

Anpassung des Stoffwechsels und der Atmungskettenfunktionen
in pulmonalarteriellen Gefäßmuskelzellen unter chronischer
Hypoxie

—

insbesondere unter Betrachtung der Cytochrom-c-Oxidase
Untereinheit 4 Isoform 2

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

vorgelegt von
Karl Philipp Krug
aus Langen (Hessen)

Gießen 2018

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Exzellenzcluster Kardio-Pulmonales System
der Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Gutachter: PD Dr. Yury Ladilov

Tag der Disputation: 30. Oktober 2018

Für Hilde und Karl
und
Clara

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	ix
1.	Einleitung	1
1.1	Pulmonale Hypertonie (PH)	1
1.1.1	PH bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie	3
1.1.2	Pathogenese der PH	5
1.1.3	Diagnose der PH	8
1.1.4	Therapie der PH	9
1.2	Mitochondriale Funktionen	11
1.2.1	Oxidative Phosphorylierung	11
1.2.1.1	Pharmakologische Beeinflussung mit Dichloroacetat (DCA)	14
1.2.2	Enzyme der Atmungskette	15
1.2.2.1	Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase (Cox)	17
1.3	Zelluläre Homöostase der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei PH	20
1.4	Metabolische Veränderungen bei PH	21
1.5	Fragestellung und Hypothese der Studie	23
2.	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Geräte	27
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	28
2.1.2.1	Zellisolation	28
2.1.2.2	Zellkultur	28
2.1.2.3	Kulturmedien und Lösungen	28
2.1.2.4	Respiratorische Versuche	29

2.1.2.5	Gele für SDS-PAGE	30
2.1.2.6	Western Blot	30
2.1.2.7	Citrat-Synthase (CS)-Assay	31
2.1.3	Kits und Assays	31
2.1.4	Primer	32
2.1.5	Antikörper	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Hypoxieexposition von Ratten	35
2.2.2	Isolation von PAGMZ	36
2.2.3	Zellkultur	39
2.2.4	Respirometrische Messung	41
2.2.4.1	Vorbereitung der PAGMZ vor der respiratorischen Messung	41
2.2.4.2	Technik und Funktionsweise des Respirometers	42
2.2.4.3	Vorbereitung des Respirometers	44
2.2.4.4	Bestimmung der O ₂ -Affinität	45
2.2.4.5	Bestimmung der mitochondrialen Atmung mittels eines Substrat-Inhibitor-Protokolls	46
2.2.4.6	Bestimmung einzelner Atmungskettenkomplexfunktionen	47
2.2.5	Quantitative Real-time PCR (qPCR).....	48
2.2.5.1	mRNA-Isolierung aus PAGMZ	49
2.2.5.2	mRNA-Isolierung aus Lungengewebe der Ratte	50
2.2.5.3	cDNA-Synthese	50
2.2.5.4	Vorbereitung der quantitativen Real-Time PCR (qPCR)	50
2.2.5.5	Quantitative Real-Time PCR	51
2.2.6	Western Blot	53
2.2.7	CS-Assay	54
2.2.8	Proteinbestimmung	55
2.2.9	Auswertung	56

3. Ergebnisse	57
3.1 Der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Atmungskettenfunktionen der PAGMZ	57
3.1.1 Endogene Atmung und Atmungskettenkapazität	59
3.1.2 Respiration einzelner Enzymkomplexe der Atmungskette	63
3.1.3 O ₂ -Affinität	66
3.2 Der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Regulation verschiedener mitochondrialer, glycolytischer und antioxidativer Proteine auf mRNA Ebene	68
3.2.1 Der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Transkription verschiedener Gene in isolierten PAGMZ	68
3.2.1.1 Der Einfluss von hypoxischer Inkubation mit 1% O ₂	68
3.2.1.2 Der Einfluss von hypoxischer Inkubation mit 7% O ₂	72
3.2.2 Der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Transkription in Lungenhomogenat	75
3.3 Prävention der Hypoxie-induzierten Respirationsabnahme durch Behandlung der PAGMZ mit DCA	76
3.3.1 Prävention der Hypoxie-induzierten Verringerung der endogenen Atmung und der Atmungskettenkapazität	77
3.3.2 Prävention der Hypoxie-induzierten Verringerung der Aktivität einzelner Atmungskettenkomplexe	78
3.3.3 Prävention der Hypoxie-bedingten Reduktion der O ₂ -Affinität	79
3.3.4 Prävention der Hypoxie-induzierten Veränderungen der Transkription nach Behandlung der PAGMZ mit DCA	80
3.4 Proteinexpression von Cox4i2 in PAGMZ nach hypoxischer Inkubation ...	81
3.5 Mitochondriale CS	83

4. Diskussion	84
4.1 Übersicht	84
4.2 Hypoxische Inkubation von isolierten Zellen als Modell für die PH	86
4.3 Kritische Überlegungen zum Versuchsmodell	88
4.4 Mitochondriale Respiration von PAGMZ nach chronischer, hypoxischer Inkubation	90
4.5 Die Aktivität einzelner Atmungsketten-Komplexe nach chronischer, hypoxischer Inkubation	93
4.6 O ₂ -Affinität	95
4.7 Genexpression mitochondrialer, metabolischer und antioxidativer Proteine	96
4.7.1 Gene der Atmungskette	96
4.7.1.1 Untereinheiten von Komplex IV	98
4.7.2 Sonstige mitochondriale Gene und Gene des ROS-Stoffwechsels	101
4.7.3 Gene der Stoffwechselregulation	103
4.8 Metabolische Veränderungen	106
4.9 Hypoxie-induzierte Veränderungen in Lungenhomogenat	108
4.10 Funktionsweise von DCA	109
4.11 Effekte von DCA auf Hypoxie-induzierte mitochondriale Veränderungen	111
4.12 Schlussfolgerungen	114

5. Zusammenfassung	118
6. Summary	120
7. Literaturverzeichnis	121
8. Publikationsverzeichnis	131
9. Ehrenwörtliche Erklärung	132
10. Danksagung	133

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPIF1	<i>ATPase inhibitory factor 1</i>
B2M	β-Mikroglobulin
BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
Cox	Cytochrom-c-Oxidase
CPX	Kurzform für Komplexenzym
CS	Citrat-Synthase
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
Cyt bc 1	Cytochrom bc 1 Komplex
DCA	Dichloroacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTNB	<i>5,5-ditho-bis-(2-nitrobenzoic acid)</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>

EGTA	<i>ethyleneglycoltetraacetic acid</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ET	Endothelin
FAD	oxidiertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	<i>carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon</i>
FCS	fetales Kälberserum
G	Gauge
GLUT	Glucose Transporter
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	<i>hydroxyethylpiperatineeethanesulfonic acid</i>
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
HOX	Kurzform für hypoxisch inkubierte Zellen
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
ILE	interstitielle Lungenerkrankung
ILF	idiopathische Lungenfibrose
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
K _v	<i>voltage gated potassium channel</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
M199	Medium 199
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

NDUFS	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein</i>
NOX	Kurzform für normoxisch inkubierte Zellen
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
p50	Sauerstoffpartialdruck bei halbmaximaler Atmung
PAEZ	pulmonalarterielle endotheliale Zellen
PAGMZ	pulmonalarterielle glatte Muskelzellen
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	<i>pulmonary arterial pressure</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PH	pulmonale Hypertonie
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVR	<i>pulmonary vascular resistance</i>
Q	Ubichinon
qPCR	quantitative PCR
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHC	<i>SH2 containing proto-oncogene</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween[®]</i>

TGF	<i>transforming growth factor</i>
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
TNB	Trinitrobenzol
UCP	<i>uncoupling protein</i>

1. Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie (PH)

Das Krankheitsbild der Pulmonalen Hypertonie (PH) wurde erstmals 1891 von Ernst von Romberg beschrieben. In seinem Fallbericht ist von einer Sklerose der Lungengefäße die Rede, für die er keine zugrundeliegende Ursache entdecken konnte [1]. Der Begriff PH wurde erst im Jahr 1951 von Dresdale, D.T., et. al. geprägt. Beschrieben wurde hierbei eine hypertensive Gefäßerkrankung der Lunge, die ohne erkennbaren Grund auftrat [2]. Schon kurze Zeit danach konnten Dresdale, D.T., et. al. nachweisen, dass eine pulmonale Vasokonstriktion eine wesentliche Rolle in der Krankheitsentstehung spielt [3].

In den späten 60er Jahren des 20. Jahrhunderts traten gehäuft Fälle von PH auf, die in Zusammenhang mit dem Appetitzügler Aminorex standen [4]. Das gesteigerte öffentliche Interesse spielte eine Rolle bei der Einberufung einer Konferenz durch die Welt-Gesundheits-Organisation im Jahr 1975. Hier wurde beschlossen, Daten zu sammeln, um die Pathogenese und die Epidemiologie der PH zu erforschen. Dies sollte der Anfang von mehreren internationalen Konferenzen zur PH sein. 2013, anlässlich des letzten internationalen Symposiums zum Thema PH in Nizza, Frankreich, wurde die Krankheitsdefinition letztmals erneuert und auch die Klassifikation der Erkrankung überarbeitet. Bei einem pulmonalarteriellen Mitteldruck (mPAP) von ≥ 25 mmHg in Ruhe spricht man von einer PH. Liegen die Drücke zwischen 24 und 21 mmHg kann man von einer grenzwertigen „*borderline* PH“ ausgehen. Darunter liegende Werte sind als Normalbefund zu betrachten [5].

Laut der aktuellen Nizza-Klassifikation von 2013 für pulmonale Hypertonie werden fünf verschiedene Formen von PH unterschieden [6]:

1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
 - 1‘ Pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose
 - 1‘‘ Persistierende PAH des Neugeborenen
2. PH bei Erkrankung des linken Herzens
3. PH bei Lungenerkrankungen und /oder Hypoxie
4. Chronisch thromboembolische PH (CTEPH) und andere Pulmonalarterienobstruktionen
5. PH mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen.

Die idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH), die zur ersten Gruppe der PH-Einteilung gehört, ist eine sehr seltene Krankheit, die circa zwei Patienten pro Million Einwohner betrifft. Die Krankheit mündet regelhaft in eine Rechtsherzinsuffizienz und ist nicht kurativ heilbar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in erster Linie mit der dritten Gruppe, also mit einer PH, die durch eine chronische Hypoxie ausgelöst wird.

1.1.1 PH bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie

Bei dieser Untergruppe der PH resultiert die chronische Exposition gegenüber Hypoxie, z.B. bei Aufenthalt in großer Höhe oder bei Vorliegen einer Lungenerkrankung, wie beispielsweise einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder einer interstitiellen Lungenerkrankung (ILE), die zu einer Minderbelüftung einzelner Lungenbereiche und alveolärer Umbauprozesse führen, in einer Vasokonstriktion und Umbauprozessen der Lungengefäße, die zur Entwicklung einer PH führen können.

Hypoxie ist neben inflammatorischen Einflüssen und einer Lungenparenchymdestruktion ein zentraler Faktor für die Entstehung der PH bei COPD. Allerdings ist die PH in den meisten Fällen bei COPD-Patienten gering ausgeprägt. Im Fall einer schweren PH sollten zusätzliche Faktoren wie z.B. eine Schlaf-Apnoe oder alveoläre Hypoventilationssyndrome sowie eine zusätzlich zugrundeliegende PAH oder CTEPH als Grund für diese Krankheitsausprägung in Erwägung gezogen werden [7]. Eine PH steigert bei bestehender COPD die Mortalität und kann je nach Schweregrad der PH als Faktor für die Krankheitsprognose herangezogen werden [8-10].

Zu der Gruppe von ILE gehört z.B. die idiopathische Lungenfibrose (ILF). In der Studie von Shorr, et. al wiesen 46,1% der Patienten mit einer ILF auch eine PH auf. 9,1% der Patienten hatten eine schwere PH [11].

Der enge Zusammenhang zwischen PH und ILE wird auch in einer zum Teil gemeinsamen Pathogenese deutlich. Als Beispiel ist hierbei das Endothelin (ET)-System mit ET-1 als dem stärksten pulmonalen Vasokonstriktor anzuführen. So zeigten Untersuchungen von Braun-Moscovici, Y., et al. und Galie, N., et al., dass das ET-System bei PH eine wichtige Rolle spielt [12,13]. Erhöhte ET-Konzentration im Blutplasma und ET-1 Expression in Lungengewebe von ILF-Patienten deuten gleichfalls auf einen Zusammenhang zwischen der ET-1-Produktion und der Krankheitsentstehung hin [14].

Auch ein längerer Aufenthalt in großer Höhe und ein damit verbundener geringer Sauerstoffpartialdruck (pO_2) kann ein Auslöser für eine PH sein. In einer Studie von Ghofrani, H.A., et al. hielten sich insgesamt 14 gesunde Probanden für einen Zeitraum von sechs Tagen im Basiscamp am Mount Everest in einer Höhe von 5245 m auf. Nach sechs Tagen führte man Messungen des systolischen Drucks in der Pulmonalarterie durch. Die mittels Doppler-Echokardiographie gemessenen Werte waren deutlich erhöht und lagen im Durchschnitt bei 33,6 mmHg [15]. Auch eine chinesische Untersuchung konnte belegen, dass ein Zusammenhang zwischen Aufenthalt in großer Höhe und

erhöhtem pulmonalarteriellen Druck (PAP) besteht. 91 Probanden verbrachten über ein Jahr in einer Höhe von 3700 m. 37% der Studienteilnehmer entwickelten daraufhin eine „borderline PH“ mit Werten von einem mPAP zwischen 20 und 25 mmHg [16].

Tibetaner haben im Vergleich zu an große Höhe akklimatisierten ehemaligen Tieflandbewohnern einen signifikant geringeren pulmonalarteriellen Druck [17]. Dies legt nahe, dass in ersterer Bevölkerungsgruppe eine genetische Anpassung an die Lebensumstände in großer Höhe stattgefunden hat.

1.1.2 Pathogenese der PH

Die pulmonale Hypertonie ist eine Erkrankung mit einer multifaktoriellen Genese. Bei allen Formen der PH, außer bei Klasse 2, stellen sich ein erhöhter pulmonalarterieller Druck aufgrund eines Gefäß-*remodelings* [18] und eine Rechtsherzhypertrophie als typisch dar. Im Folgenden wird nur auf die Klassen 1 und 3 näher eingegangen. Klasse 1 kann als prototypische Erkrankung innerhalb der PH aufgefasst werden und weist insbesondere bei dem Gefäß-*remodeling* viele Ähnlichkeiten mit der Klasse 3 auf, die im Rahmen dieser Studie als Modell fungiert. Die idiopathische PAH (IPAH) ist vergesellschaftet mit Veränderungen der Gefäße aufgrund unklarer Ursache. Histologisch betrachtet reichen die Schäden in der pulmonalarteriellen Gefäßbahn von einer Verengung durch eine Mediahypertrophie, plexiforme Läsionen im Endothel und Fibrosierung der Intima bis zum Verschluss des präkapillären Gefäßbetts und dem Verlust kleiner Gefäße („*pruning*“) [19-21]. Plexiforme Läsionen sind ein Kennzeichen der PAH und sind bei 90% der Patienten mit PAH und bei 100% der Patienten mit IPAH nachweisbar [22]. Die plexiformen Läsionen stellen komplexe vaskuläre Formationen dar, die durch monoklonale Proliferation von Endothelzellen entstehen und histologische Ähnlichkeit zu neoplastischem Gewebe in Glioblastomen aufweisen [20,23].

Es sind verschiedene Genmutationen bekannt, die im kausalen Zusammenhang mit der Entstehung der PAH stehen und unter anderem aus der *transforming growth factor* (TGF) β -Familie stammen. Die erste entdeckte Genmutation bei PAH betraf den *bone morphogenetic protein receptor* (BMPR)-2. Es fand sich in 10-40% der IPAH-Patienten und in 80% der erblichen PAH-Patienten eine entsprechende Mutation. Allerdings entwickeln mit 20-80% der heterozygoten Genträger nur relativ wenige Träger eine PAH. In einer Arbeit von Viales, R.R., et al. stellte sich dabei heraus, dass sich die Penetranz erhöht, wenn neben der Promoterregion von BMPR-2 weitere Gene der TGF-Familie mutiert waren. In einer Studie von Pousada, G., et al. fanden sich unter 57 PAH Patienten 15 Erkrankte, die mehr als eine Mutation der TGF-Familie aufwiesen. Patienten mit oben genannten Mutationen zeigten hierbei ein jüngeres Lebensalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung [24-26].

Bei Gruppe 3 der PH stellt die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) im präkapillären pulmonalarteriellen Stromgebiet aufgrund akuter alveolärer Hypoxie [27] einen wichtigen, aber nicht den Hauptfaktor für die Entstehung einer PH dar. Akute alveoläre Hypoxie bewirkt eine präkapilläre Vasokonstriktion und sorgt für eine verringerte Perfusion in minderbelüfteten Lungenarealen, indem unter anderem spannungsabhängig Kaliumkanäle (Kv) in der glatten pulmonalarteriellen Gefäßmuskulatur inhibiert werden. Der genaue zugrundeliegende Mechanismus ist ungeklärt, wahrscheinlich spielen freie Radikale, die in der Atmungskette der Mitochondrien entstehen, eine Rolle. Durch die resultierende Depolarisation der glatten Muskelzelle öffnen sich unter anderem spannungsabhängige Kalziumkanäle, die zu einer Muskelkontraktion führen [28]. Ferner begünstigt der Anstieg des intrazellulären Kalziums die Zellproliferation bei länger dauernder Hypoxie. Durch den Anstieg des Kaliumspiegels in der Muskelzelle entsteht außerdem eine anti-apoptotische Stoffwechsellaage [29].

Chronische Hypoxie induziert einen Umbau der pulmonalarteriellen Gefäßwand. In der Gefäßwand vertretene Zelltypen sind Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten, die jeweils eine eigene Rolle im *remodeling* spielen. Endothelzellen geben beispielsweise vasokonstriktive Faktoren ab, glatte Muskelzellen und Fibroblasten proliferieren und führen zusammen mit einer Zunahme von extrazellulären Matrixproteinen zu einer Verdickung von Media und Adventita. Zudem scheinen sich unter chronischer Hypoxie zirkulierende Progenitorzellen in Intima und Media anzusammeln. Die strukturellen Veränderungen der Gefäßwand werden hierbei über Mitogene, Wachstumsfaktoren oder Chemokine vermittelt [30,31]. Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen kommt es zudem in der Gefäßwand zu einer Akkumulation von Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen, die ihrerseits wieder proliferative Faktoren abgeben [30,32]. Letztlich führen die oben genannten Veränderungen durch eine Verminderung des Gefäßquerschnitts zu einem erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand (PVR), der in einer Rechtsherzhypertrophie mündet [33]. Ein wichtiger zugrundeliegender Faktor bei den chronisch hypoxie-bedingten Gefäßumbauprozessen ist zudem die Stabilisierung des *hypoxia inducible factor* (HIF). Dieser transkribiert zahlreiche Gene, die unter anderem zur Expression proliferativer Proteine, zu einer Verschiebung des Stoffwechsels hin zur Glycolyse und zu einer verminderten Expression von K_v-Kanälen führen [34].

Eine häufige Erkrankung, die mit einer PH der Gruppe 3 vergesellschaftet ist, stellt die COPD dar. COPD ist eine Erkrankung mit Destruktion des Lungenparenchyms, dadurch eingeschränkter Ventilation und Entzündungs-induziertem Umbau der pulmonalen Gefäße. Als herausragende Noxe ist dabei der Zigarettenrauch zu nennen [35]. COPD ist assoziiert mit einer häufig eher mild ausgeprägten PH. Die charakteristischen histologischen Veränderungen bei COPD-assoziiierter PH sind die Mediahypertrophie und die Sklerosierung der Intima [36,37].

1.1.3 Diagnose der PH

Die PH führt im Anfangsstadium kaum zu Einschränkungen des körperlichen Befindens, sodass die Diagnose meist erst in weit fortgeschrittenen Krankheitsstadien gestellt wird. Die Symptome sind eher unspezifisch und bestehen in erster Linie aus Dyspnoe, Husten, Abgeschlagenheit und Synkopen beziehungsweise (bzw.) synkopenähnlichen Zuständen. Des Weiteren können Thoraxschmerzen, Ödeme und Aszites auftreten [38].

Im Elektrokardiogramm (EKG) können eine Rechtsherzbelastung, ein Rechtsschenkelblock und unspezifische Erregungsrückbildungsstörungen in den anterioren und inferioren Ableitungen auf eine PH hinweisen. Allerdings sind Sensitivität und Spezifität des EKG gering, sodass es nicht als Screeningmethode geeignet ist [39].

Eine Röntgenuntersuchung und ein Lungenfunktionstest können eine der PH zugrundeliegende Lungenerkrankung oder die Folgen einer Rechtsherzbelastung bzw. der Gefäßumbauprozesse aufzeigen. Hierbei finden sich bei PAH-Patienten eher geringe Einschränkungen der dynamischen und statischen Lungenvolumina [40]. Typischerweise sieht man allerdings eine Einschränkung der Kohlenstoffmonoxid-Diffusionskapazität. Eine COPD als Ursache für eine PH weist eine irreversible Lungenobstruktion zusammen mit erhöhtem Residualvolumen und reduzierter Diffusionskapazität für Kohlenstoffmonoxid auf [41].

Sollte anhand der genannten Symptome oder pathologischen Befunde in den oben aufgeführten Untersuchungen der Verdacht auf eine PH bestehen, sollte eine Doppler-Echokardiographie durchgeführt werden. Dabei wird anhand des Blutflusses durch die insuffiziente Trikuspidalklappe auf den systolischen PAP geschlossen. Bei Verdacht auf PH in der Dopplerechographie ist vor einer möglichen Behandlung der PH eine Rechtsherzkatheteruntersuchung und die Einteilung gemäß der aktuellen Klassifikation von Nizza nötig [42].

1.1.4 Therapie der PH

Die Therapie der PH ist komplex und richtet sich nach der Klassifikation der PH.

Bei Patienten mit idiopathischer PAH, Medikamenten oder Toxin-induzierter PAH und assoziierter PAH wird vor einer Therapieeinleitung ein Vasoreagibilitätstest durchgeführt. Sollte der mPAP des Patienten hierbei unter medikamentöser Stimulation mit z.B. inhalativem Stickoxid deutlich absinken, handelt es sich um einen sogenannten "responder", der mit einer pharmakologischen Therapie mit Kalziumkanal-Antagonisten eine gute Prognose haben kann [5]. Allerdings zeigte sich in einer Studie von 2005, dass nur etwa die Hälfte der IPAH-Patienten mit positivem Vasoreagibilitätstest von einer Monotherapie mit Kalziumkanal-Antagonisten profitierten. Von allen untersuchten Patienten mit IPAH wiesen weniger als 10% einen langfristigen Therapieerfolg auf [43]. Patienten mit allen anderen Formen der PAH, Patienten mit negativem Vasoreagibilitätstest und Patienten mit unzureichendem Therapieansprechen auf Kalziumkanal-Antagonisten können mit spezifischen pulmonalvasoaktiven Medikamenten therapiert werden. Zur Verfügung stehen dabei Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Phosphodiesterase-Inhibitoren und Prostazykline/-analoga. Diese genannten Medikamentengruppen haben sich als effektiv und sicher erwiesen [44]. Eine Metaanalyse von Galiè, N., et al. aus dem Jahr 2009 zeigte bei Behandlung der PH mit den genannten drei Substanzgruppen eine Reduktion der Mortalität von 43% [45].

Bei PH der Gruppe 3, also bei Lungenerkrankung oder Hypoxie, liegt keine spezifische pulmonalvasoaktive Therapie vor.

Da die aktuelle Therapie die Krankheitsentwicklung nur verlangsamen kann, bleibt als therapeutischer Endpunkt nur eine Lungen- oder Herz-Lungen-Transplantation [46,47]. Da mögliche Spenderorgane nicht in der nötigen Anzahl zur Verfügung stehen und eine Transplantation große Risiken und Nebenwirkungen birgt, ist die Suche nach zusätzlichen medikamentösen Therapien für einzelne PH-Formen von großer Wichtigkeit.

Zurzeit gibt es verschiedene vielversprechende neue Therapieansätze zur Behandlung der PH, wobei an dieser Stelle nur auf einen Wirkstoff, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, eingegangen wird. Hierbei handelt es sich um den Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK)-Hemmer Dichloroacetat (DCA). Die Hypothese besagt hierbei, dass die medikamentöse Modulation des mitochondrialen Stoffwechsels in den

pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PAGMZ) einen möglichen neuen therapeutischen Ansatz darstellen könnte.

DCA hat sich dabei in verschiedenen tierexperimentellen Arbeiten als vielversprechend erwiesen. So wurden beispielsweise Ratten mit Monocrotalin-induzierter PAH mit DCA behandelt. Hierbei wiesen die mit DCA behandelten Ratten eine signifikante Reduktion des pulmonalen Gefäßwiderstands, der PA-Dicke und der rechtsventrikulären Hypertrophie auf. In weiteren Versuchen wurden Ratten, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren, mit DCA behandelt. Die behandelten Ratten wiesen einen signifikant reduzierten PVR, eine verringerte Rechtsherzhypertrophie und ein vermindertes *remodeling* der PA im Vergleich zur Kontrolle auf. Zudem wiesen die isolierten PAGMZ der mit DCA behandelten Ratten eine erhöhte Expression von K_v-Kanälen auf. [29,48]. In einer Studie von Li, B., et al. konnte gezeigt werden, dass DCA in einem auf Monocrotalingabe basierenden Rattenmodell der schweren PAH mit Ausbildung von plexiformen Läsionen bzw. von neointimalen Läsionen vorbeugt [49]. Zudem wurde von März 2010 bis September 2013 erstmals eine klinische Studie mit DCA zur Behandlung von PAH-Patienten durchgeführt. Unter der Leitung der Universität von Alberta galt es, die Hypothese zu überprüfen, ob DCA ein sicherer und gut verträglicher Wirkstoff für die Behandlung von PAH ist. Hierbei bekamen Patienten mit moderater bis schwerer PAH neben ihrer üblichen Medikation für 16 Wochen DCA in verschiedenen Dosierungen verabreicht. Anschließend wurden verschiedene Parameter wie unter anderem PVR, Rechtsherzvolumen und Rechtsherzmasse sowie Lebensqualität mit dem Ausgangspunkt vor DCA verglichen. Leider liegen zu dieser Studie bisher noch keine Veröffentlichungen vor.

Neben Versuchen zur Behandlung von primären mitochondrialen Erkrankungen bei Kindern [50] wird DCA außerdem verstärkt als Therapeutikum bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen erforscht. Hierbei kommt es wie bei der PH zu einer mitochondrialen Modulation mit gesteigerter Glycolyse. Zudem könnte DCA vermittelt durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) einer anitapoptischen Stoffwechsellaage entgegenwirken [51,52].

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von DCA auf die Respiration und den Energiestoffwechsel von hypoxisch inkubierte PAGMZ untersucht.

1.2 Mitochondriale Funktionen

1.2.1 Oxidative Phosphorylierung

Laut der Endosymbionten-Theorie sind Mitochondrien von bakteriellem Ursprung. Durch die Aufnahme von Bakterien in die Zellen von Metazoen ergab sich ein evolutionärer Vorteil, da die tierischen Zellen nun O_2 für die ATP-Gewinnung einsetzen konnten [53,54].

Ohne Mitochondrien wären die Zellen auf anaerobe Glycolyse angewiesen, die allerdings im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung nur eine geringere Menge ATP bereitstellen kann. Eine besondere Körperzelle, die keine Mitochondrien (und keinen Zellkern) besitzt, ist der Erythrozyt.

Laut gängigen biochemischen Lehrbüchern werden bei der aeroben Energiegewinnung aus einem mol Glucose 32 mol ATP generiert [55]. Bei der (anaeroben) Glycolyse entstehen nur zwei mol ATP. Auch wenn die dargestellte Stöchiometrie der ATP-Gewinnung ein idealisiertes Modell darstellt [56], verdeutlicht es doch die Überlegenheit der aeroben Energiegewinnung gegenüber der anaeroben Glycolyse. In dieser wird z.B. unter hypoxischen Bedingungen Pyruvat mittels Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat fermentiert, um Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) zu regenerieren. LDHa, welches in dieser Arbeit näher untersucht wurde, gehört zur Gruppe der Laktatdehydrogenasen und findet sich in den meisten Organen, aber insbesondere in Muskulatur und in Tumorgewebe. Häufig ist der LDHa Spiegel in Krebsgeschwüren erhöht [57].

Pyruvat, das als Substrat, sowohl für die anaerobe Glycolyse als auch für die mitochondriale Glucoseoxidation dient, wird über den mitochondrialen Citratzyklus verstoffwechselt, wobei NADH und $FADH_2$ als Elektronendonatoren für die mitochondriale Atmungskette entstehen. Dadurch ist es möglich, das hochreaktive O_2 nach mehreren Reaktionsschritten als Elektronenakzeptor zu verwenden.

Der Begriff oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) beschreibt die oben beschriebene Herstellung von ATP durch Mitochondrien unter Anwesenheit von O_2 . Der Citratzyklus generiert hierbei die Coenzyme NADH und $FADH_2$, die an Komplex I, bzw. Komplex II der Atmungskette oxidiert werden und Ubichinon reduzieren. Ubichinol überträgt nun seine Elektronen an den Komplex III, welches die Elektronen wiederum an Cytochrom-c weitergibt. Als letzter Reaktionsschritt erfolgt die Oxidation von Cytochrom-c und die Reduktion von O_2 zu Wasser durch Komplex IV. Durch alle genannten Komplexe, außer

Komplex II, werden Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transportiert. Durch diese Ausschleusung der Protonen entsteht ein Gradient, der abgebaut wird, indem die Protonen durch den Komplex V (ATP-Synthase) in den Matrixraum zurückkehren. Dadurch entsteht aus ADP und Phosphat ATP, das aus dem Mitochondrium ausgeschleust wird und nun der Zelle als Energieträger zur Verfügung steht. Die Produktion von ATP, der Elektronenfluss durch die Atmungskette und auch der O₂-Verbrauch sind somit miteinander gekoppelt [58,59]. Alternativ wird der Gradient abgebaut, indem die Protonen unabhängig von Komplex V die innere Membran der Mitochondrien durchqueren (=“Protonen-leak“ oder „Entkopplung“).

Die OXPHOS wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Chance, B., et al. postulierte bereits 1955, dass sich eine hohe Menge an ATP in der Zelle als eine negative Rückkopplung auf den Komplex V und damit auch vermindern auf die Zell-Respiration auswirkt [60]. Eine weitere Regulation der Respiration erfolgt durch die Verfügbarkeit von den Coenzymen NADH und FADH₂ bzw. den Substraten des Citratzyklus. Eine Regulation der Aktivität der Atmungskettenkomplex sowie das Ausmaß des Protonen-leak sind weitere Regelgrößen von Respiration und ATP-Produktion [61].

Die Aktivität der Atmungskettenkomplexe kann durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden, z.B. durch reversible cAMP-abhängige Phosphorylierung des Komplex IV der Atmungskette (Cytochrom-c-Oxidase). Bender, E., et al. konnten zeigen, dass eine cAMP-abhängige Phosphorylierung der Untereinheiten 2 und 5b durch die Proteinkinase A erfolgt. Dadurch wurde die allosterische ATP-Inhibierung von Komplex IV aktiviert. Es wurde postuliert, dass die mitochondriale Respiration nun von dem Konzentrationsverhältnis ATP/ADP kontrolliert werde. Durch Gabe von Kalzium erfolge eine Dephosphorylierung mit nun aufgehobener Enzymkontrolle durch das ATP/ADP Verhältnis [62].

Dass auch die Untereinheit 4 von Komplex IV phosphoryliert wird, konnte schon 1997 gezeigt werden [63]. Allerdings wurde in dieser Studie nicht betrachtet, welchen Effekt auf die Zelle eine solche Phosphorylierung hervorruft. Eine cAMP-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung von Untereinheit 1 hemmte in einer Studie von Lee, I., et al. die Aktivität von Komplex IV [64]. Daneben sind zahlreiche weitere Phosphorylierungsstellen an Komplex IV bekannt, deren Funktionsweise und Signalwege noch unklar sind [65].

Eine weitere Möglichkeit, wie das Energieniveau der Zelle die OXPHOS regulieren kann, ist über das Verhältnis von AMP und ATP, das die Aktivität der AMP-activated

protein kinase (AMPK) beeinflusst. Ein Verhältnis zugunsten von AMP zeigt einen Energiemangel an. Anabole Stoffwechselwege wie die Cholesterinsynthese werden daraufhin gestoppt. Katabole Abläufe, wie die β -Oxidation werden angestoßen. Das entstehende Acetyl-CoA kann in den Citratzyklus eingespeist werden.

Ein weiteres Regulationselement der OXPHOS stellt der *ATPase inhibitory factor 1* (ATPIF) dar. Wenn unter hypoxischen Bedingungen kein Elektronenfluss stattfinden kann, baut sich das mitochondriale Membranpotential ab. Um dies zu verhindern, kommt es zu einer Umkehrung der ATPase-Funktion mit Hydrolyse von ATP, um das mitochondriale Membranpotential aufrechtzuerhalten. Diese Hydrolyse von ATP wird durch ATPIF verhindert, um den Abbau von cytosolischem ATP zu verhindern. Die Regulation von ATPIF scheint hierbei über HIF-1 gesteuert zu werden. So findet sich auch in Krebszellen ein erhöhter ATPIF-Spiegel, um den ATP-Bedarf zu sichern [66].

1.2.1.1 Pharmakologische Beeinflussung der mitochondrialen Funktion mit Dichloroacetat (DCA)

Um NADH in die Atmungskette einzuschleusen, muss Glucose mittels der Glucosetransporter (GLUT) in die Zelle aufgenommen werden, zu Pyruvat verstoffwechselt und anschließend Pyruvat in Acetyl-CoA umgewandelt werden. Der letztgenannte Reaktionsschritt wird von der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) katalysiert und ist notwendig, um den Energieträger Acetyl-CoA dem mitochondrialen Citratzyklus zuzuführen, in dem NADH und FADH_2 produziert wird.

PDH wird von PDK phosphoryliert und damit inaktiviert. Durch diese Verringerung des mitochondrialen Pyruvatabbaus verschiebt sich der Stoffwechsel von aerober zu anaerober Glucoseutilisation. Unter anderem unter hypoxischen Bedingungen wird PDK mittels HIF-1 verstärkt transkribiert [67], sodass hypoxischen Zellen verstärkt Pyruvat zur anaeroben ATP-Gewinnung nutzen.

Durch den PDK-Inhibitor DCA kann die Inhibierung der PDH aufgehoben werden [48]. PDH kann nun wieder die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysieren, wodurch via Citratzyklus eine erhöhte Bereitstellung von Coenzymen (NADH und FADH_2) für die OXPHOS erfolgt [68].

1.2.2 Enzyme der Atmungskette

Die fünf Enzymekomplexe der Atmungskette sind:

1. NADH-Dehydrogenase (Komplex I)
2. Succinat-Dehydrogenase (Komplex II)
3. Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III)
4. Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)
5. ATP-Synthase (Komplex V)

Komplex I befindet sich in der inneren mitochondrialen Membran und ist dort frei beweglich. Neben der Oxidierung von NADH zu NAD^+ , dem Elektronentransfer auf Ubiquinon und dem Transport von vier Protonen pro Molekül O_2 aus der mitochondrialen Matrix in den intermembranären Zwischenraum wird Komplex I auch als Hauptentstehungsort von ROS gesehen [69-71]. Einen Inhibitor von Komplex I stellt Rotenon dar.

Das Gen *NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein* (NDUFS)1 kodiert für die größte Untereinheit von Komplex I. Diese 75 kDa große Untereinheit, die Eisen und Sulfid enthält, dehydrogenisiert NADH und speist damit Elektronen in die Atmungskette. NDUFS 4 kodiert für eine Untereinheit, die die Weiterleitung der Elektronen bewerkstelligt und eine Phosphorylierungsstelle für eine cAMP-abhängige Proteinkinase aufweist. Studien mit mutierten NDUFS 1-Gen zeigten eine Reduktion der Enzymaktivität sowie einen Anstieg von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und O_2^- in Mitochondrien und ein reduziertes Membranpotential der Mitochondrien. Schäden in NDUFS4 führten zu einem unvollständigen Aufbau des Enzymkomplexes und sorgten somit für einen kompletten Ausfall der Enzymaktivität [72].

