktive Bronchiolitis, *small airway disease*) und andererseits durch irreversibler Emphysembildung mit Destruktion des Parenchymgewebe und Vergrößerung des Totraumvolumens [1, 3]. Die Ausprägung der Erkrankung zeigt sich klinisch in verschiedenen Phänotypen. Während manche COPD-Patienten überwiegend eine obstruktive Bronchiolitis erleiden, ist die Emphysembildung bei anderen stärker ausgeprägt. Weiterhin gibt es Unterschiede im Erkrankungsalter, Exazerbationshäufigkeiten und assoziierte Komorbiditäten [4]. Atemstromveränderungen im Rahmen der Erkrankung werden klinisch spirometrisch erfasst, wobei bei jedem Patienten mit chronischem Husten, Dyspnoe und Auswurf in Kombination mit Risikofaktoren, allen voraus das Zigarettenrauchen, an eine COPD zu denken ist. Eine relative Einsekundenkapazität ( $FEV_1/FVC$ ) von unter 0,70 nach Bronchodilatatorgabe bestätigt eine irreversible Atemwegsobstruktion, *ergo* eine COPD [5]. Die Lungenfunktionsveränderungen werden hierbei durch Entzündungen und Verengungen der Bronchiolen im Rahmen des *small airway diseases* verursacht [6]. Parenchymale Schädigung durch Emphysembildung trägt ebenfalls zu Lungenfunktionsveränderungen und vermindertem Gasaustausch bei. Weiterhin werden Verluste von kleinen Atemwege für die Veränderungen des Atemstroms verantwortlich gemacht [7].

Begleitend treten bei COPD Patienten chronischer Husten durch vermehrte Schleimproduktion gemeinsam mit verminderter mukoziliäre Clearance und endothelialer Barrierestörung auf [8]. Zwar ist die Schleimbildung nicht zwangsläufig mit der Atemobstruktionsverschlechterung vergesellschaftet, jedoch steigt bei der erhöhten

Schleimproduktion das Risiko einer Verschlechterung der Lungenfunktion und Anzahl der Exazerbationen erheblich [5, 9]. Die Patienten entwickeln im späteren Krankheitsverlauf ein irreversibles Lungenemphysem, welches eine Zerstörung des Parenchyms darstellt. Vermittelt wird dies durch diverse Entzündungsmediatoren, ausgeschüttet von Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten [10, 11]. Zwar wird die Emphysembildung und die chronische Bronchitis von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der *Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) nicht mehr als Teil der Definition der COPD gerechnet, doch tragen diese Komorbiditäten erheblich zur Verschlechterung der Erkrankung bei [2, 5, 12]. Eine weitere Komplikation im späten Verlauf der Erkrankung ist die pulmonale Hypertonie. Diese entsteht hauptsächlich durch hypoxische Vasokonstriktion der kleinen Pulmonalarterien, welche eine Intimahyperplasie und Entzündungsreaktionen der Gefäße, sowie endotheliale Dysfunktion verursachen [13]. Sie wird definiert als ein mittlerer pulmonalarterieller Druck von über 20 mmHg [14]. Fortschreitende pulmonale Hypertonie kann zu einer Rechtsherzhypertrophie und final zu Rechtsherzversagen führen [15]. Neueste Untersuchungen zeigen, dass ein PH dem Lungenemphysem vorausgehen und pulmonalvaskuläre Veränderungen möglicherweise das Lungenemphysem auslösen kann [16, 17]. Weiterhin korreliert der Grad des pulmonalen

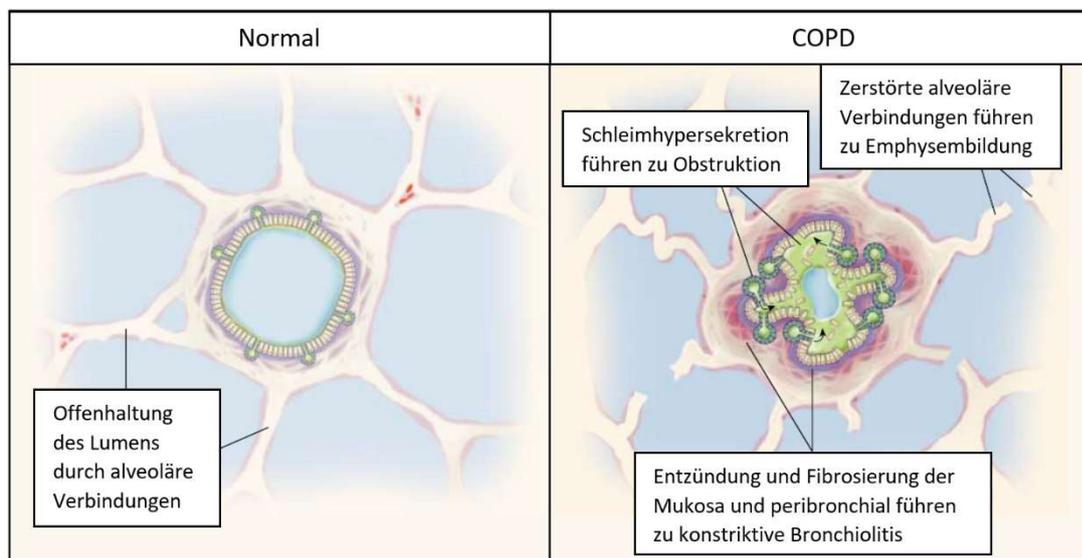


Abbildung 1-1: Mechanismen der pulmonalen Beeinflussung von COPD. Modifiziert nach Barnes, 2000 [1]

Hochdruckes, gemessen anhand der Pulmonalarteriendurchmesser, mit dem Risiko einer Exazerbation [18]. Dies suggeriert eine wichtige Rolle des Lungenhochdruckes bei der Progression des COPDs.

Die *Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) teilt anhand von FEV<sub>1</sub>-Werten die Einschränkung der Lungenfunktion in vier Stadien ein (GOLD 1-4). Die Spirometrie stellt ein einfaches und ubiquitär vorhandenes Diagnostikum dar und ist gemäß GOLD geeignet zur Diagnosestellung. Im 2018 Report empfiehlt GOLD erstmalig die Therapieentscheidung anhand von Symptomen (anhand des *Modified British Medical Research Council* (mMRC) *Questionnaire* oder des *COPD Assessment Test* (CAT) [19, 20]) und der Anzahl der Exazerbationen zu treffen, wobei Patienten in einer Vierfeldertafel in GOLD Gruppe A-D nochmals eingeteilt werden [5, 21]. Diese Einteilung ermöglicht eine differenzierte Therapieentscheidung, vor allem zwischen Patienten mit ähnlicher Erkrankungsschwere, aber unterschiedlicher Symptomausprägung.

<b>GOLD 1</b>	>80% des Sollwertes
<b>GOLD 2</b>	50-79% des Sollwertes
<b>GOLD 3</b>	30-49% des Sollwertes
<b>GOLD 4</b>	<30% des Sollwertes

Tabelle 1-1: Schweregrad der COPD anhand von FEV<sub>1</sub>-Werten der Patienten in der Spirometrie, GOLD Report, 2018 [5]

	Wenige Symptome	Vermehrte Symptome
0-1 Exazerbationen/Jahr	<b>A</b>	<b>B</b>
>2 Exazerbationen/Jahr	<b>C</b>	<b>D</b>

Tabelle 1-2: Einteilung der Patienten nach Anzahl der Exazerbationen und Symptomschwere (wenig: CAT<10, mMRC 0-1; vermehrt: CAT≥10, mMRC≥2), GOLD Report, 2018 [5]

### 1.1.2 Epidemiologie

COPD geht weltweit mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher und wird mit zunehmender Inzidenz durch die steigende Lebenserwartung und dem steigenden Zigarettenkonsum voraussichtlich 2030 die vierthäufigste Todesursache weltweit sein. Das *Burden of Obstructive Lung Diseases* (BOLD) Programm schätzt, dass vor allem in Ländern mit mittleren Einkommen die COPD mit einem Todesursachenanteil von 12% eine erhebliche Rolle spielen wird [22, 23]. Die Prävalenz der Erkrankung in Deutschland lag 2008 bei 13,2%, wobei milde Stadien der Erkrankung überwogen. Sie korrelierte mit steigendem Alter und Zigarettenkonsum, sodass auch in Deutschland eine steigende Inzidenz zu erwarten ist [24]. In Ländern mit hohem Einkommen ist COPD die

---

chronische Erkrankung mit der größten Mortalitätssteigerung, zum Beispiel verdoppelte sich die Sterberate an COPD in der USA von 1970 bis 2002 [25].

Des Weiteren stellt COPD eine erhebliche wirtschaftliche Belastung dar. Es wird geschätzt, dass circa 6% des Budgets des Gesundheitswesens in der Europäischen Union direkt für Krankheiten des respiratorischen Systems ausgegeben wird, wobei COPD 56% ausmacht [5]. Mit steigender Erkrankungsschwere steigen ebenfalls direkte Kosten, wobei akute Exazerbationen den größten Anteil der Kosten ausmachen [26]. Indirekte Kosten der Erkrankung lassen sich nur schwer quantifizieren, doch ist davon auszugehen, dass sie eine erhebliche wirtschaftliche Belastung darstellt. Die *Disability-Adjusted Life Year* (DALY) ist ein Maß, welches verlorene Lebensjahre anhand von Behinderungen adjustiert um soziologisch Krankheiten besser zu bewerten [27]. COPD steht an fünfter Stelle in Ländern mit hohem Einkommen bezogen auf DALY Verluste, mit steigender Tendenz [28]. In der USA war 2010 COPD der zweithäufigste Grund für Verluste von DALY, nur übertroffen von ischämischen Herzerkrankungen [29].

### **1.1.3 Risikofaktoren**

#### **1.1.3.1 Tabakrauch**

Es ist bekannt, dass Tabakrauch der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung der COPD ist [5]. Das komplexe Gas-/Partikelgemisch des Tabakrauches besteht aus mehr als 6000 Substanzen [30]. Enthaltene Radikale und Oxidantien spielen eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung, allen voran Kohlenstoffmonoxid (CO) als wichtigste Oxidantien [30, 31]. Es wird geschätzt, dass 4,9 Millionen Menschen jährlich an den Folgen des Tabakkonsums versterben. Hauptursache sind hier kardiovaskuläre und pulmonale Erkrankungen [2]. Die Entstehung der COPD steht im linearen Zusammenhang zur Rauchdauer der Patienten, wobei eine Einstellung des Rauchens von zehn Jahren oder länger mit einer erniedrigten Prävalenz der Erkrankung einhergeht [32]. Da lediglich 10-20% aller Raucher eine COPD entwickeln, wird postuliert, dass COPD ein amplifizierender Prozess der Entzündungsreaktion auf Rauch darstellt und weitere Risikofaktoren eine Rolle in der Genese spielen [33]. Vermehrte Hinweise deuten ebenfalls auf ein erhöhtes Krankheitsrisiko beim passiven Tabakrauch bei Patienten mit leerer Raucheranamnese [34–36].

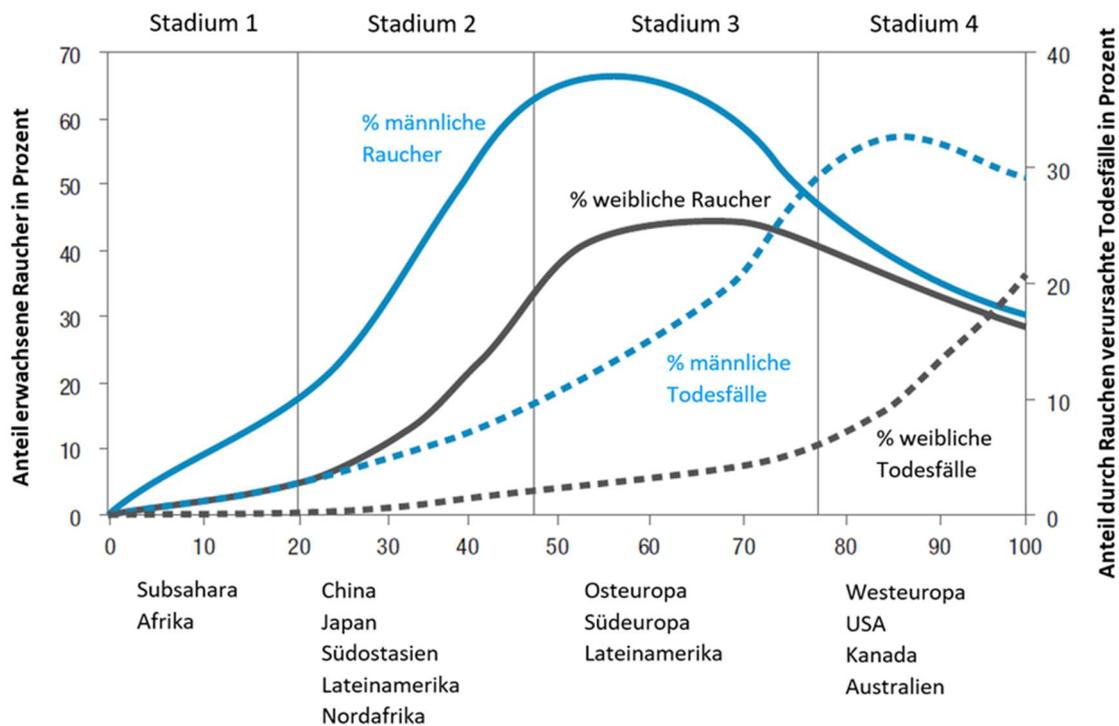


Abbildung 1-2: Vier Stadien der Tabakrauch-Epidemie, zu erkennen ist die Latenzzeit zwischen dem Anstieg der Raucheranzahl und der Rauch-bedingten Todesfälle. Modifiziert nach Bousquet (Hg.), 2007 [2]

### 1.1.3.2 Luftverschmutzung und berufliche Belastung

Luftverschmutzung durch Benutzung von Festbrennstoffen im Innenraum, Verschmutzung der Außenluft und berufliche Exposition toxischer Gase und Partikel sind stark mit der Entstehung von COPD assoziiert [37–39]. Innenluftverschmutzungen entstehen hauptsächlich durch inkomplettes Verbrennen von Festbrennstoffen und betreffen hauptsächlich Frauen und Kinder in Länder mit niedrigen oder mittleren Einkommen [40, 41]. Es wird geschätzt, dass bis zum Jahre 2030 Raumluftverschmutzung im Haushalt für 9,8 Millionen vorzeitige Todesfälle verantwortlich sein wird [42]. Verschmutzungen der Außenluft führen zwar nicht zu einer starken Erkrankungsausprägung, doch ist sie mit deutlicher FEV<sub>1</sub>-Verschlechterung assoziiert und trägt ebenfalls unmittelbar zur Genese bei [43–46]. Sie verursacht vermehrt akute Symptome und erhöht ebenso die Mortalität bei bestehendem COPD [47]. Berufliche Belastungen machen schätzungsweise 13% aller COPD aus und verursachten im Jahre 2000 rund 3,7 Millionen DALY-Verluste [2, 48]. Da die Erkrankung erst mit einer langen Latenz entsteht, werden berufliche Faktoren erheblich unterschätzt.

---

### 1.1.3.3 Genetische Faktoren

Mögliche genetische Faktoren sind Teil eines großen Forschungsgebietes der COPD. Eine familiäre Häufung ist bei der *early-onset* COPD zu beobachten und deutet auf eine mögliche genetische Prädisposition der Erkrankung hin [49, 50].

$\alpha_1$ -Antitrypsin gilt als protektiver Faktor, dessen Mangel, im Rahmen einer genetischen Erkrankung, eine COPD prädisponiert. Die autosomal kodominant vererbte Erkrankung geht mit einem *loss-of-function* Defekt des Serinproteaseinhibitors einher, welches ein Lungenemphysem begünstigt. Durch fehlende Protektion gegen elastolytische Prozesse, erkranken Patienten frühzeitig und häufig ohne vorherigen Tabakkonsum [51]. Polymorphismen verschiedener Gene wurden mit einer Risikoerhöhung der COPD assoziiert. Mitunter spielen Gene der Matrixmetalloproteasen MMP12 und des Hedgehog-Signalwegs HHIP eine Rolle [52, 53]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Hämoxxygenase (HO1) protektiv gegen oxidativen Stress in der Lunge wirkt [54]. Dinukleotidpolymorphismen von HO1 wurden in zwei Studien als Faktor postuliert und untersucht. Allerdings ergaben beide Studien unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich ihrer Relevanz [55, 56]. Eine exogene Erhöhung von HO1 wirkte bei Ratten jedoch Lungen protektiv bei Hyperoxie [57].

### 1.1.4 Pathophysiologie

Auf mikroskopischer Ebene führt die Erkrankung durch epitheliale Zellaktivierung der Fibroblasten zur Fibrosierung der kleinen Luftwege, während Entzündungsreaktionen, mediiert durch Makrophagen, die Destruierung der septalen Strukturen und Emphysembildung fördern. Beide Mechanismen sind nach heutiger Lehrmeinung irreversibel und tragen erheblich zu FEV<sub>1</sub>-Verlust und allgemeiner Dyspnoe bei [5]. Hinzu kommen Rarifizierungen der Zillienstrukturen, welche physiologisch für den Schleimabtransport dienen. Ebenfalls durch Entzündungsmediatoren, wie MMP9, wird die Schleimproduktion der Epithelzellen angeregt, welches für das Kardinalsymptom des Auswurfes verantwortlich ist (vgl. Abb. 1-3) [5, 58, 59]. Mediiert werden die oben genannten Prozesse durch eine Reihe von Chemokinen-Liganden (wie CXCL Subtypen, CCL2 etc.), die nach Ausschüttung an Rezeptoren der Zielzelle (wie CXCR Subtypen, CCR2) binden.

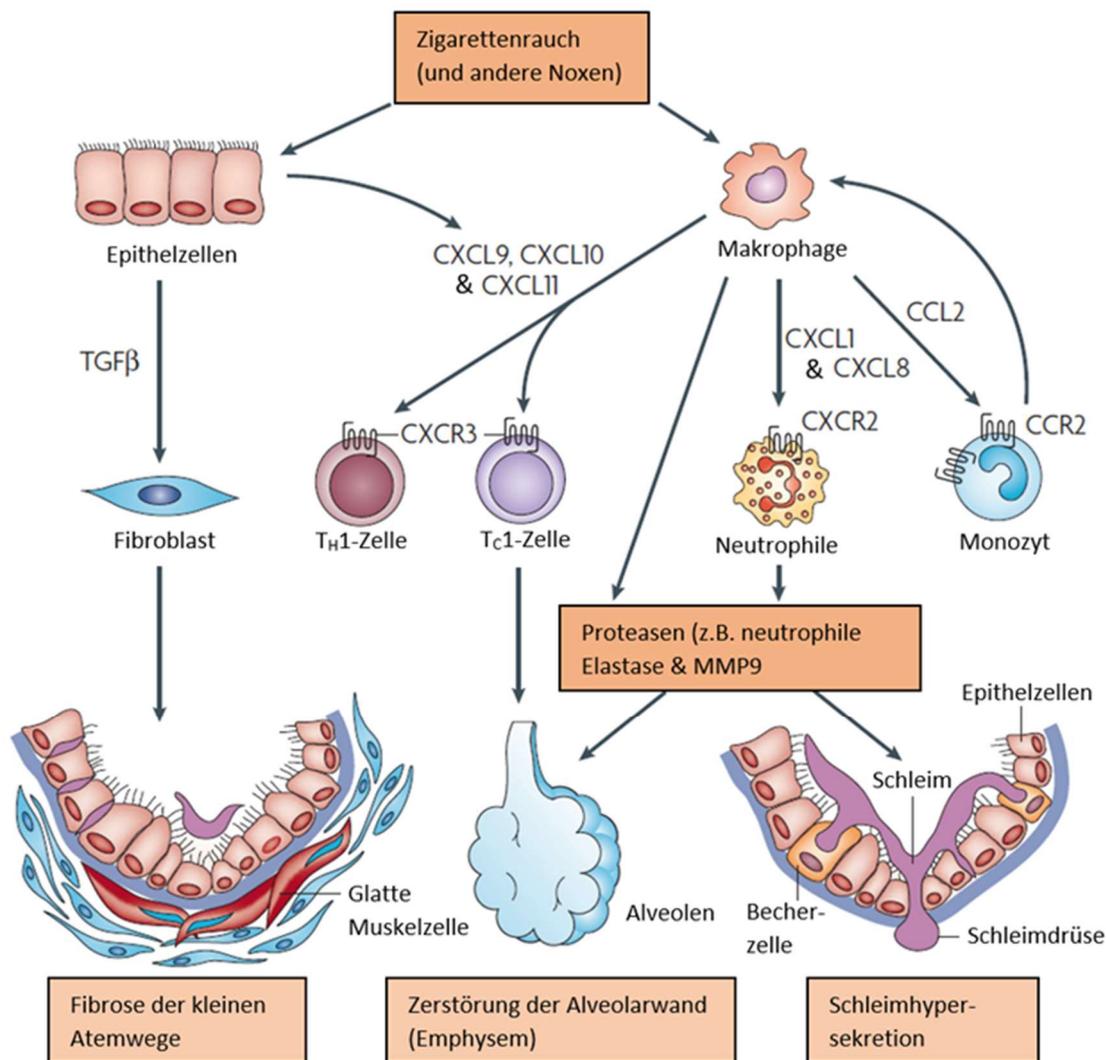


Abbildung 1-3: Überblick der beteiligten Zellen und Zytokine bei der COPD. Zigarettenrauch und andere Noxen aktivieren die Freisetzung verschiedener Zytokine aus Epithelzellen und Makrophagen. Diese führt zur chemotaktischen Aktivierung von Monozyten, welche in der Lunge zu Makrophagen differenzieren. Aktivierte neutrophile Granulozyten und Makrophagen setzen Proteasen frei, die zur Zerstörung der Alveolen / Emphysembildung und vermehrter Schleimproduktion beitragen. Aktivierte TH1-Zellen und zytotoxische TC1-Zellen unterstützen die Destruierung der Alveolen. Die stimulierte Proliferation von Fibroblasten führt zu Fibrose der kleinen Atemwege. (TGFβ = transforming growth factor-β, CCL = CC-chemokine ligand, CCR = CC-chemokine receptor, CXCL = CXC-chemokine ligand, CXCR = CXC-chemokine receptor, MMP9 = Matrixmetalloprotease 9). Modifiziert nach Barnes, 2008 [58]

Zu oben genannten Veränderungen der Lungengewebsstrukturen finden bei der Erkrankung Umstrukturierungsmaßnahmen in pulmonale Gefäße statt. Das *Remodelling* findet hierbei vor allem in Arteriolen mit Durchmesser unter 500 µm statt. Die *Intima* der Gefäße hyperplasiert, während die *Tunica media* vermehrt muskularisiert. Beide Mechanismen führen zur Bildung eines pulmonal Hochdruckes (PH), welches durch Rückstau des Blutes zur rechtsventrikulären Hypertrophie und Dilatation (*Cor pulmonale*) führt. Im Verlauf der Erkrankung treten Rechtsherzdekompensationen und Herzrhythmusstörungen auf. In vorherigen Studien ergaben sich Hinweise, dass

---

Gefäßveränderungen bereits vor der septalen Destruktion entstehen, welches durch das Vorkommen von pulmonalen Gefäßveränderungen bei Rauchern ohne respiratorische Symptome und Lungenemphysem bestärkt wird. Die pulmonalvaskuläre Veränderung könnte die treibende Kraft der Emphysembildung sein [16, 17]. Die hierdurch entstehende COPD-assoziierte pulmonale Hypertonie (formal der Gruppe 3.1 nach der Nizza-Klassifikation zugehörig) wird in Menschen definiert als ein mittlerer pulmonalarterieller Druck von größer als 20mmHg [14]. Die weiterhin wichtigste Therapie der PH besteht in der Behandlung der Grunderkrankung, nämlich die COPD [13, 16, 60].

#### **1.1.4.1 Entzündungsreaktion**

COPD Patienten entwickeln durch ihre Erkrankung typische Entzündungsreaktionen. Während mit steigender Schwere der Erkrankung die Entzündungsintensität zunimmt, stellt die akute Exazerbation mit bakterieller Beteiligung die schwerste Form der Entzündung dar. Typischerweise sind hierbei neutrophile Granulozyten, Makrophagen (mit dem Zelltypmarker CD68) und T- und B-Lymphozyten in ihrer Anzahl im Atemwegsystem erhöht [58, 61]. Zigarettenrauch aktiviert Alveolarmakrophagen und intrazelluläre Prozesse in Epithelzellen, die durch Ausschüttung von Chemokine, wie CSF2, CCL2, CCL25, zirkulierende neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten in die Lunge anziehen (vgl. Abb. 1-3). Ebenfalls werden elastolytische Enzyme wie MMP9 aus Makrophagen freigesetzt. MMP9 und MMP12 können durch Abbau des Elastins zur Emphysembildung in der Lunge beitragen, während TIMP3, welches MMPs inhibieren kann, supprimiert wird [3, 62].

*Toll-like receptor 4* (TLR4) spielt sowohl bei der Abwehr von Erregern als auch in der immanenten Entzündungsreaktion in der Lunge eine große Rolle. So zeigten MacRedmond *et al.* eine Verminderung der TLR4 Expression bei COPD Patienten, wobei sie mit der Schwere der Erkrankung korreliert [63].

Ebenfalls bei COPD herunterreguliert ist die Endopeptidase Neprilysin, welches als membrangebundenes Protein zahlreiche Hormone, vor allem in der Lunge und der Niere spaltet. Wick *et al.* postulieren einen möglichen Ansatz der COPD Therapie durch Neprilysinsubstitution. Interessanterweise werden Neprilysin-Inhibitoren bereits zur Therapie der Herzinsuffizienz durch ihre Wirkung an der Niere eingesetzt [64, 65].

---

Ein weiterer möglicher Therapieansatz der COPD, vor allem zur Reduktion der Exazerbationshäufigkeit, besteht möglicherweise in der Inhibition von Osteopontin (Gen: SPP1). Dieses Protein, welches in Entzündungsprozessen und Knochenerhaltung involviert ist, ist in den Atemwegen von COPD Patienten massiv hochreguliert und kann zur Abwehrverlust gegen bakterielle Fremdproteine (akute Exazerbation) führen [66].

#### **1.1.4.2 Proteasen-Antiproteasen-Dysbalance**

Wie bereits oben erwähnt, schütten Makrophagen und neutrophile Granulozyten bei Rauchstimulus elastolytische MMPs aus. Diese können enzymatisch extrazelluläres Elastin spalten, welches zur Emphysembildung beiträgt. Da der MMP Inhibitor TIMP in diesem Falle herunterreguliert wird, wird davon ausgegangen, dass eine Dysbalance zwischen der Protease MMP und der Antiprotease TIMP herrscht. Weitere Proteasen spielen in der Elastolyse der extrazellulären Matrix ebenfalls eine Rolle. So verursachen neutrophile Elastasen, Proteinase 3 und Cathepsine emphysematische Läsionen in Tierversuchen [67]. Bei Mangel des neutrophilen Elastase Inhibitors  $\alpha$ 1-Antitrypsin, infolge einer genetischen Stoffwechselerkrankung, entwickeln Betroffene ein progredientes Lungenemphysem, welches durch Rauchen verstärkt wird (siehe Kap. 1.1.3.3). Demzufolge wird postuliert, dass infolge der COPD es zur allgemeinen Dysbalance der Proteasen und Antiproteasen kommt, wobei die elastolytischen Proteasen überwiegen [1, 68].

#### **1.1.4.3 Oxidativer Stress**

Die Destruktion der Lungenstrukturen wird durch reaktive Sauerstoffspezies mitverursacht (ROS). Hierbei werden DNA und Proteine durch die hohe Reaktivität geschädigt. Es liegt im Falle des oxidativen Stresses ebenfalls eine Dysbalance vor, wobei ROS-bildende Prozesse den ROS-abbauenden Maßnahmen überwiegen. In physiologischer Menge sind ROS wichtige Signaltransduktoren und regulieren mitunter die Gefäßkontraktion. Generell entstehen ROS sowohl exogen im Tabakrauch als auch endogen durch NADPH-Oxidasen und durch NO-Synthasen in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Epithelzellen.

NADPH-Oxidasen produzieren Superoxid-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) durch die Reduzierung von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), welches mit Protonen durch Superoxiddismutasen (Sod1, Sod2) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reagiert (Gleichung 1).

---

Wasserstoffperoxid wird im Körper durch Katalasen katalysiert zu Wasser abgebaut und unschädlich gemacht (Gleichung 2). Wenn jedoch größere Mengen  $H_2O_2$  oder  $O_2^{\cdot-}$  sich ansammeln, reagieren sie durch Eisensalze katalysiert zu hochreaktiven Hydroxylradikale ( $\cdot OH$ ) (Fenton-Reaktion) und schädigen somit organische Substrate [3]. Ebenfalls können Superoxide mit Stickstoffmonooxiden (NO) zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) reagieren (Gleichung 3), welches im Atem von COPD-Patienten vermehrt zu finden ist [69]. Tyrosinbestandteile von Proteinen werden anschließend unter Bildung von Nitrotyrosin nitriert und können zusätzlich zur Gewebsschädigung beitragen [3, 70, 71]. Zusätzlich zur Katalase können Glutathionperoxidasen  $H_2O_2$  Glutathion-abhängig zu Wasser reduzieren. Ein Mangel dieses Enzyms spielt zum Beispiel eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen [72].

1.  $2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
2.  $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$
3.  $NO + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONOO^-$

NO wird im Körper von NO-Synthasen gebildet, wobei konstitutiv aktive Formen (*endothelial* NOS und *neuronal* NOS) und eine induzierbare Form (*inducible* NOS) existieren. Studien aus der Arbeitsgruppe in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, haben gezeigt, dass eine Inhibition der induzierbaren NOS oder dessen Signalweg im Mausmodell nicht nur eine Emphysembildung vorbeugen, sondern auch revertieren kann [16, 17]. Ebenfalls wirkt eine kongenitale Nox-Organizer 1 (NoxO1) Deletion präventiv [73]. NoxO1 ist ein wesentlicher Bestandteil vieler NADPH Oxidasen (siehe Kap. 1.2). Das daraus abgeleitete pathophysiologische Konzept besagt, dass Peroxynitrit über eine Nitrierung von Proteinen sowohl die PH als auch das Lungenemphysem auslöst [73].

Ebenso als antioxidativ gelten Stoffwechselprodukte der Hämoxygenase (induzierbare Form: HO1). Sie katalysieren die Oxidation von Häm zu Biliverdin, wobei Kohlenstoffmonooxid entsteht. Balestrasse *et al.* zeigten, dass eine Inhibition von HO1 in Sojabohnen erhöhte Parameter des oxidativen Stresses (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) bewirkt [74]. Hämabbauprodukte und die Induktion von HO1 gelten in der Literatur als zytoprotektiv und antioxidativ [75].

Oxidativer Stress führt zu Oxidation von Arachidonsäure und zur nicht-enzymatischen Bildung von Prostaglandin-ähnlichen Isoprostanen, die Bronchokonstriktion und

---

Plasmaexsudation bei COPD fördern [76]. Antioxidantien wie die Superoxiddismutase, die Katalase, die Hämoxydase und vor allem die Glutathionperoxidase werden unter anderem vom Transkriptionsfaktor *nuclear erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) reguliert [77]. Diese wird im Rahmen der COPD nicht adäquat hochreguliert, welches mit vermehrter Acetylierung von Histonen durch Verminderung von Histon-Deacetylase 2 (HDAC2) assoziiert sein kann [78, 79].

Amplifizierend auf Entzündungsprozesse wirkt die NF- $\kappa$ B Induktion durch oxidativen Stress, welches multiple proinflammatorische Gene vermehrt transkribiert [80]. So werden Cyclooxygenasen (COX) vermehrt gebildet und fördern durch Prostaglandinbildung inflammatorische Prozesse [81]. Weiterhin werden Histonacetyltransferasen aktiviert und HDAC2 inhibiert, sodass vermehrt inflammatorische Gene durch freiliegende Chromatinstrukturen transkribiert werden können [82]. Zu den Histonacetyltransferasen gehören, die unter anderem durch das Gen KANSL1 kodiert werden [83, 84].

#### **1.1.4.4 Apoptose**

Die Pathogenese der COPD lässt sich nicht auf einzelne unabhängige Mechanismen herunterbrechen, vielmehr interagieren die oben genannten Prozesse miteinander. So können proteolytische Aktivitäten durch Entzündungsreaktionen (Enzyme aus Makrophagen oder neutrophile Granulozyten, z.B.: Perforine oder Granzym B) oder durch genetische Faktoren (hereditärer  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel) initiiert werden. Oxidativer Stress trägt durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ebenfalls zur Proteolyse bei und aktiviert Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, welche die Transkription von proinflammatorischen Genen induzieren. Ein weiterer Schnittpunkt der Prozesse und wichtiger Faktor der Pathogenese ist die Regulierung der Apoptose.

Der programmierte Zelltod wird hauptsächlich durch drei bekannte Signalwege eingeleitet. So können TNF- $\alpha$  oder andere Fas-Liganden an sogenannte *Fas associated death domain* Proteine (FADD) binden und die Caspase-Signalkaskade auslösen. Ebenfalls sind Granzyme, die über Perforine ins Zellinnere gelangen, fähig dieselbe Kaskade anzustoßen. Weiterhin wird durch das Fehlen von Überlebensfaktoren Cytochrom C aus Mitochondrien ausgeschüttet, welches ebenfalls die Apoptose einleiten [85–87]. Mediert wird die Ausschüttung durch das proapoptotische Protein Bax und durch die Herunterregulation des antiapoptotische Protein Bcl-2. [88, 89] Imai *et al.*

konnten eine Vermehrung von apoptotischen Zellen in emphysematöse Lungengewebe und Erhöhung der Capsase-3 und Bax Konzentration bei Emphysem-Patienten zeigen. [90] Weiterhin ist es möglich eine Apoptose durch Senkung des VEGF-Spiegels durch oxidativen Stress einzuleiten, sodass VEGF ein weiteres mögliches Ziel der Therapie darstellt [85, 91].

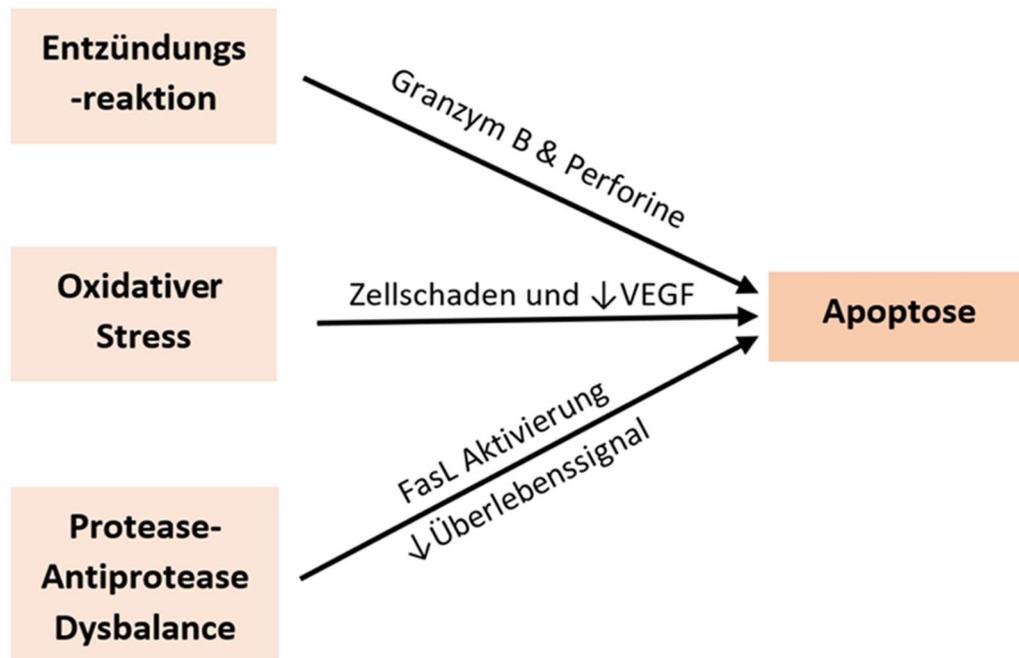


Abbildung 1-4: Interaktion der Apoptose mit anderen pathogenetischen Mechanismen in der COPD. Durch die Entzündungsreaktion aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen setzen Perforine und Granzym B frei, welche die Apoptose initiieren. Oxidativer Stress verursacht Zellschäden und niedrigere VEGF-Spiegel, die so zur Apoptose führen. Proteasen wie MMPs können durch Basalmembranzerstörung, die zu Verlust von Überlebenssignalen in Zellen oder direkt durch Fas-Liganden-Aktivierung zu Apoptose führen. Modifiziert nach Demedts, 2006 [85].

