

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Institut für Kardiovaskuläre Physiologie (Physiologie I)

Quantifizierung der Expression
der NADPH-Oxidasen
mittels real-time RT-PCR

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang
Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Judith G. Schreiber
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2007

Dekan: Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. med. R. Brandes

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. A. Aicher

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Abkürzungsverzeichnis	4
2 Einleitung	5
2.1 Reaktive Sauerstoffspezies.....	5
2.2 Die NADPH-Oxidase	7
2.3 NADPH-Oxidase und Atherosklerose	20
3 Material und Methoden	21
3.1 RNA-Extraktion	21
3.2 RNA- Konzentrationsmessung.....	22
3.3 Reverse Transkription	23
3.4 Real-time PCR.....	24
3.5 Tierversuche	29
3.6 Messung der vaskulären Sauerstoffradikalproduktion.....	31
3.7 Angiotensin II-Plasmaspiegel	31
3.8 Statistik.....	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Nox-Isoformen	32
4.2 Regulatorische Untereinheiten	39
4.3 Nox-Expression in einem Mausmodell für renale Hypertonie.....	51
5. Diskussion	60
5.1 Nox-Isoformen	60
5.2 Regulatorische Untereinheiten	67
5.3 Nox-Expression in einem pathophysiologischen Modell der renalen Hypertonie... 71	
6 Zusammenfassung	74
7 Summary	76
8 Literaturverzeichnis.....	78

1 Abkürzungsverzeichnis

AT II	Angiotensin II
Cytochrom b558	558 kiloDalton schwere Cytochrom-Untereinheit der NADPH-Oxidase, setzt sich zusammen aus p22phox und gp91phox, enthält zwei Hämgruppen
$\Delta\Delta c_T$	delta-delta-threshold-cycle-Wert, siehe Material und Methoden 3.4.2.1
DNA	desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
gp91phox	91 kiloDalton Glykoprotein-Untereinheit der NADPH-Oxidase (Synonym: Nox2)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell = Nabelschnurvenenendothelzelle
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NfκB	<u>n</u> ukleärer, redox-sensitiver Transkriptions <u>f</u> aktor, initial aus <u>B</u> -Lymphozyten isoliert
Noxa1	NADPH oxidase activator = Untereinheit der NADPH-Oxidase, (Synonym: p51nox)
Noxo1	NADPH oxidase organizer = Untereinheit der NADPH-Oxidase
Nox2-/-	Nox2-Knockout
p22phox	22 kiloDalton schwere Cytochrom-Untereinheit der NADPH-Oxidase
p40phox	40 kiloDalton Protein-Untereinheit der NADPH-Oxidase
p47phox	47 kiloDalton Untereinheit der NADPH-Oxidase
p67phox	67 kiloDalton Untereinheit der NADPH-Oxidase
p51nox	51 kiloDalton Untereinheit der NADPH-Oxidase, = Noxa1
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor, Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
rac	niedermolekulares GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
ROS	reactive oxygen species = Reaktive Sauerstoffverbindungen
VSMC	vascular smooth muscle cells = glatte Gefäßmuskelzellen
WT	Wildtyp

2 Einleitung

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Der in jeder Zelle unverzichtbare Sauerstoff ist mehr als nur „Treibstoff“ für die Energieversorgung der Zelle. Mit Hilfe verschiedener Enzyme wandeln Zellen molekularen Sauerstoff (O_2) in chemisch reaktivere Formen um. Diese reaktiven Sauerstoffspezies erfüllen im Organismus verschiedenste Aufgaben. Sie wirken u. a. als intrazelluläre Botenstoffe in Signaltransduktionskaskaden für Insulin oder Angiotensin II, als chemischer Kampfstoff der Granulozyten zur Abtötung von Bakterien, bei der Produktion von Schilddrüsenhormon oder bei der Bildung von Otolithen im Innenohr.

Reaktive Sauerstoffarten, kurz ROS (von englisch „reactive oxygen species“) genannt, besitzen z. T. als chemische Radikale ungepaarte Elektronen (\bullet) und gehen mit verschiedensten Arten von Molekülen Bindungen ein. Zu den ROS gehört u. a. das Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$). Dieses kann durch die Superoxiddismutase in membranpermeables Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt werden, welches wiederum in Gegenwart von freiem Eisen (Fe^{2+}) mit Superoxidanionen zu hochreaktiven Hydroxylradikalen (OH^{\bullet}) reagieren kann. So dienen Superoxidanionen als Ausgangsstoff für eine Reihe weiterer reaktiver Substanzen, z. B. Lipidperoxide und -radikale, reaktive Aldehyde, Stickstoffoxide und Hypochlorsäure¹. Daneben bilden Zellen mit Hilfe verschiedener NO-Synthasen Stickstoffmonoxid (NO^{\bullet}), das mit $O_2^{\bullet-}$ zu dem langlebigeren Peroxynitrit ($ONOO^{\bullet}$) reagieren kann (vgl. Abbildung 1).

Säugetierzellen sind mit unterschiedlichen Enzymen ausgestattet, die reaktive Sauerstoffspezies bilden können. Dazu gehören mitochondriale Enzyme der Atmungskette, die Xanthinoxidase, NO-Synthasen, Cyclo- und Lipoxygenasen, Cytochrom-P450 Monooxygenasen und NADPH-Oxidasen.

ROS haben insbesondere, wenn sie in großen Mengen entstehen, einen schädigenden Einfluss auf Zellen. So reagieren sie mit Eisen-Schwefel-Zentren, Zink-Finger-Domänen und Thiolgruppen zellulärer Enzyme, wodurch jene inaktiviert werden. Sie schädigen die DNA im Zellkern und die Lipide der Zellmembranen. Es ist daher für Zellen überlebenswichtig, ein Gleichgewicht zwischen ROS und Reduktionsmitteln aufrechtzuerhalten. Zu diesem Zweck gibt es in den Zellen zahlreiche Systeme mit antioxidativer Aktivität, z. B. das Glutathion-System oder Katalase. Des weiteren unterliegt die Aktivität der ROS-produzierenden Enzyme einer strengen Regulation.

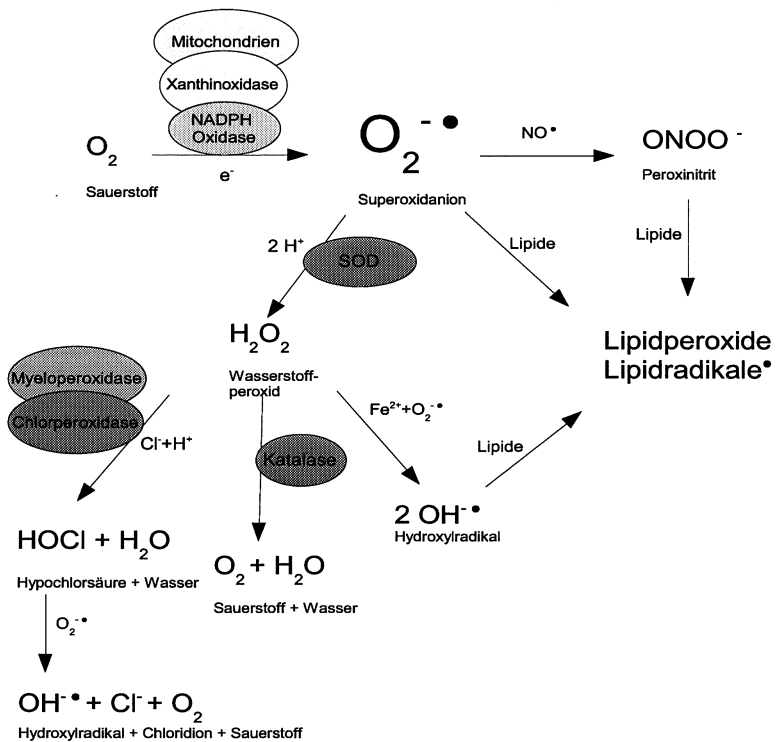


Abbildung 1: Reaktionsschema der Bildung und Umwandlung von ROS

Aus molekularem Sauerstoff werden durch Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Xanthinoxidase oder NADPH-Oxidasen hochreagible Superoxidationen ($O_2^{\cdot-}$) erzeugt. Diese dienen als Ausgangsstoff zur Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies: Mit Stickstoffmonoxid (NO^\bullet) reagieren Superoxidationen zu Peroxinitrit ($ONOO^{\cdot-}$). Reagieren Superoxidationen oder Peroxynitrit mit Lipiden, entstehen wiederum Lipidperoxide und Lipidradikale. Mit Hilfe der Superoxiddismutase (SOD) wird aus Superoxidationen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet. Dieses wird in Anwesenheit von Myeloperoxidase, Chlorperoxidase oder zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) für die Bildung von Hypochlorsäure ($HOCl$) und Hydroxylradikalen ($OH^{\cdot\cdot}$) genutzt. Auf der anderen Seite dienen Superoxiddismutase und Katalase dem Abbau von Superoxidationen zu molekularem Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O).

2.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies im Gefäßsystem

Normalerweise besteht in der Gefäßwand ein Gleichgewicht zwischen ROS und NO. Dieses kann jedoch unter pathologischen Bedingungen dauerhaft zu Gunsten der ROS verschoben werden – Bedingungen, die die Entwicklung von Hypertonie, Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankheit begünstigen bzw. diese voranschreiten lassen¹.

Insbesondere Mediatoren wie Thrombin, Angiotensin II, PDGF und LDL führen zu einer erhöhten ROS-Konzentration in der Gefäßwand, gestörter endothel-abhängiger Vasorelaxation, sowie zu proinflammatorischen und prokoagulatorischen Eigenschaften der Endothelzelloberfläche¹.

In der Gefäßwand gebildetes Superoxid vermindert die Bioverfügbarkeit des endothelialen Stickstoffmonoxids, eines wichtigen Vasodilatators, mit der Folge einer Steigerung des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur¹. Glatte Gefäßmuskelzellen sind zusammen mit Fibroblasten der Hauptproduktionsort für Superoxid in der Gefäßwand². Das durch die Reaktion zwischen $\text{NO} \cdot$ und $\text{O}_2 \cdot^-$ entstandene Peroxynitrit reagiert u. a. mit Tyrosinresten verschiedener Proteine, z. B. der Prostacyclin-Synthase, wodurch deren enzymatische Aktivität deutlich vermindert wird³. Es hemmt außerdem die mitochondriale Elektronentransportkette und das Enzym Aconitase aus dem Citratcyclus. Erhöhte Konzentrationen von H_2O_2 greifen in die Regulation des Zellzyklus ein und verursachen u. a. eine Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. ROS beeinflussen also auf vielfältige Weise die intrazelluläre Signaltransduktion.

2.2 Die NADPH-Oxidase

2.2.1 Die Leukozyten-NADPH-Oxidase / Nox2

Am genauesten untersucht wurde bisher die Struktur und Funktion der leukozytären NADPH-Oxidase. Sie dient in neutrophilen Granulozyten der Abtötung phagozytierter Pathogene während des „Oxidative burst“.

Es handelt sich um einen Enzymkomplex aus den Untereinheiten p22phox, gp91phox (Synonym: Nox2), p47phox, p67phox, zusammen mit dem kleinen G-Protein rac, fakultativ auch einem Protein namens p40phox. Die Untereinheiten p22phox und gp91phox sind membranständig und bilden zusammen das Cytochrom b558, das zwei Hämgruppen und Flavinadeninindinukleotid- (FAD), sowie Nikotinamidadeninindinukleotidphosphat- (NADPH) Bindungsstellen aufweist. Im nicht aktivierten Zustand der Zelle befinden sich alle anderen

Untereinheiten im Zytoplasma und das Enzym ist inaktiv. Erst bei Aktivierung der Granulozyten wandern die übrigen Untereinheiten zur Membran und bilden gemeinsam mit Cytochrom b 558 einen funktionsfähigen NADPH-Oxidase-Komplex.

1996 konnten Jones et al.⁴ auf mRNA-Ebene zeigen, dass auch in Endothelzellen alle Untereinheiten der leukozytären NADPH-Oxidase exprimiert werden. Nox2 findet sich daneben auch in Atemwegsepithelien, glatten Gefäßmuskelnzellen, Kardiomyozyten und B-Lymphozyten.

Allerdings produzieren vaskuläre Zellen kontinuierlich ROS, jedoch in deutlich geringeren Mengen als neutrophile Granulozyten, und zeigen auch nicht das für neutrophile Granulozyten typische Phänomen des „Oxidative burst“¹.

2.2.2 Homologa

1999 beschrieben Suh et al. ein zu gp91phox homologes Protein, das sie zunächst Mox1 für „mitogen activated oxidase 1“ nannten, in Colonkarzinomzellen und glatten Gefäßmuskelnzellen⁵. Inzwischen sind mehr als fünf verschiedene homologe Proteine bekannt. Mox1 wurde in Nox1, gp91phox in Nox2 umbenannt. Hinzu kamen Nox3, das in fetalen Nierenzellen und im Innenohr von Mäusen exprimiert wird⁶, Nox4, das v. a. in der Niere vorkommt, und Nox5, das hauptsächlich in Testes und lymphatischem Gewebe⁷ sowie Oligodendrozyten der Ratte nachweisbar ist. In Schilddrüsengewebe wurden zwei Proteine mit zu gp91phox homologen Domänen und zusätzlicher Peroxidaseaktivität entdeckt: Duox 1 und 2. Auch in anderen Geweben, z. B. respiratorischen Epithelien, Magenschleimhaut-Epithelien oder Fibroblasten konnten einige der Nox2-Isoenzyme nachgewiesen werden. Eine genaue Auflistung der Literaturangaben zur Expression der verschiedenen Isoenzyme gibt Tabelle 1.

Die Nox-Isoenzyme erfüllen in verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedliche Aufgaben. Zum Beispiel dient Nox4 in der Niere möglicherweise als Sauerstoffsensoren, über den die Erythropoietinproduktion reguliert wird, Nox3 spielt bei Mäusen eine Rolle bei der Synthese der Otolithen im Innenohr⁶, und Nox5 ist wichtig bei der Fusion von Spermium und Eizelle des Menschen⁷. In den meisten Zelltypen ist die Funktion der dort vorkommenden Nox-Isoenzyme noch nicht genau geklärt. Es finden sich z. T. widersprüchliche Angaben in der Literatur, so bei Nox1, das je nach Zelltyp sowohl Proliferation als auch Apoptose vermittelt⁸.

Maus

Quellen

Organ	Nox1	Nox2	Nox3	Nox4	Nox5	Nox1	Nox2	Nox3	Nox4	Nox5
Colon			-					6		
Dünndarm			-					6		
Leber			-	+				6	9	
Pankreas										
Uterus			-					6		
Ovar										
Prostata										
Plazenta										
Testis										
Respirationstrakt		+	-				10	6		
Skelettmuskel										
Niere			-	+				6	9,11	
Herz			-					6		
Blutgefäße	+	+		+		12	10,13		12	
Periphere Bluteukozyten										
Milz, Thymus			-					6		
Gehirn			-					6		
Innenohr, Vestibularorgan			+					6		
Knochen			+					6		
Knorpel			-					6		

Tabelle 1: Untersuchungen zur Nox-Expression in der Literatur

Tabelle 1A: Nox-Isoformen in verschiedenen Geweben der Maus

Dargestellt sind der Nachweis der vorhandenen (+) oder nicht vorhandenen (-) Expression von mRNA oder Protein verschiedener Nox-Isoformen (grau) in der Literatur in den in der ersten Spalte aufgeführten Organen, Geweben und Zelltypen der Maus. In den weißen Spalten auf der rechten Seite sind die jeweiligen Quellen anhand der Nummern aus dem Literaturverzeichnis dieser Arbeit aufgelistet.

Mensch

Quellen

Organ	Nox1	Nox2	Nox3	Nox4	Nox5	Nox1	Nox2	Nox3	Nox4	Nox5
Colon	+	+	-	+	-	5;10;14-21	17	16	17	7;17
Dünndarm	-		-		+/-	15;17		16		(+) 17 (-) 7
Leber	-		-		+/-	15;17	16			(+) 17 (-) 7
Pankreas	-	+	-	+	+	15;17	17	16	17	17
Uterus	+				-	5;11;17				7;17;22
Ovar			-	+	+/-			16	17	(+) 17;22 (-) 7
Prostata	+		-		+/-	5;11;16;22		16		(+) 17;22 (-) 7
Plazenta		+	+/-	+	+/-		17	(+) 17 (-) 16	17	(+) 17;22 (-) 7
Testis	+		-	+/-	+	16;17		16	(+) 17 (-) 11	7;17;22
Respirationstrakt: Lunge, Epithel und Drüsen	+/-	+	-	+/-	-	(+) 23 (-) 17	17;23	16	(+)17;23 (-) 11	7
Skelettmuskel	-	-	-	+/-	-	15;17	16	16	(+) 9;17 (-) 11	7;17
Niere	+/-	+	-	+	+/-	(+) 9;16 (-) 9;15;17	24	16	9;11;17	(+) 17 (-) 7
Herz	-	+	-	+/-	+/-	15;17	25	16	(+) 9;17 (-) 11	(+) 17 (-) 7
Blutgefäße	+/-	+		+	+	(+) 14;18;26-28 (-) 29	29	29	29	7;26
Periphere Blutleukozyten		+	-	-			17	16	17;30	
Milz	-		-	+/-	+	15;17		16	(+) 17 (-) 11	7;17;31
Thymus	-		-	-	-	15;17		16	11	7;17
Gehirn	-	-	-	+/-	+/-	17	16	16	(+) 9;17 (-) 11	(+) 17 (-) 7

Tabelle 1B: Nox-Isoformen in verschiedenen Organen und Geweben des Menschen

Dargestellt sind der Nachweis der vorhandenen (+) oder nicht vorhandenen (-) Expression von mRNA oder Protein verschiedener Nox-Isoformen in den in der ersten Spalte aufgeführten Organen, Geweben und Zelltypen des Menschen. In den Spalten auf der rechten Seite sind die jeweiligen Quellen anhand der Nummern aus dem Literaturverzeichnis dieser Arbeit aufgelistet. Zum Teil gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben (+/-) zur Expression einer Nox-Isoform, die z. T. durch die Verwendung unterschiedlich sensitiver Nachweismethoden erklärt werden können.

2.2.3 NADPH-Oxidasen in vaskulären Zellen

In vaskulären Zellen dienen ROS u. a. als second messenger, die redox-sensitive Enzyme, z. B. p38 MAP Kinase oder Transkriptionsfaktoren wie NFκB (nukleärer Faktor, ursprünglich in B-Lymphozyten charakterisiert) und AP-1 (activating protein 1) aktivieren, wodurch die Genexpression der Zellen reguliert wird. Eine der wichtigsten Quellen für vaskuläre ROS-Produktion ist die membranständige NADPH-Oxidase, deren verschiedene Isoenzyme in allen drei Gefäßwandschichten nachgewiesen werden konnten^{4;10;14;32}. Dabei wird die Aktivität dieses Enzyms durch Cytokine, physikalische Einflüsse wie Scherkräfte oder Dehnung und verschiedene Mediatoren beeinflusst.

In allen drei Schichten der aortalen Gefäßwand wurden bislang die Untereinheiten p22phox, p47phox und rac1 der NADPH-Oxidase nachgewiesen^{18;32;33}. In der Expression der verschiedenen gp91phox-Isoformen gibt es jedoch deutliche Unterschiede:

Endothelzellen exprimieren bevorzugt Nox2 zusammen mit sehr geringen Mengen Nox1, Nox4 und Nox5²⁶. In diesen Zellen ist die Aktivierung der NADPH-Oxidase wichtig bei der Stimulation zur Angiogenese, z. B. bei Wundheilung oder Tumorwachstum^{34;35}.

In glatten Gefäßmuskulatur sind je nach Lokalisation im Gefäßsystem unterschiedliche Homologa des NADPH-Oxidase-Komplexes nachweisbar. In VSMC der menschlichen Pulmonalarterie und Aorta wird Nox4 und Nox1 sowie in geringen Mengen Nox5 exprimiert, jedoch kein Nox2^{18;26}. In VSMC menschlicher Widerstandsgefäße aus Gluteusbiopsien finden sich dagegen Nox2 und Nox4, aber kein Nox1¹⁸.

In Fibroblasten der Adventitia sind die Nox-Isoformen Nox1, Nox2 und Nox4 nachweisbar, zusammen mit großen Mengen der Untereinheit p67phox. Nach Stimulation von aortalen Fibroblasten der Adventitia mit Angiotensin II kommt es zu einem dosisabhängigen Anstieg der ROS-Produktion.

2.2.4 Aktivierung der NADPH-Oxidase (Nox2)

In Leukozyten kommt es z. B. nach Phagozytose von Bakterien zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die die Serinreste 358 und 370 der p47phox-Untereinheit phosphoryliert³⁶. Es erfolgt eine Konformationsänderung, woraufhin die autoinhibitorische Domäne des p47phox dessen hydrophobe phox-Domäne sowie zwei SH3-Domänen freigibt. Nachfolgend transloziert p47phox zusammen mit p67phox vom Zytoplasma in die Membran und wird an weiteren Serinresten (Ser 303, 304, evtl. 328) phosphoryliert^{36;37}. Jetzt bindet es über seine SH3-Domänen an den zytoplasmatischen Teil von p22phox und stabilisiert damit

die Bindung zwischen p67phox und cytochrom b558³⁸. Die p67phox-Untereinheit enthält eine Aktivierungsdomäne, die den Elektronentransfer von NADPH zu FAD reguliert und daher für die enzymatische Aktivität des Enzymkomplexes unverzichtbar ist.

Zur vollen Aktivierung der Oxidase wird noch GTP-gebundenes rac benötigt, das unabhängig von den anderen Untereinheiten zur Membran rekrutiert wird und mit p67phox interagiert. Nach Assoziation aller Untereinheiten ist die Oxidase aktiv. Dabei werden Elektronen von NADPH über FAD und die beiden Hämgruppen auf molekularen Sauerstoff übertragen. Es entstehen als Produkt Superoxidanionen (vgl. Abbildung 2).

2.2.5 Nox1 und Nox1

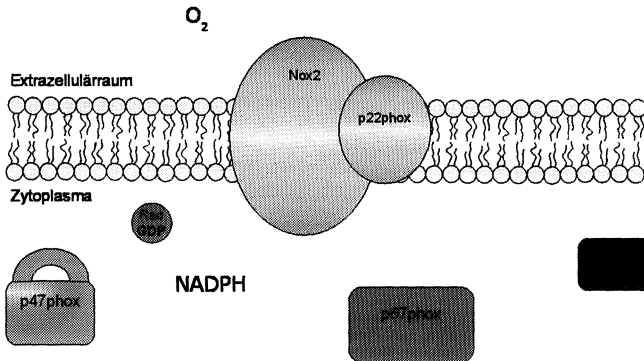
Neben den o. g. Untereinheiten p47phox und p67phox wurden initial von Geiszt et al. wie auch von B. Bánfi et al. zwei homologe Proteine beschrieben: Nox Organizer 1 (Nox1 oder p41^{nox}) homolog zu p47phox, sowie Nox-Aktivator 1 (Noxa1 oder p51^{nox}) homolog zu p67phox. Sie werden in relativ großen Mengen zusammen mit Nox1 u. a. in Colonepithelzellen exprimiert. Diese Proteine vermögen ohne Stimuli wie PMA (Phorbolmyristatacetat, ein Aktivator der Proteinkinase C), die Nox1, Nox2 und Nox3-Isoformen der NADPH-Oxidase z. B. in transfizierten HEK293-Zellen zu aktivieren^{15;23;30}.

Nox1 unterscheidet sich von p47phox u. a. durch das Fehlen verschiedener Serinreste, die als Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C dienen, und die Abwesenheit einer autoinhibitorischen Domäne. Im Ruhezustand der Phagozyten wird p47phox dadurch im Zytoplasma gehalten und kann erst nach Aktivierung der Zelle und Phosphorylierung der Serinreste, die dann die lipophile Phox-Domäne freigeben, zur Zellmembran translozieren. Nox1 liegt bereits im Ruhezustand an der Zellmembran als Komplex mit p22phox vor^{15;30} und spielt v. a. bei der Translokation von Noxa1 aus vom Zytoplasma zur Membran eine Rolle.³⁹

In Untersuchungen zum Lipidbindungsprofil zeigte Nox1 im Gegensatz zu p47phox eine hohe Affinität zu Phosphatidylinositol-4-Phosphat und -5-Phosphat. Dies sind Lipide, die in der Membran nicht aktivierter Zellen vorkommen. Diese Untereinheit unterstützt daher wahrscheinlich eine konstitutive Aktivität der NADPH-Oxidase^{30;40}.