Komplex II besteht aus 4 Untereinheiten und ist in der inneren mitochondrialen Membran verankert. Die Funktion des Enzymkomplexes liegt in der Umwandlung von Succinat zu Fumarat durch die Succinatdehydrogenase (SDH). Dabei wird FADH_2 zu FAD oxidiert und es werden Elektronen auf Ubichinon übertragen. Im Gegensatz zu Komplex I bis IV ist der strukturelle Aufbau von Komplex II spezieübergreifend sehr ähnlich [73]. Komplex II ist sowohl ein Bestandteil der Atmungskette als auch des Citratzyklus und überträgt keine Protonen in den Intermembranraum [74]. Im Rahmen dieser Arbeit

wurden die Untereinheiten SDHa und SDHd untersucht. SDHa katalysiert die Umwandlung von Succinat zur Fumarat und wandelt im selben Schritt FAD zu FADH₂ um. Das von SDHd codierte Protein verankert die Untereinheit cybS von Cytochrom b im Komplex II [75].

Die Hauptaufgabe von Komplex III besteht in der Übertragung der Elektronen des Ubichinol-Pools auf Cytochrom-c [76,77]. Bei diesem Transfer kommt es in unterschiedlichem Ausmaß zur Generierung von ROS, indem Elektronen auf O₂ übertragen werden. Dies passiert in zunehmenden Maße, wenn z.B. der Enzymkomplex mit dem Inhibitor Antimycin A blockiert ist oder das mitochondriale Membranpotential erhöht ist [34,78,79].

Mit vier ausgeschleusten Protonen pro O₂ trägt der Cytochrom bc₁-Komplex (Cyt bc₁), wie Komplex III auch genannt wird, zum elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran bei [80].

An Komplex IV wird Cytochrom-c oxidiert und O₂ reduziert. Der größte Teil des zellulär umgesetzten O₂ wird für diese Reaktion verwendet. Des Weiteren werden vier Protonen pro O₂ aus der Matrix transportiert [81]. Ein Inhibitor des Komplex IV ist Cyanid. Dieses Zellgift bindet an eine Häm-Kupfer-Komponente (CuB-Häm a₃) des Komplex IV und verhindert so eine Reduktion von O₂. So liegen alle Komplexe der Atmungskette reduziert vor und die OXPHOS kommt zum Erliegen [82].

Auf die verschiedenen Untereinheiten und deren Funktion wird weiter unten ausführlich eingegangen.

Die ATP-Synthase ist ein großer transmembranöser Protein-Komplex, durch den die Protonen dem Gradienten folgend in die Matrix zurückfließen. Durch eine rotierende Konformationsänderung bindet der sogenannte Komplex V dabei ADP und Phosphat und setzt ATP frei [83]. Durch die Gabe von Oligomycin kann diese Funktion der ATP-Synthase inhibiert werden [84].

1.2.2.1 Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase (Cox)

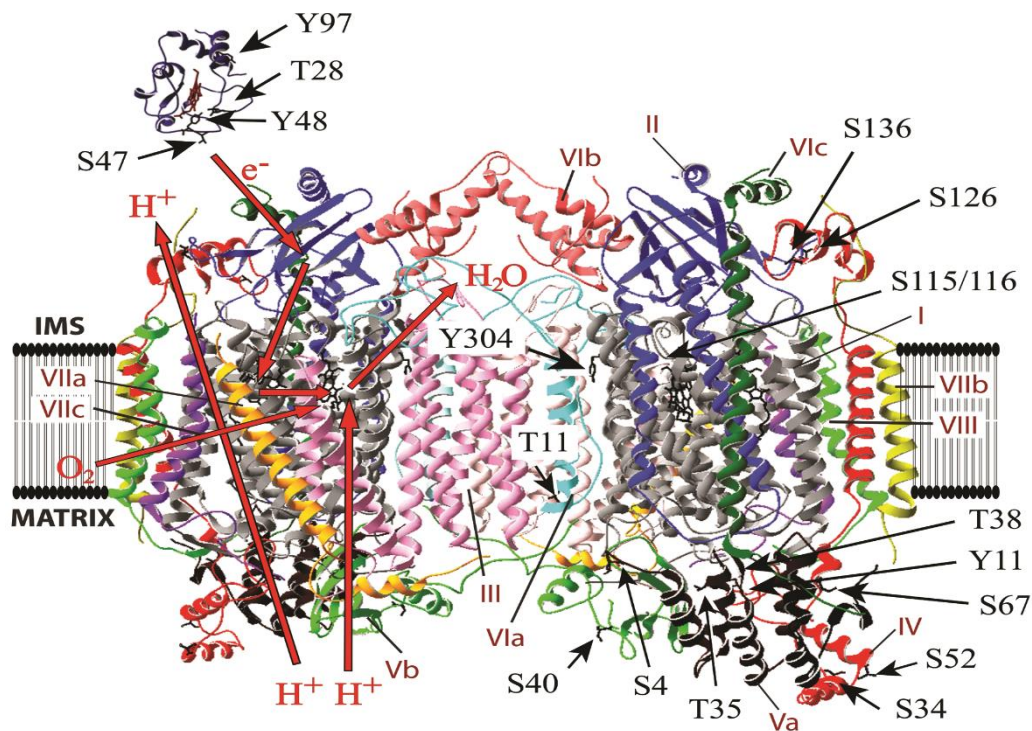


Abb.1: Ansicht der Kristallstruktur von Cytochrom-c und der Cox basierend auf den Daten aus Herzmuskelzellen von Pferd bzw. Rind. Dargestellt sind die Untereinheiten der Cox, sowie die Phosphorylierungsstellen von Cytochrom-c und der Cox. Cytochrom-c befindet sich in der Grafik rechts oben. Die Phosphorylierungsstellen von Cytochrom-c sind mit S47, T28, Y48 und Y97 abgekürzt.

Mit freundlicher Genehmigung entnommen aus: Huttemann, M., et al., *Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease* [65].

Der Komplex IV der Atmungskette ist bei Säugetieren aus 13 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, die teilweise auch Isoformen aufweisen [85].

1.	1
2.	2
3.	3
4.	4
5.	5a
6.	5b
7.	6a-H
8.	6b
9.	6c
10.	7-H
11.	7b
12.	7c
13.	8-H

Bei den Untereinheiten 1-3 liegen die Informationen in mitochondrialen Genen, während die Untereinheiten 4-8 im Zellkern kodiert sind [85].

Die mitochondrial kodierten Untereinheiten stellen den Ort der eigentlichen katalytischen Enzymaktivität dar. In den Untereinheiten 1 und 2 sind die Bindungsstelle für Cytochrom-c und O₂ eingebettet [86].

Die Kern-kodierten Untereinheiten müssen nach der Proteinbiosynthese im Cytosol in die Mitochondrien transportiert werden und wirken vielfältig regulatorisch auf die Enzymaktivität. Für die vorliegende Arbeit wurden einzelne Untereinheiten bzw. Isoformen zur näheren Analyse ausgesucht. Diese werden im Folgenden weiter beschrieben: Untereinheit 4 steht mit Untereinheit 1 und 2, also dem katalytischen Zentrum, in Kontakt. Untereinheit 4 besitzt eine Bindungsstelle für ATP oder ADP und kann auf diese Weise die Aktivität des Enzymkomplexes maßgeblich beeinflussen. Für Untereinheit 4 sind zwei Isoformen bekannt, wobei eine Isoform 2 spezifisch für Lungengewebe ist. Isoform 2 der Untereinheit 4 zeigt eine verstärkte Expression unter hypoxischen Bedingungen. Unter Standardbedingungen wird die Isoform 1 verstärkt exprimiert [85,87,88].

Durch die Untereinheit 5a ist es möglich, die Reaktionsgeschwindigkeit von Komplex IV endokrinologisch zu beeinflussen. Dies geschieht durch eine spezifische Bindung von Diiodthyronin. Durch diese Bindung kann die Aktivität des Enzymkomplexes trotz hoher ATP-Konzentrationen gesteigert werden

Die Expression von Isoformen der Untereinheiten ist in niederen Lebewesen von äußeren Faktoren wie beispielsweise der O₂-Konzentration abhängig. Bei Säugetieren findet man teilweise gewebsspezifische Isoform-Expression oder eine Abhängigkeit vom Lebensalter.

Bereits drei Isoformen der Untereinheit 8 sind bekannt. Darunter eine Isoform, die in Herz und Leber vorkommt [89]. Cox8b zeigt sich verstärkt in braunem Fettgewebe, wo unter Umgehung der OXPHOS Wärme produziert wird [90]. Ferner zeigen Studien, dass diese Untereinheit von Cox für eine effektive Respiration und Cox-Aktivität benötigt wird [91]. Daher sollte in dieser Arbeit die Genexpression von Untereinheit 8b untersucht werden.

1.3 Zelluläre Homöostase der ROS bei PH

Neben anderen ROS-Quellen wie z.B. der NADPH-Oxidase und der endothelialen NO Synthase spielt die mitochondriale ROS-Produktion eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der glatten Muskulatur der Lungengefäße. Unter Hypoxie kommt es laut der Redox-Theorie von Archer, S.L., et al. zu einer reduzierten Zellrespiration und damit zu einem Abfall der ROS-Produktion. ROS löse hierbei eine Verschiebung des Redox-Gleichgewichtes aus, was zu einer Inhibierung von Kaliumkanälen und einer anschließenden Membrandepolarisation der Gefäßmuskelzelle führe. Der daraufhin einsetzende Kalzium-Einstrom ermögliche anschließend eine Vasokonstriktion bzw. begünstige unter chronischer Hypoxie die Zellproliferation.

Andere Arbeitsgruppen wie die von Schumacker, P.T., et al. fanden unter hypoxischen Bedingungen einen Anstieg von ROS, die am Komplex III der Atmungskette entstehen könnten [92]. Hierbei könnte eine ROS-Erhöhung über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren eine Anpassung des Zellstoffwechsels an O₂-arme Bedingungen bewirken.

Die unterschiedlichen Hypothesen bezüglich eines Anstiegs oder Abfalls von ROS könnten hierbei dadurch erklärt werden, dass, lokalisiert an bestimmten Ionenkanälen oder Zellorganellen, eine andere ROS-Konzentration herrscht als in der restlichen Zelle [93].

Superoxid (O₂⁻), das von Mitochondrien und der NADPH-Oxidase freigesetzt wird, wird von der O₂⁻-Dismutase (SOD) zu H₂O₂ katalysiert. Hierbei gilt es, zwei wichtige Formen zu unterscheiden: SOD1, eine Kupfer/Zink- O₂⁻-Dismutase, befindet sich im Zytoplasma und im mitochondrialen Intermembranraum. SOD2 ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und enthält Mangan.

P66 *SH 2 containing proto-oncogene* (SHC) ist ebenfalls eng mit der ROS-Homöostase, aber auch mit der Apoptose verbunden. Hierbei wird zytosolisches p66SHC unter Stress phosphoryliert und in die Mitochondrien transloziert. Dort stimuliert es die Produktion von O₂⁻ in der Atmungskette an Cytochrom-c. Dies erhöht den oxidativen Stress und führt zu einer Steigerung der Apoptose [94]. Ein p66SHC-*knock-out*-Experiment wies darauf hin, dass eine fehlende Funktion dieses Enzyms zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress führt [95].

1.4 Metabolische Veränderungen bei PH

Die Mitochondrien sind die hauptsächlichen Verbraucher von O_2 im menschlichen Körper [96] und die zentralen Drehscheiben im Energiestoffwechsel. Neben dem Citratzyklus laufen unter anderem die Reaktionen des Harnstoffzyklus, die β -Oxidation der Fettsäuren und die ATP-Produktion in diesen "Zell-Kraftwerken" ab.

Darüber hinaus spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Apoptose [97], der zellulären Kalziumhomöostase [98] und der Entstehung und Detoxifikation von ROS [99,100].

In den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Michelakis, E.D./Archer, S.L., et al. stehen die Mitochondrien im Zentrum einer umfassenden Hypothese, die die komplexen Zusammenhänge der Pathogenese der PH in Hinsicht auf die mitochondriale Rolle zu erklären versuchen. Hierbei wird ein spezifischer mitochondrialer Phänotyp postuliert, der nicht nur bei der PH sondern auch in malignen Zellformationen vorkommt. Dabei ist der zelluläre Stoffwechsel von der Glucoseoxidation mittels OXPHOS der Mitochondrien zur anaeroben Glycolyse verschoben und es besteht ein Zustand der Anti-Apoptose [101,102].

Im Zentrum der Theorie steht hierbei PDH, das als Schlüsselenzym die Verstoffwechslung von Pyruvat zu Acetyl-CoA als Substrat für den Citratzyklus reguliert. PDK hemmt die Aktivität der PDH. Ein dadurch verursachter verminderter Zufluss von Elektronen aus dem Citratzyklus in die Atmungskette führt laut dieser Hypothese zu einer reduzierten Glucoseoxidation und Produktion von O_2 , welches von SOD zu H_2O_2 abgebaut wird. Die verminderte Konzentration von H_2O_2 würde demnach zu einer Hemmung des *apoptosis-inducing factor* (AIF) und damit zu einer Resistenz gegenüber der Apoptose führen. Des Weiteren würde ein verminderter ROS-Spiegel eine Stabilisierung des HIF [96,103] und eine verminderte Öffnung von Redox-sensitiven Kaliumkanälen (*K_v channels*) verursachen. Es ist bereits seit langem bekannt, dass eine Inhibierung der Kaliumkanäle zur Öffnung von spannungs-abhängigen Kalziumkanälen führt. Der erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel wiederum resultiert in einer Kontraktion der Zelle und in einer proliferativen Stoffwechsellage durch Aktivierung von proliferativen Transkriptionsfaktoren. Ferner wurde von zahlreichen Autoren beschrieben, dass ein erhöhter zytoplasmatischer Kalziumspiegel den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) aktiviert, der wiederum die Expression von mitochondrialen Proteinen inhibiert und die Expression von *K_v*

channels vermindert, sodass ein *circulus vitiosus* entsteht [104,105]. Im Rahmen einer chronischen Hypoxie kommt es via HIF-1 α zu einer Adaptation des Zellstoffwechsels, indem Gene der Glycolyse gesteigert und Gene der OXPHOS vermindert exprimiert werden.

Gemäß der metabolischen Theorie der PAH von Paulin, R. und Michelakis, E.D. könnten nun sämtliche genannte Veränderungen des Energiestoffwechsels durch eine Hemmung der PDK rückgängig gemacht werden [106]. Einen solchen Hemmstoff von PDK stellt DCA dar. Diese Substanz erwies sich hierbei in einigen Tiermodellen der PH (basierend auf Monocrotalin oder Hypoxie) als geeignet, um eine gesteigerte Glycolyse und die anti-apoptotische Stoffwechsellaage rückgängig zu machen oder zu verhindern. Ferner konnten vaskuläre Umbauprozesse in den Lungengefäßen in diesen Tiermodellen rückgängig gemacht werden. Ebenso verbesserte DCA die Pumpfunktion des rechten Ventrikels [29,107].

1.5 Fragestellung und Hypothese der Studie

Es ist bereits bekannt, dass Mitochondrien eine zentrale Rolle bei der zellulären Adaptation an unterschiedliche äußere Voraussetzungen sowie in der Pathogenese verschiedener Krankheiten spielen. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Verstärkung der OXPHOS in verschiedenen Modellen der PH die Krankheitsentwicklung vermindert [29,48,49]. Allerdings wurde bisher nicht untersucht, inwiefern die mitochondriale Atmung von PAGMZ, die bei der Krankheitsentstehung der PH eine zentrale Rolle spielen, in Tiermodellen der PH verändert ist und welche genauen Mechanismen dieser möglichen Veränderung zugrunde liegen. In diesem Zusammenhang ist auch bekannt, dass Hypoxieexposition – als möglicher Stimulus für die PH – metabolische Veränderungen hervorrufen kann, die zu einer verminderten mitochondrialen Atmung führen. In dieser Arbeit sollten daher verschiedene Funktionen der mitochondrialen Atmungskette in PAGMZ nach chronisch hypoxischer Inkubation untersucht werden.

Als grundlegende Hypothese lag die Annahme vor, dass Mitochondrien eine wesentliche Rolle bei Hypoxie-induzierten Adaptations-Prozessen von PAGMZ, wie sie bei der Hypoxie-induzierten PH vorkommen, spielen. Diese Adaptations-Prozesse könnten sowohl Respiration und mitochondriale O₂-Affinität als auch Genexpression und Proteinkonzentrationen entscheidender Enzyme des mitochondrialen und des Zellstoffwechsels signifikant beeinflussen.

Des Weiteren bestand die Annahme, dass es durch eine pharmakologische Intervention an der PDK mittels DCA möglich sein könnte, die möglichen Auswirkungen der chronischen Hypoxie auf die Mitochondrien der PAGMZ zu verhindern.

Ziel der Arbeit war es, Hypoxie-induzierte Veränderung der Mitochondrien in PAGMZ zu identifizieren, um daraus mögliche neue Ansatzpunkte zur Therapie der PH abzuleiten. Die Hypothese sollte durch polarographische Messungen der Respiration überprüft werden. Dafür wurden PAGMZ aus Ratten isoliert und O₂-Konzentrationen von 1% und 7% für jeweils 12, 24 und 48 Stunden ausgesetzt. Zur Bestimmung verschiedener Atmungsketteneigenschaften wurde die unstimulierte Atmung unter Normoxie und Hypoxie, der Protonen-*leak*, die maximale Kapazität der Atmungskette und die Aktivität einzelner Komplexe der Atmungskette nach chronisch hypoxischer Inkubation dargestellt.

Darauf aufbauend wurden die Regulation verschiedener Gene u.a. des Stoffwechsels und der Atmungskette unter chronischer Hypoxie quantifiziert. Hierbei wurde nicht nur die isolierte mRNA von PAGMZ, sondern auch Lungenhomogenat von hypoxisch inkubierten Ratten auf Veränderungen auf der Genebene überprüft. Als Referenz-Gen (*housekeeping-gene*) wurde Beta2-Mikroglobulin (B2M) ausgewählt, das unter hypoxischen Bedingungen über eine konstante Expression verfügt [108].

Abschließend wurde überprüft, ob sich die Hypoxie-induzierten Anpassungsreaktionen auf pharmakologische Weise verhindern lassen. Dafür wurden dem Zellkulturmedium der PDK-Inhibitor DCA hinzugefügt. Anschließend wurden die oben genannten Messungen mit den DCA-inkubierten Zellen wiederholt und mit den unbehandelten Muskelzellen verglichen.

Bei dem aeroben Stoffwechselweg wird Pyruvat im Mitochondrium durch PDH zu Acetyl-CoA umgebaut. Das Schlüsselenzym PDH treibt somit den Citratzyklus an, der für die Atmungskette NADH und FADH₂ bereitstellt. Im Rahmen des Elektronentransports entlang der Atmungskette baut sich ein elektrochemischer Protonengradient auf, der von Komplex V, der ATP-Synthase zur Herstellung von ATP verwendet wird.

Durch Verminderung von ROS, könnten Kaliumkanäle (Kv) inhibiert werden. Dies könnte zu einer Depolarisation des zellulären Membranpotentials und zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanäle führen. Der erhöhte Kalziumspiegel führe nun zu Vasokonstriktion und begünstige Zellproliferation. Zu Vasokonstriktion und Proliferation der PAGMZ könnte daneben eine gesteigerte Glycolyse und ein verringertes ATP-Angebot beitragen. Auch eine verringerte Apoptose aufgrund eines erhöhten mitochondrialen Membranpotentials könnte die Proliferation fördern.

Durch eine möglicherweise gesteigerte ROS-Produktion könnte sich HIF stabilisieren und eine verstärkte Expression von PDK1 induzieren, das zu einer Hemmung von PDH führen würde.

Untersucht werden sollten nun die hypoxischen Auswirkungen auf die Respiration und Aktivität einzelner Komplexe der Mitochondrien, insbesondere auf Komplex IV als direktem Interaktionspartner mit O₂. Schließlich sollte untersucht werden, ob Schlüsselproteine der Glucoseoxidation und Glycolyse sowie Proteine des ROS-Stoffwechsels eine quantifizierbare Änderung ihrer Genexpression unter Hypoxie in PAGMZ aufweisen. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf den Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase (Cox). Insbesondere Isoform 2 der Untereinheit 4 stellte sich aufgrund der Literatur als aussichtsreicher Kandidat für eine Hypoxie-induzierte Regulation der Genexpression dar.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

CASY® Technologie Zellzähler	Innovatis AG, Bielefeld
Entwicklermaschine Curix	AGFA, Mechelen, Belgien
Homogenisator	Precellys 24 Peqlab, Erlangen
Microzentrifuge 200	Hettich, Tuttlingen
Microzentrifuge 120	Hettich, Tuttlingen
Mikroplattenlesegerät ELx808	Bio-Tek, Bad Friedrichhall
Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Mikroskop Leica DM IL	Leica, Wetzlar
Mx3000P® QPCR System	Agilent (Stratagene), Waldbronn
NanoDrop (ND-1000)	Kisker-Biotech, Steinfurt
Oxygraph-2k	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
Präzisionswaagen Sartorius Basic	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage Mettler H20T	Mettler-Toledo, Gießen
Real-time PCR-Reaktionsgefäße	Thermo-Fisher, Abgene, Hamburg
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore, Schwalbach
Sicherheitswerkbank NU-480 E	Nuaire, Plymouth, USA
Spektrophotometer ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Thermocycler T-personal	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Vertikal-/Horizontalschüttler	KeutzLabortechnik, Reiskirchen
Vortexer MS1 Minishaker	IKA, Staufen
Wasserbad WNE 45	Memmert, Schwabach
Zellinkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifuge Rotana 46 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotana AP	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2.1.2.1 Zellisolation

Agarose (Type VII)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisen III Oxid (Eisen-II, III-oxid, 98% Fe ₃ O ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
15 G-Kanüle	Dispomed Witt, Gelnhausen
18 G-Kanüle	HMD Healthcare LTD, Horsham, UK
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2.2 Zellkultur:

Cellstar [®] Zellkulturflaschen T 75	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dichloroacetat (DCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> (DPBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
<i>Hydroxyethyl piperatineeethanesulfonic acid</i> (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kochsalzlösung (NaCl)	Braun, Melsungen
Medium 199 (M199)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN-Biotech, Aidenbach
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Trypsin/ <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (EDTA) (10x)	PAN-Biotech, Aidenbach

2.1.2.3 Kulturmedien und Lösungen

Einfriermedium M1=	M199 mit 10% HEPES, 10% FCS, 1% P/S
Einfriermedium M2=	M1 mit 20% DMSO
Kulturmedium M199	(enthält 10% FCS und 1% P/S)
Trypsinlösung	(enthält 10% Trypsin, 10% HEPES, 80% NaCl)

2.1.2.4 Respiratorische Versuche

Versuche zur Atmungskettenaktivität

Oligomycin	4 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCCP	1 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>(carbonylcyanid- p-trifluoromethoxyphenylhydrazon)</i>		
Rotenon	1 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Antimycin A	5 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim

Versuche zur Komplexaktivität

alle von Sigma-Aldrich, Steinheim

Digitonin	10 mg/ml
Malat	0,8 M
Glutamat	2 M
Adenosindiphosphat (ADP)	0,5 M
Rotenon	1,0 M
Succinat	1 M
Antimycin A	5 mM
Ascorbat	0,8 M
Tetramethylphenylendiamin (TMPD)	0,2 M
Sodiumacid	4 M
Natriumdithionit	0,1 M

Mitochondrial Respiration Medium (MiR05)

<i>Ethyleneglycoltetraacetic acid</i> (EGTA)	0,5 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
MgCl ₂ *6H ₂ O	3 mM	Scharlau, Barcelona, Spanien
<i>K-lactobionate</i>	60 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Taurine	20 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
KH ₂ PO ₄	10 mM	Merck, Darmstadt
HEPES	20 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Sucrose	110 mM	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	1g/l	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2.5 Gele für Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Aqua dest.	Braun, Melsungen
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin 99% p.A.	Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2.6 Western Blot

DPBS	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> (RIPA)-Puffer:	Thermo Scientific, Dreieich
SDS	Roth, Karlsruhe
NuPage Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Ladepuffer	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Full-Range Rainbow Mol. Weight Marker</i>	Bio-Rad, München
Whatman-Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Pall Life Science, Dreieich
Milchpulver (<i>Skim Milk</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
Tween [®] 20 (<i>Polysorbate</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL Plus	GE Healthcare, München
<i>Cronex 5 Medical X-Ray Film</i>	Agfa, Mortsel, Belgien

2.1.2.7 CS-Assay

Tris	1 M	Merck, Darmstadt
Triethanolamin	0,5 M	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	5 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	10%	Serva, Heidelberg
Oxalacetat	10 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	1,01 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetyl-CoA	12,2 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citrat-Synthase (CS)	8,6 mg Prot./ml	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.3 Kits und Assays

DC Protein Assay	Bio-Rad, München
iScript-cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
iTaq-SYBR Green-Mix	Bio-Rad, München
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4 Primer

Die verwendeten Primer stammen alle von Metabion International AG (Martinsried, Deutschland).

Gene (rattenspezifisch)	Sequenz	Produktgröße [bp]
AMPK	F:5´ - AGG CAC ATG GTT GTC CAC AG-3´	148
	R:5´ - CTG CAT AAT TTG GCG ATC CA-3´	
ATPIF1	F:5´ - GGG AAA CGA GAG AAG GCT GA-3´	143
	R:5´ - TGC CGT TCG ATC TGT TTT TG-3´	
B2M	F:5´ - GCT CAC ACT GAA TTC ACA CCC ACC GA-3´	101
	R:5´ - ATG TCT CGG TCC CAG GTG ACG GT-3´	
Cytbc1	F:5´ - GCC CTT CGG TCT CAG CTA AA-3´	104
	R:5´ - GCC AAG GCA TTC TTG TAG GC-3´	
Cox4i1	F:5´ -AGG CCC TGA AGG AGA AGG AG-3´	119
	R:5´ - CTC ATT GGT GCC CTT GTT CA-3´	
Cox4i2	F:5´ -CAG CTG AGC CAA GCA GAG AA-3´	135
	R:5´ - TCA TTG GAT TCA CGG CTC TG-3´	
Cox5a	F:5´ - GTG CTG TTC GCA TCT TGG AG-3´	138
	R:5´ - CTT TGT CAA GGC CCA GTT CC-3´	
Cox5b	F:5´ - ATG GCT TCT GGA GGT GGT GT-3´	119
	R:5´ - GCT GCC TTT GGA GGT AGC AT-3´	
Cox8b	F:5´ - AGC GCC CGA GAA GTA CAC A-3´	132
	R:5´ - CAT CCT GCT GGA ACC ATG AA-3´	
GLUT1	F:5´ - GAT CCC TGC AGT TCG GCT AT-3´	150
	R:5´ - AGA TGG CCA CGG AGA GAG AC-3´	
LDHa	F:5´ - TGG AAG TGG TTG CAA TCT GG-3´	133
	R:5´ - ACC ACT CCA CAC AGG CAC AC-3´	

NDUFS1	F: 5′ - CTT CCC CAA TGA AGG AGC TG-3′	134
	R:5′ - CAT TAA ACA GCG GTG CCT CA-3′	
NDUFS4	F:5′ - AAC TCG GGA CAC CCA GCT TA-3′	125
	R:5′ - GCA TGT TAT TGC GAG CAG GA-3′	
p66SHC	F:5′ - GAG CCT GCC ATA TCC TGG AG-3′	146
	R:5′ - ATC AAA GCC AGC CAT CCT GT-3′	
PDK1	F:5′ -ATT GCC CAT ATC ACG CCT CT-3′	120
	R:5′ - CTG TCA ACG GAG TCC ATC GA-3′	
PDK2	F:5′ - CCA AAC ACA TTG GCA GCA TT-3′	111
	R:5′ - GGT CAG GGG AAG CCA TGT AA-3′	
SDHa	F:5′ - GGC GAA AGG TTC ATG GAG AG-3′	121
	R:5′ - GAT CCT TCT CAG GGC CAC AG-3′	
SDHd	F:5′ - TTT TGC TCT TGG GCC TGA TT-3′	135
	R:5′ - CGT CCC CAT GAA CGT AGT CA-3′	
SOD1	F:5′ - GCG TCA TTC ACT TCG AGC AG-3′	136
	R:5′ - CCT GCA GTG GTA CAG CCT TG-3′	
SOD2	F:5′ - GGG CCA TAT CAA TCA CAG CA-3′	163
	R:5′ - CCA GCC TGA ACC TTG GAC TC-3′	

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper

Cox 4i2, monoklonal, Firma Abnova (# H00084701-M01), Konzentration 1:1000

ß-Aktin, monoklonal, Firma Sigma-Aldrich (# A5316), Konzentration 1:30000

Sekundäre Antikörper (Peroxidase-gekoppelt)

Rabbit-anti mouse Ig HRP, polyklonal, Firma Promega (# W402B), Konzentration 1:5000

2.2 Methoden

2.2.1 Hypoxieexposition von Ratten

Die verwendeten Tiere stammten von der Firma Charles River (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld). Die adulten, männlichen CD-IGS Ratten wurden mit einem Anfangsgewicht von 226 bis 250 Gramm geliefert.

Sämtliche Versuche waren vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Genehmigungsnummer: GI 20/10 Nr. 16/2008).

2.2.2 Isolation von PAGMZ

Zur Gewinnung von PAGMZ für respiratorische Messungen und molekularbiologische Untersuchungen wurden CD-IGS Ratten verwendet. Nach Fixierung in einem Kleintier-Restrainer wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion narkotisiert. Die Mischspritze enthielt 50mg/kg Ketamin[®] (Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml, Pharmacia, Erlangen) und 100 µg/kg Domitor[®] (Medetomidinhydrochlorid 1mg/ml, Pfizer, Karlsruhe). Nach Bewusstseinsverlust erfolgte eine Antikoagulation durch eine Injektion von 200 µl Heparin (25000 I.E.; 1:3-Mischung mit Kochsalzlösung; Roche, Basel, Schweiz) in die Penisvene.

Der auf dem Rücken fixierten Ratte wurde nun das Fell bis zum Hals aufgeschnitten und die Trachea freigelegt. Auf das Legen einer Ligatur um die Trachea folgte eine Quereinziehung der Luftröhre und eine Einbindung des Trachealtubus. Nach Eröffnung des Peritoneums und Abpräparieren des Diaphragmas konnte der Thorax eröffnet werden. Nun wurde der Thymus stumpf entfernt und der Herzbeutel vorsichtig aufgeschnitten. Mit einem Faden (Coats GmbH, Kenzingen) wurde nun eine Ligatur um die Aorta und die Pulmonalarterie (PA) vorgelegt und eine Spritze mit DPBS (Invitrogen, Karlsruhe) bereitgelegt. Durch einen kleinen Schnitt in den rechten Ventrikel wurde ein Katheter in die Pulmonalarterie eingebunden und darüber die Lunge mit DPBS blutfrei gespült. Der Abfluss der Spülflüssigkeit wurde durch einen großen Schnitt im linken Ventrikel gewährleistet. Beim Spülen durch die PA wurde darauf geachtet, dass die Spritze sowie der Gummischlauch (Braun, Melsungen), der als Verbindungsstück zum Katheter diente, luftblasenfrei mit DPBS-Puffer gefüllt waren. Nach dem Abklemmen des Verbindungsschlauches wurde eine neue Spritze aufgesetzt, die eine Mischung aus 12 ml M199 (Invitrogen, Karlsruhe) mit 1% P/S (10000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin; PAN Biotech, Aidenbach), sowie 60 mg Eisen III Oxid und 60 mg Agarose (beides Sigma-Aldrich, Steinheim) mit einem niedrigen Schmelzpunkt enthielt. Das Gemisch wurde zuvor in einem Wasserbad für 20 Minuten bei 70° C erhitzt, auf 40°C abgekühlt und dann langsam über den Katheter in die Pulmonalarterie instilliert. Die Größe der Eisenpartikel war hierbei so gewählt, dass sich diese in den präkapillären Bereichen des Gefäßsystems ablagerten und die Kapillaren nicht durchfließen konnten. Dadurch konnten glatte Muskelzellen aus einer definierten Region der pulmonalarteriellen Strombahn ausgewählt werden. Nach Entfernen des PA-Katheters wurde nun eine Mischung aus 15 ml M199 und 1% P/S sowie 150 mg Agarose in die

Trachea instilliert, bis die Lunge komplett aufgebläht war. Die Agarose-Lösung wurde zuvor auf 70°C erhitzt und dann auf 40°C abgekühlt.

Diese Behandlung diente zur besseren Handhabbarkeit bei der weiteren Zellisolierung. Nach der kompletten Ablösung des Herz-Lungen-Paketes wurde das Präparat zur Verfestigung der Agarose in ein Gefäß mit eiskaltem DPBS-Puffer überführt. Während der Abkühlzeit wurde eine Kollagenaselösung vorbereitet. Dazu vermischte man M199 und 1% P/S mit zuvor abgewogener Kollagenase, sodass eine Konzentration von 80 U/ml resultierte. Die Lunge wurde nun von Herz und restlichem Gewebe getrennt und mechanisch zerkleinert. Um sicherzustellen, dass die Ratte keine Zeichen der PH aufwies, wurde der rechte Herzventrikel von der linken Herzkammer abgelöst und ein Gewichtsverhältnis zwischen den beiden Herzkammern errechnet. Die Lungenstückchen wurden in zwei sterile Plastikröhrchen überführt (Blue Caps, Greiner Bio-one, Frickenhausen), die mit DPBS aufgefüllt wurden. Im nächsten Schritt wurden die Blue Caps in einen magnetischen Halteapparat (Magnetic Concentrator, Dynal A.S., Oslo, Norwegen) eingespannt. Dieser bewirkte, dass sich die Lungenstückchen mit Eisenbeladung am Rand des Blue Caps positionierten und das Gewebe ohne Eisenanteile zusammen mit dem DPBS-Puffer mittels Pasteur-Pipette abgesaugt werden konnte. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Die vorbereitete Kollagenaselösung wurde nun mit zu den gewaschenen Lungenstücken gegeben und anschließend in eine Petrischale überführt. In einem Inkubator (Flow Laboratories, Meckenheim) wurden für 55 Minuten bei 37°C und 5% Kohlendioxid optimale Bedingungen geschaffen, sodass die Kollagenase den noch bestehenden Zellverband auflösen konnte. Durch die Behandlung wurden die Eisenpartikel mit den glatten Muskelzellen nicht nur von Fibroblasten befreit, sondern gleichzeitig wurde auch das Gemisch noch von eventuell enthaltenen Mikroorganismen gereinigt. Durch das mehrmalige Hochziehen des angedauten Gewebes mit einer 15 G-Kanüle und anschließend mit einer 18 G-Kanüle wurde das angedaute Gewebe durch mechanische Scherkräfte entfernt. Der Kollagenaseverdau wurde nun gestoppt, indem die Eisenpartikel mit dem daran anhaftenden Gewebe in ein Blue Cap mit Zellkulturmedium (M199 mit 10% FCS und 1% P/S) gegeben wurden. Mit Hilfe des Magnetic Concentrator wurden die Eisenpartikel mit dem daran anhaftenden Gewebe in dem Blue Cap fixiert und drei Mal nach dem oben bereits beschriebenen Prinzip gewaschen. 2 ml der Suspension der Eisenpartikel mit den nun daran anhaftenden kleinen Gefäßbestandteilen wurde nun in T75 Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 10 ml

Zellkulturmedium M199 mit 10% FCS und 1% P/S ausgesät. Die Zellkulturflaschen wurden nun in einen Inkubator gestellt, in dem die PAGMZ bei 37°C, 21 % O₂ und 5% CO₂ aussprossen. Die restliche Gasfraktion bestand aus N₂.