### 1.1.5 Lungenentwicklung und -regeneration

Neben symptomorientierter Therapie und als *Ultima Ratio* die Lungentransplantation existieren heutzutage keine kurativen Therapieoptionen der chronischen Degeneration bei COPD. Lange wurde von einer limitierten reparativen Kapazität mit Neigung zur Narbenbildung der Lunge ausgegangen [92, 93]. Neuere Studien, angetrieben durch das Fehlen einer adäquaten Therapie, zeigten jedoch erhebliche fakultative regenerative Möglichkeiten der Lunge, die vermutlich durch die Fähigkeit differenzierter Zellen wieder in den Zellzyklus einzutreten bedingt ist. Dies ähnelt der regenerativen Fähigkeit

---

von Leber und Pankreas, wobei klassische multipotente Stammzellen eine untergeordnete Rolle spielen [94].

### **1.1.5.1 Lungenentwicklung**

Um Regenerationsprozesse der Lunge zu verstehen, ist es unentbehrlich Vorgänge der embryologischen Entstehung, wobei die Lunge in physiologischer Weise proliferiert und sich differenziert, zu begreifen. Das respiratorische System besteht einerseits aus dem mit Atemluft gefüllten Respirationstrakt, endodermalen Ursprungs und andererseits aus den pulmonalen Gefäßen, mesodermalen Ursprungs [95].

Die Sprossung des endodermalen Vorderdarms zu zwei Lungenknospen und Trachea wird unter anderem durch *fibroblast growth factor 10* (FGF10) mediiert [96]. FGF10 defiziente Mäuse entwickeln in der Embryogenese keine Verzweigung der Lungenknospen und sind somit lebensunfähig. Interessanterweise wiesen El Algha *et al.* auf FGF10 positive Zellen als mögliche Progenitorzellen im Rahmen der postnatalen Lungenreparatur bei deren Schädigung hin [97]. Im späteren Verlauf differenzieren sich an der Spitze der ehemaligen Knospen Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten (*alveolar epithelial cell 1* und *2*, AEC1/2). Typ 1 Zellen bilden mitunter die Diffusionsbarriere zu pulmonalen Gefäßen (Teil der sogenannten Blut-Luft-Schranke) und es ist deren Zerstörung, die zu typischen Befunden des Emphysems führen. Typ 2 Zellen sind für die Bildung des Surfactants verantwortlich, die durch Senkung der Oberflächenspannung die Struktur der Alveolen während der Expiration erhält. Man geht davon aus, dass Typ 2 Zellen als Progenitorzellen der Typ 1 Zellen dienen und somit in ihrer Regeneration beteiligt sind [98–100].

### **1.1.5.2 Mechanismen der Lungenregeneration**

Der Hedgehog Signalweg gilt als ein Regulator der embryologischen Entstehung der mesenchymalen Teile der Lunge [101–103]. Van der Plaats *et al.* demonstrierten Zusammenhänge von *Hedgehog interacting protein* (HHIP) und der Verzweigungsprozess der Lunge, so führten niedrige Mengen HHIP zur Lungenhypoplasie [104]. Umgekehrt könnten höhere HHIP Expressionen mit möglichen regenerativen Potenzialen assoziiert sein.

Proliferationsprozesse nach partieller Pneumektomie konnten durch exogene Gabe und Aktivierung der Signalwege des *keratocyte growth factors* (KGF, den FGF

---

untergeordnet) angestoßen werden [105]. Ebenfalls sind Assoziationen der KGF Gabe mit Regeneration von alveolären Epithelzellen (AEC) im emphysematösen Gewebe beschrieben [106].

Der für die normale Embryonalentwicklung essenzielle WNT Signalweg kann bei der alveolären Regeneration eine Rolle spielen. So werden Fibrosierungsprozesse durch Blockade des WNT Signalweges gehemmt, gar revertiert und durch vermehrte Aktivierung verstärkt [107, 108]. Allerdings bleibt es unklar ob der Signalweg bei COPD ebenfalls zur Genese beiträgt.

Wie bereits erwähnt, führt der exogene Zigarettenrauch zu verminderter HDAC2 Aktivität [109]. Clubzellen können nach HDAC1 und HDAC2 Inhibition in Mäusen nicht regenerieren, dies sei durch eine direkte Wirkung von HDAC2 auf Tumorsuppressorgene bedingt [110]. Insgesamt lassen diese Ergebnisse einen vorteilhaften und eventuell regenerativen Effekt einer HDAC2 Erhöhung vermuten. *Tet methylcytosine dioxygenase 2* (TET2), kodierend für ein Enzym, welches Methylcytosin in der DNA hydroxylieren kann, kann, durch HDAC2 mediiert, repressive Effekte auf Interleukin 6 erzielen [111, 112], welches mit einer verminderten Entzündungsreaktion einhergeht. HDAC2 als mögliches Zielprotein einer Reparaturinduktion besitzt somit ebenfalls vorteilhafte antiinflammatorische Potenziale.

### **1.1.5.3 Zellzyklus, Zellproliferation**

Wie bereits beschrieben, kann in der Lunge der Zellzyklus von differenzierten Zellen reaktiviert werden. So können regulatorische Proteine des Zellzyklus, zum Beispiel Cyklin A1 (CCNA1) und *cyclin dependent kinase 2* (CDK2), die als Cyclin-CDK-Komplexe den Zellzyklus regulieren und vorantreiben, auf aktivierte Zellzyklusprozesse in der Lunge hinweisen.

## **1.2 NADPH-Oxidasen**

### **1.2.1 Die NADPH-Oxidasen-Familie**

Die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidasen (NADPH-Oxidase, Nox) sind eine Gruppe aus sieben bekannten homologen Enzymkomplexen, die Sauerstoff mithilfe eines Elektrons aus NADPH zu Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) reduzieren. Ungleich anderer

---

Prozesse produzieren Nox ROS nicht als Nebenprodukt, sondern stellen diese gezielt her [113]. Das zunächst angenommene solitäre Vorkommen in Phagozyten als Teil des *respiratory burst* konnte durch den Aktivitätsnachweis in Fibroblasten [114] und glatte Muskelzellen [115] widerlegt werden [116]. Wenn aktiv, gelangt  $O_2^-$  in den Extrazellulärraum, wo es durch seine hohe Reaktivität in bakterielle Abwehrmechanismen und zelluläre Signaltransduktion beteiligt ist. Ebenfalls führen Nox-Mangel oder -Überschuss zu verschiedenen Pathologien. So kann ein Mangel mit Störung der Otolithenmembran und ein Überschuss mit kardiovaskulären und pulmonalen Erkrankungen vergesellschaftet sein [113].

Zur Familie der Nox gehören: Nox1-5 und *dual oxidase 1&2* (Duox1&2), wobei vor allem Nox1, 2 und 4 nach heutigem Kenntnisstand bezogen auf COPD relevant sein könnten. In Endothelzellen kommen Nox1, Nox2, Nox4 und Nox5; in vaskulären glatten Muskelzellen Nox1, Nox4 und Nox5; und in Fibroblasten Nox2 und Nox4 vor [117]. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass Nox5 in Mäusen nicht exprimiert wird [118]. Nox1, Nox2 und Nox4 gehören alle zu den Kalzium unabhängigen NADPH-Oxidase und werden durch verschiedene Untereinheiten reguliert und aktiviert [119].

Die Nox2 Isoform, früher gp91<sup>phox</sup> genannt, ist die erste bekannte Form der Oxidase. Besonders in Phagozyten wird sie durch p22<sup>phox</sup> stabilisiert, welches zusätzlich als Bindungsstelle für p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> dient. p47<sup>phox</sup> stellt das Homolog der NoxO1 und p67<sup>phox</sup> das der NoxA1 dar. Beide sind eher spezifisch für die Nox2, während Nox1 selektiver für NoxO1 und NoxA1 ist. Durch eine Proteinkinase C abhängige Phosphorylierung von p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> binden diese an die membrangebundene Nox2 und, stabilisiert durch p40<sup>phox</sup>, aktivieren diese, sodass es zum Ausbruch von  $O_2^-$  kommt [118, 120–122].

Die Nox1 befindet sich vor allem in Kolon-, Epithel-, Magen-, Uterus- und Prostatagewebe. Wie Nox2 bildet Nox1 mit p22<sup>phox</sup> ein Heterodimer, welches durch NoxA1 und NoxO1 aktiviert wird [123]. Zwar kann Nox1 durch p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> ebenfalls aktiviert werden, allerdings deutet das deckungsgleiche Verteilungsmuster von Nox1 zu NoxO1 und NoxA1 auf ihre physiologische Interaktion hin [124]. Zur Unterstützung der Nox-Aktivität wird eine membrangebundene GTPase RAC benötigt, diese ist ebenfalls bei Nox2 der Fall [125].

Nox4 wurde zunächst in der Niere und später ebenfalls in glatten Muskelzellen und Epithelzellen entdeckt [126]. Wie Nox1 und Nox2 bildet sie ein Heterodimer mit p22<sup>phox</sup>, welches das Komplex stabilisiert [127]. Ungleich dieser, benötigt sie keine bekannten Untereinheiten, die ihre Aktivität reguliert. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass die Nox4 konstitutiv aktiv sein kann [128].

Die Aktivatoren NoxA1 und p67<sup>phox</sup> migrieren nach einer Bindung des RAC-GTPs vom Zytosol an die Zellmembran, wo es, unterstützt durch NoxO1 oder p47<sup>phox</sup>, direkt mit Nox1 bzw. Nox2 interagiert [123, 129]. Hierdurch wird die O<sub>2</sub><sup>-</sup> Produktion initiiert. Beide Aktivatoren sind strukturell ähnlich mit der Ausnahme, dass p67<sup>phox</sup> in der Lage ist p40<sup>phox</sup> zu binden [130].

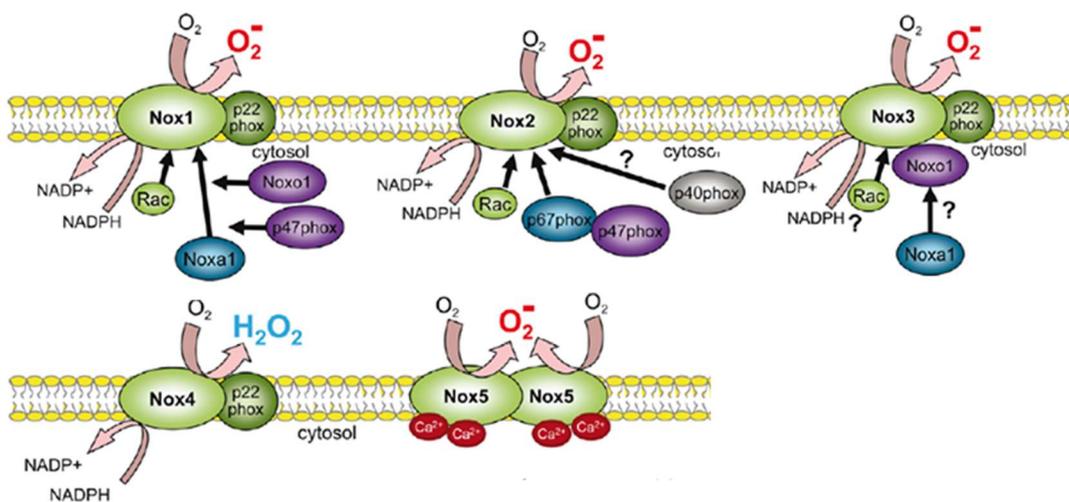


Abbildung 1-5: Unterformen der NADPH-Oxidasen Nox1-5. Nox1-4 gehen mit p22phox Heterodimere ein. Nox1 als enzymatisch aktiver Komplex beinhaltet den Nox *Organiser* (NoxO1), den Nox *Activator* 1 (NoxA1) und die GTPase Rac in ihrer aktiven, GTP gebundener Form. Die Aktivität von Nox2 hängt von p47phox, p67phox und Rac ab. Supportiv wirkt hierbei p40phox. Nox3 benötigt für ihre Aktivität NoxO1. Die Funktion von Rac in vivo ist nicht geklärt. Nox4 erfährt keine Regulation durch Untereinheiten. Ebenfalls ist der Einfluss von Rac hier nicht geklärt. Interessanterweise entstehen hierbei hauptsächlich Wasserstoffperoxide. Nox5 wird durch Bindung von Kalzium aktiviert. Hierbei bewirkt eine Konformationsänderung das Lösen eines intramolekularen Inhibitors. Aus Brandes et al., 2014 [131].

## 1.2.2 NoxO1 als Regulator der NADPH-Oxidasen

Erstmals 2002 erkannt, ist NoxO1 ein homologes Protein von p47<sup>phox</sup>, welches mit Nox1 vergesellschaftet ist [123]. NoxO1 und das Homolog p47<sup>phox</sup> sind für die Vermittlung der Bindung von NoxA1/p67<sup>phox</sup> mit Nox1/2 zuständig. Ferner ist es möglich, dass sie durch verschiedene Spliceformen die Kompartimentenlokalisierung in einer Zelle bestimmt [132]. Die Unterformen unterscheiden sich in ihrer Nox-Präferenz, so interagiert NoxO1

---

gehäuft mit Nox1 und p47<sup>phox</sup> mit Nox2. Im Gegensatz zu NoxO1, besitzt p47<sup>phox</sup> eine autoinhibitorische Region, sodass sie erst bei Phosphorylierung durch Proteinkinase C mit p22<sup>phox</sup> interagiert. Dies führt zur Annahme, dass NoxO1 konstitutiv p22<sup>phox</sup> bindet [129].

Eine NoxO1-Deletion in Mäusen führt zu einer inkompletten Otolithogenese im Innenohr, sodass schwere Gleichgewichtsstörungen entstehen [133]. In Bezug auf weiteres Gewebe gibt es allerdings Hinweise einer protektiven Wirkung durch NoxO1-Deletion. So zeigten Moll *et al.* eine erhöhte Mitoserate des Kolonepithels in Abwesenheit von NoxO1, welches auf vermehrte Proliferation deutet. Weiterhin fällt eine durch Dextran Natriumsulfat induzierte Kolitis in Abwesenheit von NoxO1 milder aus [134]. Des Weiteren führt eine NoxO1-Depletion im Gefäßsystem zur vermehrten Angiogenese. Im Umkehrschluss hindert die ROS Bildung durch das Nox1 System die Angiogenesepotenz [135].

## 1.3 Vorarbeiten

Die hier beschriebenen Vorarbeiten beruhen, wenn nicht explizit anders genannt, auf Daten und Versuche aus der Arbeitsgruppe von Prof. Weißmann, insbesondere von Mariola Bednorz, die ebenfalls die in dieser Arbeit untersuchten Proben generierte und bereitstellte.

### 1.3.1 NoxO1-Depletionsfähigkeit mithilfe des Cre/loxP-Systems und Rauch-induziertes Emphysem

Die in dieser Arbeit untersuchten Lungenproben stammen allesamt von der Hausmaus (*Mus musculus*), dabei wurden linke und rechte Lungenflügel von männlichen Tieren randomisiert ausgewählt. Während für Wildtypkontrollen C57BL/6 Mäuse verwendet wurden, wurden für die NoxO1 Untersuchung Mäuse generiert, die eine loxP-Flankierung des NoxO1 Gens auf Chromosom 17 besaßen. Ebenfalls besaßen die Mäuse eine am Östrogenrezeptor gekoppelte Cre-Rekombinase, die nur durch Tamoxifen und nicht durch körpereigene Östrogene aktiviert wird. Dies wurde durch die Verpaarung von NoxO1 flankierten C57BL/6 Mäusen (generiert durch Taconic Artemis, Köln) mit Tamoxifen induzierbaren CreERT2 Mäusen realisiert. Alle Tiere wurden im Labor unter Standardbedingungen gehalten (20-30 °C, Luftfeuchtigkeit 40-70%, Tag/Nachtrhythmus

13/11, Fütterung *ad lib.*), Durch den Zigarettenrauch wird ein Emphysem induziert, welches einer COPD Erkrankung der Stufe 1 bis 2 gleicht. Mäuse entwickeln ferner hierbei keine Atemwegsobstruktionen durch Zigarettenrauch [136].

Das verwendete Cre/loxP System erlaubt eine Exzision des NoxO1-Gens zu einem beliebigen Zeitpunkt durch Gabe von Tamoxifen, wodurch NoxO1 als Protein nicht mehr gebildet wird. Durch die Tamoxifengabe werden die gekoppelten Estrogenrezeptoren aktiviert und wandern physiologischer Weise in den Zellkern, wo die gekoppelte Cre-Rekombinase loxP Flankierungen auf der DNA erkennen und diese durch Bildung von ringförmiger DNA mit dem enthaltenen Zielgen exzidieren. Hierdurch wird in der Maus das Zielgen eliminiert, sodass keine vollständige Transkription mehr stattfinden kann [137, 138] (vgl.: Abb. 1-6). Im Falle des NoxO1 befinden sich die loxP-Stellen im zweiten und im neunten Exon des Gens, sodass lediglich das erste Exon verbleibt, welches keine funktionellen Proteine bilden kann.

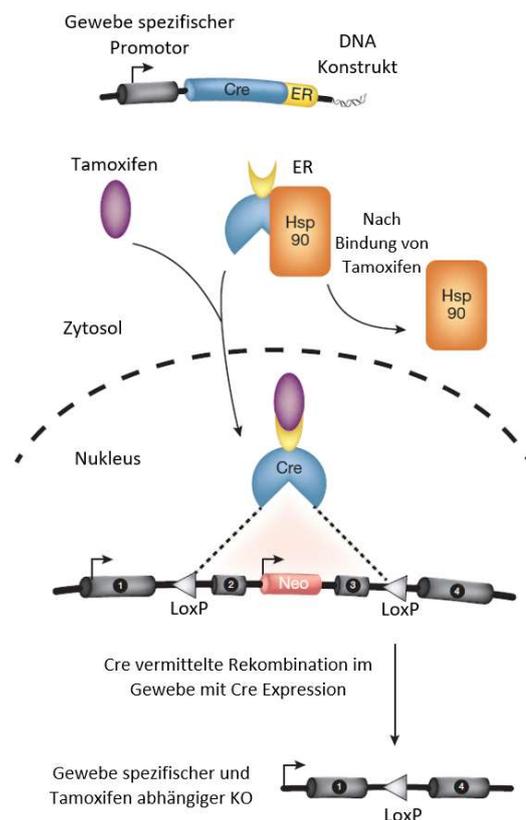


Abbildung 1-6: Durch Tamoxifen induzierbares Cre-loxP System. Die Cre Rekombinase wird mit einem modifizierten Estrogenrezeptor (ER) gebunden und durch einen Gewebe-spezifischen Promotor kontrolliert. Im inaktiven Zustand bindet *heat shock protein* 90 (Hsp90) am ER und verhindert ein Wandern in den Zellkern. Bei Tamoxifengabe bindet diese am ER, Hsp90 wird freigesetzt und das Cre-

ER Fusionsprotein kann in den Zellkern wandern. Dort rekombiniert Cre die LoxP Sequenzen, woraus ein *Knockout* resultiert. Modifiziert nach Günschmann, 2014 [139]

Um ein Emphysem, welches die Pathophysiologie des menschlichen Emphysems im fortgeschrittenen Stadium nachempfunden, durch Rauch zu induzieren, wurden die entsprechenden Mäusen sechs Stunden pro Tag an fünf Tagen die Woche bis zu acht Monate in einer eigens hierfür bereitgestellte Rauchkammer mit einem Rauchstrom von 3R4F Forschungszigaretten (*Kentucky Tobacco Research and Development Centre, Lexington, USA*) ausgesetzt. Hierbei wurde die Partikelkonzentration bei 140 mg/m<sup>3</sup> konstant gehalten. Anschließend erfolgte eine rauchfreie Phase von drei Monaten, wobei bei bestimmten Gruppen eine NoxO1- *Knockout* durch orale Tamoxifengabe für zwei Wochen am Anfang der Phase initiiert wurde. Das zeitliche Rauchschemata ist der Abbildung 1-7 zu entnehmen. Als Kontrolle wurden Mäuse bei Raumluft, *ergo* 21 Vol.-% Sauerstoff, gehalten. Die Mäuselungen wurden nach durchgeführter hämodynamischer Untersuchung bis zur weiteren Untersuchung in Stickstoff eingefroren, bzw. in Tissue-Tek® O.C.T™ *compound* eingebettet und eingefroren.

WT <sub>kein Rauch</sub>	11 Monate Raumluft		
WT <sub>Rauch</sub>	8 Monate Rauchexposition	3 Monate Raumluft	
NOXO1 <sub>kein Rauch, kein Tam</sub>	11 Monate Raumluft		
NOXO1 <sub>Rauch, kein Tam</sub>	8 Monate Rauchexposition	3 Monate Raumluft	
NOXO1 <sub>kein Rauch, Tam</sub>	11 Monate Raumluft		2 Wochen Tamoxifen
NOXO1 <sub>Rauch, Tam</sub>	8 Monate Rauchexposition	3 Monate Raumluft	

	Wildtyp	NoxO1 LoxP- flankiert	Rauch	Tamoxifen
WT <sub>kein Rauch</sub>	X			
WT <sub>Rauch</sub>	X		X	
NoxO1 <sub>kein Rauch, kein Tam</sub>		X		
NoxO1 <sub>Rauch, kein Tam</sub>		X	X	
NoxO1 <sub>kein Rauch, Tam</sub>		X		X
NoxO1 <sub>Rauch, Tam</sub>		X	X	X

Abbildung 1-7: Verwendetes Gruppenschema für die Rauchexposition und Tamoxifenzugabe (Tam) der verschiedenen Mausgruppen. Alle Mäuse befanden sich 11 Monate im Experiment. Zu jeder Kontrollgruppe ohne jegliche Rauchexposition gab es eine Rauch-exponierte Gruppe, die für 8 Monate 6 Stunden pro Tag an 5 Tagen die Woche mit einer Partikelkonzentration von 140 mg/m<sup>3</sup> geraucht wurde. Anschließend wurde bei 2 von 4 NoxO1 LoxP-flankierten Gruppen durch zweiwöchige Tamoxifengabe eine NoxO1-KO initiiert. Alle Rauchexponierte Gruppen wurden für weitere 3 Monate bei Raumluft gehalten.

---

### 1.3.2 Reversibilität der COPD bei iNOS-Hemmung, Riociguat als Prävention

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Wildtyp C57BL/6 Mäuse nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition sowohl ein Emphysem als auch eine pulmonale Hypertonie entwickeln. Ferner erfolgte hierbei keine spontane Lungenregeneration nach anschließender 3-monatiger RaumlufTEXposition. Detaillierte Untersuchungen der Mäuse zeigten, dass die Tiere bereits nach 3 Monaten Zigarettenrauchexposition eine pulmonale Hypertonie entwickeln, während das Emphysem erst nach 6-8 Monaten auftrat [16, 17, 140]. Seimetz *et al.* zeigten 2011, dass eine Inhibition der induzierbaren NO-Synthase nach einer Rauchexposition von 8 Monaten und einer dreimonatigen rauchfreien Phase im Mausmodell sichtbar zur Rückbildung des Emphysems im Rahmen der COPD führt [16]. 2014 zeigten Weißmann *et al.* präventive und partiell reversible Wirkungen einer Riociguatgabe bezogen auf COPD im Mausmodell. Riociguat ist eine Stimulanz der löslichen Guanylatzyklase, welches physiologisch durch NO aktiviert wird [17]. Dies verdeutlicht ebenfalls die wichtige Rolle von Stickstoffmonoxid in der Pathophysiologie der COPD. Es wurde demnach postuliert, dass die Unterbindung der Peroxynitritbildung durch NO-Synthasen und NADPH-Oxidasen maßgeblich für die Reversibilität verantwortlich sei, weshalb eine Inhibierung der NADPH-Oxidasen (oder ihre Bestandteile) zu ähnlichen Prozessen führen sollte.

### 1.3.3 Resistenz gegen COPD bei Fehlen von NoxO1

Seimetz *et al.* zeigten präventive Wirkungen einer NoxO1 Deletion. So zeigen Mäuse, die bereits zum Zeitpunkt der ersten Rauchexposition kein NoxO1 mehr transkribieren, keine Hinweise einer Emphysembildung nach acht Monaten Rauchexposition, ersichtlich anhand der dynamischen Lungencompliance, der histologischen Auswertung des Lungenluftraumes, des *mean linear intercepts* (MLI) und der Anzahl an Alveolen. Ebenfalls kommt es nicht zur vermehrten Muskularisierung und Verdickung der bronchialen Gefäße. Physiologische Daten zeigten ebenfalls keine Veränderung der Rechtsherzfunktion bei rauchexponierten, NoxO1 defizienten Mäusen [73].

### 1.3.4 Daten aus physiologischen Versuchen

Alle in dieser Arbeit untersuchten Mäuse wurden zuvor *in vivo* in Bezug auf Lungenfunktion und Herzfunktion untersucht (Daten von Mariola Bednorz zur Verfügung gestellt). Lungenfunktionsmessungen ergaben bei NoxO1 post-Rauch deletierten Mäusen eine Reversibilität der durch Rauch verursachten Compliance Erhöhung, während Mäuse ohne NoxO1-KO-Induktion ähnliche Compliancewerte wie berauchte Wildtypmäuse aufwiesen (Abb. 1-8). Ebenfalls ergaben Untersuchungen keinen erhöhten rechtsventrikulären Druck nach NoxO1-KO-Induktion, während ohne Tamoxifengabe der rechtsventrikuläre Druck erhöht war. Die Versuche wurden durch Bednorz *et al.* durchgeführt.

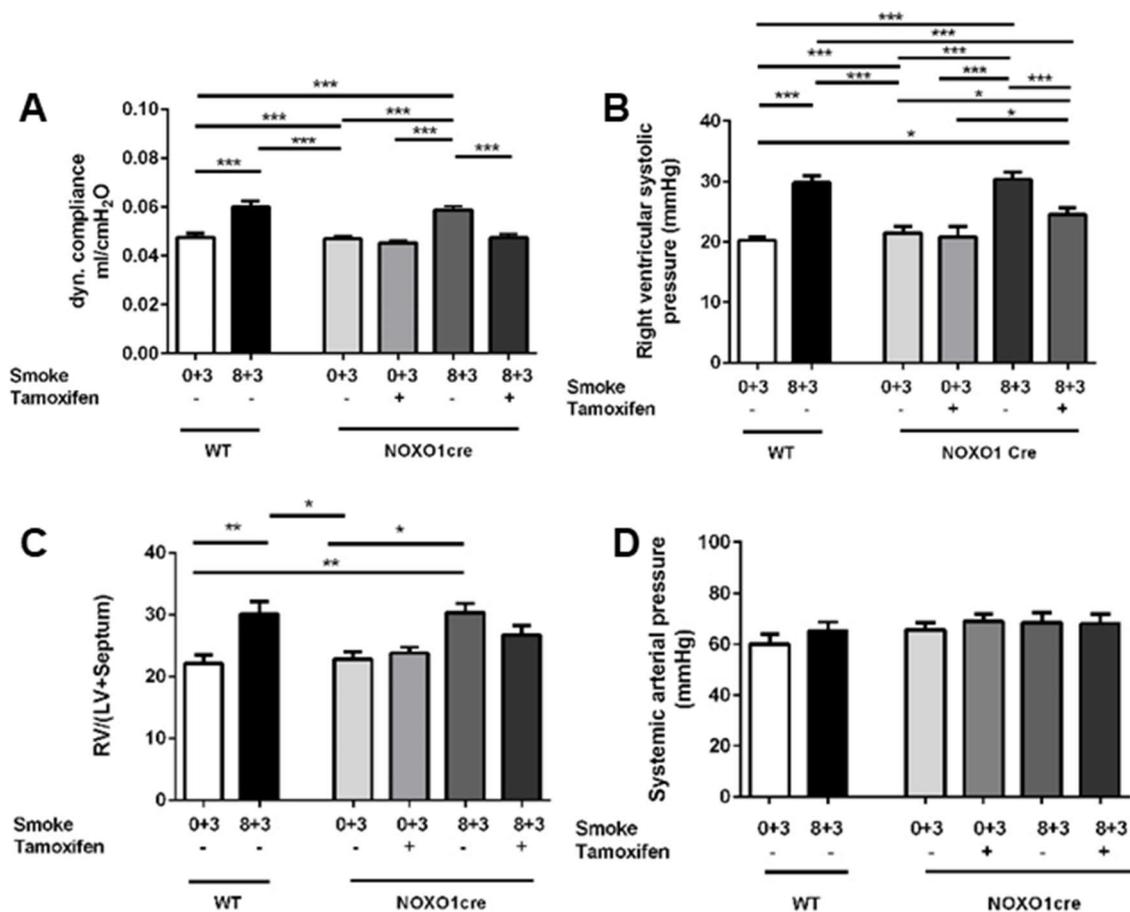


Abbildung 1-8: *In vivo* und *ex vivo* Daten der Lungencompliance, des rechtsventrikulären systolischen Blutdruckes, der Ventrikelverhältnisse und des systemischen arteriellen Mitteldruckes von Wildtypmäusen (WT), NoxO1-Knockout nicht induzierten und NoxO1 Knockout induzierten Mäusen, jeweils nach Raumluf- und 8-monatiger Rauchexposition. n=10. A) Dynamische Lungencompliance. B) Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck, gemessen via Rechtsherzkatheter. C) Gewichtsverhältnis des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel plus Septum. D) Systemischer arterieller Mitteldruck. Zur Verfügung gestellt von M. Bednorz.

---

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Reversibilität des Rauch-induzierten Lungenemphysems im Mausmodell nach NoxO1-Deletion zu evaluieren. Dazu wurden zunächst durch 8-monatige Rauchexposition ein Lungenemphysem induziert. In den Tieren wurde dann durch Tamoxifengabe die Deletion der NoxO1 NADPH-Oxidase Untereinheit ausgelöst, und die Tiere wurden für weitere drei Monate unter Raumluft gehalten. Vorausgehende Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, hatten gezeigt, dass eine 8-monatige Rauchexposition zu einem Lungenemphysem und einer pulmonalen Hypertonie führen und eine nachfolgende 3-monatige Raumluft-Reexposition nicht zu einer spontanen Lungenregeneration führt. [16] Bereits durchgeführte *in vivo* Untersuchungen der Versuchstiere sollen auf ihr histologisches und molekulares Korrelat hin untersucht werden. Dazu sollten Lungenproben in Bezug auf Emphysembildung und Gefäßveränderungen histologisch quantifiziert werden, während ausgewählte molekulare Veränderungen explorativ untersucht und potenzielle Schlüsselproteine und -gene quantifiziert werden sollten.

Folgende Untersuchungen wurden dazu vorgenommen:

- Kontrolle der Vergleichbarkeit von Wildtyp Mäusen und *Knockout*-fähigen Mäusen in Bezug auf Erkrankungsschwere nach Rauchexposition.
- Validierung und Quantifizierung der Reversibilität des durch Rauch induzierten Emphysems drei Monaten nach induzierten NoxO1-Knockout.
- Validierung und Quantifizierung der Reversibilität der durch Rauch induzierte Intimahyperplasie und Muskularisierung der parabronchialen Gefäße mit einem Durchmesser von 20-70 und 70-150 µm drei Monaten nach induzierten NoxO1-Knockout.
- Quantitative Untersuchung von potenziellen Schlüsselproteinen im Lungenhomogenat in Bezug auf Pathogenese und potenzielle Regeneration.
- Quantitative Untersuchung potenzieller Schlüsselgene im Lungenhomogenat in Bezug auf Pathogenese und potenzielle Regeneration eingeteilt in „Extrazelluläre Matrix“, „Immunologie“, „DNA-Aktivität“, „Oxidativen Stress“, „Apoptose“ und „Proliferation“.
- Explorative Mikroarray Analyse von Gefäßen, und Septumdissektaten zur Destinktion der zwei Kompartimente, sowie zur Hypothesenfindung möglicher

---

biochemischer Prozesse in der Lungenregeneration nach Emphysembildung und Gefäßveränderungen post-Rauchexposition.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikro-Schraubröhre 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon® 50ml	Corning inc., Corning, NY, USA
Cellstar® Tubes 15 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Pipetten Research	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Mikro200R & Universal 320R	Hettich, Tuttlingen
Waage PL303, classic light	Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA

#### 2.1.2 Benutzte Antikörper für Western Blot Analyse

Alle Antikörper wurden in 5%ige Milch/TBST (Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween) Lösungen verdünnt.