Noxa1 unterscheidet sich v. a. durch eine zusätzliche C-terminale hydrophobe Region, die vermutlich als Membrananker dient, von p67phox. Es fehlt bei Noxa1 eine N-terminale SH3-Domäne, die C-terminale SH3-Domäne ist erhalten. Noxa1 interagiert nicht mit p40phox, einer regulatorischen Untereinheit der NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten^{41;42}.

A Ruhezustand



B Zustand nach Aktivierung

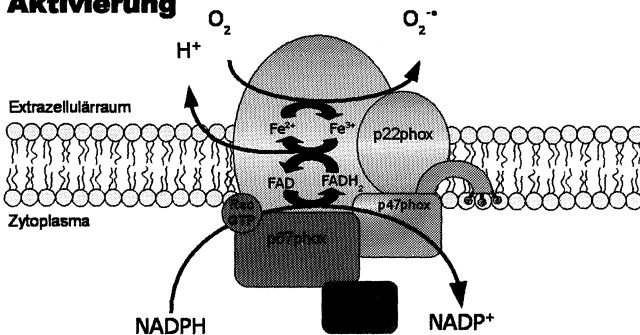
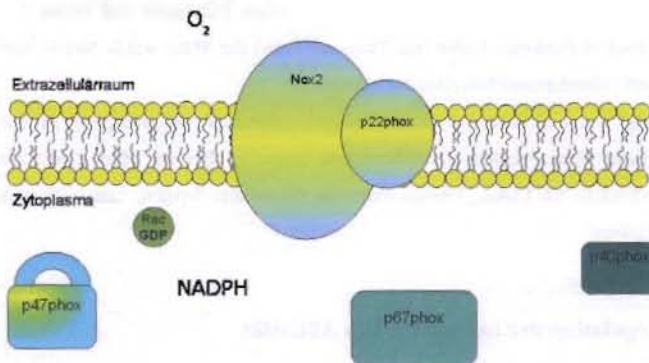


Abbildung 2: Aufbau der NADPH-Oxidase in inaktivem und aktivem Zustand

A: Im inaktiven Zustand liegen die Untereinheiten Nox2 und p22phox als Cytochrom b558 in Form eines membranständigen Komplexes vor. Die übrigen Untereinheiten p47phox, p40phox und rac befinden sich an unterschiedlichen Orten im Zytoplasma. In dieser Form werden keine Superoxidanionen produziert.

B: Nach Aktivierung der Granulozyten kommt es zur Phosphorylierung von p47phox durch Proteinkinase C. Dieses ändert dadurch seine Konformation und bindet das ebenfalls phosphorylierte p67phox. Beide translozieren zusammen in die Zellmembran zum Cytochrom b558. Damit sind im NADPH-Oxidase-Komplex die an der enzymatischen Reaktion beteiligten Strukturen versammelt. Zur vollständigen Aktivierung muss jedoch noch das kleine G-Protein rac nach Austausch von GDP gegen GTP aus dem Zytoplasma zum NADPH-Oxidase-Komplex rekrutiert werden. Über die Bedeutung von p40phox als aktivierende oder inhibierende Untereinheit gibt es gegensätzliche Ansichten in der Literatur.

A Ruhezustand



B Zustand nach Aktivierung

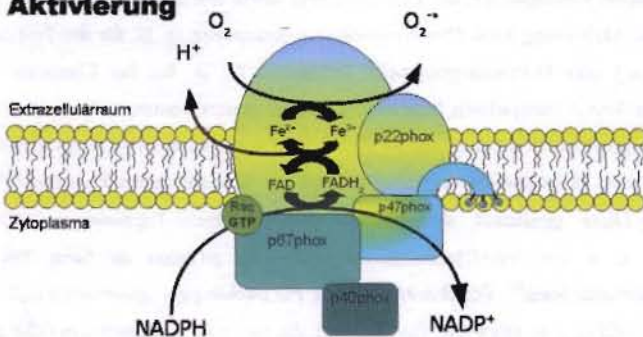


Abbildung 2: Aufbau der NADPH-Oxidase in inaktivem und aktivem Zustand

A: Im inaktiven Zustand liegen die Untereinheiten Nox2 und p22phox als Cytochrom b558 in Form eines membranständigen Komplexes vor. Die übrigen Untereinheiten p47phox, p40phox, p67phox und rac befinden sich an unterschiedlichen Orten im Zytoplasma. In dieser Form werden keine Superoxidationen produziert.

B: Nach Aktivierung der Granulozyten kommt es zur Phosphorylierung von p47phox durch Proteinkinase C. Dieses ändert dadurch seine Konformation und bindet das ebenfalls phosphorylierte p67phox. Beide translozieren zusammen in die Zellmembran zum Cytochrom b558. Damit sind im NADPH-Oxidase-Komplex die an der enzymatischen Reaktion beteiligten Strukturen versammelt. Zur vollständigen Aktivierung muss jedoch noch das kleine G-Protein rac nach Austausch von GDP gegen GTP aus dem Zytoplasma zum NADPH-Oxidase-Komplex rekrutiert werden. Über die Bedeutung von p40phox als aktivierende oder inhibierende Untereinheit gibt es gegensätzliche Ansichten in der Literatur.

Bisher ist nicht bekannt, mit welchen der Nox-Isoformen Nox1 und Nox1 in vivo bevorzugt interagieren. In vitro wurde bisher die Bildung funktionsfähiger NADPH-Oxidase-Komplexe aus Nox1/Nox1 mit Nox1, Nox2 oder Nox3 nachgewiesen.

Exprimiert wird Nox1 beim Menschen v. a. in Colon, Dünndarm und Testes, in geringeren Mengen auch in Pankreas, Leber und Thymus^{8;15}. Bei der Maus wurde Nox1 bisher v. a. in Colon- und Dünndarmepithelzellen nachgewiesen⁸.

Nox1 wird beim Menschen v. a. im Pankreas exprimiert, in geringeren Mengen auch in Leber, Niere, Milz, Prostata, Dünndarm und Colon^{8;15}. Bei der Maus findet sich Nox1-mRNA ebenfalls im Colon, Uterus, Prostata, Dünndarm, Magen, Lunge, Schilddrüse und Speicheldrüsen⁸.

2.2.6 Regulation der enzymatischen Aktivität

2.2.6.1 Regulation der leukozytären NADPH-Oxidase

Die leukozytäre NADPH-Oxidase unterliegt einer strengen Regulation ihrer Aktivität durch den Phosphorylierungsstatus der Untereinheiten, sowie den Zustand des kleinen G-Proteins rac2. Die Aktivierung kann über Tyrosinkinase-Rezeptoren (z. B. für das Fc-Fragment der Antikörper) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z. B. für das Chemokin N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin, kurz fMLP) in Gang gesetzt werden.

In der Signaltransduktionskaskade für fMLP wird zunächst ein G_i-Protein aktiviert. In der Folge kommt es vermutlich via MAP-Kinasen zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase-γ. Diese produziert vermehrt Phosphatidyl-Inositol-Triphosphat (PIP3). Dieses aktiviert u. a. die Serin/Threoninkinase AKT, die p47phox an Serin 304 und 328 phosphorylieren kann³⁷. Gleichzeitig werden PIP3-abhängige „guaninnucleotide exchange factors“ (GEFs), z. B. pRex und Vav, aktiviert, die rac2 zum Austausch von GDP gegen GTP anregen. In einer Art positiver Verstärkungsschleife bedingt aktiviertes rac zusätzlich eine vermehrte Phosphorylierung von p47phox, eventuell über p21-aktivierte Kinasen (PAKs) oder direkt durch Akt (Synonym: Proteinkinase B)^{37;43}.

2.2.6.2 Regulation der vaskulären NADPH-Oxidasen

Durch verschiedene proinflammatorische Stimuli, z. B. Thrombin^{25;44;45}, PDGF^{43;46;47}, Prostaglandine⁴⁸, Histamin⁴⁹, TNFα^{50;51} und Serotonin⁵², sowie die Hormone Angiotensin II⁵³ und Adrenalin⁵⁴ kommt es zur Aktivierung der vaskulären NADPH-Oxidasen und Anstieg der Superoxidproduktion in vaskulären Zellen. Man geht davon aus, dass die vaskulären

NADPH-Oxidasen nach ähnlichem Muster wie Nox2 als Komplex aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind. Daher wird auch eine dem leukozytären Enzym ähnliche Regulationsweise für Nox1 und Nox4 vermutet mit evtl. anderen beteiligten Untereinheiten (z. B. Noxo1 und Noxa1 anstelle von p47phox und p67phox). Die genaue Identifizierung der jeweils beteiligten Untereinheiten und Nox-Isoformen ist in vivo jedoch bisher nur teilweise erfolgt. So benötigt Nox1 zur maximalen Superoxidradikalproduktion p22phox, Noxa1 und Noxo1 zur Bildung eines aktiven NADPH-Oxidase-Komplexes an der Zellmembran³⁹. Humanes Nox3 kann entweder durch Noxo1 alleine, oder durch die Kombination aus p47phox und p67phox nach PMA-Stimulation aktiviert werden⁵⁵. Murines Nox3 zeigt eine ähnliche Regulation, braucht jedoch zur Aktivierung Noxo1 in Kombination mit Noxa1⁶. Nox4 funktioniert möglicherweise ohne regulatorische Untereinheiten^{20;56}. Nox5 wird anscheinend ebenfalls ohne zytoplasmatische Untereinheiten allein durch eine erhöhte zytoplasmatische Calciumkonzentration aktiviert³¹.

Das kleine G-Protein rac (in nicht-hämatopoetischen Zellen v. a. rac1) wird auch in vaskulären Zellen zur Aktivierung der NADPH-Oxidase benötigt. Es interagiert in seiner GTP-gebundenen Form mit der N-terminalen Region von Noxa1 und unterstützt dessen Translokation vom Zytoplasma zur Zellmembran, wo es mit Nox1 und Noxo1 den NADPH-Oxidase-Komplex bildet. Möglicherweise induziert es sogar eine Konformationsänderung in der Aktivierungsdomäne von Noxa1^{15;39;40}.

Neben der Regulation der NADPH-Oxidase-Aktivität auf Proteinebene wirken sich die o. g. Stimuli auch auf die Genexpression verschiedener NADPH-Oxidase-Untereinheiten aus, was ebenfalls eine veränderte Enzymaktivität zur Folge hat^{5;12;18;19;57}.

2.2.6.2.1 NADPH-Oxidase-Aktivierung durch Angiotensin II

Nach Bindung des Liganden an den AT1-Rezeptor glatter Gefäßmuskelzellen werden G_{q/11}- und G_i-Proteine aktiviert⁵⁸⁻⁶⁰. In den nachfolgenden Signaltransduktionskaskaden kommt es zur PI3-Kinase-abhängigen Aktivierung von zytosolischer Phospholipase A₂^{61;62} mit Freisetzung von Arachidonsäure, sowie von Phospholipase C und D⁶³, wonach die intrazelluläre Konzentration von Calciumionen und Arachidonsäurederivaten, z. B. Leukotrien B₄, ansteigt^{62;64;65}. Die Aktivierung der NADPH-Oxidase wird über eine Proteinkinase-C-abhängige Phosphorylierung von p47phox und Aktivierung von rac ausgelöst⁵³. Nach dieser initialen Aktivierungsphase folgt eine spätere prolongierte Aktivierung, bei der das initial produzierte Superoxid via Bildung von H₂O₂⁶⁶ in einer positiven Verstärkungsschleife die Tyrosinkinase c-Src aktiviert⁶⁷, die zur Transaktivierung

des EGF-Rezeptors beiträgt^{68;69}, der wiederum die Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängige Produktion von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat induziert. Dieses potenziert über Guaninnukleotid-Exchange-Faktoren die Aktivierung und Translokation von rac1 zum membranständigen Oxidase-Komplex^{26;53}. Daneben forciert c-Src auch die Phosphorylierung von p47phox⁷⁰.

Bei länger anhaltender Stimulation durch Angiotensin II kommt es zu ROS-abhängiger Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen wie p38MAPK und c-jun aminoterminal kinase (JNK)⁷¹, die zur Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren (NFκB, AP-1) führen. Diese induzieren z. B. die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bei chronischer Stimulation durch Angiotensin II, was bisher in Mäusen und Ratten gezeigt werden konnte. Gleichfalls werden inflammatorische Gene, z. B. für das Chemokin MCP-1, IL-6 oder vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) verstärkt exprimiert^{26;65;72}. Auch die Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten p22phox und Nox1 in der Aorta, sowie Nox2, p22phox, p47phox und p67phox in subkutanen Widerstandgefäßen wird über redox-sensitive Transkriptionsfaktoren induziert^{18;57}. Damit unterliegt die NADPH-Oxidase auf der Ebene der Expressionsregulation ebenfalls einem positiven Rückkopplungsmechanismus.

Abbildung 3: Modell für Signal-transduktionswege bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Angiotensin II

Bindet Angiotensin II an den AT₁-Rezeptor werden G_s- und G_{q11}-Proteine aktiviert. Diese wiederum führen zur Aktivierung (+, dünne blaue Pfeile) von Phospholipase C, die Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) bildet, und von MAP-Kinasen. Letztere steigern die Aktivität der Phosphoinositol-3-Kinase, die Phospholipase A₂ (PLA₂) aktiviert. PLA₂ setzt Arachidonsäure aus der Zellmembran frei, diese wird durch Lipoxygenase zu Leukotrien B₄ umgewandelt.

Inositoltriphosphat aktiviert Calciumkanäle im endoplasmatischen Retikulum, wodurch die Calciumkonzentration im Zytoplasma steigt. Dieser Umstand zusammen mit DAG induziert die Aktivierung der Proteinkinase C, die u. a. p47phox phosphoryliert und den GDP/GTP-Austausch von Rac sowie die Aktivität der Phospholipase D fördert. GTP-gebundenes Rac transloziert zur Zellmembran und assoziiert mit den anderen Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplexes. Die Phosphorylierung von p47phox führt zur Konformationsänderung mit Freilegung der hydrophoben Phox-Domäne und Translokation zum NADPH-Oxidasekomplex in der Zellmembran.

Das Enzym ist nun funktionstüchtig und produziert Superoxidationen, die in einer zweiten Aktivierungsphase (+, dünne braune Pfeile) nach Umwandlung zu Wasserstoffperoxid durch Katalase als positiver Feedback-Mechanismus die Tyrosinkinase c-src aktivieren. C-src fördert die Transaktivierung des EGF-Rezeptors. Dieser forciert zusätzlich die Aktivität der PI-3-Kinase, es kommt zu erhöhter PIP₂-Produktion. PIP₂ potenziert über Guaninnukleotidexchangeaktoren (GEFs) die Aktivierung und Translokation von Rac zum Oxidasekomplex.

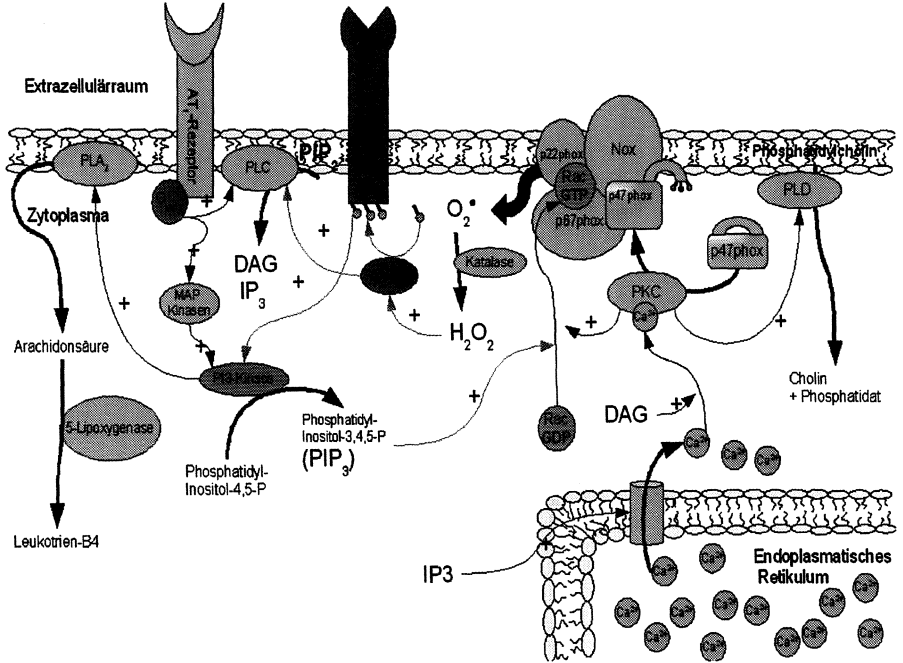
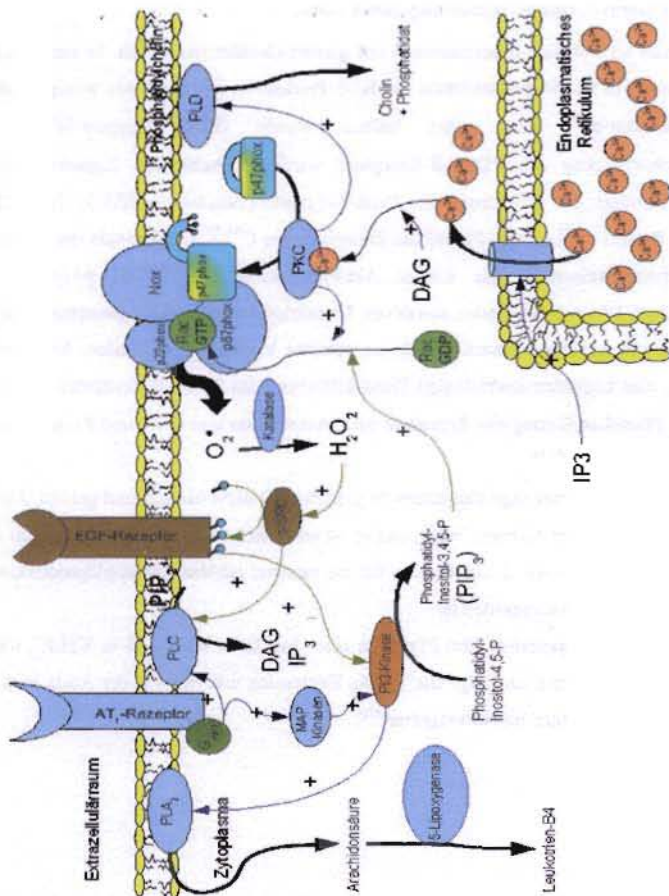


Abbildung 3: Modell für Signal-transduktionswege bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Angiotensin II

Einmal Angiotensin II an den AT₁-Rezeptor werden G- und G₁₂-Proteine aktiviert. Diese wiederum führen zur Aktivierung (+) dünne braune Pfeile) von Phospholipase C, die Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) bildet, und von MAP-Kinasen. Letztere steigern die Aktivität der Phosphoinositid-3-Kinase, die Phosphatidylinositol (PI-3) aktiviert. PI-3-Kinase katalysiert die Phosphorylierung von Leukotrien B₄ umgewandelt.

Inositoltriphosphat aktiviert Calciumkanäle im endoplasmatischen Retikulum, wodurch die Calciumkonzentration im Zytoplasma steigt. Dieser Umstand zusammen mit DAG induziert die Aktivierung der Proteinkinase C, die u. a. p37phox phosphoryliert und den GDP/GTP-Austausch von Rac sowie die Aktivität der Phospholipase D fördert. GTP-gebundenes Rac transloziert zur Zellmembran und assoziiert mit den anderen Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplexes. Die Phosphorylierung von p37phox führt zur Konformationsänderung mit Freisetzung der hydrophoben Fliox-Domäne und Translokation zum NADPH-Oxidasekomplex, in der Zellmembran.

Das Enzym ist nun funktionsfähig und produziert Superoxidionen, die in einer zweiten Aktivierungsphase (+, dünne braune Pfeile) nach Umwandlung zu Wasserstoffperoxid durch Katalase als positiver Feedback-Mechanismus die Tyrosinkinase c-src aktivieren. C-src fördert die Transaktivierung des EGF-Rezeptors. Dieser fördert zusätzlich die Aktivität der PI-3-Kinase, es kommt zu erhöhter PI3-P-Produktion. PI3-P potenziert über Guaninukleotidbindungsproteine (GEBFs) die Aktivierung und Translokation von Rac zum Oxidasekomplex.



2.2.6.2.2 NADPH-Oxidase-Aktivierung durch PDGF

PDGF bindet an Tyrosinkinaserzeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen. Je nach Rezeptor-Subtyp kommt es zu einer Stimulation der ROS-Produktion innerhalb von wenigen Minuten (PDGF-Rezeptor- α)⁴³ bzw. einer halben Stunde (PDGF-Rezeptor- β)^{43;73}. Nach Autophosphorylierung des PDGF- β -Rezeptors werden verschiedene Signatransduktionsproteine rekrutiert: die PI3-Kinase, die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2, das „GTPase-activating Protein of Ras“ (GAP) und die Phospholipase C^{43;73}. Das Produkt der PI3-Kinase, PIP₃, aktiviert seinerseits die Kinase Akt/Proteinkinase B^{37;43}, die p47phox, sowie verschiedene GEFs und den Redox-sensitiven Transkriptionsfaktor AP-1 phosphoryliert.

Auch in dieser Aktivierungskaskade gibt es positive Verstärkungsschleifen. So wurde von Saito et al. eine Liganden-unabhängige Transaktivierung des PDGF- β -Rezeptors durch H₂O₂-induzierte Phosphorylierung des Rezeptors nach Assoziation von c-Src und Proteinkinase C δ in VSMC beschrieben^{43;74}.

Der genaue Ablauf dieser Signalkaskaden ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Zum Teil überschneiden sich hier mehrere Wege und es ist auch nicht klar, welche Isoform der in den VSMC exprimierten Nox1, 2 und 4 genau für die messbar erhöhte Superoxidproduktion nach PDGF-Stimulation verantwortlich ist.

Auf Ebene der Genexpression führt PDGF zu einer Induktion von Nox1 in VSMC, was eine erhöhte Proliferationsrate zur Folge hat^{5;43}. Die Expression von Nox4 in der Aorta wird durch PDGF im Gegensatz dazu herunterreguliert^{12;43}.

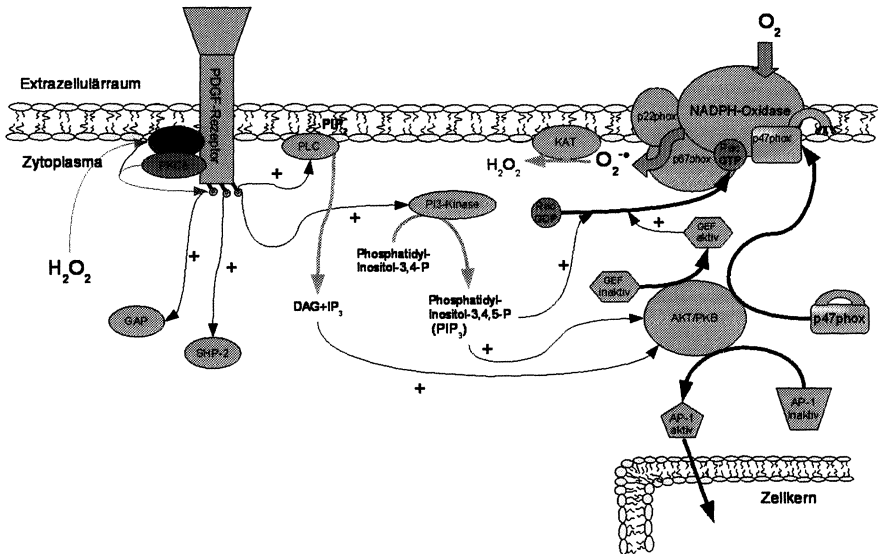


Abbildung 4: Modell für Signaltransduktionswege bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase durch PDGF

Bindet PDGF an seinen Typ-β-Rezeptor auf der Zellmembran, wird dessen Autophosphorylierungsaktivität in Gang gesetzt und verschiedene Signaltransduktionsmoleküle werden rekrutiert (+, blaue Pfeile). Dazu zählen das GTPase activating protein of Ras (GAP), die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2, Phospholipase C und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase). Letztere produziert Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat (PIP₃). PIP₃ aktiviert AKT, auch Proteinkinase B (PKB) genannt. Diese Kinase phosphoryliert u. a. den Transkriptionsfaktor AP-1, der dadurch in den Zellkern transloziert und die Genexpression beeinflusst. Daneben phosphoryliert sie p47phox, das zum NADPH-Oxidasekomplex in der Zellmembran transloziert, sowie verschiedene Guanidinnukleotidexchange Faktoren (GEF), die die Aktivierung von Rac beschleunigen. Rac transloziert sodann im aktivierten Zustand zum NADPH-Oxidasekomplex in der Zellmembran. Nach Versammlung aller Untereinheiten wird die NADPH-Oxidase aktiv und produziert Superoxidanionen.