2.2.3 Zellkultur

Nach einer dreitägigen Wartezeit waren die an den Eisenpartikeln befindlichen glatten Gefäßmuskelzellen auf dem Boden der Zellkulturflasche fest angewachsen und die beweglichen Eisenpartikel wurden mit DPBS aus den Zellkulturflaschen gespült. Dazu wurde drei Mal mit einer Pipettenspitze und dazugehörigem „Pipetboy“ der Boden der T75 gespült und die Flüssigkeit anschließend mit Pasteur-Pipetten abgesaugt. Die so behandelten Zellen wurden nun wieder für drei Tage in den Inkubator gegeben. Nach dieser Wartezeit wurde das Wachstum der Zellen unter dem Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar) überprüft. Erstreckte sich das Zellwachstum auf circa 75 % der T75 Platten, wurde die erste Passage durchgeführt. Dazu wurde das Zellkulturmedium mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und die Zellen wie oben beschrieben gründlich mit DPBS gespült. Nun wurde 4 ml Trypsinlösung (Trypsin mit 10% HEPES und 80% NaCl) in die Zellkulturflaschen gegeben und für eine Minute bei 37°C, 21 % O₂, 5% CO₂, circa 74% N₂ inkubiert. Unter lichtmikroskopischer Sichtkontrolle wurden die Zellen durch leichtes Anschlagen der T75 vollständig abgelöst und in mit 2ml FCS befüllte Blue Caps überführt. Dadurch wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins abgestoppt. Die T75 wurden nun mit 10 ml DPBS ausgespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls in das Blue Cap gegeben. Um residuelle Eisenpartikel zu entfernen, wurde das Blue Cap in den Magnetic Concentrator eingespannt und die Zellsuspension in ein anderes Blue Cap umgefüllt. In der Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) wurden die Zellen bei einer Umdrehung von 250 x g für 7 Minuten konzentriert. Der Überstand aus DPBS wurde abgesaugt, und das auf dem Boden des Plastikröhrchen verbleibende Zell-Pellet wurde mit 10 ml DPBS resuspendiert. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten mit nach oben beschriebenen Schema wurde das Zellpellet mit 10 ml M199 (mit 10% FCS und 1% P/S) resuspendiert. Dabei wurde der Inhalt einer T75 Flasche auf 5 T75 Flaschen aufgeteilt (1:5). Nach drei weiteren Tagen Inkubation wurden die Zellen das zweite Mal im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dabei war das Vorgehen mit dem oben beschriebenen Schema identisch. Allerdings wurden bei der zweiten Passage immer auch Zellen für zukünftige Experimente eingefroren. Das Einfriermedium bestand dabei aus M199 mit 10% HEPES, 10% FCS, 1% FCS und 10% DMSO. Das DMSO hatte die Funktion, ein Entstehen von Eiskristallen zu verhindern. Das Einfrieren geschah in mehreren Schritten von -30°C über -80°C bis zu -180°C in flüssigem Stickstoff. Die PAGMZ, die sich nun in der zweiten Passage befanden, wurden zunächst mit M199 (mit 10% FCS und 1% P/S) bei 37°C, 21 % O₂, 5%

CO₂, circa 74% N₂ inkubiert. Nachdem die PAGMZ eine Konfluenz von circa 50% erreicht hatten, wurden sie für die Experimente vorbereitet. Bis dahin wurde jeden zweiten Tag das Nährmedium ausgetauscht. Das Versuchsprotokoll für die Experimente an isolierten PAGMZ umfasste Veränderungen des Inkubationsmediums oder in der O₂-Konzentration im Inkubator oder von beidem.

Folgende Tabelle dient zur Illustration der Experimente:

Zellen	Medium	Zusätze	O₂-Konzentration (%)	Inkubationsdauer (h)	Gruppenbezeichnung
PAGMZ	M199 (+10% FCS, 1% P/S)	-	21	12/24/48	NOX
PAGMZ	M199 (+10% FCS, 1% P/S)	-	7	12/24/48	HOX7/ 12/24/48
PAGMZ	M199 (+10% FCS, 1% P/S)	-	1	12/24/48	HOX1/ 12/24/48
PAGMZ	M199 (+10% FCS, 1% P/S)	DCA 0,5 mM	1	24/48	HOX1/ 24/48+D

Tab. 1: Darstellung der verschiedenen Versuchsgruppen der PAGMZ.

2.2.4 Respirometrische Messung

2.2.4.1 Vorbereitung der PAGMZ vor der respiratorischen Messung

Nachdem die Zellen die vorgegebene Zeit im Inkubator verbracht hatten, wurden sie lichtmikroskopisch auf eventuelle Kontaminationen überprüft. Danach wurden aus den Zellkulturflaschen das Inkubationsmedium abgesaugt und anschließend mit 10 ml DPBS gespült. Wie bereits im Abschnitt Zellkultur beschrieben, wurden die PAGMZ nun trypsiniert und in FCS überführt. Nach der ersten Zentrifugation wurden die PAGMZ mit 10 ml farblosem M199 resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Nach einem weiteren Schritt, der Resuspendierung und Zentrifugierung umfasste, wurde das Zellpellet mit 2,5 ml farblosem M199 resuspendiert. 2,5 µl dieses Zellsuspensates wurden nun verwendet, um die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen. Dazu wurde ein CASY® Cell Counter + Analyser Modell TT (Innovatis AG, Reutlingen) verwendet. Der Zellzähler registrierte eine Gesamtzellzahl, die Zahl der lebensfähigen Zellen und den Aggregationsgrad mit Angabe des mittleren Aggregationsfaktors. Nur wenn die Zellzahl größer als $0,5 \times 10^6$ und der mittlere Aggregationsfaktor kleiner 2 war, wurden die Zellen verwendet.

In beide Kammern des Oxygraphen wurden je 2,5 ml einer Suspension aus PAGMZ in M199 mit 10% HEPES gegeben. Nach einer Wartezeit von etwa 10 Minuten hatte sich die O₂-Konzentration in den Messkammern stabilisiert und sie wurden luftblasenfrei verschlossen. Die O₂-Konzentration und der O₂-Verbrauch wurden mit Hilfe des Programms „DatLab 4.1“ kontinuierlich aufgezeichnet. Dadurch, dass zwei getrennte Messkammern zur Verfügung standen, konnte man den O₂-Verbrauch von unterschiedlich inkubierten PAGMZ gleichzeitig aufzeichnen und direkt miteinander vergleichen.

2.2.4.2 Technik und Funktionsweise des Respirometers

Zur Messung des O₂-Verbrauches wurde ein Respirometers (Oxygraph-2k, Oroboros® INSTRUMENTS GmbH, Innsbruck, Österreich) (siehe Abbildung 3) mit zwei baugleichen Versuchskammern verwendet.



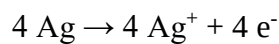
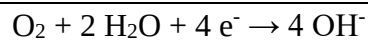
Abb. 3: Oroboros Oxygraph-2k.

Mit freundlicher Genehmigung durch Erich Gnaiger.

Das zentrale Bauteil des Respirometers ist ein Kupferblock, in den zwei Glaskammern eingelassen sind. Der Kupferblock ist wärmeisoliert und temperaturreguliert. Die Temperaturregulation geschieht mit Hilfe einer Peltier-Wärmeverteilerplatte, die mit dem Kupferblock verbunden ist. In der Messkammer befinden sich Magnetrührer, die mit einer Rührgeschwindigkeit von 750 rpm den Inhalt der Messkammer durchmischen und so konstante Messbedingungen schaffen. Die polarographischen O₂-Sensoren (POS) sind durch eine gelochte Ummantelung aus Kautschuk geschützt und von unten in die Glaskammern eingelassen. Die Stempel (Stopper) zum luftdichten Verschluss der

Glaskammern haben in der Mitte einen Titaniumkanal und können variabel in die Glaskammern eingelassen werden, um das Volumen zu verändern. Bei den durchgeführten Versuchen war die Messkammer stets auf 2 ml eingestellt. Durch den Titaniumkanal besteht die Möglichkeit der Zellsuspension mit einer Hamilton-Spritze Substrate oder Inhibitoren der Atmungskette zuzusetzen ohne die O₂-Messung zu unterbrechen.

Die O₂-Sensoren verfügen über eine Goldkathode und eine Silber/Silberchlorid-Anode. Als Elektrolyt fungiert eine 1 molare Kaliumchlorid-Lösung. An der Kathode wird eine Polarisationsspannung angelegt. O₂ diffundiert nun aus dem Medium der Messkammer durch eine FEP-Membran (Dicke 25 µm) zur Oberfläche der Kathode. Hier wird O₂ reduziert, während an der Silber/Silberchlorid-Anode elementares Silber oxidiert wird:



Bei dieser Reaktion fließt ein Strom, der zur Menge des verbrauchten O₂ proportional ist, wodurch die O₂-Konzentration im Medium bestimmt werden kann. Der O₂-Verbrauch der Elektrode selbst ist minimal.

2.2.4.3 Vorbereitung des Respirometers

Zu Beginn einer Messreihe wurden die Versuchskammern sorgfältig mit destilliertem Wasser und Ethanol (70%) gereinigt. Anschließend wurde vor jeder Messung eine Kalibrierung der O₂-Sensoren durchgeführt. Dabei wurde M199 in die Kammern gegeben. Nachdem sich das Signal stabilisierte, wurde dieser Wert als der Raumluft-pO₂ bei dem aktuellen Luftdruck definiert. Der zweite Schritt der Kalibrierung erfolgte jeweils am Ende eines Versuches. Hier wurde der Nullpunkt des pO₂ festgelegt, indem man Natriumdithionit in die geschlossene Messkammer gab. Dadurch wurde sämtlicher gelöster O₂ chemisch verbraucht. Mit diesen ermittelten Werten und dem O₂-Löslichkeits-Koeffizienten des Reaktionsmediums kalibrierte das Programm „DatLab 4.1“ automatisch die O₂-Elektrode und berechnete die O₂-Konzentration im jeweiligen Medium. Luftdruck und Temperatur wurden automatisch registriert und berücksichtigt. Des Weiteren wurde wöchentlich eine sogenannte *Background-Calibration* durchgeführt, bei der Inkubationsmedium ohne Probenmaterial in die Messkammer gegeben wurde. Die O₂-Konzentration im Medium sollte unter diesen Voraussetzungen konstant sein. Etwaige Veränderungen durch Diffusion von O₂ in die Messkammer oder aus der Messkammer werden durch den Kalibrierungsprozess erfasst und automatisch korrigiert. Auch ein geringer O₂-Verbrauch durch den polarographischen O₂-Sensor konnte hierbei erfasst werden. Die Atmung der PAGMZ wurde mit dem Programm „DatLab 4.1“ berechnet. Dabei rechnet das Programm unter Berücksichtigung der Kalibrierung und Eingabeparameter den gemessenen pO₂-Gehalt des Mediums in die O₂-Konzentration [µM] um. Die erste Ableitung dieser O₂-Konzentration, gemessen einmal pro Sekunde, ergibt die zeitbezogene Änderung der O₂-Konzentration bezogen auf die mitochondriale Proteinmenge im Medium [nmol mg Protein⁻¹ min⁻¹].

2.2.4.4 Bestimmung der O₂-Affinität:

Zunächst wurden, wie im Unterkapitel 2.2.4 "Respirometrische Messung" beschrieben, Zellsuspensionen hergestellt und in die Messkammern des Oxygraph-2k gegeben. Es wurde darauf geachtet, möglichst mit Hypoxie behandelte und Kontrollzellen (normoxische Zellen, oder mit DCA behandelte hypoxische Zellen) parallel in beiden Messkammern zu untersuchen. Nach einer Äquilibrierungszeit wurden die Messkammern verschlossen und es wurde abgewartet, bis O₂ komplett durch die mitochondriale Atmung verbraucht war. Nun wurden mit Hilfe der Software DatLab 2.1 die O₂-Affinität [p₅₀ (kPa)] und der maximale O₂-Verbrauch [(J_{max} (pmol s⁻¹ *cm⁻³)] der Probe bestimmt. Die Auswertung orientierte sich an einer modellierten Michaelis-Menten-Kinetik [(J_{max} = (J_{max} * pO₂) / ([p₅₀+pO₂)] des O₂-Verbrauchs. Dabei stellt der p₅₀-Wert die halbmaximale mitochondriale Atmung dar.

2.2.4.5 Bestimmung der mitochondrialen Atmung mittels eines Substrat-Inhibitor-Protokolls:

Eine Suspension von PAGMZ und Zellkulturmedium (M199 mit 10% HEPES) wurde in die Messkammern des Oxygraph-2k gegeben. Nach einer Äquilibrationszeit von 5 Minuten wurden die Kammern verschlossen. Nachdem sich das Signal stabilisiert hatte, wurde die zelluläre Routine-Atmung J_R gemessen. Nun wurde mittels einer Hamilton-Injektionsspritze 2 μ l Oligomycin in beide Messkammern hinzugefügt. Durch die Bindung des Oligomycins an der ATP-Synthase (Komplex V) konnte der Protonengradient nur noch langsam über den Protonen-*leak* abgebaut werden. Die Respiration (J_L) war dementsprechend erniedrigt. Nun wurde schrittweise alle 2 Minuten 1 μ l FCCP in die Messkammern titriert. Dabei wurde das TIP2k-Modul der Firma OROBOROS verwendet. Das Modul besteht aus einer Mikropumpe für Titrationsversuche und verschiedenen Hamilton-Spritzen für Mikroinjektionen. Das Modul wurde mit dem Programm „DatLab 4.1“ gesteuert. Die Injektionen wurden so lange fortgeführt, bis sich die entkoppelte Zellatmung (J_E) nicht mehr steigerte. Diese Zellatmung zeigte nun die maximale Gesamtkapazität der Elektronentransportkette. Nach Zugabe von 2 μ l Rotenon und 2 μ l Antimycin A (um 5 Minuten zeitversetzt) wurde die verbleibende Restatmung J_{ROX} bestimmt. Dieser O_2 -Verbrauch ist unabhängig von der Atmungskette. Es wurde der O_2 -Verbrauch bei den jeweiligen Messphasen markiert, die markierten Bereiche in das Programm „Microsoft Excel“ exportiert und graphisch dargestellt.

Aus den einzelnen Atmungsphasen lassen sich folgende Parameter berechnen:

Das Verhältnis zwischen Routineatmung (J_R) und entkoppelter Zellatmung (J_E) wird im Folgenden als R/E bezeichnet und gibt an, zu welchem Prozentwert die Routineatmung im Vergleich zur maximalen Kapazität der Atmungskette aktiviert ist.

Das Verhältnis L/E stellt den Anteil des Protonen-*leaks* (J_L) zur maximalen Atmungskettenkapazität (J_E) dar.

Abschließend stellt der netR die Netto-Routineatmung dar. Dieser Wert drückt den Anteil der aktivierten Zellrespiration unter Routinebedingungen aus, bereinigt durch den Protonen-*leak* [$\text{netR} = (J_R - J_L) / (J_E)$], also den Anteil der Zellrespiration, der für die ATP-Produktion genutzt wird.

2.2.4.7 Bestimmung einzelner Atmungskettenkomplexfunktionen:

Eine Suspension von PAGMZ und Medium MiR05 wurde in die Messkammern gegeben. Vor dem Verschließen der Kammern erfolgte eine Äquilibration von 5 Minuten. Nach der Signalstabilisierung wurde die Routine-Atmung (J_R) bestimmt. Durch die Gabe von 10 μ l Digitonin wurde die Plasmamembran der Zellen permeabelisiert. In einem Vorversuch wurde die Konzentration von Digitonin bestimmt, die dazu notwendig war, ohne dass die mitochondriale Membran beschädigt wurde. So konnten gezielte Untersuchungen der Aktivität einzelner Atmungskettenkomplexe mit Substraten, die nicht zellmembrangängig sind, durchgeführt werden. Nachdem sich der O_2 -Verbrauch auf eine konstante Rate eingestellt hatte, wurden nun Malat und Glutamat als Substrate für Komplex I in die Messkammer gegeben. Damit konnte die *state 2*-Atmung nach Chance, B. und Williams, G.R. [109] gemessen werden, die einer Ruheatmung der Mitochondrien bei fehlendem ADP entsprach. Durch Zugabe von ADP wurde nun die *state 3*-Atmung bestimmt, die dem maximalen O_2 -Verbrauch von gekoppelten Mitochondrien in Anwesenheit von Komplex I Substraten entsprach.

Anschließend wurde nach Gabe von Rotenon, als Inhibitor von Komplex I, Succinat als Substrat für Komplex II hinzugefügt, bis die Atmung nicht weiter anstieg. Diese *state 3*-Atmung entsprach der maximalen Aktivität der Komplexe II bis IV in gekoppelten Mitochondrien. Nach der Inhibierung von Komplex III durch Antimycin A wurde nun die Aktivität von Komplex IV untersucht. Durch Gabe von TMPD als Elektronendonator wurde Cytochrom-c komplett reduziert und die Cytochrom-C-Oxidase stimuliert. Zeitgleich wurde Ascorbat als Antioxidans hinzugefügt, um eine Regeneration von TMPD zu sichern. Im Verhältnis zur Cytochrom-C-Konzentration und der O_2 -Konzentration kam es nun zu einer entsprechenden Autooxidation von TMPD und Ascorbat. Zur Bestimmung der Cox-Kapazität musste nun zwischen Cytochrom-C-Oxidase Aktivität und Autooxidation von TMPD unterschieden werden. Um dies zu erreichen, wurde die Cox mit Natriumazid gehemmt und der Cox-unabhängige O_2 -Fluss subtrahiert.

2.2.5 Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um spezifische Genombereiche in ausreichender Menge zu vervielfältigen und sie dadurch einer Analyse zukommen zu lassen. Im vorliegenden Fall wurde die Methode der Real-Time PCR (qPCR) verwendet, um die mRNA-Menge zu definierten Zeitpunkten der Versuche zu quantifizieren. Dazu war es zunächst nötig, mRNA aus den zu untersuchenden PAGMZ zu isolieren, wie weiter unten beschrieben.

2.2.5.1 mRNA-Isolierung aus PAGMZ

Zur mRNA-Isolierung wurde das Qiagen RNeasy Mini Kit verwendet. Nach Trypsinierung der PAGMZ und zweimaligem Waschen mit PBS folgte die Lyse des Zellpellets mit 1 ml RLT-Lyse-Puffer (enthält 10µl Mercaptoethanol). Anschließend wurde das Zelllysats nach Anleitung des Mini Kits weiterverarbeitet und nun in eine mitgelieferte QIAGEN Shredder-Säule überführt, die in ein 2ml Auffangröhrchen gesteckt wurde. Nach dem Zentrifugieren des Lysats für 2 Minuten mit 14000 Umdrehungen pro Minute (rpm) wurde dem aufgefangenen Filtrat im Folgenden 1 ml Ethanol (70%) hinzugefügt und durch vorsichtiges Pipettieren gemischt. Anschließend wurde diese mRNA-Suspension in eine Silikagelsäule (RNeasy Säule) verbracht und anschließend für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die an der RNeasy Säule gebundene mRNA weiter verarbeitet. Durch das Hinzufügen von 700µl RW1-Puffers in die RNeasy-Säule und die Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 Sekunden wurde die Membran der Säule gewaschen. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen. Nun folgte eine Waschung mit 500 µl RPE-Puffer, der im Vorfeld laut Anleitung mit Ethanol verdünnt wurde. Für 15 Sekunden wurde bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen, um im nächsten Schritt auf die gleiche Weise zu verfahren, mit dem Unterschied, dass diesmal für 2 Minuten zentrifugiert wurde. Dadurch wurde die Membran getrocknet und vorhandene Ethanolreste entfernt. Um mögliche Reste von RPE-Puffer zu entfernen, wurde die RNeasy-Säule vorsichtig aus dem Auffangröhrchen genommen und in einem neuen Auffangröhrchen für 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde die mRNA in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und nach einminütiger Zentrifugation mit 10000 rpm in einem 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Durch ein weiteres Eluieren mit 50 µl Wasser wurde verbleibende mRNA von der Membran gelöst, und die mRNA-Menge konnte so erhöht werden. Die erhaltene mRNA wurde nun auf Eis gestellt und dann bei -20°C eingefroren.

2.2.5.2 mRNA-Isolierung aus Lungengewebe der Ratte:

Für die Isolierung von mRNA aus der Rattenlunge wurden bei -80°C gefrorene Lungenteile mit einem Mörser zerkleinert. Um das Gewebe weiter verarbeiten zu können, wurde es homogenisiert. Das geschah in einem 2 ml Gefäß mit Schraubgewinde, das neben den Lungenbestandteilen 600 µl RLT-Lyse-Puffer und 1,4 mm große Keramikkügelchen enthielt. Mit Hilfe eines Homogenisators (Precellys 24, Peqlab, Erlangen) wurde das Gewebe nun innerhalb von 30 Sekunden zerkleinert und anschließend für 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert (Microzentrifuge 200, Hettlich, Tuttlingen). Durch diesen Schritt wurden die festen Zellbestandteile von der löslichen mRNA getrennt. Nun konnte aus dem Überstand, wie schon oben beschrieben, mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits von Qiagen die mRNA isoliert werden.

Die Qualität und Konzentration der mRNA wurde mit Nano Drop (ND-1000, Kisker-Biotech, Steinfurt) gemessen.

2.2.5.3 cDNA-Synthese

Die vorliegende mRNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben. Jeweils 1 µg mRNA wurde mit Hilfe des iScript cDNA Synthesis Kits in cDNA umgewandelt. Hierbei wurden 4 µl Mastermix, 1 µl Reverse Transkriptase und je nach Konzentration die Menge an mRNA zusammen mit Wasser auf ein Zielvolumen von 20 µl gebracht. In einem Thermocycler T-personal (Biometra, Göttingen) fand die Reaktion bei einem Zyklus mit 25°C für 5 Minuten; einem Zyklus von 42°C für 30 Minuten und einem Zyklus bei 85°C für 5 Minuten statt. Das Endprodukt wurde mit Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt und für Real-Time PCR-Versuche verwendet.

2.2.5.4 Vorbereitung der quantitativen Real-Time PCR (qPCR)

Die nun vorliegende cDNA wurde anschließend mit destilliertem Wasser, iTaq SYBR Green Supermix mit ROX (Bio-Rad, Hercules, USA) und den entsprechenden Primern vermischt und mittels qPCR amplifiziert, sodass nach Primeranlagerung und Elongation doppelsträngige DNA (dsDNA) vorlag.

2.2.5.5 Quantitative Real-Time PCR

Bei den Versuchen wurde der Farbstoff SYBR Green I verwendet. SYBR Green I lagert sich in dsDNA ein und fluoresziert nach Anregung. Diese Fluoreszenz kann nun detektiert werden und verhält sich proportional zur Menge an dsDNA. Die Affinität des Farbstoffes zu dsDNA ist dabei höher als zu einzelsträngiger DNA (ssDNA) und RNA. Die Durchführung der Versuche erfolgte mit dem Gerät Mx3000P der Firma Stratagene. Die Real-time PCR-Reaktionsgefäße (Thermo-Fisher, Abgene, Hamburg) wurden nach Anleitung mit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München) befüllt. Die Mischung bestand aus 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix, 9,5 µl sterilem Wasser, je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (100 pmol/µl). Anschließend wurden noch je 2 µl cDNA (nach Verdünnung) hinzugegeben und das Reaktionsgefäß für eine Minute bei 300 x g zentrifugiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass keine Flüssigkeitstropfen an der Innenwand des Gefäßes haften blieben. Jeder Lauf enthielt einen Ansatz Mastermix ohne cDNA (*non-template-control*). Dadurch stand eine Negativ-Kontrolle zur Verfügung, die eventuelle Verunreinigungen anzeigen konnte. Bei einem Lauf wurde meist cDNA aus Kontroll-Zellen mit behandelten Zellen verglichen bzw. zwei unterschiedlich behandelte Zellreihen.

Folgendes Thermalprofil wurde für die Versuche verwendet:

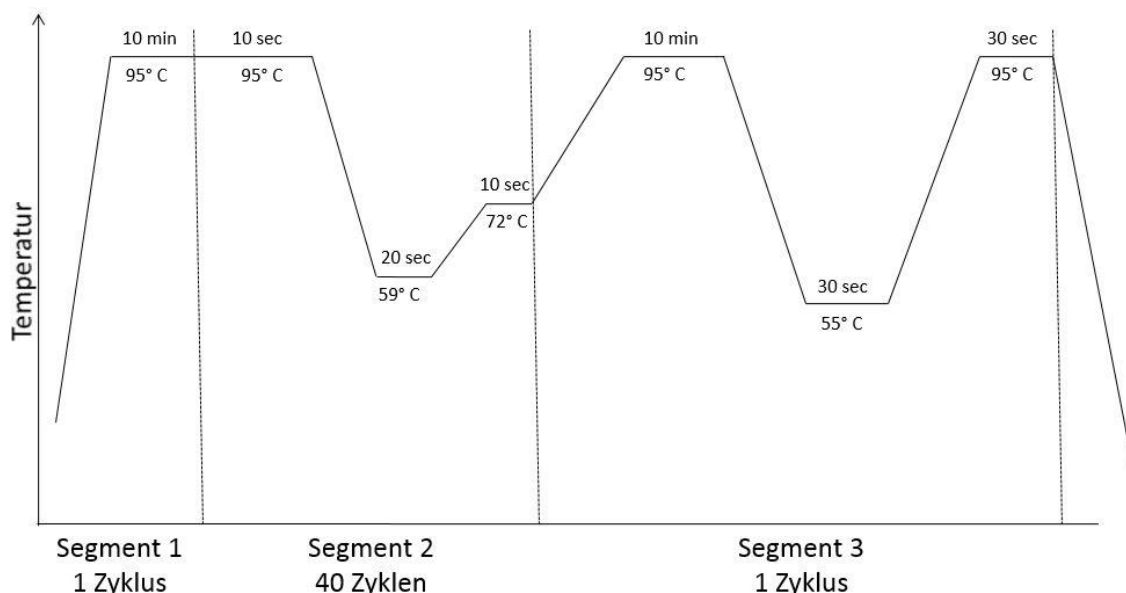


Abb. 4: Thermalprofil eines Experiments zur quantitativen Bestimmung von mRNA.

Im ersten Segment erfolgte eine Erhitzung der Reaktionsansätze, um eine Enzymaktivierung zu erreichen. Im Segment 2 folgte nun nach der Denaturierung die Anlagerung der Primer bei 59°C. Nach 20 Sekunden erhöhte sich die Temperatur auf 72°C, um mit der Elongation durch Anlagerung von Nukleotiden an die ssDNA fortzufahren. Anschließend wurden die Ansätze wieder bei 95°C denaturiert und das Segment 2 39 Mal wiederholt. Nach jedem Durchlauf des Zyklus in Segment 2 lagert sich in der Phase der Elongation der Farbstoff SYBR Green I an die dsDNA an und sorgt nach Anregung für Fluoreszenz. Mit jedem Zyklus nimmt die Menge an dsDNA zu und damit nimmt auch die Fluoreszenz zu. Nach Beendigung der 40 Zyklen schließt sich Segment 3 an mit einer Erhitzung der Ansätze auf 95°C für 10 Minuten und damit der Denaturierung. Als letzter Schritt folgte auf eine Abkühlung auf 55°C eine schrittweise Erhitzung auf 95°C. Hierbei schmilzt dsDNA zu ssDNA und setzt dabei SYBR Green Farbstoff frei und verliert dabei die Fluoreszenz. Spezifische dsDNA schmilzt aufgrund der Länge bei anderen Temperaturen als beispielsweise Primer-Dimere oder Verunreinigungen. Mittels einer sogenannten Dissoziationskurve konnte eine Differenzierung des gewünschten PCR-Produktes von Artefakten erfolgen.

Die Analyse der Schwellenwerte der Fluoreszenz erfolgte mit der mitgelieferten Software von Stratagene. Dabei ist der Ct (*cycle threshold*) -Wert die Anzahl an Elongations-Zyklen (im Segment 2) ab der die Fluoreszenz erstmals exponentiell den Hintergrundwert übersteigt. Mit Hilfe dieses Wertes kann nun ein Rückschluss auf die anfängliche Anzahl von cDNA (*templates*) gezogen werden. Um die Ct-Werte von behandelten und unbehandelten Zellen vergleichen zu können, wurde ein Referenz-Gen (*housekeeping-gene*) namens Beta2-Mikroglobulin (B2M) hinzugezogen, das unter verschiedensten Bedingungen über eine konstante Expression verfügt. Hierbei ist die Differenz zwischen Ct (B2M) und Ct (untersuchtes Gen) der Wert Delta Ct. Die weitere Analyse der Ct-Werte erfolgte mit der Software „Microsoft Excel“.

2.2.6 Western Blot

Um die Proteinexpression von Cox4i2 unter hypoxischen Bedingungen zu bestimmen, wurden PAGMZ untersucht, die über 48 Stunden mit 1% O₂, 5% CO₂, Rest N₂ inkubiert wurden. Diese wurden normoxisch inkubierten Kontroll-PAGMZ gegenübergestellt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit DPBS-Puffer vom Nährmedium gereinigt und anschließend mit RIPA-Puffer behandelt. Die Proteinkonzentration wurde nun wie unter 2.2.8 beschrieben bestimmt.

Als nächster Schritt erfolgte die Auftrennung der einzelnen Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit einem 15%-igen SDS Polyacrylamid-Gel. Die Probe wurde hierfür mit einem LDS-Ladepuffer 4-facher Konzentration und β -Mercaptoethanol vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 99° C wurde die Probe nun kurz zentrifugiert, um tertiäre und quartäre Strukturen aufzuschließen. Die Probe wurde nun auf das Gel aufgebracht und in Laufpuffer (Lämmli-Puffer; 25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS) mittels Elektrophorese (100 V, 400 mA, 150 W, 90 Minuten) aufgetrennt. Der Probe wurde zuvor ein Molekulargewichts-Marker hinzugefügt.

Anschließend erfolgte der Western Blot zur Detektion des Zielproteins Cox4i2 mit einem spezifischen Antikörper. Die aufgetrennten Proteine wurden hierfür durch einen vertikalen Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran mit Hilfe einer Semidry-Blot-Vorrichtung transferiert. Nach 75 Minuten (100 V, 115mA, 150 W) wurde die Membran eine Stunde lang in Tris gepufferter Kochsalzlösung mit Tween[®] 20 (TBST) gelöstem, 5%-igem Milchpuffer geblockt, um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Über Nacht wurde die Membran nun in Primärantikörper inkubiert und anschließend sorgfältig mit TBST (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20[®]) gewaschen. Im Folgenden wurde die Membran eine Stunde in Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend mit TBST gewaschen. Zur Entwicklung des Blots wurde die Membran für 5 Minuten mit dem Peroxidase-Substrat ECL Plus behandelt. Die Reaktion von ECL Plus und der Peroxidase an den Sekundärantikörpern führte nun zu einer Chemilumineszenz. Diese Chemilumineszenz der Membran wurde nun auf spezielle Filme übertragen und abschließend in einer Entwicklermaschine sichtbar gemacht. Nun wurde der Film maschinell eingelesen und mit einer Standard-Software quantifiziert. Die gemessene Bandendichte wurde schließlich in Bezug zu dem Referenzgen β -Aktin gesetzt.

2.2.7 CS-Assay

Das Enzym CS kommt nur in Mitochondrien vor. Daher kann von der quantitativen Analyse der Menge an CS in einer Zellsuspension auf die Menge an Mitochondrien geschlossen werden.

Für diesen Versuch wurden Proben von Kontrollzellen und in Hypoxie inkubierten Zellen verwendet, die jeweils direkt nach einem respirometrischen Versuch entnommen wurden. Nach der Entnahme wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C eingelagert.

Die Bestimmung der CS orientierte sich an der Methode von Srere, P.A. (1969) und Bergmeier, H.U. (1970). CS katalysiert die Reaktion von Acetyl-CoenzymA(CoA), Oxalacetat und Wasser zu Citrat und CoA-SH. CoA-SH und 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) werden wiederum durch die CS zu CoA-S-S-Trinitrobenzol(TNB) katalysiert. TNB zeichnet sich durch eine gelbe Farbe aus und hat sein Absorptionsmaximum bei 412 nm. Das Messprinzip beruht nun auf Differenzen in der Absorption, bedingt durch die Intensität des Farbumschlags der Probe. Die Differenz der Absorption verhält sich proportional zur Enzymaktivität bzw. zur Enzymmenge.

Im Rahmen der Versuchsvorbereitung wurde zuerst das Inkubationsmedium (IM) hergestellt. Es setzt sich zusammen aus 800 µl destilliertem Wasser (aus Millipore-Anlage), 100 µl 0,1mM DTNB, 25 µl 10% Triton X-100, 50 µl Oxalacetat und 25 µl Acetyl-CoA. In einer Glasküvette wurden 50 µl IM mit 170 µl aqua dest. verdünnt und mit einem Plastikstäbchen durchmischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 30 µl der Zellproben hinzugefügt und die Absorption bei 412 nm über ca. 200 Sekunden mit Hilfe eines Mikroplattenlesegeräts gemessen. Die Messung wurde im Anschluss zwei Mal wiederholt um einen Mittelwert der Absorption bilden zu können. Die Aktivität der CS pro mg wurde anhand von Leerkontrollen und CS-Standardkontrollen aufsteigender Konzentrationen bestimmt. Hierbei wurde CS mit ≥ 200 IU/ mg in einer 1:500 Verdünnung in 0,1 M Tris-HCl Puffer bei pH 7,0 verwendet.

2.2.8 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde das DC (*detergent compatible*) Protein Assay von der Firma Biorad verwendet. Gemessen wurden die gleichen Proben, die auch für die CS-Bestimmung verwendet wurden. Zuerst erfolgte eine 1:10 Verdünnung des Probenmaterials. Anschließend wurde 1ml ReagenzA und 20 µl ReagenzS zu ReagenzA' vermischt. Je Reaktion wurde verwendet: 25 µl A', 5 µl Probe, 200 µl Reagenz B. Die Absorption der Ansätze wurde mit einem Mikroplattenlesegerät bei 750nm bestimmt und mit Hilfe des Computerprogramms „Gen5™“ berechnet.

Das Prinzip der quantitativen Proteinbestimmung basiert auf der Methode von Lowry, O.H.. Der erste Teil der Proteinbestimmung bestand aus der Biuret-Reaktion, bei der in alkalischer Lösung die Peptidbindungen mit Kupfer(II)-Ionen Komplexe bilden und es zur Ausbildung einer blau-violetten Farbe kam. Anschließend reduzierte das Kupfer(II) zu Kupfer(I). Kupfer(I) reduzierte wiederum die gelbe Folin-Lösung, die in Substanz B enthalten war, zu blauer Molybdän-Lösung. Die Intensität der Blaufärbung war proportional zur Proteinmenge, die nun photometrisch bestimmt werden konnte.

2.2.9 Auswertung

Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des *student's t-test* bei dem Vergleich von 2 Gruppen. Bei >2 Gruppen wurde die ANOVA-Varianzanalyse verwendet. Zur post hoc Analyse wurde der Bonferronitest benutzt. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism 5“.

Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Atmungskettenaktivität der PAGMZ

In Abb. 5 dargestellt ist der Ablauf einer repräsentativen Messung der mitochondrialen Atmung in PAGMZ. Nach Zugabe verschiedener mitochondrialer Inhibitoren sah man eine Veränderung der Abnahme der O_2 -Konzentration in der Kammer (blaue Linie) und des O_2 -Verbrauchs (rote Linie, berechnet als 1. Ableitung der O_2 -Konzentration). Zunächst wurde der O_2 -Verbrauch ohne Zugabe von Substanzen, Routineatmung J_R , bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Oligomycin (O), das als Inhibitor der ATP-Synthase wirkte. Durch diese Substanz reduzierte sich der O_2 -Verbrauch, da sich der Protonengradient nicht mehr durch die ATP-Synthase abbauen ließ und folglich den Elektronenfluss inhibierte. Die darunter gemessene Respiration J_L geht hierbei auf Protonen zurück, die unabhängig von der ATP-Synthase die innere Mitochondrienmembran Richtung mitochondriale Matrix durchdringen, daher auch der Begriff „*leak*-Respiration“. Nach Zugabe von FCCP, einem mitochondrialen Entkoppler, der den Protonengradient aufhebt, stieg der O_2 -Verbrauch mit jeder weiteren Gabe bis zu einem Maximalwert der entkoppelten Respiration, J_E . Durch die Zugabe der mitochondrialen Inhibitoren Rotenon (R), einem Inhibitor von Komplex I, und Antimycin A (An), einem Inhibitor von Komplex III, sank der O_2 -Verbrauch und spiegelte den atmungskettenunabhängigen O_2 -Verbrauch wider. Auf die Darstellung des Sauerstoffverbrauchs nach Gabe von Rotenon und Antimycin wird nachfolgend verzichtet, da dieser bei sämtlichen Versuchen keinen Unterschied zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen zeigte.