##### *Primäre Antikörper*

Antikörper	Firma	Bestellnr.	WB
Anti-NoxO1, „26“,	generiert, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R.P. Brandes		1:1000
Anti- β-Aktin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A5316	1:50000
Anti-FGF10	abcam, Cambridge, UK	ab71794	1:1000
Anti-TIMP3	abcam, Cambridge, UK	ab39184	1:1000
Anti-MMP9	abcam, Cambridge, UK	ab38898	1:1000
Anti-MMP12	abcam, Cambridge, UK	ab52897	1:2000
Anti-GADD45α (C-	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	sc-6850	1:1000
Anti-Nitrotyrosin	abcam, Cambridge, UK	ab7048	1:1000

Tabelle 2-1: Benutzte primäre Antikörper bei Western Blot

---

### ***Sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase gekoppelt)***

<b>Antikörper</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnr.</b>	<b>WB</b>
Anti-Rabbit	Promega, Mannheim, Deutschland	W401B	1:5000
Anti-Mouse	Promega, Mannheim, Deutschland	W402B	1:5000

Tabelle 2-2: Benutzte sekundäre Antikörper bei Western Blot

### **2.1.3 Geräte und Software für Histologie**

Mikrotom RM2165	Leica Microsystems, Nussloch
Kühlplatte EG1150C	Leica Microsystems, Nussloch
Paraffinstreckbad HI1210	Leica Microsystems, Nussloch
Objektträgerstrecktisch HI1220	Leica Microsystems, Nussloch
Gewebeinfiltrationsautomat ASP300 S	Leica Biosystems, Nussloch
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Merck Millipore, Darmstadt
Mikroskop DM6000B	Leica Microsystems, Nussloch
Digitalkamera DFC310 FX	Leica Microsystems, Nussloch
Trockenschrank	Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach
Leica QWin Standard Analyzing Software	Leica Microsystems, Nussloch
Makros zur histologischen Auswertung	entwickelt von Hr. Christoph Frank, Leica Microsystems, Nussloch

### **2.1.4 Verbrauchsmaterialien für Histologie**

Mikrotomklingen S35 Feather	Produkte für die Medizin AG, Köln
Objektträger Superfrost Plus®	R. Langenbrink, Emmendingen
Eindeckmedium Pertex®	Medite GmbH Burgdorf
Deckgläser AutomatStar 24x50mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Einbettungskassette Tissue-Tek® III	Sakura Finetek, Staufen
Faltenfilter	Schleicher + Schüll GmbH, Dassel

### **2.1.5 Kits / Chemikalien für Histologie**

Xylol	Carl Roth GmbH Karlsruhe
-------	--------------------------

Ethanol 70%ig, 96%, 99,6%	Fischer, Saarbrücken
Hämalaun nach Mayer, sauer	Waldeck GmbH, Münster
Eosin-y-alkoholisch	Thermo Shandon Limited, Cheshire, UK
Isopropanol 99,8%ig	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Weigertes Resorcin Fuchsin	Waldeck GmbH, Münster
Fe-Hämatoxylin nach Weigert Lösung A	Waldeck GmbH, Münster
Fe-Hämatoxylin nach Weigert Lösung B	Waldeck GmbH, Münster
25%ige HCl	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Gesättigte Pikrinsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Säurefuchsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
100%ige Essigsäure	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Methylgrün	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck Millipore, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumazid	Riedel-de Haën AG, Seelze
Hydrogenperoxid 30%	Merck Millipore, Darmstadt
Digest all 2 Trypsin, Konzentrat und Lsg.	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
MM HRP Polymer Kit	Biocare medical, Concord, CA, USA
AK Diluent	Zytomed Systems, Berlin
VECTOR VIP Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
ImmPRESS™ HRP Anti-Rabbit IgG	
Polymer Detection Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Pertex® Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf

## 2.1.6 Antikörper für Immunfärbung

Antikörper	Firma	Bestellnr.	WB
Anti- $\alpha$ -Aktin, Mouse	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A2547	1:700
Anti-vWF, Rabbit	Dako, Carpinteria, CA, USA	A0082	1:1000

Tabelle 2-3: Benutzte Antikörper zur Immunfärbung

---

### **2.1.7 Geräte und Software für Proteinextraktion, Proteinkonzentrationsbestimmung, SDS-PAGE und Western Blot**

Homogenisator, Precellys 24	Peqlab, Erlangen
Spacer Plates 1,5 mm	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Short Plates	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-Protean® Casting Stand	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-Protean® Combs, 15-well, 1.5 mm	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Digital Heatblock	VWR, Radnor, PA, USA
Electrophoresis Power Supply E835	Consort, Turnhout, Belgien
Transfer-Blot SD Semidry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini Trans-Blot® Gel holder cassette	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Electrophoresis power supply E835	Consort, Gent, Belgien

### **2.1.8 Verbrauchsmaterialien für Proteinextraktion, Proteinkonzentrationsbestimmung, SDS-PAGE und Western Blot**

Keramik-Kügelchen 1.4 mm	Peqlab, Erlangen
Cellstar® 96-Well-Platte Kulturplatte	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
PVDF Transfer Membrane, Immobilon®-P	Merck Millipore, Darmstadt
Blot Paper	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

### **2.1.9 Kits/ Chemikalien für Proteinextraktion, Proteinkonzentrationsbestimmung, SDS-PAGE und Western Blot**

Cell lysis buffer (10X)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Destilliertes Wasser	Life Technologies, Carlsbad, USA
DC™-Protein-Assay	Bio-Rad, Hercules, California, USA

---

Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TGX-Stainfree Fastcast Kit 12%	Bio-Rad, Hercules, California, USA
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, Hercules, California, USA
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Precision Plus Protein™ Dual Color	Bio-Rad, Hercules, California, USA
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Clarity Western ECL	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween® 20	Promega, Madison, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### **2.1.10 Geräte und Software für RNA-Isolierung, cDNA Transkription und Real-Time PCR**

Homogenisator, Precellys 24	Peqlab, Erlangen
Imager ChemiDoc XRS+	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Image Lab Software	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Nanodrop, ND1000, Photometer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Thermocycler T personal	BioMetra, Göttingen
Mini Plate Spinner MPS 1000™	Labnet, Edison, NJ, USA
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad, Hercules, CA; USA
CFX Manager Software	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Electrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

---

## 2.1.11 Verbrauchsmaterialien für RNA-Isolierung, cDNA Transkription und Real-Time PCR

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Thermo-Strip	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Clear flat 8 Cap strips	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Hard-Shell® PCR Plates 96-well	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Clear Heat Seal	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

## 2.1.12 Kits/ Chemikalien für RNA-Isolierung, cDNA Transkription und Real-Time PCR

RLT-Lyse-Puffer	Qiagen, Hilden
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RNA-Lyse Kit, RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
iScript cDNA synthesis kit	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
SYBR® Safe DNA gel stain	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Agarose for DNA electrophoresis	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, Waltham, MA, USA

## 2.1.13 Primer für Real-Time PCR

Alle Primer wurden mit Hilfe von Primer-BLAST auf der Seite von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) designiert und von Metabion GmbH (Steinkirchen, Deutschland) synthetisiert. Folgende Maus spezifischen Primern wurden verwendet:

Primer	Basenfolge	Produktgröße
Rpl32_mice_F	TGGAGGTGCTGCTGATGTG	142 bp
Rpl32_mice_R	GCGTTGGGATTGGTGA CTCT	
Tlr4_mice_F	CCTGACACCAGGAAGCTTGA	140 bp
Tlr4_mice_R	TCAAGGGGTTGAAGCTCAGA	
NoxO1_mice_F	TTCCTGATGCTCCATTGCTG	226 bp

NoxO1_mice_R	GGTTGGGATAAGGGCTCCTC	
Fgf10_mice_F	GTCAAAGCCATCAACAGCAACT	200 bp
Fgf10_mice_R	CCTCTCCTGGGAGCTCCTTT	
Timp3_mice_F	ACAACAGCTACCATGACTCCCT	196 bp
Timp3_mice_R	AGACCAGAGTGCCAAAGGGC	
Mmp9_mice_F	GTCTCGGGAAGGCTCTGCT	188 bp
Mmp9_mice_R	CACACGCCAGAAGAATTTGC	
Mmp12_mice_F	TATTCCCTGGGCTTCTCTGC	139 bp
Mmp12_mice_R	GGTAAGCAGGGTCCATGAGC	
Hhip_mice_F	AAACGGCTACTACACCCCA	214 bp
Hhip_mice_R	CTGATCAAGGATACCTGCCCTG	
Kans11_mice_F	ACAAGTTGCAGCCAGCACAT	152 bp
Kans11_mice_R	CTCGCCAGCTTGGAGTAAGGA	
Tet2_mice_F	CTCAGAATGAACTAGAACTGTTGTTGT	241 bp
Tet2_mice_R	GCATCGGGTGCAAGCTTCT	
Tet2_mice_F	CGCCGAGCCTAGAGAACAGA	250 bp
Tet2_mice_R	CCTGCTTCCAAGCACCGTAG	
Csf2_mice_F	GAAGAGGTAGAAGTCGTCTCTAACGAG	200 bp
Csf2_mice_R	GCATAGGTGGTAACTTGTGTTTCAC	
Cd68_mice_F	ACCTGGACTACATGGCGGTG	245 bp
Cd68_mice_R	CTGGTCACGGTTGCAAGAGA	
Ccl25_mice_F	TGTGAAGAGGGCGATGAGAA	190 bp
Ccl25_mice_R	GTTGGTCTTTCTGGGCATCA	
Hdac2_mice_F	AGAAAGTGTGCTACTACTATGATGGTGA	170 bp
Hdac2_mice_R	AGTCATTTCTTCAGCAGTGGCTTT	
Nox1_mice_F_2	CACTGGCTGGGATAGCAACA	184 bp
Nox1_mice_R_2	AGTCCGAGGGCCACATAAGA	
GADD45A_mice_F	GCTGAGCTGCTGCTACTGGA	157 bp
GADD45A_mice_R	GACTTTCCCGGCAAAAACAA	
Cdk2_mice_F	TGGAGTCCCTGTCCGAACTT	182 bp
Cdk2_mice_R	TTCTGTGTTCCCCACAGCAC	
Bcl2_mice_F	CATGTGTGTGGAGAGCGTCA	152 bp
Bcl2_mice_R	GCATGCTGGGGCCATATAGT	
Bax_mice_F	TCTGGATCCAAGACCAGGGTG	137 bp
Bax_mice_R	GAGGCCTCAGCCCATCTTCT	
Gp91_mice_F	TCGCTGGAAACCCTCCTATG	215 bp
Gp91_mice_R	GGATACCTTGGGGCACTTGA	
Ccna1_mice_F	TAAGGCGTCAAGGAGTGTGC	186 bp

Ccna1_mice_R	AGCCCGTAAATGCAGCAAGT	
Ccl2_mice_F	CTGGAGCATCCACGTGTTGG	166 bp
Ccl2_mice_R	CTTGAGCTTGGTGACAAAACTACAG	
NEP_mice_F	TCAGCCAAAGCAAGCAGCTA	186 bp
NEP_mice_R	CGATGCCCCCATAGTTCAAT	
SOD1_mice_F	GTGCAGGGAACCATCCACTT	143 bp
SOD1_mice_R	CCTGCACTGGTACAGCCTTG	
SOD2_mice_F	ACCTGAGCCCTAAGGGTGGT	131 bp
SOD2_mice_R	CCAGCCTGAACCTTGGACTC	
KGF_mice_F	CGAGCGACACACCAGAAGTT	163 bp
KGF_mice_R	CACGGTCCTGATTTCCATGA	
SPP1_mice_F	GAGGAAACCAGCCAAGGACT	150bp
SPP1_mice_R	TATAGGATCTGGGTGCAGGC	

Tabelle 2-4: Benutzte Primer mit den jeweiligen Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer und der Produktgröße

### 2.1.14 Geräte und Verbrauchsmaterialien für Lasermikrodissektion

O.C.T™ Compound TissueTek®	Sakura Finetek, Staufen
PEN-Membrane	Leica Microsystems, Nussloch
Kryostat CM1850 UV	Leica Biosystems, Nussloch
Laser FTSS 355-50	CryLaS, Berlin
Mikroskop DM6000p	Leica Microsystems, Nussloch
Kamera HVD20	Hitachi, Tokio, Japan

### 2.1.15 Geräte, Software und Chemikalien für Mikroarray Analyse

RNeasy micro Kit	Qiagen, Hilden
Ovation® PicoSL WTA System V2	NuGEN, San Carlos, CA, USA
SureTAG DNA Labeling Kit	Agilent, Santa Clara, CA, USA
SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K Microarray	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Microarray scanner InnoScan 900	Innopsys, Carbonne, Frankreich
Microarray software Mapix	Innopsys, Carbonne, Frankreich

---

## 2.2 Methoden

Alle Methoden wurden von laboreigenen Protokollen übernommen und gemäß durchgeführt.

### 2.2.1 Histologie

Nachdem die Lungen in Paraffin eingebettet worden sind, wurden sie am Mikrotom in 3 µm dicke Schichten geschnitten und auf Objektträger gezogen, welche im Wärmeschrank bei 37 °C trockneten.

#### 2.2.1.1 Analyse der alveolaren Morphometrie anhand von HE-gefärbten Lungenschnitten

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<i>Schritt</i>	<i>Dauer (min)</i>	<i>Reagenz</i>
1	60	Wärmeschrank 60 °C
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	10	Xylol
5	5	Ethanol 99,6 %
6	5	Ethanol 99,6 %
7	5	Ethanol 96 %
8	5	Ethanol 70 %
9	2	<i>Aqua dest.</i>
10	20	Hämalaun nach Mayer, sauer
11	5	Wasser, fließend
12	1	Ethanol 96 %
13	3	Eosin-y-alkoholisch
14	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
15	2	Ethanol 96 %
16	2	Ethanol 96 %
17	5	Ethanol 99,6 %
18	5	Isopropylalkohol 99,8 %
19	5	Xylol

20	5	Xylol
21	5	Xylol
22		Eindecken mit Pertex/ Corbit

Tabelle 2-5: Protokoll für Hämatoxylin-Eosin-Färbung (übernommen von der laboreigenen Arbeitsgruppe)  
 Am Lichtmikroskop wurden alle HE-gefärbte Lungenschnitte verblindet und mit Hilfe des Programms Leica QWin und der für die Analyse entwickelten Makros ausgewertet. Alle Schnitte wurden bei fünffacher Vergrößerung komplett eingescannt, dabei wurden Lungenanteile, die manuell auszuwerten sind, markiert. Anschließend erfolgte die Auswertung bei zehnfacher Vergrößerung an den markierten Lungenabschnitten, wobei der Hintergrund blau markiert wurde. Damit nur Alveolen ausgewertet werden, wurden Gefäße, Bronchien und andere nicht-alveoläre Bereiche manuell abgedeckt. Das Programm errechnet aus dem Bild den Luftanteil in den Alveolen (*air space*), die mittlere Septenwanddicke (*septal wall thickness*) und den durchschnittlichen Abstand zwischen den Septen (*mean linear intercept*). Alle Daten wurden zunächst nach ihrer jeweiligen Messfläche gewichtet und als Excel-Datei gespeichert.

### 2.2.1.2 Analyse der Wandstärke der Gefäße nach Elastika-van-Gieson-Färbung

Die Elastika-van-Gieson-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<i>Schritt</i>	<i>Dauer (min)</i>	<i>Reagenz</i>
0	60	Wärmeschrank 60 °C
1	10	Xylol
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	5	Ethanol 99,6 %
5	5	Ethanol 99,6 %
6	5	Ethanol 96 %
7	5	Ethanol 70 %
8	10-24 h	Resorcin-Fuchsin
9	15	Leitungswasser
10	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
11	5	Fe-Hämatoxylin nach Weigert A und B 1:1
12	abspülen	<i>Aqua dest.</i>

13	15	Leitungswasser
14	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
15	10	van Gieson-Lösung
16	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
17	2	Ethanol 96 %
18	2	Ethanol 96 %
19	5	Ethanol 99,6 %
20	5	Isopropylalkohol 99,8 %
21	5	Xylol
22	5	Xylol
23	5	Xylol
24		Eindecken mit Pertex/Corbit

Tabelle 2-6: Protokoll für Elastika-van-Gieson-Färbung (übernommen von der laboreigenen Arbeitsgruppe)

Zusammensetzung der Resorcin-Fuchsin-Lösung:

- 10 ml Weigert's Resorcin-Fuchsin
- 200 ml einprozentige HCl-Alkohol

Zusammensetzung der van-Gieson-Lösung:

- 240 ml gesättigte Pikrinsäure, filtriert
- 8 ml zweiprozentiges Säurefuchsin
- 4 ml einprozentige Essigsäure

Folgendes Färbeergebnis wurde erzielt:

elastische Fasern	blaubraunschwarz
Zellkerne	braunschwarz
Muskulatur, Epithel, Nerven, Erythrozyten	gelb
Bindegewebe	rot

Tabelle 2-7: Färbeergebnis der Elastika-van-Gieson-Färbung

Die Wandstärkenmessung wurde bei van-Gieson gefärbten Präparaten in zufälliger Reihenfolge verblindet am Lichtmikroskop mithilfe des Programms Leica QWin und des Makros für die Wandstärkenmessung ausgewertet. Bei 63-facher Vergrößerung wurden Gefäße ausgewählt, dessen Lumen, falls sie gefüllt waren, manuell leer retuschiert wurden. Mit einem grünen Punkt wurde das Gefäß selektiert. Anschließend wurde der Hintergrund grau gefüllt und angepasst, sodass das Gefäß sich vom Hintergrund abhebt. Um die Dicke der *Tunica media vasorum* zu bestimmen, wurden Linien vom äußeren

Rand der Schicht ins Lumen des Gefäßes gezogen. Insgesamt wurden pro Schnitt mindestens 95 Gefäße gemessen, wobei 85 kleine (20-70 µm) und 10 mittlere (70-150 µm) Gefäße detektiert wurden. Alle Daten wurden in Excel überführt und gespeichert.

### 2.2.1.3 Analyse des Muskularisierungsgrades der Gefäße nach doppelter Immunfärbung von $\alpha$ -Aktin und vWF

Die doppelte Immunfärbung von  $\alpha$ -Aktin und von Willebrand-Faktor erfolgte nach folgendem Protokoll (Schritte mit ungefähre Zeitangabe wurden unter 10x Mikroskop bei visueller Kontrolle gefärbt):

<i>Schritt</i>	<i>Dauer (min)</i>	<i>Reagenz</i>
0	60	Wärmeschrank 60 °C
1	10	Xylol
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	5	Ethanol 99,6 %
5	5	Ethanol 99,6 %
6	5	Ethanol 96 %
7	5	Ethanol 70 %
8	20	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Methanol 3 %
9	2 x 5	<i>Aqua dest.</i>
10	2 x 5	PBS
11	15	Trypsin bei 38 °C
12	3x5	PBS
13	20	10 % BSA
14	3 x 5	PBS
15	30	<i>Rodent Block M</i>
16	3 x 5	PBS
17	30	$\alpha$ -Aktin Antikörper
18	4 x 5	PBS
19	20	<i>MM HRP Polymer</i>
20	3 x 5	PBS
21	1-4	Vector Vip. Substrat Kit
22	5	Leitungswasser
23	2 x 5	PBS

24	20	10 % BSA
25	3 x 5	PBS
26	20	2,5 % <i>normal Horse Serum</i>
27	30	vWF Antikörper bei 38 °C
28	4 x 5	PBS
29	30	<i>Anti-Rabbit</i> Immunglobuline
30	4 x 5	PBS
31	1-40 s	DAB Substrat Kit
32	5	Leitungswasser
33	2	Methylgrün
34	1	<i>Aqua dest.</i>
35	30 s	Ethanol 96 %
36	30 s	Ethanol 96 %
37	30 s	Isopropylalkohol 99,8 %
38	30 s	Isopropylalkohol 99,8 %
39	2	Xylol
40	2	Xylol
41	2	Xylol
42		Eindecken mit Pertex/Corbit

Tabelle 2-8: Protokoll der doppelten Immunfärbung von  $\alpha$ -Aktin und vWF (übernommen von der laboreigenen Arbeitsgruppe)

Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS):

- 8 g NaCl
- 200 mg KCL
- 1150 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- 200 mg  $\text{KH}_4\text{PO}_4$
- 1 l *Aqua dest.*
- pH auf 7,4 einstellen

Die Muskularisierung wurde bei doppelt immungefärbten Präparaten in zufälliger Reihenfolge und verblindet am Lichtmikroskop mithilfe des Programms Leica QWin und des Makros für die Muskularisierung ausgewertet. Unterm 40x Objektiv wurden Gefäße ausgewählt und das Lumen, falls nötig, mit Weiß überdeckt. Nachdem die Software das Gefäß erkannt hatte, wurde der muskularisierte Anteil, die durch die  $\alpha$ -Aktin-Färbung lila gefärbt wurde, markiert. Hierbei wurden 80 kleine (20-70  $\mu\text{m}$ ) Gefäße und 15 (70-150

---

µm) mittlere Gefäße gemessen. Der Muskularisierungsgrad wurde als Verhältnis prozentual angegeben. Alle Daten wurden in Excel überführt und gespeichert.

## 2.2.2 Proteinanalyse

### 2.2.2.1 Proteinextraktion aus Lungengewebe und Konzentrationsmessung

Um die Proteine aus den Geweben zu isolieren, wurden ca. 30 mg Lungenproben (gefroren bei -80 °C) zu 150 µl *Cell Lysis Puffer* in 2 ml Mikro-Schraubröhren gegeben. Der Lysepuffer wurde zuvor fünffach verdünnt und mit 100 mM Phenylmethansulfonylfluorid im Verhältnis 1:1000 versetzt. Anschließend wurden ca. 10 Keramikkügelchen zu jedem Röhrchen hinzugefügt. Um möglichst vollständig die Gewebestruktur zu zerstören, wurden die Proben für 30 Sekunden bei 6800 Umdrehungen pro Minute im Homogenisator geschüttelt. Nach fünf minütigem Ruhen auf Eis, wurden die Proben fünf Minuten lang bei 15000 rpm (21382 RCF) und 4 °C zentrifugiert, sodass ein *Pellet* entstand. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und die Reste verworfen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des DC™ *Protein Assay Kit* von Bio-Rad, welches ähnlich wie die Methode nach Lowry funktioniert [141]. Auf einer 96-Well Platte wurden die Proben in zehnfacher Verdünnung pipettiert und gemäß dem Protokoll des Herstellers mit den Reagenzien versetzt. Als Referenz wurden folgende Proteinstandards (BSA) verwendet:

S <sub>0</sub> =Lysepuffer	S <sub>1</sub> =0,128 µg/µl
S <sub>2</sub> =0,258 µg/µl	S <sub>3</sub> =0,515 µg/µl
S <sub>4</sub> =1,028 µg/µl	S <sub>5</sub> =2,056 µg/µl

Falls die Blaufärbung der Probe intensiver wirkte als S<sub>5</sub>, so wurde die Vorbereitung mit einer 20fach verdünnten Probe wiederholt. Die Blaufärbung/Extinktion wurde bei 630 nm im *Elisa Reader* gemessen und anhand der Standardproteine in Konzentration umgerechnet.

### 2.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteine nach ihrer Größe in kDa auftrennen zu können, wurden die Proteine mit Lithiumdodecylsulfat versetzt, sodass alle Proteine negativ geladen waren. Alle Proben wurden zunächst mit Lämmli-Puffer auf eine einheitliche Konzentration gebracht und mit

---

vierfacher LDS-Lösung (4x *Laemmli Sample Buffer*, Bio-Rad) und Mercaptoethanol vermischt. Nach zehnmütigem Erhitzen auf 99 °C wurde das Kondenswasser herunterzentrifugiert und 20 µl der Probe in ein 12%iges Acrylamid-Gel, welches mithilfe des *TGX-Stainfree Fastcast Kits* von Bio-Rad gegossen wurde, pipettiert. Als Marker wurde 2,5 µl des *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* von Bio-Rad verwendet. Die Elektrophorese erfolgte anschließend bei 100 V, 400 mA und 150 W für 90 min im Lämmli-Puffer.

Zusammensetzung des Lämmli-Puffers (zehnfach konzentriert):

- Tris, 250 mM, 30,28 g pro Liter
- Glycin, 1,9 M, 144 g pro Liter
- SDS, 1 %, 10 g pro Liter
- Mit Wasser auf 1 Liter auffüllen

### 2.2.2.3 Western Blot

Um die Proteine vom Acrylamid-Gel auf eine PVDF Filtermembran (5,5 cm x 8,5 cm) zu übertragen, wurde die Semi-Dry Transfer Methode angewendet. Nachdem die Filtermembran in Methanol für eine Sekunde aktiviert wurde, wurde sie unter das Acrylamid-Gel gelegt und jeweils zwischen drei Schichten in Transfer-Puffer getränktes Blot-Papier platziert, welches auf einer Semi-dry Transferzelle gelegt wurde. Der Transfervorgang geschah bei 20 V, 300 mA und 150 W für eine Stunde. Die Filtermembran wurde anschließend in 5%ige Milch für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken.

Zusammensetzung des Semi-Dry-Transfer-Puffers:

- Tris, 11,6 g
- Glycin, 5,8 g
- SDS, 20 %, 3,7 ml
- Methanol, 400 ml
- Mit Wasser auf 2 Liter auffüllen

Zusammensetzung des Waschpuffers (zehnfache Konzentration):

- Tris, 24,23 g
- NaCl, 1,5 M, 87,66 g
- 1 l *Aqua dest.*

- 
- pH auf 7,5 einstellen
  - Einfache Konzentration mit 1 ml/l Tween versetzen

Zusammensetzung der 5%igen Milch:

- 5 g Milchpulver in 100 ml Waschlösung

#### **2.2.2.4 Inkubation mit Antikörper und Bildgebung**

Gebloottete Membranen wurden über Nacht in der primären Antikörper-Lösung bei 4 °C und nach mehrmaligem Waschen in Waschlösung, für eine Stunde im Sekundärantikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Nach weiterem Waschen wurden die Membranen mit einer *Enhanced chemiluminescence* (ECL) – Substrat, welches Luminol-haltig ist und Substrat der Peroxidase ist, versetzt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit wurde bei 428 nm ein Bild der Membran mit dem ChemiDoc XRS+ *Imager* und der Software *Image Lab* geschossen.

#### **2.2.2.5 Strippen der Membranen**

Um die PVDF-Membran vom benutzten Antikörper zu befreien, wird sie in einer Stripping-Lösung für eine Stunde gelegt. Nach mehreren Waschrufen kann die Membran erneut mit Antikörpern inkubiert werden.

Zusammensetzung der Stripping-Lösung:

- 90 ml *Aqua dest.*
- 10 ml Glycin
- 2 ml 37 % HCL

### **2.2.3 DNA-Microarray Analyse**

#### **2.2.3.1 Anfertigen von Kryoschnitten der Lungen, Lasermikrodissektion, RNA-Isolation und *Single Primer Isothermal Amplification* (SPIA)**

In Tissue-Tek® O.C.T™ *compound* eingebettete Lungenstücke wurden mit derselben Substanz an einem Kryostat-Stempel befestigt und bei -20 °C in 8 µm dicke Schichten geschnitten und auf eine Glasplatte mit einer PEN-Membran gezogen. Anschließend wurden die Platten nach folgendem Protokoll mit Hämalaun gefärbt:

- 
- 40 s in Hämalaun (Hämalaun-Wasser 4:6)
  - 10 s in Leitungswasser
  - 2 x 10 s in 70%ige Ethanol
  - 2 x 10 s in 96%ige Ethanol
  - 2 x 10 s in 99,6%ige Ethanol

Hämalaun gefärbte Lungen wurden im Mikroskop für die Mikrodissektion eingespannt und luftgetrocknet. Mit Hilfe eines Lasers (FTSS 355-50 CryLaS, Berlin) wurden jeweils 40 intrapulmonale Arterien und 15 Septenareale herausgeschnitten, die in 0,5 ml Reagiergefäße mit 300 µl RLT-Puffer isoliert gesammelt wurden. Nach dem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufreinigung bei -80 °C aufbewahrt. Die Aufreinigung der RNAs wurde mit dem *RNeasy Micro Kit* von Qiagen nach Hersteller-Protokoll durchgeführt, sodass 15 µl gelöste und aufgereinigte RNA Lösung produziert wurde. Da die Menge der RNA aus den Dissektaten für eine Mikroarray Analyse nicht ausreichte, wurde eine Amplifikation und cDNA Umschrift nach der SPIA-Methode durchgeführt. Dabei wurden chimäre DNA/RNA-Primer und eine Reverse Transkriptase verwendet, die in zwei Schritten eine doppelsträngige cDNA synthetisierten. Mit Hilfe einer RNase H wird der RNA-haltige Kopf abgespalten, sodass eine neue Primer-Sequenz binden konnte. Hierdurch war eine lineare Amplifikation ohne Sättigung möglich.

### **2.2.3.2 DNA-Mikroarray**

Um die Gen-Analyse durchzuführen, wurden die amplifizierten und umgeschriebenen Proben mit Cy3 oder Cy5 markiert. Gemäß Herstellerangaben wurden die Mikroarrays pipettiert und inkubiert. Mit Hilfe eines Scanners wurden die Platten in hoher Auflösung fotografiert und die Intensität der Signalpunkte mit der Software Mapix von Innopsys ausgewertet. Ein starkes Signal entspricht einer großen Menge des Farbstoffes, was einer großen Menge cDNA entspricht.

Die Auswertung und die grafische Darstellung der Daten wurden freundlicherweise von Dr. Jochen Wilhelm von der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. *Pathway*-Analysen bzw. Gen-Set Tests griffen auf die „*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*“ Datenbank zurück, während die Datenbank *mirTargets* und *tfTargets* als Referenz für die miRNA bzw. Transkriptionsfaktoren benutzt wurden. Um die Gruppen

---

„WT<sub>kein Rauch</sub>“, „WT<sub>Rauch</sub>“, „NoxO1<sub>Rauch, kein Tam</sub>“ und „NoxO1<sub>Rauch, Tam</sub>“ zu vergleichen, wurden drei Vergleiche gemacht. Erster Vergleich (SE) wurde zwischen „WT<sub>Rauch</sub>“ und „WT<sub>kein Rauch</sub>“ gezogen, um den Effekt der Rauchexposition (*smoke exposure*) zu untersuchen. Zweiter Vergleich (KO) wurde zwischen „NoxO1<sub>Rauch, kein Tam</sub>“ und „WT<sub>Rauch</sub>“ gezogen, um Effekte der LoxP-Cre Methode zu untersuchen. Dritter Vergleich (Tx) wurde zwischen „NoxO1<sub>Rauch, Tam</sub>“ und „NoxO1<sub>Rauch, kein Tam</sub>“ gezogen, um Effekte des *Knockouts* durch Gabe von Tamoxifen zu untersuchen. Weitere Gruppenvergleiche siehe Ergebnisteil.

## 2.2.4 RNA-Analyse

### 2.2.4.1 RNA-Lyse aus Lungengewebe und RNA-Aufreinigung

Um RNA zu gewinnen, wurden ca. 30 mg Lungengewebe (gefroren bei -80 °C) zu 350 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) in 2 ml Mikro-Schraubröhren gegeben. Jeder Milliliter RLT-Puffer wurde zunächst mit 10 µl Mercaptoethanol versetzt. Anschließend erfolgte das Homogenisieren und Zentrifugieren der Proben ähnlich wie die Proteinextraktion (siehe Kap. 2.2.2.1). Die RNA wurden mit Hilfe des RNeasy Mini Kits aufgereinigt. Dabei wurden 300 µl 70%igen Ethanol und 300 µl des Homogenisatüberstands, in eine Mini-Spinsäule gegeben und bei 10000 rpm und Raumtemperatur für 15 s zentrifugiert. Nachdem Austauschen des Auffanggefäßes wurden die Proben mit 700 µl RW1-Puffer versetzt und wie im vorherigen Schritt zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit 500 µl RPE-Puffer zweimal wiederholt. Nach einem zweiminütigen Zentrifugieren wurden die Säulen bei 12000 rpm für eine Minute nochmals zentrifugiert. Um die aufgereinigte RNA in Lösung zu bringen, wurden 35 µl destilliertem & RNase-freiem Wasser in die Säulen gegeben und eine Minute lang zentrifugiert.

### 2.2.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Um die RNA-Konzentration der Proben zu bestimmen, wurde die Extinktion mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. 260 nm entspricht dem Absorptionsmaximum von DNA & RNA und 280 nm von Proteinen, sodass ein Quotient von  $A_{260}/A_{280} > 2$  für eine RNA-Isolation nahezu frei von Protein-

---

Kontaminationen deutet. Ein Extinktionsquotient von 1 entspricht bei einer unverdünnten Probe 40 ng/μl RNA, sodass die Konzentration daraus berechnet werden konnte.

### 2.2.4.3 cDNA-Umschrift

Alle Proben wurden auf eine RNA-Konzentration von 50 ng/μl verdünnt. Zu 15 μl verdünnter Probe wurden 4 μl 5x *iScript reaction mix* und 1 μl Reversetranskriptase hinzugefügt. Anschließend wurde die RNA im *Thermocycler* umgeschrieben. Die Umschrift erfolgte nach folgendem Temperaturzyklus:

- 5 min 25 °C - 30 min 42 °C - 5 min 85 °C – 4 °C

### 2.2.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR und ihre Auswertung

Auf einer 96-Well Platte wurde jede Probe doppelt aufgetragen. Zu 1 μl cDNA wurden 5 μl SYBR-Lösung, 3,5 μl DNase freies Wasser und 0,5 μl Primergemisch, welches sich aus einem Zehntel Vorwärtsprimer, einem Zehntel Rückwärtsprimer und acht Zehntel Wasser zusammensetzt, hinzugefügt. Jede Platte enthielt Primer für ein Referenzgen, womit eine relative Quantifizierung möglich war. Nachdem die Platte versiegelt und zentrifugiert wurde, wurde sie in einem *Real Time PCR Cycler* gegeben. Das Protokoll enthält 39 Zyklen mit einer anschließenden Schmelzkurvenmessung, die die Spezifität des DNA-Produkts bestimmt.

Start	95 °C
1 s	95 °C
1 s	59 °C
5 s	72 °C
39 Zyklen der oberen drei Schritte	
Anschließend Schmelzkurvenanalyse	

Tabelle 2-9: Protokoll der *Real Time* PCR Zyklen. Die Zeiten gelten ab Erreichen der jeweiligen Temperatur.

Die Differenz  $\Delta Ct$  zwischen Referenz und Zielgen errechnete sich wie folgt:

$$\Delta Ct = Ct(\text{Referenz}) - Ct(\text{Zielgen})$$

---

#### 2.2.4.5 Verifizierung der PCR Ergebnisse mit Hilfe der DNA-Gelelektrophorese

Bei jeder Real Time PCR Platte wurden stichprobenartig DNA-Produktgrößen mit einer Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurden zunächst 1,5%ige Agarose Gele im TAE-Puffer angefertigt. Jedes Gel enthielt 2 µl *SYBR safe DNA gel stain*. 10 µl Probe wurden gemeinsam mit 2 µl Loading Dye auf das Gel aufgetragen und als Marker dienten 3 µl DNA 100 plus *ladder*. Die Elektrophorese passierte bei Einstellungen von 120 V, 100 W und 120 mA für 40 min. Um die Anzahl der Basenpaare zu bestimmen wurden mit dem *Imager ChemiDoc XRS+* Bilder der Gele geschossen und mit Hilfe der *Software Image Lab* von Bio-Rad ausgewertet.

Zusammensetzung des TAE-Puffers (50fache Konzentration, pH=8):

- 242 g Tris
- 57 ml Essigsäure
- 100 ml EDTA (14,6 g)

#### 2.2.5 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 6 durchgeführt. Bei Vergleich von mehreren Gruppen wurde eine Two-Way-ANOVA durchgeführt. Bei Vergleichen von Wildtypen, die lediglich der Referenz dienen, wurde der T-Test angewendet. Ergebnisse wurden als Mittelwert mit ihrem Standardfehler abgebildet. In allen Analysen wurde das Signifikanzniveau auf 5 % festgesetzt. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden mit „\*“ markiert, wobei \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$  und \*\*\* =  $p < 0,0001$ . Da im folgenden Versuchsgruppen verglichen werden, die sich stets in zwei Parametern unterscheiden (Rauchexposition durchgeführt/ nicht durchgeführt und Knockout induziert und nicht induziert) wird zur statistischen Analyse die Interaktion der zwei Parameter berechnet. Der Effekt der Reversibilität bedarf im Vorfeld eine durchgeführte Rauchexposition und anschließender Knockoutinduktion, sodass solitär die Interaktion der Parameter den Effekt zeigen. Effekte, die lediglich nur auf die Rauchexposition oder auf die KO-Induktion zurückzuführen sind, werden gesondert erwähnt.

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Histologische Validierung der Lungen-Regeneration durch post-Rauch-induzierte NoxO1-Defizienz

Wie bereits in Kapitel 1.3.4 beschrieben, zeigten vorrausgegangene *in vivo* Lungenfunktionstests Anzeichen einer vaskulären und alveolären Regeneration nach Tamoxifen-induzierter NoxO1-KO-Induktion und vorheriger Rauchexposition. Die Regeneration galt es durch histologische Quantifizierung zu verifizieren und zu visualisieren. Sowohl das Ausmaß des Lungenemphysems als auch die Gefäßveränderungen wurden histologisch untersucht.

#### 3.1.1 Emphysemrückbildung in NoxO1-defizienten Mäusen

Um das rauchinduzierte Lungenemphysem zu quantifizieren, wurden der prozentuale Luftanteil (*Airspace*), der durchschnittliche intraalveoläre Abstand (*Mean linear intercept*, MLI) und die Septumdicke anhand von HE-gefärbten Lungenschnitten gemessen. Hohe Werte in *Airspace* und MLI und niedrige Werte in der Septumdicke sprechen für ein Emphysem. Wie in der Abbildung 3-1 zu sehen, weisen Mäuse ohne Tamoxifen-induzierte NoxO1-KO-Induktion, genauso wie die Wildtypen, nach Rauchexposition emphysematische Veränderungen auf. Diese sind sichtbar anhand des Luftanteils, des MLIs und der Septumdicke. NoxO1-KO-Induktion nach 8-monatige Zigarettenrauch Exposition und anschließender Regenerationsphase bewirken eine Rückbildung der emphysematischen Veränderungen (Abb. 3-1 A). Ebenfalls ergab die Luftanteilmessung eine signifikante Interaktion ( $p = 0,02$ ) zwischen Rauchexposition und NoxO1-KO-Induktion (Abb. 3-1 A). Ähnliche Ergebnisse waren ebenfalls in der Septumdickenmessung und in der Messung der alveolären Septenabstand ersichtlich. Jedoch hierbei ohne eine signifikante Interaktion (Abb. 3-1 B,C).