Auch in diesem Signaltransduktionsweg existieren positive Verstärkungsschleifen (+, braune Pfeile). So wandelt Katalase (KAT) die Superoxidationen ($O_2^{\bullet-}$) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um, das seinerseits die Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors in Gegenwart der Kinasen c-SRC und Proteinkinase Cδ (PKCδ) auch ohne Liganden aktiviert.

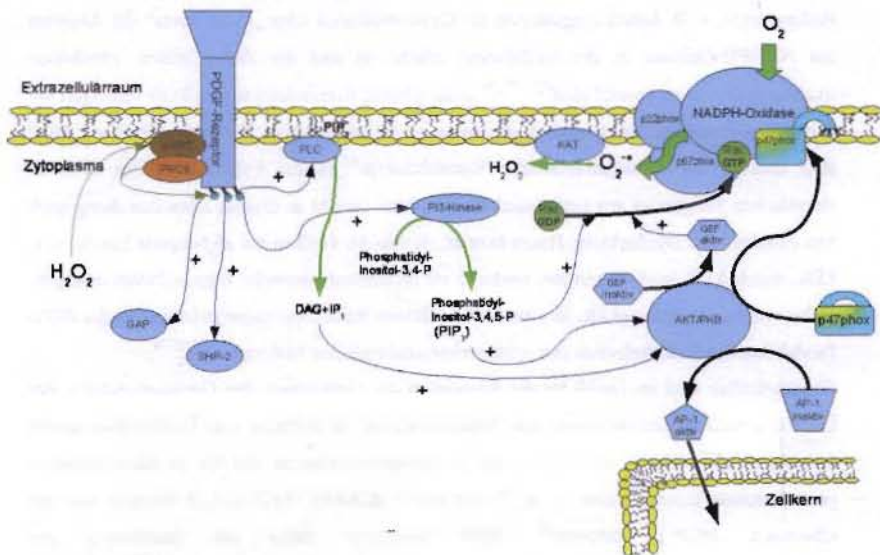


Abbildung 4: Modell für Signaltransduktionswege bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase durch PDGF

Bindet PDGF an seinen Typ-β-Rezeptor auf der Zellmembran, wird dessen Autophosphorylierungsaktivität in Gang gesetzt und verschiedene Signaltransduktionsmoleküle werden rekrutiert (+, blaue Pfeile). Dazu zählen das GTPase activating protein of Ras (GAP), die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2, Phospholipase C und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase). Letztere produziert Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat (PIP₃). PIP₃ aktiviert AKT, auch Proteininkinase B (PKB) genannt. Diese Kinase phosphoryliert u. a. den Transkriptionsfaktor AP-1, der dadurch in den Zellkern transloziert und die Genexpression beeinflusst. Daneben phosphoryliert sie p47phox, das zum NADPH-Oxidasekomplex in der Zellmembran transloziert, sowie verschiedene Guanidinnukleotidexchangefaktoren (GEF), die die Aktivierung von Rac beschleunigen. Rac transloziert sodann im aktivierten Zustand zum NADPH-Oxidasekomplex in der Zellmembran. Nach Versammlung aller Untereinheiten wird die NADPH-Oxidase aktiv und produziert Superoxidanionen.

Auch in diesem Signaltransduktionsweg existieren positive Verstärkungsschleifen (+, braune Pfeile). So wandelt Katalase (KAT) die Superoxidanionen (O₂^{•-}) in Wasserstoffperoxid (H₂O₂) um, das seinerseits die Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors in Gegenwart der Kinasen c-SRC und Proteininkinase C6 (PKC6) auch ohne Liganden aktiviert.

2.3 NADPH-Oxidase und Atherosklerose

Verschiedene Gruppen konnten bisher zeigen, dass unter proatherosklerotischen Bedingungen, z. B. hohen Angiotensin II- Konzentrationen oder „shear stress“ die Aktivität der NADPH-Oxidase in der Gefäßwand erhöht ist und die Zellen einem verstärkten oxidativen Stress ausgesetzt sind^{53;57;75;76}. Eine erhöhte Konzentration von ROS verringert die Bioverfügbarkeit des vom Endothel gebildeten, vasodilatatorischen NO in der Gefäßwand und stört dadurch die endothelvermittelte Vasorelaxation¹. In der Folge kommt es zu einer chronischen Steigerung des Gefäßmuskeltonus. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von endothelialer Dysfunktion. Hinzu kommt, dass in der Gefäßwand abgelagerte Lipide, v. a. LDL, durch ROS oxidiert werden, wodurch sie proinflammatorische Eigenschaften erlangen. Insbesondere steigern oxLDL in einer Art positivem Rückkopplungsmechanismus die ROS-Produktion der Endothelzellen und wirken chemotaktisch auf Makrophagen⁷⁷⁻⁷⁹.

Endothelzellen sind im Gefäß für die Regulation des Gefäßtonus, des Gerinnungsstatus, der Leukozytentransmigration sowie der Zellproliferation im Rahmen von Reparaturprozessen verantwortlich⁷². Durch redox-sensitive Transkriptionsfaktoren werden in Endothelzellen proinflammatorische Proteine, z. B. Tissue-factor, ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und das Chemokin MCP-1 induziert⁷². ROS induzieren daher die Ausstattung der Endothelzelloberfläche mit den Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1, was die Thrombozytenaggregation und die Transmigration von Leukozyten erst ermöglicht. Diese Infiltration von Monocyten in die Gefäßwand mit nachfolgender Bildung von Schaumzellen durch Phagozytose abgelagerter Lipide ist verantwortlich für die Entstehung der ersten Stadien atherosklerotischer Plaques.

Die Expression und Regulation der NADPH-Oxidase in vaskulären Zellen ist daher ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von endothelialer Dysfunktion und der Entstehung bzw. Progression von Atheromen.

In dieser Arbeit soll nun das Expressionsmuster der Nox-Isoenzyme und regulatorischen Untereinheiten in verschiedenen Organen im Allgemeinen und in vaskulären Zellen im Besonderen untersucht werden. Darüberhinaus ist die Veränderung der Expression von regulatorischen Untereinheiten der NADPH-Oxidase in vaskulären Zellen unter dem Einfluss von für die Pathophysiologie der Atherosklerose bedeutsamen Wachstumsfaktoren (Angiotensin II, PDGF) Gegenstand der Untersuchung, sowie die Nox-Expression in einem Tiermodell für renovaskuläre Hypertonie.

3 Material und Methoden

3.1 RNA-Extraktion

3.1.1 Probenvorbereitung

Maus oder Rattenorgane, z. B. Leber oder Niere werden direkt nach Entnahme aus den kurz zuvor getöteten Tieren in ca. 8 mm³ große Würfel geschnitten. Colon wird zunächst in PBS-Puffer gewaschen und danach in ca. 3 mm breite Ringe geschnitten. Anschließend werden die Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff gemörsert und bis zur Weiterverarbeitung bei – 80 °C tiefgefroren.

Zellkulturschalen von 3 cm Durchmesser mit fast konfluierenden Zellen wurden direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und ebenfalls bis zur Weiterverarbeitung bei – 80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.1.2 TRIzol-Methode

Zu den gemörserten Gewebeproben wird je 1 ml Tri-Reagenz (Mischung aus Guanidinisothiozyanat, Phenol und Chloroform) gegeben, die Suspension wird dann mit Hilfe einer 1000- μ l-Pipette homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei Zellkulturen in 3 cm großen Schalen wird nach Abgießen des Kulturmediums das Tri-Reagenz direkt auf die Zellen gegeben. Anschließend werden die Zellen mit einem Schaber von der Platte gekratzt, die Suspension in ein Eppendorf™-Röhrchen gegeben und 5 min inkubiert. Jeweils 0,2 ml Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (1:24) wird zu den Proben gegeben, die Mischung wird geschüttelt und wiederum 5-10 min inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend bei 12 000 g und 4 °C 15 min lang zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird dann abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen. Dann wird je 1 ml 75 % Ethanol zugegeben, die Mischung kräftig geschüttelt und bei 7 500 g und 4 °C 5 min lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Ethanol möglichst vollständig abpipettiert und das entstandene RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wird das getrocknete Pellet in 30-50 μ l DEPC-H₂O resuspendiert.

3.1.3 Stratagene Rneasy kit

Dieser Kit basiert auf einer Silika-Fasermatrix, die die RNA in Gegenwart eines chaotropen Salzes bindet, während mit Hilfe verschiedener Waschpuffer Proteine und andere Kontaminationen entfernt werden.

Die vorbereiteten Proben werden zunächst mit Lysis-Puffer auf Guanidinthiocyanat-Basis gemischt. Dieser schützt aufgrund seiner stark Protein-denaturierenden Wirkung die RNA vor Degradation durch RNasen und lysiert die Zellen. Nach der Lyse werden die Proben, nach erster grober Reinigung von Partikeln und großen DNA-Mengen mit Hilfe einer Filtersäule, auf die Silikafasermatrix übertragen. Die übrige DNA wird durch einen 15-minütigen DNase-Verdau direkt auf der Silika-Fasermatrix entfernt. Dieser Schritt ist laut Jo Vandesompele et al. eine Voraussetzung für akkurate RT-PCR Ergebnisse⁸⁰. Anschließend wird die RNA noch in mehreren Waschstufen gereinigt und schließlich mit 30µl schwach-ionischen Puffer von der Matrix gelöst und in ein Eppendorftube aufgenommen.

3.2 RNA- Konzentrationsmessung

3.2.1 Photometrisches Verfahren

Die extrahierten RNA-Proben werden - je nach Ausbeute der Extraktion, meist im Verhältnis 1:100 - mit DEPC-H₂O verdünnt und in eine Kristall-Küvette gegeben. Nach Messung der Extinktion bei 260nm wird die RNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$C = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 500$$

Anschließend wird noch der Grad der Verunreinigung der RNA mit Hilfe des Quotienten aus den Extinktionswerten bei 260 nm und 280 nm nach folgender Formel berechnet:

$$Q = E_{260} / E_{280}$$

wobei die Qualität der RNA umso besser ist, je näher der Quotient (Q) bei 1,8 liegt.

Problematisch bei dieser Methode ist, dass RNA-Konzentrationen unter 0,5 µg/µl nicht mehr exakt gemessen werden können. V. a. bei Verwendung geringer RNA-Mengen für RT und real-time RT-PCR-Versuche ist die photometrische Ermittlung der RNA-Konzentration daher nur bedingt geeignet.

3.2.2 RiboGreen[®]-Verfahren

Dieses Verfahren misst die RNA-Konzentration mit Hilfe des an RNA bindenden Fluoreszenzfarbstoffs RiboGreen[®] (Absorptionsmaximum ohne RNA: 482 nm, molarer Extinktionskoeffizient_{482 nm} = ca. 67 000 L cm⁻¹ mol⁻¹, Absorptionsmaximum mit RNA: ~ 500 nm, Fluoreszenz-Emission gemessen bei 530 ± 15 nm)⁸¹.

Die RNA-Proben werden zu Beginn im Verhältnis 1:1000 mit TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5) verdünnt. Zur Erstellung einer Standardkurve wird Referenz-RNA, die im Kit mitgeliefert wird, mit TE-Puffer entsprechend den Konzentrationen 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,0625 µg/ml und 0 µg/ml RNA verdünnt. Von den Proben und Standard-Verdünnungen werden je 2 mal 50 µl in die Wells einer schwarzen 96-Well-Platte pipettiert und in Dunkelheit je 50 µL 750 nM RiboGreen[®]-Reagenz dazu gegeben. Danach wird die Fluoreszenz der Ansätze im Viktor[®]-Fluorimeter jeweils drei mal pro Well gemessen, wobei die Intensität der Fluoreszenz der RNA-Konzentration proportional ist. Die Fluoreszenzwerte werden zur Auswertung in eine Excel-Datei transferiert und jeweils die Mittelwerte für eine Probe berechnet. Aus den Fluoreszenzwerten der Referenz-RNA-Verdünnungen wird eine Standardkurve erstellt, diese als Diagramm dargestellt und die Funktion der Standardkurve mit Hilfe des Programms errechnet. Anhand dieser Funktion unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren werden die RNA-Konzentrationen der Proben berechnet. Mit diesem Verfahren können laut L. J. Jones et al. RNA-Konzentrationen von 1,0 ng/ml bis 1,0 µg/ml RNA zuverlässig gemessen werden⁸¹.

3.3 Reverse Transkription

1 bis 2 µg RNA-Probe werden vor der ersten Verwendung zunächst 5 min lang bei 65 °C im Heizblock erwärmt und im Anschluss zur Denaturierung sofort auf Eis abgekühlt. Im Folgenden werden auf Eis 50 µl RT-Ansatz mit folgendem Inhalt zusammenpipettiert: RT-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂), 0,01 µg/µl „random Hexamer-Primer“, 1 mM DTT, jeweils 0,4 mM dATP, dTTP, dGTP, und dCTP, 5 Units Superscript II Reverse Transkriptase und als restliches Volumen bis 50 µl DEPC-H₂O. Alle Zutaten werden gut gemischt und dann 30 min bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Danach wird die Reverse Transkriptase in den Versuchsansätzen durch 5-7 min langes Erhitzen bei 95 °C im Heizblock inaktiviert. Die RT Ansätze müssen danach noch abkühlen, werden kurz bei 12 000 g zentrifugiert und bis zur Verwendung bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.4 Real-time PCR

Mit Hilfe eines Thermocyclers, der während der Reaktion in 96-well-Platten Fluoreszenz-Intensität von bis zu 4 verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig messen kann (Mx4000 von Stratagene), können während des Ablaufs einer PCR Daten über den Reaktionsverlauf ermittelt werden. Wie bei der konventionellen PCR wird eine spezifische DNA-Sequenz (Template) mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase in Zyklen verschiedener aufeinanderfolgender Temperaturschritte vervielfältigt. Für die real-time PCR wird eine durch einen Antikörper blockierte Polymerase verwendet, die erst durch 5 minütiges Erhitzen bei 94 °C vom Antikörper freigegeben wird und dabei ihre enzymatische Aktivität erlangt. Dadurch ist gesichert, dass die Reaktion in allen Versuchsansätzen gleichzeitig gestartet werden kann und nicht bereits nach Hinzufügen des Enzyms zum Reaktionsansatz beginnt.

Für 30 µl Reaktionsansatz werden außer der Polymerase noch 10-50 ng Template-DNA, 20 pmol Forward Primer, und 20 pmol Reverse-Primer (bzw. je nach Primer-Set unterschiedliche Mengen), benötigt. Des Weiteren werden je 0,2 mmol/L dATP, dTTP, dCTP und dGTP sowie Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4), 1,5-4,5 mmol/l MgCl₂ und als restliches Volumen Aqua bidest. hinzu pipettiert.

Der Reaktionsansatz wird nun über 30 und 40 Zyklen einem festen Temperaturschema unterworfen: 30 s Denaturierung bei 95 °C zur Trennung der DNA-Doppelstränge, dann 30-45 s „Annealing“ bei einer Primer-spezifischen Temperatur (55-60 °C) zur Bindung der Primer an die komplementäre „Template-Sequenz“ und schließlich 30-60 s „Elongation“ währenddessen die Taqpolymerase an die Primer-Template-Hybride bindet und an der Template-DNA beginnend an der Primerbindungsstelle einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Der neu entstandene Doppelstrang wird im nächsten Zyklus beim Denaturierungsschritt in zwei Einzelstränge getrennt. Beide dienen dann erneut als Template für die Amplifikation. Auf diese Weise wird die DNA über mehrere Zyklen exponentiell vervielfältigt.

3.4.1 mRNA-Quantifizierung mit Taqman-Probes

Dieses Verfahren beruht auf fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (= Taqman-Probe), die sequenzspezifisch an Einzelstrang-DNA binden. Die Primer und Taqmanprobes wurden entweder mit der PrimerExpress-Software entworfen oder der Literatur entnommen und anschließend durch die Firma Biospring hergestellt.

Im ungebundenen Zustand absorbiert ein „Quencher“ am 3′ -Ende des Oligonukleotids, z. B. TAMRA, das von einem fluoreszierenden Farbstoff, z. B. FAM, CY5 oder HEX, am 5′-Ende desselben Oligonukleotids emittierte Licht. Das Oligonukleotid bindet während der Annealing-Phase der PCR-Reaktion an einen Abschnitt des zu seiner Nukleotid-Sequenz komplementären DNA Einzelstranges zwischen den Bindungsstellen für Forward- und Reverse-Primer. Dort wird es mit Hilfe der 5′-Exonukleaseaktivität der *Thermophilus aquaticus*-Polymerase während der Elongationsphase der PCR in einzelne Nukleotide zerlegt. Der Farbstoff und der Quencher werden dabei räumlich voneinander getrennt, so dass die Intensität des vom Farbstoff emittierten Lichts photometrisch gemessen werden kann. Die in jedem PCR-Zyklus gemessene Lichtintensität steigt während der PCR proportional zur Menge der lysierten Taqman-Probes an. Dadurch kann spezifisch die Menge des synthetisierten PCR-Produkts anhand der Fluoreszenz gemessen werden.

3.4.2 mRNA Quantifizierung mit Sybrgreen[®]

Für dieses Verfahren werden dem PCR-Reaktionsansatz zwei fluoreszierende Farbstoffe zugesetzt. Sybrgreen[®] fluoresziert spezifisch nach Bindung an doppelsträngige DNA. Die in jedem PCR-Zyklus gemessene Intensität der Fluoreszenz steigt proportional zur Menge des doppelsträngigen synthetisierten PCR-Produkts. Da die Fluoreszenz ebenfalls durch andere Faktoren, insbesondere von der Temperatur beeinflusst wird, wird zur Kontrolle ein Referenz-Fluoreszenz-Farbstoff, z. B. Rox, der nicht an DNA bindet und Licht einer anderen Wellenlänge emittiert, dem PCR-Reaktionsansatz zugegeben. Die Intensität der Sybrgreen[®]-Fluoreszenz kann auf diese Weise durch die Software um Temperatur- und andere Einflüsse korrigiert werden, um allein die DNA-Synthese-abhängige Zunahme der Fluoreszenz zu ermitteln.

Der größte Nachteil dieser Methode liegt darin, dass Sybrgreen[®] nicht sequenz-spezifisch ist, d. h. es bindet an alle DNA-Doppelstränge, z. B. auch Primer-Dimere und unspezifische, von der Polymerase synthetisierte DNA-Stränge, die nicht dem gewünschten Amplikon entsprechen. Dies wird v. a. dann problematisch, wenn das zu untersuchende Gen in der Probe nur durch sehr wenige cDNA-Moleküle vertreten ist. Daher ist die Sensitivität dieser Methode auf mind. 100 ursprüngliche Template-Kopien in der Probe begrenzt⁸². Ist der Schmelzpunkt der Amplikons bekannt, kann man die Fluoreszenz durch unspezifische PCR-Produkte reduzieren, indem man die Fluoreszenz 1-2°C unterhalb des Schmelzpunktes des Amplikons misst, da unspezifische Produkte meistens kürzer sind und daher geringere

Schmelztemperaturen haben. Dennoch ist oft eine weitere Analyse zur genaueren Charakterisierung des PCR-Produkts durch Agarose-Gelelektrophorese oder Polyacrylamidgelelektrophorese notwendig.

Während der exponentiellen Phase der PCR, d. h. wenn noch alle Reagenzien in nicht limitierter Menge im PCR-Ansatz vorhanden sind, steigt die Fluoreszenz bei beiden Methoden exponentiell mit der Menge des amplifizierten Templates an. Man kann während dieser Phase der PCR daher anhand der Fluoreszenz die ursprüngliche Menge Template berechnen.

Um die Proben untereinander vergleichen zu können, ermittelt man den sogenannten Schwellenwert-Zyklus oder „threshold cycle“ (c_T). Das ist der PCR-Zyklus, bei dem die Intensität der Fluoreszenz des Taqmanprobe-Farbstoffs bzw. des Sybrogreen[®] im PCR-Ansatz sich erstmals deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Er liegt immer in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion und weist daher ein lineares Verhältnis zur ursprünglichen Kopienzahl des untersuchten Gens in der Probe auf⁸³. Vergleicht man nun die Threshold-Cycles verschiedener cDNA-Proben gleicher Konzentration, kann man damit Aussagen über die ursprüngliche Anzahl der Genkopien oder Templates machen. Zur Berechnung der ursprünglichen Template-Menge gibt es verschiedene Methoden:

3.4.2.1 Vergleichende c_T – Methode ($\Delta\Delta c_T$)

Bei dieser Methode wird ein Referenz- oder „Haushalts“- Gen parallel, d. h. in getrennten Tubes, zum zu untersuchenden Gen amplifiziert. Die Expression des Referenzgens sollte durch die Versuchsabläufe möglichst nicht beeinflusst werden und dessen Expression sollte in allen zu untersuchenden Zellen in möglichst gleich sein. Man kann mit dieser Methode die relative Menge des zu untersuchenden Gens in einer Probe im Vergleich zu einer anderen Probe (Kontrolle) ermitteln. Voraussetzungen für die Anwendung dieses Verfahrens sind die Annahmen einer gleichen Amplifikationseffizienz des Referenzgens und des zu untersuchenden Gens und eine nahe 1 liegende Amplifikationseffizienz während der exponentiellen PCR-Phase⁸³. Die Effizienz der PCR-Reaktion ist abhängig von der Bindung der Primer, der Schmelztemperatur des Amplikons und auch der Schmelztemperatur der dem Amplikon benachbarten DNA-Sequenzen⁸⁴.

Werden diese Bedingungen erfüllt, kann man die relative Menge des zu untersuchenden Gens folgendermaßen berechnen:

Zuerst berechnet man für alle zu vergleichenden Proben die Differenz (Δc_T) der „threshold cycles“ zwischen dem zu untersuchendem Gen und dem Referenzgen:

$$\Delta c_T = c_T(\text{Gen}_{\text{Unt}}) - c_T(\text{Gen}_{\text{Ref}})$$

Nun werden für alle Proben die Δc_T -Werte mit dem Δc_T -Wert einer Kontroll-Probe durch Berechnung des $\Delta \Delta c_T$ -Wertes verglichen. Dieser errechnet sich wie folgt:

$$\Delta \Delta c_T = \Delta c_T(\text{Probe X}) - \Delta c_T(\text{Kontroll-Probe})$$

Um nun vergleichbare Zahlenwerte zu erhalten, berechnet man, unter der Annahme, dass die Menge des PCR-Produkts sich idealerweise in jedem Zyklus verdoppelt, den Expressionslevel des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur Kontrollprobe (Expressionslevel Kontrolle = 1) folgendermaßen:

$$\text{Expressionslevel}_{\text{Probe X}} = 2^{-\Delta \Delta c_T(\text{Probe X})}$$

Die Auswahl des Referenzgens bei dieser Methode ist äußerst wichtig, da kleine Unterschiede in dessen Expression sich stark auf das Ergebnis (relative Menge des zu untersuchenden Gens in verschiedenen Proben) auswirken. In dieser Arbeit wurden als Haushaltsgene β Aktin, Elongationsfaktor und 18SrRNA verwendet, wobei letztere mRNA nach eigenen Erfahrungen und auch laut Literatur^{85;85;86;86} am wenigsten durch unterschiedliche Stimulation der Zellkulturen beeinflusst wurde und auch in verschiedenen Zelltypen und Geweben in gleicher Menge vorhanden war.

Da in der Realität die PCR-Effizienz meist nicht genau 2 beträgt, sondern etwas geringer ist, wurde für die verschiedenen PCR-Reaktionen die jeweilige PCR-Effizienz anhand einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Kontroll-cDNA, z.B. murine Colon cDNA oder Noxo1-Plasmid, errechnet. Dazu wird der c_T -Wert in Abhängigkeit von der cDNA- respektive Plasmid-Menge dargestellt und die zugehörige logarithmische Funktion berechnet. Die PCR-Effizienz (E) errechnet sich dann wie folgt:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung der Standardkurve}}$$

Bei dieser Methode wird die tatsächliche PCR-Effizienz leider z.T. überschätzt, so dass die errechneten PCR-Effizienzen u.U. Werte über 2 annehmen können, was unrealistisch ist.