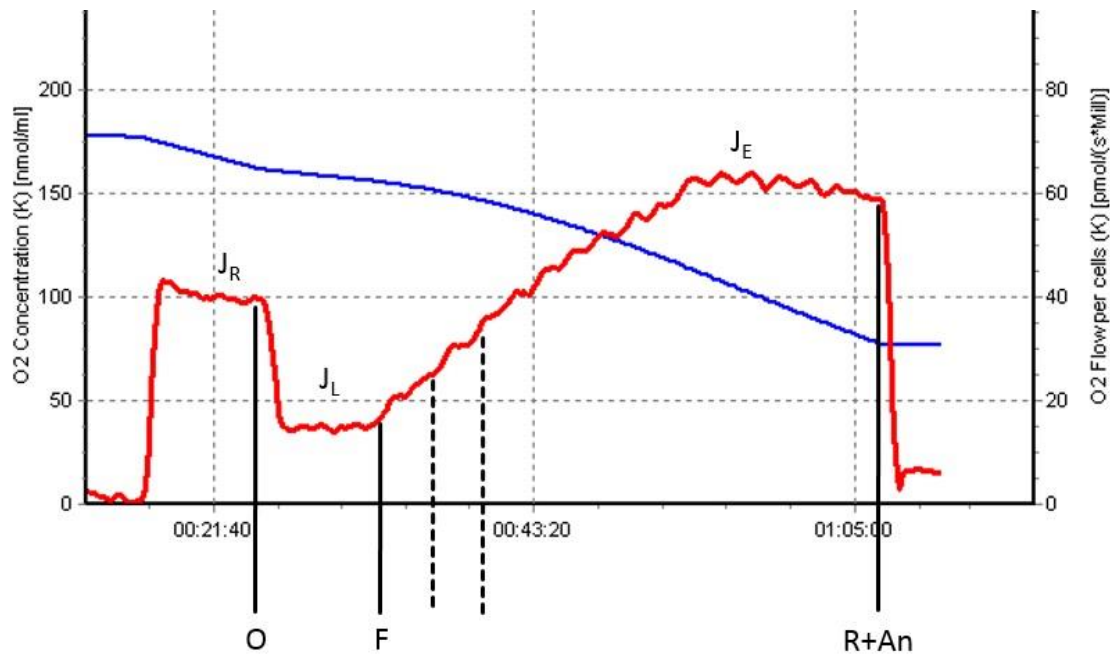


Abb. 5: Darstellung eines Originalversuches. J_R = Routineatmung, J_L = *leak*-atmung und J_E = entkoppelte Atmung. Die schwarzen, durchgängigen Linien stehen für den Zeitpunkt der Substanztitrationen. Die beiden gestrichelten schwarzen Linien stehen beispielhaft für die ersten zwei Wiederholungen einer alle zwei Minuten wiederholten FCCP-Titration bis zum Erreichen der maximal entkoppelten Respiration (J_E).

O= Oligomycin, F= FCCP, R= Rotenon, An= Antimycin A.

x-Achse: Zeit in Stunden (hh:mm:ss).

y-Achse: links: O_2 -Konzentration; rechts: O_2 -Verbrauch.

3.1.1 Endogene Atmung und maximale Atmungskettenkapazität

In den folgenden Versuchen wurden die Routineatmung (J_R) und die entkoppelte Atmung (J_E) von unterschiedlichen Gruppen hypoxisch inkubierter Zellen mit einer Gruppe normoxisch inkubierter Kontrollzellen verglichen. Hierbei zeigte sich in der Gruppe der 48 h bei 1% O_2 inkubierten Zellen (HOX1/48) eine signifikante Reduktion von J_R und J_E gegenüber den normoxisch inkubierten Zellen (NOX) (Abb. 6). Die Routineatmung der Zellen nach 24 h Inkubation in 1% O_2 (HOX1/24) war tendenziell reduziert, erreichte aber keine signifikante Änderung. J_E hingegen war signifikant verringert.

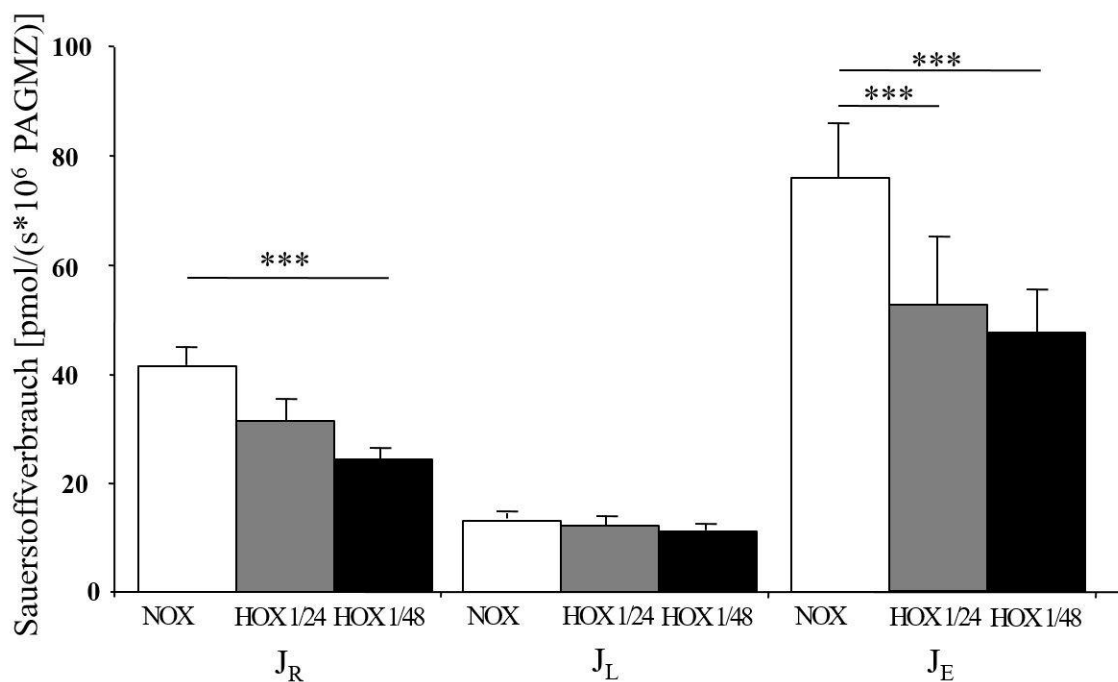


Abb. 6: Routineatmung (J_R), leak-Atmung (J_L) und entkoppelte Atmung (J_E) in 1% O_2 -inkubierten Zellen.

*** $p < 0,001$

NOX: $n=33$; HOX1/24: $n=11$; HOX1/48: $n=29$.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Es liegen unterschiedliche n-Werte vor, obwohl zwei Versuche jeweils parallel abgelaufen sind. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen und anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden.

Bei Zellen, die bei 7% O₂ für 24 Stunden (HOX7/24) kultiviert worden waren, zeigte sich keine Veränderung der einzelnen Atmungsparameter im Vergleich zu den Kontrollzellen. Bei der Gruppe der für 48 Stunden bei 7% O₂ inkubierten Zellen (HOX7/48) war J_E signifikant niedriger im Vergleich zu den normoxisch inkubierten Kontrollzellen (siehe Abb.7).

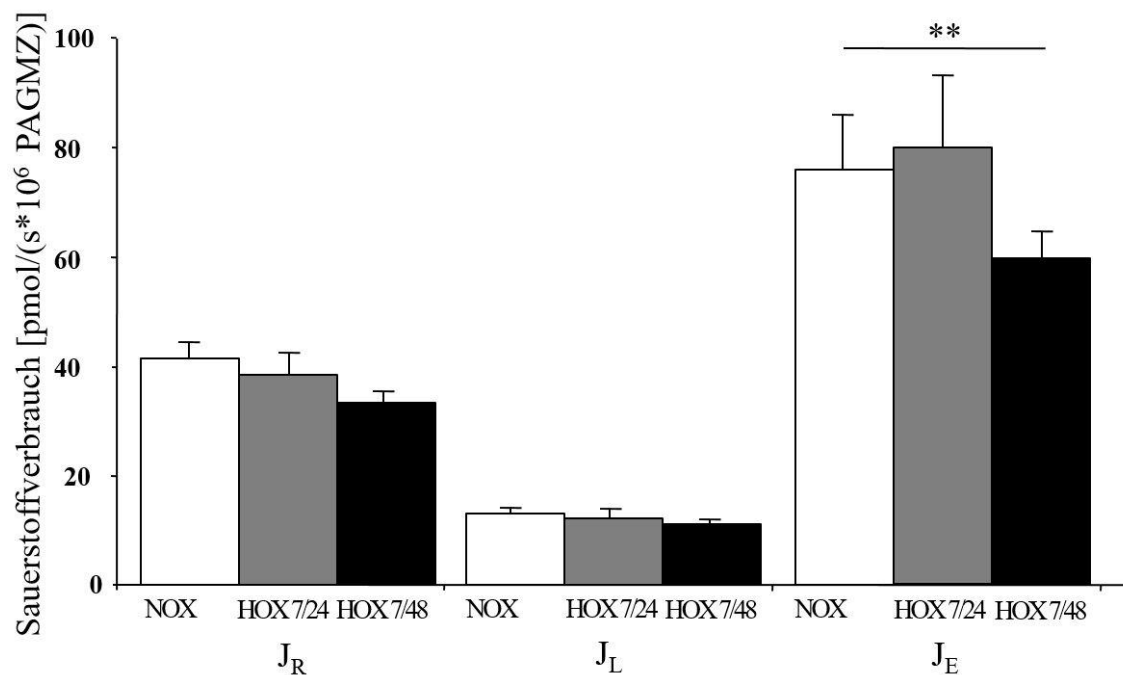


Abb. 7: Routineatmung (J_R), *leak*-Atmung (J_L) und entkoppelte Atmung (J_E) in 7% O₂-inkubierten Zellen.

** p<0,01

NOX: n=33; HOX7/24: n=8; HOX7/48: n=9 (unabhängige Versuche).

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Bei beiden Gruppen, HOX1/24 und HOX1/48, war das Verhältnis zwischen Routineatmung zur entkoppelten Atmung (R/E) nicht verändert. Ebenso waren das Verhältnis zwischen Oligomycin-inhibierter Atmung J_L und entkoppelter Atmung J_E (L/E) und die Netto-Atmung ($(J_R - J_L)/J_E$), die den aktivierten Anteil der Atmungskette für die ATP-Produktion anzeigt, auf dem gleichen Niveau der Kontrollgruppe (siehe Abb.8).

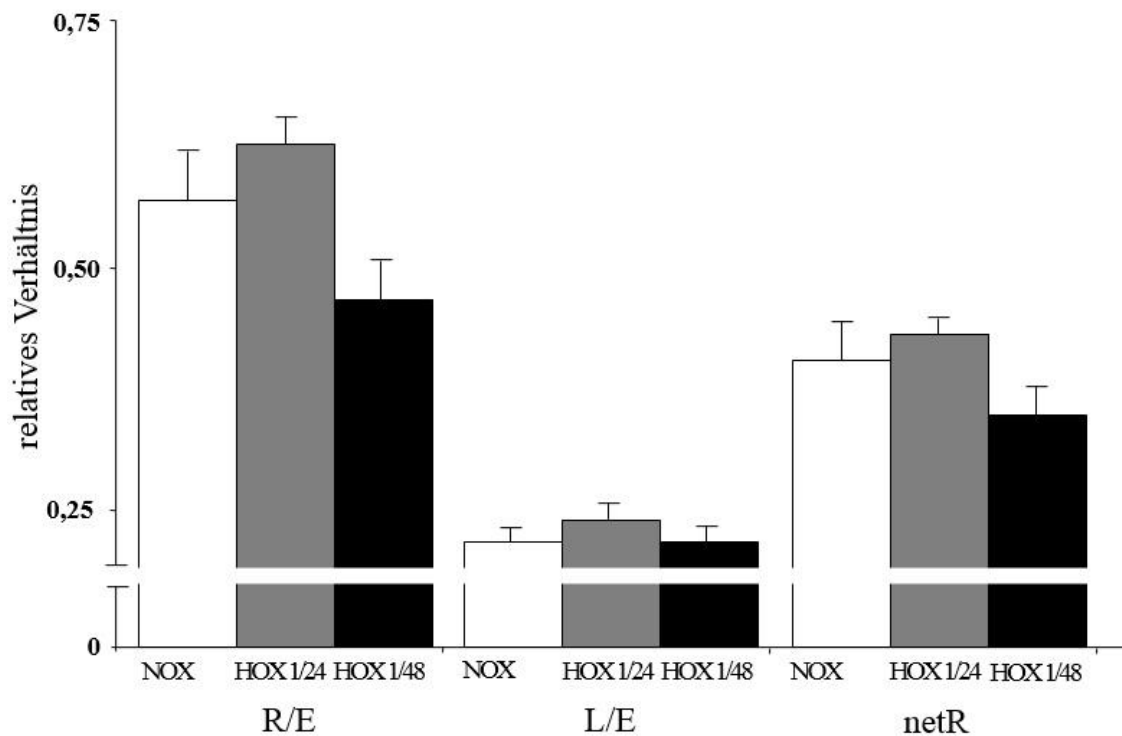


Abb. 8: Verhältnis zwischen Routineatmung zu entkoppelter Atmung (R/E); *leak*-Atmung zu entkoppelter Atmung (L/E); Netto-Routine Atmung (netR) errechnet aus der Differenz von Routineatmung und *leak*-Atmung geteilt durch entkoppelte Atmung; jeweils in 1% O₂-inkubierte Zellen.

NOX: n=33; HOX1/24: n=11; HOX1/48: n=29.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Die Daten stammen aus den Versuchen von Abb. 6.

Die Verhältnisse R/E und L/E, sowie die Netto-Routine-Atmung (netR) waren in den Gruppen HOX7/24 und HOX7/48 statistisch nicht von denen der Kontrollgruppe zu unterscheiden (siehe Abb. 9).

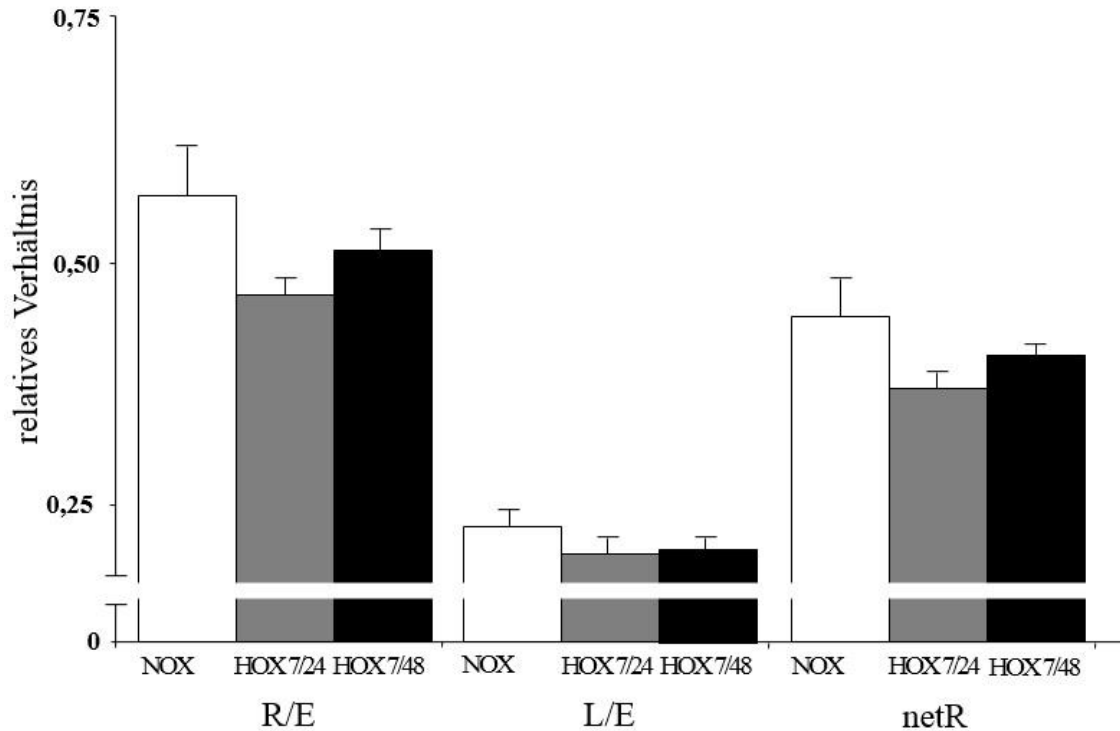


Abb. 9: Verhältnis zwischen Routineatmung zu entkoppelter Atmung (R/E); leak-Atmung zu entkoppelter Atmung (L/E); Netto-Routine Atmung (netR) errechnet aus der Differenz von Routineatmung und leak-Atmung geteilt durch entkoppelte Atmung; jeweils in 7% O₂-inkubierte Zellen.

NOX: n=33; HOX7/24: n=8; HOX7/48: n=9.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Die Daten stammen aus den Versuchen von Abb. 7.

3.1.2 Respiration einzelner Enzymkomplexe der Atmungskette

In Abb. 10 dargestellt ist der Ablauf einer repräsentativen Messung zur Bestimmung der substratabhängigen Atmungskettenaktivität und Aktivität einzelner Atmungskettenkomplexe in permeabilisierten PAGMZ. Die PAGMZ wurden durch Digitonin (D) permeabilisiert, wodurch die intrazellulären Substratkonzentrationen abfielen und der O₂-Verbrauch (=mitochondriale Atmung) sank. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden durch Gabe von spezifischen Substraten und Inhibitoren die einzelnen Enzyme der Atmungskette untersucht. Nach der Gabe von Digitonin (D) wurde Glutamat (G) und Malat (M) als Substrat für Komplex I der Atmungskette (CPX I) in die Messkammer injiziert und der resultierende O₂-Verbrauch aufgezeichnet. Diese Respiration ist eine *state 2*-Respiration nach Chance, B. und Williams, G.R. [109] und beschreibt den *in-vitro*-O₂-Verbrauch isolierter Mitochondrien bzw. permeabilisierter Zellen unter der Voraussetzung, dass ein Substrat der Atmungskette vorhanden ist bei gleichzeitigem Fehlen von ADP oder Inhibitoren. Im Folgenden wird diese Respiration als Glutamat-Malat-*leak* (GM_L) bezeichnet, da der Protonengradient in diesem Zustand nur durch einen *leak* in der inneren Mitochondrienmembran abgebaut werden kann.

Für den Übergang zur *state 3*-Atmung nach Chance, B. und Williams, G.R. wurde ADP in die Messkammer hinzugefügt. Dadurch bestand nun die Möglichkeit, mittels der ATP-Synthase ein energiereiches Phosphat auf ADP zu übertragen und ATP herzustellen. Durch den Abbau des Protonengradienten an der ATP-Synthase beschleunigte sich der Elektronentransport in der Atmungskette und der O₂-Verbrauch stieg an. Diese Atmung wird in der vorliegenden Arbeit als Glutamat-Malat-Phosphat (GM_P) bezeichnet. Sowohl bei GM_L als auch bei GM_P speist nur CPX I über NADH Elektronen in die Elektronentransportkette ein. GM_P entsprach dabei dem mitochondrialen O₂-Verbrauch, der durch den Elektronenfluss durch die Atmungskettenkomplexe I bis IV mit Ausnahme von Komplex II (CPX II) verursacht wird. Nachdem der O₂-Verbrauch ein Maximum erreichte, wurde der CPX I-Inhibitor Rotenon hinzugefügt. Als nächster Schritt wurde Succinat als Substrat für CPX II bereitgestellt. Dabei wurde wiederholt Succinat hinzugegeben, bis sich der O₂-Verbrauch nicht weiter erhöhte. Der als S(Rot) bezeichnete O₂-Verbrauch entspricht dabei der *state 3*-Atmung, die durch den Elektronenfluss durch die Atmungskettenkomplex II bis IV mit Ausnahme des inhibierten Komplex I verursacht

wird. Durch die Gabe von Antimycin A (An) wird der Elektronentransport von Komplex III (CPX III) verhindert.

So besteht die Möglichkeit, den O₂-Verbrauch von Komplex IV (CPX IV) zu messen. Dies geschieht durch die Zugabe von Ascorbat (As) und TMPD (T). TMPD übernimmt dabei die Aufgabe als künstlicher Elektronendonator für Cytochrom-c und Ascorbat regeneriert das oxidierte TMPD. Der O₂-Verbrauch wird dabei nicht alleine durch CPX IV verursacht, sondern auch durch die Autooxidation von TMPD. Um den CPX IV-spezifischen O₂-Verbrauch zu bestimmen, wurde daher Natriumazid, als Inhibitor von CPX IV, hinzugefügt und der verbleibende O₂-Verbrauch vom Verbrauch nach Ascorbat und TMPD-Gabe subtrahiert.

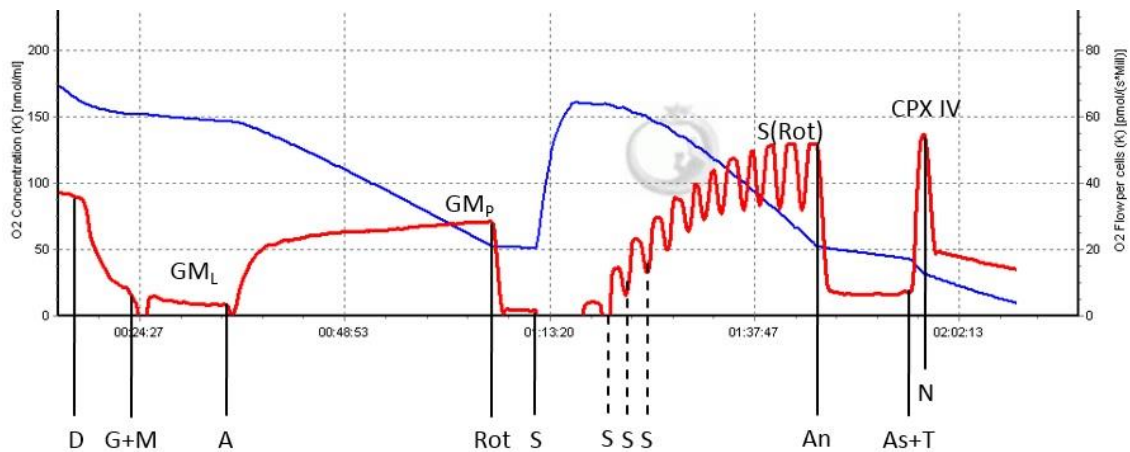


Abb. 10: Darstellung eines Originalversuches. Die schwarzen, durchgängigen Linien stehen für den Zeitpunkt der Substanztitrationen. Die drei gestrichelten schwarzen Linien stehen beispielhaft für eine wiederholte manuelle Titration bis zur maximalen Respiration.

D= Digitonin, G= Glutamat, M= Malat, A= ADP, Rot= Rotenon, S= Succinat, An= Antimycin A, As= Ascorbat, T= TMPD, N= Natriumazid.

x-Achse: Zeit in Stunden (hh:mm:ss).

y-Achse: links: O₂-Konzentration; rechts: O₂-Verbrauch.

GM_L war wie auch GM_P im Vergleich von Kontrollzellen zu hypoxisch inkubierten Zellen der Gruppen HOX1/24 und HOX1/48 nicht verändert. Die Respiration S(Rot) war in der Gruppe HOX1/24 tendentiell verringert. Die Komplex IV Aktivität (CPX IV) zeigte in der Gruppe HOX1/24 einen reduzierten und bei HOX1/48 einen signifikant reduzierten O₂-Verbrauch.

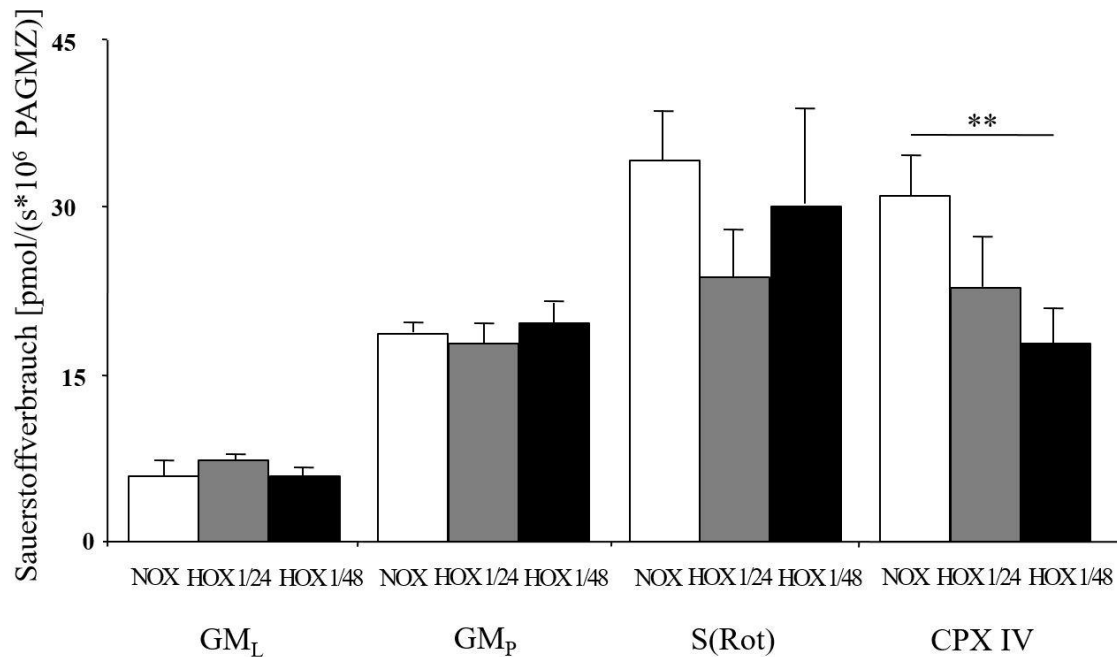


Abb. 11: GM_L und GM_P sowie Respiration S(Rot) und Komplex IV Aktivität der Gruppen NOX, HOX1/24 und HOX1/48.

** p<0,01

NOX: n=20; HOX1/24: n=6; HOX1/48: n=6.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Es liegen unterschiedliche n-Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden.

3.1.3 O₂-Affinität

Die O₂-Affinität wurde in Kontrollzellen aus normoxischer Umgebung (NOX) und PAGMZ, die definierte Zeiträume in einer hypoxischen Umgebung kultiviert worden waren, verglichen. Hierbei liegt eine herabgesetzte O₂-Affinität vor, wenn der pO₂, bei dem der halbmaximale O₂-Verbrauch erreicht ist, steigt. Die verschiedenen Vergleichsgruppen wurden bei 1% O₂ über 24 Stunden (HOX1/24) oder bei 1% O₂ über 48 Stunden inkubiert (HOX1/48). Hierbei konnte im Vergleich zu Kontrollzellen eine signifikante Verringerung der O₂-Affinität bei der HOX1/48-Gruppe nachgewiesen werden, wie in Abb. 12 veranschaulicht. In der Gruppe HOX1/24 konnte keine signifikante Änderung der Affinität nachgewiesen werden.

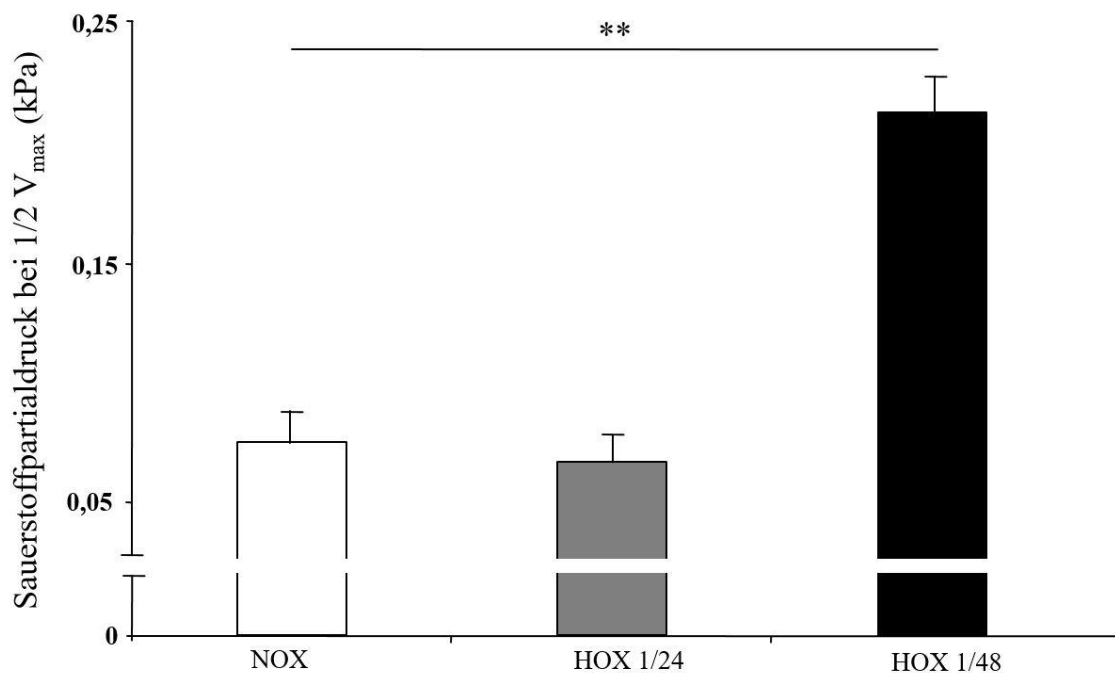


Abb. 12: O₂-Affinität der Atmungskette im Vergleich zwischen Kontrollzellen und Hypoxie-inkubierten PAGMZ.

*** p<0,001

NOX: n=18; HOX1/24: n=5; HOX1/48: n=3.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Es liegen unterschiedliche n-Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden. Darstellung der Daten als pO₂ bei halbmaximalem O₂-Verbrauch (V_{max}) in kPa.

Im Vergleich mit normoxisch inkubierten Kontrollzellen (NOX) wurde die O₂-Affinität in der Gruppe mit 7% O₂-inkubierten Zellen weder nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden noch nach einer von 48 Stunden signifikant beeinflusst (siehe Abb. 13).

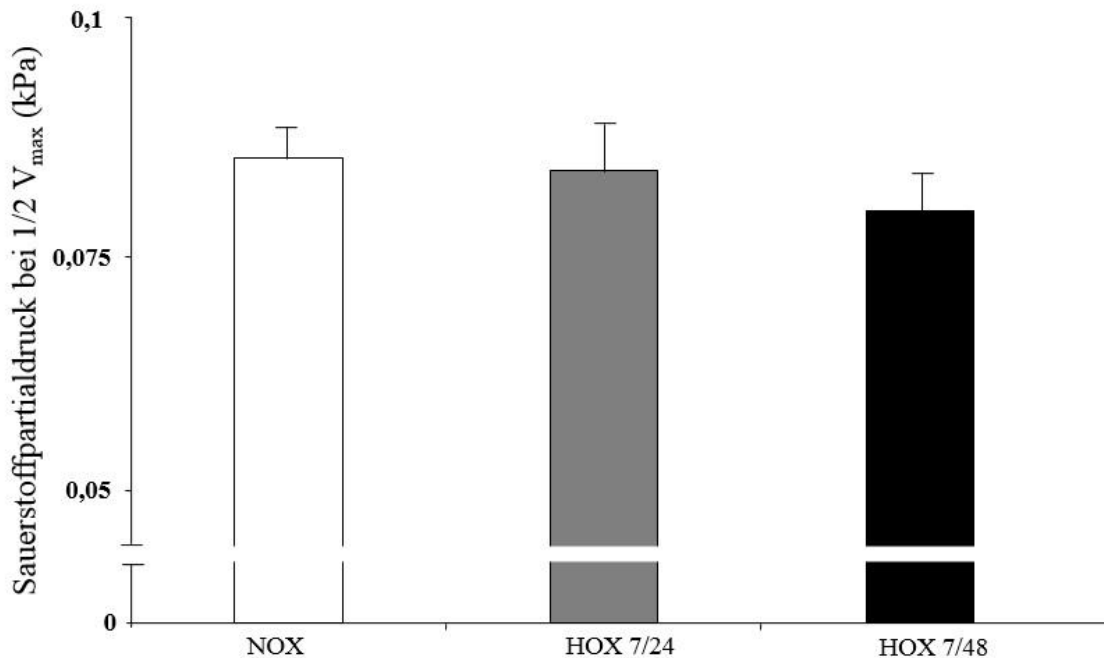


Abb. 13: O₂-Affinität der Atmungskette im Vergleich zwischen Kontrollzellen und Hypoxie-inkubierten PAGMZ.

NOX: n=18; HOX7/24: n=4; HOX7/48: n=5.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Es liegen unterschiedliche n-Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden. Darstellung der Daten als pO₂ bei halbmaximalem O₂-Verbrauch (V_{max}) in kPa.

3.2 Der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Regulation verschiedener mitochondrialer, glycolytischer und antioxidativer Proteine auf mRNA Ebene

3.2.1 Der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Transkription verschiedener Gene in isolierten PAGMZ

3.2.1.1 Der Einfluss von hypoxischer Inkubation in 1% O₂

Um eine zeitabhängige Regulation verschiedener potentiell Hypoxie-sensitiver Proteine zu untersuchen, wurde die Menge der jeweiligen mRNA in den Zellen nach 12, 24 und 48 Stunden Inkubation in 1%-iger O₂-Atmosphäre gemessen.

Es wurden das NDUFS1 und das NDUFS2 Gen, die für Komplex I kodieren, sowie SDHa und SDHd, die für Komplex II kodieren, untersucht. Cytbc1, das für Teile des Komplex III kodiert, und mehrere Untereinheiten von Komplex IV sind ebenfalls analysiert worden.

Wie in Abb. 14 illustriert, waren folgende Enzyme der Atmungskette signifikant reguliert:

In der Gruppe HOX1/12 waren Cox4i1 und Cox5b vermindert exprimiert. Die Gruppe HOX1/24 hatte nur Cox4i2 als hochreguliertes Gen vorzuweisen. SDHd, Cox4i1, Cox4i2 und Cox8b zeigten in Gruppe HOX1/48 eine vermehrt mRNA-Menge. Dabei ist vor allem Cox4i2 als hochsignifikant hervorzuheben.

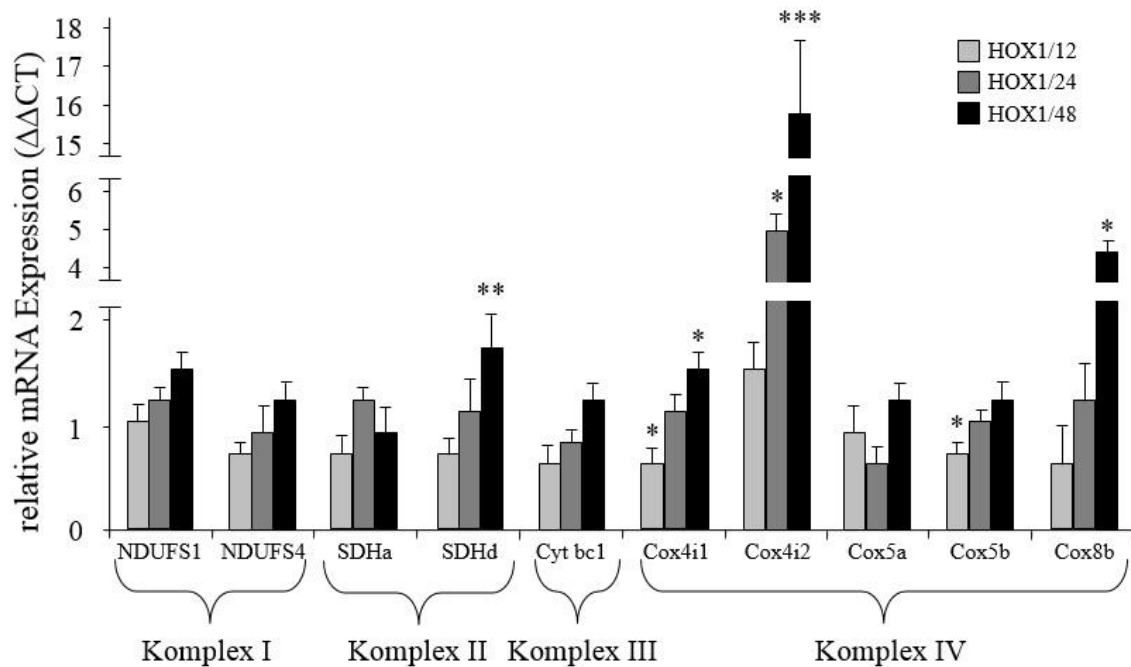


Abb.14: Hypoxie-induzierte Genregulation: Proteine der Atmungskette bei HOX1/12, HOX1/24 und HOX1/48.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

NOX: $n=4$; HOX1/12: $n=3$; HOX1/24: $n=3$; HOX1/48: $n=5$.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Der Wert 1 auf der Y-Achse entspricht der mRNA Expression der Kontrollzellen.

Es liegen unterschiedliche n-Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden. Die Daten sind dargestellt als relative mRNA-Expression bezogen auf die Werte von normoxisch inkubierten Zellen nach Korrektur gegen das *housekeeping* Gen (B2M). NDUFS= NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein; SDH= Succinatdehydrogenase; Cyt bc 1= Cytochrom bc 1 Komplex; Cox= Cytochrom-c-Oxidase.