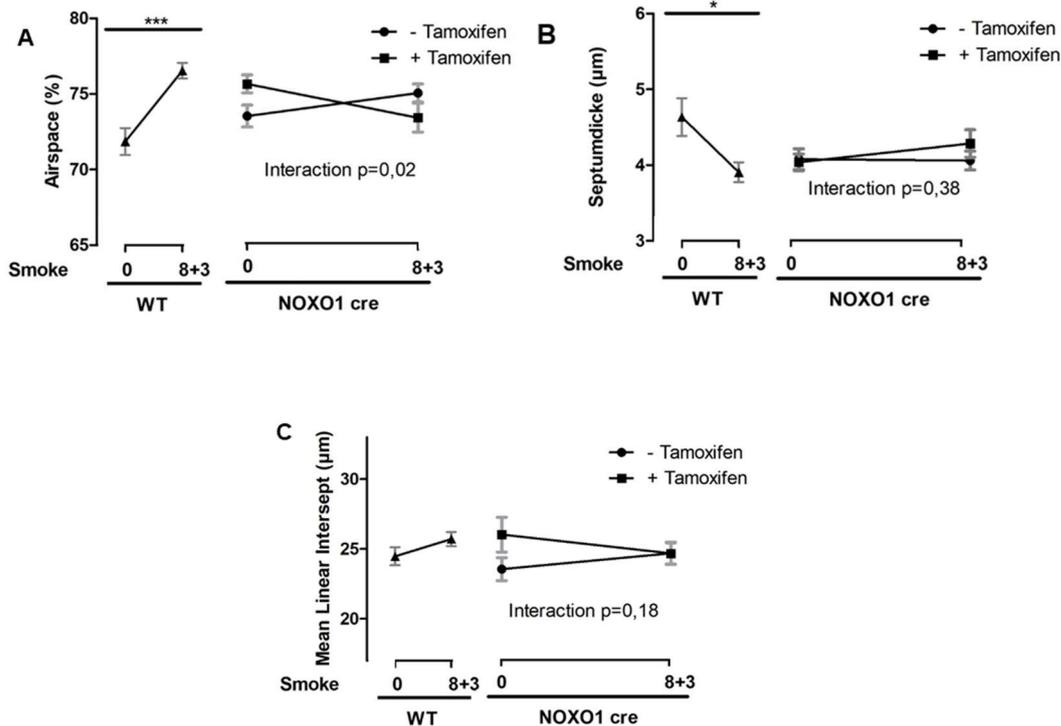


Abbildung 3-1: Messdaten der Alveolarmorphometrie von Wildtyp- und NoxO1 *Knockout*-fähigen Mäusen, jeweils mit und ohne Zigarettenrauchexposition. Bei der Hälfte der NoxO1 Cre Mäuse wurde ein *Knockout* post-Rauchexposition durch Tamoxifengabe induziert. Es wurden hierfür Lungenschnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung untersucht. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige Raumluftexposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. Die Interaktion stellt hierbei die Effekte der Regeneration dar, welches sich aus den Parametern „Rauchexposition“ und anschließender „KO-Induktion“ zusammensetzt. n=7-9. A) Alveolärer Luftanteil (*Airspace*). B) Durchschnittliche Septumdicke. C) Mittlerer Alveolenseptenabstand (mean linear intercept).

### 3.1.2 Regeneration in Wandstärke und Muskularisierungsgrad der Lungengefäße bei NoxO1-defizienten Mäusen nach vorher bestehender pulmonaler Hypertonie

Um rauchinduzierte vaskuläre Veränderungen zu quantifizieren, wurden bei kleinen Gefäßen (20-70 µm im Durchmesser) und mittelgroßen Gefäßen (70-150 µm im Durchmesser) die durchschnittliche Dicke und der prozentuale Muskularisierungsgrad der Gefäßwand gemessen. Eine erhöhte Dicke und ein höherer Muskularisierungsanteil spiegeln eine pathologische Veränderung auf Grund des Rauches wider (Intimahyperplasie, vermehrte Tunica media Muskularisierung). Mausgruppen ohne NoxO1-KO-Induktion entwickelten nach der Rauchexposition, wie WT Kontrollgruppen, dickere Gefäßwände (Abb. 3-2), die ihrerseits vermehrt muskularisiert waren (Abb. 3-3). Diese Veränderung war besonders in kleinen Gefäßen sichtbar, wohingegen mittelgroße Gefäße lediglich Tendenzen einer solchen Veränderung zeigten. NoxO1-depletierte

Gruppen zeigten eine Rückbildung der Wanddicke und Muskularisierung, welche signifikant in Gefäßen der Größe 20-70  $\mu\text{m}$  war ( $p=0,006$ ). In mittelgroßen Gefäßen war ebenfalls die Rückbildung zu erkennen, allerdings wurde diese durch die größere physiologische Streuung der Messergebnisse überlagert (Abb. 3-3 B). Abbildung 3-2 C und Abbildung 3-2 C zeigen vier repräsentative histologische Ausschnitte mit jeweils einer Gefäßdarstellung, wobei die rauchexponierte Wildtypgruppe und die rauchexponierte NoxO1-Gruppe ohne Tamoxifen induziertem *Knockout* sichtbar dickere Gefäßwände mit einer dickeren und kräftigeren Muskelschicht aufweisen.

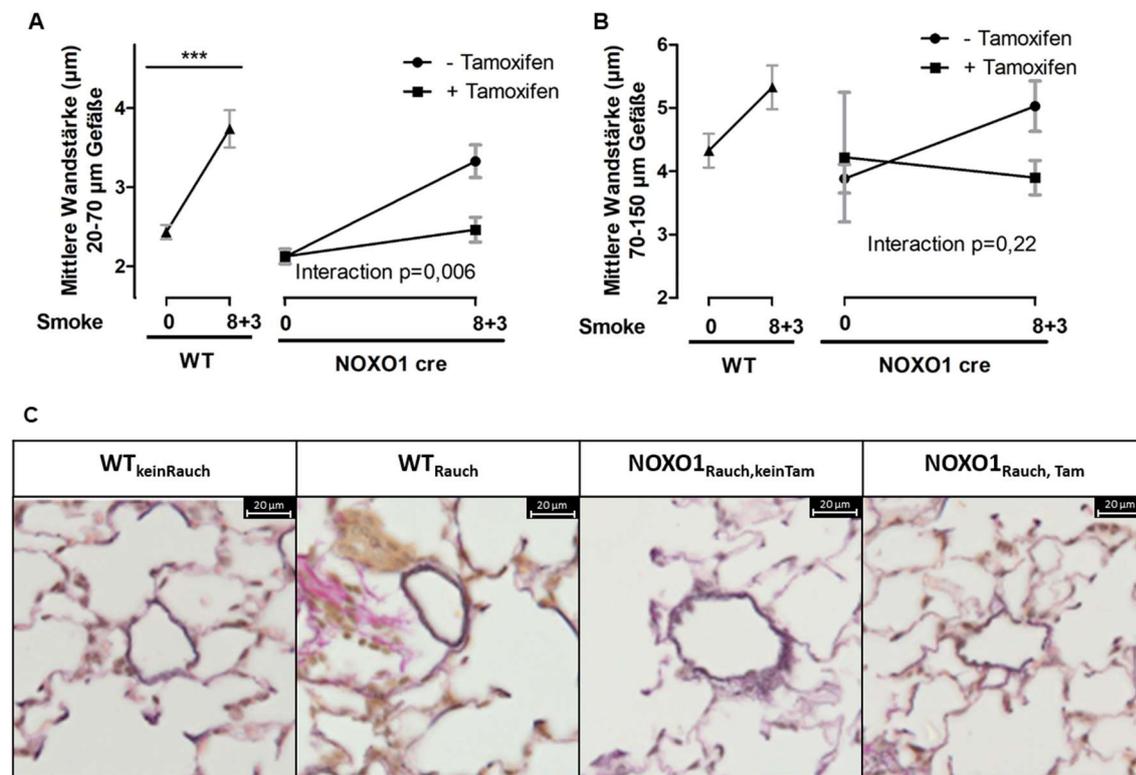


Abbildung 3-2: Untersuchung der mittleren Wandstärke der pulmonalen Gefäße nach Rauchexposition in WT, NoxO1-*Knockout* nicht-induzierten und induzierten Mausgruppen. Hierfür wurden Lungenschnitte in Elastika-van-Gieson-Färbung untersucht. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige Raumlufteexposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt.  $n=5$ . A) Gefäße zwischen 20-70  $\mu\text{m}$  im Innendurchmesser. B) Gefäße zwischen 70-150  $\mu\text{m}$  im Innendurchmesser. C) Exemplarische Bilder zur Visualisierung.

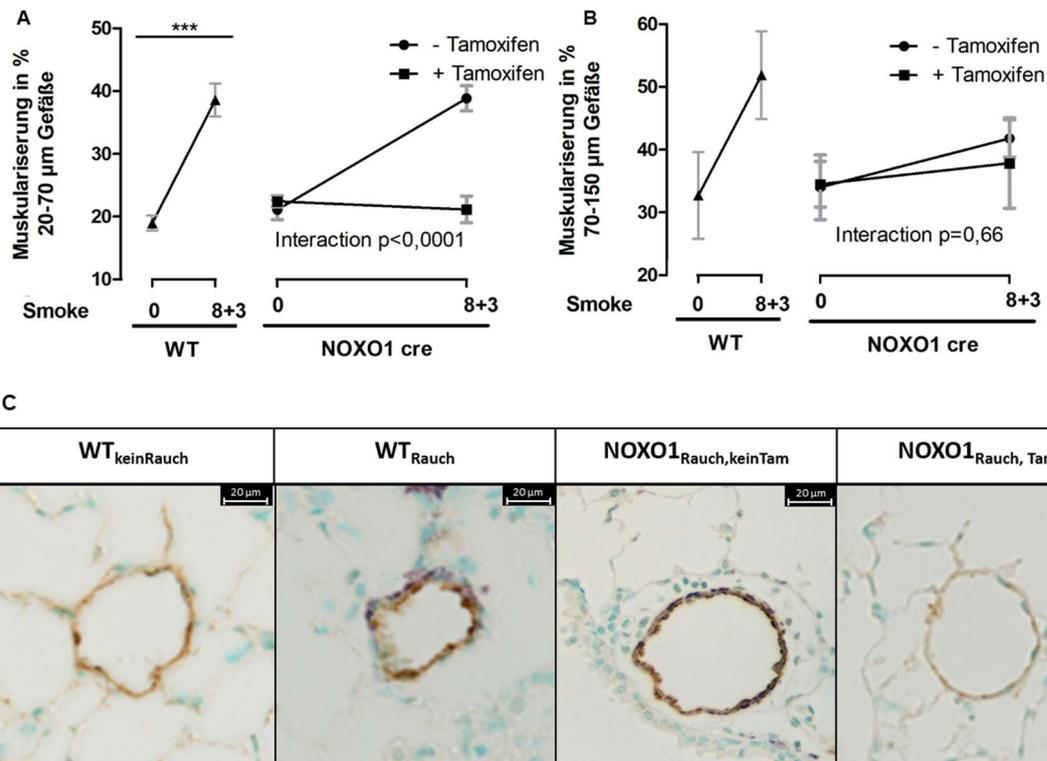


Abbildung 3-3: Untersuchung des Muskularisierungsgrades der pulmonalen Gefäße nach Rauchexposition in WT, NoxO1-Knockout nicht-induzierten und induzierten Mausgruppen. Hierfür wurden Lungenschnitte mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Aktin und von-Willebrand-Faktor gefärbt und untersucht. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige Raumluftexposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=5. A) Gefäße zwischen 20-70  $\mu$ m im Innendurchmesser. B) Gefäße zwischen 70-150  $\mu$ m im Innendurchmesser. C) Exemplarische Bilder zur Visualisierung.

### 3.2 Untersuchung der NoxO1 Protein- und mRNA-Menge nach KO-Induktion

Abbildung 3-4 zeigt, dass die NoxO1 Proteinmenge durch Rauchexposition in Mausgruppen mit LoxP-flankierten NoxO1-Gen stark zunimmt, während in Mausgruppen, welche nach achtmonatiger Rauchexposition und anschließender Tamoxifen-induziertem NoxO1-Knockout im Westerblot keine NoxO1 Proteine nachweisbar waren.).

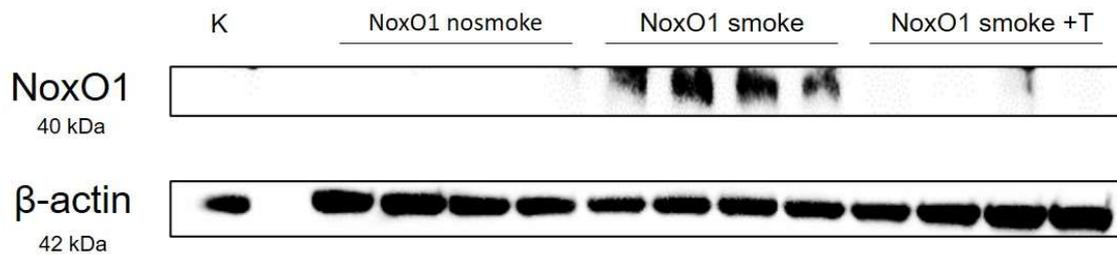


Abbildung 3-4: Quantitative Proteinanalyse von Lungenhomogenat von NoxO1 mittels Western Blot, als Referenzstandard wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Es wurden Mausgruppen mit LoXP-flankiertem NoxO1-Gen verwendet („NoxO1“). „nosmoke“ Mausgruppen stellen Gruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar. Zudem wurden Mausgruppen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition mit und ohne anschließender Tamoxifengabe untersucht (NoxO1 smoke & NoxO1 smoke +T). Als Kontrollgruppe „K“ wurde eine konstitutionell NoxO1-defiziente Mausgruppe verwendet. Bilder des kompletten Westerblots im Anhang. Analyse durchgeführt durch S.Hadzic. n=4.

### 3.3 Untersuchung der molekularen Regenerationsvorgänge

#### 3.3.1 Veränderung der Proteinexpression von Nitrotyrosin, MMP9, TIMP3 und FGF10 nach Tamoxifen-induzierter NoxO1-Defizienz

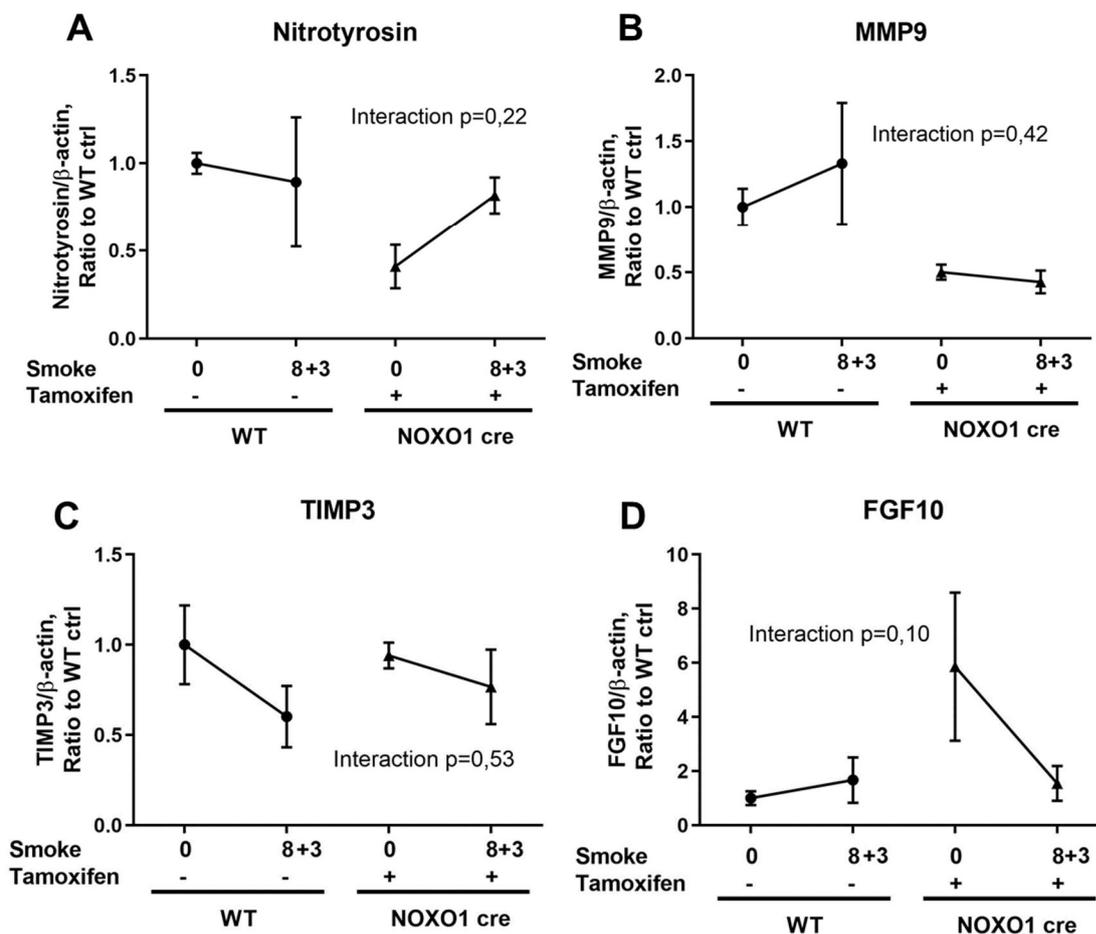
Um Effekte des Zigarettenrauchs und der NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifen auf die Proteinexpression zu untersuchen, wurden mittels Western Blot Technik ausgewählte Proteine analysiert. Nitrotyrosin, als Produkt des oxidativen Stresses, kann Hinweise auf eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) geben, die mit einer Schädigung der Lunge einhergehen. Es entsteht aus der Reaktion von Peroxynitrit und Tyrosinresten von Proteinen [142]. Aus Abbildung 3-5 A ist ersichtlich, dass keine signifikante Veränderung der Nitrotyrosinmenge im WT nach Rauchexposition und anschließender Erholungsphase erkennbar ist. Nach post-Rauch NoxO1-KO-Induktion ließen sich höhere Nitrotyrosinwerte messen.

MMP9 und TIMP3, die entzündungsassoziiert reguliert werden und mit Gewebszerstörung bzw. der Gegenregulation der Gewebsdestruktion einhergehen, gestatten einen Einblick in die stattgefundenen Lungendestruktion. Sowohl im WT, als auch in NoxO1-KO Mäusen sind post-Rauch keine signifikante Veränderung zu detektieren, jedoch bewirkte die Tamoxifen induzierte NoxO1-KO in Raumluft und Rauch exponierte Mausgruppen deutlich niedrigere MMP9 Mengen als in WT Mäusen (Abb. 3-5. B,E). Abbildung 3-5 C und F zeigen die TIMP3 Expression in WT und NoxO1-

KO Gruppen. Bei ähnlichem Ausgangswert der Raumluft exponierten Kontrollgruppen zeigen sowohl WT als auch NoxO1-KO Gruppen eine rauchbedingte Senkung der Proteinmenge, jedoch ist diese in NoxO1-KO Gruppen milder ausgeprägt.

FGF10 ist ein wichtiges Protein für die embryonale Lungenentwicklung und -reifung [143] und stellt, aus Vorarbeiten des Labors ersichtlich, ein potentielles Zielprotein der Lungenregeneration nach NoxO1-Defizienz dar. Rauchexposition bewirkte in WT tendenziell eine Steigerung der Menge von FGF10 (Abb. 3-5 D, G). In Gruppen ohne NoxO1 sank die Menge des Proteins nach Zigarettenrauch signifikant ab, bei in Vergleich zum WT hohem Ausgangswert.

Insgesamt wurden bei allen Western Blots Proteinanalysen die Interaktion zwischen Wildtypgruppen und NoxO1-KO induzierte Mausgruppen mit und ohne 8-monatige Zigarettenrauchexposition untersucht. Eine Analyse der Mausgruppen mit LoXP-Flankierung und vorhandener Cre-Rekombinase ohne KO-Induktion fand hierbei nicht statt. Originalbilder der benutzen Western Blots sind in Kapitel 11 angehängt.



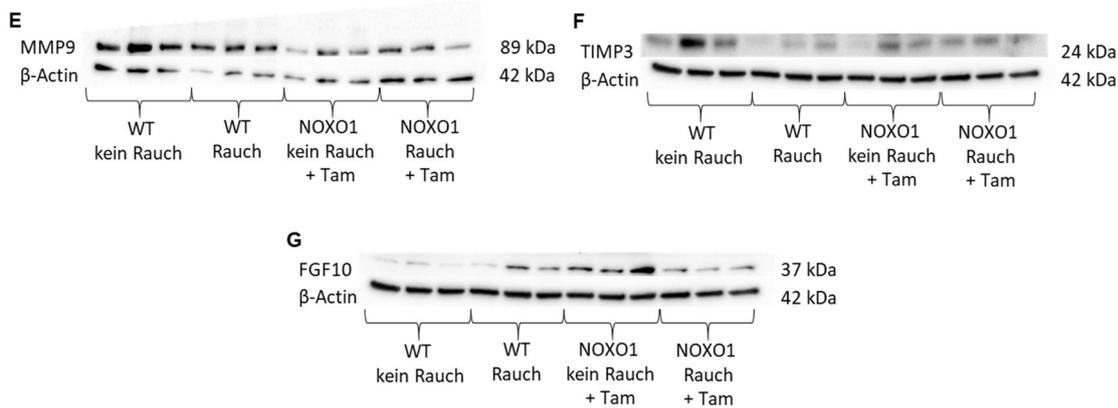


Abbildung 3-5: Quantitative Proteinanalyse von Lungenhomogenat mittels Western Blot, als Referenzstandard wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Es wurden WT und post-Rauch NoxO1 defiziente Gruppen untersucht, jeweils nach Rauchluft- und 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Gruppen in Relation zur WT-Gruppe ohne Rauchexposition gesetzt. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige Raumlufteexposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=6. A) relative Nitrotyrosinmenge. B,E) Relative MMP9-Menge und exemplarischer Blot. C,F) Relative TIMP3-Menge und exemplarischer Blot. D,G) Relative FGF10-Menge und exemplarischer Blot.

### 3.3.2 Genexpressionistischer Effekt der Lungenregeneration durch NoxO1-Defizienz

#### 3.3.2.1 Effekte der NoxO1-KO-Induktion auf spezifische RNA-Sequenzen im Homogenat

Da *in vivo* auf mRNA Ebene eine Vielzahl an Regulationsmechanismen greifen, ist es für die Fragestellung interessant, in welcher Menge spezifische RNAs exprimiert werden. Es ist zu beachten, dass die alleinige Menge einer RNA lediglich Hinweise auf die Proteinregulation liefern kann und posttranslationale Veränderungen ebenso die Funktion beeinflussen können. Häufig korrelieren aber mRNA und Proteinregulation, sodass die Regulation bestimmter mRNA Gruppen Hinweise über Entzündungsstatus (*Cd68*, *Csf2*, *Tlr4*), Zellproliferation (*Cdk2*, *Ccnal*, *Fgf10*, *Kgf*, *Hhip*), Apoptose (*Bax*), Transkriptionsaktivität (*Hdac2*, *Kansl1*), extrazelluläre Veränderungen (*Mmp9*, *Mmp12*, *Timp3*, *Spp1*) und Ausmaß des oxidativen Stresses (*Nox1*, *Gp91*, *Sod1*, *Sod2*, *Ho1*) in den Lungen gibt. Da die Lox-Flankierung des NoxO1-Gens eine Manipulation des Genoms darstellt, könnten Veränderungen der Genexpression bereits hierdurch erfolgen. Durch Untersuchung der Kontrollgruppen „NoxO1 ctrl“ und „NoxO1 smoke“, die beide keine Cre induzierten NoxO1-KO aufweisen, ist es möglich, die Effekte der solitären *Knockout*-Fähigkeit von denen des eigentlichen *Knockouts* zu unterscheiden. Die *Knockout*-Fähigkeit bezieht sich hierbei auf das Vorhandensein der LoxP-Flankierung von NoxO1

---

und der inaktiven Estrogenrezeptor-gekoppelten Cre-Rekombinase in C57BL/6 Mäusen. Wenn die Genexpression von Gruppen ohne Tamoxifen-Induktion sich ähnlich verhalten, wie Gruppen mit Induktion und beide sich stark von WT Gruppen unterscheiden, spricht es für Effekte der *Knockout*-Fähigkeit der Lox-Cre-Mäuse. In der Tat ist dies bei einer Vielzahl von Targets zu beobachten (Abb. 3-6 C, 3-7 C, 3-9 D).

Gemäß der Funktion der korrespondierenden Proteine, wurden die *Targets* in Gruppen eingeteilt. Die Gruppe „Extrazelluläre Matrix“ enthielt *Mmp9*, *Mmp12*, den MMP-Inhibitor *Timp3* und *Spp1*. Entgegen der im Kapitel 3.3.1 beschriebenen post-Rauch steigenden Proteinmenge von MMP9 in WT, wurde *Mmp9* auf mRNA-Ebene im WT signifikant herunterreguliert. Trotz der gleichbleibenden Proteinexpression von MMP9 in NoxO1-KO Gruppen nach Rauchexposition, erfolgte für *Mmp9* eine signifikante Hochregulation durch *Knockout*-Induktion und Rauchexposition ( $p=0,001$ ). *Mmp12* zeigte keine signifikante Veränderung im WT durch Rauchexposition. Ebenfalls sind Veränderungen der mRNA-Menge in NoxO1-KO Gruppen marginal (Abb. 3-6 B ). *Timp3* zeigte, wie auf Proteinebene (Abb. 3-6 C), eine Herunterregulation post-Rauch im WT. Jedoch spiegeln die ähnlichen Verläufe der NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen Effekte der Genmanipulation der Mäuse vor Tamoxifengabe und Rauchexposition wider. Post-Rauch fand sich in beiden Gruppen eine Hochregulation der mRNA (Abb. 3-6 C). Die klinisch in COPD-Patienten festgestellte massive Erhöhung der Osteopontin-Proteinmenge im Sputum, als Schlüsselprotein der Pathogenese, trat auf mRNA Ebene im Lungengewebe von Mäusen nicht auf. Für *Spp1* (Osteopontin mRNA) zeigte sich keine Regulation nach Rauchexposition oder *Knockout*-Induktion (Abb. 3-6 D)

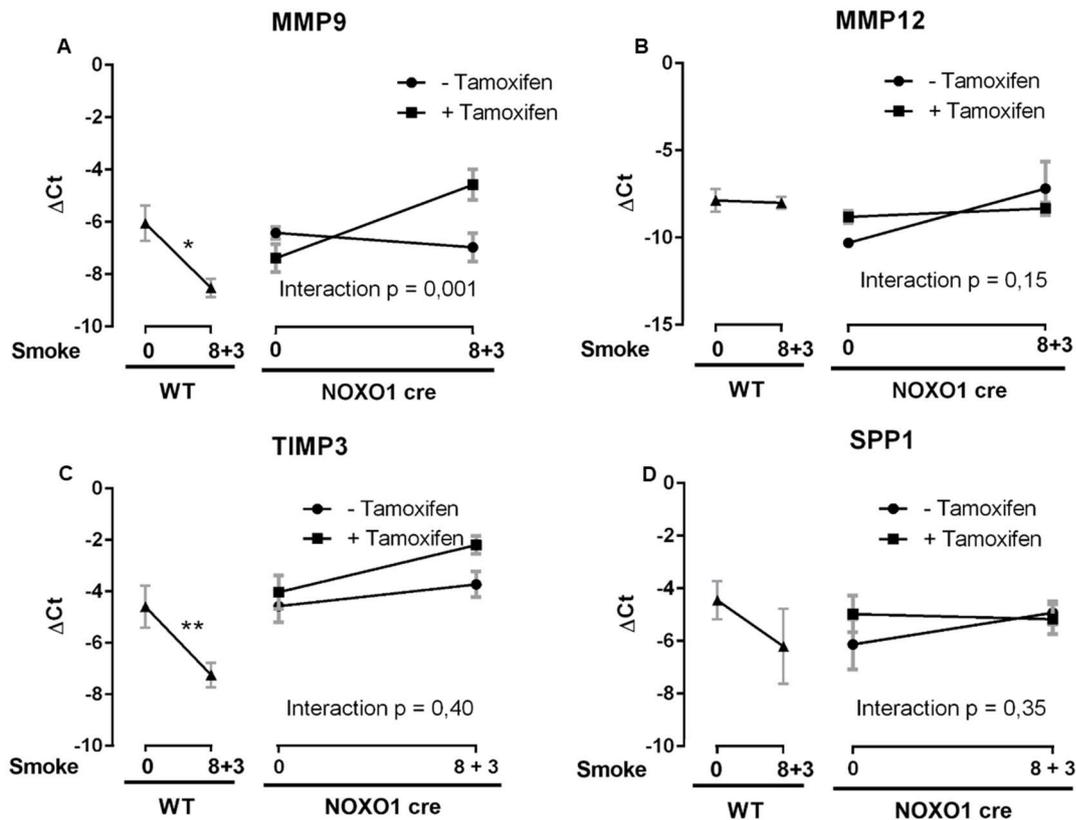


Abbildung 3-6: Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) der Gene der Gruppe „Extrazelluläre Matrix“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige Raumluftexposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=3.

Für die Gruppe „Immunologie“ wurden *Cd68*, *Csf2* und *Tlr4* ausgewählt. *Cd68* ist spezifisch exprimiert in Monozyten und ihre mRNA-Regulation kann auf eine vermehrte Entzündungsreaktion hinweisen. Im WT stieg die mRNA-Menge post-Rauch an, jedoch zeigte sich keine *Cd68*-Reduktion durch KO-Induktion nach dem Rauchen. Vielmehr stieg die mRNA-Menge tendenziell eher an, während ohne KO-Induktion die mRNA-Menge tendenziell sank (Abb. 3-7 A). Der Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierende Faktor (kurz GM-CSF), als Produkt des Gens *Csf2*, fördert die Granulozyten- und Monozytendifferenzierung. Im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion werden vermehrt Granulozyten und Monozyten gebildet, sodass es interessant ist die GM-CSF Regulation zu untersuchen. In WT Gruppen konnten im Versuch keine Regulationsunterschiede festgestellt werden. Durch NoxO1 *Knockout* stieg die mRNA-Menge post-Rauch weniger stark an als im Vergleich zu Gruppen ohne *Knockout*-Induktion (p=0,09) (Abb.3-7 B). *Toll-like-receptor 4* (TLR4) als transmembranöses Protein aktiviert nach Ligandenbindung intrazelluläre inflammatorische Zytokinproduktion. Als Ligand dienen Lipopolysaccharide (Bestandteil vieler

gramnegativer Bakterien) und virale Proteinstrukturen, aber auch endogene Proteine, wie das *heat-shock-protein* [144, 145]. So wird das *Tlr4*-Gen im WT nach dem Rauchen signifikant herunterreguliert, während durch die *Knockout*-Fähigkeit sowohl KO-induzierte als auch KO-nicht-induzierte Gruppen nach der Rauchexposition einen Anstieg der *Tlr4*-mRNA-Menge erfuhren ( $p=0,02$ , nicht in Abb.) (Abb.3-7 C). Ebenfalls stieg hierbei durch die KO-Induktion die mRNA-Menge signifikant an ( $p=0,002$ ).

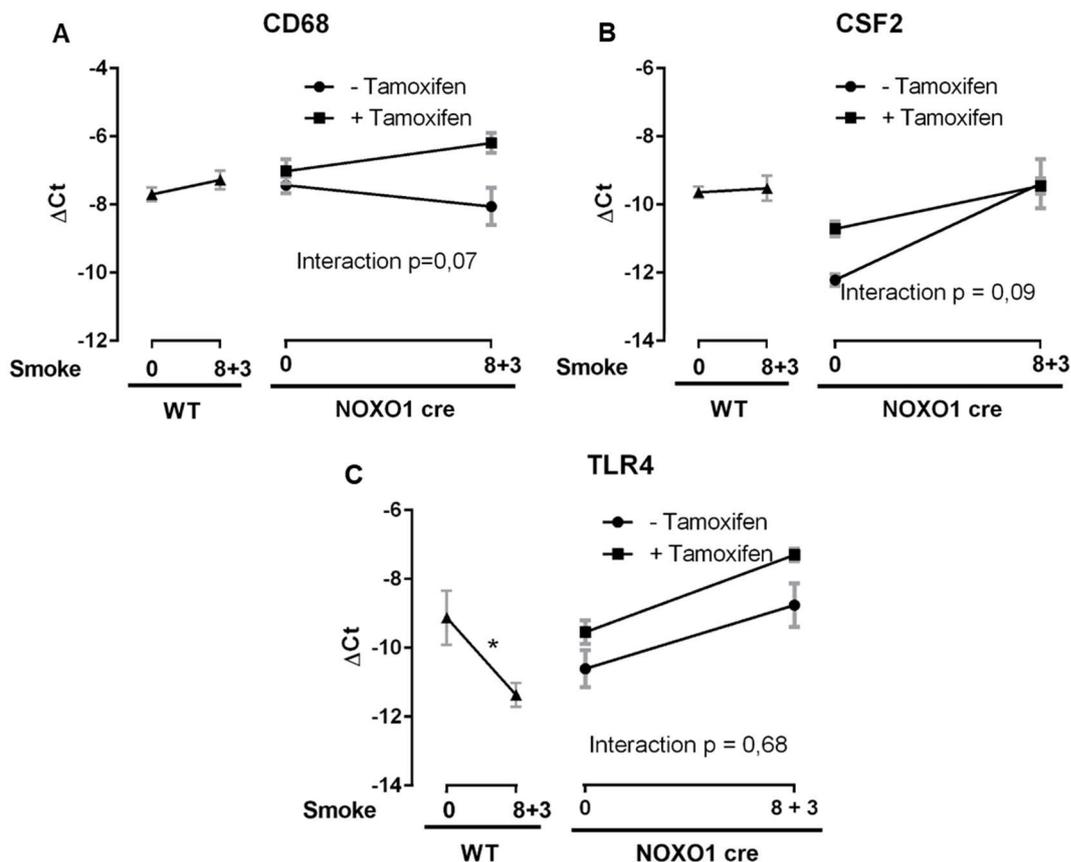


Abbildung 3-7: Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) der Gene der Gruppe „Immunologie“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige Raumluftexposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt.  $n=3$ .

mRNAs der Gruppe „DNA-Aktivität“ beinhalten Gene für *Hdac2* und *Kans11*. Die Histondeacetylase 2 (HDAC2) entfernt Acetylgruppen von acetylierten Lysinen in Histonen, wodurch die Bindung des Histons an die DNA verstärkt und die Transkription herunterreguliert wird [78]. Quantitative PCR konnte keine post-Rauch Veränderung der *Hdac2* mRNA-Menge feststellen, ebenso wenig bei KO-nicht-induzierten Gruppen. Durch NoxO1-KO-Induktion und Rauchexposition konnte eine verminderte *Hdac2* mRNA-Menge festgestellt werden ( $p=0,15$ ) (Abb. 3-8 A). *KAT8 regulatory NSL complex*

*subunit 1* Gen (*Kansl1* Gen) kodiert ein nukleares Protein, welches als Teil des *non specific lethal* Komplexes (NSL Komplex) zur Histonacetylierung beiträgt und somit die DNA-Transkription fördert. Im WT konnte hierbei keine signifikante Regulation der mRNA-Menge post-Rauch festgestellt werden. Während vor allem durch NoxO1-KO-Induktion *Kansl1* hochreguliert wurde (Abb. 3-8 B).

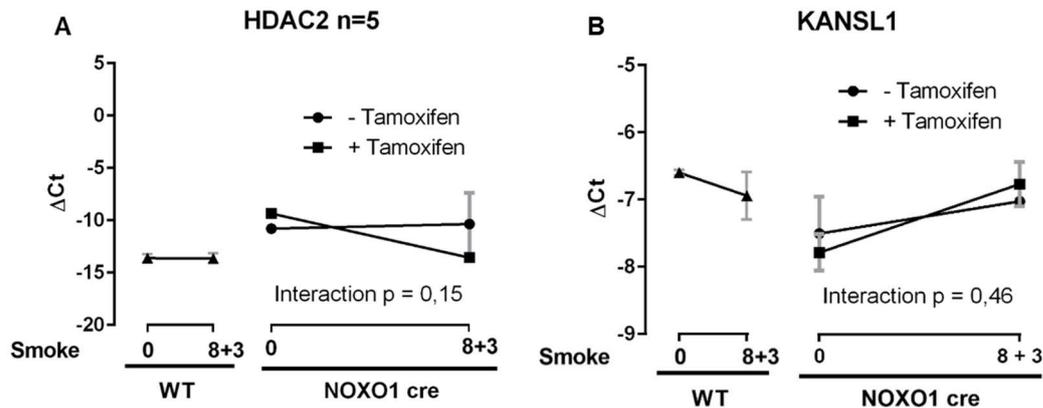


Abbildung 3-8: Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) der Gene der Gruppe „DNA-Aktivität“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=3, falls nicht anders bezeichnet.