Die Effizienz-korrigierte relative Expression errechnet sich dann anhand folgender Formel:

$$\text{Expressionslevel}_{\text{Probe X}} = (E_{\text{NoxPCR}}^{\Delta c_T(\text{Probe X})}) / (E_{\text{RefgenPCR}}^{\Delta c_T(\text{Probe X})}) .$$

3.4.2.2 Standardkurven-Methode

Hier wird eine Probe mit bekannter Genkopienzahl, z. B. ein Plasmid, das die Template-Sequenz der Primer und Taqmanprobe enthält, in verschiedenen Konzentrationen parallel zu den übrigen Proben amplifiziert. Anhand der Threshold-Cycles der Standard-Proben und ihrer bekannten Kopienzahl lässt sich nun eine Standardkurve erstellen, mit deren Hilfe die Kopienzahl der zu untersuchenden Proben aus deren Threshold-Cycle errechnet werden kann.

3.4.3 Analyse der PCR-Produkte

3.4.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse der Länge der PCR-Produkte wird zunächst ein 1-1,2 %iges Agarosegel aus Agarose und TAE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen und auf eine Plastikplatte gegossen. In das noch heiße Gel werden Käbme zur Bildung von Taschen gesteckt. In diese Taschen können dann, sobald das Gel fest geworden ist, die Proben und ein Größenstandard pipettiert werden. Jene werden zuvor allerdings noch mit „Loading-Dye“, einem Farbstoff, versetzt, um während der Elektrophorese beurteilen zu können, wie weit die Proben im Gel schon gewandert sind. Die PCR-Produkte werden dann aufgrund ihrer negativen Ladung im Elektrischen Feld zum Pluspol gezogen und dank der Agarosematrix je nach Größe aufgetrennt.

Nach 30-60 min wird der Strom abgestellt und die DNA im Gel ca. 10 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Unter UV-Licht können DNA-Fragmente gleicher Länge als Banden dadurch sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

3.4.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten von 100-300 Basenpaaren Länge benötigt man ein 10%iges Polyacrylamidgel. Für 40ml Acrylamidgel werden 13,3 ml aus einer 30%igen Acrylamid-Lösung, 26,7 ml TBE-Puffer, 320 µl 10 %iges APS und 40 µl TEMED vermischt und sofort zwischen zwei auf drei Seiten mit Agarose abgedichtete Glasplatten gegossen. Auf der noch offenen Seite wird ein Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt, um Taschen für die Proben zu erzeugen. Nachdem das Gel polymerisiert ist, werden Proben mit Loading-Dye und Größenstandard in die Taschen pipettiert und in einen mit TBE-gefüllten Laufkasten gestellt, in dem ein elektrisches Feld erzeugt wird. Die DNA wandert nun ca. 1 h entsprechend ihrer Ladung in Richtung des Pluspols und wird im Acrylamidgel der Länge nach aufgetrennt.

Schließlich wird das elektrische Feld ausgeschaltet, das Gel vorsichtig von den Glasplatten abgelöst und 10 min in einer 1 : 20 000 fach verdünnten Sybgreen[®]-Lösung gefärbt. Die DNA-Banden können dann mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden und zur Dokumentation fotografiert werden.

3.4.3.3 Analyse der DNA-Schmelzkurven nach der PCR-Reaktion

Wenn die PCR-Reaktion mit Sybgreen[®] durchgeführt wurde, kann man im Anschluss an die PCR im Mx4000 eine Schmelzkurve der PCR-Produkte erstellen. Dabei werden die PCR-Ansätze angefangen bei 55 °C jeweils alle 10 Sekunden um 1 °C erhitzt und die Fluoreszenz bei der entsprechenden Temperatur aufgezeichnet. Wenn man nun die Fluoreszenz über der Temperatur als Graph aufträgt, erhält man eine asymptotische Kurve, deren Steigung sich bei der Schmelztemperatur des PCR-Produkts stark verändert. Dies kann durch Darstellung als 1. Ableitung der Schmelzkurve noch verdeutlicht werden. Hier erscheint die Temperatur, bei der die Fluoreszenz im PCR-Ansatz am stärksten abgenommen hat, d. h. bei der die meisten DNA-Stücke im Ansatz geschmolzen sind, als gut ablesbares Maximum des Graphen.

Dieses Verfahren ermöglicht laut Kirk Ririe⁸⁷ die Unterscheidung zweier Amplifikationsprodukte, die eine um mindestens 2 °C unterschiedliche Schmelztemperatur aufweisen, da die Form und Position der DNA-Schmelzkurve Funktionen des GC/AT-Verhältnisses, der Länge und der Sequenz des Amplifikationsproduktes sind.

3.5 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden entsprechend den Richtlinien des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ der US National Institutes of Health (<http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309053773>) durchgeführt und von der zuständigen Ethikkommission genehmigt (Aktenzeichen II25.3-19c20/15-F61/16).

Männliche Nox2-Knockout-Mäuse (Genetischer Hintergrund C57/BL) wurden von Jackson Laboratories, Bar Harbour, Maine, USA geliefert. Entsprechende C57/BL-Kontrollmäuse wurden von den Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, Massachusetts, USA bezogen. Im Alter von 8 Wochen wurden die Mäuse nach der von Wiesel et al. 1997 entwickelten Methode⁸⁸ entweder der Schein- oder der Clip-Operation unterzogen.

Die Mäuse wurden zunächst durch Isofluran-Inhalation (1-2 % in reinem Sauerstoff) narkotisiert, dann wurde eine Niere durch einen kleinen Schnitt an der Flanke freigelegt und vorsichtig mit einer filigranen Pinzette festgehalten. Für die Clip-Operation wurde ein kurzer Abschnitt der linken Nierenarterie stumpf freipräpariert und nahe des Abgangs aus der Aorta der Clip platziert. Dafür wurden U-förmige Edelstahl-Clips der Größe 3 x 2 x 1 mm mit einer 2 mm langen Spalte verwendet. Die Weite der Clip-Öffnung lag zwischen 0,04 und 0,18 mm. Anschließend wurde die Niere vorsichtig wieder in den Retroperitonealraum zurückversetzt. Für die Scheinoperation wurden die Mäuse der gesamten Prozedur unterzogen mit Ausnahme der Clip-Applikation an der Nierenarterie. Um das Risiko einer Wundinfektion zu minimieren erhielten die Mäuse postoperativ eine einmalige Ampicillin-Spritze (50 mg/kg KG).

Am 14. und 28. Tag nach der Operation wurde bei den Tieren der Blutdruck mittels Schwanzmanschette von Visitech Systems gemessen und am 29. Tag wurden die Versuche im Organbad durchgeführt. Insgesamt war die Induktion einer renovaskulären Hypertonie, definiert über einen Blutdruck > 120 mmHg zwei Wochen postoperativ, bei ca. 70 % der Tiere erfolgreich. Tiere, die dieses Kriterium nicht erfüllten, wurden von den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Einigen Tieren wurden 16 Stunden vor der Tötung noch 100 µl einer physiologischen Kochsalzlösung mit 1000 U/kg Polyethylenglykol-Superoxiddismutase (PEG-SOD) von Sigma subkutan injiziert. Andere erhielten über den Zeitraum von 5 Tagen vor der Tötung 10 mg/kg Körpergewicht und Tag des die NADPH-Oxidase-hemmenden Peptids „gp91ds-tat“ von Eurogentec oder eines Kontroll-Peptids („scrambled-tat“) über eine osmotische Minipumpe, wie 2001 von Rey et al. beschrieben⁸⁹.

3.5.1 Organkultur

Unter sterilen Bedingungen wurden Aortensegmente aus Wildtyp und Nox2-Knockout-Mäusen entnommen, gesäubert und 24 Stunden lang in MCDB-131-Kulturmedium von Gibco mit 0,1 % bovinem Serumalbumin, Penicillin und Streptomycin bei 5 % CO₂ und verschiedenen [⁵Val]-Angiotensin II-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Aortenringe in den Organbadversuchen verwendet.

3.5.2 Versuche im Organbad

Für diese Versuche wurden Aortenringe im Organbad unter einer passiven Spannung von 2 g mit isometrischen Kraftaufnehmern verbunden. Die Konzentration von Phenylephrin wurde

dabei zwischen 0,03 und 0,3 $\mu\text{mol/l}$ so gewählt, dass Vorkonstriktions-Niveaus entsprechend 80 % einer durch 80 mmol/l KCl-Lösung bedingten Vasokonstriktion vorlagen. Zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vorkonstriktionsniveaus und der Kraftentwicklung. Zur Untersuchung der endothelabhängigen Vasorelaxation wurde Acetylcholin in Konzentrationen zwischen 0,0001 und 10 $\mu\text{mol/l}$ in das Organbad gegeben. In einzelnen Versuchsgruppen wurden die Aortenringe zuvor über 30 min mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Ro31-8220, einem Inhibitor der Proteinkinase C oder 60 min mit 40 ng/ml Clostridium difficile lethal Toxin B (TcdB), das Rac inaktiviert, oder mit 1 $\mu\text{mol/l}$ AG1478, einem Inhibitor der Epidermal-Growth-factor-Rezeptor-Kinase, inkubiert. Bei anderen Versuchsgruppen erfolgten die Messungen der endothelabhängigen Vasorelaxation in Gegenwart von 1 mmol/l des Antioxidans Tiron. Darüberhinaus wurde mit kumulativer Zugabe der NO-Donatoren von 0,01 bis 10 $\mu\text{mol/L}$ Deta-NONOat oder 0,01 nmol/l – 1 $\mu\text{mol/l}$ Nitroprussidnatrium die endothelunabhängige Vasorelaxation mit und ohne Entfernung der Intima mittels Pinzetten untersucht.

3.6 Messung der vaskulären Sauerstoffradikalproduktion

Die Messung der Sauerstoffradikalproduktion erfolgte mit Hilfe von 5 $\mu\text{mol/l}$ Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz-Bestimmung in intakten Aortenringen, wie von Brandes et al. 1994 beschrieben⁹⁰.

3.7 Angiotensin II-Plasmaspiegel

Die Angiotensin II-Spiegel der Mäuse wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays von IBL, Hamburg, in EDTA-Plasma entsprechend den Anwendungshinweisen des Herstellers bestimmt.

3.8 Statistik

3.8.1 Statistische Auswertung der mRNA Expression

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur semiquantitativen Nox-Expression sind in den Grafiken als Median dargestellt, sofern nicht anders bezeichnet. Die Beurteilung und Charakterisierung der Expressionsuntersuchungen in den Stimulationsversuchen erfolgt

mittels ANOVA (Analyse der Varianz) und nachfolgendem Test nach Dunnett. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ als signifikant bzw. $p < 0,01$ als hochsignifikant festgelegt. Die Werte sind in den Grafiken als arithmetisches Mittel \pm Standard error of the mean (SEM) dargestellt, wie im einzelnen angezeigt.

3.8.2 Statistische Auswertung der übrigen Versuche

Alle dargestellten Werte sind – sofern nicht anders bezeichnet – arithmetische Mittelwerte \pm SEM. Die Werte der maximalen Relaxation wurden aus individuellen Dosis-Wirkungskurven berechnet. Statistische Analysen wurden mit ANOVA für wiederholte Messungen und anschließendem Fisher's Test der geringsten signifikanten Unterschiede oder, wenn angemessen, mit einem gepaarten T-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden P-Werte $< 0,05$ angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Nox-Isoformen

4.1.1 Validierung der Nox-Primer und Etablierung der PCR

Im Archiv der online-Datenbank der National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>) wird die Nukleotidsequenz der mRNA für das zu untersuchende Gen, i. e. Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 und Nox5, der jeweiligen Spezies ermittelt.

MRNA	Mensch	Maus	Ratte
Nox1	AJ438989	NM_172203	NM_053683
Nox2	NM_000397	BC071229	NM_023965
Nox3	NM_015718	AY182377	"-/-"
Nox4	AF254621	NM_015760	NM_053524
Nox5	AF317889	"-/-"	"-/-"

Tabelle 2: Quellen der Nukleotidsequenzen der verschiedenen Nox-Isoform-mRNAs

Aufgeführt sind die Accession-Nummern der mRNA-Nukleotidsequenzen (Spalten 2,3 und 4) getrennt nach Spezies für die in Spalte 1 aufgeführten mRNAs der verschiedenen Nox-Isoformen. Anhand dieser Accession-Nummern kann die mRNA-Sequenz in der online-Datenbank „Nucleotide“ der National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) aufgerufen werden. Die Sequenzen für Nox3 der Ratte sowie Nox5 bei Maus und Ratte waren zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht und sind daher mit „-/-“, als nicht vorhanden gekennzeichnet.

Diese Sequenz diente nun als Matritze für die Auswahl geeigneter Primersequenzen durch das Programm Primer ExpressTM. Die Primer wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

1. die Schmelztemperatur (T_m) der Primer sollte bei ca 60 °C liegen.
2. sie sollten bei 1,5 mM $MgCl_2$ funktionieren.
3. möglichst keine selbst- oder paarweise komplementären Sequenzen in den Primern
4. möglichst keine Bildung von über 40 °C stabilen „loop“- oder „hairpin“-Strukturen
5. die Länge des gewünschten PCR-Produkts sollte zwischen 50 und 200 Basenpaaren liegen.

Aus der vom Programm erstellten Liste an geeigneten Sequenzen wurden dann 3-4 Paare Forward und Reverse-Primer ausgewählt. Anschließend erfolgte einer Überprüfung der Primer-Sequenzen mit Hilfe des „BLASTn“- Suchprogramms des NCBI hinsichtlich ihrer Spezifität. Sie wurden dann als hinreichend spezifisch befunden, wenn die Primersequenzen entweder nur an die zu untersuchende mRNA oder im Falle einer Bindung an andere mRNAs mit einer sehr geringen Anzahl von Basenpaaren an jene banden. Von den Primerpaaren, die diese Kriterien erfüllten, wurden 1-2 Sets ausgewählt und bei der Firma Biospring, Frankfurt a. M., bestellt.

Die gelieferten Primer wurden dann zunächst bei verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen, z. B. 1,5, 3 und 4,5 mmol/l (vgl. Tabelle 3), und anschließend bei verschiedenen Annealing-Temperaturen in der PCR getestet. Auf diese Weise wählte ich möglichst spezifische

MgCl₂- Konzentration [mmol/l]	c_T-Wert	Schmelztemperatur [°C]
1,5	28,92	83,53
3	28,83	83,53
4,5	29,57	82,53

Tabelle 3: Abhängigkeit des Threshold-cycle Wertes von der $MgCl_2$ -Konzentration im PCR-Ansatz

Unter ansonsten gleichen Bedingungen wurden drei Pcr-Ansätze mit unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentrationen pipettiert. Als Beispiel dient in diesem Fall eine Maus-Nox1-PCR. Als Template dienten jeweils 100 ng Maus-Nieren cDNA. Die c_T -Werte der PCR-Ansätze mit 1,5 und 3 mmol/l unterscheiden sich nicht, der Pcr-Ansatz mit 4,5 mmol/l $MgCl_2$ zeigt einen höheren c_T -Wert als Zeichen einer geringeren Pcr-Effizienz. Bemerkenswert ist auch eine geringere Schmelztemperatur der Pcr-Produkte im Ansatz als Hinweis auf möglicherweise unspezifische Amplifikate.

Primer ohne Primer-Dimer-Bildung bei gleichzeitig guter Sensitivität und PCR-Effizienz aus. Für die ausgewählten Primer wird nun noch die optimale Kombination der Konzentrationen aus Forward und Reverse Primer empirisch ermittelt.

In diesem Beispiel funktionierten die Primer für Nox1-mRNA bei 100 nM Forward-Primer erst ab einer Reverse-Primer-Konzentration von 900 nM. Erwünscht ist in erster Linie ein möglichst niedriger c_T -Wert bei gleichzeitig möglichst geringen Konzentrationen der Forward und Reverse-Primer. Die Kombination von 300 nM Forward-Primer und 900 nM Reverse-Primer war ein geeigneter Kompromiss.

Um sicherzugehen, dass es sich tatsächlich um das gewünschte Amplikon handelte, wurde eine PCR entsprechend den optimierten Bedingungen durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Eine Bande der erwarteten Größe wies auf das spezifische Produkt hin.

c Forward-Primer [nM]	c Reverse-Primer [nM]	c_T -Wert
100	100	No c_T
100	300	No c_T
100	900	27,94
300	100	No c_T
300	300	36,87
300	900	26,36
900	100	No c_T
900	300	30,30
900	900	25,77

Tabelle 4: Abhängigkeit des Threshold-cycle Wertes von der Primer-Konzentration

Unter ansonsten gleichen Bedingungen wurden neun Pcr-Ansätze mit unterschiedlichen Forward-Primer- (Spalte 1) und Reverse-Primer-Konzentrationen (Spalte 2), jeweils angegeben in nmol/l, pipettiert. Als Beispiel dient in diesem Fall eine Maus-Nox1-PCR mit jeweils 25 ng Maus-Colon-cDNA als Template. In einigen PCR-Ansätzen waren die jeweiligen Primer-Konzentrationen für die Reaktion nicht ausreichend, es wurden keine c_T -Werte gemessen (gekennzeichnet als „No c_T “ in Spalte 3). Die Primer-Konzentrationen mit dem niedrigsten c_T -Wert war 900 nmol/l Forward-Primer und 900 nmol/l Reverse-Primer.

Um die amplifizierte Sequenz genau zu charakterisieren wurde in einigen Fällen die Bande des gewünschten PCR-Produkts (z. B. für Maus-Nox1: 361 Basenpaare) aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA aus der Gelmatrix extrahiert. Diese Probe wurde nun an die Firma MWG Biotech, Ebersberg, zur Sequenzierung gesendet und das Ergebnis mit der GeneBank mRNA Sequenz verglichen.

4.1.2 Expression der Nox-Isoformen bei Maus und Mensch

In den letzten Jahren wurde viel zur Charakterisierung einzelner Nox-Isoformen, insbesondere Nox1, Nox4 und Nox5 geforscht. Die Autoren verglichen dabei die Expression jeweils einer Isoform mit mRNA-Datenbanken verschiedener Gewebe und untersuchten die Isoformen v. a. in den Geweben, wo sie in großen Mengen vorkamen. Z. T. kommen allerdings mehrere Nox-Isoformen gleichzeitig in einem Gewebe vor, manchmal sogar in einem Zelltyp. Bisher gibt es keine für einzelne Nox-Isoformen spezifischen Inhibitoren, so dass bei Untersuchungen zur Funktion und Bedeutung der NADPH-Oxidase in diesen Zellen meist mit siRNA, Antisense Methoden oder Nullmutanten gearbeitet wurde. Dabei kann eine Rolle anderer, gleichzeitig exprimierter Isoformen jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Um einen Überblick über die relativen quantitativen Verhältnisse der Nox-Expression in der Aorta zu gewinnen, wurden daher für diese Arbeit mittels real-time RT-PCR die mRNA-Mengen der Nox1, Nox2 und Nox4-Isoformen in Niere, Colon, Milz und Aorta der Maus untersucht.

Nox4 wird in den ortsständigen Zellen der Gefäßwand von allen Nox-Isoformen am stärksten exprimiert. Es findet sich v. a. in glatten Gefäßmuskelzellen, aber auch in Endothelzellen und Fibroblasten der Adventitia von Koronargefäßen²⁷.

Alle in diesem Teil angegebenen Werte der relativen Expression wurden mittels der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet. Dabei dienten als sog. „Haushaltsgene“ Translations-Elongationsfaktor 2, β -Aktin und 18S rRNA.

4.1.2.1 Semiquantitativer Vergleich der Nox-Expression in verschiedenen Geweben

4.1.2.1.1 Nox1

Die semiquantitative real-time RT-PCR detektierte Nox1-mRNA in Colon, Niere, Milz und Aorta der Maus sowie in HUVEC, VSMC der Aorta von Mensch und Ratte.

Es zeigten sich quantitative Unterschiede über ca. 4 Zehnerpotenzen in der Expression: Die höchste Nox1-Expression fand sich im Colon der Maus. Im Vergleich dazu betrug die Nox1-Expression in der Niere ca. 2 % und in der Aorta nur ca. 0,5 %, in der Milz ca. 10 % der Nox1-mRNA-Menge des Colon.

Nox1-Expression

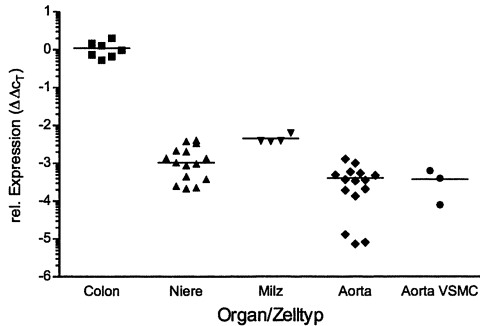


Abbildung 5: Expression von Nox1 in verschiedenen Geweben der Maus relativ zur Nox1-Expression im Colon

Dargestellt sind im Scatterdiagramm die dekadischen Logarithmen der einzelnen $\Delta\Delta C_T$ -Werte nach PCR-Effizienzkorrektur (vgl. Material und Methoden) mit Median als Maß für die relative Expression von Nox1-mRNA in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen der Maus. (n = 3 bis 15 Proben, wie angezeigt) In der Niere wird im Median 10^{-3} mal weniger Nox1 exprimiert als im Colon, in der Milz findet sich $4 \cdot 10^{-3}$ mal weniger Nox1 als im Colon und in der Aorta und aortalen Gefäßmuskeln (VSMC) finden sich ca. $4 \cdot 10^{-4}$ mal weniger Nox1 verglichen mit Colon.

Nox1-Expression

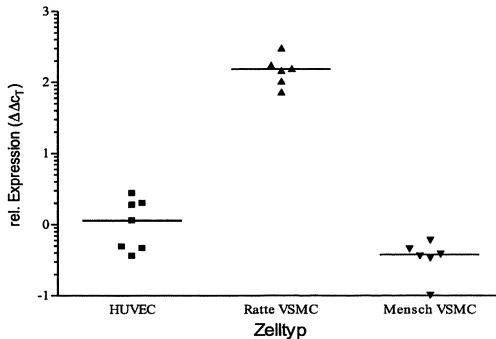


Abbildung 6: Expression von Nox1 in glatten Gefäßmuskeln von Mensch und Maus relativ zur Nox1-Expression in HUVEC.

Dargestellt sind im Scatterdiagramm die dekadischen Logarithmen der einzelnen $\Delta\Delta C_T$ -Werte nach PCR-Effizienzkorrektur (vgl. Material und Methoden) mit Median als Maß für die relative Expression von Nox1-mRNA in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen der Maus. (n = 6-7 Proben, wie angezeigt) Gefäßmuskeln (VSMC) des Menschen exprimieren im Median $4 \cdot 10^{-1}$ mal weniger Nox1 wie Endothelzellen des Menschen (HUVEC), Gefäßmuskeln der Ratte exprimieren dagegen $1,5 \cdot 10^2$ mal so viel Nox1 wie menschliche Endothelzellen.

Um die Quellen der Nox1-Expression in der Aorta genauer zu charakterisieren, wurden anschließend verschiedene Zellkulturen aus HUVEC sowie VSMC aus menschlicher und Ratten-Aorta mittels semiquantitativer real-time RT-PCR untersucht. Dabei zeigten alle 3 Zelllinien Expression von Nox1-mRNA. Es existieren allerdings deutliche Unterschiede zwischen den VSMC verschiedener Spezies. So exprimierten Ratten VSMC etwa 100 mal mehr Nox1 als menschliche VSMC.

4.1.2.1.2 Nox2

Nox2 wird in großen Mengen in Phagozyten und B-Lymphozyten exprimiert, findet sich aber auch in Zellen des kardiovaskulären Systems von Maus und Mensch. Es wird in größeren Mengen in Endothelzellen, z. B. HUVEC, nicht jedoch in VSMC der menschlichen Aorta exprimiert.

Die Untersuchung verschiedener Organe der Maus mittels real-time RT-PCR ergab bezüglich der Nox2-mRNA- Expression: Die größten mRNA-Mengen fanden sich aufgrund des hohen Lymphozytengehaltes erwartungsgemäß in der Milz. Diese exprimierte ca. 50 mal so viel Nox2-mRNA wie das Colon. Aorta und Niere enthielten etwa das 30fache der Nox2-Menge des Colons.