Von den Proteinen der intrazellulären Stoffwechselregulation war die mRNA von LDHa, dem Schlüsselenzym der anaeroben Glycolyse, und PDK1, als Inhibitor der mitochondrialen Glucoseoxidation, in allen drei hypoxischen Gruppen signifikant hochreguliert. Die mRNA des Glucosetransportproteins GLUT1 war bei HOX1/24 und HOX1/48 signifikant erhöht. Geringer exprimiert als in der normoxischen Kontrollgruppe war PDK2 in Gruppe HOX1/48 (siehe Abb.15). AMPK als Sensorprotein für einen ATP-Mangel war in keiner Gruppe reguliert.

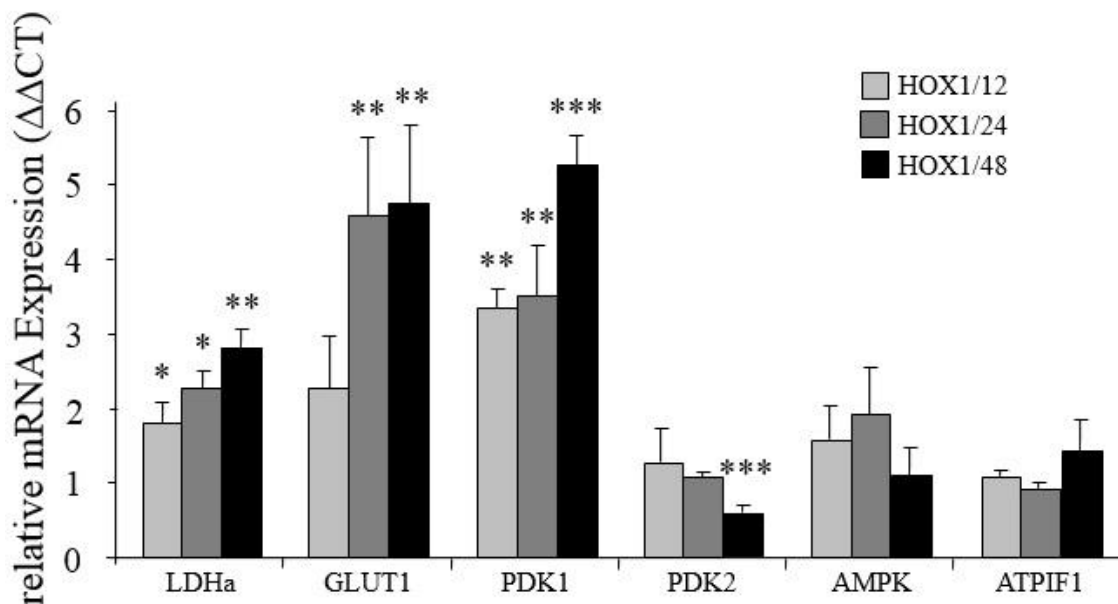


Abb.15: Hypoxie-induzierte Genregulation: Proteine der Regulation des Zellstoffwechsels bei HOX1/12, HOX1/24 und HOX1/48.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

NOX: $n=4$; HOX1/12: $n=3$; HOX1/24: $n=3$; HOX1/48: $n=5$.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Der Wert 1 auf der Y-Achse entspricht der mRNA Expression der Kontrollzellen.

Es liegen unterschiedliche n -Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden. Die Daten sind dargestellt als relative mRNA-Expression bezogen auf die Werte von normoxisch inkubierten Zellen nach Korrektur gegen das *housekeeping* Gen (B2M). LDH= Lactatdehydrogenase; GLUT1= Glucose Transporter; PDK1= Pyruvatdehydrogenase-Kinase; AMPK= AMP-activated protein kinase; ATP1F= ATPase inhibitory factor 1.

Wie in Abb. 16 dargestellt, war die mRNA des antioxidativen, mitochondrialen Proteins SOD2 in Gruppe HOX1/48 erhöht. Die Regulation des Apoptose-Steuerungsproteins p66SHC, das zur erhöhten ROS-Produktion an der Atmungskette führt, verhielt sich gegenläufig, wobei die Gentranskription in der Gruppe HOX1/24 hoch- und in HOX1/48 herunter reguliert war. Das im Zytoplasma ansässige antioxidative Protein SOD1 war nicht reguliert.

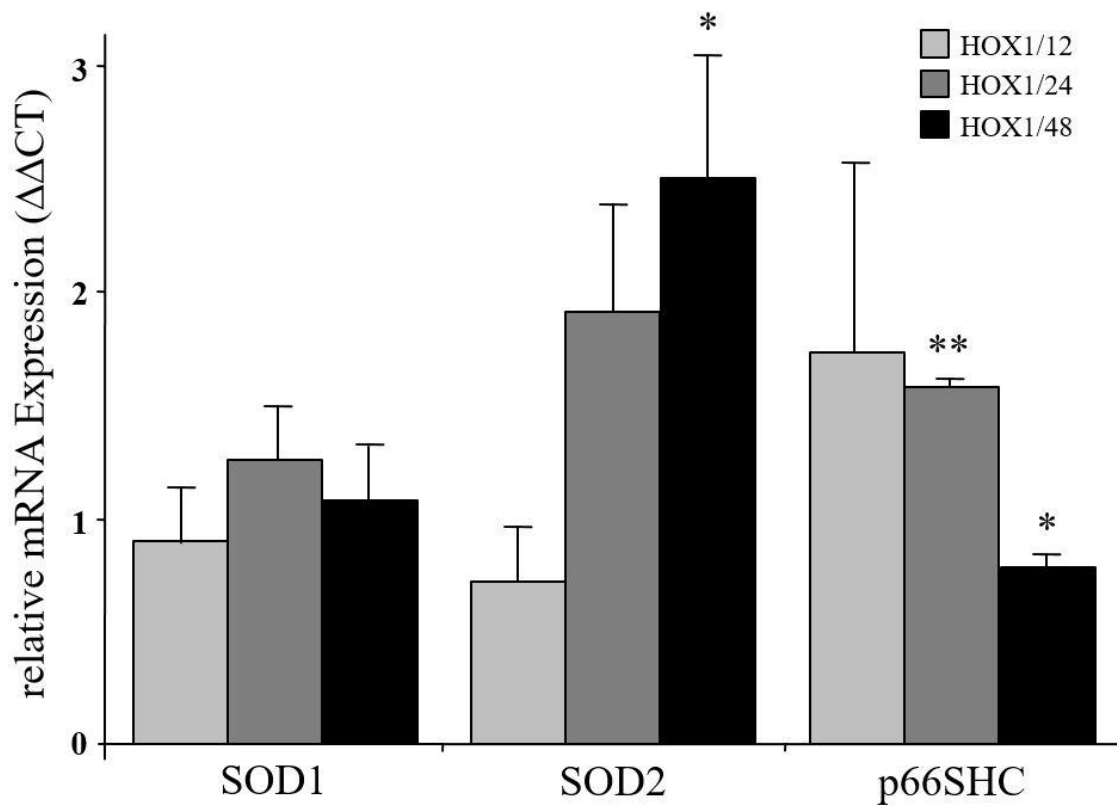


Abb.16: Hypoxie-induzierte Genregulation: Proteine des mitochondrialen ROS-Stoffwechsels bei HOX1/12, HOX1/24 und HOX1/48.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

NOX: $n=4$; HOX1/12: $n=3$; HOX1/24: $n=3$; HOX1/48: $n=5$.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Der Wert 1 auf der Y-Achse entspricht der mRNA Expression der Kontrollzellen.

Es liegen unterschiedliche n -Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden. Die Daten sind dargestellt als relative mRNA-Expression bezogen auf die Werte von normoxisch inkubierten Zellen nach Korrektur gegen das *housekeeping* Gen (B2M). SOD= O_2^- -Dismutase; p66SHC= p66 SH2 containing proto-oncogene.

3.2.1.2 Der Einfluss von hypoxischer Inkubation in 7% O₂

In den Gruppen HOX7/24 und HOX7/48 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Regulation potentiell Hypoxie-sensitiver Gene festgestellt werden. Allerdings waren in der Gruppe HOX7/12 NDUFS 1, LDHa, GLUT1 und p66 SHC signifikant erhöht. Cox8b war in derselben Gruppe geringer exprimiert (siehe Abb. 17).

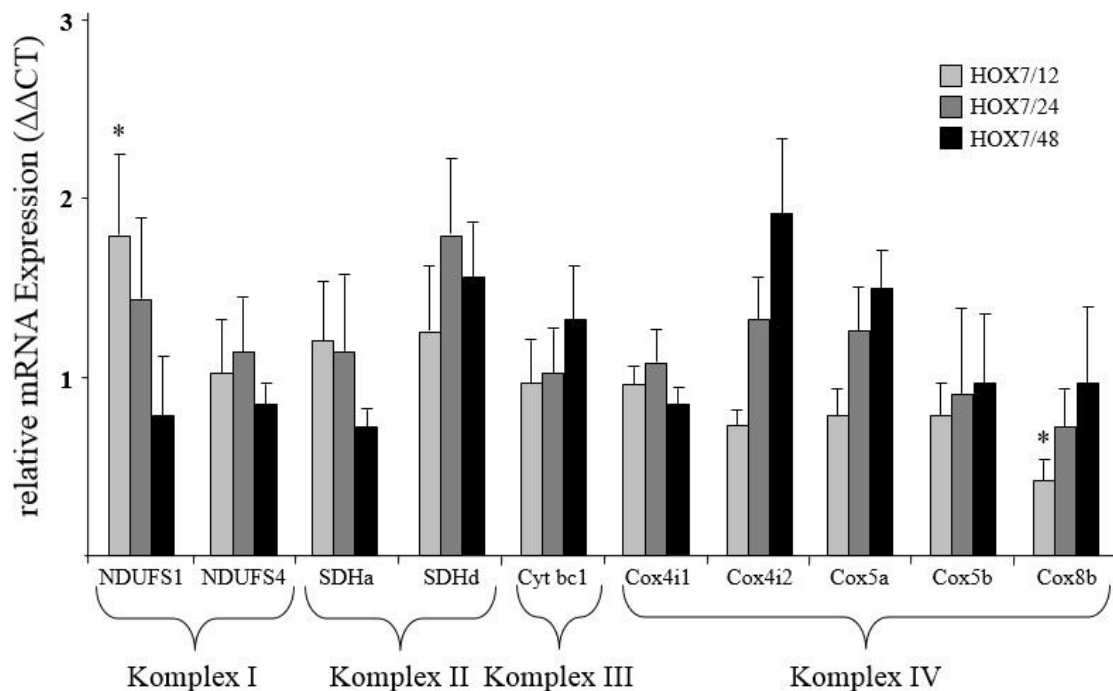


Abb.17: Hypoxie-induzierte Genregulation: Proteine der Atmungskette bei HOX7/12, HOX7/24 und HOX7/48.

* $p < 0,05$.

NOX: n=4; HOX1/12: n=3; HOX1/24: n=4; HOX1/48: n=5.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Der Wert 1 auf der Y-Achse entspricht der mRNA Expression der Kontrollzellen.

Es liegen unterschiedliche n-Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden. Die Daten sind dargestellt als relative mRNA-Expression bezogen auf die Werte von normoxisch inkubierten Zellen nach Korrektur gegen das *housekeeping* Gen (B2M). NDUFS= NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein; SDH= Succinatdehydrogenase; Cyt bc 1= Cytochrom bc 1 Komplex; Cox= Cytochrom-c-Oxidase.

Die mRNA von LDHa und die mRNA des Glucosetransportproteins GLUT 1 waren nach 12-stündiger hypoxischer Inkubation mit 7% O₂ signifikant erhöht (siehe Abb. 18). Die restlichen Proteine wiesen keine signifikante Änderung in der Genexpression auf.

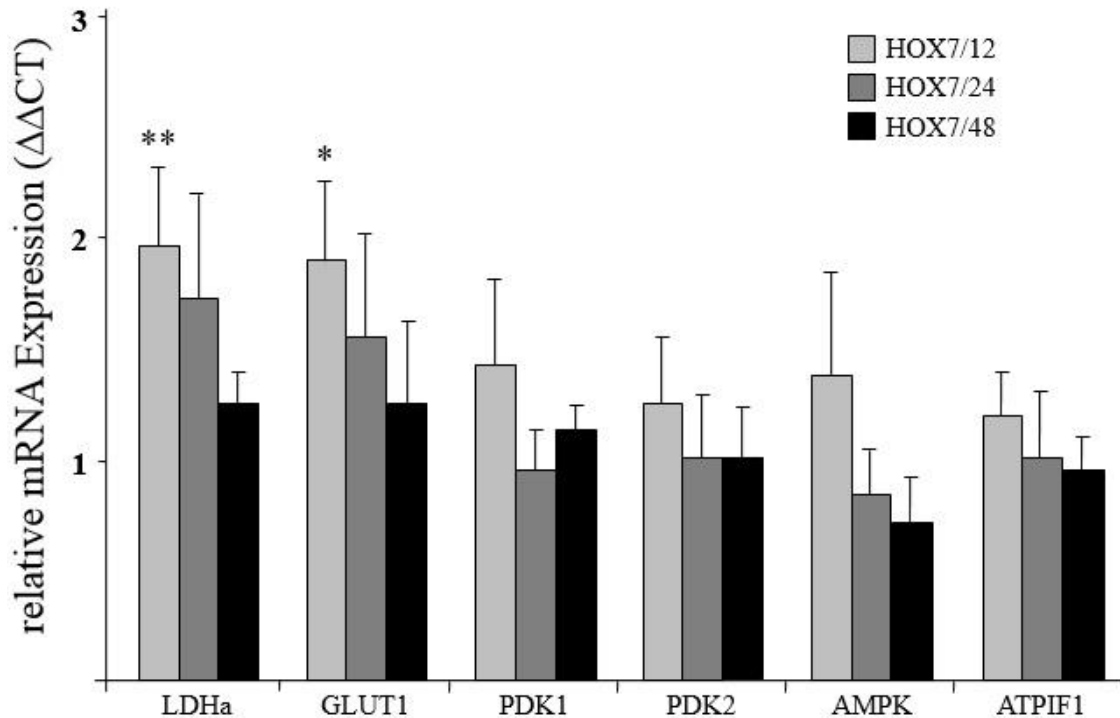


Abb.18: Hypoxie-induzierte Genregulation: Proteine der Regulation des Zellstoffwechsels bei HOX7/12, HOX7/24 und HOX7/48.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

NOX: $n=4$; HOX1/12: $n=3$; HOX1/24: $n=4$; HOX1/48: $n=5$.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Der Wert 1 auf der Y-Achse entspricht der mRNA Expression der Kontrollzellen.

Es liegen unterschiedliche n -Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden. Die Daten sind dargestellt als relative mRNA-Expression bezogen auf die Werte von normoxisch inkubierten Zellen nach Korrektur gegen das *housekeeping* Gen (B2M).

LDH= Lactatdehydrogenase; GLUT1= Glucose Transporter; PDK1= Pyruvatdehydrogenase-Kinase; AMPK= AMP-activated protein kinase; ATP1F= ATPase inhibitory factor 1.

Lediglich die mRNA des Apoptose-Steuerungsproteins p66SHC zeigte sich nach 12-stündiger hypoxischer Inkubation bei 7 % O₂-Konzentration signifikant erhöht (siehe Abb. 19).

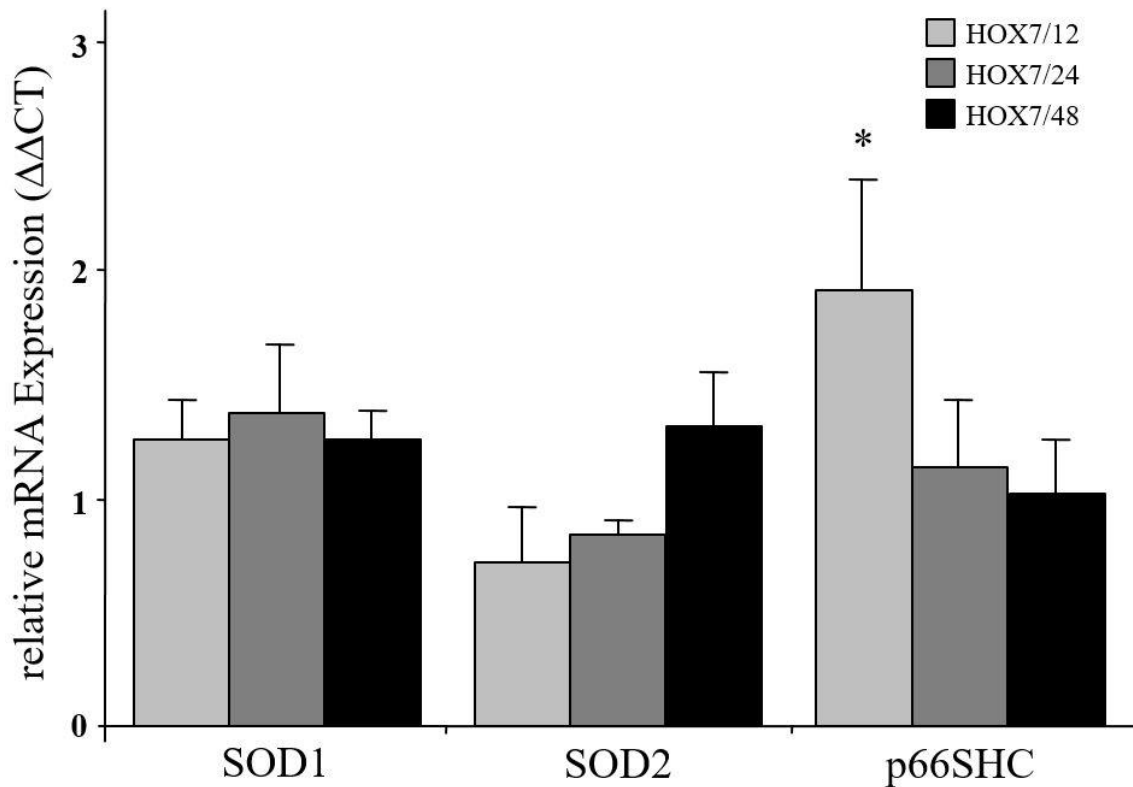


Abb.19: Hypoxie-induzierte Genregulation: Proteine des mitochondrialen ROS-Stoffwechsels bei HOX7/12, HOX7/24 und HOX7/48.

* $p < 0,05$.

NOX: n=4; HOX1/12: n=3; HOX1/24: n=4; HOX1/48: n=5.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Der Wert 1 auf der Y-Achse entspricht der mRNA Expression der Kontrollzellen.

Es liegen unterschiedliche n-Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden. Die Daten sind dargestellt als relative mRNA-Expression bezogen auf die Werte von normoxisch inkubierten Zellen nach Korrektur gegen das *housekeeping* Gen (B2M). SOD= O₂⁻-Dismutase; p66SHC= p66 SH2 containing proto-oncogene.

3.2.2 Der Einfluss von chronischer Hypoxie auf die Transkription in Lungenhomogenat

Lungenhomogenat von Kontrollratten wurde mit Gewebe von Ratten verglichen, die für drei Wochen in einer Atmosphäre mit 10% O₂ (HOX10/21d) gehalten worden waren. Für diese Versuche wurden die Proteine ausgewählt, die sich beim Screening in PAGMZ als signifikant reguliert herausgestellt hatten.

Die Genexpression war bei der Mehrheit der untersuchten Proteine tendentiell erhöht, bei GLUT1 und Cox4i2 waren die Veränderungen signifikant angehoben (siehe Abb. 20).

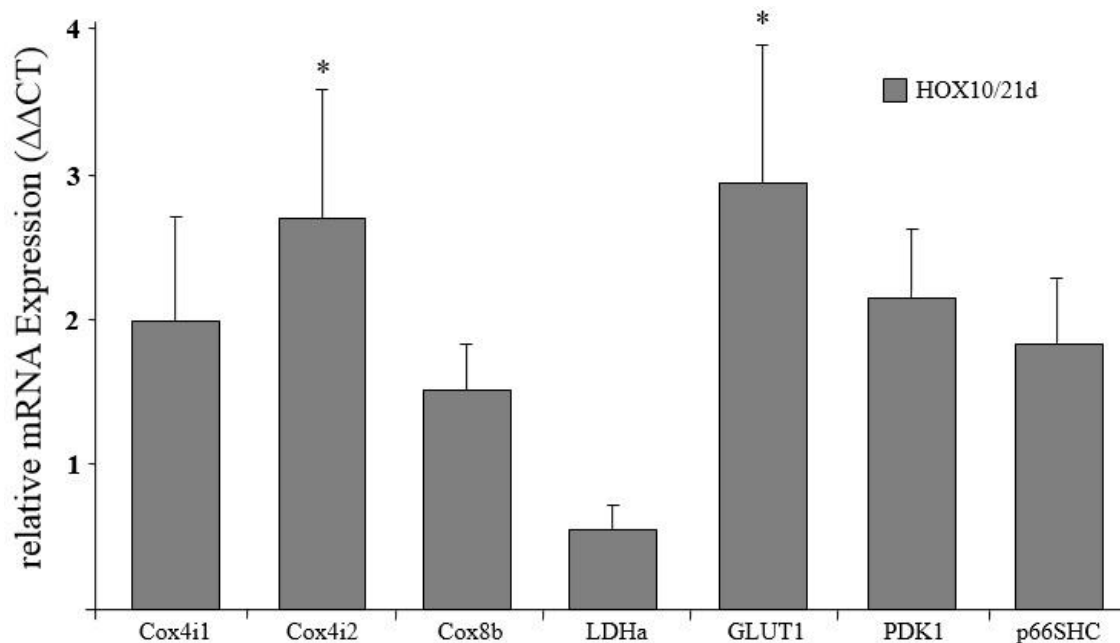


Abb.20: Hypoxie-induzierte Genregulation in Lungenhomogenat bei HOX10/21d.

* $p < 0,05$.

NOX: n=5; HOX10/21d: n=5.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Der Wert 1 auf der Y-Achse entspricht der mRNA Expression der Kontroll-Lungen.

Die Daten sind dargestellt als relative mRNA-Expression bezogen auf die Werte von normoxisch inkubierten Zellen nach Korrektur gegen das *housekeeping* Gen (B2M).

Cox= Cytochrom-c-Oxidase; LDH= Lactatdehydrogenase; GLUT= Glucose Transporter;

PDK= Pyruvatdehydrogenase-Kinase; p66SHC= p66 *SH2* containing proto-oncogene.

3.3 Prävention der Hypoxie-induzierten Respirationsabnahme durch Behandlung der PAGMZ mit DCA

Es wurde untersucht, ob durch Hemmung von PDK mit DCA eine Aktivierung der Respiration erreicht werden kann, und ob die unter Hypoxie beobachtete Verminderung der Atmung nach Inkubation mit DCA verhindert werden kann.

3.3.1 Prävention der Hypoxie-induzierten Verringerung der endogenen Atmung und maximalen Atmungskettenkapazität

Nach 48 Stunden hypoxischer Inkubation in 1%-igem O₂ sah man keine Veränderung der Atmungskettenfunktionen durch die Gabe von 0,5 mM DCA (siehe Abb. 21).

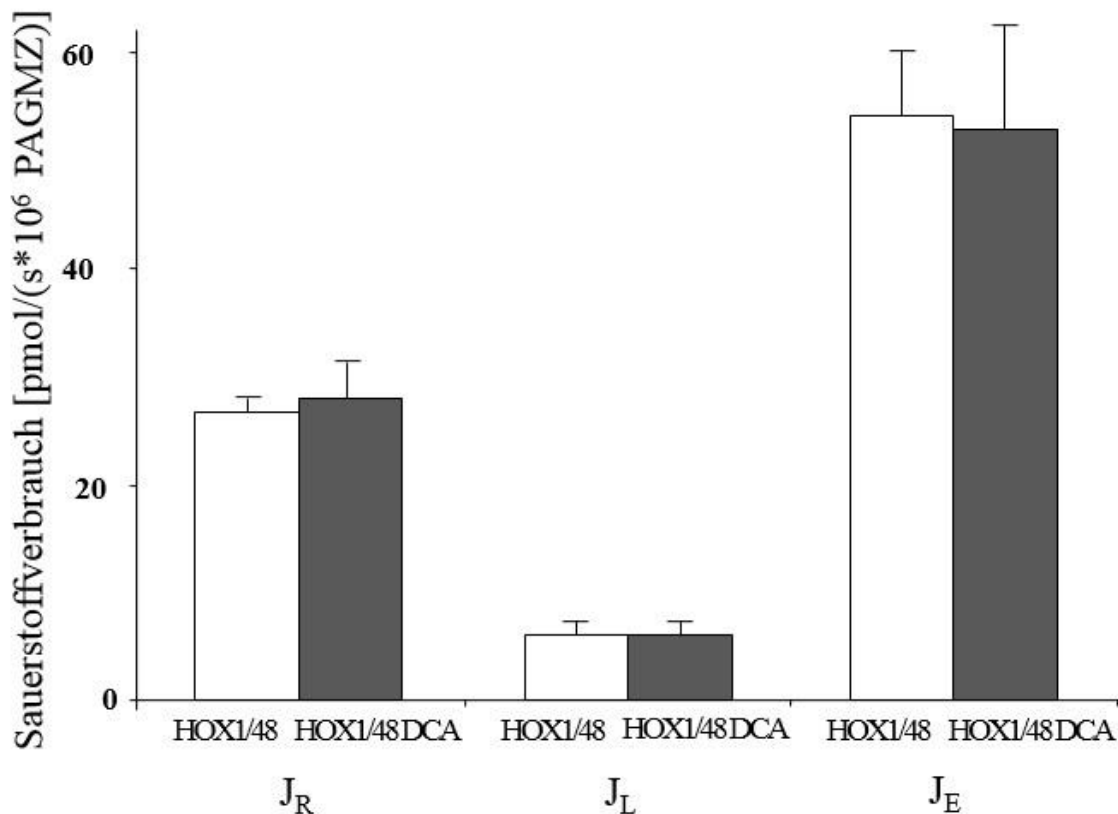


Abb.21: Routineatmung (J_R), *leak*-Atmung (J_L) und entkoppelte Atmung (J_E) der Gruppen HOX1/48 im Vergleich mit Gruppe HOX1/48 DCA.

HOX1/48: n=29; HOX1/48 DCA: n=7.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Es liegen unterschiedliche n-Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden.

3.3.2 Prävention der Hypoxie-induzierten Verringerung der Respiration einzelner Atmungskettenkomplexe

Die Komplex IV -Aktivität der Gruppe HOX1/48 DCA war (wie in Abb. 22 illustriert) signifikant erhöht im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe HOX1/48.

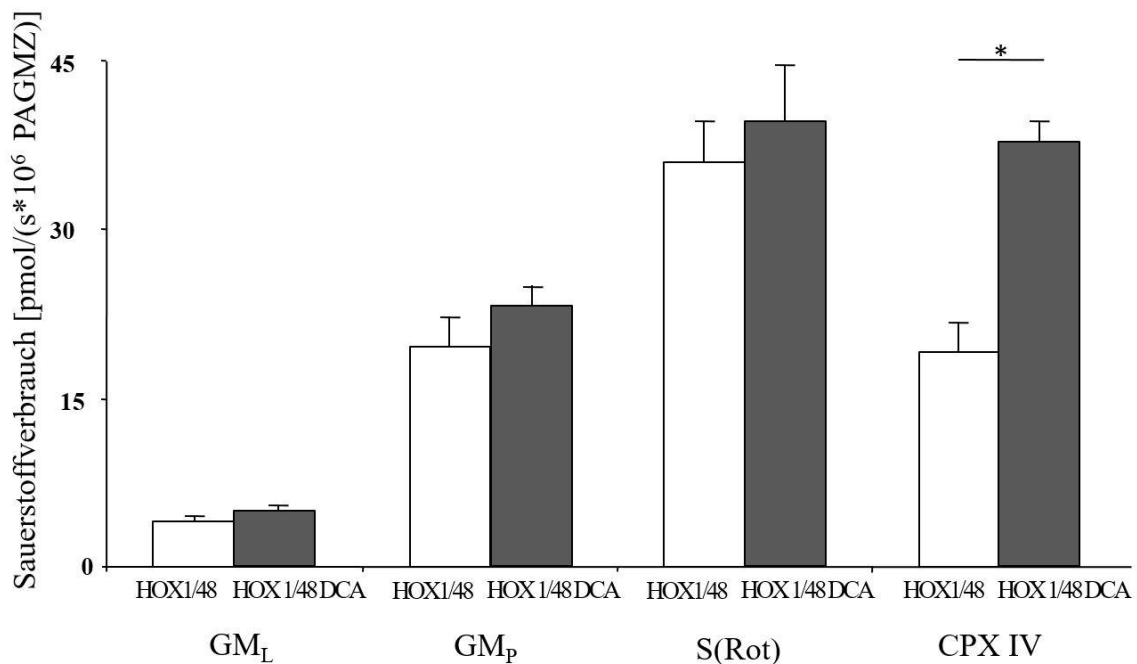


Abb.22: G_M_L und G_M_P, sowie Respiration S(Rot) und Komplex IV Aktivität der Gruppen HOX1/48 und HOX1/48 DCA.

* p<0,05.

HOX1/48: n=6; HOX1/48 DCA: n=4.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Es liegen unterschiedliche n-Werte vor, da die Daten aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten stammen, die anschließend zu passenden Gruppen zugeordnet wurden.

3.3.3 Prävention einer Hypoxie-bedingten Reduktion der O₂-Affinität

Die O₂-Affinität in der Gruppe HOX1/48 DCA war erhöht im Vergleich zu HOX1/48. Hierbei liegt eine erhöhte O₂-Affinität vor, wenn der pO₂, bei dem der halbmaximale O₂-Verbrauch erreicht ist, sinkt (Siehe Abb. 23).

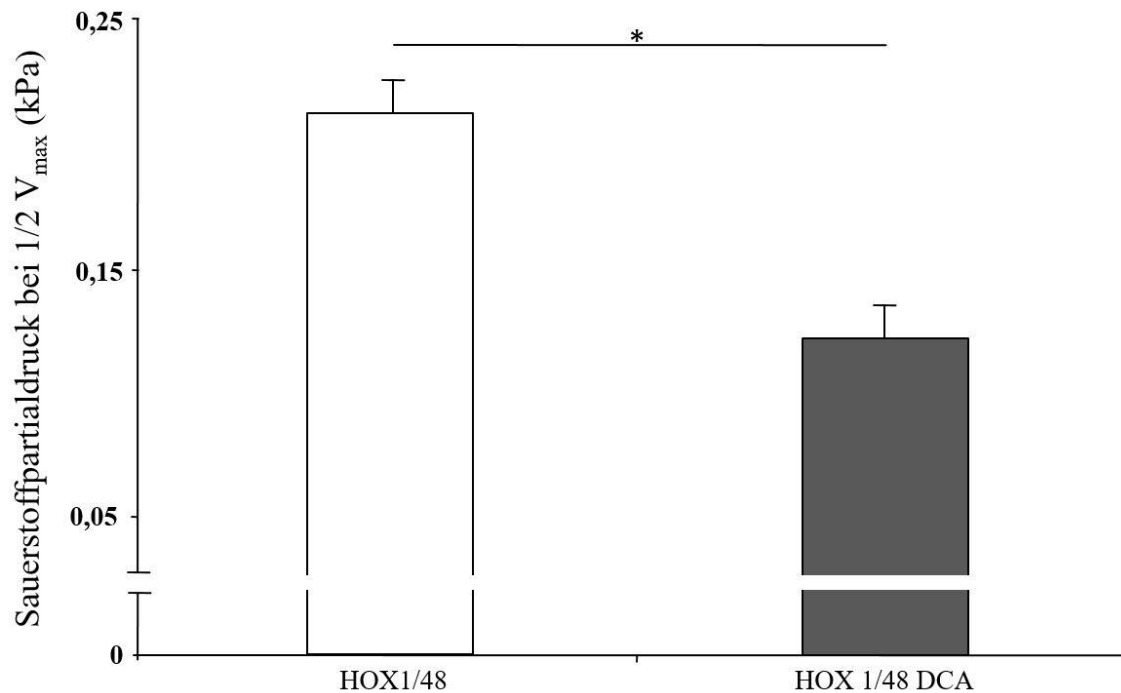


Abb. 23: O₂-Affinität der Atmungskette im Vergleich zwischen der Gruppe HOX1/48 und HOX1/48 DCA.

* p<0,05.

HOX1/48: n=3; HOX1/48 DCA: n=3.

Daten sind dargestellt als pO₂ bei 1/2 V_{max} in kPa.

3.3.4 Prävention der Hypoxie-induzierten Veränderungen der Transkription nach Behandlung der PAGMZ mit DCA

Für diese Versuche wurden dieselben Proteine ausgewählt, die schon bei der Untersuchung des Lungenhomogenats verwendet wurden und die sich beim Screening in PAGMZ als signifikant reguliert herausgestellt hatten.

Im Vergleich zwischen HOX1/48 war die Genexpression der Gruppe HOX1/48 DCA bei Cox4i1, Cox4i2, Cox8b und PDK1 erniedrigt. Bei LDHa hingegen war die Expression signifikant erhöht (siehe Abb. 24).

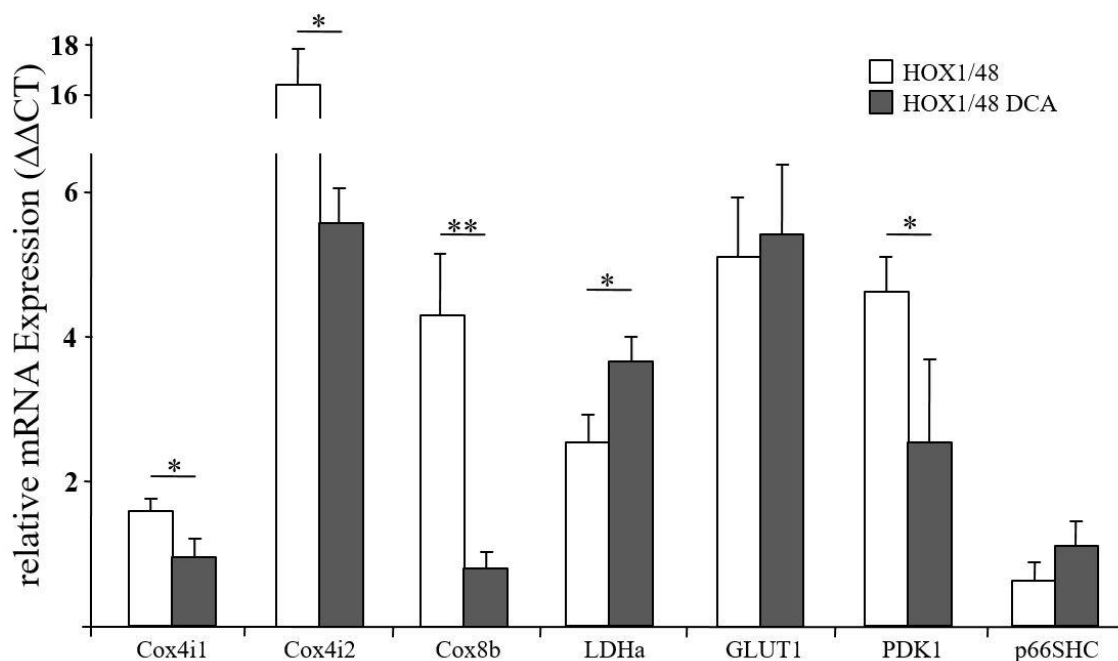


Abb.24: Veränderungen der hypoxisch induzierten Genexpression der Gruppe HOX1/48 im Vergleich mit der Gruppe HOX1/48 DCA.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

HOX1/48: $n=5$; HOX1/48 DCA: $n=5$.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Die Daten sind dargestellt als relative mRNA-Expression bezogen auf die Werte von normoxisch inkubierten Zellen nach Korrektur gegen das *housekeeping* Gen (B2M).

Cox= Cytochrom-c-Oxidase; LDH= Lactatdehydrogenase; GLUT= Glucose Transporter; PDK= Pyruvatdehydrogenase-Kinase; p66SHC= p66 *SH2* containing proto-oncogene.

3.4 Proteinexpression von Cox4i2 in PAGMZ nach hypoxischer Inkubation

In der Literatur ist die Expression von Cox4i2 als Hypoxie-abhängig beschrieben [110,111]. Zudem beeinflusst Cox4i2 die Aktivität von isolierter Cox, die sich in der vorliegenden Arbeit unter Hypoxie verringert dargestellt hatte. Nicht zuletzt war die starke Regulation der mRNA von Cox4i2 ein Grund, warum die Proteinexpression von Cox4i2 untersucht wurde. Hierbei zeigte sich die Proteinexpression von Cox4i2 in der Gruppe HOX1/48 signifikant erhöht im Vergleich zur normoxischen Vergleichsgruppe (siehe Abb. 25 und 26).