Die Gruppe „Oxidativer Stress“ enthält Gene von ROS-bildenden (*Nox1*, *Gp91*) und ROS-abbauenden Proteinen (*Sod1*, *Sod2*, *Ho1*). Sowohl eine Rauchexposition als auch eine NoxO1-KO-Induktion beeinflusst die Expression der NADPH-Oxidase Gene. Im WT konnte im Versuch keine Expressionsveränderung von *Nox1* und *Nox2* (*Gp91*) durch Zigarettenrauch festgestellt werden (Abb.3-9 A, B). *Nox1* erfuhr sowohl bei KO-induzierten als auch bei nicht-induzierten Gruppen nach Rauchexposition eine Expressionssteigerung (p=0,007) (Abb. 3-9 A). *Nox2* hingegen zeigte auch in diesen Gruppen keine durch Zigarettenrauch verursachten Effekte. Durch KO-Induktion stieg hierbei sowohl bei Rauch-exponierten als auch bei RaumlufTEXponierten Gruppen die mRNA-Menge signifikant an (p= 0,004). Das Gen der Superoxiddismutase 1 (*Sod1*), welches für den ROS-Abbau zuständig ist, erfuhr lediglich durch den Tamoxifen induzierten KO eine Expressionssteigerung (p=0,10). Zigarettenrauch verursachte Veränderung waren hier nicht festzustellen (Abb. 3-9 C). Ebenso wenig veränderte sich die Expression von *Sod2* durch Rauchexposition oder NoxO1-KO-Induktion (Abb. 3-9 D). Die induzierbare Isoform der Häm-Oxygenasen HO1 dient der Protektion gegen Oxidativen Stress, ebenso ist es in der Angiogenese in der Embryonalentwicklung

beteiligt [77]. Durch NoxO1-KO konnte eine erhöhte Expression unabhängig der Rauchexposition festgestellt werden ( $p= 0,03$ ). In allen Gruppen führte eine Rauchexposition zu erhöhten *Ho1* Expression ( $p=0,052$ ) (Abb. 3-9 E).

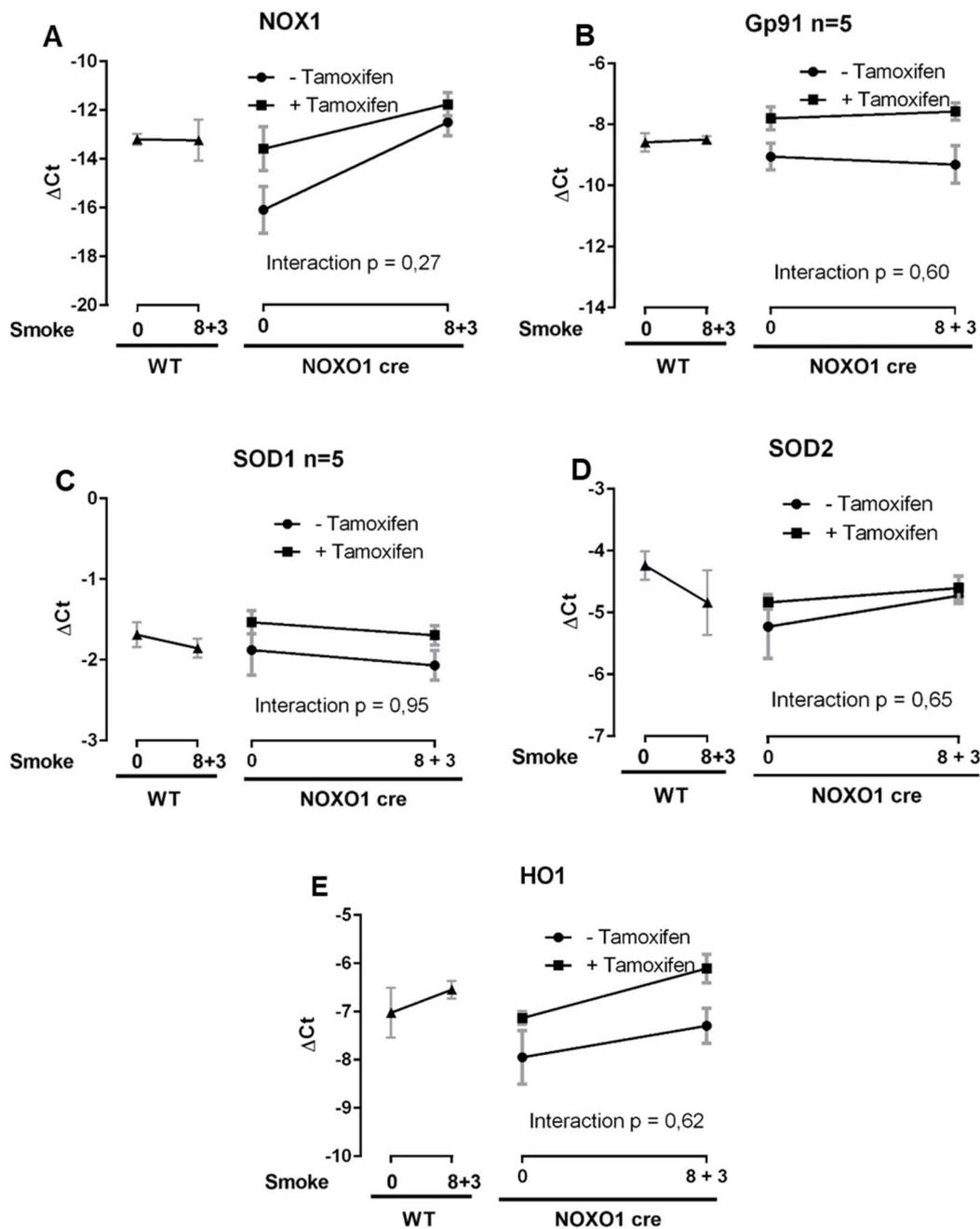


Abbildung 3-9: Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) der Gene der Gruppe „Oxidativer Stress“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=3, falls nicht anders bezeichnet.

Durch den Tumorsuppressor p53 induziert, beschleunigt *Bcl-2-associated X protein* (BAX) die Apoptose in Zellen. Es führt zur Ausschüttung von Zytocrom c aus

Mitochondrien und die Bildung von *Mitochondrial apoptosis-induced channel* (MAC). In den durchgeführten Versuchen konnte keine Rauch-bedingte Veränderung der *Bax* Regulation festgestellt werden. Durch NoxO1 KO jedoch erhöhte sich die mRNA Menge von *Bax* unabhängig der Rauchexposition ( $p=0,02$ ) (Abb. 3-10).

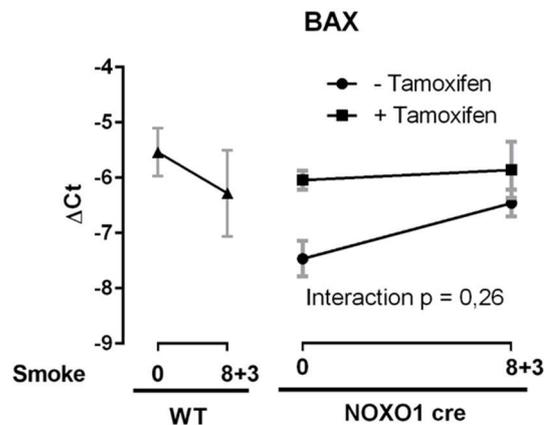


Abbildung 3-10: Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) des BAX-Gens. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt.  $n=3$ .

Gene von Proliferation fördernden Proteinen können als Regulatoren des Zellzyklus (*Cdk2*, *Ccna1*) oder Schlüsselproteine der Lungenreifung (*Fgf10*, *Kgf*, *Hhip*) zum *Remodelling* oder zur Regeneration der Lungen nach Rauchexposition beitragen. Cyclin-dependant-Kinase 2 (CDK2) reguliert die Transition in die S-Phase (Synthese-Phase), wo Zellen sich durch DNA-Teilung auf eine bevorstehende Mitose vorbereiten [146]. Rauchinduziert steigt die mRNA-Menge des *Cdk2*-Gens signifikant ( $p=0,002$ ). Ebenso führt ein NoxO1-KO rauchunabhängig zu erhöhter *Cdk2* Expression ( $p=0,04$ ) (Abb.3-11 A). Cyclin A1, kodiert durch *Ccna1*, bindet sowohl CDK1, als auch CDK2 und ist somit beteiligt in den Übergang in die S-Phase und in die G2 Phase (folgt der S-Phase; Phase des vermehrten Zellwachstums und der Proteinsynthese) im Zellzyklus [146]. In allen Gruppen ist eine verminderte Expression von *Ccna1* nach Rauchexposition festzustellen ( $p=0,002$ ). Ebenso führt die Kombination von Zigarettenrauch und anschließender NoxO1-KO-Induktion zur signifikant niedrigere Expression von *Ccna1* ( $p=0,02$ ), die bereits solitär durch NoxO1-KO-Induktion signifikant angehoben wurde (ersichtlich anhand der NoxO1 KO induzierten, RaumlufTEXponierten Gruppe,  $p=0,003$ ) (Abb. 3-11 B). *Fgf10* und *Kgf* als Gene von Wachstumsfaktoren fördern die Bildung der extrazellulären Matrix. So ist ersichtlich, dass eine Rauchexposition eine

Expressionssteigerung von *Fgf10* verursacht ( $p=0,002$ ), während eine KO-Induktion *Fgf10* ebenfalls hochreguliert ( $p=0,06$ ) (Abb. 3-11 C). *Kgf* hingegen wird weder durch Rauch noch durch NoxO1-KO-Induktion beeinflusst (Abb. 3-11 D). *Hhip* ist als Teil der Hedgehog Familie in embryonale Entwicklungsprozesse beteiligt [104]. In der qPCR-Analyse konnte jedoch keine relevante Interaktion zwischen Raucheinwirkung und anschließender NoxO1-KO-Induktion festgestellt werden (Abb.3-11 E).

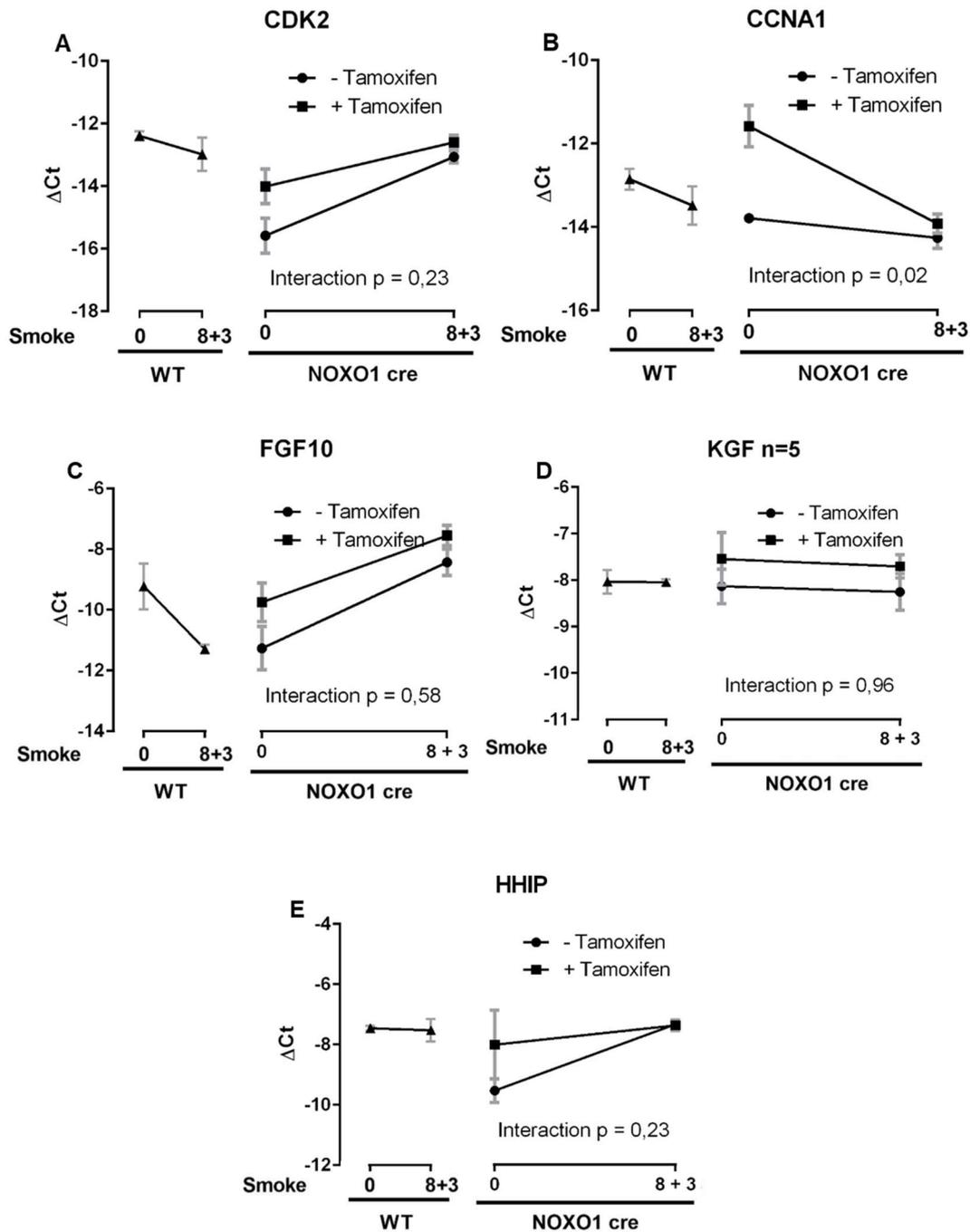


Abbildung 3-11: Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) für Gene der Gruppe „Proliferation und Lungenreifung“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und

nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige Raumluftexposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=3, falls nicht anders bezeichnet.

### 3.3.2.2 Micro-Array Ergebnisse im Gefäßkompartiment und alveolären Septen

Da bei den Micro-Array Daten geprüft werden sollte, ob die solitäre KO-Fähigkeit einen Einfluss auf das mRNA-Regulationsprofil hat, wurden um dies zu berücksichtigen, folgende Gruppenkontraste gewählt, die entweder die Effekte der KO-Fähigkeit (1), die der KO-Induktion (2) oder beides kombiniert (3) darstellen. Da eine Kompartiment-Aufteilung erfolgte, stehen jeweils die Buchstaben „v“ für Gefäße (*vessels*) und „s“ für Septen (*septa*). Die Gengruppen in Abbildung 3-12 stellen die Gengruppen mit den deutlichsten Unterschieden dar, während Abbildung 3-13 und 3-14 ausgewählte Gengruppen bzw. cDNA-Gene darstellen, die in der Pathogenese und Lungenregeneration relevant sein könnten. Die Auswahl orientiert sich hierbei an Voruntersuchungen mit NoxO1 defizienten Mäusen der Arbeitsgruppe [73]. Die Rohdaten der Mikro-Array Analyse im Kapitel 11 dargestellt.

$$\begin{aligned}
 WT &= WT_{Rauch} - WT_{keinRauch} \\
 KO &= NoxO1_{Rauch,keinTam.} - NoxO1_{keinRauch,keinTam.} \\
 KO.K &= NoxO1_{Rauch,Tam.} - NoxO1_{keinRauch,Tam.} \\
 KO_{Fähigkeit} &= KO - WT = KO \text{ vs } WT \text{ (1)} \\
 KO_{Induktion} &= KO.K - KO = KO.K \text{ vs } KO \text{ (2)} \\
 Kombiniert &= KO.K - WT = KO.K \text{ vs } WT \text{ (3)}
 \end{aligned}$$

#### 3.3.2.2.1 cDNA-Genregulation in intrapulmonalen Gefäßen

In Abbildung 3-12 ist zu erkennen, dass die KO-Induktion nach der Rauchexposition in den Gefäßen erhebliche Wirkung auf Genebene zeigte. Im Vergleich zu Gruppen ohne Induktion sind viele Gengruppen erhöht exprimiert, die mit neurodegenerativen Erkrankungen zusammenhängen, wie z.B. Alzheimer-, Parkinson- und Huntington Erkrankung (Abb. 3-12). Bei näherer Beobachtung fällt auf, dass hierbei hauptsächlich Gene, die mit der Atmungskette assoziiert sind, erhöht exprimiert wurden (*Oxidative Phosphorylation*). Ferner sind spezifische Gene in ihrer Ausprägung deutlich verändert. *Mki67* (*Proliferation marker protein Ki-67*) ist in seiner Menge nach KO-Induktion deutlich erhöht, während *Ccl6*, ein Gen von einem proinflammatorisches Chemokin, herunterreguliert war. (Abb. 3-14) Interessanterweise wurden *Mmp9* und *Mmp12* bereits durch die NoxO1-KO-Fähigkeit herunterreguliert. Genaue Analyse von auserwählten Signalwegen ergaben veränderte Expressionsmuster für metabolische Signalwege

(*metabolic pathways*) durch Tamoxifen-induzierte NoxO1-KO-Induktion nach Rauchexposition. (Abb.3-13).

### 3.3.2.2.2 cDNA-Genregulation in alveolären Septen

Abbildung 3-14 zeigt deutliche Veränderungen vieler RNAs nach KO-Induktion, die solitär septal vorkommen. *Mmp9* ist deutlich herunterreguliert, während *Mmp12* und *Timp3* erhöht sind. Weiterhin sind *Targets* wie *Hmox1* und *Noxa1* verstärkt zu finden, während die *Nos2*, ein Gen, welches ebenfalls in Prozessen des oxidativen Stresses beteiligt ist, herunterreguliert war. Insgesamt fanden septal Regulationen von metabolischen Signalwegen statt, die durch post-Rauch NoxO1-KO-Induktion bedingt sind. (Abb.3-13).

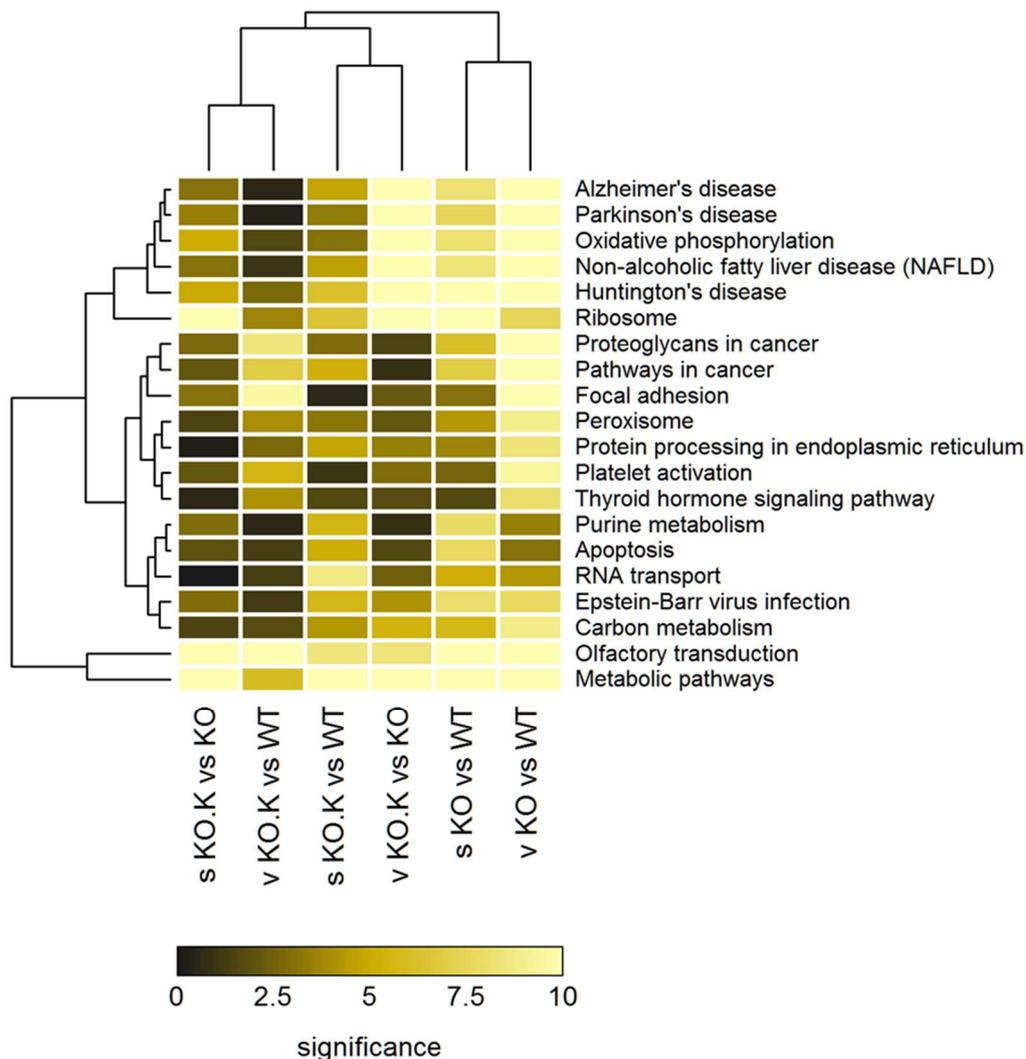


Abbildung 3-12: Kompartiment spezifische Mikroarray-Analyse der Genexpression in Bezug auf übergeordnete Gengruppen nach Rauchexposition und NoxO1 *Knockout*-Induktion post-Rauch (KO.K vs. KO), nach Rauchexposition und alleinige NoxO1-*Knockout*-Fähigkeit (KO vs. WT) und beide Vergleiche kombiniert (KO.K vs. WT). s = Effekte in Lungensepten, v = Effekte in Lungengefäße. KO.K vs KO zeigt die Genexpressionsveränderung durch NoxO1-*Knockout* in Vergleich zu *Knockout*-fähigen Tieren in

Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen NoxO1 *Knockout* Tiere und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen *Knockout*-fähige Gruppen ohne *Knockout*-Induktion und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. n=4.

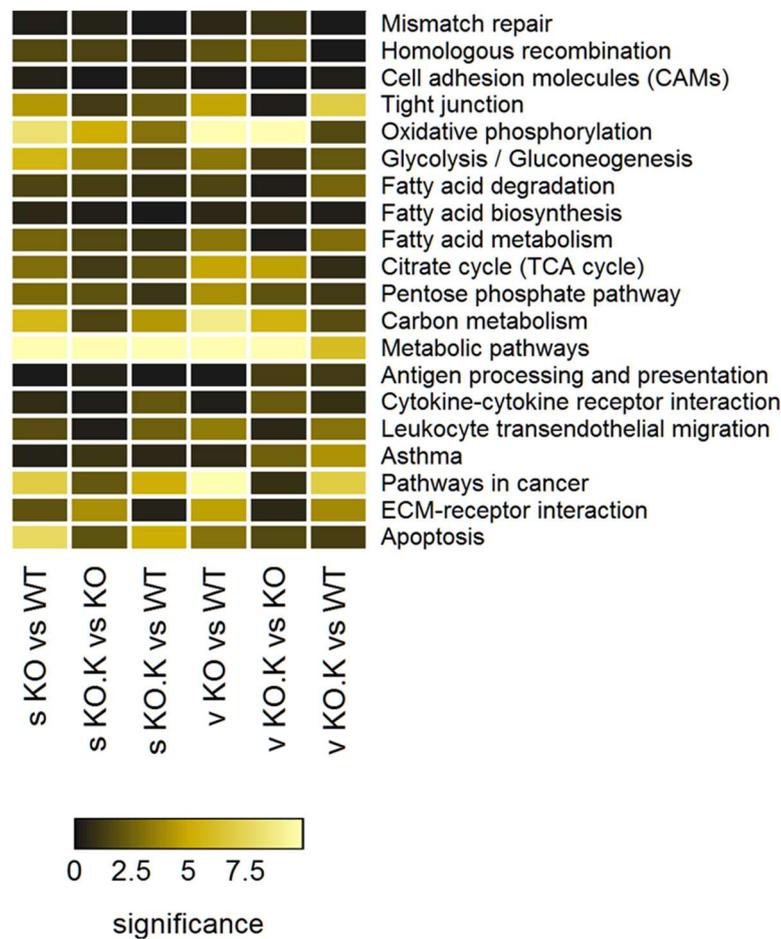


Abbildung 3-13: Kompartiment spezifische Mikroarray-Analyse der Genexpression in Bezug auf übergeordnete Gengruppen mit möglicher Relevanz in der Pathogenese nach Rauchexposition und NoxO1 *Knockout*-Induktion post-Rauch (KO.K vs. KO), nach Rauchexposition und alleinige NoxO1-*Knockout*-Fähigkeit (KO vs. WT) und beide Vergleiche kombiniert (KO.K vs. WT). s =Effekte in Lungensepten, v = Effekte in Lungengefäße. KO.K vs KO zeigt die Genexpressionsveränderung durch NoxO1-*Knockout* in Vergleich zu *Knockout*-fähigen Tieren in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen NoxO1 *Knockout* Tiere und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen *Knockout*-fähige Gruppen ohne *Knockout*-Induktion und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. n=4.

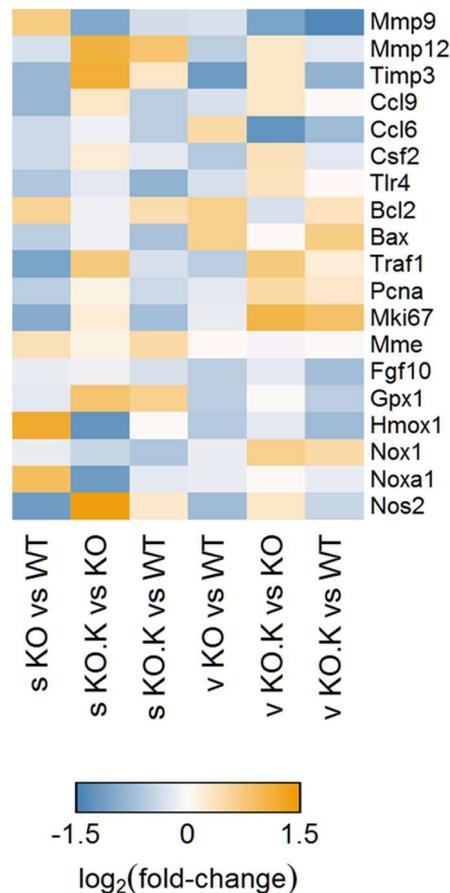


Abbildung 3-14: Kompartiment spezifische Mikroarray-Analyse der Genexpression in Bezug auf möglich relevante Gene nach Rauchexposition und NoxO1 *Knockout*-Induktion post-Rauch (KO.K vs. KO), nach Rauchexposition und alleinige NoxO1-*Knockout*-Fähigkeit (KO vs. WT) und beide Vergleiche kombiniert (KO.K vs. WT). s = Effekte in Lungensepten, v = Effekte in Lungengefäße. KO.K vs KO zeigt die Genexpressionsveränderung durch NoxO1-*Knockout* in Vergleich zu *Knockout*-fähigen Tieren in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen NoxO1 *Knockout* Tiere und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen *Knockout*-fähige Gruppen ohne *Knockout*-Induktion und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. n=4.

### 3.3.2.2.3 RNA-Expressionsveränderungen im Kompartimentenvergleich

Septen und Gefäße zeigten im Versuch viele Ähnlichkeiten. In beiden Kompartimenten sind metabolische Signalwege in ihrer Gesamtheit signifikant in KO-induzierten Gruppen nach Rauchexposition im Vergleich zu KO-fähigen Gruppen erhöht. Auffällig ist, dass bereits die KO-Fähigkeit nach Rauchexposition im Vergleich zu WT eine signifikante Erhöhung von metabolischen Signalwegen induziert (Abb. 3-12). In allen Vergleichsgruppen sind „*olfactory transduction*“, also G-Protein gekoppelte, mit der olfaktorischen Wahrnehmung assoziierte Gene signifikant verändert, wobei die KO-Induktion in beiden Kompartimenten eine Herunterregulation und die KO-Fähigkeit eine Hochregulation in beiden Kompartimenten bewirkte (Abb.3-12). Bei näherer

Betrachtung der Signalwege war auffällig, dass septal Gene wie *Olfr49*, *Adrbk2*, *Pdelc* stark reguliert wurden, während *Olfr47*, *Prkg2* in Gefäßen stark reguliert wurden. Allerdings war die Regulation lediglich bei *Prkg2* in Gefäßen mit  $p = 0,015$  signifikant. Weiterhin ist in beiden Kompartimenten eine signifikante Erhöhung von Ribosomen assoziierten Genen sichtbar, was für eine signifikante Veränderung der Translation in den jeweiligen Gruppen sprechen kann (Abb.3-12). Im direkten Vergleich von Gefäßen und Septen zeigt Abbildung 3-15 eine hohe Überlappung der Daten, die allesamt um Null streuen oder in ihrer Ausprägung ähnlich sind (d.h. sich entlang der 45° Linie befinden). Eine Ausnahme stellen wenige nicht benannte Gensegmente (rot markiert in Abb. 3-15) dar, die lediglich in Gefäßen eine erhöhte Expression zeigten. Weiterhin tendieren Genpunkte im negativen septalen Bereich dazu, weniger stark in Gefäßen herunterreguliert zu sein. Durch die Art der Probenentnahme, wobei sich im Gefäßproben stets septales Material befindet, kann man davon ausgehen, dass diese Gene vor allem septal herunterreguliert werden.

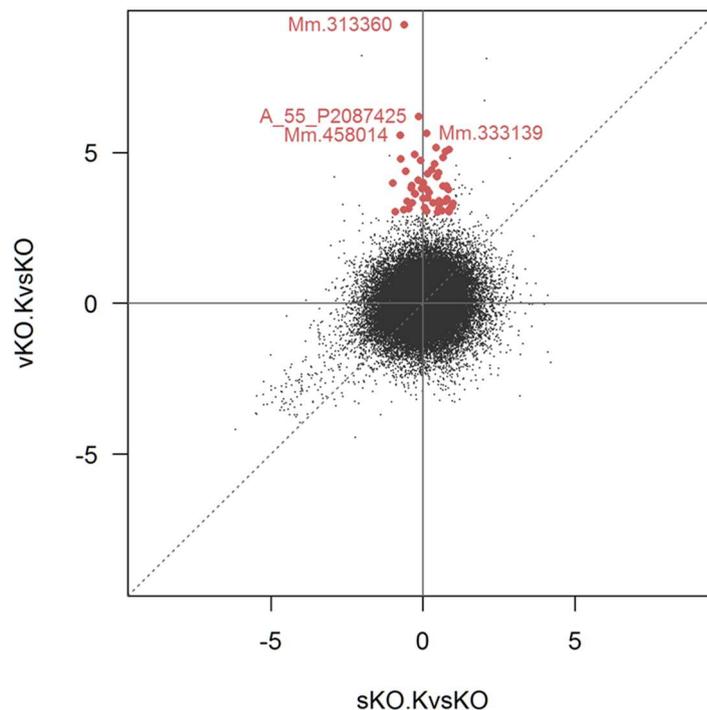


Abbildung 3-15: Kompartimentenvergleich zwischen Lungensepten (s) und Lungengefäßen (v) nach Rauchexposition und NoxO1-KO-Induktion post-Rauch (KO.K vs KO) in Bezug auf die logarithmierte Intensitätsänderung zur Basis 2 ( $\log_2 \text{fold-change}$ ). KO.K vs KO zeigt die Genexpressionsveränderung durch NoxO1-*Knockout* in Vergleich zu *Knockout*-fähigen Tieren in Bezug auf Rauchexposition. Genpunkte im negativen Bereich erfuhren eine Herunterregulation und im positiven Bereich eine Hochregulation. Liegen Genpunkte auf der gestrichelten Linie, so ist ihr Expressionsverhalten in Gefäßen und Septen gleich. Rot hervorgehoben wurden Punkte, die lediglich in Lungengefäßen hochreguliert wurden (septal:  $\log_2 \text{fold-change} = \pm 1$ , vaskulär:  $\log_2 \text{fold-change} \geq 2,5$ ).  $n=4$ .

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Wahl des Modells „Zigarettenrauch-exponierte Maus“ und seine Vergleichbarkeit zur COPD des Menschen

Weltweit gilt die COPD als dritthäufigste Todesursache, besonders Zigarettenrauch wird dabei als Hauptverursacher angesehen [147]. Trotz des deutlichen Rückgang des inhalativen Tabakrauchens ist zu prognostizieren, dass die Bedeutung der COPD nicht geringer wird. Dies ist bedingt durch die zunehmende Luftverschmutzung und die vorhandene berufliche Exposition von toxischen Gasen und Partikeln. Lediglich kardiovaskuläre Erkrankungen sind häufiger, deren Risiko ebenfalls durch Zigarettenkonsum gesteigert wird. Zigarettenkonsum führt zu veränderter Endothelfunktion und begünstigt die atherosklerotische Plaquebildung in Gefäßen [148]. Um bessere Therapien und Behandlungsmöglichkeiten der COPD zu entwickeln, sind Erforschungen der Pathogenese auf molekularer Ebene von besonderem Interesse. Die Pathophysiologie der COPD in Menschen imitierend, arbeitet die Arbeitsgruppe, aus der diese Arbeit stammt, mit Zigarettenrauch-exponierten Mausmodellen. Die Zigarettenrauchexposition und Knockoutinduktion ist für C57BL/6 Mäuse in der Arbeitsgruppe etabliert und wurde in mehreren Vorarbeiten verwendet [16, 17, 149, 150]. Die Verwendung dieser Mauslinie und die Verwendung von 3R4F Referenzzigaretten (University of Kentucky) gewährleistet eine standardisierte Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Das Modell erlaubt den Vergleich zwischen Zigarettenrauchexposition und RaumlufTEXposition, sowie einen möglichen Knockoutinduktion des zu untersuchenden Gens nach der Rauchexposition. Versuchsmäuse werden mit einer Partikelkonzentration von  $140 \text{ mg/m}^3$  für sechs Stunden pro Tag und fünf Tage die Woche beraucht. Diese Standardisierung wurde bereits in Vorversuchen der Arbeitsgruppe erfolgreich verwendet [17, 149, 150]. In vorausgehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Mäuse bereits nach drei Monaten Rauchexposition eine pulmonale Hypertonie aufweisen. [16, 73] Diese geht einher mit einer Gefäßwandverdickung, die sich im Wesentlichen auf die Gefäßmedia bezieht. Die pulmonale Hypertonie geht in diesem Modell der Emphysembildung voraus und bleibt auch bei einer Rauchexposition von bis zu acht Monaten bestehen. Sie geht mit einer Rechtsherzhypertrophie einher [16]. Nach sechs bis acht Monaten Rauchexposition fanden Umbauprozesse des Parenchyms statt. So

---

entwickelten die Mäuse zu diesem Zeitpunkt bereits ein Lungenemphysem, ersichtlich an einem vergrößerten prozentualen Luftanteil, einer verminderten Septumdicke und einem größeren mittleren Septumabstand (*mean linear intercept*), sowie eine Verringerung der Alveolenanzahl. Ebenso veränderte sich zu diesem Zeitpunkt die Lungencompliance, welche spirometrisch ermittelt wird. Die Compliance spiegelt die Elastizität der Lunge wider und ist im Falle eines Emphysems durch Verlust der Dehnbarkeit erhöht [151]. Aus diesem Grunde wurde im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit ein achtmonatiges Rauch-Expositionsintervall der Mäuse eingesetzt. Die Rauch bedingten pathologischen Veränderungen der Mauslunge im Wildtyp sind nach anschließender 3-monatiger RaumlufTEXposition nicht reversibel, sodass Regenerationsprozesse auf den Tamoxifen induzierten KO zurückzuführen sind. Diese könnte jedoch bei Mäusen mit der NoxO1 LoxP-Flankierung und vorhandener Cre-Rekombinase abweichen. Ein Voranschreiten des Emphysems und der pulmonalen Hypertonie nach Ende der Berauchung ist hierbei möglich. Da in den untersuchten Mausgruppen mit LoxP-Flankierung der durch Rauchexposition veränderte rechtsventrikuläre systolische Druck (Abb. 1-8B) oder die histologisch ersichtlichen Gefäßveränderungen, die der Wildgruppen nach Rauchexposition nicht übersteigen, ist ein Voranschreiten des Emphysem und der pulmonalen Hypertonie hierbei jedoch unwahrscheinlich. Generell eignen sich Mäuse zur Untersuchung von Rauchexpositionseffekten, da ihr voll sequenziertes Genom eine gute Grundlage zum molekularbiologischen Verständnis der Pathogenese bildet. Ebenfalls gleicht der Zeitverlauf der Emphysem-Entstehung der Mäuse der Emphysem-Entstehung beim Menschen mit einer COPD-Schwere von ca. GOLD II [152]. In der Literatur werden Zigarettenrauchexpositionen ebenfalls an Meerschweinchen oder Ratten beschrieben [153, 154]. Während Meerschweinchen eine ausgeprägte Emphysembildung im Vergleich zu Mäusen nach gleicher Rauchexpositionsdauer aufweisen, entwickeln Ratten nach 13-monatiger Rauchexposition kaum morphologische Veränderungen in der Lunge. Ferner ist zu erwähnen, dass das Mausmodell ebenfalls Limitationen in der Replikation der menschlichen COPD aufweist. So entwickeln Mäuse nach Rauchexposition keine pulmonale Obstruktion, sodass es nicht als Modell für eine Atemwegsobstruktion, sondern nur als Modell einer Emphysembildung und einer rauchinduzierten pulmonalen Hypertonie dienen kann [152].