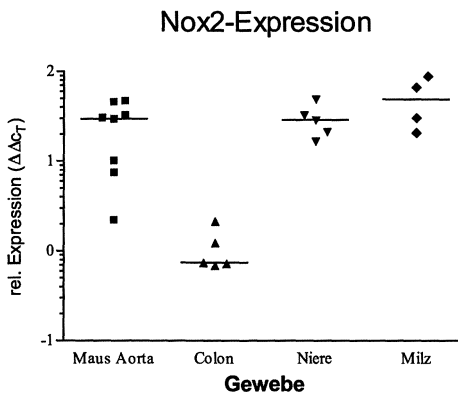


Abbildung 7: Relative Expression von Nox2 in verschiedenen Geweben der Maus verglichen mit Maus-Colon

Dargestellt sind im Scatterdiagramm die dekadischen Logarithmen der einzelnen $\Delta\Delta C_T$ -Werte nach PCR-Effizienzkorrektur (vgl. Material und Methoden) mit Median als Maß für die relative Expression von Nox2-mRNA in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen der Maus. (n = 4 bis 8 Proben, wie angezeigt) In der Milz wird im Median $5 \cdot 10^1$ mehr Nox2 exprimiert als im Colon und in Niere und Aorta findet sich ca. $3 \cdot 10^1$ so viel Nox2 wie im Colon. Auffällig war eine breite Streuung der Nox2-Expression der Aorten verschiedener Mäuse.

In aortalen VSMC des Menschen fand sich im Gegensatz zu HUVEC kein Nachweis von Nox2-mRNA, weshalb hier auf graphische Darstellung verzichtet wird.

4.1.2.1.3 Nox4

Auch die relative Expression von Nox4-mRNA wurde in Maus-Aorta, -Colon und -Niere untersucht. Die mit Abstand größte Menge Nox4-mRNA fand sich in der Niere (170fache Menge des Colons). Die Aorta der Maus enthielt etwas weniger Nox4 als das Colon (0,7). Interessanterweise exprimierten VSMC der Ratten-Aorta 40 mal so viel Nox4 wie das Colon. Auch VSMC der menschlichen Aorta exprimieren Nox4. HUVECs stellen sie allerdings weit in den Schatten und exprimieren ca. 460fach mehr Nox4 als VSMC.

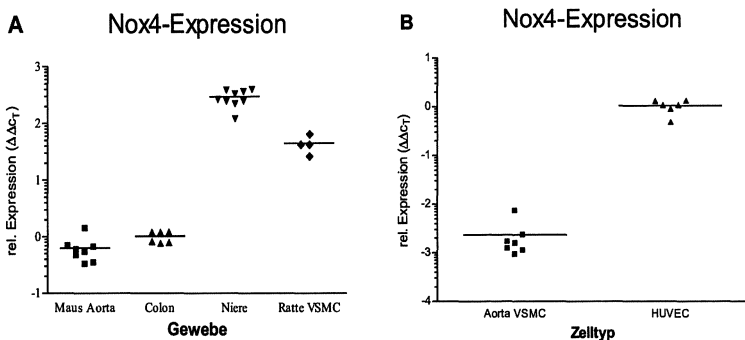


Abbildung 8: Relative Expression von Nox4 in verschiedenen Geweben der Maus und vaskulären Zelltypen des Menschen

Dargestellt sind im Scatterdiagramm die dekadischen Logarithmen der einzelnen $\Delta\Delta C_T$ -Werte nach PCR-Effizienzkorrektur (vgl. Material und Methoden) mit Median als Maß für die relative Expression von Nox4-mRNA in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen des Menschen. (n = 4 bis 9 Proben, wie angezeigt.) **A:** Expression von Nox4 in verschiedenen Geweben der Maus. In der Niere findet sich $1,7 \cdot 10^2$ mal so viel Nox4 wie im Colon, in der Aorta $0,7 \cdot 10^1$. Im Vergleich rechts der gleiche Pcr-Ansatz mit Ratte VSMC cDNA: Die Nox4-Expression ist $4,5 \cdot 10^1$ so hoch wie im Colon der Maus. **B:** Verhältnis der Nox4-Expression in aortalen Gefäßmuskulzellen des Menschen im Vergleich zu Endothelzellen. In den VSMC fand sich $1 \cdot 10^{-3}$ mal weniger Nox4 als in HUVEC.

4.2 Regulatorische Untereinheiten

4.2.1 Etablierung der Noxa1-, Noxo1- und p67phox-PCR

Die Nukleotidsequenzen der mRNA für Noxo1, Noxa1 und p67phox von Maus und Mensch wurden zunächst im Archiv der Online-Datenbank der National Library of Medicine recherchiert.

mRNA	Mensch	Maus	Ratte
Noxo1	NM_144603	NM_027988	XM_220221
Noxa1	NM_006647	NM_172204	XM_231042
p67phox	NM_000433	NM_010877	XM_344156

Tabelle 5: Quellen für die Nukleotidsequenzen der Noxo1-, Noxa1- und p67phox-mRNAs verschiedener Spezies in der NCBI-Datenbank.

Aufgeführt sind die Accession-Nummern der mRNA-Nukleotidsequenzen (Spalten 2, 3 und 4) getrennt nach Spezies für die in Spalte 1 aufgeführten mRNAs der verschiedenen regulatorischen Nox-Untereinheiten. Anhand dieser Accession-Nummern kann die mRNA-Sequenz in der online-Datenbank „Nucleotide“ der National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) aufgerufen werden.

Diese Sequenz diente nun als Matritze für die Auswahl geeigneter Primersequenzen mit Hilfe des Computerprogramms Primer ExpressTM. Die Primer wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- die Schmelztemperatur (T_m) der Primer sollte bei ca 60 °C liegen.
- sie sollten bei 1,5 mM MgCl₂ funktionieren.
- möglichst keine selbst- oder paarweise komplementären Sequenzen in den Primern
- möglichst keine Bildung von über 40 °C stabilen „loop“- oder „hairpin“-Strukturen
- die Länge des gewünschten PCR-Produkts sollte zwischen 50 und 200 Basenpaaren liegen.

Aus der vom Programm erstellten Liste an geeigneten Sequenzen wählte ich dann 3-4 Paare Forward und Reverse-Primer aus. Die Primer-Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe des „BLASTn“- Suchprogramms des NCBI hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft und als hinreichend spezifisch befunden, wenn die Primersequenzen, falls sie entweder nur an die untersuchende mRNA oder bei eventueller Bindung an andere mRNAs dort mit möglichst wenigen Basenpaaren banden. Von den Primerpaaren, die diese Kriterien erfüllten, wurden 1-2 Sets ausgewählt und bei der Firma Biospring, Frankfurt a. M., bestellt.

Die Sequenzen der Maus-p67phox-Primer wurden einer Arbeit von Rao PV, Maddala R et. al. entnommen⁹¹.

Die gelieferten Primer wurden dann zunächst bei einer Annealing-Temperatur von 59 °C und unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen, z. B. 1,5, 3 und 4,5 mmol/l in der PCR getestet (vgl. Tabelle 6).

MgCl ₂ -Konzentration [mmol/l]	c _T -Wert	Schmelztemperatur [°C]
1,5	18,72	88,52
3	20,03	89,52
4,5	19,99	89,52

Tabelle 6: Abhängigkeit des Thresholdcycle Wertes von der MgCl₂-Konzentration im PCR-Ansatz

Unter ansonsten gleichen Bedingungen wurden drei Pcr-Ansätze mit unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen pipettiert. Als Beispiel dient in diesem Fall eine Maus-Noxo1-PCR. Als Template dienten jeweils 5·10⁻⁴ ng Noxo1-Plasmid. Der c_T-Wert des PCR-Ansatzes mit 1,5 mmol/l ist am geringsten, die Ansätze mit 3 und 4,5 mmol/l MgCl₂ zeigen einen um 1 erhöhten c_T-Wert bei gleichzeitig um 1 °C erhöhter Schmelztemperatur des Amplikons. In diesem Fall bewirkt eine erhöhte MgCl₂-Konzentration eine geringere Effizienz der PCR-Reaktion bei gleichzeitig geringerer Amplifikation unspezifischer Produkte.

Für Maus-Noxo1 ergab sich der niedrigste c_T-Wert bei einer MgCl₂-Konzentration ab 3 mmol/l, eine weitere Erhöhung der MgCl₂-Menge verbesserte die PCR-Effizienz nicht. Die ideale Konzentration für diese Primer lag daher bei ca. 3 mmol/l MgCl₂. Ebenfalls am besten bei 3mmol/l MgCl₂ funktionierten Maus-p67phox- und Mensch-Noxa1-Primer. Alle übrigen Primer-Sets für die in Tabelle 1 genannten Gene arbeiteten optimal bei 1,5 mmol/l MgCl₂.

Anschließend wurden die Primer Sets bei drei verschiedenen Annealing-Temperaturen getestet. Stellvertretend hier eine Agarosegelelektrophorese mit einer Mensch p67phox-PCR bei 54, 56, 58, 60 und 62°C Annealing-Temperatur (s. Abbildung 9).

Bei 54 und 56 °C entstanden unspezifische PCR-Produkte, deren Länge etwas kürzer als die des spezifischen Amplikons ausfiel. Bei 58 °C entstanden weder unspezifische Produkte noch das spezifische Produkt. Bei 60 °C, der laut Primer-Express idealen Annealing-Temperatur dieses Primer-Sets, entstand eine größere Menge des 72 Basenpaare langen p67phox-

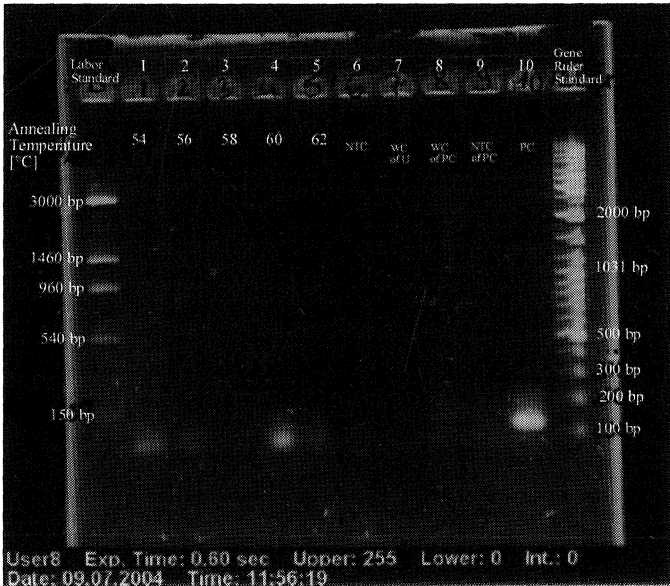


Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese einer PCR mit Mensch-p67phox-Primern bei verschiedenen Annealing-Temperaturen.

1,2%iges Agarosegel, Färbung mit Ethidiumbromid und Fluoreszenz im UV-Licht. Das spezifische p67phox-Amplikon hat eine Länge von 71 Basenpaaren (bp). Links und rechts außen wurden als Maßstab zur Längeneinschätzung Standards mit einem Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter Länge aufgetragen.

Bahn 1-5: RT-PCR mit Mensch p67phox-Primern, hVSMC RNA, 3mmol/l MgCl₂ bei den angegebenen Annealing-Temperaturen (54-62 °C). In Bahn 4 bei 60 °C, der von Primer-Express® berechneten Annealing-Temperatur, sind als unscharfe Bande Pcr-Produkte eine Länge < 100 bp zu erkennen. Bei 56, 58 und 62 °C sind keine Pcr-Produkte erkennbar. Bei 54°C entstehen Pcr-Produkte einer etwas kürzeren Länge als bei 58 °C, möglicherweise Primer-Dimere oder unspezifische PCR-Produkte.

Bahn 6-10: RT-PCR-Kontrollen bei 60°C Annealing-Temperatur und 3 mmol/l MgCl₂. Bahn 6: NTC = no template control, p67phox-PCR-Ansatz mit RT-Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase; Bahn 7: WC of U = water control of unknown p67phox-RT-PCR-Ansatz mit Wasser statt RNA; Bahn 8: WC of PC = water control of positive control, PCR-Ansatz mit 18SrRNA-Primern und Wasser statt cDNA; Bahn 9: NTC of PC = no template control of positive control, PCR-Ansatz mit RT-Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase mit 18SrRNA-Primern; Bahn 10: PC = positive control, cDNA und Primer für 18SrRNA, hier ist eine Bande im Bereich der erwarteten Amplikonlänge von 131 bp zu sehen.

Amplikons, bei weiterer Erhöhung der Annealing-Temperatur verminderte sich die Menge des entstandenen spezifischen Amplikons wieder.

Für die jeweiligen Primer wurde anschließend noch die optimale Kombination der Konzentrationen aus Forward- und Reverse-Primer empirisch ermittelt, wie bereits ausführlich in Teil A, Testung der Nox-Primer, beschrieben.

4.2.2 Gewebeverteilung der cytoplasmatischen Untereinheiten

In der Literatur wurden zwei Paare einander ähnlicher Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplexes beschrieben, die jedoch unterschiedliche Charakteristika bezüglich ihrer Regulation und ihrer Affinität für bestimmte Nox-Isoformen aufweisen: P67phox/p47phox und Noxa1/Noxo1. Bisher ist nicht genau bekannt, welche Untereinheit in vivo in welchem Zelltyp mit welcher Nox-Isoform interagiert. Es gibt jedoch Hinweise für eine bevorzugte Interaktion zwischen Noxa1/Noxo1 und Nox1 oder Nox3. Auch die Interaktion zwischen Noxa1/p47phox und p67phox/Noxo1 erscheint möglich, da es Zellen gibt, die beide Untereinheiten-Paare exprimieren.

Bisher wurden jedoch nur spärliche Informationen über die quantitative Expression der einzelnen Untereinheiten in verschiedenen Geweben veröffentlicht. Der Nachweis eines ähnlichen Expressionsmusters von Noxa1, Noxo1 und Nox1 in verschiedenen Geweben und Zelltypen wäre dabei ein Indiz für die bevorzugte Zusammensetzung einer NADPH-Oxidase aus Nox1, Noxa1 und Noxo1.

4.2.2.1 P67phox

Für p67phox der Maus stand leider kein Plasmid zur Verfügung, der Vergleich der Expression in verschiedenen Geweben der Maus wurde daher semiquantitativ mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelt. Die Reihenfolge der p67phox-mRNA-Menge war wie folgt: Colon > Aorta > Niere > Aorta VSMC. In der Aorta wurde 25 % der Menge im Colon exprimiert, in der Niere fand sich 10 % der p67phox-Menge des Colons. In Kulturen aus VSMC der Aorta der Maus wurde p67phox und in sehr geringem Ausmaß exprimiert (0,2 % der Colon-Menge).

Der Vergleich der Expression in Aorta, Colon, Niere und VSMC ähnelt am ehesten der Gewebsverteilung der Nox1-Expression (vgl. Abbildungen 5 und 10).

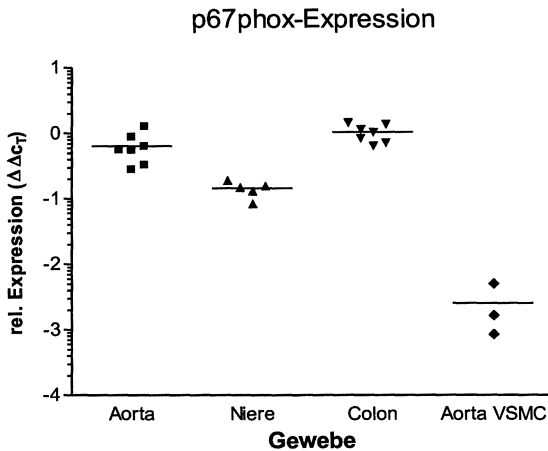


Abbildung 10: Relative Expression von p67phox in verschiedenen Geweben der Maus verglichen mit Maus-Colon

Dargestellt sind im Scatterdiagramm die dekadischen Logarithmen der einzelnen $\Delta\Delta C_T$ -Werte (vgl. Material und Methoden) mit Median als Maß für die relative Expression von p67phox-mRNA in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen der Maus. (n = 3-7 Proben, wie angezeigt) In Maus-Niere findet sich im Median $1,4 \cdot 10^{-1}$ mal weniger p67phox als im Colon, in der Aorta findet sich $5,5 \cdot 10^{-1}$ mal weniger p67phox als im Colon und in aortalen Gefäßmuskelzellen (Aorta VSMC) der Maus wird im Median $1,6 \cdot 10^{-3}$ mal weniger Nox1 als im Colon exprimiert.

Im Gegensatz zu den geringen Mengen p67phox in VSMC der Mauseorta fanden sich in VSMC der menschlichen Aorta um ein Vielfaches mehr p67phox. In Ermangelung von p67phox-Plasmiden für Maus und Mensch war mir leider keine Berechnung der copy Nr. und damit ein direkter Vergleich zwischen Maus und Mensch möglich. Die deutlich unterschiedlichen ct -Werte für Maus und Mensch VSMC lassen jedoch einen groben Vergleich der mRNA-Mengen zu (s. Tabelle 7). Zwischen den Spezies Maus und Mensch bestehen anscheinend starke Expressionsunterschiede, was eine Übertragung von an Mäusezellen erworbenen Daten auf den Menschen problematisch erscheinen lässt.

Verglichen mit HUVECs enthielten hVSMC ca. 16 mal mehr p67phox-mRNA.

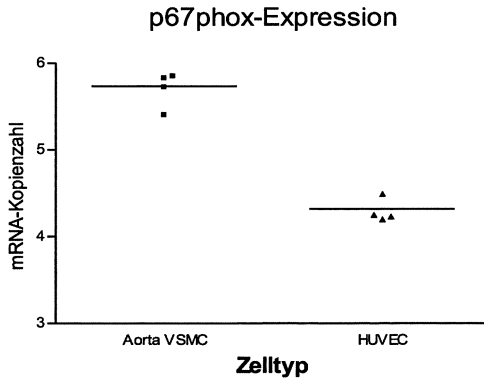


Abbildung 11: p67phox-Expression in vaskulären Zelltypen des Menschen

Dargestellt sind im Scatterdiagramm die dekadischen Logarithmen der mRNA-Kopienzahl (vgl. Material und Methoden) mit Median als Maß für die Expression von p67phox-mRNA in verschiedenen vaskulären Zelltypen des Menschen. (n = 4 Proben, wie angezeigt) In aortalen Gefäßmuskelnzellen des Menschen finden sich in 100ng cDNA im Median $6 \cdot 10^5$ p67phox-Kopien, in Endothelzellen (Nabelschnurarterie) nur $1,8 \cdot 10^4$ p67phox-Kopien. Damit exprimieren VSMC $3,4 \cdot 10^1$ mal mehr p67phox als HUVEC.

Material	c_T p67phox	c_T 18SrRNA	Δc_T
Maus VSMC 1	30,47	7,66	22,82
Maus VSMC 2	30,43	8,56	21,87
Maus VSMC 3	29,62	9,36	20,26
Mensch VSMC 1	25,32	8,20	17,12
Mensch VSMC 2	26,37	8,32	18,05
Mensch VSMC 3	24,98	8,26	16,72

Tabelle 7: Vergleich der c_T -Werte für p67phox in aortalen VSMC bei Maus und Mensch

Dargestellt sind mittels real-time RT-PCR gemessene Threshold-cycle-Werte (c_T) von PCRs mit p67phox- bzw. 18SrRNA-Primern, sowie die errechneten Δc_T -Werte (vgl. Material und Methoden) in jeweils 100ng cDNA aus je 3 verschiedenen Zelllinien (Spalte 1) glatter Gefäßmuskelnzellen (VSMC) der Maus und des Menschen. Die Δc_T -Werte der menschlichen Gefäßmuskelnzellen sind deutlich geringer als die der murinen Gefäßmuskelnzellen, was als Hinweis auf eine stärkere Expression von p67phox in menschlichen versus murinen VSMC gesehen werden kann. Ein direkter Vergleich ist aus methodischen Gründen hier jedoch nicht möglich, da sich die Primer für menschliches und murines p67phox in Nukleotidsequenz, Annealing-Temperatur und PCR-Effizienz unterscheiden.

4.2.2.2 Nox-Activator-1

Für Noxa1 der Maus stand ein Plasmid der Länge 6779 Basenpaare, für Noxa1 des Menschen ein Plasmid der Länge 7078 Basenpaare zur Verfügung. Dies ermöglichte, wie unter Material und Methoden beschrieben, die Berechnung der genauen mRNA-Kopienzahl und damit einen direkten quantitativen Vergleich zwischen den verschiedenen Geweben und Spezies.

Die Reihenfolge nach Noxa1-Expression in Mausorganen war Colon > Aorta > Niere > VSMC. Auffällig war hier ein besonders großer Unterschied von mind. um den Faktor 100 zwischen Colon und den anderen Geweben.

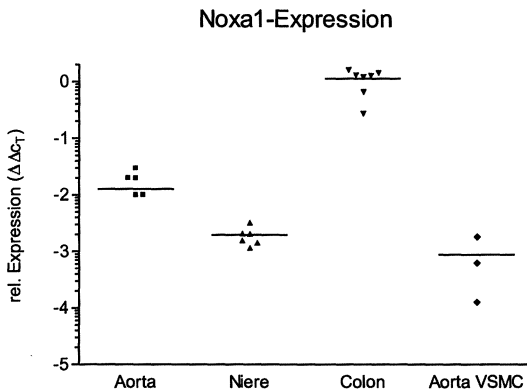


Abbildung 12: Relative Noxa1-Expression in verschiedenen Geweben und Zelltypen der Maus

Dargestellt sind im Scatterdiagramm die dekadischen Logarithmen der einzelnen $\Delta\Delta C_t$ -Werte nach PCR-Effizienzkorrektur (vgl. Material und Methoden) mit Median als Maß für die relative Expression von Noxa1-mRNA in verschiedenen Geweben der Maus relativ zur Expression im Colon. (n = 3 bis 6 Proben, wie angezeigt) In der Aorta findet sich im Median $1,2 \cdot 10^{-2}$ mal weniger Noxa1-mRNA als im Colon, in der Niere findet sich $2 \cdot 10^{-3}$ mal weniger und in aortalen Gefäßmuskelnzellen (VSMC) findet sich $6,6 \cdot 10^{-4}$ mal weniger Noxa1.

In menschlichen Zellen fand sich Noxa1 in quantitativ absteigender Reihenfolge in HUVEC, Leukozyten und VSMC der Aorta. Insgesamt entspricht die Gewebeverteilung wie die von p67phox am ehesten dem Nox1-Expressionsmuster (vgl. Abbildungen 12 und 5).

Vergleicht man die relative Expression von p67phox und seinem Homologen Noxa1 in Aorta und Niere, so wird in beiden Organen ca. 20 mal mehr p67phox als Noxa1 exprimiert. In Anbetracht der ausgesprochen niedrigen Noxa1-Expression in Niere und VSMC, die v. a. Nox4 exprimieren, erscheint eine Interaktion zwischen Noxa1 und Nox4 als eher unwahrscheinlich.

4.2.2.3 Nox-Organizer-1

Nox1 als Homologon zu p47phox wird am meisten im Colon exprimiert. Es fand sich ca. 26 % der Noxo1-Menge des Colons in der Aorta und ca. 6 % in der Niere. In VSMC der Mauseorta fand sich sogar etwas mehr Noxo1 als in der Niere: ca. 9,5 % der Colon-Menge, wobei die Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien beträchtlich waren.

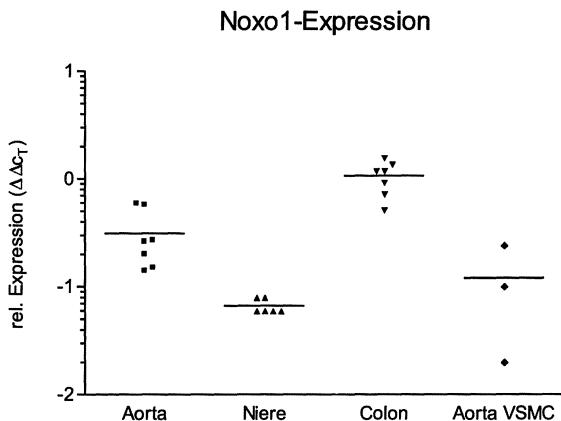


Abbildung 13: relative Expression von Noxo1 in verschiedenen Geweben und Zelltypen der Maus

Dargestellt sind im Scatterdiagramm die dekadischen Logarithmen der einzelnen $\Delta\Delta C_T$ -Werte nach PCR-Effizienzkorrektur (vgl. Material und Methoden) mit Median als Maß für die relative Expression von Noxo1-mRNA in verschiedenen Geweben der Maus relativ zur Expression im Colon. (n = 3 bis 7 Proben, wie angezeigt) In der Aorta findet sich im Median $3,1 \cdot 10^{-1}$ mal weniger Noxo1-mRNA als im Colon, in der Niere findet sich $6,6 \cdot 10^{-2}$ mal weniger und in aortalen Gefäßmuskelnzellen (VSMC) findet sich $1,7 \cdot 10^{-2}$ mal weniger Noxo1 als im Colon.