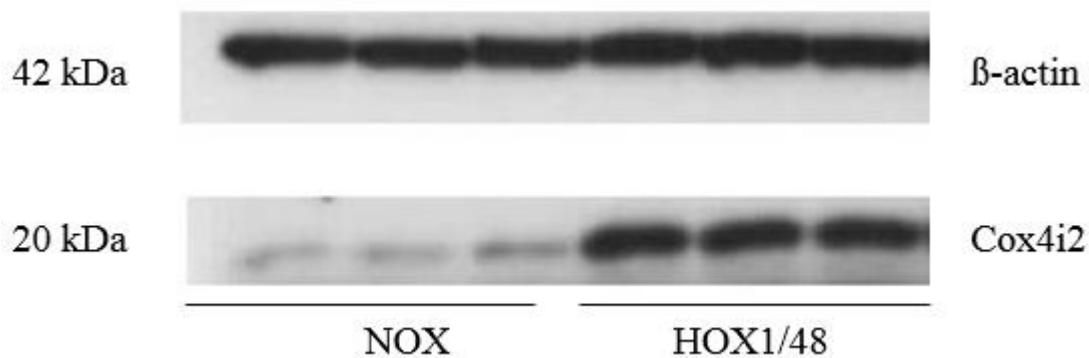


Abb. 25: Repräsentativer Western-Blot der Cox4i2-Proteinexpression in der unbehandelten Kontrollgruppe (NOX) und den bei 1% O₂-inkubierten PAGMZ (HOX1/48).

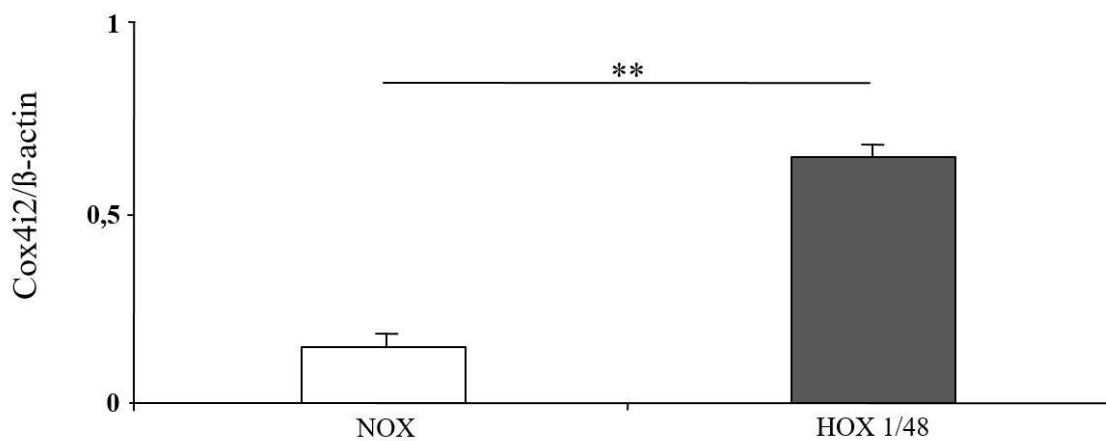


Abb. 26: Densiometrische Auswertung der Cox4i2-Proteinexpression.

**= Signifikanz von $p < 0,01$.

NOX: $n=5$; HOX1/48: $n=5$.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

Die Daten sind dargestellt als relatives Verhältnis der Proteinmenge von Cox4i2 und β -actin.

Cox= Cytochrom-c-Oxidase.

3.5 Mitochondriale CS

Die CS-Aktivität wurde bestimmt, um einen Rückschluss auf die Anzahl der Mitochondrien in den PAGMZ ziehen zu können.

Die CS-Aktivität war bei normoxischen PAGMZ und Hypoxie-inkubierten Zellen auf dem gleichen Niveau. Das bedeutet, dass die respiratorischen Veränderungen nach Hypoxie nicht einer verminderten Mitochondrienzahl geschuldet sind. Die Proben wurden jeweils nach respiratorischen Messungen entnommen und für die weitere Verwendung bei -80°C eingefroren.

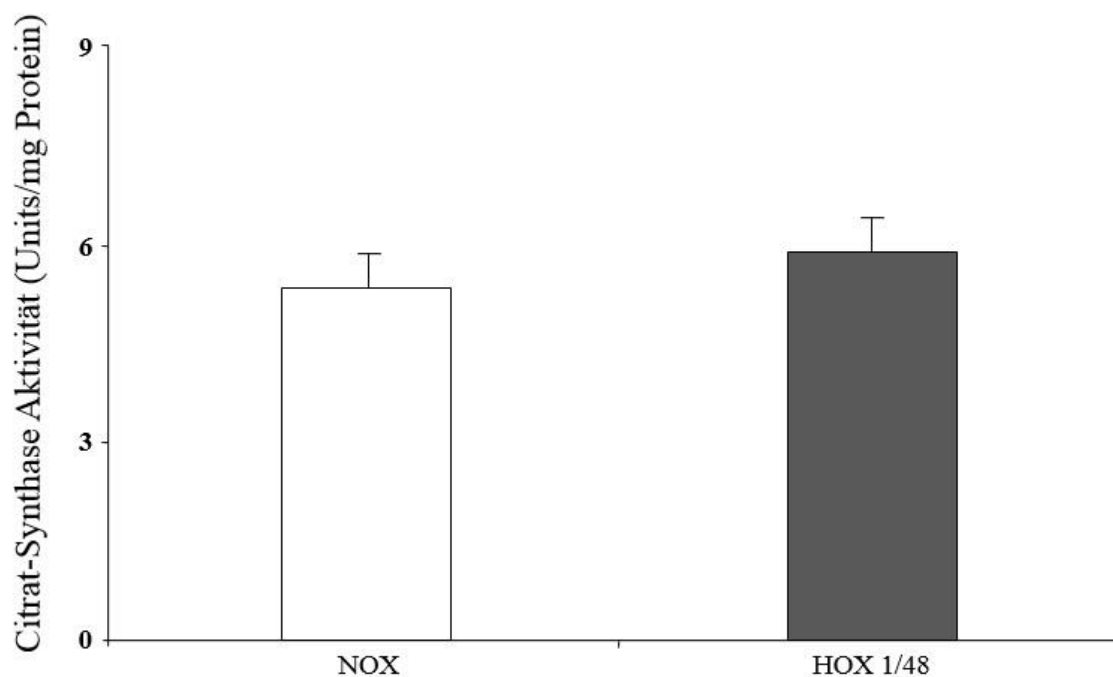


Abb.27: Mitochondriale CS-Aktivität von normoxischen PAGMZ im Vergleich mit Hypoxie-inkubierten PAGMZ.

NOX: n=5; HOX1/48: n=5.

(NOX: Normoxie, HOX: Hypoxie)

4. Diskussion

4.1 Übersicht

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwerwiegende Krankheit, die gegenwärtig nicht kurativ behandelt werden kann und unter anderem durch chronische Hypoxieexposition ausgelöst werden kann. Um Fortschritte in der Therapie zu erzielen, ist es essenziell, die Mechanismen der Krankheitsentstehung zu verstehen. Als wichtiger Faktor zum Verständnis haben sich dabei Veränderungen der PAGMZ und insbesondere der Mitochondrien beim Krankheitsprozess der PH herausgestellt.

Es besteht die Annahme, dass bei der Entstehung der PH eine mitochondriale Dysfunktion, die zu zellulären metabolischen Veränderungen führt, die Proliferation der PAGMZ begünstigt. Es wurde bereits gezeigt, dass DCA, eine Substanz, die die mitochondriale Atmung steigern kann, die experimentelle Hypertonie im Tiermodell rückgängig machen oder vorbeugen kann. Allerdings wurden die spezifischen Veränderungen der mitochondrialen Funktion im Modell der Hypoxie-induzierten PH bisher nicht ausreichend untersucht.

In dieser Studie wurden daher die mitochondriale Respiration, Aktivität einzelner Atmungskettenkomplexe und die Genexpression ausgewählter mitochondrialer und metabolischer Enzyme unter Normalbedingungen und unter hypoxischen Bedingungen untersucht.

Hierbei konnte in PAGMZ im *in-vitro*-Modell der Hypoxie-induzierten PH die Abnahme der mitochondrialen Atmung nach 24 h und 48 h Inkubation in 1% Hypoxie gezeigt werden.

Des Weiteren konnten in einer detaillierteren Betrachtung der Atmungskettenenzyme Veränderungen am Komplex IV gefunden werden. Diese zeigten sich in einer verringerten Komplex IV Aktivität und in einer erniedrigten O₂-Affinität nach 48 Stunden Inkubation in 1% Hypoxie. Neben der veränderten Aktivität von Komplex IV konnte auch eine Veränderung der Untereinheitenkomposition gezeigt werden. Hervorzuheben ist hierbei insbesondere die Untereinheit Cox4i2. Die Genexpression dieser Untereinheit war nach 24 Stunden und 48 Stunden Inkubation in 1% Hypoxie signifikant erhöht. Diese Veränderungen bestätigten sich auch in Lungenhomogenat hypoxisch inkubierter Ratten und durch eine gesteigerte Proteinexpression von Cox4i2 in PAGMZ nach 48 h Inkubation in 1% Hypoxie.

Durch die Inkubation mit DCA, einem Inhibitor von PDK, konnte die Hypoxie-induzierte Verringerung der Komplex IV-Aktivität sowie die Erniedrigung der O₂-Affinität verhindert werden. Ferner zeigte die Genexpression von Cox4i2 nach Inkubation mit DCA einen niedrigeren Anstieg als in der Vergleichsgruppe mit 48 Stunden Inkubation in 1% Hypoxie ohne DCA.

In dieser Studie konnte daher gezeigt werden, dass Hypoxie die mitochondriale Atmung und Funktion von Komplex IV einschränkt. Möglicherweise stellt DCA nun einen neuen Ansatzpunkt zur Therapie der PH dar.

4.2 Hypoxische Inkubation von isolierten Zellen als Modell für die PH

Für die vorliegende Arbeit wurde das Modell einer Hypoxie-induzierten PH gewählt. Es ist seit mehreren Jahrzehnten anerkannt, dass alveoläre Hypoxie *in-vivo* in der pulmonalarteriellen Strombahn zur hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) und zu vaskulären Umbauprozessen führt. Schon 1979 konnte von Rabinovitch, M., et al. gezeigt werden, dass eine dreitägige hypoxische Inkubation von Ratten zu einer signifikanten Erhöhung des PAP Wertes führte. Des Weiteren wiesen die o.g. Ratten eine vermehrte Wanddicke der pulmonalarteriellen Strombahn auf, und die Muskularisierung der Pulmonalarterien dehnte sich weiter in die Peripherie aus. Zudem kam es zu einer Verminderung der Anzahl an Arterien im Verhältnis zu Alveolen [112].

Da die Widerstandserhöhung im Rahmen der HPV und die vaskulären Umbauvorgänge bei der Hypoxie-induzierten PH in erster Linie im präkapillären Bereich stattfinden, ist die Rolle der sich dort befindlichen PAGMZ von besonderem Interesse [33]. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie die präkapillären PAGMZ der Lungenstrombahn präpariert und weiter untersucht. In zahlreichen früheren Studien wurde eine Beeinflussung von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PAGMZ) durch chronische Hypoxie gezeigt.

So konnte die HPV auch in isolierten fetalen Rinder-PAGMZ durch eine akute Hypoxie (circa 3% O₂; 5 Minuten Inkubationszeit) ausgelöst werden. Kontraktionen der Muskelzellen wurden hierbei von Murray T.R., et al. mittels Phasen-Kontrast-Mikroskopie beobachtet [113]. Bei isolierten PAGMZ von Mäusen, die vier Wochen mit einer Hypoxie von 10% inkubiert wurden, konnte eine Verdickung der pulmonalarteriellen Gefäße sowie eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration beschrieben werden [114].

Neben der *in-vitro* Untersuchung der isolierten PAGMZ wurde ein *in-vivo*-Modell verwendet, bei dem Ratten für fünf Tage in einer Atmosphäre mit 10% O₂ gehalten wurden.

Anschließend wurde das Lungenhomogenat für Analysen der Expression verschiedener Gene verwendet. Dieses Modell zur Genanalyse basierend auf Lungenhomogenat wird weithin akzeptiert und praktiziert [115,116].

Besonders interessant ist die Frage, ab welcher O₂-Konzentration Hypoxie-induzierte Veränderungen in PAGMZ auftreten. *In vivo* liegt in den Alveolen eine O₂-Konzentration von ca 13% vor, wobei die O₂-Konzentration im pulmonalarteriellen Blut bei ca. 5% liegt.

Die O₂-Konzentration in den PAGMZ muss also zwischen diesen beiden Werten liegen. Verschiedene Quellen gehen von einem Schwellenwert von 3-7% O₂ aus [113,117,118]. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit 1% O₂ und 7% O₂ durchgeführt.

4.3 Kritische Überlegungen zum Versuchsmodell:

Die respiratorischen Messungen sollten die Veränderung in PAGMZ, die durch Exposition gegenüber chronischer Hypoxie ausgelöst werden, untersuchen. Methodisch bedingt trat allerdings im Verlauf der Versuche eine Reoxygenierung auf, die möglicherweise die Ergebnisse beeinflusst haben könnte: Die PAGMZ wurden zur Vorbereitung der respirometrischen Messungen sowie im Rahmen der mRNA Isolation normoxischer Raumluft ausgesetzt. Ebenso wurden die respirometrischen Messungen unter normoxischen Bedingungen durchgeführt. Hierdurch könnten sich Veränderungen durch die Reoxygenierung und damit bedingte Aktivierung oxidativer Signalwege ergeben haben oder Hypoxie-bedingte Veränderungen in den PAGMZ kurzfristig zurückgebildet haben.

Insbesondere für HIF ist bekannt, dass die O₂-abhängige HIF-1 α Untereinheit nach einer Reoxygenierung schnell abgebaut wird. Dabei wird HIF-1 α post-translational mittels Prolylhydroxlation zum Abbau durch Proteasome markiert [119]. Wang, G.L., et al. zeigten bereits 1995, dass HIF-1 α mRNA und das entsprechende Protein innerhalb weniger Minuten abnimmt. Hep 3B Zellen, die über einen Zeitraum von vier Stunden einer Hypoxie von 1% ausgesetzt waren, zeigten dabei fünf Minuten nach Reoxygenierung eine Rückkehr zu normoxischen HIF-1 α Werten [120]. Die Kinetik der HIF-1 α Degeneration ist darüber hinaus von der Intensität der Hypoxie und der Dauer der Hypoxie-Exposition abhängig. Nach einstündiger Anoxie fand sich in der Arbeit von Jewell, U.R., et al. nach Reoxygenierung innerhalb von 32 Minuten kein HIF-1 α -Protein mehr. Nach demselben Ablauf fand sich nach 0,5 %-iger Hypoxie innerhalb von nur 16 Minuten kein HIF-1 α -Protein mehr [121]. Im Vergleich von hypoxisch (1-2% O₂) inkubierten HeLa-Zellen fand sich nach acht Stunden Inkubation eine deutlich verringerte Halbwertszeit von HIF-1 α -Protein nach Reoxygenierung im Vergleich zu einer hypoxischen Inkubationszeit von einer Stunde [122]. Diese und andere posttranslationale Veränderungen, die sehr schnell reversibel sind, wurden möglicherweise in diesem Modell nicht ausreichend abgebildet. Andererseits sind Veränderungen auf Proteinexpressionsebene und Transkriptionsebene deutlich stabiler, wie sich auch in unseren Versuchen zu mRNA-Veränderungen gezeigt hat.

Insbesondere die erhöhte Proteinkonzentration und die erhöhte mRNA von Cox4i2 nach HOX1/48 Stunden sprechen dafür, dass persistierende Hypoxie-bedingte Veränderungen in dem Versuchsaufbau dieser Studie ausreichend dargestellt werden konnten.

Eine weitere Limitation der Versuchsbedingungen besteht in unphysiologischen Bedingungen der Zellkultur. Durch die Anzucht der PAGMZ in Zellkultur-Flaschen befinden sich die Zellen in einer zweidimensionalen Anordnung mit direktem Kontakt zu Luftsauerstoff (21% O₂) gesättigter Kulturflüssigkeit. An der Oberfläche der Lungenalveolen finden sich jedoch nur O₂-Spiegel von ca. 13% O₂ [123]. Somit erfolgte die Zellanzucht mit einer unphysiologisch hohen O₂-Konzentration. Dies könnte dazu führen, dass die Adaption der isolierten Zellen an die relativ hyperoxischen Bedingungen zu einer veränderten Hypoxieantwort im Vergleich zu *in-vivo*-Zellen führt.

Die O₂-Diffusion durch die verschiedenen Zellschichten und die Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellarten, wie Fibroblasten und Endothelzellen, kann in diesem Versuchsaufbau nur unzureichend wiedergegeben werden. Andererseits ist diese Methode der Zellanzucht gut etabliert und damit mit Ergebnissen anderer Studien gut vergleichbar.

Zum anderen ist diese Methode vergleichsweise einfach zu handhaben, und es werden im Vergleich zu reinen *in-vivo*-Studien deutlich weniger Versuchstiere benötigt.

Darüber hinaus sprechen die in dieser Arbeit festgestellten Übereinstimmungen der Genexpression von isolierten Zellen und von Lungenhomogenat in *in-vivo* Hypoxie-inkubierten Ratten für eine Übertragbarkeit von *in-vitro* und *in-vivo* erhobenen Daten.

4.4 Mitochondriale Respiration von PAGMZ nach chronischer, hypoxischer Inkubation

Nach Inkubation von PAGMZ in chronischer Hypoxie konnte in der vorliegenden Arbeit eine Abnahme der mitochondrialen Atmungskettenfunktion nachgewiesen werden.

So waren nach 48 Stunden Inkubation in 1% Hypoxie die endogene Atmung und die maximale Atmungskettenkapazität verringert. Nach 24-stündiger Inkubation in 1%-iger Hypoxie und nach 48-stündiger Inkubation in 7 % Hypoxie war jeweils nur die maximale Atmungskettenkapazität verringert.

Andere Autoren bestätigen bei anderen Zelltypen eine verringerte Respiration unter Hypoxie. Papandreou I., et al. inkubierten humane und murine Fibroblasten für einen Zeitraum von 24 Stunden in hypoxischer Umgebung (0,5% O₂) und konnten eine Halbierung der endogenen Respiration feststellen [124].

Humane A549 Zellen aus einer Adenokarzinomzelllinie der Lunge und Alveolarzellen Typ II der Ratte wurden von Heerlein, K., et al. über 24 Stunden bei 2%, bzw. 1,5% O₂ inkubiert. Die anschließende respirometrische Messung ergab für beide Zelltypen eine erniedrigte endogene Atmung. Für A549 Zellen betrug die Reduktion 35%, für die Alveolarzellen Typ II Zellen circa 45%. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Respiration von PAGMZ nach 24-stündiger Inkubation in 1%-iger Hypoxie zeigte eine um 15 % reduzierte Routineatmung ohne statistische Signifikanz. Dies könnte durch Abweichungen unter den verschiedenen Zelltypen erklärt werden.

Somit konnte in dieser Studie bestätigt werden, dass die mitochondriale Respiration durch chronisch-hypoxische Zustände, wie sie in ähnlicher Weise als Ursache der PH auftreten, herabgesetzt wird.

Wichtig zu erwähnen ist, dass die endogene Atmung und die maximale Atmung nach Gabe von FCCP unterschiedlich reguliert werden. Die endogene Atmung wird durch drei Faktoren bestimmt: das Substratangebot aus dem Citratzyklus, die Aktivität von einzelnen Atmungskettenkomplexen und die ATP-Synthase-Aktivität. Die einzelnen Atmungskettenkomplexe können in ihrer Aktivität durch Schäden, ausgehend von ROS, posttranslationale Modifikationen oder durch das ATP/ADP-Verhältnis variieren. Die ATP-Synthase-Aktivität ist abhängig von der ADP-Menge bzw. von der metabolischen Aktivierung der Zellen. Bei der maximalen Atmung nach Gabe von FCCP fällt nun die Abhängigkeit von der ATP-Synthase weg, da die Wasserstoffprotonen nun mittels FCCP die innere Mitochondrienmembran überwinden können. Wenn nun die endogene Atmung

und die FCCP-Atmung vermindert sind, besteht daher also am ehesten ein vermindertes Substratangebot, eine verringerte Aktivität eines Enzymkomplexes oder beides.

Um die Eigenschaften der Mitochondrien näher zu beschreiben, können die einzelnen Atmungsstadien auch in ein Verhältnis zueinander gesetzt werden. Das Verhältnis zwischen Routineatmung J_R und entkoppelter Respiration J_E beschreibt, wie hoch der Anteil der Routineatmung an der gesamten Elektronenkettenkapazität ist. Dieses Verhältnis wird hauptsächlich durch eine ADP-vermittelte Aktivierung der Mitochondrien beeinflusst. Somit würde diese Ratio bei hohem ATP-Bedarf und ADP-stimulierter Routineatmung ansteigen.

In der vorliegenden Studie konnten keine Veränderungen von R/E zwischen den hypoxischen Gruppen HOX1 und HOX7, nach jeweils 24 oder 48 Stunden hypoxischer Inkubation, festgestellt werden.

Durch Gabe von Oligomycin kommt es zu einer Inhibierung der ATP-Synthase. Diese sogenannte *leak*-Atmung ist als eine Kompensationsatmung bei Protonenverlust über die innere Mitochondrienmembran zu verstehen und sorgt dafür, dass das mitochondriale Membranpotential aufrechterhalten bleibt. Durch die inkomplette Kopplung der OXPHOS sind mittels Protonenverlust Anpassungen des Stoffwechsels, z.B. bei geringem ATP-Bedarf, möglich [125].

L/E zeigt das Verhältnis von *leak*-Atmung und Kapazität der Atmungskette an. Das Verhältnis steigt vor allem bei einem vermehrten Protonen-*leak* [126].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in keiner Gruppe eine Veränderung des Verhältnisses, sodass von einem unveränderten Protonen-*leak* auszugehen ist. Da ein erhöhter Protonen-*leak* oben beschriebenes Verhältnis von endogener Atmung zu maximaler Atmungskettenaktivität beeinflussen könnte, wurde außerdem der Anteil der Respiration, der für die ATP-Produktion verwendet wird, ermittelt, indem der Quotient aus $(J_R - J_L)/J_E$ (netR) bestimmt wurde.

Da keine Veränderung zwischen Kontrollzellen und hypoxisch inkubierten Zellen zu finden war, deutet dies, entsprechend dem R/E, darauf hin, dass eine verringerte Ruheatmung in den hypoxischen Zellen keine erhöhte ADP-Aktivierung der Mitochondrien hervorrief.

Das könnte bedeuten, dass die geringer atmenden Zellen weniger ATP benötigen oder aber auf anderweitig produziertes ATP, beispielsweise via Glycolyse, zurückgreifen. Dieser Effekt ist bereits 1861 von Louis Pasteur beschrieben worden, als er feststellte, dass Hefen unter anaeroben Bedingungen vermehrt Glucose verbrauchten [127]. Die

Glycolyse wird hierbei unter anderem über den Transkriptionsfaktor HIF und AMPK reguliert.

4.5 Die Aktivität einzelner Atmungsketten-Komplexe nach chronischer, hypoxischer Inkubation

Die Komplex IV-Aktivität zeigte bei HOX1/48 eine signifikante Reduktion. Die ausschließliche Erniedrigung der Komplex IV-Aktivität nach HOX1/48 legt nahe, dass es einen Regulationsmechanismus in PAGMZ gibt, der erst bei einer prolongierten Hypoxie greift bzw. vorher nicht detektierbar ist. In der Veröffentlichung von Horvat, S., et al. wurde in kortikalen Astrozyten bereits nach 6-stündiger hypoxischer (5 % O₂) Inkubation eine verringerte Cox-Aktivität beschrieben [128]. Dies könnte u.a. an einer organspezifischen Untereinheitenkomposition der Cox liegen. So wurde bei der Cox Untereinheit 4i2, die u.a. die Enzymaktivität regulieren kann, eine hohe Expression in der Lungen im Vergleich zu anderen Organen gesehen [111]. Die verringerte FCCP-Atmung in der Gruppe HOX1/24 und HOX7/48 ist nicht durch Cox zu erklären, da sich in diesen Gruppen keine Reduktion der Komplex IV Aktivität zeigte. Bei gleichbleibender R/E ist a.e. ein Substratmangel aus dem Citratzyklus für diesen Effekt verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit war die GM_P-Respiration nach hypoxischer Inkubation nicht reduziert. Die S(Rot)-Respiration nach hypoxischer Inkubation war ohne statistische Signifikanz verringert. GM_P entsprach in der vorliegenden Arbeit der mitochondrialen Respiration von Komplex I, III und IV nach Gabe von Glutamat und Malat als Substrat für Komplex I bei Vorliegen von ADP. Die S(Rot)-Respiration stellte die mitochondriale Respiration nach Hemmung des Komplex I durch Rotenon und Gabe von Succinat als Substrat für Komplex II dar. Die fehlende verminderte Atmung unter Gabe von Substraten und ADP im Überschuss bei gleichzeitig verminderter endogener Respiration in intakten Mitochondrien (siehe oben) spricht dafür, dass die verminderte endogene Respiration nicht (nur) durch eine verminderte Aktivität einzelner Atmungskettenkomplexe verursacht wurde, sondern v.a. durch ein vermindertes endogenes Substrat- oder ADP-Angebot, wobei die ebenfalls verminderte maximale Atmungskettenaktivität ein vermindertes ADP-Angebot unwahrscheinlich macht. Die verminderte Aktivität von Komplex IV wird möglicherweise unter maximaler Atmungsaktivierung unter Entkopplung mit FCCP demaskiert, sodass sie zwar die Respiration in intakten Zellen, aber nicht in permeabilisierten Zellen einschränkt. Es wurde bereits postuliert, dass die Komplex IV Aktivität unter endogenen Bedingungen keinen limitierenden Faktor für die Atmung darstellt [129].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in dieser Arbeit mit einer unveränderten GM_P und $S(Rot)$ Atmung wurde bei Versuchen von Heerlein, K., et al. in A549-Zellen und in primären Alveolarzellen Typ 2 von Ratten eine Erniedrigung der GM_P und $S(Rot)$ -Respiration jeweils nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation mit 1,5-prozentiger und 2-prozentiger Hypoxie gemessen [130]. Der GM_P - O_2 -Verbrauch von permeabilisierten A549-Zellen war in der o.g. Studie um circa 40 Prozent reduziert.

Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie stehen. Powell, C.S., et al. untersuchten an humanen Lungenkarzinomzellen mit Eigenschaften von alveolaren Epithelzellen (A 549-Zellen), wie sich die Aktivität von Komplex I und Komplex II nach hypoxischer Inkubation verhält. Hierbei zeigte sich die Aktivität bei beiden o.g. Enzymkomplexen nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation (1% O_2) nicht signifikant verringert [131].

Als Erklärung für die kontroversen Ergebnisse kommen methodische Unterschiede in Betracht. So wurden bei Heerlein, K., et al. die in Hypoxie inkubierten Zellen unter hypoxischen Bedingungen respiratorisch gemessen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Messung jeweils unter normoxischen Bedingungen. Möglicherweise war der Versuchsaufbau auch nicht sensitiv genug, um mögliche Unterschiede zu detektieren.

4.6 O₂-Affinität

In der vorliegenden Arbeit wurde die O₂-Affinität der Atmungskette von PAGMZ nach hypoxischer Inkubation mit 1% und 7% O₂ nach 24 Stunden und 48 Stunden untersucht. Die normoxisch inkubierten Kontrollzellen zeigten einen p50-Wert von 0,085 kPa.

Laut Scandurra, F.M., et al. liegt der zu erwartende p50 für Mitochondrien und kleine Zellen zwischen 0,01 und 0,1 kPa [132] und entspricht damit der Literatur.

In der vorliegenden Studie zeigte sich nur in der Gruppe HOX1/48 eine Erhöhung des p50 und damit eine Verringerung der O₂-Affinität. Im Durchschnitt lag der Wert von p50 bei 0,18 kPa und damit um ca. 212% über dem Wert der normoxischen Zellen.

Eine Arbeit von Chandel, N.S., et al. aus dem Jahr 1996 zeigte ebenfalls einen Anstieg des p50-Wertes von isolierter Cox für O₂ nach hypoxischer Inkubation. Dies wird auf eine allosterische Inhibierung der Cox durch eine verminderte O₂-Konzentration zurückgeführt [133]. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass strukturelle Veränderungen des Enzymkomplexes die O₂-Affinität verändern können. So ergaben respiratorische Messungen von Fibroblasten von Patienten mit einer gestörten Cox-Zusammensetzung aufgrund einer SURF1-Mutation einen erhöhten p50 für O₂ [134].

Zusätzlich könnte eine Inhibierung der Cox-Aktivität bzw. fehlende Aktivierung der Cox-Aktivität unter akuter Hypoxie, wie sie zur Bestimmung des p50-Wertes induziert wird, zu einer verminderten O₂-Affinität führen. Unter normoxischen Bedingungen wird die Aktivität von Cox an der Untereinheit 4 über das Verhältnis von ADP zu ATP reguliert. Laut Napiwotzk, J., et al. führen hierbei hohe ATP-Spiegel zu einer allosterischen Inhibierung, wobei ADP die Aktivität steigert [135].

Die in dieser Arbeit festgestellte verringerte O₂-Affinität von Cox für O₂ nach prolongierter Hypoxie könnte bedeuten, dass trotz hoher ADP/ATP-Ratio die oxidative Phosphorylierung unter hypoxischen Bedingungen über Cox gehemmt wird und die benötigte Energie für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen über die Glycolyse generiert wird. Diese Theorie wird von einer Arbeit von Horvat, S., et al. unterstützt, bei der festgestellt werden konnte, dass in Gewebe mit hoher Cox4i2 Expression die allosterische Inhibition von Cox durch ATP aufgehoben war [128]. Dies steht allerdings im Widerspruch zu Untersuchungen, die zeigten, dass die ADP-regulierte Aktivität von isolierter Cox durch die Abwesenheit von Cox4i2 nicht verändert ist [88].

4.7 Genexpression mitochondrialer, metabolischer und antioxidativer Proteine

4.7.1 Gene der Atmungskette

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden u.a. verschiedene Gene der Atmungskette untersucht, nachdem eine hypoxische Inkubation mit 1% und mit 7% pO₂ für 12, 24 oder 48 Stunden erfolgt war. Ziel war es, signifikant über- oder unterexprimierte Gene der Atmungskette zu finden, als Anhalt auf eine hypoxisch induzierte Veränderung in der Zusammensetzung der Untereinheiten der Enzymkomplexe.

NDUFS1 und NDUFS4 kodieren jeweils für Untereinheiten von Komplex I der Atmungskette. NDUFS1 enthält den Bauplan für die 75-kDa Fe-S Untereinheit von Komplex I. NDUFS4 kodiert für cAMP-abhängige Phosphorylierungsstellen, die die Kapazität von Komplex I beeinflussen können. Bei einer Mutation des NDUFS1-Gens ist eine mitochondriale Enzephalopathie eine bekannte assoziierte Erkrankung. Beim Leigh-Syndrom, der Parkinsonerkrankung und der Alzheimererkrankung konnten Mutationen von NDUFS4 nachgewiesen werden [72]. Nach 1%-iger Hypoxie fand sich keine signifikante Veränderung der relativen mRNA-Expression bei nur gering vermehrter mRNA-Menge.

Die NDUFS1-Expression war nach HOX7/12 signifikant erhöht. Bei einer vergleichsweise geringen Veränderung wurden keine Komplex-Titrations mit HOX7/12 inkubierten Zellen durchgeführt, so dass ein Rückschluss auf die Respiration nicht gezogen werden kann.

Das SDHd-Gen kodiert für ein Verankerungselement von Komplex II und scheint daneben eine Rolle bei der Tumorgenese von kolorektalem Karzinom und von Magenkarzinom zu spielen. Bei beiden o.g. Tumortypen konnte eine reduzierte Expression von SDHd festgestellt werden [136]. Bei Mutationen im SDH Gen treten im Übrigen gehäuft Phäochromozytom-Erkrankungen und Paragangliome auf. Hierbei konnte in mehreren Studien eine Verringerung des SDH-Proteins gezeigt werden [137,138]. Interessanterweise konnten Powell, C.S., et al. nach hypoxischer Inkubation von humanen Lungenkrebszellen (A549) eine Verminderung der SDH-Aktivität feststellen. Diese konnte durch SOD2 verhindert werden [131]. Letztlich konnte eine

Arbeit von Huang, Y.P., et al. zeigen, dass eine antitumorös wirksame Substanz, Fenofibrat, einen Einfluss auf die mitochondriale Genexpression via SDHd hat [139].

Im Rahmen dieser Arbeit war SDHd in der Gruppe HOX1/48 signifikant überexprimiert. Eine Veränderung der S(Rot)-Respiration war im Rahmen der Komplextitration nicht nachweisbar. Somit scheint die veränderte Genexpression nicht die Respiration von Komplex II zu beeinflussen.

SDHa, welches für ein katalytisches Zentrum kodiert, wies eine unveränderte mRNA Expression auf.

4.7.1.1 Untereinheiten von Komplex IV.

Die mRNA von Cox4i2 bei HOX1/48 war mit einem Faktor von mehr als 15 höchstsignifikant überexprimiert. Nach 24-stündiger Inkubation in 1% O₂ fand sich eine Erhöhung der Transkription um den Faktor 5.

Eine 12-stündige Inkubation unter oben genannten Bedingungen reichte nicht aus, um die mRNA-Menge von Cox4i2 signifikant zu erhöhen. Dies macht deutlich, dass die Dauer der hypoxischen Inkubation entscheidend sein kann, um bestimmte Veränderungen in der mitochondrialen Respiration hervorzurufen.

Im Gegensatz dazu konnte bei einer hypoxischen Inkubation mit 7% O₂ zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Überexpression von Cox4i2 gefunden werden. Eine O₂-Konzentration von 7% scheint also zu hoch, um als Stimulus für eine signifikante Änderung im Verhältnis der Isoformen von Cox4 zu fungieren.

Die ubiquitär vorhandene Isoform Cox4i1 war nach 12-stündiger Inkubation in 1%-iger Hypoxie verringert exprimiert. Nach 24 Stunden fand sich keine Veränderung im Vergleich zu Kontrollzellen und nach 48 stündiger Inkubation war die mRNA um etwa den Faktor 1,6 erhöht. Somit findet sich ähnlich wie bei Cox4i2 bei HOX1/48 ein Anstieg der Genexpression, wenn auch in einer unterschiedlichen Größenordnung. Da Fukuda, R., et al. eine hypoxische Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt haben, stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit einem Cox4i1 auf dem Level von Normoxie und einer erhöhte Cox4i2-Expression, jeweils bei HOX1/24, letztlich mit den Resultaten der oben genannten Forschungsgruppe überein.

Laut Fukuda, R., et al. führe HIF-1 zur Transkription von *ATP-dependant protease La* (LON), welches für eine Cox4i1-abbauende Protease kodiere. Cox4i1 mRNA werde bei Hypoxie nun weiter transkribiert und liege auf dem gleichen Niveau wie in Normoxie, während das Protein von Cox4i1 in Hypoxie verringert sei. Dagegen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit Cox4i1 erhöht bei HOX1/48 erhöht. Dieser Zeitpunkt wurde in der Studie von Fukuda, R., et al. nicht untersucht. Es zeigte sich aber, im Einklang mit der Studie von Fukuda, R., auch in der hier vorliegenden Untersuchung eine starke Erhöhung des COX4i2/COX4i1 mRNA Verhältnisses nach chronischer hypoxischer Inkubation. Übereinstimmend kommt Semenza, G.L., et al. in seiner Arbeit von 2007 zum Ergebnis, dass Cox4i2 in hypoxischen Zellen verstärkt exprimiert sei. Dies geschehe, damit die Funktion von Cox dem geringen O₂-Spiegel angepasst werde. Diese Aussage basiert u.a.

auf Versuchen unter hypoxischen Bedingungen, bei denen Cox4i2 gegen Cox4i1 ausgetauscht wurde, was zu einem verminderten O₂-Verbrauch und zu einer verminderten Cox-Aktivität führte [111,140].

In dieser Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Proteinmenge von Cox4i2 bei HOX1/48 festgestellt werden. Gleiche Ergebnisse finden sich in der Arbeit von Fukuda, R., et al., bei der HeLa-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1% O₂ eine Erhöhung von Cox4i2-Protein im Vergleich mit Kontrollzellen aufwiesen.