---

## 4.2 Das Tamoxifen-induzierbare NoxO1-KO Mausmodell und seine Limitationen

Um den Effekt eines NoxO1 *Knockout* nach Rauchexposition zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das Cre/loxP-System im Mausmodell verwendet. Hierbei wurden Exon 2 und 9 des NoxO1 Gens mit loxP-Sequenzen flankiert und mithilfe der Cre-Rekombinase, welches an einem Estrogenrezeptor gebunden ist, geschnitten. Dieser Prozess wurde durch die Gabe von Tamoxifen initiiert. Hierbei dockt Tamoxifen an den Estrogenrezeptor und bewirkt eine intranukleäre Migration des Cre-ER- Komplexes. Da diese erst zum Zeitpunkt der abgeschlossenen Rauchexposition stattfand, entwickelten diese Mäuse, gemäß der Wildtypmäuse, zunächst ein Rauch-induziertes Emphysem und vaskuläre Veränderungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Validierung der Veränderungen direkt zum Zeitpunkt der vollendeten Rauchexposition nach acht Monaten durchgeführt. Allerdings konnten Rauch-bedingte morphologische Veränderungen mithilfe von Kontrollgruppen, die keine KO-Induktion erfahren haben, klar gezeigt werden. Außerdem gibt es umfassende Evidenz, dass nach 8 Monaten Rauchexposition ein Emphysem und nach bereits 3 Monate eine PH in C57BL/6 Mäuse entsteht, die nach nachfolgender RaumlufTEXposition nicht reversibel ist [17, 73, 149]. Es ist nicht auszuschließen, dass bereits die loxP-Flankierung und das Besitzen der Cre-Rekombinase zu morphologischen oder molekularen Veränderungen führen. Um diese zu untersuchen, wurden ebenfalls NoxO1-KO fähige Mausgruppen, die zur Kontrolle bei RaumlufT gehalten wurden, analysiert. Der Vergleich zwischen Rauch-bedingten Veränderungen in Wildtyp Mäusen und NoxO1 KO-fähigen Mäusen ohne eine Tamoxifengabe konnten Aufschluss über Effekte, die bereits durch das Vorhandensein der LoxP Flankierung und der Cre-Rekombinase verursacht werden, geben. Auf molekularer Ebene sind erhebliche Veränderung der Genexpression durch das solitäre Vorhandensein der LoxP-Flankierung von NoxO1 und der inaktiven Cre-Rekombinase (wird im Folgenden als KO-Fähigkeit bezeichnet) zu detektieren, sodass die Aussagekraft über alleinige post-Rauch NoxO1-KO Effekte limitiert ist (siehe Kap. 4.5). Um die KO-Fähigkeit als Störvariable auszuklammern, wurde in der Auswertung dieser Arbeit stets die Interaktion von Rauchexposition und anschließender KO analysiert. Des Weiteren ist es möglich, dass Tamoxifen, als selektiver Estrogenrezeptormodulator die beobachteten Regenerationsprozesse verursacht. Chen et al. zeigten, dass eine pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) im Mausmodell durch Östrogen-Inhibition reversibel ist [155]. Jedoch

---

wurde bislang der Effekt nicht bei Zigarettenrauch-induziertem Emphysem und pulmonaler Hypertonie beobachtet. Wie in der Literatur bereits beschrieben, kann das loxP/Cre System einen unvollständigen KO des Gens *in vivo* bewirken. Durch die unvollständige Expressierung von Cre-Rekombinase in Zellen kommt es zur unvollständigen Deletion des Zielgens. Als Ursache wird unter anderem der Positionseffekt-Variation vermutet [156, 157]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei *Knockout*-induzierten Mausgruppen nach dreimonatiger Erholungsphase ein NoxO1-KO per Western Blot nachgewiesen werden. Diese Daten werden sowohl durch morphologische als auch durchphysiologische Daten untermauert (siehe Kap. 4.4, 4.5).

### **4.3 Validierung des durchgeführten NoxO1-Knockouts durch Tamoxifengabe**

Wie die Abbildung 3-4 zeigt, konnte in Mausgruppen nach Rauchexposition und Tamoxifengabe eine NoxO1 Depletion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen ein erfolgreiches NoxO1-*Knockout* durch Tamoxifengabe auf Proteinebene. Wie Vorarbeiten bereits zeigten, führt eine Rauchexposition zur vermehrten Proteinexpression von NoxO1, welche ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit ersichtlich waren (siehe Abb. 3-4) [158].

### **4.4 NoxO1-KO nach Zigarettenrauch führt zu Verminderung der Rechtsherzbelastung und Lung COMPLIANCE**

Vorausgehende Untersuchungen und physiologische Messungen (siehe Kap. 1.3.4) zeigten, dass acht-monatige Zigarettenrauchexposition eine Rechtsherzhypertrophie in Mäusen bewirkt. Diese entsteht im Zuge einer pulmonalen Hypertonie [159]. In vorausgegangenen Versuchen (siehe Kap. 1.3.4) konnten derartige Effekte bereits in Wildtyp Mäusen bestätigt werden. Hierbei konnte eine pulmonale Hypertonie nach drei Monaten Rauchexposition, also deutlich früher als die Emphysembildung, beobachtet werden [16]. Weiterhin konnten ähnliche Veränderungen in NoxO1-KO-fähigen Mäusen, die keinen KO erfuhren, beobachtet werden. Sowohl die Größe als auch der systolische Blutdruck des rechten Ventrikels sind in Mausgruppen nach stattgefundener NoxO1-KO-Induktion signifikant geringer als ihre Vergleichsgruppen, sodass von einer Regression

---

der Parameter ausgegangen werden kann. Im Vergleich zu Raumluft-Kontrollgruppen persistiert weiterhin eine höhere Rechtsherzbelastung, weshalb mögliche Regenerationsprozesse, im Sinne einer Veränderung der pulmonalen Gefäße, im Laufe der dreimonatigen Erholungsphase progredient und potenziell nicht abgeschlossen waren.

Es ist bekannt, dass im Rahmen einer COPD die Lungencompliance steigen kann. Dies ist ein Zeichen eines Elastizitätsverlustes des Lungengewebes durch Emphysembildung und Verlust von elastischen Fasern [151]. Messungen im Rahmen dieser Arbeit konnten sowohl im WT als auch in KO-fähigen Mausgruppen nach Rauchexposition eine Compliance-Erhöhung nachweisen. Durch NoxO1-KO-Induktion post-Rauch konnte bereits nach drei Monaten Erholungsphase keine Unterschiede der Compliance im Vergleich zu Raumluft-Kontrollgruppen mehr festgestellt werden, was für eine Emphysem-Rückbildung spricht.

Insgesamt ergaben Lungenfunktionsmessungen und echokardiographische Messungen in post-Rauch NoxO1-KO Mäusen Hinweise auf eine Emphysem-Rückbildung und Nachlassen einer Rechtsherzbelastung im Rahmen potenzieller pulmovaskulärer Regeneration. Diese Befunde galt es histomorphologisch zu bestätigen, welches im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

#### **4.5 Histologische Bestätigung der Veränderung der Lungenmorphologie im Sinne einer potenziellen Regeneration nach NoxO1 *Knockout* post-Rauch**

Im vorigen Kapitel wurden physiologische Effekte des NoxO1-KOs nach Rauchexposition diskutiert. Um diese weiter zu differenzieren, wurden im Rahmen der Arbeit histologische Lungenschnitte der Mäuse angefertigt und untersucht. Bei Wildtyp Mausgruppen konnte diese Emphysembildung nach Rauchexposition bestätigt werden. Hierbei erhöhte sich der prozentuale Luftanteil und der mittlere Abstand zwischen Septen signifikant, während die Septumdicke abnahm. Eine stereologische Untersuchung der Lunge zur Emphysem-Quantifizierung, welche in Vorversuchen und in der Literatur gebräuchlich ist [16, 73, 149], wurde hierbei nicht durchgeführt. Nach stattgefundener Rauchexposition und Tamoxifengabe konnte eine signifikante Interaktion der zwei Variablen im Rahmen der Luftanteilmessung nachgewiesen werden. Durch KO-Induktion konnte lediglich eine geringfügige Zunahme der Septumdicke initiiert werden.

---

In Anbetracht des geringeren Luftanteils und der wenig progredienten Septumdicke, kann eine potenzielle Regeneration durch vermehrte Septumbildung vermutet werden. Ähnliche Prozesse spielen in der Alveologenese in der Lunge eine wichtige Rolle [160]. Zu besserer Beurteilung der Lungenmorphologie ist eine zukünftige stereologische Untersuchung, welche eine genauere Quantifizierung der Lungenveränderungen erlaubt [161], sinnvoll.

Auf vaskulärer Ebene konnte in Wildtypgruppen eine in der Literatur beschriebene erhöhte Muskularisierung und allgemeine Gefäßverdickung in der Lunge nach Zigarettenrauch bestätigt werden [16, 162, 163]. Diese Effekte waren besonders in kleinen Gefäßen mit einem Durchmesser von 20-70 µm ersichtlich. Da die größte kumulative Gefäßschnittfläche durch kleine Pulmonalarterien gebildet wird, sind diese vor allem für Blutdruckveränderungen in der Lunge verantwortlich [164]. So führen die vermehrte Muskularisierung und die größere Wandstärke zu erhöhtem Blutdruck in der Lunge [163]. Ebenfalls konnte die morphologische Untersuchung ähnliche Veränderungen in KO-fähigen Mausgruppen feststellen. So sind diese auch von einer verstärkten Muskularisierung und von einer Gefäßwandverdickung nach Rauchexposition betroffen. Durch NoxO1-KO-Induktion nach Rauchexposition konnte eine Regression der Wandverdickung und Muskularisierung auf Normalniveau beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Veränderungen zu der beobachteten Normalisierung des RVSPs auf Niveau gesunder Lungen führt. Diese geht, wie die Daten zeigen, mit einer verminderten Rechtsherzbelastung einher (siehe Kap. 1.3.4).

Insgesamt konnte histomorphologisch eine durch Compliance-Messung vermutetes geringeres Emphysem nach NoxO1-KO-Induktion bestätigt werden: So ist nach dreimonatiger Reexposition in Raumluft bereits kein Emphysem anhand der erhobenen Parameter mehr nachweisbar. Endgültigen Aufschluss können hier in zukünftigen Untersuchungen durchgeführte Messungen der absoluten Alveolenzahlen geben, da Messungen des „*air space*“, der Septumdicke und der MLI Artefakte unterliegen können [165]. Zudem konnte eine Regression von rauchbedingten vaskulären Veränderungen nachgewiesen werden, welche durch Rechtsherzmessungen bereits vermutet wurde. Im weiteren Verlauf werden die regenerativen Potentiale einer NoxO1-KO-Induktion auf molekularer Ebene diskutiert.

---

## 4.6 Exploration der molekularbiologischen Effekte einer NoxO1-KO-Induktion nach Rauchexposition

Um die Protein- und Genexpression zwischen den Mausgruppen zu vergleichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit Lungenhomogenat der jeweiligen Mäuse analysiert. Limitierend gilt die Zusammensetzung des Homogenats aus verschiedenen Zelltypen, welches sich aus Pneumozyten, Fibrozyten, Zellen des Immunsystems und der Gefäße und weitere zusammensetzt [166]. Es ist davon auszugehen, dass verschiedene Kompartimente der Lunge verschieden auf Rauch und NoxO1-KO-Induktion reagieren. Da der Großteil des Homogenats aus Pneumozyten besteht, sind Analysen dieser hinweisend auf Veränderungen vor allem im Parenchym.

### 4.6.1 Regulation von NADPH-Oxidasen Untereinheiten und Nitrotyrosinbildung

Da NoxO1 ein funktionellen Komplex mit der Nox1 und Nox3 NADPH Oxidase bildet und ein NoxO1-KO die Superoxidbildung reduzieren sollte, was kompensatorische Regulationsmechanismen aktivieren könnte, wurde die Genregulation der beteiligten Proteine untersucht. Hier standen im Fokus *Nox1* und *Nox2* (*Gp91*). In der Literatur wird eine verminderte Nox1 Aktivität durch NoxO1 Deletion beschrieben, wodurch die Radikalbildung vermindert wird [167, 168]. NoxO1 scheint hierbei die Aktivität der Nox1 NADPH-Oxidase maßgeblich zu regulieren. Diese Wirkung dient ebenfalls als Basis der NoxO1-KO-Induktion im Rahmen der durchgeführten Versuche (siehe Kap. 1.2.2). Interessanterweise konnte eine generelle Genexpressionserhöhung von *Nox1* sowohl in Mausgruppen mit NoxO1-KO-Induktion und Rauchexposition als auch in Mausgruppen mit NoxO1-KO-Induktion ohne Rauchexposition festgestellt werden. Dies zeigt eine mögliche reaktive Steigerung der *Nox1* mRNA Produktion durch fehlende *NoxO1* Gene und kann auf einen autoregulatorischen Mechanismus der Zellen, um der fehlenden NoxO1 Produktion entgegenzuwirken, deuten. In Vorarbeiten mit NoxO1<sup>-/-</sup> Mäusen durch M. Bednorz konnten ähnliche Effekte festgestellt werden. Ebenfalls ist eine vergleichbare Steigerung der *Nox2* Produktion durch NoxO1-KO-Induktion zu beobachten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Interaktion von Rauchexposition und anschließender NoxO1-KO-Induktion in Bezug auf Protein-Nitrierung, gemessen anhand

---

der Nitrotyrosinbildung festgestellt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine vermehrte Bildung von Nitrotyrosin durch Zigarettenrauch-Exposition ausgelöst wird [169], welches ebenfalls bei NoxO1-deletierten Mausgruppen mit Rauchexposition ersichtlich war. Allerdings beeinträchtigt die Bildung von Nitrotyrosin in den durchgeführten Versuchen nicht die regenerative Fähigkeit einer NoxO1-KO-Induktion.

#### **4.6.2 qPCR Ergebnisse bestätigen Effekte der KO-Fähigkeit und Effekte eines NoxO1-KOs ohne Interaktion mit Zigarettenrauchwirkung**

Daten der PCR-Analyse, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, deuten auf Auswirkungen der solitären KO-Fähigkeit ohne KO-Induktion hin. Diese ergibt sich aus Unterschieden zwischen WT und NoxO1 KO-fähigen Mausgruppen in den randomisierten Gruppen. In der qPCR Untersuchung konnte dies vor allem anhand der mRNA-Regulation von *Spp1*, *Kansl1*, *Sod2* und *Cdk2* festgestellt werden. Betrachtet man zusätzlich den Vergleich zwischen gerauchte Gruppen von nicht induzierten NoxO1-KO und WT Mäusen in den cDNA-Microarray-Untersuchungen, erkennt man erhebliche Auswirkungen der KO-Fähigkeit, die insgesamt stärker sind KO-bedingte Effekte. Die KO-Fähigkeit als unvermeidlicher Störfaktor überlagert zu einem gewissen Teil Wirkungen des NoxO1-*Knockouts* per se. Dies führt dazu, dass Auswirkungen des NoxO1-*Knockouts* erst bei größeren Unterschieden zu Kontrollgruppen festgestellt werden können, was die Qualität der Aussagen, falls Unterschiede festzustellen sind, gar erhöht.

Für viele untersuchte Genexpressionen konnte ebenso ein Effekt des NoxO1-KOs unabhängig von Zigarettenrauchexposition detektiert werden. So bewirkt ein NoxO1-*Knockout* rauchunabhängige *Sod1* Expressionssteigerung. Diese könnten zu einem vermehrten Abbau von Superoxiden und Reduktion des oxidativen Stresses führen [170]. In allen Gruppen sinkt die Expression von *Sod1* rauchbedingt, sodass im Falle einer höheren *Sod1* Expression durch NoxO1 KO, die Expression post-Rauch weniger stark abfällt. Dies könnte durch einen vermehrten Superoxid-Abbau regenerativ in Bezug auf die Emphysembildung und die PH wirken.

TLR4-mRNA, welche für das transmembranöse TLR4-Protein in der Immunantwort gegenüber Fremdmolekülen beteiligt ist, ist im Falle eines NoxO1-KOs rauchunabhängig

---

vermehrt exprimiert. Ebenfalls zeigt die Diskrepanz der WT Gruppen und NoxO1 KO-fähigen Gruppen KO-Fähigkeit bedingte Veränderungen der Expression von *Tlr4*. Eine moderate Expressionserhöhung des *Tlr4* könnte im Falle des NoxO1-KOs mit einem benignen Zellwachstum assoziiert sein. Jedoch zeigten Haw et al., dass *Tlr4*<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte Fibrosierung und Emphysembildung nach Zigarettenrauchexposition aufwiesen [171], sodass die Rolle des TLR4 im Rahmen eine NoxO1 *Knockouts* weiterhin unklar bleibt. Des Weiteren wird rauchunabhängig *Bax*, ein pro-apoptotischer Co-Faktor des p53 vermehrt durch NoxO1-KO exprimiert, weshalb eine gehemmte Apoptose durch NoxO1-KO als unwahrscheinlich erscheint.

Einige der untersuchten Gen-Expressionen wurden weder durch Rauch noch durch NoxO1-KO oder KO-Fähigkeit beeinflusst, sodass sie für die beobachteten funktionellen und strukturellen Effekte in Bezug auf Emphysem und PH einer post-Rauch NoxO1-KO-Induktion nicht relevant erscheinen. So konnten für *Cd68* und *Csf2*, die für Proteine mit Assoziation zur Entzündungsreaktionen kodieren, keinerlei Veränderungen der Expression festgestellt werden. Im Rückschluss bestehen wenig Zusammenhang zwischen Alterationen der Entzündungsreaktion und der beobachteten Lungenregeneration.

#### **4.6.3 Matrix-Metalloproteasen, ein potenzieller Angriffspunkt der NoxO1-KO-Induktion nach Rauchexposition**

Es ist bekannt, dass Matrix-Metalloproteasen in der Emphysembildung eine große Rolle spielen [3, 52]. So wurde ein rauchbedingtes Ungleichgewicht der MMPs und ihrer Gegenspieler TIMPs im Rahmen einer Proteasen-Antiproteasen-Dysbalance im Sinne einer vermehrten MMP-Aktivität als wichtiger Pathomechanismus der COPD nachgewiesen [172]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese rauchbedingte Dysbalance ebenfalls festgestellt werden. So ist die Proteinexpression von MMP9 in WT in der Rauchexpositionsgruppe tendenziell erhöht, während die Expression von TIMP3, ein Inhibitor von MMPs, vermindert ist. Durch NoxO1-KO-Induktion konnte keine Erhöhung der MMP9 Menge festgestellt werden, während TIMP3 wie im WT vermindert exprimiert wird. Ein mögliches Aufheben der Dysbalance hierbei könnte zur Regeneration des Emphysems und der Gefäßproliferation beigetragen haben. Auf Genomebene ist eine verminderte *Timp3* Expression nach Rauchexposition korrelierend mit der Proteinexpression im WT. Der Tamoxifen induzierte NoxO1-*Knockout* bedingt

---

allerdings eine erhöhte *Timp3* Genexpression, welche sich jedoch nicht in der Proteinexpression widerspiegelt. Eine mögliche Ursache ist die potenzielle posttranslationale Modifikation des Proteins, welches zu vermehrtem Abbau führt. Andererseits ist es möglich, dass eine Proteinerhöhung dann wegen einer Latenzzeit zwischen erhöhter Genexpression und Proteinproduktion zum Zeitpunkt der Analyse nicht ersichtlich gewesen ist. In der Kompartiment-spezifische Microarray Analyse trat die Genexpressionsveränderungen von *Timp3* und *Mmp9* vor allem septal auf, sodass insgesamt die Ergebnisse auf eine mögliche Wiederherstellung der Proteasen-Antiprotease-Balance im Lungenseptum hinweisen, die durch NoxO1-KO-Induktion post-Rauch verursacht wird.

#### **4.6.4 FGF10 als mögliches Schlüsselprotein der Lungen-Regeneration**

FGF10 als Wachstumsfaktor spielt in der Lungengnese und -reifung eine große Rolle [96, 173]. Während der Lungenreifung kommt es ebenfalls zur Bildung neuer Septen, die ähnlich wie die in dieser Arbeit beschriebene morphologische Veränderung nach NoxO1-KO-Induktion verläuft [95]. Da eine regenerative Lungenveränderung Prozesse der embryologischen Lungengnese aktivieren könnte, wurde FGF10 auf molekularer Ebene im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Auf mRNA Ebene konnte eine vermehrte Expression durch das Vorhandensein des LoxP/Cre Systems und der Tamoxifen induzierte *Knockout* nachgewiesen werden. Die Proteinmenge von FGF10 nach NoxO1-KO-Induktion post-Rauchexposition ist hierbei erniedrigt. Ein Abbau des Proteins während der Lungenregeneration könnte diese Ergebnisse erklären. Die gravierende Veränderung der *Fgf10* Genexpression durch NoxO1 *Knockout*-Fähigkeit und KO-Induktion weisen auf einen Zusammenhang dieser zur potenziellen Lungenregeneration hin. Um die Rolle von *Fgf10* im Rahmen des Zigarettenrauch-induzierten Emphysems zu untersuchen, wären weitere Versuche diesbezüglich mit FGF10-*Knockouts* interessant.

#### **4.6.5 Lungenkompartimente im Vergleich**

Mithilfe der cDNA Mikroarray Untersuchung vom mikrodisektierten Lungenmaterial konnte Kompartiment-spezifisch die Genexpression analysiert werden. Im Rahmen der Experimente wurden Alveolarsepten und pulmonalarterielle Gefäße untersucht. Insgesamt konnten bezogen auf alle Gene nur geringfügige Unterschiede im

---

Kompartimentenvergleich zwischen Gefäßen und Septen festgestellt werden. Dies weist auf ähnliche Genexpressionsveränderungen, die durch Rauch und anschließender NoxO1-KO-Induktion verursacht werden. Allerdings sind wenige Gene stärker septal herunterreguliert als in Gefäßen, während einige Gene lediglich in Gefäßen hochreguliert wurden. So konnte im Versuch gezeigt werden, dass die Kompartimente sich hier in ihrer Genexpression unterscheiden. Diese werden im Folgenden diskutiert.

Die ersichtlichsten Unterschiede in der Mikroarray sind zwischen WT und KO-fähigen Mäuse festzustellen, welche als Genexpressionsänderung durch LoxP-Flankierung und das Vorhandensein von Estrogenrezeptor-gekoppelte Rekombinasen zu deuten sind. Potenzielle Toxizität der Cre-Rekombinase könnte zu den beobachteten Veränderungen beitragen [174]. Nichtsdestotrotz konnten Veränderungen der Genexpression nach NoxO1-KO-Induktion auch rauchbedingt festgestellt werden. So werden Gene von G-Protein-gekoppelten Prozessen stark durch NoxO1-KO-Induktion und Rauchexposition sowohl in Gefäßen als auch in Septen beeinflusst. Des Weiteren sind Gene der metabolischen Signalwege signifikant verändert, was auf metabolische Veränderungen durch NoxO1-KO-Induktion und Raucheinwirkung hinweist.

Wie bereits in den Vorarbeiten des Labors gezeigt werden konnte, führt eine kongenitale NoxO1-Defizienz zu Veränderungen von Genen der oxidativen Phosphorylierung, die mitochondrial stattfinden [73]. Es wurde ein Zusammenhang zwischen Rauchprozessen und mitochondrialen Veränderungen postuliert. Ebenfalls wurde auf eine protektive Wirkung einer NoxO1-KO-Induktion durch Beeinflussung der Mitochondrien-Funktion hingewiesen [73]. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass vermehrte ROS-Bildung zur Destruktion mitochondrialer Proteine führt, welche mit verändertem Zellmetabolismus vergesellschaftet ist [175]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Lungengefäßen ebenfalls eine signifikant veränderte Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung nach Raucheinwirkung und NoxO1-*Knockout* festgestellt werden. Eine NoxO1-KO-Induktion könnte demnach durch Veränderungen der Mitochondrien-Funktion zu lungenregenerativen Prozessen beitragen und rauchbedingte Schädigungen der Mitochondrien verringern.

Insgesamt weisen die Mikroarray Ergebnisse in dieser Arbeit auf eine Beteiligung von G-gekoppelten Prozessen und Beteiligung der Mitochondrien hin. Deren genaue Funktion

---

im Rahmen einer NoxO1-Defizienz bedingten Lungenregeneration weiter exploriert werden sollte.

---

## 5 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Versuchsdaten konnten eine Lungenregeneration durch NoxO1-*Knockout* Induktion nach Rauchexposition im Mausmodell bestätigen. Diese Regeneration ist, durch den Versuchsansatz bedingt, in Bezug auf die Emphysembildung limitiert und für die pulmonale Hypertonie klar, da diese, wie Vorversuche verdeutlichen, bereits nach 3 Monaten Rauchexposition entsteht und somit die Versuchsdaten eindeutig auf eine Regeneration zurückzuführen sind, während die rauchbedingte Emphysembildung zum Zeitpunkt der KO-Induktion möglicherweise noch nicht abschlossen ist. So konnten insgesamt auf Basis der erhobenen Parameter Rückbildungstendenzen des entstandenen Emphysems, sowie starke Effekte auf die Gefäßveränderungen und die pulmonale Hypertonie beobachtet werden. In Vorarbeiten des Labors wurden bereits protektive Effekte einer NoxO1 Deletion gezeigt [73]. NoxO1 scheint nicht nur die Entstehung der COPD zu begünstigen, sondern vielmehr bewirkt das Vorhandensein von NoxO1, als wichtige Untereinheit von Nox1 und Nox3, die Aufrechterhaltung der Erkrankung. Weitere Studien zur NoxO1 Wirkung im Mausmodell zu verschiedenen Zeitpunkten der Regenerationsphase und unmittelbar vor und nach KO-Induktion könnten eine genauere Dynamik der Regeneration geben. Des Weiteren sind stereologische Untersuchungen der Lungenregeneration sinnvoll, um diese weiter zu validieren. Versuchsaufbaubedingt ist eine Untersuchung des solitären Tamoxifen-Effekts zukünftig sinnvoll, um mögliche Lungen-regenerative Potentiale von Tamoxifen auszuschließen. Die potenzielle Übertragbarkeit der NoxO1 KO-Ergebnisse auf den Menschen bedürfen weitere Studien und die Untersuchung der Wirkung in weiteren Organen wäre ebenfalls interessant. Ebenso wären Versuchen mit gewebespezifischen NoxO1 *Knockout* aufschlussreich um die Effekte auf Zelltyp-spezifische Prozesse herunterzubrechen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Verlagerung des Protease-Antiproteasen-Gleichgewichts (MMP9 und TIMP3) in Richtung der Antiproteasen, die durch die NoxO1-KO-Induktion verursacht wird, was sich günstig auf das Emphysem und die PH auswirkt. Ebenfalls scheinen sowohl G-Protein gekoppelte Mechanismen als auch eine mitochondriale Beteiligung von Bedeutung zu sein. Um intrazelluläre Prozesse bei einer NoxO1 KO-bedingten Lungenregeneration besser zu verstehen, bedarf es weitere Studien diesbezüglich. Diese Arbeit konnte erste Anhaltspunkte auf die potenzielle Wichtigkeit

---

des Wachstumsfaktors FGF10 im Rahmen einer Lungenregeneration bei Rauchinduzierten Emphysem und PH erarbeiten. Studien mit FGF10 KO oder Überexpression im Mausmodell könnten die Rolle des Faktors FGF10 im Rahmen des Zigarettenrauch-Induziertem Emphysems weiter aufschlüsseln.

Des Weiteren ist von Interesse, inwiefern potenzielle Nox1, Nox3 oder Nox1-Inhibitoren eine Lungenregeneration nach Zigarettenrauch-induziertem Emphysem und pulmonale Hypertonie bedingen würden. Entwicklungen und Testung eines spezifischen NoxO1- oder Nox1 Inhibitors könnte ein Schritt zur medikamentösen Therapie der COPD in Menschen darstellen.

---

## 6 Zusammenfassung

Die COPD ist eine Erkrankung mit steigender Morbidität und Mortalität weltweit. Nach den heutigen Kenntnissen ist sie eine Erkrankung ohne kausale Therapie, dessen Progredienz lediglich mit symptomlindernder Therapie und Therapie der begleitenden Infektionen verlangsamt wird. Für die Entwicklung kurativer Therapieansätze ist das molekulare Verständnis der Regulationsmechanismen, die der Erkrankung und der Lungenregeneration zu Grunde liegen essenziell. NADPH-Oxidasen spielen in der Krankheitsgenese und Aufrechterhaltung durch Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies hierbei potenziell eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein im Mausmodell durch Zigarettenrauch induziertes Emphysem und eine durch Zigarettenrauch induzierte pulmonale Hypertonie nach NoxO1 *Knockout*-Induktion, nach dem Ende der Rauchexposition regenerierfähig ist. Ein *Knockout* von NoxO1 (*NADPH-Oxidase Organizer 1*), eine Untereinheit der NADPH-Oxidase 1, wurde mithilfe des Cre-Lox-Systems nach rauchbedingter Emphysembildung und Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie induziert. Morphologische Untersuchungen von Lungenschnitten zeigten im Vergleich von Gruppen mit induziertem NoxO1 *Knockout* nach Rauchexposition zu WT und NoxO1-nicht induzierten Mausgruppen ein signifikant geringeres Emphysem. Hierbei wurde die Septumdicke, der Luftanteil und der mittlere Alveolenabstand gemessen. Weitergehende Untersuchungen mittels Quantifizierung der Alveolenzahl sollten hier zur weiteren Validierung vorgenommen werden. Des Weiteren bildeten sich rauchinduzierte Gefäß-Remodelling Prozesse durch einen NoxO1 *Knockout* zurück. So wiesen diese Mausgruppen keine erhöhte vaskuläre Muskularisierung und geringere Gefäßwandstärke auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse deuten auf eine Involvierung von Matrix-Metalloproteasen und ihre Inhibitoren in der Lungenregeneration nach NoxO1-KO-Induktion hin. Eine Wiederherstellung des Proteasen-Antiproteasen-Gleichgewichts könnte regenerative Prozesse in der Lunge positiv beeinflussen. Durch erhöhte Superoxiddismutase 1 Expression kann eine NoxO1-KO-Induktion den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies beschleunigen und das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Anti-Oxidantien beeinflussen. Die vor allem in Septen festgestellte Involvierung von

---

G-Protein-gekoppelten Prozessen und mitochondriale Stoffwechselwege in Gefäßen könnten in der Lungenregeneration eine große Rolle spielen. FGF10, welches bereits in anderen Untersuchungen als wichtiges Protein der Lungenreifung postuliert wurde, könnte ebenfalls in NoxO1 bedingter Lungenregeneration eine Rolle spielen.

Es müssen weitere Experimente und Untersuchungen durchgeführt werden, um die Wirkung eines NoxO1 *Knockouts* und mögliche Tamoxifen Effekte besser zu verstehen. Im Rahmen der Lungenregeneration scheinen Proteine wie FGF10 eine große Rolle zu spielen, dessen Expression auf die Lungenregeneration weiter evaluiert werden sollten. Die Wirkung eines NoxO1 *Knockouts* auf weitere Organe und die Suche nach geeigneten NoxO1 Inhibitoren und deren Effekte in Bezug auf eine potenzielle Emphysemrückbildung und Rückbildung der pulmonalen Hypertonie stellen einen wichtigen Schritt zum potenziellen therapeutischen Ansatz eines NoxO1 Inhibitors bei COPD in Menschen dar.

---

## 7 Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease with increasing morbidity and mortality worldwide. According to current knowledge, it is a disease without causal treatment, the progression of which is only slowed down with symptom-relieving therapy and therapy of accompanying infections. For the development of curative therapeutic approaches, a molecular understanding of the regulatory mechanisms underlying both the disease and lung regeneration is essential. NADPH oxidases play a potentially important role in pathogenesis and progression by production of reactive oxygen species.

This dissertation demonstrates that cigarette smoke-induced pulmonary hypertension in mice can be reversed via NoxO1 knockout induction. The data of the current thesis also suggest that established lung emphysema can be improved by NoxO1 knockout.

After inducing emphysema and pulmonary hypertension in mice by tobacco-smoke exposure, NoxO1 (NADPH oxidase organizer 1), a subunit of NADPH oxidase 1, was knocked out using the Cre-Lox system. Morphological examinations of the lungs show a significantly lower emphysema rate in NoxO1-knockout groups compared to Wildtype and non-knockout mouse groups. For assessment of emphysema, the septal wall thickness, the airspace, and the mean linear intercept were measured. Quantification of the number of alveoli needs to be carried out in future to further validate these findings. Furthermore, smoke-induced lung vascular remodeling, a process underlying pulmonary hypertension, returned to normal in the NoxO1 knockout. NoxO1 knockout mice showed no increased lung vascular muscularization and comparatively thinner vessel walls.

The results originating from this dissertation indicate an involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the above-described process of lung regeneration after NoxO1-KO-induction. The reestablishment of the protease/antiprotease balance could positively influence regenerative processes in the lung. By increasing superoxide dismutase 1 expression, NoxO1-KO induction can enhance the breakdown of reactive oxygen species and influence the oxidant-antioxidant system. Involvement of G-protein-coupled processes, especially in septa, and metabolic pathways in vascular mitochondria could also play a major role in lung regeneration. FGF10, an important protein in lung maturation as postulated by other studies, could have major functions in NoxO1 related lung regeneration as well.

Further experimentation and research need to be done to better understand the effects of a NoxO1 knockout and possible tamoxifen effects. In the context of lung regeneration, proteins such as FGF10 could play a major role; its expression in lung regeneration should

---

therefore be further evaluated. Research on the effect of a NoxO1 knockout on other organs, as well as of suitable NoxO1 inhibitors and their potential for reversing emphysema and pulmonary hypertension, would represent an important step towards a potentially therapeutic application of NoxO1 Inhibition in COPD in humans.