In menschlichen Zellen gelang nur mit VSMC der Aorta und HEK (human embryonic kidney cells) der sichere Nachweis von Noxo1-mRNA. Dabei enthielten die VSMC etwa 40% weniger Noxo1 als die HEK-Zellen. Anscheinend enthalten sie noch weniger Noxo1 als VSMC der Maus. In HUVEC gelang trotz wiederholter Versuche kein Nachweis von Noxo1-mRNA.

4.2.3 Pathophysiologisches Modell: Expression der Untereinheiten in VSMC-Kulturen nach Stimulation mit AT II, PDGF bzw. 8 % Serum

Glatte Gefäßmuskelnzellen enthalten also Noxo1 und Noxo1 als Bestandteile ihrer NADPH-Oxidase-Komplexe. Um etwas über die Bedeutung der Untereinheiten für die VSMC zu

erfahren, wurde zunächst der Einfluss von Wachstumsfaktoren (PDGF und AT II) auf die Noxa1- und Noxa1-Expression in VSMC untersucht.

4.2.3.1 Effekt von Angiotensin II

In VSMC des Menschen konnte kein signifikanter Effekt durch Stimulation mit Angiotensin II (100 nmol/l) auf die Noxa1-Expression über 12 h nachgewiesen werden.

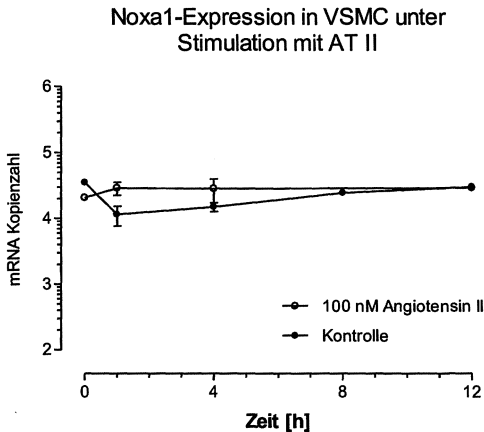


Abbildung 14: Noxa1-Expression in VSMC unter Stimulation mit Angiotensin II

Dargestellt ist die Noxa1-mRNA-Kopienzahl als Dekadischer Logarithmus (y-Achse) in Zellkulturen aortaler Gefäßmuskulzellen (VSMC) der menschlichen Aorta mit und ohne Stimulation mit 100 nmol/l Angiotensin II über einen Zeitraum von 12 Stunden (h). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 2). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Noxa1-Expression zwischen Kontrollen und Angiotensin II-stimulierten VSMC.

Zeit [h]	c_T Noxa1	Kopienzahl
0	32,80	20502
1	32,33	28827
4	32,45	28210
12	32,28	29167

Tabelle 8: c_T -Werte und errechnete Noxa1-Kopienzahl in aortalen VSMC der menschlichen Aorta unter Stimulation mit Angiotensin II.

Dargestellt sind der c_T -Wert (Spalte 2) und die Noxa1-mRNA-Kopienzahl (Spalte 3) in Zellkulturen aortaler Gefäßmuskulzellen (VSMC) der menschlichen Aorta nach Stimulation mit 100 nmol/l Angiotensin II über einen Zeitraum von 12 Stunden (h) nach Beginn der Stimulation. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte (n = 2). Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen der c_T -Werte über die Zeit.

4.2.3.2 Effekt von PDGF

PDGF führte bereits nach einer Stunde zur Reduktion von Noxa1-mRNA, die Kopienanzahl fiel nach 12 h auf ein Minimum von ca. 1 % der Expression des Kontrollwertes. Nachfolgend stieg sie wieder leicht an, wobei die Verminderung der Noxa1-Genexpression bis zu 48 h lang weiter anhielt.

p67phox wurde im Gegensatz dazu durch PDGF-Stimulation induziert. Die Anzahl der p67phox-Kopien stieg nach einer Stunde auf das 5fache der Kontrollen, blieb dann bis 12 h konstant auf erhöhtem Niveau und stieg nach 24 h anschließend weiter auf Werte bis über das 6fache der Kontrollen an (s. Abbildung 15).

Noxo1 wird in menschlichen VSMC nur in sehr geringer mRNA-Kopienzahl exprimiert und war bei den Kontrollen nur nach 1 und erneut nach 24 h Serumentzug nachweisbar, unter Stimulation mit 30 ng/ml PDGF konnte durchgehend Noxo1 nachgewiesen werden, die Kopienzahl lag jedoch nur knapp über der Nachweisgrenze.

4.2.3.3 Effekt von Serumentzug

Da die Zellkulturen für die oben beschriebenen Experimente vor Beginn Stimulation einem 48-stündigen Serumentzug ausgesetzt werden mussten, erfolgte als Kontrollexperimente die quantitative Bestimmung der Noxa1-, Noxo1- und p67phox-Expression nach 48 h Serumentzug und nachfolgend 24 h erneuter Serumexposition. Der Serumentzug zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die p67phox-Expression. Noxa1 wird nach 12 h Serumentzug leicht, jedoch nicht signifikant induziert. Eine ähnliche vorübergehende Induktion nach 24 h Serumentzug und 12 h erneuter Serumexposition wurde für die Expression von p22phox und Nox4 in Endothelzellen der Rattenaorta berichtet²⁸.

Noxo1 wurde durch den Entzug von Wachstumsfaktoren nach 1 h kurzzeitig induziert, nach 4 h war es jedoch bereits nicht mehr nachweisbar.

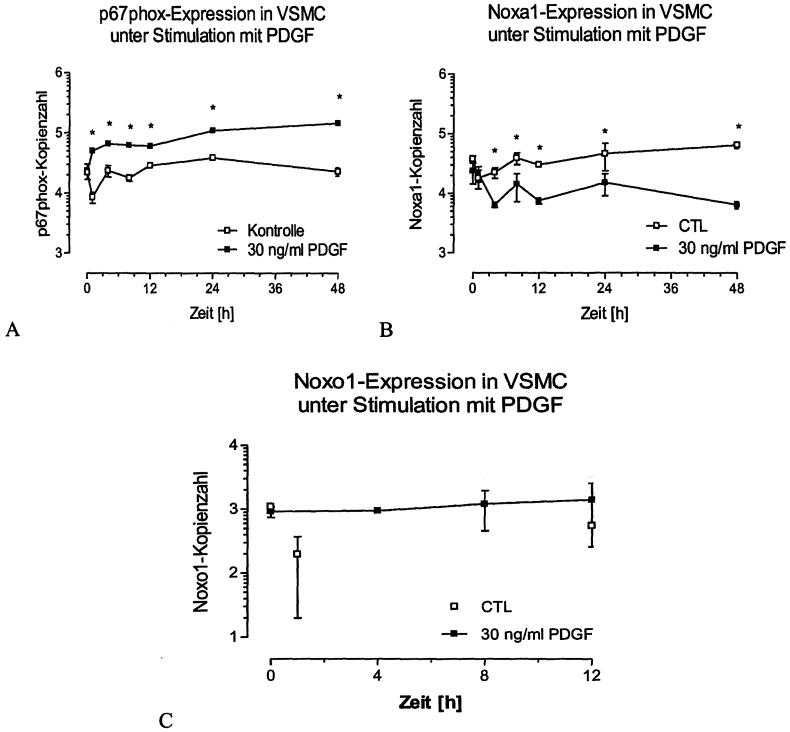


Abbildung 15: Expression von Noxa1, Noxo1 und p67phox in VSMC unter Stimulation mit PDGF

Dargestellt ist die Veränderung der Expression verschiedener NADPH-Oxidase-Untereinheiten unter PDGF-Stimulation über einen Zeitraum von 48 Stunden (h) in Zellkulturen menschlicher Gefäßmuskulzellen (VSMC) der Aorta. Als Kontrollen dienten Zellkulturen, denen jeweils nur physiologische Kochsalzlösung zugesetzt wurde. (n=4)

A: Veränderung der mRNA Kopienzahl von p67phox in 100 ng Gesamt-RNA aus VSMC bei Stimulation der Zellkulturen mit 30 ng/ml PDGF, gemessen mittels quantitativer real-time-RT-PCR. Die Werte sind dargestellt als dekadischer Logarithmus der mRNA-Kopienzahl \pm SEM, * $P < 0,05$ PDGF-Stimulation versus Kontrollen. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der p67phox-Expression bereits 1 h nach Beginn der Stimulation auf das ca. 3fache des Ausgangswertes. Danach bleibt die p67phox-Expression auf dem höheren Niveau konstant.

B: Veränderung der Kopienzahl von Noxa1 in 100 ng Gesamt-RNA aus VSMC bei Stimulation der Zellkulturen mit 30 ng/ml PDGF, gemessen mittels quantitativer real-time-RT-PCR. Die Werte sind dargestellt als dekadischer Logarithmus der mRNA-Kopienzahl \pm SEM, * $P < 0,05$ PDGF-Stimulation versus Kontrollen. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Noxa1-Expression beginnend bei 4h auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes, der während der Dauer der PDGF-Stimulation über 48 h erhalten bleibt.

C: Veränderung der Kopienzahl von Noxo1 in 100 ng Gesamt-RNA aus VSMC bei Stimulation der Zellkulturen mit 30 ng/ml PDGF, gemessen mittels quantitativer real-time-RT-PCR. Die Werte sind dargestellt als dekadischer Logarithmus der mRNA-Kopienzahl \pm SEM. Da in den Kontrollen Noxo1-mRNA nur bei 1 h und 24 h nachweisbar war, sind die Werte untereinander nicht verbunden. Unter Stimulaton mit PDGF war Noxo1 zwar durchgehend nachweisbar, jedoch lediglich mit einer Kopienzahl knapp oberhalb der Nachweisgrenze.

Expression von Noxa1 und p67phox

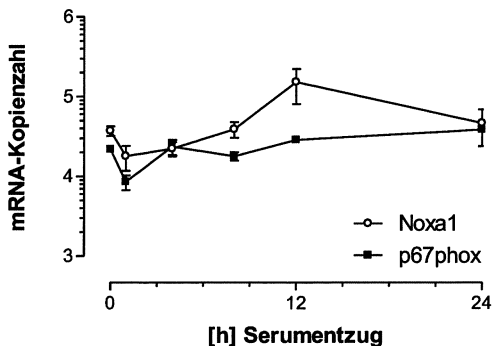


Abbildung 16: Expression von Noxa1 und p67phox-mRNA in VSMC unter Serumentzug

Dargestellt ist der Einfluss von Serumentzug über 24 Stunden (h) auf die Expression von Noxa1 und P67phox-mRNA pro 100 ng Gesamt-RNA in Kulturen glatter Gefäßmuskulzellkulturen (VSMC) der menschlichen Aorta als dekadischer Logarithmus der mRNA-Kopienzahl, gemessen mittels quantitativer real-time RT-PCR. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n = 4). Die Schwankungen der p67phox-Expression und Noxa1-Expression sind nicht signifikant gegenüber dem Ausgangsniveau.

<i>Dauer</i>		
Serumentzug [h]	c_T Noxo1	Kopienzahl
1	38,13	$1,10 \cdot 10^{15}$
24	35,66	$1,44 \cdot 10^{14}$

Tabelle 9: Expression von Noxo1-mRNA in VSMC nach Serumentzug

Dargestellt sind c_T -Werte und errechnete mRNA-Kopienzahl von VSMC-Kulturen der menschlichen Aorta unter Serumentzug über insgesamt 24 h als Mittelwerte (n=4). Nach Serumentzug kommt es zu einem kurzfristigen Anstieg der Noxo1-Expression nach einer Stunde. Nach 4h ist Noxo1 nicht mehr nachweisbar, erst nach 24 h wird es erneut exprimiert mit einer mRNA-Kopienzahl knapp oberhalb der Nachweisgrenze.

4.3 Nox-Expression in einem Mausmodell für renale Hypertonie

Um die Bedeutung der NADPH-Oxidase in der Pathophysiologie der renalen Hypertonie zu untersuchen, verwendeten wir ein Mausmodell. Die Bedingungen einer renovaskulären Hypertonie wurden bei Wildtyp- (WT) und Nox2-Knockout-Mäusen (Nox2^{-/-}) simuliert, indem jeweils eine Nierenarterie mittels eines Clips komprimiert wurde. (sog. „geclippte Tiere“) Die Kontroll-Mäuse wurden ebenfalls operiert, jedoch ohne Applikation des Clips.

4.3.1 Auswirkungen der Clip-Operation auf Anatomie und Physiologie der Mäuse

Die Untersuchung der Tiere nach 4 Wochen zeigte bei geclippten WT- und Nox2^{-/-}-Mäusen eine Verkleinerung der Nieren mit komprimierter Arterie und eine Hypertrophie der kontralateralen Niere. Daneben kam es bei den geclippten Tieren auch zu einer kardialen Hypertrophie. Die Angiotensin II-Konzentrationen im Plasma waren bei allen geclippten Tieren erhöht (vgl. Tabelle 10).

Die Messung des Blutdrucks ergab gleiche Werte bei den Kontroll-operierten WT und Nox2^{-/-}-Tieren. Die Clip-Operation führte bei beiden Mäusestämmen zu einer Erhöhung des Blutdrucks, wobei die Erhöhung des Blutdrucks bei den WT-Mäusen stärker ausgeprägt war als bei den Nox2^{-/-}-Mäusen.

Vier Wochen nach der Operation wurden den Tieren die Aorten entnommen. Diese dienten in weiteren Versuchen im Organbad der Untersuchung der Relaxation bzw. Kontraktion auf verschiedene Stimuli sowie der Untersuchung der Genexpression mittels real-time RT-PCR.

4.3.2 Untersuchung der endothelabhängigen Relaxation an Aortenringen im Organbad

Vier Wochen nach Applikation der Clips wurde die endothelabhängige Relaxation an Aortenringen der Mäuse durch Stimulation mit Acetylcholin im Organbad untersucht.

Die Aortenringe der geclippten der WT-Mäuse zeigten eine deutlich beeinträchtigte endothelabhängige Relaxation im Vergleich mit den geclippten Nox2^{-/-}-Mäusen.

Diese gestörte Relaxation konnte bei den WT-Mäusen durch eine In-vivo-Behandlung mit PEG-SOD oder ex-vivo-Behandlung mit dem Radikalfänger Tiron (1 mmol/l) oder dem

SOD-ähnlichen Mn-TBAP (10 µmol/l) signifikant verbessert werden. Die endotheliale Dysfunktion in diesem Modell beruht demnach v. a. auf der Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit durch Superoxidradikale.

	Wildtyp Kontroll- operiert n=8	Wildtyp Arterien-Clip n=7	Nox2-/- Kontroll- operiert n=7	Nox2-/- Arterien-Clip n=7
Cardiac weight Index: mg Herzgewicht / g Körpergewicht	4,39 ± 0,07	4,80 ± 0,16*	4,34 ± 0,09	4,7 ± 0,12*
Quotient linke Niere / rechte Niere	1,00 ± 0,04	0,52 ± 0,10*	0,99 ± 0,02	0,37 ± 0,09*
Angiotensin II Plasmaspiegel in nmol/l	20,9 ± 0,9	35,4 ± 4,5*	24,7 ± 0,90	36,1 ± 1,10*

Tabelle 10: Anatomische und physiologische Veränderungen infolge der Clip-Operation

Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg des Cardiac weight index und der Angiotensin II Plasmaspiegel bei Verkleinerung der geklippten Niere um die Hälfte bei Wildtyp-Mäusen und Nox2-Knockout-Mäusen. * P<0,05 Kontroll-operierte vs. Arterien-Clip Tiere eines Mäusetyps.

In den Kontroll-operierten Gruppen war die endothelabhängige Relaxation der Aortenringe der Nox2-/-Mäuse etwas besser als die der WT-Mäuse. Anders als bei den WT-Mäusen führte die Clip-Behandlung bei den Nox2-/-Mäusen jedoch zu keiner Veränderung der endothelabhängigen Relaxation (s. Abbildung 17C).

4.3.2.1 Untersuchung der Wirkung von NADPH-Oxidase-Inhibitoren auf die Endothelfunktion der Aortenringe

Um die Hypothese zu untermauern, dass die endotheliale Dysfunktion der Aortenringe der geklippten WT-Mäuse eine Folge vermehrter Superoxidradikalbildung durch die NADPH-Oxidase, insbesondere Nox2, ist, wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren des NADPH-Oxidase-Aktivierungswegs⁵³ auf die Acetylcholin-induzierte Relaxation getestet.

Sowohl eine Hemmung der Proteinkinase C, als auch von Rac oder der EGF-Rezeptor-Kinase führten zur Wiederherstellung einer normalen Relaxation in Aortenringen geklippter WT-Mäuse (s. Abbildung 18).

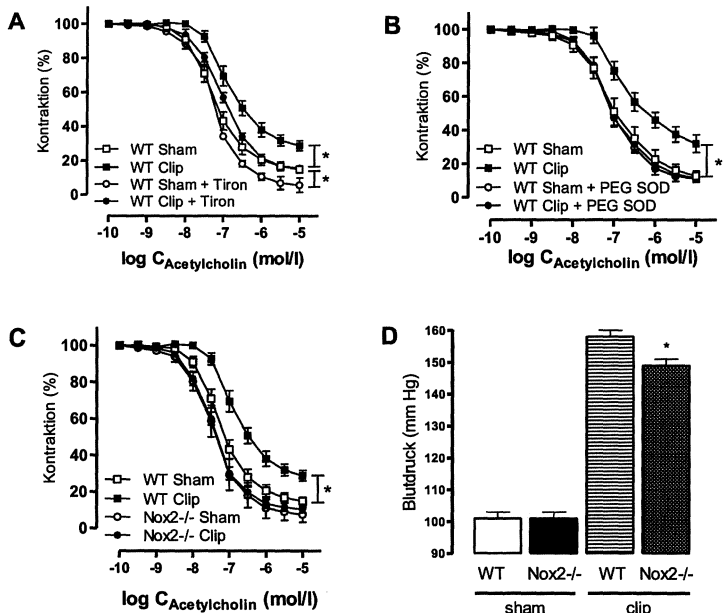


Abbildung 17: Einfluss der Clip-Operation auf die endothelabhängige Relaxation und den Blutdruck von Wildtyp- und Nox2-Knockout-Mäusen

Abkürzungen: Wildtyp-Mäuse (WT), Nox2-Knockout-Mäuse (Nox2^{-/-}), aus der Gruppe der mit Clip operierten Mäuse (Clip) oder der ohne Clip operierten Mäuse (Sham), X-Achse: dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration im Organbad in mol/l (log C_{Acetylcholin} mol/l).

A: Dargestellt ist die Endothel-abhängige Relaxation durch Acetylcholin in Phenylephrin-konstrigierten WT-Aortenringen im Organbad mit und ohne In-vivo-Behandlung mit Polyethylenglykol-Superoxiddismutase (PEG-SOD) zur Elimination von Superoxidanionen. Dabei zeigt sich im Vergleich zur Sham-OP-Gruppe eine schlechtere endothelabhängige Relaxation bei den Clip-OP-Gruppe-Mäusen. Tiron verbessert die endothelabhängige Relaxation in der Clip-OP-Gruppe in etwa auf das Niveau der Sham-OP-Gruppe in Abwesenheit von Tiron. Die endothelabhängige Relaxation der Sham-OP-Gruppe wird durch Tiron noch verbessert. *P<0,05 Clip-OP-Gruppe versus Sham-OP-Gruppe und Sham-OP-Gruppe mit Tiron versus ohne Tiron.

B: Dargestellt ist die Endothel-abhängige Relaxation durch Acetylcholin in Phenylephrin-konstrigierten WT-Aortenringen im Organbad in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 1 mmol/l des Antioxidantiums Tiron. Dabei zeigt sich bei WT-Mäusen eine komplette Restitution der endothelabhängigen Relaxation bei der Clip-OP-Gruppe in Gegenwart von PEG-SOD auf das Niveau der Sham-OP-Gruppe. Die Relaxation der Sham-OP-WT-Mäuse verbessert sich in Gegenwart von PEG-SOD nicht weiter. *P<0,05 Clip-OP-Gruppe versus Sham-OP-Gruppe

C: Vergleich der Endothelabhängigen Relaxation durch Acetylcholin in Phenylephrin-konstrigierten WT-Aortenringen im Organbad in Wildtyp und Nox2^{-/-}-Mäusen der Clip-OP-Gruppen und Sham-OP-Gruppen. In der Sham-OP-Gruppe der Nox2^{-/-} Mäuse ist die endothelabhängige Relaxation bereits primär besser als in der Sham-OP-Gruppe der WT-Mäuse. Die Applikation des Clips bedingt in Nox2^{-/-}-Mäusen keine signifikante Beeinträchtigung der endothelvermittelten Relaxation im Vergleich zur Sham-OP-Gruppe der Nox2^{-/-}-Mäuse. Die Relaxation der Clip-OP-Gruppe in Nox2^{-/-}-Mäusen ist von vornherein besser als die der Sham-OP-Gruppe der WT-Mäuse. *P<0,05 WT-Clip-OP-Gruppe versus WT-Sham-OP-Gruppe

D: Unterschiede in der Höhe des mittels Schwanzmanschette gemessenen Blutdrucks bei WT- und Nox2^{-/-}-Mäusen nach Clip- bzw. Sham-OP. Die Clip-OP-Gruppe zeigen einen stark erhöhten Blutdruck bei WT und Nox2^{-/-}-Mäusen, wobei bei ersteren der Blutdruck signifikant höher war. *P< 0,05 bei Clip-OP-WT-Mäusen versus Clip-OP-Nox2^{-/-}-Mäusen.

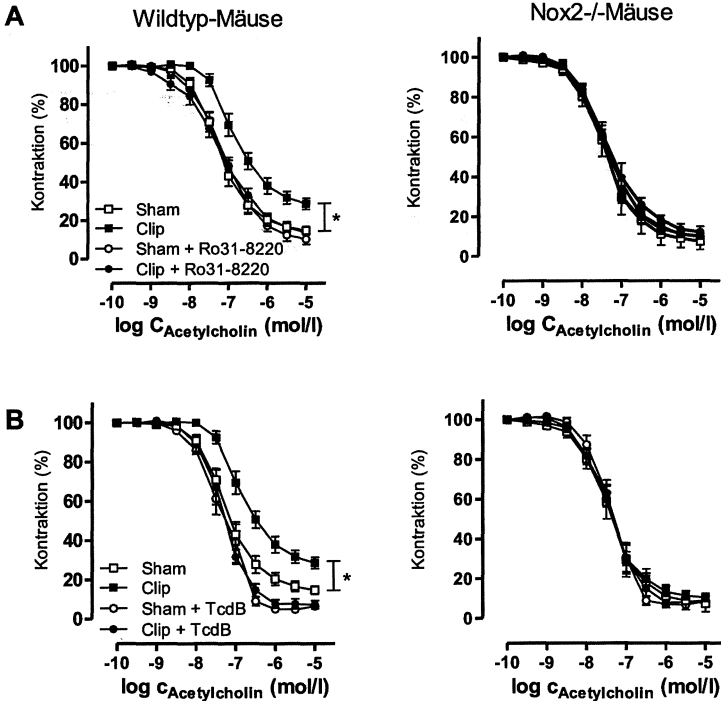
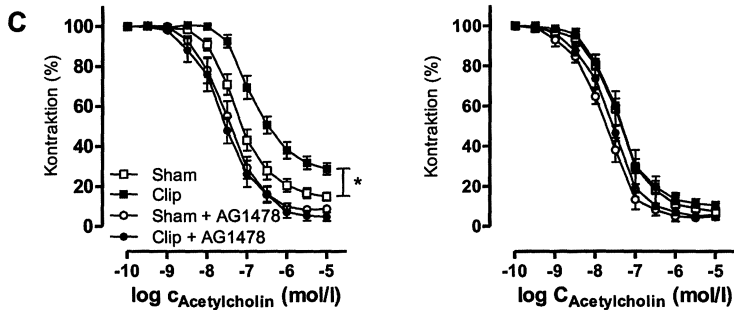


Abbildung 18: Einfluss von Inhibitoren der NADPH-Oxidase-Aktivierung auf die endothelabhängige Relaxation in Aortenringen von WT-Mäusen (links) und Nox2^{-/-}-Mäusen (rechts)

Abkürzungen: Wildtyp-Mäuse (WT), Nox2-Knockout-Mäuse (Nox2^{-/-}), aus der Gruppe der mit Clip operierten Mäuse (Clip) oder der ohne Clip operierten Mäuse (Sham), Ro31-8220 (Inhibitor der Proteinkinase C), Clostridium difficile lethal Toxin B (TcdB), AG1478 (Inhibitor der Epidermal growth factor-Rezeptorkinase), X-Achse: dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration im Organbad in mol/l (log $c_{\text{Acetylcholin}}$ mol/l)

A: Dargestellt ist die Endothel-abhängige Relaxation durch Acetylcholin in Phenylephrin-konstrangierten WT-Aortenringen im Organbad mit und ohne 30 Minuten Vorinkubation mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Ro31-8220. In Gegenwart des Inhibitors wird die Verschlechterung der endothelabhängigen Relaxation bei WT-Mäusen durch die Clip-Operation aufgehoben. Bei Nox2^{-/-}-Mäusen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Endothel-abhängigen Relaxation in Gegenwart des PKC-Inhibitors bei den verschiedenen Gruppen. * $P < 0,05$ WT-Clip-OP-Gruppe versus WT-Sham-OP-Gruppe ohne PKC-Inhibitor.