Neben einer Regulation von Cox4i2 über HIF zeigte sich in einer Arbeit von Aras, S., et al., dass Cox4i2 über eine Gensequenz in der Promotorregion verfügt, die als ein "*oxygen responsive element*" (ORE) fungiert und drei verschiedene Transkriptionsfaktoren aufweist. Bei einer Konzentration von 4% O₂ wurde die Expression von Cox4i2 maximal reguliert [110]. Dies stimmt weitgehend mit den Ergebnissen dieser Studie überein, bei der die Regulation bei 1%, aber nicht bei 7% O₂ gesehen wurde, sodass ein O₂-abhängiger Effekt angenommen werden kann.

Ferner zeigten sich in Cox4i2 KO-Mäusen eine reduzierte Cox-Aktivität sowie reduzierte ATP-Spiegel. Somit liegt nahe, dass Cox4i2 unter Normoxie eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung eines ausreichenden Energiespiegels spielt.

In dieser Arbeit zeigten sich unter Hypoxie ein Anstieg der Expression von Cox4i2 und eine verringerte Respiration von Cox. Daher könnte die erhöhte Cox4i2 Expression einem Schutzmechanismus gleichkommen, der vor einer Zellschädigung bei niedrigen O₂-Konzentrationen schützt. In neueren Untersuchungen konnte dagegen gezeigt werden, dass ein Fehlen von Cox4i2 die Respiration in PAGMZ nicht beeinflusst. Die veränderte Respiration und Cox-Aktivität nach chronischer hypoxischer Inkubation ist somit evtl. auch durch die Regulation anderer Cox-Untereinheiten bedingt [141].

Weitere Genregulationen von Cox-Untereinheiten betreffen unter anderem das im Zellkern kodierte Cox5b. Hier lag nach 12-stündiger hypoxischer Inkubation mit 1% O₂ eine reduzierte Expression vor. In einer Untersuchung von Chen, Z.X., et al. zeigte sich, dass Cox5a und 5b eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von Tumorzellen spielen. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 zeigte in der o.g. Untersuchung eine Überexpression unter oxidativem Stress, was zu einer Verringerung der Cox-Aktivität und zu einer Verringerung von ROS führte. Ferner zeigte sich unter Hypoxie (3h mit 0,5 % O₂) eine geringere Konzentration von Cox5b Protein innerhalb der Mitochondrien. Dabei sorgte Cox5b unter Hypoxie für eine herabgesetzte Cox-Aktivität und damit für eine verringerte Respiration [142]. Eine Erkrankung, die auf einen Gendefekt von Cox5b zurückzuführen

wäre, ist zurzeit nicht bekannt. Die meisten Cox-defizienten Patienten weisen Mutationen in den mitochondrial kodierten ersten drei Untereinheiten auf.

Cox8b zeigte nach 48 Stunden Inkubationszeit mit 1% O₂ eine vermehrte relative mRNA-Menge. Bei einer hypoxischen Inkubation mit 7% O₂ zeigte sich keine signifikante Regulation von Cox4 oder Cox5. Einzig Cox8b war bei HOX7/12 verringert exprimiert. Da Cox8b vor allem im braunen Fettgewebe auftritt, könnte eine erhöhte Expression auf eine zunehmende Entkopplung der Atmungskette bei prolongierter 1%-iger Hypoxie hindeuten [90].

4.7.2 Sonstige mitochondriale Gene und Gene des ROS-Stoffwechsels

Korrespondierend zur oben erwähnten Erhöhung der mitochondrialen H_2O_2 -Konzentration in hypoxisch inkubierten Zellen [34], fand sich in dieser Arbeit eine signifikant gesteigerte Expression von SOD2 (auch bekannt als MnSOD), welches als Enzym in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist und O_2^- in den Mitochondrien zu H_2O_2 und O_2 katalysiert. Dies legt nahe, dass unter Hypoxie vermehrt O_2^- in den Mitochondrien entsteht.

ROS könnten möglicherweise in unterschiedlicher Weise, zum Beispiel über eine Umkehr des Elektronenflusses an Komplex II, eine Rolle bei der Zelladaptation auf niedrige O_2 -Spiegel spielen [143,144].

Laut Scortegagna, M. et al. sei eine gesteigerte Expression von SOD2 als Reaktion auf erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen und stelle einen Überlebensvorteil dar [145]. Auch Brunet, A., et al. betrachten eine erhöhte Expression von SOD2 als Überlebensvorteil. Reguliert würde SOD2 dabei über HIF-2 α . [146,147]

Eine Arbeitsgruppe um Agrawal, A. stellte einen Hypoxie-induzierten Anstieg der SOD2 Expression um den Faktor 2 bei humanen Chondrozyten (HTB94) nach einer Inkubation mit 2% O_2 für 24 Stunden fest. Experimente von G. C. Brown zeigten, dass NO und Peroxynitrit (ONOO^-), ein Oxidans, das aus O_2^- und NO gebildet wird [148], den p50-Wert von Cox für O_2 anheben [149].

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SOD2 bei HOX1/48 eine erhöhte Transkription aufweist. Dies spricht für eine hypoxische Steigerung der ROS-Produktion, da der SOD2-Level unter bestimmten Bedingungen zu der ROS-Menge proportional ist [99]. Eine gegensätzliche Meinung wird von Archer, S.L., et al. vertreten. In einem Review aus dem Jahr 2008 vertritt er den Ansatz, dass ROS unter chronischer Hypoxie abnehmen würden. Die verringerte ROS-Konzentration würde zu einer Inhibierung von Kv-Kanälen führen, was letztlich eine Vasokonstriktion zur Folge hätte [150,151].

p66SHC spielt eine wichtige Rolle in der Steuerung der Apoptose und ist als ein klassisches Signalübertragungsprotein, sowie für seine Beteiligung am Glucose-Transport-Regelkreis bekannt [152]. Darüber hinaus weist die Literatur auf einen Zusammenhang zwischen erhöhten p66SHC-Werten und vermehrter ROS-Produktion hin [94,95,153]. Bei HOX1/24 und HOX7/48 zeigte sich eine vermehrte Expression von p66SHC, wobei unter HOX1/48 eine verringerte Expression vorlag. In einer

Untersuchung von Yuan, Y., et al. wurde die Pathophysiologie von Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität untersucht. Hierbei wurde die zentrale Rolle von p66SHC als Ursprung von mitochondrialem O_2^- hervorgehoben, das die Apoptose in den proximalen Tubuli anstößt. Als Gegenspieler fungierte hierbei SOD2, das O_2^- zu H_2O_2 katalysiert. In HK2 Zellen war nach Gabe von Cisplatin die Expression von SOD2 erniedrigt und die Expression von p66SHC erhöht [153]. Wenn bei HOX1/48 nun die SOD2-Expression erhöht und p66SHC erniedrigt ist, lässt das den Rückschluss auf einen anti-apoptotischen Zustand zu.

4.7.3 Gene der Stoffwechselregulation

Unter Bedingungen mit vermindertem O₂-Angebot kann der zelluläre Energiebedarf mittels anaerober Glycolyse gedeckt werden. Hierbei wird Pyruvat mittels des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat katalysiert. In der vorliegenden Arbeit ist das Enzym LDHa nach hypoxischer Inkubation verstärkt exprimiert. In den Gruppen HOX1/12, HOX1/24, HOX1/48 und HOX7/12 konnte jeweils eine Überexpression gezeigt werden. Diese Ergebnisse werden von Semenza, G.L., et al. bestätigt [140], der in hypoxischen Zellen eine verstärkte Transkription von PDK1, LDHa, Cox4i2 und LON, eine Protease zum Abbau von Cox4i1, gesehen hat. Dieser konzertierte Anstieg der Genexpression geschehe mittels Aktivierung von HIF-1. Der Anstieg von LDHa-mRNA bereits nach 12 Stunden legt nahe, dass nach vergleichsweise kurzer Hypoxie-Phase der Energiestoffwechsel von der oxidativen Phosphorylierung hin zur anaeroben Glycolyse verschoben wird und Pyruvat verstärkt zu Laktat katalysiert wird.

Um den Energiebedarf der Zelle trotz der im Vergleich zur Glucoseoxidation ineffektiven anaeroben Glycolyse zu decken, muss die Zelle den Zufluss von Glucose steigern. Dies spiegeln die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten mit einer erhöhten Transkription von GLUT1 in der Gruppe HOX1/24, HOX1/48 und HOX7/12 wider.

Das Protein AMPK spielt ebenfalls eine Rolle beim Umschalten des Stoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung auf Glycolyse. Wenn aufgrund von O₂-Mangel das AMP/ATP-Verhältnis ansteigt, werde AMPK hochreguliert, was zu einem gesteigerten katabolen und einem verringertem anabolen Stoffwechsel führe [154]. Im Gegensatz dazu postuliert Emerling, B.M., et al., dass AMPK durch oxidativen Stress und unabhängig vom AMP/ATP-Verhältnis aktiviert werde [144]. In einer Studie von Hwang, A.B., et al. zeigte sich neben der Induktion von HIF-1 eine Aktivierung der AMPK, was jeweils durch ROS vermittelt würde. Der heterotrimerische Proteinkomplex AMPK würde dabei mittels Phosphorylierung einen gegenseitigen *feedback*-Mechanismus mit HIF-1 aufweisen [155]. Der von Hwang, A.B., et al. festgestellten erhöhten Aktivierung des AMPK-Proteins steht in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Erhöhung der Genexpression gegenüber. Lediglich in der Gruppe HOX7/12 fand sich ein tendentieller Anstieg. Möglicherweise waren die untersuchten PAGMZ zum Untersuchungszeitpunkt nach 12, 24 und 48 Stunden bereits soweit an die Hypoxie adaptiert, sodass weder ein ATP-Mangel noch ein verstärktes Vorkommen von ROS vorlag.

Eine zentrale Schaltfunktion des Energiestoffwechsels wird durch das Enzym PDH eingenommen, das Pyruvat zu Acetyl-CoA, dem „Treibstoff“ des Citratzyklus, umwandelt. PDH wird wiederum in seiner Aktivität mittels Phosphorylierung durch die PDK gehemmt. Dies führt ebenfalls zu einer Herunterregulierung der OXPHOS zur Energiegewinnung unter hypoxische Bedingungen. Die PDK1-Expression nach HOX1/12, HOX 1/24 und HOX1/48 war signifikant erhöht.

In der Arbeit von Chen, T. wurden bei PAGMZ-spezifischem *knock-out*-Experimenten mittels microRNA(miR)-17~92 verminderte Zeichen der Hypoxie-induzierten PH gesehen, so hatten entsprechende *knock-out*-Mäuse einen verringerten Hämatokrit und Hämoglobinwert. Nach Gabe eines miR-17~92 Inhibitors fand sich in PAGMZ in vitro ein Rückgang der Hypoxie induzierten PDK1-Erhöhung [156]. PDK1 hat auch deswegen eine besondere Relevanz, weil es sich als mögliches *target* für Krebstherapien eignen könnte. So zeigten zwei Studien, dass eine selektive Blockade der HIF-induzierten Expression von PDK1 die Apoptose von Krebszellen hervorrief [124,157]. Ferner zeigte sich in Perizyten von PAH-Patienten eine gesteigerte Expression von PDK1. PDK2 war nicht signifikant reguliert [158].

Die Zusammensetzung der PDK-Isoenzyme ist gewebespezifisch. In Herzmuskulatur finden sich z.B. PDK1, PDK2 und PDK4. PDK2 ist das im Gewebe von Säugetieren am häufigsten anzutreffende Isoenzym von PDK und scheint Hauptanteil an der Phosphorylierung von PDH zu leisten. PDK1 ist in erster Linie in Herzmuskulatur gefunden worden. Zwar ähneln sich PDK1 und PDK2 bezüglich Kinetik und Regulation, allerdings hat PDK1 eine höhere spezifische Aktivität und weist eine ausgeprägtere Inhibierung durch DCA und ADP auf [159].

Wie PDK1 hemmt auch PDK 2 das Enzym PDH und damit den Eintritt von Acetyl-CoA in den Citratsäurezyklus. In dieser Studie ist PDK2 in der Gruppe HOX1/48 herabreguliert und in den restlichen Gruppen nicht signifikant reguliert. Laut einer Arbeit von Hurd, T.R., et al. könnte eine Inaktivierung von PDK2 durch geringe H₂O₂-Spiegel geschehen [160]. Im Verhältnis zur Hochregulierung von PDK1 war PDK2 weniger stark herunterreguliert, was zu einer insgesamt verstärkten Aktivität der Gesamt-PDK führen könnte.

Eine erhöhte Expression von ATP1F1 hemmt die mitochondriale ATP-Synthase und spielt eine wichtige Rolle im "*metabolic switch*" von Tumorzellen hin zur Glycolyse. Eine verstärkte Transkription solle laut kürzlich durchgeführten Studien für eine mitochondriale Hyperpolarisation und eine gesteigerte Produktion von ROS sorgen

[161]. Huang, L.J., et al. konnten zeigen, dass die ATPIF1-Expression über HIF reguliert wird [66]. Somit wäre auch in dieser Arbeit mit einer erhöhten Expression von ATPIF1 zu rechnen gewesen. Es fand sich bei HOX1/48 zwar ein Anstieg der mRNA-Konzentration, allerdings keine signifikante Erhöhung.

4.8 Metabolische Veränderungen

Neben der Inhibierung von PDH unter Hypoxie spielt HIF eine wichtige Rolle in der Umstellung der Energieversorgung, der Vaskularisierung und der Zellproliferation. Unter hypoxischen Bedingungen bildet HIF ein Heterodimer aus drei verschiedenen Untereinheiten. Anschließend bindet HIF an sogenannten „*hypoxia responsive elements*“ (HRE) in der Promotorregion der Zielgene und induziert so die Gene für Glycolyse und Glucoseimport. Laut Kim, J.W., et al. kommt es durch HIF zu einer erhöhten Expression von PDK1 und damit zu einer Umleitung des Energielieferanten Pyruvat hin zur Glycolyse [157].

Im Rahmen des Pasteureffekts kommt es während Hypoxie zu einer HIF-regulierten, vermehrten anaeroben Glycolyse mit vermehrter Bildung von Laktat. Im Gegensatz dazu beschreibt der Warbureffekt eine Inhibierung des Pasteureffekts in Tumorzellen, die auch unter ausreichender O₂-Versorgung vermehrt Glycolyse betreiben und den Laktatspiegel so ansteigen lassen. Die OXPHOS ist entsprechend vermindert. Dieser Effekt konnte auch bei der PH festgestellt werden [162]. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte vermehrte Expression von GLUT1 unter hypoxischen Bedingungen und die erhöhte Expression von LDHa sind daher gut nachvollziehbar und decken sich mit der Literatur.

Durch eine verringerte OXPHOS kommt es nun entsprechend zu einer geringeren Einspeisung von Elektronen in die Atmungskette. Dadurch könnten in der Atmungskette weniger toxische ROS entstehen und ein Überdauern der Zelle in Hypoxie wäre besser möglich [157]. Diese Annahme steht im Einklang mit Untersuchungen von Fibroblasten aus Maus-Embryos (MEF). MEF mit ausgeschaltetem HIF-1 α zeigten dabei höhere Spiegel an H₂O₂ als der Wildtyp-MEF. Wenn allerdings eine verstärkte Expression von PDK1 herbeigeführt wurde, zeigten die MEF ohne funktionierendes HIF-1 α verringerte Werte für H₂O₂ und eine gesteigerte Überlebensrate nach 48 und 72 Stunden [157]. Bei Patienten mit Leigh-Syndrom bei SURF-Mutation wurde ein erhöhter p50 gemessen. Auch hier könnte der Stoffwechsel via PDK1 hin zu einer anaeroben Glycolyse verschoben und die Apoptose durch eine verringerte Entstehung von ROS verhindert sein [134]. Papandreou I., et al. zeigte ebenfalls mittels HIF-1 α *knock-out*-MEF, dass PDK1 von HIF induziert wird. Allerdings stellte sie auch noch den Zusammenhang zwischen HIF-1 induziertem PDK1 und einem reduzierten mitochondrialen O₂-Verbrauch her.

Hierbei würden mit PDK1 transfizierte RKO-Zellen, humane Koloncarcinom-Zellen, bei Normoxie und Hypoxie einen verringerten mitochondrialen O₂-Verbrauch zeigen [124]. In Krebszellen wie auch in PAGMZ von PH-Lungen tritt die Apoptose im Verhältnis zur Zellproliferation in den Hintergrund, und die anaerobe Glycolyse ist vorherrschend. Neben diesen Gemeinsamkeiten finden sich sogar teilweise Tumormarker in den Gefäßen von Patienten mit manifester PH. Der "Überlebensvorteil" der Krebszelle und des erkrankten Gewebes bei PH könnte laut Denko, N.C. dabei nicht nur in erhöhten Glycolyse, sondern vor allem in der verringerten mitochondrialen Aktivität und der damit verbundenen geringeren ROS-Produktion liegen [163]. Eine gegensätzliche Auffassung vertreten Fukuda, R., et al. und Semenza, G.L., et al., die einen Hypoxie-induzierten Anstieg der ROS annehmen [67,111].

4.9 Hypoxie-induzierte Veränderungen in Lungenhomogenat

In der hier vorliegenden Studie war die Cox4i2 Genexpression nicht nur in isolierten PAGMZ erhöht, sondern auch in Lungengewebe von Ratten, die zuvor drei Wochen lang bei 10% O₂ gehalten wurden.

Dies würde bedeuten, dass auch *in-vivo* unter physiologischen, hypoxischen Bedingungen Cox4i2 eine wichtige Rolle in der zellulären Anpassung auf geringe O₂-Spiegel spielt. Das gleiche Ergebnis lieferte die Studie von Fukuda, R., et. al, bei der das Lungenhomogenat von Mäusen, die drei Wochen in einer Atmosphäre mit 10% O₂ gehalten wurden, ebenso erhöhte Cox4i2 mRNA aufwies.

Diese Studie konnte bei HOX1/24, HOX1/48, HOX7/12 und in Lungenhomogenat hypoxisch inkubierter Ratten gesteigerte mRNA-Levels von GLUT1 nachweisen. Somit liegt nahe, dass unter *in-vivo*-Bedingungen Hypoxie zu einer Umstellung des zellulären Stoffwechsels in der Lunge und zu einem verstärkten Glucosebedarf führen.

PDK1 war im Lungenhomogenat etwas erhöht, erreichte allerdings keine Signifikanz. Auch unter *in-vitro* Hypoxie fand sich bei O₂-Konzentrationen von 7% keine signifikante Regulation. Somit scheint denkbar, dass die HIF-vermittelte Hemmung von PDH über PDK1 erst bei niedrigeren O₂-Konzentrationen einsetzt. In früheren Studien hat sich gezeigt, dass HIF-1 α -Protein schon bei O₂-Konzentrationen von 5% erhöht sei, aber bei geringeren Konzentrationen unter 1% O₂ auf den 10-fachen Wert ansteige [164,165] und damit bei niedrigeren O₂-Konzentrationen eine größere Wirkung entfalten könne.

4.10 Funktionsweise von DCA

DCA ist eine gut bekannte und beforschte Substanz, für die bereits in den Siebzigerjahren des 20. Jahrhunderts ein Einfluss auf den Glucosestoffwechsel festgestellt werden konnte. So zeigte sich beispielsweise bei Ratten mit einer diabetischen Stoffwechsellage ein Rückgang der Hyperglykämie [166]. Letztlich wurde erkannt, dass DCA die Aktivität von PDH steigerte, was sich auf eine Inhibierung von PDK zurückführen ließ [167].

Neben Versuchen mit DCA zur Behandlung von PH in Tiermodellen [48] wurde die Substanz auch bei klinischen Versuchen am Menschen getestet. Die Zielsetzung war hier jedoch in erster Linie, eine bestehende Laktatazidose bei Kindern mittels DCA auszugleichen. Bei dieser ersten doppelblinden, randomisierten Studie konnte zwar die klinische Situation nicht verbessert werden, aber der Laktatspiegel im Blut sank ab [50]. Dies steht im Einklang mit der erhöhten LDHa-Expression nach 48-stündiger Inkubation in 1%iger Hypoxie und DCA, da davon auszugehen ist, dass DCA für einen so starken Abfall der Pyruvatkonzentration sorgt, dass Laktat über die LDH zu Pyruvat katalysiert wird.

Auch im Rahmen von Krebserkrankungen ist DCA als mögliches Therapeutikum in der Diskussion. Laut Wong, J.Y., et al. konnte mittels DCA in endometrialen Tumorzellen Apoptose induziert werden. [168]. Ähnliche Ergebnisse erzielte Michelakis, E.D., et al. mit Gewebe von Glioblastomen. Die Mitochondrien aus diesem Gewebe seien hyperpolarisiert, was die Zellproliferation begünstige und die Apoptose verhindere. Durch die Gabe von DCA würden sich die Mitochondrien depolarisieren, es käme zu einer ROS-Erhöhung und schließlich zu einer Apoptose, *in-vitro* sowie *in-vivo*. Zusätzlich werde HIF-1 α durch DCA indirekt inhibiert [169]. Die Mitochondrien aus PH-Gewebe wiesen einen ähnlichen Phänotyp wie in Karzinomgewebe auf. Wie bei Krebszellen liege auch bei PH eine Hyperpolarisation der Mitochondrien vor, die durch DCA rückgängig gemacht werden könne, um apoptotische Signale aus den Mitochondrien in das Zytoplasma zu leiten [29]. In einer Studie von Bonnet, S., et al. konnten ergänzend gezeigt werden dass eine Ausschaltung von PDK mit siRNA in Krebszellen die gleiche Wirkung zeigte wie die Gabe von DCA [170].

Als vorteilhaft erweist sich, dass DCA in klinischen Versuchen kaum Nebenwirkungen aufwies, mit Ausnahme einer eventuell auftretenden peripheren Neuropathie [171]. DCA entfalte seine Wirkung nämlich nicht in Zellen mit normaler Stoffwechsellage, sondern wirke laut Stockwin, L.H., et al. selektiv auf Zellen mit einer defekten mitochondrialen

DNA oder mit einem Cox-Defizit [172]. Eine gezielte Wirkung liegt wahrscheinlich auch bei PH vor. So wurde in der Arbeit von Michelakis, E.D., et al. bei PAGMZ-Kontrollzellen, die mit DCA behandelt wurden, keine Veränderung zu unbehandelten PAGMZ gefunden [48]. Gerade die Parallelen zwischen PH und Krebs, die Verträglichkeit und die Selektivität machen DCA als Schalter zwischen zwei Stoffwechselzuständen in Zukunft für weitere Forschung interessant.

4.11 Effekte von DCA auf Hypoxie-induzierte mitochondriale Veränderungen

Die mitochondriale Respiration war besonders in der Gruppe HOX1/48 eingeschränkt. J_R , J_E und der O_2 -Verbrauch von Komplex IV waren hierbei erniedrigt. Durch den PDK-Inhibitor DCA [173] konnten diese Veränderungen in Bezug auf J_R und J_E nicht verhindert werden. Allerdings war der O_2 -Verbrauch von Komplex IV bei HOX1/48 DCA erhöht im Vergleich zu hypoxischen Referenzgruppe HOX1/48. Des Weiteren zeigte sich eine erhöhte O_2 -Affinität in der HOX1/48DCA-Gruppe. Damit hätte DCA, zumindest *in-vitro*, nur einen isolierten Effekt auf Cox und keinen Einfluss auf die proximalen Anteile der ETC, die entscheidend zur Regulation des Protonendurchflusses beitragen. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da DCA PDK hemmt und durch die erhöhte Aktivierung von PDH eine erhöhte Substratproduktion für den Citratzyklus und damit auch eine erhöhte Respiration erwartet wurde.

Da die Hemmung von PDK scheinbar nicht zu einer Substraterhöhung für den Citratzyklus beiträgt, liegt eine mögliche Erklärung in anderen Effekten von DCA, so kann z.B. die Fettsäuresynthese durch DCA inhibiert werden [167]. Eine Reduzierung des Laktatspiegels und auch eine Verringerung der Glutaminaufnahme und der Glutaminolyse sind weitere mögliche Wirkungen von DCA. In zahlreichen Studien wird dabei aufgezeigt, dass ein verringerter Laktatspiegel anti-proliferativ wirken könnte und dass Tumorzellen und hypoxische Zellen in besonderer Weise von Glutamin abhängig sind [174-178]. In Übereinstimmung mit dieser These zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung eine signifikant erhöhte Expression von LDHa. Die Expression des Apoptose-Signalproteins p66SHC war nicht signifikant erhöht.

Die positiven therapeutischen Eigenschaften von DCA gehen des Weiteren auf eine indirekte Hemmung von HIF zurück. Dies könnte über einen Anstieg von mitochondrialen ROS und erhöhter p53-Aktivierung oder auch durch einen Anstieg von α -Ketoglutarat geschehen, das einen Kofaktor der Inhibierung von HIF-1 α darstellt [169].

Andere Veröffentlichungen zeigen auch, dass DCA die Atmung Zelltyp-spezifisch beeinflusst, z.B. beim multiplen Myelom oder auch bei dem oralen Plattenepithelkarzinom [179,180].

Die Arbeit von Michelakis zeigte, dass DCA im Hypoxie-Modell die Zeichen einer PH vorbeugen und auch rückgängig machen kann. SD-Ratten wurden hierbei in 4 Gruppen eingeteilt: Normoxie, Normoxie mit DCA, Hypoxie und Hypoxie mit DCA. Die

hypoxischen Ratten waren dabei für zwei bis drei Wochen in einer Atmosphäre mit 10% O₂. Mit dem Trinkwasser wurde die Substanz aufgenommen. Letztlich war der PAP in der Gruppe mit DCA-Gabe deutlich verringert und die Tunica media der Pulmonalarterie wies im Vergleich mit der hypoxischen Gruppe eine geringere Dicke auf. Nach längerfristiger Gabe von DCA waren in PAGMZ die Kv2.1-Kaliumkanäle verstärkt exprimiert, allerdings konnte keine verstärkte Aktivität von PDH nachgewiesen werden. In Immunblotting-Daten von isolierten PA erschien die PDK-Expression bei chronischer Hypoxie erhöht, war aber nach DCA-Gabe nicht reversibel [48]. Im Rahmen dieser Arbeit war PDK1 nach DCA-Gabe verringert transkribiert. GLUT1 wies keine signifikante Regulation durch DCA auf.

Im Monocrotalin-induzierten PH-Modell konnte DCA die krankhaften Veränderungen vorbeugen oder rückgängig machen. In diesem Modell konnte nachweislich die Hämodynamik und die Rechtsherzhypertrophie bekämpft werden. Außerdem zeigte sich unter DCA-Einfluss eine größere Tendenz zur Apoptose, was den vaskulären Umbauprozessen entgegensteht [29].

Cox4i2 und Cox4i1 wiesen in dieser Studie beide eine signifikant verminderte mRNA-Menge nach DCA im Vergleich von lediglich in Hypoxie inkubierten PAGMZ auf. Somit konnte gezeigt werden, dass DCA dem isolierten hypoxischen Effekt auf Cox vorbeugen konnte. Cox4i1 war im Vergleich zu Cox4i2 quantitativ geringer reguliert. Es konnte aber im Gegensatz zu anderen Studien festgestellt werden, dass auch Cox4i1 durch die O₂-Konzentration beeinflusst wird und nicht ausschließlich über das Verhältnis ADP/ATP [111,181]. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass ein Verlust von Cox4i2 zu einer verminderten COX-Aktivität führte, was wiederum zu einem verminderten ATP-Spiegel führte [88]. Somit könnte DCA zu einer Verminderung der energieaufwendigen Vasokonstriktion und Proliferation in chronisch hypoxischen PAGMZ beitragen.

Unter DCA Inkubation war die Cox8b-mRNA im Gegensatz zu alleinig in Hypoxie inkubierten PAGMZ in dieser Arbeit hochsignifikant herunterreguliert. Wie bereits beschrieben, sind die Ausprägungen von Isoenzymen Spezies- und Gewebe-spezifisch [182-184]. Beispielsweise ist Cox8b in braunem Fettgewebe signifikant überexprimiert im Gegensatz zu weißem Fettgewebe [90,185]. Die Aufgabe des braunen Fettgewebes besteht in erster Linie in Erzeugung von Wärme. Im Umkehrschluss wäre es hypothetisch denkbar, dass sich ein gesteigertes Protonen-*leak* in einer erhöhten Expression von Cox8b widerspiegelt. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit keine veränderte *leak*-Respiration gefunden. Generell scheint Cox8 für eine effektive Respiration und Cox-

Aktivität benötigt zu werden [91]. Die genaue Funktion von Cox8b bleibt allerdings noch unklar und müsste ggf. weiter beforscht werden.

4.12 Schlussfolgerungen

1) Nach prolongierter hypoxischer Inkubation in 1% und 7% O₂ war die mitochondriale Respiration reduziert. Der O₂-Verbrauch von Komplex IV der Atmungskette war nach 48-stündiger Inkubation in 1%-iger Hypoxie verringert. Die O₂-Affinität von PAGMZ war nach oben genannter hypoxischer Inkubation verringert.

Daneben fand sich eine erhöhte Expression u.a. von Cox4i2 nach hypoxischer Inkubation, sowohl in isolierten PAGMZ als auch in Lungenhomogenat von Hypoxie-inkubierten Ratten.

Cox4i2 zeigt ferner eine erhöhte Konzentration auf Proteinebene.

Dies legt nahe, dass Hypoxie die Zellrespiration beeinflussen kann und dass durch prolongierte Hypoxie eine strukturelle Veränderung der Untereinheitenkomposition der Cox induziert wird.

Durch den veränderten Aufbau des Enzymkomplexes scheint die Cox eine verringerte Affinität für O₂ aufzuweisen. Durch die veränderte mitochondriale Funktion wird möglicherweise auch die mitochondriale ROS-Freisetzung reguliert. Zusätzlich wird die ROS-Freisetzung durch einen Anstieg von SOD2 und eine Reduktion der Expression von p66SHC nach 48-stündiger hypoxischer Inkubation mit 1% pO₂ inhibiert.

Außerdem waren die Expression glykolytischer Enzyme im Sinne eines "*metabolic switch*" nach hypoxischer Inkubation erhöht. Dies war bei LDHa und GLUT1 nach 1%-iger und nach 7%-iger hypoxischer Inkubation der Fall.

mRNA von PDK1 und PDK2 waren hochsignifikant reguliert, wobei das wichtigere „Schaltstellen-Enzym“ zwischen OXPHOS und anaerober Glycolyse, PDK2, herabreguliert war und PDK1 verstärkt exprimiert war.

Zusammen mit den Respirationsversuchen ergibt sich daraus der Hinweis, dass die OXPHOS auch durch einen Substratmangel nach chronischer Hypoxie inhibiert war.

2) Durch die Gabe von DCA konnten eine verringerte Respiration von Komplex IV sowie eine verringerte Affinität von O₂ für Cox in Hypoxie-inkubierten PAGMZ verhindert werden. Auch die Expression von Cox4i2 und PDK1 war unter DCA verringert.

Die Gesamt-Respiration der Atmungskette blieb allerdings auch in Anwesenheit von DCA in Hypoxie-inkubierten PAGMZ unverändert erniedrigt. Dies würde bedeuten, dass DCA die Hypoxie-induzierte Expression von glykolytischen Enzymen und von Cox4i2 verhindert, ohne die OXPHOS anzuheben. Die DCA-induzierten Veränderungen wären daher eher durch eine Inhibierung der anaeroben Glycolyse (mit exzessivem Laktatanstieg) als durch eine Aktivierung der OXPHOS verursacht.

3) Eine veränderte Zusammensetzung verschiedener Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase, vor allem von Cox4, sowie der "*metabolic switch*" spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Hypoxie-induzierten PH über Regulation von zellulärer ROS-Homöostase, ATP-Herstellung, Apoptose-induktion und Aminosäurestoffwechsel. Diese am ehesten HIF-induzierten Veränderungen des Zellstoffwechsels stellen eventuell ein *target* für eine medikamentöse Therapie dar.

4) Die Konzentration von Mitochondrien war in Hypoxie-inkubierten PAGMZ ebenso hoch wie in Kontrollzellen. Darauf lässt sich schließen, da die mitochondrialen CS-Aktivität bei Kontrollzellen im Vergleich zu hypoxisch inkubierten PAGMZ unverändert war. Die verringerte Respiration nach Hypoxie wäre somit nicht durch eine Verringerung der Mitochondrienzahl, sondern tatsächlich durch eine Modulation des Zellstoffwechsels bedingt.

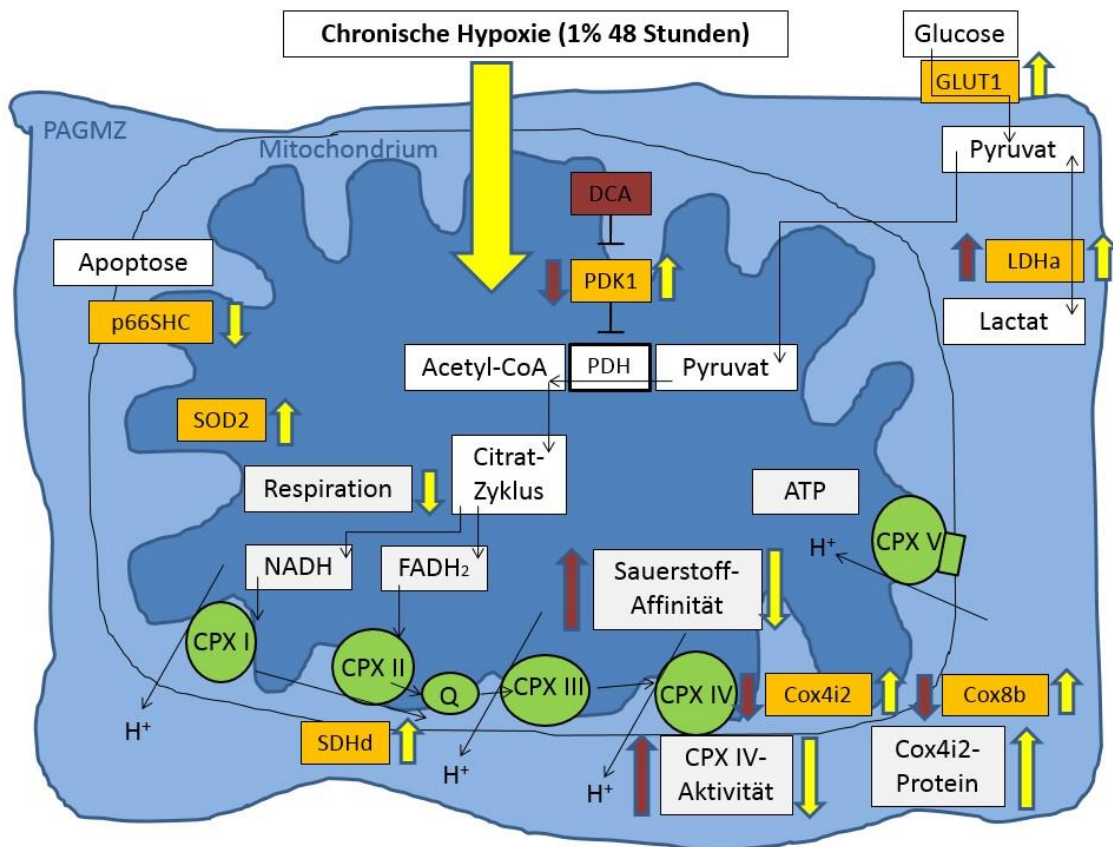


Abb. 28: Schematische Darstellung einer PAGMZ mit Hypoxie-induzierten Veränderungen der mitochondrialen Funktionen (siehe Textfeld) sowie Veränderung der Genexpression einzelner Proteine (orange dargestellt). Daneben Illustration der Wirkung von DCA (rot dargestellt).

ATP= Adenosintriphosphat; Cox= Cytochrom-c-Oxidase; CPX= Komplexenzym; FADH₂= Flavin-Adenin-Dinukleotid; GLUT= Glucose Transporter; LDH= Lactatdehydrogenase; NADH= Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid; p66SHC= SH2 enthaltendes Proto-Onkogen p66; PDH= Pyruvatdehydrogenase; PDK= Pyruvatdehydrogenase-Kinase; SDH= Succinatdehydrogenase; SOD= O₂⁻-Dismutase;

In Abb. 28 dargestellt finden sich die graphisch zusammengefassten Kernergebnisse der vorliegenden Arbeit: Nach chronischer Hypoxieexposition kommt es zu Zeichen eines erhöhten anaeroben Glucosestoffwechsels und inhibierter Glucoseoxidation. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der mRNA des Glucosetransporters GLUT1. Daneben ist LDHa und PDK1 verstärkt exprimiert, was für einen gesteigerten anaeroben Glucosestoffwechsel spricht. Parallel werden nach chronischer Hypoxieexposition die Gene von SDHd,

Cox4i2 und Cox8b vermehrt exprimiert. Dagegen ist nach Hypoxieexposition die Respiration von Cox und die Gesamtrespiration vermindert.