---

## 8 Literatur

- [1] Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269–280. doi:10.1056/NEJM200007273430407
- [2] Bousquet J, ed. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: A comprehensive approach. Geneva: WHO; 2007
- [3] Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138: 16–27. doi:10.1016/j.jaci.2016.05.011
- [4] Castaldi PJ, Dy J, Ross J, et al. Cluster analysis in the COPDGene study identifies subtypes of smokers with distinct patterns of airway disease and emphysema. *Thorax* 2014; 69: 415–422. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-203601
- [5] [Anonym]. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2018 report). The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Inc. 2017
- [6] Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645–2653. doi:10.1056/NEJMoa032158
- [7] McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, et al. Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2011; 365: 1567–1575. doi:10.1056/NEJMoa1106955
- [8] Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364: 709–721. doi:10.1016/S0140-6736(04)16900-6
- [9] Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1530–1535. doi:10.1164/ajrccm.153.5.8630597
- [10] Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, et al. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1666–1672. doi:10.1164/ajrccm.152.5.7582312
- [11] Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 543–559. doi:10.1038/nrd4025

- 
- [12] [Anonym]. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: S78-S83.  
doi:10.1164/ajrccm/152.5\_Pt\_2.S78
- [13] Barberà JA. Mechanisms of development of chronic obstructive pulmonary disease-associated pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 2013; 3: 160–164.  
doi:10.4103/2045-8932.109949
- [14] Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019; 53.  
doi:10.1183/13993003.01913-2018
- [15] McLaughlin VV, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006; 114: 1417–1431. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503540
- [16] Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, et al. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 2011; 147: 293–305. doi:10.1016/j.cell.2011.08.035
- [17] Weissmann N, Lobo B, Pichl A, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase prevents cigarette smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 1359–1373. doi:10.1164/rccm.201311-2037OC
- [18] Wells JM, Washko GR, Han MK, et al. Pulmonary arterial enlargement and acute exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2012; 367: 913–921.  
doi:10.1056/NEJMoa1203830
- [19] Fletcher CM, ELMES PC, FAIRBAIRN AS, et al. The significance of respiratory symptoms and the diagnosis of chronic bronchitis in a working population. *Br Med J* 1959; 2: 257–266
- [20] Jones PW, Harding G, Berry P, et al. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *Eur Respir J* 2009; 34: 648–654.  
doi:10.1183/09031936.00102509
- [21] Barnes PJ. GOLD 2017: A New Report. *Chest* 2017; 151: 245–246.  
doi:10.1016/j.chest.2016.11.042
- [22] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3: e442. doi:10.1371/journal.pmed.0030442
- [23] Buist AS, Vollmer WM, Sullivan SD, et al. The Burden of Obstructive Lung Disease Initiative (BOLD). Rationale and Design. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2009; 2: 277–283. doi:10.1081/COPD-57610

- 
- [24] Geldmacher H, Biller H, Herbst A, et al. Die Prävalenz der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) in Deutschland. Ergebnisse der BOLD-Studie. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133: 2609–2614. doi:10.1055/s-0028-1105858
- [25] Jemal A, Ward E, Hao Y, et al. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA* 2005; 294: 1255–1259. doi:10.1001/jama.294.10.1255
- [26] Mapel DW, McMillan GP, Frost FJ, et al. Predicting the costs of managing patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2005; 99: 1325–1333. doi:10.1016/j.rmed.2005.03.001
- [27] Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020. Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 1997; 349: 1498–1504. doi:10.1016/S0140-6736(96)07492-2
- [28] Murray CJL, Barber RM, Foreman KJ, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013. Quantifying the epidemiological transition. *The Lancet* 2015; 386: 2145–2191. doi:10.1016/S0140-6736(15)61340-X
- [29] Murray CJL, Atkinson C, Bhalla K, et al. The state of US health, 1990-2010: Burden of diseases, injuries, and risk factors. *JAMA* 2013; 310: 591–608. doi:10.1001/jama.2013.13805
- [30] Rodgman A, Perfetti TA. *The chemical components of tobacco and tobacco smoke*. 2. Aufl. Boca Raton, Fla. { : CRC Press; 2013
- [31] Pryor WA, Stone K. Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 686: 12–27. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb39148.x
- [32] Liu Y, Pleasants RA, Croft JB, et al. Smoking duration, respiratory symptoms, and COPD in adults aged  $\geq 45$  years with a smoking history. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015; 10: 1409–1416. doi:10.2147/COPD.S82259
- [33] Barnes PJ, Cosio MG. Characterization of T Lymphocytes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLOS Medicine* 2004; 1: e20. doi:10.1371/journal.pmed.0010020
- [34] Chen R. Passive smoking exposure and risk of COPD in China. *Lancet* 2008; 371: 201; author reply 201-2. doi:10.1016/S0140-6736(08)60126-9

- 
- [35] Halcken S, Høst A, Nilsson L, et al. Passive smoking as a risk factor for development of obstructive respiratory disease and allergic sensitization. *Allergy* 1995; 50: 97–105
- [36] Ukawa S, Tamakoshi A, Yatsuya H, et al. Passive smoking and chronic obstructive pulmonary disease mortality. Findings from the Japan collaborative cohort study. *International Journal of Public Health* 2017; 62: 489–494. doi:10.1007/s00038-016-0938-1
- [37] Trupin L, Earnest G, Pedro MS, et al. The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 2003; 22: 462–469. doi:10.1183/09031936.03.00094203
- [38] Viegi G, Simoni M, Scognamiglio A, et al. Indoor air pollution and airway diseases. *International journal of tuberculosis and lung diseases* 2004: 1401–1415
- [39] Yang Q, Chen Y, Krewski D, et al. Effect of short-term exposure to low levels of gaseous pollutants on chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations. *Environmental Research* 2005; 99: 99–105. doi:10.1016/j.envres.2004.09.014
- [40] Rehfuess E. *Fuel for Life: Household Energy and Health*. Geneva: World Health Organization; 2006
- [41] Rehfuess E, Mehta S, Prüss-Üstün A. Assessing Household Solid Fuel Use. Multiple Implications for the Millennium Development Goals. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 373–378. doi:10.1289/ehp.8603
- [42] Bailis R, Ezzati M, Kammen DM. Mortality and greenhouse gas impacts of biomass and petroleum energy futures in Africa. *Science* 2005; 308: 98–103. doi:10.1126/science.1106881
- [43] C. Arden Pope, III and Douglas W. Dockery. *Dockery. Acute Health Effects of PM10 Pollution on Symptomatic and Asymptomatic Children*
- [44] Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, et al. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N Engl J Med* 2004; 351: 1057–1067. doi:10.1056/NEJMoa040610
- [45] Elizabeth Z, Serge E, Christian S, et al. *Long-Term Ambient Air Pollution and Respiratory Symptoms in Adults (SAPALDIA Study)*
- [46] Tager IB, Balme J, Lurmann F, et al. Chronic Exposure to Ambient Ozone and Lung Function in Young Adults. *Epidemiology* 2005; 16: 751–759. doi:10.1097/01.ede.0000183166.68809.b0

- 
- [47] Thurston GD, Kipen H, Annesi-Maesano I, et al. A joint ERS/ATS policy statement: What constitutes an adverse health effect of air pollution? An analytical framework. *Eur Respir J* 2017; 49. doi:10.1183/13993003.00419-2016
- [48] Nelson DI, Concha-Barrientos M, Driscoll T, et al. The global burden of selected occupational diseases and injury risks: Methodology and summary. *Am J Ind Med* 2005; 48: 400–418. doi:10.1002/ajim.20211
- [49] McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, et al. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1419–1424. doi:10.1164/ajrccm.164.8.2105002
- [50] Silverman EK, Chapman HA, Drazen JM, et al. Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1770–1778. doi:10.1164/ajrccm.157.6.9706014
- [51] Stoller JK, Aboussouan LS. A review of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 246–259. doi:10.1164/rccm.201108-1428CI
- [52] Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, et al. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med* 2009; 361: 2599–2608. doi:10.1056/NEJMoa0904006
- [53] Xu G, Gao X, Zhang S, et al. Comparison of the role of HHIP SNPs in susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease between Chinese Han and Mongolian populations. *Gene* 2017. doi:10.1016/j.gene.2017.09.035
- [54] Exner M, Minar E, Wagner O, et al. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1097–1104. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.008
- [55] He J-Q, Ruan J, Connett JE, et al. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 323–328. doi:10.1164/rccm.2111059
- [56] Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 187–195. doi:10.1086/302729
- [57] Otterbein LE, Kolls JK, Mantell LL, et al. Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J Clin Invest* 1999; 103: 1047–1054. doi:10.1172/JCI5342

- 
- [58] Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 183–192. doi:10.1038/nri2254
- [59] Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672–688
- [60] Herold G, Hrsg. Innere Medizin 2018. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2018
- [61] Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* 2011; 378: 1015–1026. doi:10.1016/S0140-6736(11)60988-4
- [62] Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, et al. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997; 277: 2002–2004
- [63] MacRedmond RE, Greene CM, Dorscheid DR, et al. Epithelial expression of TLR4 is modulated in COPD and by steroids, salmeterol and cigarette smoke. *Respir Res* 2007; 8: 84. doi:10.1186/1465-9921-8-84
- [64] Wick MJ, Buesing EJ, Wehling CA, et al. Decreased neprilysin and pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 330–340. doi:10.1164/rccm.201002-0154OC
- [65] Lu BN, Davis LE. Combined angiotensin receptor and neprilysin inhibition therapy for heart failure. *JAAPA* 2018; 31: 35–37. doi:10.1097/01.JAA.0000534982.53989.c2
- [66] Gela A, Bhongir RKV, Mori M, et al. Osteopontin That Is Elevated in the Airways during COPD Impairs the Antibacterial Activity of Common Innate Antibiotics. *PLoS ONE* 2016; 11: e0146192. doi:10.1371/journal.pone.0146192
- [67] Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: S49-52. doi:10.1164/ajrccm.160.supplement\_1.13
- [68] Baraldo S, Balestro E, Bazzan E, et al. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Today: New Insights in the Immunological Pathways. *Respiration* 2016; 91: 380–385. doi:10.1159/000445692
- [69] Osoata GO, Hanazawa T, Brindicci C, et al. Peroxynitrite elevation in exhaled breath condensate of COPD and its inhibition by fudosteine. *Chest* 2009; 135: 1513–1520. doi:10.1378/chest.08-2105

- 
- [70] Rahman I. Oxidative Stress in Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *CBB* 2005; 43: 167–188. doi:10.1385/CBB:43:1:167
- [71] CHOW CK. Cigarette Smoking and Oxidative Damage in the Lung. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 686: 289–298. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb39189.x
- [72] Aoyama K, Matsubara K, Kobayashi S. Aging and oxidative stress in progressive supranuclear palsy. *Eur J Neurol* 2006; 13: 89–92. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01139.x
- [73] Seimetz M, Sommer N, Bednorz M, et al. NADPH oxidase subunit NOXO1 is a target for emphysema treatment in COPD. *Nat Metab* 2020. doi:10.1038/s42255-020-0215-8
- [74] Balestrasse KB, Noriega GO, Batlle A, et al. Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules. *Free Radic Res* 2005; 39: 145–151. doi:10.1080/10715760400022319
- [75] Idriss NK, Blann AD, Lip GYH. Hemoxygenase-1 in Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 971–978. doi:10.1016/j.jacc.2008.06.019
- [76] Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: Markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004; 18: 1791–1800. doi:10.1096/fj.04-2330rev
- [77] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 3221–3247. doi:10.1007/s00018-016-2223-0
- [78] Mercado N, Thimmulappa R, Thomas CMR, et al. Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 406: 292–298. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.035
- [79] Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, et al. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 592–604. doi:10.1164/rccm.200803-380OC
- [80] Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10: 2247–2258

- 
- [81] Lim JW, Kim H, Kim KH. Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Lab Invest* 2001; 81: 349–360
- [82] Tomita K, Barnes PJ, Adcock IM. The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 301: 572–577. doi:10.1016/S0006-291X(02)03029-2
- [83] Smith ER, Cayrou C, Huang R, et al. A human protein complex homologous to the Drosophila MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25: 9175–9188. doi:10.1128/MCB.25.21.9175-9188.2005
- [84] Myers KA, McGlade A, Neubauer BA, et al. KANSL1 variation is not a major contributing factor in self-limited focal epilepsy syndromes of childhood. *PLoS ONE* 2018; 13: e0191546. doi:10.1371/journal.pone.0191546
- [85] Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* 2006; 7: 53. doi:10.1186/1465-9921-7-53
- [86] Gogebakan B, Bayraktar R, Ulaşlı M, et al. The role of bronchial epithelial cell apoptosis in the pathogenesis of COPD. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 5321–5327. doi:10.1007/s11033-014-3403-3
- [87] Tuder RM, Yun JH, Graham BB. Cigarette smoke triggers code red: p21CIP1/WAF1/SDI1 switches on danger responses in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 1–6. doi:10.1165/rcmb.2008-0117TR
- [88] Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: Regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395–419. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.395
- [89] Zeng H, Kong X, Peng H, et al. Apoptosis and Bcl-2 family proteins, taken to chronic obstructive pulmonary disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2012: 711–727
- [90] Imai K, Mercer BA, Schulman LL, et al. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *European Respiratory Journal* 2005; 25: 250–258. doi:10.1183/09031936.05.00023704
- [91] Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106: 1311–1319. doi:10.1172/JCI10259

- 
- [92] Beers MF, Morrissey EE. The three R's of lung health and disease: Repair, remodeling, and regeneration. *J Clin Invest* 2011; 121: 2065–2073. doi:10.1172/JCI45961
- [93] Wansleeben C, Barkauskas CE, Rock JR, et al. Stem cells of the adult lung: Their development and role in homeostasis, regeneration, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2013; 2: 131–148. doi:10.1002/wdev.58
- [94] Zaret KS, Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 2008; 322: 1490–1494. doi:10.1126/science.1161431
- [95] Cardoso WV, Lü J. Regulation of early lung morphogenesis: Questions, facts and controversies. *Development* 2006; 133: 1611–1624. doi:10.1242/dev.02310
- [96] Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, et al. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat. Genet.* 1999; 21: 138–141. doi:10.1038/5096
- [97] El Agha E, Bellusci S. Walking along the Fibroblast Growth Factor 10 Route: A Key Pathway to Understand the Control and Regulation of Epithelial and Mesenchymal Cell-Lineage Formation during Lung Development and Repair after Injury. *Scientifica (Cairo)* 2014; 2014: 538379. doi:10.1155/2014/538379
- [98] Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *NATURE* 2014; 507: 190–194. doi:10.1038/nature12930
- [99] Herriges M, Morrissey EE. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* 2014; 141: 502–513. doi:10.1242/dev.098186
- [100] Kotton DN, Morrissey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat Med* 2014; 20: 822–832. doi:10.1038/nm.3642
- [101] Yin A, Winata CL, Korzh S, et al. Expression of components of Wnt and Hedgehog pathways in different tissue layers during lung development in *Xenopus laevis*. *Gene Expr Patterns* 2010; 10: 338–344. doi:10.1016/j.gep.2010.07.005
- [102] Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, et al. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* 1997; 124: 53–63
- [103] Peng T, Tian Y, Boogerd CJ, et al. Coordination of heart and lung co-development by a multipotent cardiopulmonary progenitor. *NATURE* 2013; 500: 589–592. doi:10.1038/nature12358

- 
- [104] van der Plaat DA, Jong K de, Lahousse L, et al. The Well-Known Gene HHIP and Novel Gene MECR Are Implicated in Small Airway Obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 194: 1299–1302. doi:10.1164/rccm.201604-0843LE
- [105] Kaza AK, Kron IL, Leuwerke SM, et al. Keratinocyte growth factor enhances post-pneumectomy lung growth by alveolar proliferation. *Circulation* 2002; 106: I120-4
- [106] Muyal JP, Kotnala S, Bhardwaj H, et al. Effect of recombinant human keratinocyte growth factor in inducing Ras-Raf-Erk pathway-mediated cell proliferation in emphysematous mice lung. *Inhal Toxicol* 2014; 26: 761–771. doi:10.3109/08958378.2014.957426
- [107] Henderson WR, Chi EY, Ye X, et al. Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 14309–14314. doi:10.1073/pnas.1001520107
- [108] Chilosi M, Poletti V, Zamò A, et al. Aberrant Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* 2003; 162: 1495–1502. doi:10.1016/S0002-9440(10)64282-4
- [109] Ito K, Ito M, Elliott WM, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1967–1976. doi:10.1056/NEJMoa041892
- [110] Wang Y, Tian Y, Morley MP, et al. Development and regeneration of Sox2+ endoderm progenitors are regulated by a Hdac1/2-Bmp4/Rb1 regulatory pathway. *DEVELOPMENTAL CELL* 2013; 24: 345–358. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.012
- [111] Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *NATURE* 2010; 468: 839–843. doi:10.1038/nature09586
- [112] Zhang Q, Zhao K, Shen Q, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *NATURE* 2015; 525: 389–393. doi:10.1038/nature15252
- [113] Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- [114] Meier B, Cross AR, Hancock JT, et al. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem. J.* 1991; 275: 241–245. doi:10.1042/bj2750241

- 
- [115] Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 1994; 74: 1141–1148. doi:10.1161/01.RES.74.6.1141
- [116] Rossi F, Zatti M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 1964; 20: 21–23
- [117] Rodiño-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Castiñeiras-Landeira MI, et al. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vasc Health Risk Manag* 2013; 9: 401–428. doi:10.2147/VHRM.S33053
- [118] Opitz N, Drummond GR, Selemidis S, et al. The 'A's and 'O's of NADPH oxidase regulation: A commentary on "Subcellular localization and function of alternatively spliced Nox1 isoforms". *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 175–179. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.003
- [119] Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 181. doi:10.1038/nri1312
- [120] Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464–1476
- [121] Meijles DN, Fan LM, Howlin BJ, et al. Molecular insights of p47phox phosphorylation dynamics in the regulation of NADPH oxidase activation and superoxide production. *J Biol Chem* 2014; 289: 22759–22770. doi:10.1074/jbc.M114.561159
- [122] Ueyama T, Nakakita J, Nakamura T, et al. Cooperation of p40(phox) with p47(phox) for Nox2-based NADPH oxidase activation during Fcγ receptor (FcγR)-mediated phagocytosis: Mechanism for acquisition of p40(phox) phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) binding. *J Biol Chem* 2011; 286: 40693–40705. doi:10.1074/jbc.M111.237289
- [123] Bánfi B, Clark RA, Steger K, et al. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 2003; 278: 3510–3513. doi:10.1074/jbc.C200613200
- [124] Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, et al. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 20006–20012. doi:10.1074/jbc.M301289200
- [125] Cheng G, Diebold BA, Hughes Y, et al. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 17718–17726. doi:10.1074/jbc.M512751200

- 
- [126] Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, et al. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97: 8010–8014. doi:10.1073/pnas.130135897
- [127] Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, et al. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 45935–45941. doi:10.1074/jbc.M406486200
- [128] Martyn KD, Frederick LM, Loehneysen K von, et al. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 2006; 18: 69–82. doi:10.1016/j.cellsig.2005.03.023
- [129] Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: Structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1428–1459
- [130] Ito T, Matsui Y, Ago T, et al. Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *EMBO J* 2001; 20: 3938–3946. doi:10.1093/emboj/20.15.3938
- [131] Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 2014; 76: 208–226. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046
- [132] Li J-M, Shah AM. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 19952–19960. doi:10.1074/jbc.M110073200
- [133] Kiss PJ, Knisz J, Zhang Y, et al. Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance. *Curr Biol* 2006; 16: 208–213. doi:10.1016/j.cub.2005.12.025
- [134] Moll F, Walter M, Rezende F, et al. NoxO1 Controls Proliferation of Colon Epithelial Cells. *Front Immunol* 2018; 9: 973. doi:10.3389/fimmu.2018.00973
- [135] Brandes RP, Harenkamp S, Schürmann C, et al. The Cytosolic NADPH Oxidase Subunit NoxO1 Promotes an Endothelial Stalk Cell Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36: 1558–1565. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307132
- [136] Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 974–980. doi:10.1164/rccm.200309-1270OC

- 
- [137] Hoess RH, Ziese M, Sternberg N. P1 site-specific recombination. Nucleotide sequence of the recombining sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1982; 79: 3398–3402. doi:10.1073/pnas.79.11.3398
- [138] Abi-Ghanem J, Samsonov SA, Pisabarro MT. Insights into the preferential order of strand exchange in the Cre/loxP recombinase system: Impact of the DNA spacer flanking sequence and flexibility. *J Comput Aided Mol Des* 2015; 29: 271–282. doi:10.1007/s10822-014-9825-0
- [139] Günschmann C, Chiticariu E, Garg B, et al. Transgenic mouse technology in skin biology: inducible gene knockout in mice. *J Invest Dermatol* 2014; 134: e22. doi:10.1038/jid.2014.213
- [140] Rezende F, Schürmann C, Schütz S, et al. Knock out of the NADPH oxidase Nox4 has no impact on life span in mice. *Redox Biol* 2017; 11: 312–314. doi:10.1016/j.redox.2016.12.012
- [141] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275
- [142] Tsikas D. What we-authors, reviewers and editors of scientific work-can learn from the analytical history of biological 3-nitrotyrosine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017; 1058: 68–72. doi:10.1016/j.jchromb.2017.05.012
- [143] El Agha E, Herold S, Alam DA, et al. Fgf10-positive cells represent a progenitor cell population during lung development and postnatally. *Development* 2013; 141: 296–306. doi:10.1242/dev.099747
- [144] Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, et al. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* 2015; 33: 257–290. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240
- [145] Vaure C, Liu Y. A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Front Immunol* 2014; 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00316
- [146] Boer L de, Oakes V, Beamish H, et al. Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene* 2008; 27: 4261–4268. doi:10.1038/onc.2008.74
- [147] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 2012; 380: 2095–2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0

- 
- [148] Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 2016; 37: 2315–2381. doi:10.1093/eurheartj/ehw106
- [149] Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, et al. Cigarette Smoke-Induced Emphysema and Pulmonary Hypertension Can Be Prevented by Phosphodiesterase 4 and 5 Inhibition in Mice. *PLoS ONE* 2015; 10: e0129327. doi:10.1371/journal.pone.0129327
- [150] Pichl A. Die Rolle des serotonergen Systems und der Effekt des Serotonin-Antagonisten Tergurid im Zigarettenrauch-induzierten Lungenemphysemmodell der Maus [Gießen, Justus-Liebig-Universität, Diss., 2013]. Gießen: Universitätsbibliothek; 2014
- [151] Suzuki S, Sasaki H, Takishima T. Effects of smoking on dynamic compliance and respiratory resistance. *Arch Environ Health* 1983; 38: 133–137
- [152] Churg A, Sin DD, Wright JL. Everything prevents emphysema: are animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease any use? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45: 1111–1115. doi:10.1165/rcmb.2011-0087PS
- [153] Churg A, Wright JL. Animal Models of Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Lung Disease. In: Sjöbring U, Taylor JD, Hrsg. *Models of Exacerbations in Asthma and COPD. Contributions to Microbiology*. Basel: KARGER; 2007: 113–125. doi:10.1159/000107058
- [154] Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1422–1428. doi:10.1164/ajrccm/142.6\_Pt\_1.1422
- [155] Chen X, Austin ED, Talati M, et al. Oestrogen inhibition reverses pulmonary arterial hypertension and associated metabolic defects. *Eur Respir J* 2017; 50. doi:10.1183/13993003.02337-2016
- [156] Ray MK, Fagan SP, Brunicardi FC. The Cre-loxP System: A Versatile Tool for Targeting Genes in a Cell- and Stage-Specific Manner. *Cell Transplant* 2000; 9: 805–815. doi:10.1177/096368970000900607

- 
- [157] Walters MC, Magis W, Fiering S, et al. Transcriptional enhancers act in cis to suppress position-effect variegation. *Genes & Development* 1996; 10: 185–195
- [158] Seimetz M. Regulation von NADPH-Oxidasen und NO-Synthasen in einem Zigarettenrauch-induzierten COPD-Mausmodell [Gießen, Univ., Diss., 2010]; 2010
- [159] Zangiabadi A, Pasquale CG de, Sajkov D. Pulmonary hypertension and right heart dysfunction in chronic lung disease. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 739674. doi:10.1155/2014/739674
- [160] Branchfield K, Li R, Lungova V, et al. A three-dimensional study of alveologenesis in mouse lung. *Dev Biol* 2016; 409: 429–441. doi:10.1016/j.ydbio.2015.11.017
- [161] Karnati S, Graulich T, Oruqaj G, et al. Postnatal development of the bronchiolar club cells of distal airways in the mouse lung: Stereological and molecular biological studies. *Cell Tissue Res* 2016; 364: 543–557. doi:10.1007/s00441-015-2354-x
- [162] Seeger W, Adir Y, Barberà JA, et al. Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62: D109-16. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.036
- [163] Carlsen J, Hasseriis Andersen K, Boesgaard S, et al. Pulmonary arterial lesions in explanted lungs after transplantation correlate with severity of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 347–354. doi:10.1016/j.healun.2012.11.014
- [164] Tudor RM, Marecki JC, Richter A, et al. Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 2007; 28: 23. doi:10.1016/j.ccm.2006.11.010
- [165] Knudsen L, Brandenberger C, Ochs M. Stereology as the 3D tool to quantitate lung architecture. *Histochem Cell Biol* 2021; 155: 163–181. doi:10.1007/s00418-020-01927-0
- [166] Pollock K, Albares L, Wendt C, et al. Isolation of fibroblasts and epithelial cells in bronchoalveolar lavage (BAL). *Exp Lung Res* 2013; 39: 146–154. doi:10.3109/01902148.2013.781720
- [167] Sumimoto H, Minakami R, Miyano K. Soluble Regulatory Proteins for Activation of NOX Family NADPH Oxidases. *Methods Mol Biol* 2019; 1982: 121–137. doi:10.1007/978-1-4939-9424-3\_8

- 
- [168] Lambeth JD. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 332–347.  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.027
- [169] Petruzzelli S, Puntoni R, Mimotti P, et al. Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1902–1907.  
doi:10.1164/ajrccm.156.6.9702075
- [170] Bunton-Stasyshyn RKA, Saccon RA, Fratta P, et al. SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. *Neuroscientist* 2015; 21: 519–529. doi:10.1177/1073858414561795
- [171] Haw TJ, Starkey MR, Pavlidis S, et al. Toll-like receptor 2 and 4 have opposing roles in the pathogenesis of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018; 314: L298-L317.  
doi:10.1152/ajplung.00154.2017
- [172] Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12: 361–367
- [173] Chao C-M. Effect of Fgf10 deficiency on mouse lung development and in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia 2017
- [174] McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol* 2017; 7: 1–12. doi:10.1002/cpmo.22
- [175] Aravamudan B, Thompson MA, Pabelick CM, et al. Mitochondria in Lung Diseases. *Expert Rev Respir Med* 2013; 7: 631–646.  
doi:10.1586/17476348.2013.834252

---

## 9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1: Mechanismen der pulmonalen Beeinflussung von COPD. Modifiziert nach Barnes, 2000 [1]..... 8
- Abbildung 1-2: Vier Stadien der Tabakrauch-Epidemie, zu erkennen ist die Latenzzeit zwischen dem Anstieg der Raucheranzahl und der Rauch-bedingten Todesfälle. Modifiziert nach Bousquet (Hg.), 2007 [2] ..... 11
- Abbildung 1-3: Überblick der beteiligten Zellen und Zytokine bei der COPD. Zigarettenrauch und andere Noxen aktivieren die Freisetzung verschiedener Zytokine aus Epithelzellen und Makrophagen. Diese führt zur chemotaktischen Aktivierung von Monozyten, welche in der Lunge zu Makrophagen differenzieren. Aktivierte neutrophile Granulozyten und Makrophagen setzen Proteasen frei, die zur Zerstörung der Alveolen / Emphysembildung und vermehrter Schleimproduktion beitragen. Aktivierte TH1-Zellen und zytotoxische TC1-Zellen unterstützen die Destruierung der Alveolen. Die stimulierte Proliferation von Fibroblasten führt zu Fibrose der kleinen Atemwege. (TGF $\beta$  = transforming growth factor- $\beta$ , CCL = CC-chemokine ligand, CCR = CC-chemokine receptor, CXCL = CXC-chemokine ligand, CXCR = CXC-chemokine receptor, MMP9 = Matrixmetalloprotease 9). Modifiziert nach Barnes, 2008 [58] ..... 13
- Abbildung 1-4: Interaktion der Apoptose mit anderen pathogenetischen Mechanismen in der COPD. Durch die Entzündungsreaktion aktivierte CD8+ T-Zellen setzen Perforine und Granzym B frei, welche die Apoptose initiieren. Oxidativer Stress verursacht Zellschäden und niedrigere VEGF-Spiegel, die so zur Apoptose führen. Proteasen wie MMPs können durch Basalmembranzerstörung, die zu Verlust von Überlebenssignalen in Zellen oder direkt durch Fas-Liganden-Aktivierung zu Apoptose führen. Modifiziert nach Demedts, 2006 [85]. ..... 18
- Abbildung 1-5: Unterformen der NADPH-Oxidasen Nox1-5. Nox1-4 gehen mit p22phox Heterodimere ein. Nox1 als enzymatisch aktiver Komplex beinhaltet den Nox Organiser (NoxO1), den Nox Activator 1 (NoxA1) und die GTPase Rac in ihrer aktiven, GTP gebundener Form. Die Aktivität von Nox2 hängt von p47phox, p67phox und Rac ab. Supportiv wirkt hierbei

---

p40phox. Nox3 benötigt für ihre Aktivität NoxO1. Die Funktion von Rac in vivo ist nicht geklärt. Nox4 erfährt keine Regulation durch Untereinheiten. Ebenfalls ist der Einfluss von Rac hier nicht geklärt. Interessanterweise entstehen hierbei hauptsächlich Wasserstoffperoxide. Nox5 wird durch Bindung von Kalzium aktiviert. Hierbei bewirkt eine Konformationsänderung das Lösen eines intramolekularen Inhibitors. Aus Brandes et al., 2014 [131]. .....22

Abbildung 1-6: Durch Tamoxifen induzierbares Cre-loxP System. Die Cre Rekombinase wird mit einem modifizierten Estrogenrezeptor (ER) gebunden und durch einen Gewebe-spezifischen Promotor kontrolliert. Im inaktiven Zustand bindet heat shock protein 90 (Hsp90) am ER und verhindert ein Wandern in den Zellkern. Bei Tamoxifengabe bindet diese am ER, Hsp90 wird freigesetzt und das Cre-ER Fusionsprotein kann in den Zellkern wandern. Dort rekombiniert Cre die LoxP Sequenzen, woraus ein Knockout resultiert. Modifiziert nach Günschmann, 2014 [139] .....24

Abbildung 1-7: Verwendetes Gruppenschema für die Rauchexposition und Tamoxifenzugabe (Tam) der verschiedenen Mausgruppen. Alle Mäuse befanden sich 11 Monate im Experiment. Zu jeder Kontrollgruppe ohne jegliche Rauchexposition gab es eine Rauch-exponierte Gruppe, die für 8 Monate 6 Stunden pro Tag an 5 Tagen die Woche mit einer Partikelkonzentration von 140 mg/m<sup>3</sup> beraucht wurde. Anschließend wurde bei 2 von 4 NoxO1 LoxP-flankierten Gruppen durch zweiwöchige Tamoxifengabe eine NoxO1-KO initiiert. Alle Rauchexponierte Gruppen wurden für weitere 3 Monate bei Raumluft gehalten.....25

Abbildung 1-8: In vivo und ex vivo Daten der Lungencompliance, des rechtsventrikulären systolischen Blutdruckes, der Ventrikelverhältnisse und des systemischen arteriellen Mitteldruckes von Wildtypmäusen (WT), NoxO1-Knockout nicht induzierten und NoxO1 Knockout induzierten Mäusen, jeweils nach Raumluft- und 8-monatiger Rauchexposition. n=10. A) Dynamische Lungencompliance. B) Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck, gemessen via Rechtsherzkatheter. C) Gewichtsverhältnis des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel plus Septum. D) Systemischer arterieller Mitteldruck. Zur Verfügung gestellt von M. Bednorz.....27

---

Abbildung 3-1: Messdaten der Alveolarmorphometrie von Wildtyp- und NoxO1 Knockout-fähigen Mäusen, jeweils mit und ohne Zigarettenrauchexposition. Bei der Hälfte der NoxO1 Cre Mäuse wurde ein Knockout post-Rauchexposition durch Tamoxifengabe induziert. Es wurden hierfür Lungenschnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung untersucht. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. Die Interaktion stellt hierbei die Effekte der Regeneration dar, welches sich aus den Parametern „Rauchexposition“ und anschließender „KO-Induktion“ zusammensetzt. n=7-9. A) Alveolärer Luftanteil (Airspace). B) Durchschnittliche Septumdicke. C) Mittlerer Alveolenseptenabstand (mean linear intercept).....51

Abbildung 3-2: Untersuchung der mittleren Wandstärke der pulmonalen Gefäße nach Rauchexposition in WT, NoxO1-Knockout nicht-induzierten und induzierten Mausgruppen. Hierfür wurden Lungenschnitte in Elastika-van-Gieson-Färbung untersucht. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=5. A) Gefäße zwischen 20-70 µm im Innendurchmesser. B) Gefäße zwischen 70-150 µm im Innendurchmesser. C) Exemplarische Bilder zur Visualisierung.....52

Abbildung 3-3: Untersuchung des Muskularisierungsgrades der pulmonalen Gefäße nach Rauchexposition in WT, NoxO1-Knockout nicht-induzierten und induzierten Mausgruppen. Hierfür wurden Lungenschnitte mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Aktin und von-Willebrand-Faktor gefärbt und untersucht. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=5. A) Gefäße zwischen 20-70 µm im Innendurchmesser. B) Gefäße zwischen 70-

---

150 µm im Innendurchmesser. C) Exemplarische Bilder zur Visualisierung. .....	53
Abbildung 3-4: Quantitative Proteinanalyse von Lungenhomogenat von NoxO1 mittels Western Blot, als Referenzstandard wurde β-Aktin verwendet. Es wurden Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen verwendet („NoxO1“). „nosmoke“ Mausgruppen stellen Gruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar. Zudem wurden Mausgruppen nach 8-monatiger Zigarettenrauchexposition mit und ohne anschließender Tamoxifengabe untersucht (NoxO1 smoke & NoxO1 smoke +T). Als Kontrollgruppe „K“ wurde eine konstitutionell NoxO1-defiziente Mausgruppe verwendet. Bilder des kompletten Westerblots im Anhang. Analyse durchgeführt durch S.Hadzic. n=4. ....	54
Abbildung 3-5: Quantitative Proteinanalyse von Lungenhomogenat mittels Western Blot, als Referenzstandard wurde β-Aktin verwendet. Es wurden WT und post-Rauch NoxO1 defiziente Gruppen untersucht, jeweils nach Rauchluft- und 8-monatiger Zigarettenrauchexposition. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Gruppen in Relation zur WT-Gruppe ohne Rauchexposition gesetzt. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=6. A) relative Nitrotyrosinmenge. B,E) Relative MMP9-Menge und exemplarischer Blot. C,F) Relative TIMP3-Menge und exemplarischer Blot. D,G) Relative FGF10-Menge und exemplarischer Blot. ....	56
Abbildung 3-6: Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) der Gene der Gruppe „Extrazelluläre Matrix“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=3. ....	58
Abbildung 3-7: Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) der Gene der Gruppe „Immunologie“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen	

---

	Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=3. ....	59
Abbildung 3-8:	Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) der Gene der Gruppe „DNA-Aktivität“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=3, falls nicht anders bezeichnet. ....	60
Abbildung 3-9:	Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) der Gene der Gruppe „Oxidativer Stress“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=3, falls nicht anders bezeichnet. ....	61
Abbildung 3-10:	Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) des BAX-Gens. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt. n=3. ....	62
Abbildung 3-11:	Relative Genexpressionsmenge anhand des cycle threshold Wertes (Ct) für Gene der Gruppe „Proliferation und Lungenreifung“. Interaktionsanalyse zwischen NoxO1-KO induzierten und nicht-induzierten Gruppen. „0“ stellen Mausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition dar, stattdessen erfolgten hierbei eine 11-monatige RaumlufTEXposition, wobei nach 8 Monaten ggf. eine NoxO1-KO-Induktion durch Tamoxifengabe	

---

erfolgte. Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Mäuse 11 Monate alt.  
n=3, falls nicht anders bezeichnet. ....63

Abbildung 3-12: Kompartiment spezifische Mikroarray-Analyse der Genexpression in Bezug auf übergeordnete Gengruppen nach Rauchexposition und NoxO1 Knockout-Induktion post-Rauch (KO.K vs. KO), nach Rauchexposition und alleinige NoxO1-Knockout-Fähigkeit (KO vs. WT) und beide Vergleiche kombiniert (KO.K vs. WT). s =Effekte in Lungensepten, v = Effekte in Lungengefäße. KO.K vs KO zeigt die Genexpressionsveränderung durch NoxO1-Knockout in Vergleich zu Knockout-fähigen Tieren in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen NoxO1 Knockout Tiere und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen Knockout-fähige Gruppen ohne Knockout-Induktion und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. n=4. ....65

Abbildung 3-13: Kompartiment spezifische Mikroarray-Analyse der Genexpression in Bezug auf übergeordnete Gengruppen mit möglicher Relevanz in der Pathogenese nach Rauchexposition und NoxO1 Knockout-Induktion post-Rauch (KO.K vs. KO), nach Rauchexposition und alleinige NoxO1-Knockout-Fähigkeit (KO vs. WT) und beide Vergleiche kombiniert (KO.K vs. WT). s =Effekte in Lungensepten, v = Effekte in Lungengefäße. KO.K vs KO zeigt die Genexpressionsveränderung durch NoxO1-Knockout in Vergleich zu Knockout-fähigen Tieren in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen NoxO1 Knockout Tiere und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen Knockout-fähige Gruppen ohne Knockout-Induktion und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. n=4. ....66

Abbildung 3-14: Kompartiment spezifische Mikroarray-Analyse der Genexpression in Bezug auf möglich relevante Gene nach Rauchexposition und NoxO1 Knockout-Induktion post-Rauch (KO.K vs. KO), nach Rauchexposition und alleinige NoxO1-Knockout-Fähigkeit (KO vs. WT) und beide Vergleiche kombiniert (KO.K vs. WT). s =Effekte in Lungensepten, v = Effekte in Lungengefäße. KO.K vs KO zeigt die Genexpressionsveränderung durch NoxO1-Knockout in Vergleich zu Knockout-fähigen Tieren in Bezug auf

Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen NoxO1 Knockout Tiere und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. KO.K vs WT zeigt die Genexpressionsveränderung zwischen Knockout-fähige Gruppen ohne Knockout-Induktion und Wildtypgruppen in Bezug auf Rauchexposition. n=4. ....67