B: Vergleich der endothelabhängigen Relaxation mit und ohne 60 Minuten Vorinkubation mit Clostridium TcdB, das Rac inaktiviert, in Clip-OP- und Sham-OP-Gruppen der WT- und Nox2^{-/-}-Mäuse. Bei Nox2^{-/-}-Mäusen zeigt sich kein Unterschied in der endothelabhängigen Relaxation der verschiedenen Gruppen. Bei den Wildtypmäusen ist die Verschlechterung der endothelabhängigen Relaxation infolge der Clip-OP unter Rac-Inhibition aufgehoben. * $P < 0,05$ WT-Clip-OP-Gruppe versus WT-Sham-OP-Gruppe ohne Rac-Inhibitor.



C: Vergleich der endothelabhängigen Relaxation mit und ohne Vorinkubation mit AG1478, einem Inhibitor der Epidermal growth factor-Rezeptorkinase in Clip-OP- und Sham-OP-Gruppen der WT- und Nox2^{-/-}-Mäuse. Bei Nox2^{-/-}-Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der endothelabhängigen Relaxation der verschiedenen Gruppen. Bei den Wildtypmäusen ist die Verschlechterung der endothelabhängigen Relaxation infolge der Clip-OP unter EGF-Rezeptorkinase-Inhibition aufgehoben. *P<0,05 WT-Clip-OP-Gruppe versus WT-Sham-OP-Gruppe ohne EGF-Rezeptorkinase-Inhibitor.

Der für die NADPH-Oxidasen spezifische Inhibitor gp91ds-tat, der allerdings auf mehrere Isoformen der NADPH-Oxidase wirkt, führte im Vergleich zu seiner Peptidkontrolle zu einer verbesserten ACh-induzierten Relaxation der geclippten WT-Aortenringe im Vergleich zu den Kontroll-operierten WT-Aortenringen.

Bei den Aortenringen geclippter und kontroll-operierter Nox2^{-/-}-Mäuse zeigte keiner der Inhibitoren eine Wirkung auf die Relaxation.

4.3.2.2 Messung der Superoxidradikalproduktion in den Aortenringen und Wirkung des Superoxidfängers Tiron

Um zu untersuchen, ob die gestörte Relaxation der geclippten WT-Mäuse tatsächlich eine Folge der veränderten Elimination von NO durch Superoxidradikale war, wurden die Superoxidradikalbildung und die Wirkung von Tiron an den Aortenringen untersucht.

Die Aortenringe der kontroll-operierten WT-Mäuse produzierten insgesamt mehr Superoxid als die der kontroll-operierten Nox2^{-/-}-Mäuse. Die Clip-Operation hatte bei beiden Mäusestämmen eine erhöhte Superoxidradikalproduktion der Aortenringe zur Folge, die der Nox2^{-/-}-Mäuse erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Darüberhinaus wurde die Bedeutung des Endothels bei der durch Agonisten stimulierbaren vaskulären Superoxidproduktion untersucht. Die Stimulation der Aortenringe mit 100 nmol/l

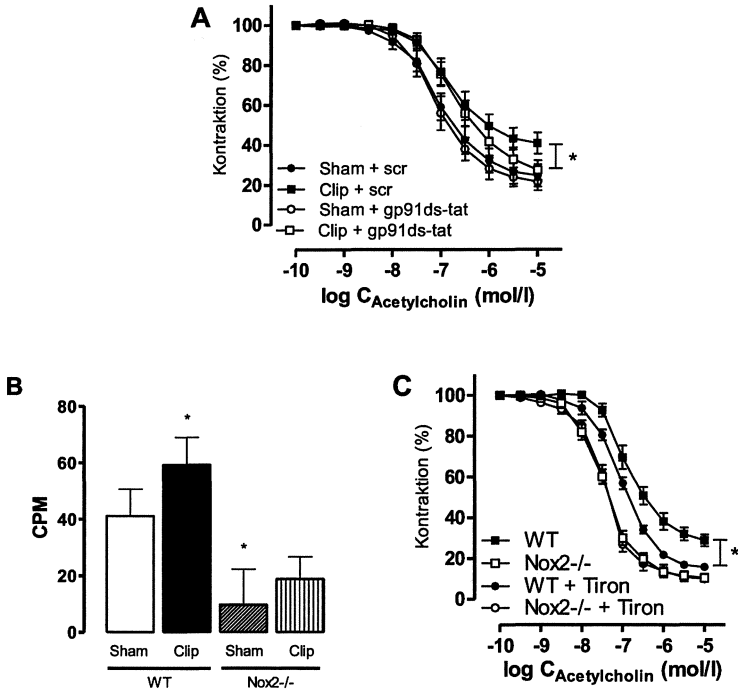


Abbildung 19: Vaskuläre Superoxidationenproduktion und Wirkung antioxidativer Agentien auf die endothelabhängige Relaxation der Aortenringe.

Abkürzungen: Wildtyp-Mäuse (WT), Nox2-Knockout-Mäuse (Nox2^{-/-}), aus der Gruppe der mit Clip operierten Mäuse (Clip) oder der ohne Clip operierten Mäuse (Sham), gp91 ds-tat (NADPH-Oxidase inhibitorisches Peptid), scr (scrambled-tat, Peptid gleicher Aminosäurezusammensetzung wie gp91 ds-tat, jedoch anderer Aminosäurereihenfolge), X-Achse (A, C): dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration im Organbad in mol/l (log C_{Acetylcholin} mol/l), counts per minute (CPM)

A: Dargestellt ist die Endothel-abhängige Relaxation durch Acetylcholin in Phenylephrin-konstrangierten WT-Aortenringen im Organbad mit In-vivo-Behandlung mit gp91 ds-tat oder scr als Kontrolle bei Clip-OP-WT-Mäusen und Sham-OP-Wildtyp-Mäusen. In Gegenwart von gp91 ds-tat ist die durch die Clip-Operation verursachte Verschlechterung der endothelabhängigen Relaxation aufgehoben. Das unspezifische Peptid scr zeigt verbessert die Relaxation nicht. *P<0,05 Clip-OP-Gruppe mit gp91 ds-tat versus Clip-OP-Gruppe mit scr, n=10.

B: Messung der Superoxidationproduktion von Aortenringen mittels Lucigenin-Chemiluminescence (5 mol/l) angegeben als Counts per minute (CPM) bei Wildtyp und Nox2^{-/-}-Mäusen der Clip-OP- und Sham-OP-Gruppen. Dabei zeigte sich in den Wildtyp-Mäusen der Clip-OP-Gruppe eine signifikant höhere Superoxidationproduktion als in der Sham-OP-Gruppe. Nox2^{-/-}-Mäuse der Sham-OP-Gruppe haben insgesamt eine signifikant niedrigere Superoxidationproduktion als die Wildtyp-Mäuse der Sham-OP-Gruppe. *P<0,05 WT-Clip-OP-Gruppe versus WT-Sham-OP-Gruppe und Nox2^{-/-}-Sham-OP-Gruppe versus WT-sham-OP-Gruppe.

C: Dargestellt ist die Wirkung des Antioxidantiums Tiron (1 mmol/l) auf die Endothel-abhängige Relaxation durch Acetylcholin in Phenylephrin-konstrangierten Aortenringen im Organbad bei WT- und Nox2^{-/-}-Mäusen der Clip-OP-Gruppe. Bei geclippten WT-Mäusen wirkte sich Tiron in einer Verbesserung der Relaxation aus, während die auch ohne Anwesenheit von Tiron deutlich bessere Relaxation der geclippten Nox2^{-/-}-Mäuse in Gegenwart von Tiron nicht weiter veränderte. *P<0,05 WT-Clip-OP-Gruppe ohne Tiron versus WT-Clip-OP-Gruppe mit Tiron

Phorbolmyristatacetat (PMA) verursachte nur in den Ringen der WT-Mäuse einen deutlichen Anstieg der Radikalproduktion¹⁴.

Die Steigerung der Superoxidradikalproduktion in den Aortenringen durch PMA-Stimulation wurde durch Entfernung des Endothels der Kontroll-operierten WT Mäuse um 89 % und der Clip-operierten WT-Mäuse um 92 % abgeschwächt.

Erwartungsgemäß zeigte die Applikation des antioxidativ wirksamen Tiron, im Gegensatz zu den Beobachtungen bei WT-Mäusen, keine Wirkung auf die endothelvermittelte Relaxation Clip-operierter Nox2-/Mäuse. Dies impliziert, dass bei diesen Tieren die NO-Bioverfügbarkeit nicht durch Superoxidradikale begrenzt wird.

4.3.2.3 Untersuchung der Genexpression der verschiedenen Nox-Isoformen und Antioxidativer Enzyme in den Aorten

Anschließend wurde mittels real-time RT-PCR untersucht, ob die erhöhte Superoxidradikalproduktion der Clip-operierten WT-Mäuse mit einer erhöhten Genexpression der NADPH-Oxidase-Isoformen einhergeht. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Nox1-, Nox2-, Nox4- oder p22phox-mRNA-Expression nach Clip- oder Kontrolloperationen der WT- und Nox2-/Mäuse.

Nox2-mRNA war mittels real-time RT-PCR auch bei den Nox2-/Mäusen nachweisbar, da deren Gen durch Insertion einer Neomycin-Kassette in Exon 3 der Nox2-mRNA verändert

Relative Expression	Wildtyp	Wildtyp	Nox2-/-	Nox2-/-
	Sham-operiert n=8	Arterien-Clip n=8	Sham-operiert n=8	Arterien-Clip n=8
Nox1	1,00 ± 0,02	0,99 ± 0,02	0,98 ± 0,03	1,01 ± 0,03
Nox2	1,00 ± 0,02	1,01 ± 0,03	1,00 ± 0,03	1,02 ± 0,03
Nox4	1,00 ± 0,28	1,04 ± 0,12	1,13 ± 0,20	1,05 ± 0,09
p22phox	1,00 ± 0,10	1,00 ± 0,13	1,15 ± 0,17	1,05 ± 0,08

Tabelle 11: relative mRNA-Expression der verschiedenen NADPH-Oxidase-Untereinheiten bei Wildtyp- und Nox2-Knockout-Mäusen nach Clip- und nach Sham-Operation

Es kam weder bei WT-Mäusen noch bei Nox2-/Mäusen zu Veränderungen der Nox-Genexpression nach Clip-Operation. Der positive Nachweis von Nox2-mRNA in Nox-/Mäusen erklärt sich durch die Ausschaltung des Nox2-Gens mittels Insertion eines längeren DNA-Abschnittes, wodurch zwar eine veränderte Nox2-mRNA, die durch die in dieser Arbeit verwendeten Primer erkannt wird, jedoch kein funktionstüchtiges Nox2-Protein mehr gebildet wird.

wurde. Die Primer-Bindungsstelle der Nox2-Primer war dadurch unverändert geblieben. Die Nox2-/-Mäuse zeigten zwar Expression der mRNA, diese wurde dennoch nicht in intaktes Protein translatiert.

Auch die Expression von eNOS, Katalase, CuZnSOD, extrazellulärer SOD und Rac zeigte keine Unterschiede zwischen den Nox2-/- und den WT-Mäusen der Kontroll- oder Clip-operierten Gruppen.

4.3.2.4 Untersuchung der Wirkung von exogen zugeführtem NO auf Aortenringe mit bzw. ohne intaktem Endothel

Nox2 wird v. a. im Endothel und in der Adventitia exprimiert. Um den genauen Ort im Gefäß, an dem die NO-Bioverfügbarkeit vermindert wird, zu finden, wurden in Aortenringen mit bzw. ohne intaktem Endothel die Reaktion auf exogen zugeführtes NO (Deta-NONOat) untersucht (s. Abbildung 20).

In Gefäßen geclippter WT-Mäuse war die NO-induzierte Relaxation geringer im Vergleich zu den Gefäßen der ohne Clip operierten WT-Mäuse. Bei Gefäßen von gp91phox-/-Mäusen hatte der Clip keinen Einfluss auf die NO-induzierte Relaxation. Wurde das Endothel mittels des Detergens CHAPS (5 mg/ml in 50 g/l Glucoselösung, Einwirkzeit 45 s) entfernt, zeigten die Gefäßringe aller Tiere gleiche Reaktionen. Parallel dazu führte die Exposition der Gefäßringe ggü. Nitroprussidnatrium, das NO nach Metabolisierung durch eine NADH-Oxidoreduktase direkt in der glatten Muskulatur freisetzt⁹², in allen Gruppen zur gleichen Relaxation.

Wurden die Ringe der geclippten WT-Mäuse in vivo mit PEG-SOD bzw. ex vivo mit MnTBAP behandelt, stellte dies die Relaxation der Ringe auf Deta-NONOat vollständig wieder her (s. Abbildung 20D).

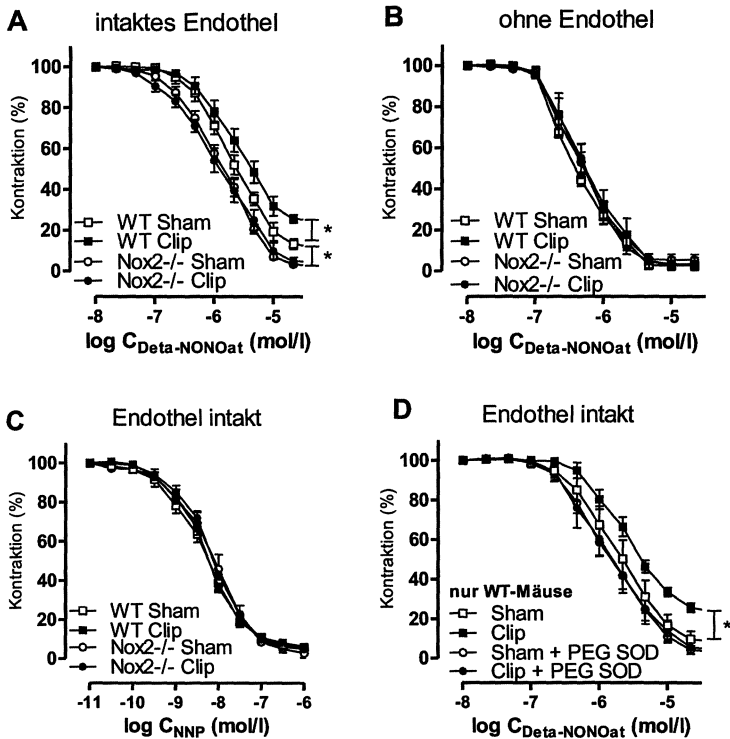


Abbildung 20: Bedeutung des Endothels für die Clip-induzierte Beeinträchtigung der endothelvermittelten Relaxation.

Abkürzungen: Wildtyp-Mäuse (WT), Nox2-Knockout-Mäuse (Nox2^{-/-}), aus der Gruppe der mit Clip operierten Mäuse (Clip) oder der ohne Clip operierten Mäuse (Sham), Konzentration (c), Polyethylenglykol-Superoxiddismutase (PEG-SOD), X-Achse: dekadischer Logarithmus der Konzentration von Deta-NONOat in A, B und D, bzw. Natriumnitroprussid (NNP) in C im Organbad in mol/l

A: Dargestellt ist die Relaxation in Abhängigkeit von der Konzentration von Deta-NONOat als exogenem NO-Donator in Phenylephrin-konstrangierten Aortenringen von WT-Mäusen und Nox2-Knockout-Mäusen der mit und ohne Clip-operierten Gruppen. Bei intaktem Endothel zeigt sich bei WT-Mäusen eine signifikante Beeinträchtigung der NO-induzierten Relaxation durch die Clip-Operation. Nox2^{-/-}-Mäuse zeigten insgesamt eine signifikant stärkere NO-abhängige Relaxation als WT-Mäuse. Die Applikation des Clips nahm keinen signifikanten Einfluss auf die NO-abhängige Relaxation bei Nox2^{-/-} Mäusen. *P<0,05 WT-Clip-OP-Gruppe versus WT-Sham-OP-Gruppe und Nox2^{-/-}-Sham-Gruppe versus WT-Sham-Gruppe.

B: Dargestellt ist die Relaxation in Abhängigkeit von der Konzentration von Deta-NONOat als exogenem NO-Donator in Phenylephrin-konstrangierten Aortenringen von WT-Mäusen und Nox2-Knockout-Mäusen der mit und ohne Clip-operierten Gruppen. In Abwesenheit des Endothels zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Relaxation zwischen WT-Mäusen und Nox2^{-/-} Mäusen der mit und ohne Clip operierten Gruppen.

C: Dargestellt ist die Relaxation in Abhängigkeit von der Konzentration von Natriumnitroprussid als direkt in den Gefäßmuskulzellen wirksamem NO-Donator in Phenylephrin-konstrangierten Aortenringen von WT-Mäusen und Nox2-Knockout-Mäusen der mit und ohne Clip operierten Gruppen. Die Ergebnisse zeigen im Gegensatz zu Abbildung A trotz Anwesenheit des Endothels keinen signifikanten Unterschied in der Relaxation zwischen WT-Mäusen und Nox2-/- Mäusen der mit und ohne Clip operierten Gruppen.

D: Dargestellt ist die Relaxation in Abhängigkeit von der Konzentration von Deta-NONOat als exogenem NO-Donator in Phenylephrin-konstrangierten Aortenringen von WT-Mäusen der mit und ohne Clip-operierten Gruppen in Gegenwart oder Abwesenheit von PEG-SOD und bei intaktem Endothel. In Abwesenheit von PEG-SOD als Superoxidationfänger wird die durch die Clip-Operation gestörte NO-abhängige Relaxation der Aortenringe wiederhergestellt. Bei den ohne Clip operierten Mäusen zeigt sich kein Einfluss von PEG-SOD auf die NO-abhängige Relaxation. * $P < 0,05$ WT-Clip-OP-Gruppe versus WT-Sham-OP-Gruppe ohne PEG-SOD.

5. Diskussion

5.1 Nox-Isoformen

5.1.1 Warum real-time RT-PCR?

In dieser Arbeit sollte die Expression der verschiedenen Nox-Isoformen in wichtigen Organen wie Colon, Niere und Aorta quantitativ untersucht werden. Dazu standen verschiedene Methoden zur Auswahl: Northern Blot, herkömmliche oder kompetitive RT-PCR mit Gelelektrophorese und real-time RT-PCR.

Ein wichtiger Aspekt bei der Wahl der Untersuchungsmethode war die Sensitivität. Beim Northern Blot wird z. B. die RNA der zu untersuchenden Probe extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt und dann durch eine markierte, spezifische DNA-Sonde auf einer Trägermatrix sichtbar gemacht. Dabei ist die Intensität der Bande auf der Matrix abhängig von der Menge der vorhandenen mRNA in der Probe. Verständlicherweise können dabei einzelne mRNA-Sonden-Komplexe nicht zuverlässig erkannt werden, erst ab einer größeren Zahl sind diese mit dem bloßen Auge oder photometrischen Messgeräten quantifizierbar. Da die zu untersuchenden Gene, z. B. Nox1, z. T. nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden, wurde für diese Arbeit eine Methode benötigt, die imstande ist, wenige Kopien eines einzelnen Genes nachzuweisen.

Die herkömmliche RT-PCR ermöglicht zwar den Nachweis auch geringer Mengen einer spezifischen mRNA in einer Probe, da aber am Ende der zahlreichen PCR-Zyklen die Menge des Amplifikationsproduktes nicht direkt proportional zur Menge der zu Beginn in der Probe befindlichen mRNA ist, sind genaue quantitative Vergleiche unter verschiedenen Proben nicht möglich. Trotzdem wurde diese Methode zu Beginn der Arbeit mit dem Ziel des rein

qualitativen Nachweises von Nox1-mRNA in Mäusearten eingesetzt. Dabei erschwerte v. a. die geringe Gesamt-RNA-Ausbeute von ca. 0,5-0,7 µg pro Mäuse-Aorta bei gleichzeitig sehr niedriger Nox1-mRNA-Expression den zuverlässigen Nachweis mittels herkömmlicher RT-PCR.

Für die Fragestellung der quantitativen Expressionsanalyse wäre noch die kompetitive RT-PCR geeignet. Sie ermöglicht semiquantitative mRNA-Analysen bis zum Unterschied von Faktor 2 zwischen zwei Proben. Ihr entscheidender Nachteil ist jedoch, dass für jede zu untersuchende mRNA unter großem Arbeitsaufwand eine Kompetitorsonde entwickelt werden muss. Des weiteren erhält man nur dann korrekte Messungen, wenn die Mengenverhältnisse zwischen der zu untersuchenden mRNA und der Kompetitorsonde zwischen 1:10 und 10:1 betragen, mit einer maximalen Genauigkeit beim Verhältnis 1:1. Da die Konzentration der zu untersuchenden mRNA in der Probe zu Beginn unbekannt ist, erfordert diese Methode wiederholte, arbeitsaufwändige Titrationschritte bis ein gutes mRNA-Kompetitorsonden-Verhältnis gefunden ist, unter der Voraussetzung gleicher PCR-Effizienzen für Template und Kompetitorsonde.

Übrig blieb schließlich die real-time RT-PCR. Ihre extrem gute Sensitivität und Spezifität ermöglicht theoretisch sogar den Nachweis von einer einzelnen mRNA-Kopie in 100 ng Proben-RNA. Nach meinen Erfahrungen gelingt eine derart sensitive real-time PCR allerdings nur bei wenigen Primer-Sets und Templates und maximaler PCR-Effizienz. Bei den meisten Primer-Sets konnte in dieser Arbeit eine Sensitivität bis zum Nachweis von ca. 20 mRNA-Templates in 100 ng Proben-RNA erreicht werden. Auch der Arbeitsaufwand ist relativ moderat, da dank der im Anschluss an die PCR automatisch durchgeführten Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte zum Teil auf eine Gelelektrophorese zur Identifizierung der Produkte verzichtet werden kann. Dieser Aspekt erspart Arbeit, Zeit, sowie Material und reduziert Fehler durch Kontamination. Der wichtigste Nachteil der real-time RT-PCR liegt in den hohen Materialkosten. Zum einen wird ein extrem teures spezielles real-time-PCR-Gerät (z. B. Mx4000 von Stratagene) benötigt, zum anderen benötigt man besondere Reagenzien, wie z. B. durch Antikörper blockierte Polymerasen, spezielle interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenz-markierte Taqman-Proben, um die hohe Sensitivität und Spezifität der Methode zu gewährleisten. Diese Reagenzien sind ebenfalls sehr teuer in der Anschaffung. Darüberhinaus werden zur Quantifizierung der Genkopienzahl Standards, meist in Form von Plasmiden, benötigt, die meist in aufwendiger Arbeit selbst hergestellt werden müssen. Für die semiquantitative Analyse relativer Mengenverhältnisse ist dieser Arbeitsaufwand jedoch nicht nötig. Auch andere

Arbeitsgruppen entschieden sich für die Untersuchung der Nox-Expression mittels real-time RT-PCR. V. a. in Arbeiten zur Nox-Expression des Gefäßsystems wurde die quantitative real-time RT-PCR bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt^{27;28}.

Insgesamt ist die real-time RT-PCR eine einzigartig sensitive und spezifische Methode zur Untersuchung der Genexpression bis ins kleinste Detail, die durch faszinierende Ergebnisse die hohen Versuchskosten wettmacht.

5.1.2 Expressionsmuster und mögliche Funktionen der Nox-Isoenzyme in verschiedenen Organen der Maus

Diese Arbeit beschreibt erstmals eine genaue quantitative Analyse der Nox-Expression in verschiedenen Organen der Maus.

Die Untersuchung der Nox1-Expression ergab, wie zuvor von anderen Autoren berichtet, die stärkste Expression im Colon. Dies trifft für auch für Mensch und Ratte zu^{5;10;16;17;19;21}. Neu ist jedoch die Erkenntnis, dass Nox1-mRNA sich in 10-200 mal kleineren Mengen in fast allen lebenswichtigen Organen, i. e. Niere, Milz, Aorta, aber auch in Lunge (Maus: Abbildung 5 und Referenzen^{13;93}, Ratte^{13;16;93;94}) Uterus und Prostata findet^{5;14;16-18;23;44}(Mensch^{5;14;16-18;23;44}), wenn man mittels hochempfindlicher real-time RT-PCR danach sucht.