DCA kann diesen Veränderungen teilweise inhibieren.

Die O₂-Affinität der Atmungskette sinkt nach Hypoxieexposition. Des Weiteren zeigt sich eine Verminderung der Expression des pro-apoptischen p66SHC-Gens nach Hypoxie. Die Expression des ROS-„Scavenger“ SOD2 ist nach Hypoxie erhöht.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Pathogenese der pulmonalerteriellen Hypertonie (PAH) kommt es zu einem Gefäß-*remodeling* und zu Proliferation von pulmonalerteriellen glatten Muskelzellen (PAGMZ). Mitochondrien spielen hierbei eine wichtige Rolle in der Krankheitsentwicklung, da sie zentrale Funktionen in der Regulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Calciumhomöostase und Apoptose einnehmen. Nicht zuletzt bildet der mitochondriale Citratzyklus die Drehscheibe des Zellstoffwechsels, und die Atmungskette fungiert als Hauptproduzent von Adenosintriphosphat (ATP).

Das Ziel dieser Arbeit war, im Modell der Hypoxie-induzierten PAH Veränderungen der mitochondrialen Atmung zwischen Kontrollzellen und hypoxisch inkubierten Zellen aufzudecken. Dazu wurden isolierte PAGMZ 24 und 48 Stunden mit 1% oder 7% Sauerstoff (O_2) hypoxisch inkubiert. Daneben wurden die O_2 -Affinität und die Atmung an einzelnen Komplexenzymen der Atmungskette untersucht. Ergänzend erfolgte die Analyse der *messenger* Ribonukleinsäure(mRNA)-Menge von verschiedenen Proteinen der Atmungskette, des Zellstoffwechsels und des mitochondrialen ROS-Stoffwechsels. Die Messungen erfolgten dabei nach 12, 24 und 48 Stunden. Schließlich sollte in dieser Studie untersucht werden, ob eine pharmakologische Intervention mit Dichloroacetat (DCA) Hypoxie-induzierten Veränderungen der Atmung und der Transkription vorbeugen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass eine chronische Hypoxieexposition von 1% O_2 zu einer verminderten Atmung und zu einer verminderten O_2 -Affinität in PAGMZ führt. Bei 7% O_2 war lediglich die Atmung reduziert. Die Aktivität von Cytochrom-c-Oxidase (Cox) war nur nach chronischer Hypoxieexposition von 1% O_2 herabgesetzt.

Nach chronischer Hypoxieexposition fanden sich zahlreiche Veränderungen der mRNA-Menge, so waren Glucose Transporter (GLUT) 1 und Lactatdehydrogenase (LDH) a als Vertreter des Zellstoffwechsels erhöht. Succinatdehydrogenase (SDH) d, Cox8b und insbesondere Cox4i2 waren ebenfalls teils hochsignifikant hochreguliert. Ferner zeigte sich eine Erhöhung der mRNA-Menge von Superoxid-Dismutase (SOD) 2 als Protein des ROS-Stoffwechsels. Der Apoptose-Marker p66 *SH2 containing proto-oncogene* (SHC) war verringert exprimiert.

Die Proteinkonzentration des bedeutenden Isoenzyms 2 von Cox4 war nach Hypoxieexposition erhöht.

Nach Gabe des Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK) 1-Inhibitors DCA konnte der hypoxische Effekt auf Cox, aber nicht auf die Respiration inhibiert werden. Durch Gabe von DCA konnte die mRNA von LDHa im Vergleich zu alleinig hypoxisch inkubierten Zellen weiter gesteigert werden. Die mRNA von PDK1, Cox4i2 und Cox8b war verringert. Zusammenfassend könnte DCA somit über eine Reduktion des Laktatspiegels einen antiproliferativen Effekt aufweisen, den man möglicherweise therapeutisch nutzen könnte.

6. Summary

Vascular remodeling and cell proliferation are part of the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH). Mitochondria play an important role in disease development, due to their important functions in the regulation of reactive oxygen species (ROS), calcium homeostasis and apoptosis. Last but not least, the mitochondrial tricarboxylic acid cycle forms the hub in cell metabolism and the electron transport chain (ETC) acts as the main producer of adenosine triphosphate (ATP).

The aim of this study was to elucidate the hypoxia-induced changes in mitochondrial respiration between normoxic control cells and hypoxic incubated cells with help of a model of the hypoxia-induced PAH. For this purpose, isolated pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) were incubated in 1% or 7% oxygen (O₂) for 24 and for 48 hours. In addition, the O₂ affinity and the respiration of defined complex enzymes of the ETC were investigated. Complementary, the analysis of the messenger ribonucleic acid (mRNA) amount of various proteins of the ETC, the cell metabolism and the mitochondrial ROS metabolism took place. The measurements were carried out after 12, 24 and 48 hours. Finally, this study aimed to investigate whether pharmacological intervention with dichloroacetate (DCA) can prevent hypoxia-induced changes in respiration and mRNA amount.

It could be shown that chronic exposure to hypoxia of 1% O₂ leads to reduced respiration and reduced O₂ affinity in PASMC. At 7% O₂, only respiration was reduced. The activity of cytochrome-c-oxidase (Cox) was reduced only after chronic exposure to 1% O₂.

After chronic exposure to hypoxia, there were numerous changes in the amount of mRNA, so were glucose transporter (GLUT) 1 and lactate dehydrogenase (LDH) a, as representatives of the cell metabolism increased. Succinate dehydrogenase (SDH) d, Cox8b and especially Cox4i2 were also highly regulated. Furthermore, there was an increase in the amount of mRNA of superoxide dismutase (SOD) 2, as a protein of the ROS metabolism. The apoptosis marker p66 *SH2 containing proto-oncogene* (SHC) was decreased.

The protein concentration of Cox4i2 was increased after exposure to hypoxia.

After administration of the pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) 1 inhibitor DCA, the hypoxic effect on Cox but not on the respiration could be inhibited. By administration of DCA, the mRNA of LDHa could be further increased in comparison to hypoxically

incubated cells alone. The mRNA of PDK1, Cox4i2 and Cox8b was reduced. In conclusion, DCA could have an antiproliferative effect via a reduction of the lactate level that could possibly be used therapeutically.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Romberg Ev. Über Sklerose der Lungenarterie. Dtsch Arch Klin Med 1891;48:197-206.
- [2] Dresdale DT, Schultz M, Michtom RJ. Primary pulmonary hypertension. I. Clinical and hemodynamic study. Am J Med 1951;11 (6):686-705.
- [3] Dresdale DT, Michtom RJ, Schultz M. Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. Bull N Y Acad Med 1954;30 (3):195-207.
- [4] Fishman AP. Dietary pulmonary hypertension. Circ Res 1974;35 (5):657-60.
- [5] Renner MK LI. Aktuelle Aspekte der Pulmonalen Hypertonie. Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology 2010;17 ((7-8)):293-9.
- [6] Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. J Am Coll Cardiol;62 (25 Suppl):D34-41.
- [7] Chaouat A, Bugnet AS, Kadaoui N, Schott R, Enache I, Ducolone A, Ehrhart M, Kessler R, Weitzenblum E. Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med, 2005. pp. 189-94.
- [8] Oswald-Mammoser M, Weitzenblum E, Quoix E, Moser G, Chaouat A, Charpentier C, Kessler R. Prognostic factors in COPD patients receiving long-term oxygen therapy. Importance of pulmonary artery pressure. Chest 1995;107 (5):1193-8.
- [9] Doi M, Nakano K, Hiramoto T, Kohno N. Significance of pulmonary artery pressure in emphysema patients with mild-to-moderate hypoxemia. Respir Med 2003;97 (8):915-20.
- [10] Kessler R, Faller M, Fourgaut G, Menecier B, Weitzenblum E. Predictive factors of hospitalization for acute exacerbation in a series of 64 patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1999;159 (1):158-64.
- [11] Shorr AF, Wainright JL, Cors CS, Lettieri CJ, Nathan SD. Pulmonary hypertension in patients with pulmonary fibrosis awaiting lung transplant. Eur Respir J 2007;30 (4):715-21.
- [12] Braun-Moscovici Y, Nahir AM, Balbir-Gurman A. Endothelin and pulmonary arterial hypertension. Semin Arthritis Rheum 2004;34 (1):442-53.
- [13] Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. Cardiovasc Res 2004;61 (2):227-37.
- [14] Uguccioni M, Pulsatelli L, Grigolo B, Facchini A, Fasano L, Cinti C, Fabbri M, Gasbarrini G, Meliconi R. Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. J Clin Pathol 1995;48 (4):330-4.
- [15] Ghofrani HA, Reichenberger F, Kohstall MG, Mrosek EH, Seeger T, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at low altitudes and at Mount Everest base camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. Ann Intern Med 2004;141 (3):169-77.
- [16] Yang T, Li X, Qin J, Li S, Yu J, Zhang J, Yu S, Wu X, Huang L. High altitude-induced borderline pulmonary hypertension impaired cardiorespiratory fitness in healthy young men. Int J Cardiol;181C:382-8.
- [17] Faoro V, Huez S, Vanderpool R, Groepenhoff H, de Bisschop C, Martinot JB, Lamotte M, Pavelescu A, Guenard H, Naeije R. Pulmonary circulation and gas

- exchange at exercise in Sherpas at high altitude. *J Appl Physiol* (1985);116 (7):919-26.
- [18] Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation* 1958;18 (4 Part 1):533-47.
 - [19] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2008;118 (7):2372-9.
 - [20] Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, Maegel L, Hoeper MM, Gottlieb J, Nickel N, Hussein K, Maus U, Lehmann U, Janciauskiene S, Welte T, Haverich A, Rische J, Kreipe H, Laenger F. Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment. *Am J Pathol*;179 (1):167-79.
 - [21] Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, Ohnishi K, Masuda H, Dahan D, Takeya M, Guibert C, Marthan R. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. *J Vasc Res*;49 (1):33-42.
 - [22] Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, Jessup M, Grizzle WE, Aldred MA, Cool CD, Tudor RM. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*;186 (3):261-72.
 - [23] St Croix CM, Steinhorn RH. New Thoughts about the Origin of Plexiform Lesions. *Am J Respir Crit Care Med*;193 (5):484-5.
 - [24] Zaiman A, Fijalkowska I, Hassoun PM, Tudor RM. One hundred years of research in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33 (5):425-31.
 - [25] Pousada G, Balloira A, Valverde D. Complex inheritance in Pulmonary Arterial Hypertension patients with several mutations. *Sci Rep*;6:33570.
 - [26] Viales RR, Eichstaedt CA, Ehlken N, Fischer C, Lichtblau M, Grunig E, Hinderhofer K. Mutation in BMPR2 Promoter: A 'Second Hit' for Manifestation of Pulmonary Arterial Hypertension? *PLoS One*;10 (7):e0133042.
 - [27] Hales CA. The site and mechanism of oxygen sensing for the pulmonary vessels. *Chest* 1985;88 (4 Suppl):235S-40S.
 - [28] Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 2005;98 (1):390-403.
 - [29] McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res* 2004;95 (8):830-40.
 - [30] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* 2006;99 (7):675-91.
 - [31] Pak O, Aldashev A, Welsh D, Peacock A. The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *Eur Respir J* 2007;30 (2):364-72.
 - [32] Chaouat A, Savale L, Chouaid C, Tu L, Sztrymf B, Canuet M, Maitre B, Housset B, Brandt C, Le Corvoisier P, Weitzenblum E, Eddahibi S, Adnot S. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. *Chest* 2009;136 (3):678-87.
 - [33] Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281 (2):L314-7.
 - [34] Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial

- complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J Biol Chem* 2000;275 (33):25130-8.
- [35] Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Veit F, Kwapiszewska G, Weisel FC, Milger K, Egemnazarov B, Turowska A, Fuchs B, Nikam S, Roth M, Sydykov A, Medebach T, Klepetko W, Jaksch P, Dumitrascu R, Garn H, Voswinckel R, Kostin S, Seeger W, Schermuly RT, Grimminger F, Ghofrani HA, Weissmann N. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell*;147 (2):293-305.
- [36] Wilkinson M, Langhorne CA, Heath D, Barer GR, Howard P. A pathophysiological study of 10 cases of hypoxic cor pulmonale. *Q J Med* 1988;66 (249):65-85.
- [37] Naeije R, Barbera JA. Pulmonary hypertension associated with COPD. *Crit Care* 2001;5 (6):286-9.
- [38] Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 1987;107 (2):216-23.
- [39] Grunig E, Barner A, Bell M, Claussen M, Dandel M, Dumitrescu D, Gorenflo M, Holt S, Kovacs G, Ley S, Meyer JF, Pabst S, Riemekasten G, Saur J, Schwaiblmair M, Seck C, Sinn L, Soricter S, Winkler J, Leuchte HH. [Non-invasive diagnosis of pulmonary hypertension: ESC/ERS Guidelines with commentary of the Cologne Consensus Conference 2010]. *Dtsch Med Wochenschr*;135 Suppl 3:S67-77.
- [40] Trip P, Nossent EJ, de Man FS, van den Berk IA, Boonstra A, Groepenhoff H, Leter EM, Westerhof N, Grunberg K, Bogaard HJ, Vonk-Noordegraaf A. Severely reduced diffusion capacity in idiopathic pulmonary arterial hypertension: patient characteristics and treatment responses. *Eur Respir J*;42 (6):1575-85.
- [41] Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CP, Gustafsson P, Hankinson J, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Wanger J. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005;26 (5):948-68.
- [42] Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M, Aboyans V, Vaz Carneiro A, Achenbach S, Agewall S, Allanore Y, Asteggiano R, Paolo Badano L, Albert Barbera J, Bouvaist H, Bueno H, Byrne RA, Carerj S, Castro G, Erol C, Falk V, Funck-Brentano C, Gorenflo M, Granton J, Iung B, Kiely DG, Kirchhof P, Kjellstrom B, Landmesser U, Lekakis J, Lionis C, Lip GY, Orfanos SE, Park MH, Piepoli MF, Ponikowski P, Revel MP, Rigau D, Rosenkranz S, Voller H, Luis Zamorano J. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*;37 (1):67-119.
- [43] Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Herve P, Simonneau G. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005;111 (23):3105-11.

- [44] He B, Zhang F, Li X, Tang C, Lin G, Du J, Jin H. Meta-analysis of randomized controlled trials on treatment of pulmonary arterial hypertension. *Circ J*;74 (7):1458-64.
- [45] Galie N, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML, Branzi A. A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 2009;30 (4):394-403.
- [46] Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, Pennock JL, Billingham ME, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med* 1982;306 (10):557-64.
- [47] Bando K, Armitage JM, Paradis IL, Keenan RJ, Hardesty RL, Konishi H, Komatsu K, Stein KL, Shah AN, Bahnson HT, et al. Indications for and results of single, bilateral, and heart-lung transplantation for pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108 (6):1056-65.
- [48] Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC, Dyck JR, Moudgil R, Hopkins TA, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Waite R, Archer SL. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation* 2002;105 (2):244-50.
- [49] Li B, Yan J, Shen Y, Liu Y, Ma Z. Dichloroacetate prevents but not reverses the formation of neointimal lesions in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Mol Med Rep*;10 (4):2144-52.
- [50] Stacpoole PW, Kerr DS, Barnes C, Bunch ST, Carney PR, Fennell EM, Felitsyn NM, Gilmore RL, Greer M, Henderson GN, Hutson AD, Neiberger RE, O'Brien RG, Perkins LA, Quisling RG, Shroads AL, Shuster JJ, Silverstein JH, Theriaque DW, Valenstein E. Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children. *Pediatrics* 2006;117 (5):1519-31.
- [51] Dunbar EM, Coats BS, Shroads AL, Langaee T, Lew A, Forder JR, Shuster JJ, Wagner DA, Stacpoole PW. Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. *Invest New Drugs*;32 (3):452-64.
- [52] Chu QS, Sangha R, Spratlin J, Vos LJ, Mackey JR, McEwan AJ, Venner P, Michelakis ED. A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*;33 (3):603-10.
- [53] Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 1967;14 (3):255-74.
- [54] Gray MW, Burger G, Lang BF. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* 2001;2 (6):REVIEWS1018.
- [55] Horn F. *Biochemie des Menschen*: Thieme Verlag.
- [56] Rich PR. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans* 2003;31 (Pt 6):1095-105.
- [57] Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life*;65 (11):904-10.
- [58] Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 1999;283 (5407):1488-93.
- [59] Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961;191:144-8.
- [60] Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* 1955;217 (1):383-93.
- [61] Jones DP. Intracellular diffusion gradients of O₂ and ATP. *Am J Physiol* 1986;250 (5 Pt 1):C663-75.

- [62] Bender E, Kadenbach B. The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Lett* 2000;466 (1):130-4.
- [63] Steenaart NA, Shore GC. Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV is phosphorylated by an endogenous kinase. *FEBS Lett* 1997;415 (3):294-8.
- [64] Lee I, Salomon AR, Ficarro S, Mathes I, Lottspeich F, Grossman LI, Huttemann M. cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J Biol Chem* 2005;280 (7):6094-100.
- [65] Huttemann M, Lee I, Grossman LI, Doan JW, Sanderson TH. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Adv Exp Med Biol*;748:237-64.
- [66] Huang LJ, Chuang IC, Dong HP, Yang RC. Hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the expression of the mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in rat liver. *Shock*;36 (1):90-6.
- [67] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*;148 (3):399-408.
- [68] Michelakis ED, Webster L, Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer* 2008;99 (7):989-94.
- [69] Sazanov LA. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* 2007;46 (9):2275-88.
- [70] Efremov RG, Sazanov LA. Respiratory complex I: 'steam engine' of the cell? *Curr Opin Struct Biol*;21 (4):532-40.
- [71] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417 (1):1-13.
- [72] Iuso A, Scacco S, Piccoli C, Bellomo F, Petruzzella V, Trentadue R, Minuto M, Ripoli M, Capitanio N, Zeviani M, Papa S. Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I. *J Biol Chem* 2006;281 (15):10374-80.
- [73] Hagerhall C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta* 1997;1320 (2):107-41.
- [74] Horsefield R, Iwata S, Byrne B. Complex II from a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci* 2004;5 (2):107-18.
- [75] Dannenberg H, Dinjens WN, Abbou M, Van Urk H, Pauw BK, Mouwen D, Mooi WJ, de Krijger RR. Frequent germ-line succinate dehydrogenase subunit D gene mutations in patients with apparently sporadic parasympathetic paraganglioma. *Clin Cancer Res* 2002;8 (7):2061-6.
- [76] Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 1998;281 (5373):64-71.
- [77] Yu L, Yang S, Yin Y, Cen X, Zhou F, Xia D, Yu CA. Chapter 25 Analysis of electron transfer and superoxide generation in the cytochrome bc1 complex. *Methods Enzymol* 2009;456:459-73.
- [78] Huttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G, Varughese A, Lu G, Liu J, Ramzan R, Vogt S, Grossman LI, Doan JW, Marcus K, Lee I. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim Biophys Acta*;1817 (4):598-609.

- [79] Bleier L, Droese S. Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim Biophys Acta*;1827 (11-12):1320-31.
- [80] Trumpower BL. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem* 1990;265 (20):11409-12.
- [81] Babcock GT, Wikstrom M. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 1992;356 (6367):301-9.
- [82] Leavesley HB, Li L, Prabhakaran K, Borowitz JL, Isom GE. Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicol Sci* 2008;101 (1):101-11.
- [83] Nakamoto RK, Baylis Scanlon JA, Al-Shawi MK. The rotary mechanism of the ATP synthase. *Arch Biochem Biophys* 2008;476 (1):43-50.
- [84] Shchepina LA, Pletjushkina OY, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Fetisova EK, Izyumov DS, Saprunova VB, Vyssokikh MY, Chernyak BV, Skulachev VP. Oligomycin, inhibitor of the F₀ part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene* 2002;21 (53):8149-57.
- [85] Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 1996;272 (5265):1136-44.
- [86] Hendler RW, Pardhasaradhi K, Reynafarje B, Ludwig B. Comparison of energy-transducing capabilities of the two- and three-subunit cytochromes aa₃ from *Paracoccus denitrificans* and the 13-subunit beef heart enzyme. *Biophys J* 1991;60 (2):415-23.
- [87] Arnold S. The power of life-Cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion*;12 (1):46-56.
- [88] Huttemann M, Lee I, Gao X, Pecina P, Pecinova A, Liu J, Aras S, Sommer N, Sanderson TH, Tost M, Neff F, Aguilar-Pimentel JA, Becker L, Naton B, Rathkolb B, Rozman J, Favor J, Hans W, Prehn C, Puk O, Schrewe A, Sun M, Hofler H, Adamski J, Bekeredjian R, Graw J, Adler T, Busch DH, Klingenspor M, Klopstock T, Ollert M, Wolf E, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabe de Angelis M, Weissmann N, Doan JW, Bassett DJ, Grossman LI. Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2-knockout mice show reduced enzyme activity, airway hyporeactivity, and lung pathology. *FASEB J*;26 (9):3916-30.
- [89] Huttemann M, Schmidt TR, Grossman LI. A third isoform of cytochrome c oxidase subunit VIII is present in mammals. *Gene* 2003;312:95-102.
- [90] Birerdinc A, Jarrar M, Stotish T, Randhawa M, Baranova A. Manipulating molecular switches in brown adipocytes and their precursors: a therapeutic potential. *Prog Lipid Res*;52 (1):51-61.
- [91] Patterson TE, Poyton RO. COX8, the structural gene for yeast cytochrome c oxidase subunit VIII. DNA sequence and gene disruption indicate that subunit VIII is required for maximal levels of cellular respiration and is derived from a precursor which is extended at both its NH₂ and COOH termini. *J Biol Chem* 1986;261 (36):17192-7.
- [92] Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* 2001;88 (12):1259-66.
- [93] Firth AL, Gordienko DV, Yuill KH, Smirnov SV. Cellular localization of mitochondria contributes to Kv channel-mediated regulation of cellular

- excitability in pulmonary but not mesenteric circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296 (3):L347-60.
- [94] Frijhoff J, Dagnell M, Augsten M, Beltrami E, Giorgio M, Ostman A. The mitochondrial reactive oxygen species regulator p66Shc controls PDGF-induced signaling and migration through protein tyrosine phosphatase oxidation. *Free Radic Biol Med*;68C:268-77.
 - [95] Betts DH, Bain NT, Madan P. The p66(Shc) Adaptor Protein Controls Oxidative Stress Response in Early Bovine Embryos. *PLoS One*;9 (1):e86978.
 - [96] Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J* 2008;409 (1):19-26.
 - [97] Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86 (1):147-57.
 - [98] Carafoli E. Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends Biochem Sci* 2003;28 (4):175-81.
 - [99] Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000;29 (3-4):222-30.
 - [100] Kang J, Pervaiz S. Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. *Biochem Res Int*;2012:896751.
 - [101] Dromparis P, Sutendra G, Michelakis ED. The role of mitochondria in pulmonary vascular remodeling. *J Mol Med (Berl)*;88 (10):1003-10.
 - [102] Gurtu V, Michelakis ED. Emerging therapies and future directions in pulmonary arterial hypertension. *Can J Cardiol*;31 (4):489-501.
 - [103] Tudor RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*;62 (25 Suppl):D4-12.
 - [104] Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN, Michelakis ED. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104 (27):11418-23.
 - [105] Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopaschuk GD, Dyck JR, Michelakis ED. Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*;2 (44):44ra58.
 - [106] Paulin R, Michelakis ED. The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res*;115 (1):148-64.
 - [107] Piao L, Marsboom G, Archer SL. Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure. *J Mol Med (Berl)*;88 (10):1011-20.
 - [108] Tan SC, Carr CA, Yeoh KK, Schofield CJ, Davies KE, Clarke K. Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditioned under hypoxia or with prolyl-4-hydroxylase inhibitors. *Mol Biol Rep*;39 (4):4857-67.
 - [109] Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 1955;217 (1):409-27.
 - [110] Aras S, Pak O, Sommer N, Finley R, Jr., Huttemann M, Weissmann N, Grossman LI. Oxygen-dependent expression of cytochrome c oxidase subunit 4-2 gene expression is mediated by transcription factors RBPJ, CXXC5 and CHCHD2. *Nucleic Acids Res*;41 (4):2255-66.

- [111] Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 2007;129 (1):111-22.
- [112] Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* 1979;236 (6):H818-27.
- [113] Murray TR, Chen L, Marshall BE, Macarak EJ. Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3 (5):457-65.
- [114] Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Voiriot G, Smith KA, Tang H, Ayon RJ, Choudhury MS, Ko EA, Wang J, Wang C, Makino A, Yuan JX. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;305 (2):L154-64.
- [115] Shaul PW, North AJ, Brannon TS, Ujiie K, Wells LB, Nisen PA, Lowenstein CJ, Snyder SH, Star RA. Prolonged in vivo hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and type III gene expression in adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13 (2):167-74.
- [116] Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115 (10):2811-21.
- [117] Kang TM, Park MK, Uhm DY. Characterization of hypoxia-induced [Ca²⁺]_i rise in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells. *Life Sci* 2002;70 (19):2321-33.
- [118] Madden JA, Vadula MS, Kurup VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992;263 (3 Pt 1):L384-93.
- [119] Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. HIF at a glance. *J Cell Sci* 2009;122 (Pt 8):1055-7.
- [120] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92 (12):5510-4.
- [121] Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001;15 (7):1312-4.
- [122] Berra E, Richard DE, Gothie E, Pouyssegur J. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett* 2001;491 (1-2):85-90.
- [123] Silbernagl S. *Taschenatlas Physiologie*: Georg Thieme Verlag, 2012.
- [124] Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3 (3):187-97.
- [125] Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda)*;26 (3):192-205.
- [126] Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol*;810:25-58.
- [127] Racker E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem* 1974;5 (1-2):17-23.

- [128] Horvat S, Beyer C, Arnold S. Effect of hypoxia on the transcription pattern of subunit isoforms and the kinetics of cytochrome c oxidase in cortical astrocytes and cerebellar neurons. *J Neurochem* 2006;99 (3):937-51.
- [129] Gnaiger E, Kuznetsov AV. Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem Soc Trans* 2002;30 (2):252-8.
- [130] Heerlein K, Schulze A, Hotz L, Bartsch P, Mairbaur H. Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of a549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32 (1):44-51.
- [131] Powell CS, Jackson RM. Mitochondrial complex I, aconitase, and succinate dehydrogenase during hypoxia-reoxygenation: modulation of enzyme activities by MnSOD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285 (1):L189-98.
- [132] Scandurra FM, Gnaiger E. Cell respiration under hypoxia: facts and artefacts in mitochondrial oxygen kinetics. *Adv Exp Med Biol*;662:7-25.
- [133] Chandel NS, Budinger GR, Schumacker PT. Molecular oxygen modulates cytochrome c oxidase function. *J Biol Chem* 1996;271 (31):18672-7.
- [134] Pecina P, Gnaiger E, Zeman J, Pronicka E, Houstek J. Decreased affinity for oxygen of cytochrome-c oxidase in Leigh syndrome caused by SURF1 mutations. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287 (5):C1384-8.
- [135] Napiwotzki J, Kadenbach B. Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV. *Biol Chem* 1998;379 (3):335-9.
- [136] Habano W, Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, Higuchi T, Terashima M, Horiuchi S. Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHD gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep* 2003;10 (5):1375-80.
- [137] Favier J, Briere JJ, Burnichon N, Riviere J, Vescovo L, Benit P, Giscos-Douriez I, De Reynies A, Bertherat J, Badoual C, Tissier F, Amar L, Libe R, Plouin PF, Jeunemaitre X, Rustin P, Gimenez-Roqueplo AP. The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PLoS One* 2009;4 (9):e7094.
- [138] Paddenberger R, Tiefenbach M, Faulhammer P, Goldenberg A, Gries B, Pfeil U, Lips KS, Piruat JJ, Lopez-Barneo J, Schermuly RT, Weissmann N, Kummer W. Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction of intra- but not of pre-acinar arteries. *Cardiovasc Res*.
- [139] Huang YP, Chang NW. PPARalpha modulates gene expression profiles of mitochondrial energy metabolism in oral tumorigenesis. *Biomedicine (Taipei)*;6 (1):3.
- [140] Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 2007;405 (1):1-9.
- [141] Sommer N, Huttemann M, Pak O, Scheibe S, Knoepp F, Sinkler C, Malczyk M, Gierhardt M, Esfandiary A, Kraut S, Jonas F, Veith C, Aras S, Sydykov A, Alebrahimdehkordi N, Giehl K, Hecker M, Brandes RP, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Schermuly RT, Grossman LI, Weissmann N. Mitochondrial Complex IV Subunit 4 Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing. *Circ Res*;121 (4):424-38.
- [142] Chen ZX, Pervaiz S. Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death Differ*;17 (3):408-20.
- [143] Paddenberger R, Ishaq B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, Braun-Dullaeus RC, Kummer W. Essential role of complex II of the respiratory

- chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284 (5):L710-9.
- [144] Emerling BM, Weinberg F, Snyder C, Burgess Z, Mutlu GM, Viollet B, Budinger GR, Chandel NS. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic Biol Med* 2009;46 (10):1386-91.
- [145] Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet* 2003;35 (4):331-40.
- [146] Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004;303 (5666):2011-5.
- [147] Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res* 2006;66 (11):5641-7.
- [148] Riederer U. Darstellung und Reaktionen von aktiven Stickstoffspezies mit DNA/RNA-Teilstrukturen als biologische Zielmoleküle. Fachbereich Chemie. Hamburg: Universität Hamburg, 1999.
- [149] Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2001;1504 (1):46-57.
- [150] Archer SL, Gombert-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JG, Weir EK. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294 (2):H570-8.
- [151] Dunham-Snary KJ, Hong ZG, Xiong PY, Del Paggio JC, Herr JE, Johri AM, Archer SL. A mitochondrial redox oxygen sensor in the pulmonary vasculature and ductus arteriosus. *Pflugers Arch*;468 (1):43-58.
- [152] Natalicchio A, Tortosa F, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. p66Shc, a multifaceted protein linking Erk signalling, glucose metabolism, and oxidative stress. *Arch Physiol Biochem*;117 (3):116-24.
- [153] Yuan Y, Wang H, Wu Y, Zhang B, Wang N, Mao H, Xing C. P53 Contributes to Cisplatin Induced Renal Oxidative Damage via Regulating P66shc and MnSOD. *Cell Physiol Biochem*;37 (4):1240-56.
- [154] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8 (10):774-85.
- [155] Hwang AB, Ryu EA, Artan M, Chang HW, Kabir MH, Nam HJ, Lee D, Yang JS, Kim S, Mair WB, Lee C, Lee SS, Lee SJ. Feedback regulation via AMPK and HIF-1 mediates ROS-dependent longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*;111 (42):E4458-67.
- [156] Chen T, Zhou Q, Tang H, Bozkanat M, Yuan JX, Raj JU, Zhou G. miR-17/20 Controls Prolyl Hydroxylase 2 (PHD2)/Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF1) to Regulate Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation. *J Am Heart Assoc*;5 (12).
- [157] Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3 (3):177-85.
- [158] Yuan K, Shao NY, Hennigs JK, Discipulo M, Orcholski ME, Shamskhov E, Richter A, Hu X, Wu JC, de Jesus Perez VA. Increased Pyruvate Dehydrogenase

- Kinase 4 Expression in Lung Pericytes Is Associated with Reduced Endothelial-Pericyte Interactions and Small Vessel Loss in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Pathol*;186 (9):2500-14.
- [159] Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J* 1998;329 (Pt 1):191-6.
 - [160] Hurd TR, Collins Y, Abakumova I, Chouchani ET, Baranowski B, Fearnley IM, Prime TA, Murphy MP, James AM. Inactivation of pyruvate dehydrogenase kinase 2 by mitochondrial reactive oxygen species. *J Biol Chem*;287 (42):35153-60.
 - [161] Formentini L, Sanchez-Arago M, Sanchez-Cenizo L, Cuezva JM. The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Mol Cell*;45 (6):731-42.
 - [162] Xu W, Koeck T, Lara AR, Neumann D, DiFilippo FP, Koo M, Janocha AJ, Masri FA, Arroliga AC, Jennings C, Dweik RA, Tudor RM, Stuehr DJ, Erzurum SC. Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104 (4):1342-7.
 - [163] Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 2008;8 (9):705-13.
 - [164] Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 2000;19 (16):4298-309.
 - [165] Caro J. Hypoxia regulation of gene transcription. *High Alt Med Biol* 2001;2 (2):145-54.
 - [166] Man KC AK. Long term treatment of mild diabetes in streptozotocin diabetic rats with phenformin and dichloroacetate: Normoglycaemia with normal blood lactate concentration. *Diabetologia* 1976;12:408.
 - [167] Whitehouse S, Cooper RH, Randle PJ. Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids. *Biochem J* 1974;141 (3):761-74.
 - [168] Wong JY, Huggins GS, Debidda M, Munshi NC, De Vivo I. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol* 2008;109 (3):394-402.
 - [169] Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, Maguire C, Gammer TL, Mackey JR, Fulton D, Abdulkarim B, McMurtry MS, Petruk KC. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med*;2 (31):31ra4.
 - [170] Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 2007;11 (1):37-51.
 - [171] Stacpoole PW, Harwood HJ, Jr., Cameron DF, Curry SH, Samuelson DA, Cornwell PE, Sauberlich HE. Chronic toxicity of dichloroacetate: possible relation to thiamine deficiency in rats. *Fundam Appl Toxicol* 1990;14 (2):327-37.
 - [172] Stockwin LH, Yu SX, Borgel S, Hancock C, Wolfe TL, Phillips LR, Hollingshead MG, Newton DL. Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int J Cancer*;127 (11):2510-9.
 - [173] Stacpoole PW. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 1989;38 (11):1124-44.

- [174] Zhdanov AV, Waters AH, Golubeva AV, Papkovsky DB. Differential contribution of key metabolic substrates and cellular oxygen in HIF signalling. *Exp Cell Res*;330 (1):13-28.
- [175] Perez-Escuredo J, Dadhich RK, Dhup S, Cacace A, Van Hee VF, De Saedeleer CJ, Sboarina M, Rodriguez F, Fontenille MJ, Brisson L, Porporato PE, Sonveaux P. Lactate promotes glutamine uptake and metabolism in oxidative cancer cells. *Cell Cycle*;15 (1):72-83.
- [176] Feron O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* 2009;92 (3):329-33.
- [177] Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J Mol Med (Berl)*;94 (2):155-71.
- [178] Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest*;123 (9):3685-92.
- [179] Sanchez WY, McGee SL, Connor T, Mottram B, Wilkinson A, Whitehead JP, Vuckovic S, Catley L. Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib. *Br J Cancer*;108 (8):1624-33.
- [180] Ruggieri V, Agriesti F, Scrima R, Laurenzana I, Perrone D, Tataranni T, Mazzoccoli C, Lo Muzio L, Capitanio N, Piccoli C. Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: a metabolic perspective of treatment. *Oncotarget*;6 (2):1217-30.
- [181] Huttemann M, Lee I, Liu J, Grossman LI. Transcription of mammalian cytochrome c oxidase subunit IV-2 is controlled by a novel conserved oxygen responsive element. *FEBS J* 2007;274 (21):5737-48.
- [182] Linder D, Freund R, Kadenbach B. Species-specific expression of cytochrome c oxidase isozymes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1995;112 (3):461-9.
- [183] Kadenbach B, Huttemann M, Arnold S, Lee I, Bender E. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med* 2000;29 (3-4):211-21.
- [184] Bar-Yaacov D, Bouskila A, Mishmar D. The first Chameleon transcriptome: comparative genomic analysis of the OXPHOS system reveals loss of COX8 in Iguanian lizards. *Genome Biol Evol*;5 (10):1792-9.
- [185] Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*;15 (3):395-404.

8. Publikationsverzeichnis

Posterbeitrag im Rahmen des Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2009.

Titel: „Mitochondriale Veränderungen in pulmonalarteriellen Gefäßmuskelzellen bei pulmonalarterieller Hypertonie“

Autoren: Philipp Krug, Sharon Waisbrod, Oleg Pak, Natascha Sommer, Hossein A. Ghofrani, Ralph T. Schermuly, Werner Seeger, Friedrich Grimminger, Norbert Weissmann

9. Ehrenwörtliche Erklärung

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

10 Danksagung

Vielen Dank an Sharon Waisbrod und Oleg Pak für die wertvolle Unterstützung.

Vielen Dank an Natascha Sommer für die treue und geduldige Betreuung.

Vielen Dank an Norbert Weissmann für die Chance am ECCPS zu promovieren.