Abbildung 3-15: Kompartimentenvergleich zwischen Lungensepten (s) und Lungengefäßen (v) nach Rauchexposition und NoxO1-KO-Induktion post-Rauch (KO.K vs KO) in Bezug auf die logarithmierte Intensitätsänderung zur Basis 2 ( $\log_2$  fold-change). KO.K vs KO zeigt die Genexpressionsveränderung durch NoxO1-Knockout in Vergleich zu Knockout-fähigen Tieren in Bezug auf Rauchexposition. Genpunkte im negativen Bereich erfuhren eine Herunterregulation und im positiven Bereich eine Hochregulation. Liegen Genpunkte auf der gestrichelten Linie, so ist ihr Expressionsverhalten in Gefäßen und Septen gleich. Rot hervorgehoben wurden Punkte, die lediglich in Lungengefäßen hochreguliert wurden (septal:  $\log_2$  fold-change =  $\pm 1$ , vaskulär:  $\log_2$  fold-change  $\geq 2,5$ ). n=4. ....68

Abbildung 11-1: Western-Blot Bild der Proteinanalyse von NoxO1 und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „K“ steht für die NoxO1-defiziente Kontrollmausgruppe. „M“ steht für den verwendeten Marker. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition. „NoxO1 smoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger Raumlufteexposition. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande. Analyse durchgeführt durch S.Hadzic. ....114

Abbildung 11-2: Western-Blot Bilder der Proteinanalyse von Nitrotyrosin und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „WT nosmoke“ steht für Wildtyp-Kontrollmausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition. „WT smoke“ stellen die Wildtypgruppe mit 8-monatiger Rauchexposition und anschließenden 3 Monaten Raumlufte-Exposition dar. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition, während „NoxO1 smoke“ für Mausgruppen mit

---

LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger RaumlufTEXposition stehen. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande, bei Nitrotyrosin werden alle Banden zur Analyse einberechnet..... 115

Abbildung 11-3: Western-Blot Bilder der Proteinanalyse von MMP9 und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „WT nosmoke“ steht für Wildtyp-Kontrollmausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition. „WT smoke“ stellen die Wildtypgruppe mit 8-monatiger Rauchexposition und anschließenden 3 Monaten RaumlufTEXposition dar. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition, während „NoxO1 smoke“ für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger RaumlufTEXposition stehen. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande..... 116

Abbildung 11-4: Western-Blot Bilder der Proteinanalyse von TIMP3 und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „M“ steht für den verwendeten Marker. „WT nosmoke“ steht für Wildtyp-Kontrollmausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition. „WT smoke“ stellen die Wildtypgruppe mit 8-monatiger Rauchexposition und anschließenden 3 Monaten RaumlufTEXposition dar. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition, während „NoxO1 smoke“ für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger RaumlufTEXposition stehen. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande..... 117

Abbildung 11-5: Western-Blot Bilder der Proteinanalyse von FGF10 und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „WT nosmoke“ steht für Wildtyp-Kontrollmausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition. „WT smoke“ stellen die Wildtypgruppe mit 8-monatiger Rauchexposition und anschließenden 3

---

Monaten Raumlucht-Exposition dar. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition, während „NoxO1 smoke“ für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger Raumluchtexposition stehen. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande..... 118

---

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Schweregrad der COPD anhand von FEV <sub>1</sub> -Werten der Patienten in der Spirometrie, GOLD Report, 2018 [5] .....	9
Tabelle 1-2: Einteilung der Patienten nach Anzahl der Exazerbationen und Symptomschwere (wenig: CAT<10, mMRC 0-1; vermehrt: CAT≥10, mMRC≥2), GOLD Report, 2018 [5] .....	9
Tabelle 2-1: Benutzte primäre Antikörper bei Western Blot .....	30
Tabelle 2-2: Benutzte sekundäre Antikörper bei Western Blot .....	31
Tabelle 2-3: Benutzte Antikörper zur Immunfärbung.....	32
Tabelle 2-4: Benutzte Primer mit den jeweiligen Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer und der Produktgröße .....	37
Tabelle 2-5: Protokoll für Hämatoxylin-Eosin-Färbung (übernommen von der laboreigenen Arbeitsgruppe) .....	39
Tabelle 2-6: Protokoll für Elastika-van-Gieson-Färbung (übernommen von der laboreigenen Arbeitsgruppe) .....	40
Tabelle 2-7: Färbeergebnis der Elastika-van-Gieson-Färbung .....	40
Tabelle 2-8: Protokoll der doppelten Immunfärbung von α-Aktin und vWF (übernommen von der laboreigenen Arbeitsgruppe).....	42
Tabelle 2-9: Protokoll der Real Time PCR Zyklen. Die Zeiten gelten ab Erreichen der jeweiligen Temperatur.....	48
Tabelle 11-1: Rohdaten der Mikro-Array cDNA Analyse der Gefäßdissektate. Dargestellt sind Gengruppen gemäß der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Die Signifikanzen der Spalten werden entweder mit Rot, Gelb oder Grün unterlegt. Grün bedeutet eine generelle Hochregulation der der Gruppe zugehörige Gene, Rot eine generelle Herunterregulation der der Gruppe zugehörige Gene. Gelb unterlegte Zahlen zeigen ein durchmisches Regulationsmuster der der Gruppe zugehörige Gene an. ....	119
Tabelle 11-2: Rohdaten der Mikro-Array cDNA Analyse der Lungensepten. Dargestellt sind Gengruppen gemäß der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Die Signifikanzen der Spalten werden entweder mit Rot, Gelb oder Grün unterlegt. Grün bedeutet eine generelle Hochregulation der der Gruppe zugehörige Gene, Rot eine generelle Herunterregulation der der	

---

Gruppe zugehörige Gene. Gelb unterlegte Zahlen zeigen ein durchmisches  
Regulationsmuster der der Gruppe zugehörige Gene an. .... 120

Tabelle 11-3: Rohdaten der Mikro-Array cDNA Analyse der Gefäßdissektate.

Dargestellt sind ausgewählte Gene, die eine mögliche Relevanz bei einer  
Lungenregeneration durch NoxO1-Knockout nach Zigarettenrauch  
induziertem Emphysem und PH haben. Die Effektstärke wird hierbei als  
Log<sub>2</sub>-Foldchange (LFC) angegeben. Ebenfalls angegeben ist das halbe  
Konfidenzintervall, sowie die negative logarithmierte Signifikanz. .... 121

Tabelle 11-4: Rohdaten der Mikro-Array cDNA Analyse der Lungensepten. Dargestellt

sind ausgewählte Gene, die eine mögliche Relevanz bei einer  
Lungenregeneration durch NoxO1-Knockout nach Zigarettenrauch  
induziertem Emphysem und PH haben. Die Effektstärke wird hierbei als  
Log<sub>2</sub>-Foldchange (LFC) angegeben. Ebenfalls angegeben ist das halbe  
Konfidenzintervall, sowie die negative logarithmierte Signifikanz. .... 121

## 11 Anhang

Im Folgenden werden die Originalbilder, welche für die Western-Blot Analyse verwendet wurden, abgebildet. Der rote Pfeil zeigt stets auf die korrekte Bande. „K“ steht für die verwendete Kontrollgruppe, welche Lungenhomogenat von NoxO1 defizienten Mäusen beinhaltet. „M“ steht für den verwendeten Marker. „WT“ und „WT nosmoke“ stehen für Wildtyp-Kontrollmausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition. „WT smoke“ stellen die Wildtypgruppe mit 8-monatiger Rauchexposition und anschließenden 3 Monaten Raumluft-Exposition dar. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition, während „NoxO1 smoke“ für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger Raumluftexposition stehen. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren.

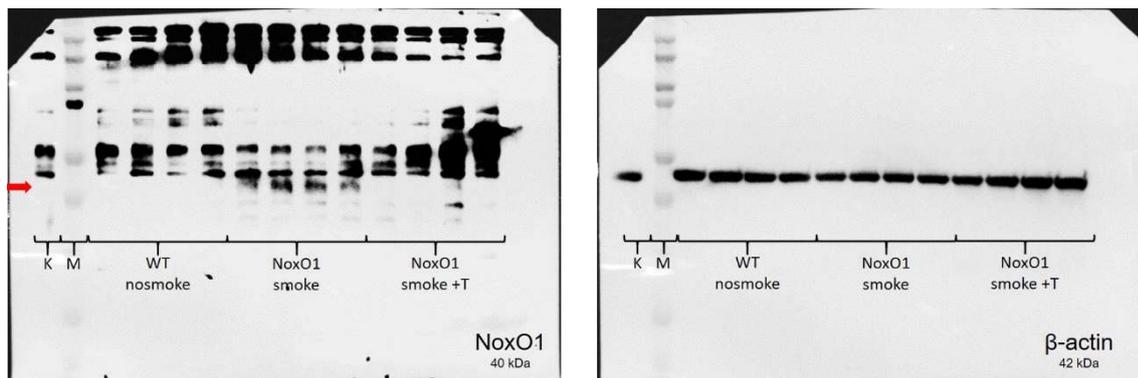


Abbildung 11-1: Western-Blot Bild der Proteinanalyse von NoxO1 und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „K“ steht für die NoxO1-defiziente Kontrollmausgruppe. „M“ steht für den verwendeten Marker. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition. „NoxO1 smoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger Raumluftexposition. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande. Analyse durchgeführt durch S.Hadzic.

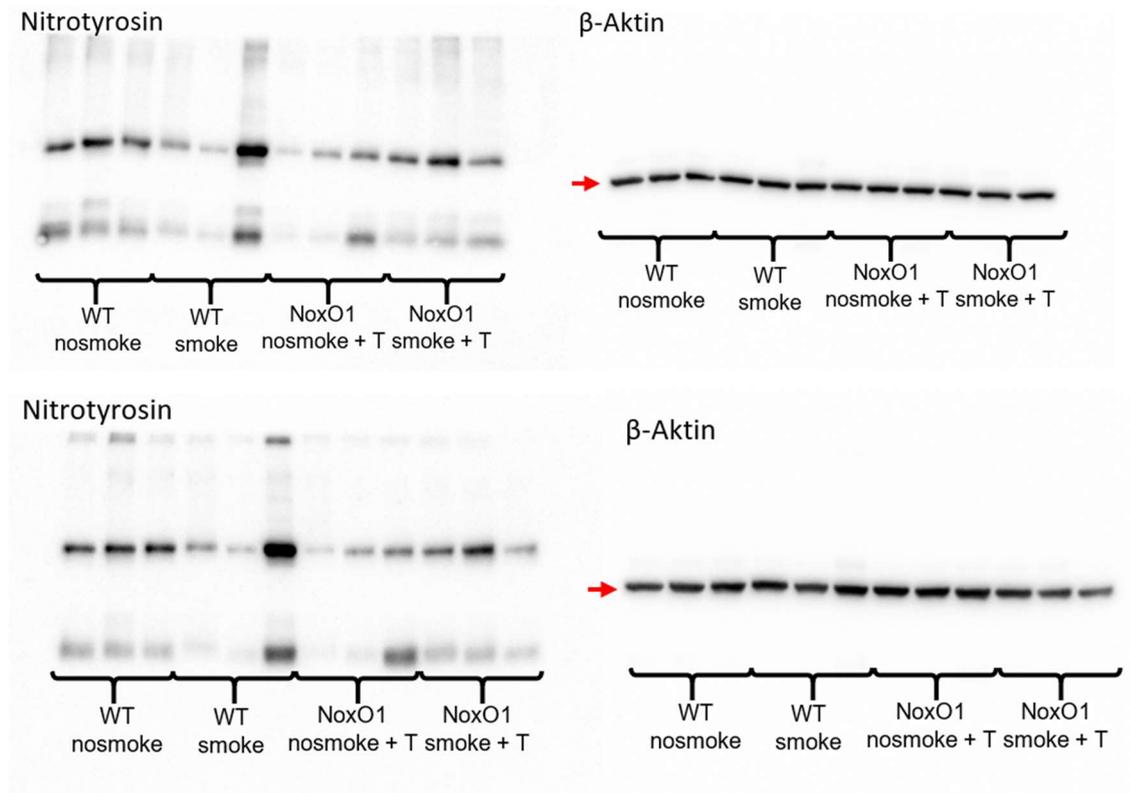


Abbildung 11-2: Western-Blot Bilder der Proteinanalyse von Nitrotyrosin und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „WT nosmoke“ steht für Wildtyp-Kontrollmausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition. „WT smoke“ stellen die Wildtypgruppe mit 8-monatiger Rauchexposition und anschließenden 3 Monaten Raumluf-Exposition dar. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition, während „NoxO1 smoke“ für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger Raumlufexposition stehen. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande, bei Nitrotyrosin werden alle Banden zur Analyse einberechnet.

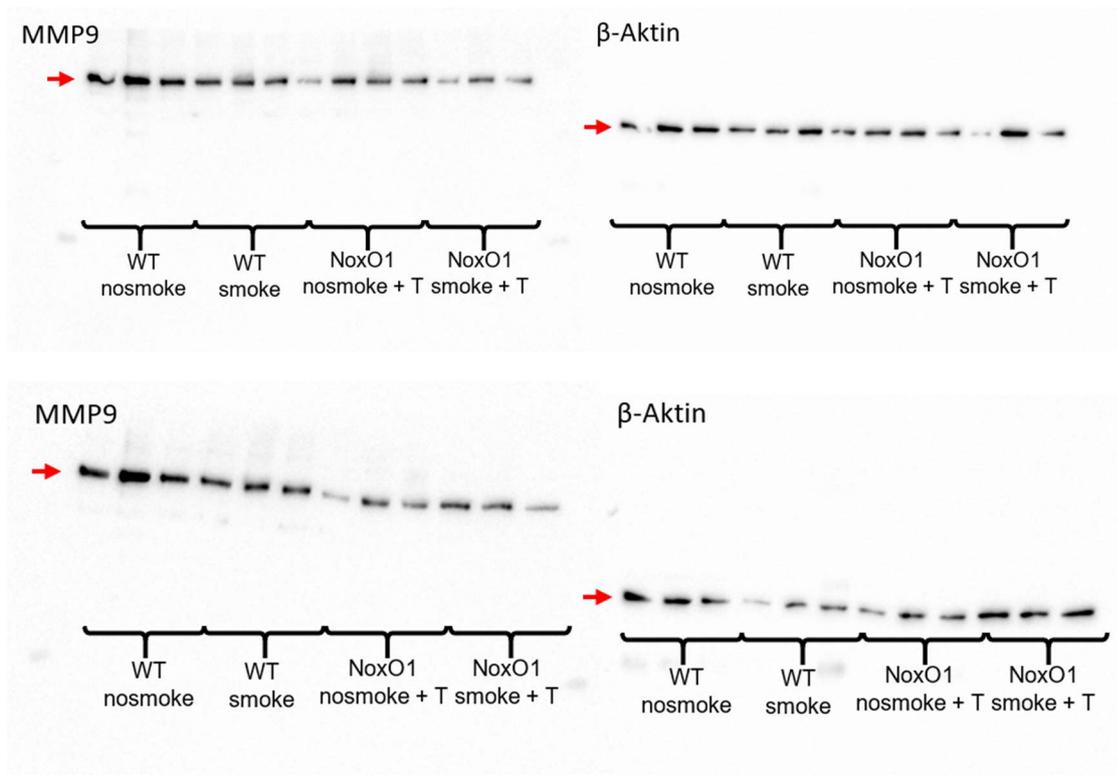


Abbildung 11-3: Western-Blot Bilder der Proteinanalyse von MMP9 und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „WT nosmoke“ steht für Wildtyp-Kontrollmausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition. „WT smoke“ stellen die Wildtypgruppe mit 8-monatiger Rauchexposition und anschließenden 3 Monaten Raumluft-Exposition dar. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition, während „NoxO1 smoke“ für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger Raumluftexposition stehen. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande.

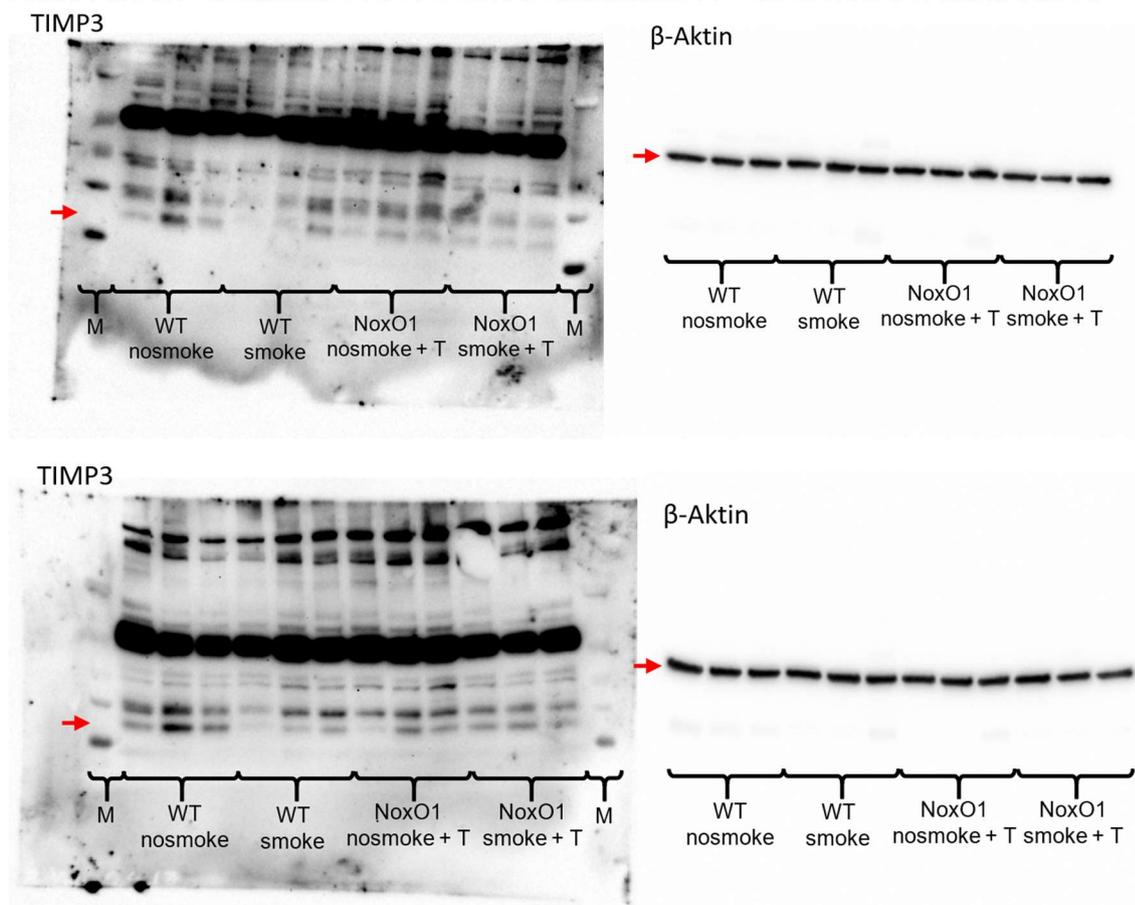


Abbildung 11-4: Western-Blot Bilder der Proteinanalyse von TIMP3 und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „M“ steht für den verwendeten Marker. „WT nosmoke“ steht für Wildtyp-Kontrollmausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition. „WT smoke“ stellen die Wildtypgruppe mit 8-monatiger Rauchexposition und anschließenden 3 Monaten Raumluf-Exposition dar. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition, während „NoxO1 smoke“ für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger Raumluf-Exposition stehen. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande.

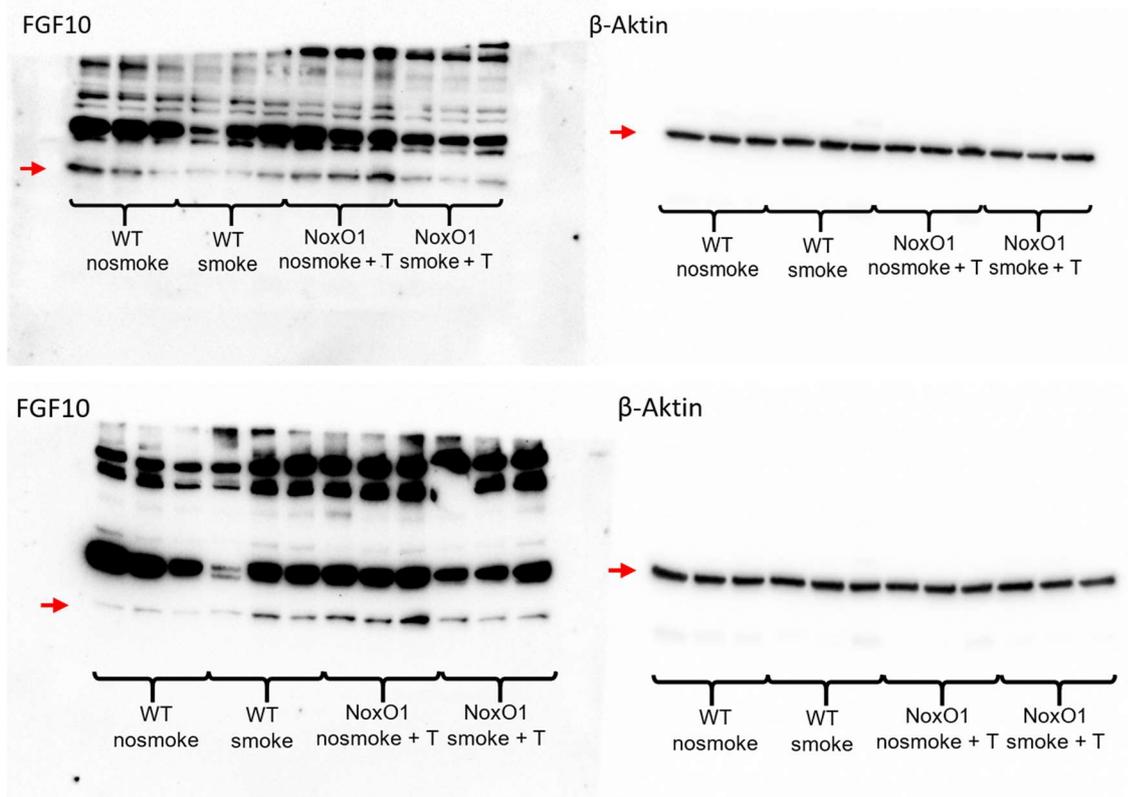


Abbildung 11-5: Western-Blot Bilder der Proteinanalyse von FGF10 und vom Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. „WT nosmoke“ steht für Wildtyp-Kontrollmausgruppen ohne Zigarettenrauchexposition. „WT smoke“ stellen die Wildtypgruppe mit 8-monatiger Rauchexposition und anschließenden 3 Monaten Raumluf-Exposition dar. „NoxO1 nosmoke“ steht für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen ohne Zigarettenrauchexposition, während „NoxO1 smoke“ für Mausgruppen mit LoxP-flankiertem NoxO1-Gen mit 8-monatiger Zigarettenrauchexposition und anschließender 3-monatiger Raumluf-Exposition stehen. Gruppen mit „+T“ sind Mausgruppen, die nach 8 Monaten eine Tamoxifen-induzierten Knockout des NoxO1-Gens erfuhren. Der rote Pfeil verweist auf die korrekte Proteinbande.

Anbei sind die Rohdaten der Mikroarray cDNA Analyse aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden:

Gene sets		Significance (-log P)		
		Vessel		
ID	Name	KO vs WT	KO.K vs KO	KO.K vs WT
05010	Alzheimer's disease	16,46	15,04	0,61
04612	Antigen processing and presentation	0,08	1,30	1,14
04210	Apoptosis	3,08	1,62	1,34
05310	Asthma	0,64	2,47	4,14
01200	Carbon metabolism	8,77	5,40	1,84
04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	0,19	0,06	0,27
00020	Citrate cycle (TCA cycle)	4,81	4,56	0,66
04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	0,18	2,20	0,88
04512	ECM-receptor interaction	4,53	0,56	3,85

05169	Epstein-Barr virus infection	7,68	4,14	1,20
00061	Fatty acid biosynthesis	0,50	0,59	0,20
00071	Fatty acid degradation	1,44	0,16	2,54
01212	Fatty acid metabolism	3,21	0,28	2,92
04510	Focal adhesion	14,06	2,28	9,60
00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	3,21	1,40	2,14
03440	Homologous recombination	1,95	2,63	0,06
05016	Huntington's disease	18,70	12,02	2,80
04670	Leukocyte transendothelial migration	3,42	0,56	2,97
01100	Metabolic pathways	28,26	10,74	6,07
03430	Mismatch repair	0,62	0,96	0,08
04932	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	13,62	11,20	0,99
04740	Olfactory transduction	31,73	8,39	27,24
00190	Oxidative phosphorylation	17,88	13,73	1,60
05012	Parkinson's disease	15,29	15,05	0,40
05200	Pathways in cancer	9,88	0,91	6,97
05200	Pathways in cancer	9,88	0,91	6,97
00030	Pentose phosphate pathway	3,91	2,02	1,22
04146	Peroxisome	9,02	2,11	4,02
04611	Platelet activation	9,50	2,95	5,54
04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	8,37	3,54	2,67
05205	Proteoglycans in cancer	11,59	1,51	8,45
00230	Purine metabolism	3,49	0,88	0,59
03010	Ribosome	7,62	19,55	3,75
03013	RNA transport	4,36	2,43	1,33
04919	Thyroid hormone signaling pathway	8,07	1,84	4,12
04530	Tight junction	4,78	0,27	6,99

Tabelle 11-1: Rohdaten der Mikro-Array cDNA Analyse der Gefäßdissektate. Dargestellt sind Gengruppen gemäß der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Die Signifikanzen der Spalten werden entweder mit Rot, Gelb oder Grün unterlegt. Grün bedeutet eine generelle Hochregulation der der Gruppe zugehörige Gene, Rot eine generelle Herunterregulation der der Gruppe zugehörige Gene. Gelb unterlegte Zahlen zeigen ein durchmisches Regulationsmuster der der Gruppe zugehörige Gene an.

Gene sets		Significance (-log P)		
		Septa		
ID	Name	KO vs WT	KO.K vs KO	KO.K vs WT
05010	Alzheimer's disease	8,23	2,99	4,69
04612	Antigen processing and presentation	0,14	0,35	0,14
04210	Apoptosis	7,74	2,02	5,01
05310	Asthma	0,38	0,98	0,61
01200	Carbon metabolism	5,66	1,49	4,23
04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	0,34	0,12	0,60
00020	Citrate cycle (TCA cycle)	2,90	1,10	1,89
04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	0,65	0,16	2,16
04512	ECM-receptor interaction	1,90	3,94	0,37
05169	Epstein-Barr virus infection	8,12	2,88	5,70
00061	Fatty acid biosynthesis	0,54	0,30	0,11

00071	Fatty acid degradation	1,53	1,27	0,86
01212	Fatty acid metabolism	2,56	1,66	0,99
04510	Focal adhesion	2,99	3,03	0,60
00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	5,58	3,65	1,83
03440	Homologous recombination	1,68	1,44	0,62
05016	Huntington's disease	12,63	4,92	6,32
04670	Leukocyte transendothelial migration	1,73	0,23	2,36
01100	Metabolic pathways	38,46	11,07	22,23
03430	Mismatch repair	0,28	0,37	0,11
04932	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	8,30	3,09	4,57
04740	Olfactory transduction	36,18	24,01	8,46
00190	Oxidative phosphorylation	8,13	5,10	3,02
05012	Parkinson's disease	7,53	3,59	3,34
05200	Pathways in cancer	6,88	2,09	5,24
05200	Pathways in cancer	6,88	2,09	5,24
00030	Pentose phosphate pathway	2,75	1,89	0,95
04146	Peroxisome	4,30	1,51	3,26
04611	Platelet activation	2,62	2,13	0,94
04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	3,66	0,26	4,76
05205	Proteoglycans in cancer	6,12	2,81	2,86
00230	Purine metabolism	7,82	2,90	5,61
03010	Ribosome	20,00	14,11	6,51
03013	RNA transport	5,17	0,02	8,62
04919	Thyroid hormone signaling pathway	1,62	0,61	1,61
04530	Tight junction	4,34	1,20	2,25

Tabelle 11-2: Rohdaten der Mikro-Array cDNA Analyse der Lungensepten. Dargestellt sind Gengruppen gemäß der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Die Signifikanzen der Spalten werden entweder mit Rot, Gelb oder Grün unterlegt. Grün bedeutet eine generelle Hochregulation der der Gruppe zugehörige Gene, Rot eine generelle Herunterregulation der der Gruppe zugehörige Gene. Gelb unterlegte Zahlen zeigen ein durchmisches Regulationsmuster der der Gruppe zugehörige Gene an.

	Coefficients (LFC)			Confidence interval (half width)			Significance (-log P)		
	Vessel			Vessel			Vessel		
	KO vs WT	KO.K vs KO	KO.K vs WT	KO vs WT	KO.K vs KO	KO.K vs WT	KO vs WT	KO.K vs KO	KO.K vs WT
<b>Mmp9</b>	-0,32	-1,05	-1,37	1,61	1,61	1,61	0,16	0,71	1,03
<b>Mmp12</b>	-0,53	0,30	-0,22	2,05	2,05	1,97	0,22	0,11	0,09
<b>Timp3</b>	-1,16	0,29	-0,88	1,21	1,21	1,21	1,23	0,20	0,83
<b>Ccl9</b>	-0,29	0,30	0,02	1,09	1,09	1,09	0,22	0,24	0,01
<b>Ccl6</b>	0,48	-1,24	-0,76	1,44	1,44	1,44	0,29	1,05	0,54
<b>Csf2</b>	-0,60	0,38	-0,21	0,97	0,97	0,97	0,66	0,37	0,18
<b>Tlr4</b>	-0,31	0,34	0,02	1,37	1,37	1,37	0,19	0,21	0,01
<b>Bcl2</b>	0,65	-0,29	0,37	1,00	1,00	1,00	0,71	0,25	0,34
<b>Bax</b>	0,62	0,04	0,67	0,86	0,86	0,86	0,81	0,04	0,89
<b>Traf1</b>	-0,52	0,74	0,22	1,15	1,15	1,15	0,43	0,69	0,15
<b>Pcna</b>	-0,21	0,50	0,29	0,98	0,98	0,98	0,17	0,50	0,26
<b>Mki67</b>	-0,18	1,04	0,86	1,50	1,50	1,50	0,09	0,77	0,59

<b>Mme</b>	0,04	-0,06	-0,02	1,69	1,69	1,69	0,02	0,03	0,01
<b>Fgf10</b>	-0,53	-0,20	-0,73	1,41	1,41	1,41	0,34	0,11	0,52
<b>Gpx1</b>	-0,52	-0,02	-0,55	1,71	1,71	1,71	0,27	0,01	0,28
<b>Hmox1</b>	-0,56	-0,19	-0,76	1,23	1,23	1,23	0,44	0,12	0,66
<b>Nox1</b>	-0,15	0,63	0,48	1,27	1,27	1,27	0,09	0,49	0,35
<b>Noxa1</b>	-0,17	-0,01	-0,18	1,32	1,32	1,32	0,10	0,01	0,11
<b>Nos2</b>	-0,76	0,30	-0,45	1,72	1,72	1,72	0,42	0,14	0,22
<b>Noxo1</b>	1,22	-1,30	-0,08	1,72	1,72	1,72	0,80	0,87	0,04

Tabelle 11-3: Rohdaten der Mikro-Array cDNA Analyse der Gefäßdissektate. Dargestellt sind ausgewählte Gene, die eine mögliche Relevanz bei einer Lungenregeneration durch NoxO1-Knockout nach Zigarettenrauch induziertem Emphysem und PH haben. Die Effektstärke wird hierbei als Log2-Foldchange (LFC) angegeben. Ebenfalls angegeben ist das halbe Konfidenzintervall, sowie die negative logarithmierte Signifikanz.

	Coefficients (LFC)			Confidence interval (half width)			Significance (-log P)		
	Septa			Septa			Septa		
	KO vs WT	KO.K vs KO	KO.K vs WT	KO vs WT	KO.K vs KO	KO.K vs WT	KO vs WT	KO.K vs KO	KO.K vs WT
<b>Mmp9</b>	0,66	-0,99	-0,34	1,73	1,67	1,79	0,35	0,62	0,15
<b>Mmp12</b>	-0,30	1,10	0,80	2,13	2,05	2,20	0,11	0,54	0,33
<b>Timp3</b>	-0,82	1,14	0,31	1,30	1,25	1,35	0,68	1,13	0,19
<b>Ccl9</b>	-0,83	0,32	-0,52	1,18	1,14	1,22	0,79	0,24	0,40
<b>Ccl6</b>	-0,40	-0,14	-0,54	1,56	1,50	1,61	0,22	0,07	0,30
<b>Csf2</b>	-0,42	0,20	-0,22	1,04	1,01	1,08	0,37	0,16	0,16
<b>Tlr4</b>	-0,65	-0,23	-0,89	1,48	1,43	1,54	0,42	0,13	0,60
<b>Bcl2</b>	0,56	-0,13	0,43	1,08	1,04	1,11	0,53	0,10	0,36
<b>Bax</b>	-0,54	-0,12	-0,66	0,93	0,90	0,97	0,60	0,11	0,76
<b>Traf1</b>	-1,05	0,73	-0,32	1,24	1,20	1,29	1,02	0,65	0,21
<b>Pcna</b>	-0,55	0,13	-0,42	1,06	1,02	1,10	0,52	0,10	0,35
<b>Mki67</b>	-0,94	0,21	-0,73	1,61	1,56	1,67	0,61	0,11	0,42
<b>Mme</b>	0,38	0,09	0,48	1,82	1,75	1,88	0,17	0,04	0,21
<b>Fgf10</b>	-0,18	-0,11	-0,29	1,52	1,47	1,58	0,09	0,06	0,15
<b>Gpx1</b>	-0,19	0,81	0,62	1,85	1,78	1,91	0,08	0,44	0,29
<b>Hmox1</b>	1,20	-1,23	-0,03	1,33	1,28	1,38	1,12	1,23	0,02
<b>Nox1</b>	-0,17	-0,46	-0,63	1,37	1,32	1,42	0,10	0,31	0,43
<b>Noxa1</b>	0,92	-1,14	-0,21	1,43	1,38	1,48	0,70	0,98	0,11
<b>Nos2</b>	-1,16	1,40	0,24	1,86	1,79	1,92	0,67	0,92	0,10
<b>Noxo1</b>	-1,22	1,82	0,59	1,85	1,79	1,92	0,72	1,33	0,27

Tabelle 11-4: Rohdaten der Mikro-Array cDNA Analyse der Lungensepten. Dargestellt sind ausgewählte Gene, die eine mögliche Relevanz bei einer Lungenregeneration durch NoxO1-Knockout nach Zigarettenrauch induziertem Emphysem und PH haben. Die Effektstärke wird hierbei als Log2-Foldchange (LFC) angegeben. Ebenfalls angegeben ist das halbe Konfidenzintervall, sowie die negative logarithmierte Signifikanz.

---

## 12 Danksagung

Abschließend möchte ich mich gerne bei all den Personen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Dissertation behilflich waren. Herrn Prof. Dr. Nobert Weißmann danke ich für die Möglichkeit die Laborarbeiten unter seiner Betreuung in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Ebenfalls bin ich dankbar für die stets hilf- und lehrreiche Rückmeldungen während des gesamten Schreibprozesses, sowie die Begutachtung dieser Arbeit. Dr. Michael Seimetz und Mariola Bednorz danke ich der fortlaufende inhaltliche Unterstützung sowohl in der Labortätigkeit als auch in der Anfertigung dieser Arbeit. Herrn Dr. Jochen Wilhelm danke ich für die statistische Auswertung der Mikroarrays und den bereichernden Diskussionen über Statistik in Allgemeinen. Für die technische Unterstützung im Labor, sowie für die Einführung in den in dieser Arbeit angewendeten Methoden möchte ich mich herzlichst bei Ingrid Breitenborn-Müller, Lisa Fröhlich, Miriam Wessendorf, Ewa Bienek und Karin Quanz bedanken. Des Weiteren möchte ich meinen Dank an all den Mitarbeitern des ECCPS aussprechen, die während meiner Zeit dort für ein wundervolles Arbeitsklima sorgten. Für die Korrekturlesung dieser Arbeit danke ich vor allem Sophia Hayen, Bernhard Hellmann und Ariann Taherie, die ebenfalls mich moralisch und geduldig unterstützten. Mein Dank geht auch an all meinen Freunden, die mich in Höhen und Tiefen in der Anfertigung dieser Arbeit nicht nur erduldeten, sondern ebenfalls tatkräftig motivierten, wodurch diese Arbeit erst möglich war.