Die physiologische Funktion von Nox1 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise dient es auch je nach Zelltyp vollkommen unterschiedlichen Aufgaben. Es gibt Hinweise für eine Bedeutung der durch Nox1 produzierten ROS als Botenstoffe in der Kontrolle von Zelldifferenzierung und -wachstum: Mit Nox1 transfizierte Fibroblasten zeigen ein gesteigertes Zellwachstum mit Tumorbildung nach Transplantation in Nacktmäuse und PDGF induziert in VSMC eine erhöhte Expression von Nox1 mit nachfolgend gesteigerter ROS-Produktion und Zellproliferation⁵. In Zellen der Magenfoveolae des Meerschweinchens ist die Nox1-Aktivität während der Zellproliferation erhöht und geringe Mengen Superoxidradikale bzw. H₂O₂ verhindern die spontane Apoptose der Zellen in Zellkultur⁹⁵. Darüberhinaus fällt eine besonders starke Expression von Nox1 in Organen mit hohem Zellumsatz, wie Gastrointestinaltrakt und Uterus, sowie in verschiedenen Tumoren, darunter Prostata-LnCap Carcinome^{5;96}, humane Colocarzinome (CaCo-1, T84), Cervix-Adenocarcinome (HeLa) und Lebertumoren (Hepatoma G2)^{5;14;16-18;96} auf. Andere Autoren haben dem eine zweite Hypothese gegenübergestellt. Sie bezweifeln eine mitogene Funktion von Nox1 in Colonepithelzellen^{97;98}. Stattdessen vermuten sie, dass die konstitutiv produzierten ROS im

Colon von Maus, Mensch und Meerschwein als intrazelluläre Botenstoffe in der unspezifischen Immunabwehr dienen, da die Nox1-Expression in Colonepithelzellen durch Entzündungsmediatoren wie Interferon- γ und rekombinantem S.-enteritidis-Flagellin erhöht wird und die nachfolgende ROS-Produktion über die Aktivierung von NF- κ B zur Produktion von IL-8 oder TNF- α führt^{8;97-99}. Diese Funktion für Nox1 wäre auch in Niere, Aorta oder Milz vorstellbar. So induziert beispielsweise die Stimulation menschlicher mikrovaskulärer Endothelzellen aus der Haut mit TNF α die ROS-Produktion durch eine NADPH-Oxidase⁵⁰. Die durch TNF α induzierte erhöhte ROS-Produktion führt in Endothelzellen zur Aktivierung von ERK1/2 und anderen Signaltransduktionsmolekülen mit der Folge einer vermehrten Expression von ICAM-1 und E-Selektinen auf der Zelloberfläche, die Entzündungszellen als Adhäsionsmoleküle dienen^{50;51;100}. Weitere Hinweise könnte die quantitative Untersuchung der Nox1-Expression in den verschiedenen Mausorganen nach intravenöser Applikation von Entzündungsmediatoren oder bakteriellen Endotoxinen *in vivo* liefern.

Nox2 ist ohne Zweifel Hauptbestandteil der Leukozyten-NADPH-Oxidase und dient diesen Zellen bei der Abtötung phagozytierter Mikroben während des sog. „Respiratory Burst“. Interessanterweise wird Nox2 auch in Aorta, Colon, Niere und Milz der Maus in größeren Mengen exprimiert (vgl. Abbildung 7). Bei der Präparation wurden alle Organe mehrfach mit PBS-Puffer gespült um insbesondere Blutreste zu entfernen, die zur Kontamination mit Leukozyten-DNA führen würden. Obwohl bei den aus den verschiedenen Organen gewonnen DNA-Proben ein geringer Anteil Leukozyten-DNA nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, erklärt dies nicht die um ca. 30fach höhere Expression von Nox2 in Niere und Aorta verglichen mit Colon. Wie zahlreiche Untersuchungen an Zellkulturen belegen, wird Nox2 in den Parenchymzellen von Aorta, Niere und Colon exprimiert. So ist die Expression von Nox2 u. a. in Endothelzellen, Fibroblasten, Mesangiumzellen und T84-Coloncarcinomzellen des Menschen nachgewiesen worden^{14;17;24;26-28;32;40}. Nox2 ist laut Li und Shah in Endothelzellen v. a. in der perinukleären Region lokalisiert und bildet ROS demnach im intrazellulären Kompartiment, ganz im Gegensatz zu Leukozyten, deren Nox2-NADPH-Oxidase ROS in den Extrazellulärraum sezerniert⁹⁸. Da Nox2 in Endothelzellen nur in sehr geringen Mengen vorkommt, dient es hier wahrscheinlich nicht der Abtötung von Mikroorganismen. Denkbar wäre, ähnlich wie zunächst für Nox1 vermutet, eine Beteiligung an proliferationssteigernden Signaltransduktionsprozessen. Laut Ushio-Fukai et al. wird beispielsweise das durch den VEGF-Rezeptor KDR vermittelte Signal zur Proliferation von Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese teilweise von durch Nox2 produzierten ROS vermittelt³⁵.

Die Expression von Nox3 wurde aufgrund der sehr limitierten Expression in Innenohr und Gehirn adulter Organismen sowie in verschiedenen Organen während der Fetalzeit in dieser Arbeit nicht untersucht^{6;16;17;55}.

Nox4 ist das Hauptisoenzym der NADPH-Oxidase in der Niere, was sich in seiner ca. 170fach höheren Expression im Vergleich zu Colon und Aorta niederschlägt (vgl. Abbildung 8). Bei Mäusen wird Nox4 in der Niere v. a. von Sammelrohrepithelzellen des inneren Markraumes und in Epithelzellen im Konvolut der proximalen Tubuli exprimiert, beim Menschen im proximalen und distalen Tubulus sowie in Mesangiumzellen^{9;11;17}. Da im renalen Cortex auch die Erythropoietinproduktion statt findet, wurde für Nox4 eine Beteiligung am Erythropoietin-Regelkreis als Sauerstoffsensoren postuliert¹¹. Diese Hypothese bleibt allerdings noch zu beweisen.

Ähnlich wie die anderen Nox-Isoformen findet man Nox4 in geringeren Mengen in einer Vielzahl von Organen. So wurde bisher die Expression von Nox4 beim Menschen z. B. in Herz und Gefäßen, Skelettmuskel, Gehirn, Pankreas, Milz, Plazenta, Ovar und Testis, sowie in humanen Colonkarzinomzellen (CaCo2, T84), Cervix-Adenokarzinomzellen (HeLa) und Ovarialkarzinomzellen (Es-2, PA-1, Ovarcar-3) beschrieben^{9;17;29}. Die Funktion von Nox4 in diesen Organen ist bisher noch nicht geklärt. Eine Überexpression von Nox4 in transfizierten NIH3T3-Fibroblasten, COS-7-Zellen oder HEK293-Zellen induziert Senescence und vermindert die Proliferationsrate^{9;11}. Umgekehrt wird die Expression von Nox4 in Endothelzellen und VSMC durch Serumentzug und damit Hemmung der Zellproliferation erhöht^{19;28}. Nox4 ist also möglicherweise mit einer genau entgegengesetzten Wirkung wie Nox1 an der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung beteiligt.

5.1.3 Expression der Nox-Isoenzyme im Gefäßsystem von Mensch und Maus

5.1.3.1 Nox-Expression in vaskulären Zellen in Kultur

Nachdem in den Maus-Aorten Nox1, Nox2 und Nox4-mRNA nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, welche Zelltypen der Gefäßwand in welchen Mengenverhältnissen diese Nox-Isoformen exprimieren würden.

Es stellte sich heraus, dass Nox1 am stärksten in Ratten AoVSMC, dann in HUVEC und dann in menschlichen AoVSMC im Verhältnis 125 : 1 : 0,3 exprimiert wird. Diese in Abbildung 4 dargestellte höhere Nox1-Expression in Endothelzellen verglichen mit aortalen VSMC steht mit Beobachtungen von Sorescu et al. beim Vergleich von koronaren Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen in Einklang²⁷. Auch bei der Ratte ist die Nox1-Expression in Endothelzellen im Vergleich zu VSMC stärker³³. Besonders überraschend waren an diesem Befund jedoch die starken spezies-spezifischen Unterschiede um den Faktor 300 zwischen Mensch und Ratte. An diesem Beispiel zeigt sich, wie problematisch die Übertragung von an Nagetieren gewonnenen Daten auf den Menschen mitunter sein kann.

In der Literatur finden sich zur Nox-Expression im kardiovaskulären System viele, z. T. widersprüchliche Ergebnisse. Tatsächlich erschweren verschiedene Umstände die genaue Charakterisierung im Gefäßsystem: Zum Beispiel ist die Nox-Expression individuell unterschiedlich. So fanden Guzik et al. Nox1 nur bei einem Teil der Versuchspersonen in der A. mammaria oder in den Koronararterien^{29;101}. Daneben ist das Vorkommen und die Stärke der Expression der verschiedenen Nox-Isoformen abhängig von der arteriellen Gefäßregion und -größe. So fand sich z. B. Nox1-mRNA in VSMC aus Leitungsgefäßen des Hoch- und Niederdrucksystems wie Aorta, Koronararterien, A. pulmonalis und V. saphena magna^{18;26;27}, nicht jedoch in VSMC aus kleinen subkutanen Widerstandsgefäßen der Glutealregion¹⁸. In Untersuchungen zur Expression von Nox4 in verschiedenen Arterien der Ratte zeigte sich eine bis zu 10fach größere Expression in der Basilararterie im Vergleich zur Aorta¹⁰². Aufgrund der sehr geringen mRNA-Kopienzahl, ist die genaue Zuordnung der Nox1-Expression in der Gefäßwand mit immunhistochemischen Methoden zu bestimmten Zelltypen schwierig. Sorescu et al. wiesen Nox1-Expression in Zellen von Intima, Media und Adventitia in Koronararterien schwer herzinsuffizienter Patienten nach²⁷. Im Gegensatz dazu konnten Görlach et al. in HUVEC oder EA.Hy926-Endothelzellen in Kultur keine Nox1-mRNA nachweisen¹⁴. In dieser Arbeit gelang der Nachweis von Nox1-mRNA in HUVEC und aortalen VSMC des Menschen, wahrscheinlich aufgrund der höheren Sensitivität der real-time RT-PCR im Vergleich zur herkömmlichen RT-PCR (vgl. Abbildung 6). Trotz der absolut gesehen eher geringen Expression von Nox1 im kardiovaskulären System gibt es Hinweise für eine Bedeutung bei der Neointimbildung nach Ballondilatation verengter Gefäßabschnitte, da die Nox1-mRNA-Level bis zu 2 Wochen lang nach Carotis-Angioplastie in Ratten-Carotiden erhöht waren¹³.

Nox2 wird in der Mäuseaorta exprimiert. Dass die Nox2-mRNA nicht nur aus gerade im Gefäß befindlichen Leukozyten stammt, zeigten Untersuchungen an Kulturen von HUVEC sowie aortalen VSMC der Ratte und des Menschen: Nox2 fand sich in HUVEC, nicht jedoch in VSMC. In der Literatur ist die Nox2-Expression in VSMC umstritten. Es gibt sowohl bestätigende als auch gegenteilige Publikationen zur Nox2-Expression in VSMC. Verschiedene Arbeitsgruppen kamen je nach Untersuchungsmethode, Spezies und untersuchtem Gefäßgebiet zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen:

Beim Menschen findet sich Nox2 in VSMC der Koronararterien und aus kleinen subkutanen Widerstandsgefäßen der Glutealregion, nicht jedoch in VSMC der Aorta^{18;27}. Bei der Ratte fanden Lassègue et al. in proliferierenden VSMC der Aorta Nox2-mRNA in der RT-PCR, während Ushio-Fukai et al. mit der gleichen Methode kein Nox2-Nachweis gelang^{19;103}. Des weiteren exprimieren Ratten Nox2 in VSMC der Pulmonalarterie, jedoch anscheinend nicht in VSMC der Mesenterialarterie¹⁸. Einig sind sich die meisten Autoren jedoch darüber, dass die in einigen Fällen in VSMC nachgewiesenen Nox2-mRNA-Mengen extrem gering sind^{13;19}.

Die Veröffentlichungen über die Expression von Nox2 in Endothelzellen stimmen wesentlich besser überein. So wurde Nox2-mRNA bisher in Endothelzellen aus Aorta, Nabelschnurvene und Koronararterien des Menschen nachgewiesen^{4;14;27;28;35;98}. Nach Untersuchungen von Li und Shah befindet sich Nox2 als Komplex aller zur Funktion benötigten NADPH-Oxidase-Untereinheiten in der perinukleären Region mit Assoziation an Strukturen des Zytoskeletts der Endothelzellen⁹⁸. Auch Fibroblasten der Adventitia produzieren mittels Nox2 Superoxid, wie Untersuchungen an Kaninchenaorten bewiesen^{32;104}. Wahrscheinlich stammt die Nox2-mRNA der Mäuseaorta also zu einem kleinen Teil aus in der Gefäßwand befindlichen Leukozyten, sowie größtenteils aus Endothelzellen und Fibroblasten der Adventitia.

Nox4 zeigt von allen Nox-Isoformen die höchste Expression in VSMC. Es wurde bisher in allen Veröffentlichungen zur Nox-Isoenzym-Expression in VSMC aus Gefäßen von Ratte und Mensch nachgewiesen^{18;27;77}. Noch mehr Nox4 als in VSMC findet sich allerdings in Endothelzellen. HUVEC exprimieren ca. 1800 mal so viel Nox4 wie aortale VSMC des Menschen, und auch hier ist Nox4 die am stärksten exprimierte Isoform²⁸ (vgl. Abbildung 8). Einen ähnlichen, wenn auch nicht ganz so großen Unterschied fanden Sorescu et al. in Endothelzellen und VSMC aus menschlichen Koronararterien²⁷. Hilenski et al. fanden heraus, dass Nox4 in aortalen VSMC der Ratte im Zellkern und an sog. Fokalkontakten positioniert ist, mit deren Hilfe die Zelle an der extrazellulären Matrix befestigt ist. Im Gegensatz dazu fanden sie Nox1 an sog. Cavolae, die der Zelle als kleine Kommunikationsplattformen

dienen, an der Zelloberfläche sowie gehäuft an den Zellgrenzen¹⁰⁵. Auch in Endothelzellen findet sich Nox4 im Inneren des Zellkerns sowie in kleinen vesikelähnlichen Strukturen im Zytoplasma¹⁰⁶. Die Lokalisation der Nox-Isoformen im Zellkern sowie an Stellen, die für Signaltransduktion der Zellen wichtig sind (Caveolae) legen die Vermutung nahe, dass die durch Nox produzierten ROS eine Rolle für die Transduktion von Signalen ins Zellinnere, insbesondere auch in den Zellkern spielen.

5.2 Regulatorische Untereinheiten

5.2.1 Gewebeverteilung von Nox1 und Noxa1

Beschrieben wurden Noxo1 und Noxa1 erstmals 2002 von Banfi et al.²³ bei der Maus und von Takeya et al.¹⁵ sowie von Geiszt et al.⁸ beim Menschen. Ihre Untersuchung verschiedener Gewebe auf die Expression der neu entdeckten Untereinheiten mittels Northern blot, In-Situ-Hybridisierung und real-time RT-PCR ergab für Noxa1 und Noxo1 ein Expressionsmuster, das dem von Nox1 am stärksten ähnelt mit der höchsten Expressionsrate im Colon von Mensch und Maus. Dank der hohen Sensitivität der real-time RT-PCR konnte in dieser Arbeit eine noch deutlich breitere Gewebeverteilung von Noxa1 und Noxo1 in einer Vielzahl lebenswichtiger Organe, u. a. auch in der Niere und im vaskulären System, gezeigt werden. Darüberhinaus gibt diese Dissertation erstmals Aufschluss über die quantitativen Unterschiede in der Expression von Nox-Isoenzymen und regulatorischen Untereinheiten in verschiedenen Geweben und Zelltypen.

Die höchste Expression von von Nox1, Noxo1 und Noxa1 im Colon der Maus konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Das Expressionsmuster der neuen Untereinheiten lässt vermuten, dass Noxo1 und Noxa1 im Colon mit Nox1 zusammen einen funktionellen NADPH-Oxidase-Komplex bilden. Diese Hypothese wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen in vitro anhand von transfizierten Zellsystemen (HEK293-Zellen, HeLa-Zellen, K562, COS7-Zellen u. a.) getestet^{8;15;23;30;55}. Darin zeigte die murine Nox1 nur mit Noxo1/Noxa1 maximale konstitutive Aktivität, während Kombinationen mit p47phox/Noxa1 oder p47phox/p67phox erst nach PMA-Stimulation aktiv wurden und eine geringere maximale Aktivität aufwiesen²³.

Überraschend war daher an den Ergebnissen dieser Arbeit die starke p67phox-Expression im Colon, das ja neben Nox1 in geringem Maß Nox4, jedoch kaum Nox2 und kein Nox3^{6;16}

exprimiert. Nox4 benötigt zur ROS-Produktion lediglich p22phox und keine Aktivatoren oder Organisatoren, wie Untersuchungen an transfizierten HEK293-Zellen vermuten lassen. Die ROS-Produktion durch eine Nox4-NADPH-Oxidase war dabei unabhängig von der Anwesenheit von Noxo1, Noxa1 oder Rac^{107;108}. In Untersuchungen an Membranen aortaler Endothelzellen der Ratte war die Nox4-Aktivität unabhängig von der Anwesenheit von p47phox und p67phox²⁸. Es kommen also im Colon nur Nox1, Nox2 oder ein noch nicht identifiziertes Isoenzym als Komplex-Partner für p67phox in Frage. Nach Ergebnissen von B. Bánfi et al. zeigten NADPH-Oxidase-Komplexe aus Nox1, Noxo1 und p67phox der Maus in vitro kaum Aktivität²³. Die genaue Zusammensetzung und Funktion der NADPH-Oxidase-Untereinheiten im Colon wird erst in zukünftigen Untersuchungen genauer erklärt werden können. So bleibt bisher unklar, welche Funktion der Untereinheit p67phox im Colon zukommt. Möglicherweise fehlten in den transfizierten Zellen o. g. Arbeiten auch weitere Kofaktoren oder Mechanismen, die im Colon der Maus natürlicherweise vorhanden sind und die Interaktion von Nox1, Noxo1 und p67phox unterstützen.

	Nox1	Nox2	Nox3	Literatur	Nox4	Literatur	Nox5	Literatur
Maus-Colon	+++	(+)	-	⁶	+		n. u.	
Maus-Aorta	+	++	n. u.		+		n. u.	
Maus-Niere	+	++	-	⁶	+++	^{9;11}	n. u.	
Mensch VSMC	(+)	-	n. u.		+	14;18;44	-(E.) + 7	7
Mensch UVEC	(+)	++	-		++	26;40	-(E.) + 7	7

Tabelle 12: Quellenangaben zur quantitativen Nox-Expression in der Literatur

+++ hohe Expressionsrate, ++ mittlere Expressionsrate, + niedrige Expressionsrate, (+) sehr niedrige Expressionsrate, - nicht nachweisbar, n. u. nicht untersucht bzw. z. gegenwärtigen Zeitpunkt keine Untersuchung in der Literatur veröffentlicht, E. eigene Untersuchung, AoVSMC aortale Gefäßmuskelzelle, UVEC umbilical vein endothelial cell = Nabelschnurvenenendothelzelle

5.2.2 Spezies-spezifische Unterschiede in der Expression von Noxo1, Noxa1 und p67phox in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen

Die Untersuchungen zur Funktion von Noxo1 und Noxa1 mit Nox1, 2 und 3 von Maus und Mensch in verschiedenen transfizierten Zelltypen kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So war die ROS-Produktion in Nox1- oder Nox2-transfizierten NIH-3T3-Fibroblasten mit humanem Noxo1 und Noxa1 durch PMA steigerbar, während die Aktivität der murinen NADPH-Oxidase mit denselben Untereinheiten nach PMA-Stimulation keine signifikante

Aktivitätssteigerung zeigte^{8;15;55}. Kombinationen aus alten und neuen Untereinheiten mit Nox1 oder Nox2 waren bei den menschlichen Varianten weniger aktiv als bei den Mausproteinen^{8;23}.

Auch bezüglich der Expression der alten und neuen Aktivator-/Organisatorproteine zeigten sich deutliche speziesspezifische Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen: Humane AoVSMC exprimieren 15 mal so viel p67phox wie Nox1 bezogen auf 100 ng Gesamt-RNA. Die murinen AoVSMC enthalten dagegen nur 1,6mal so viel p67phox wie Nox1. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer früheren Publikation, die in VSMC aus der menschlichen Aorta mittels real-time RT-PCR und Western Blot kein p67phox nachweisen konnte⁴⁴. Möglicherweise sind diese Unterschiede auf verschiedene Wachstumsbedingungen in den Zellkulturen zurückzuführen, möglicherweise auch auf individuell unterschiedliche Expression von p67phox in den Zelllinien verschiedener Spender, wie sie für die Expression von Nox1 in der V. saphena magna und A. mammaria interna des Menschen beschrieben wurde²⁹.

Beide Spezies exprimieren Nox1 nur auf niedrigem Niveau. Nox1 ist bei humanen AoVSMC im unstimulierten Zustand nicht nachweisbar und wird erst nach Stimulation mit PDGF exprimiert. Im Gegensatz dazu exprimieren murine AoVSMC-Kulturen auch ohne Stimulation 1,3 mal so viel Nox1 wie Nox1. Zwischen den einzelnen murinen Zellkulturen gab es jedoch große Unterschiede in der mRNA-Kopienzahl für Nox1.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Problematik, mit denen eine Übertragung von an Mäusen oder Mäusezellen gewonnenen experimentellen Daten auf den Menschen verbunden ist.

5.2.3 Regulation der NADPH-Oxidase-Aktivität in VSMC über die Induktion der Aktivator-/Organisator-Untereinheiten durch Wachstumsfaktoren

Eine Vielzahl von Arbeiten demonstrierte bereits, dass die Aktivität der NADPH-Oxidasen an Vorgängen wie z. B. der AT II-induzierten Hypertrophie glatter Gefäßmuskelzellen, der Bildung einer Neointima nach Ballondilatation der A. carotis und der pathophysiologischen Vorgänge bei bestimmten Formen der Hypertonie¹⁰⁹ und endothelialen Dysfunktion im Rahmen der Atherosklerose entscheidend beteiligt sind.

Die Induktion von Hypertonie durch Angiotensin II-Infusionen führte bei Ratten zu erhöhter Superoxidradikalproduktion v. a. in der Media der Aorta und gestörter Relaxation der

Gefäßwand auf Acetylcholin und Nitroglycerin¹⁰⁹. In vitro erhöhte die Stimulation von Kulturen glatter Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta mit 100 nmol/l Angiotensin II die intrazellulären H₂O₂- und Superoxidradikale-Konzentration 4 Stunden nach Beginn der Stimulation^{66;110}. Die erhöhte Superoxidradikalproduktion nach Angiotensin II-Stimulation wird in VSMC u. a. durch Arachidonsäure vermittelt und geht mit erhöhter Aktivität einer NADPH-Oxidase einher. Die ROS wiederum führen als Botenstoffe über verschiedene Signaltransduktionswege zu gesteigerter Proteinsynthese⁶⁴.

Ein möglicher Mechanismus für die Erhöhung der Superoxidradikalproduktion der NADPH-Oxidase durch Angiotensin II ist die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Induktion der Nox1-Expression um ca. 30 % in humanen aortalen Gefäßmuskelzellen bereits 1 Stunde nach Beginn der Stimulation.

Nach Verletzungen der Gefäßwand wie sie z. B. nach PTCA mit Ballondilatation stenosierter Gefäßabschnitte auftreten, kommt es u. a. zur vermehrten Ausschüttung von PDGF. Dieser Wachstumsfaktor stimuliert glatte Gefäßmuskelzellen zu Proliferation¹¹¹ und erhöhter ROS-Produktion^{44;112}. VSMC der Rattenaorta exprimieren in konfluierenden Kulturen Nox2, Nox1 und Nox4 im Verhältnis von ca. 1 : 2000 : 4000 Genkopien, also etwa doppelt so viel Nox4 wie Nox1^{5;13}. Während Nox1 durch PDGF nach 12 h um bis auf das 4fache induziert wird, wird Nox4-mRNA auf 13% des Kontrollwertes herunterreguliert^{5;19}. In proliferierenden Kulturen müsste demnach das Verhältnis von Nox1 : Nox4 von 1 : 2 auf 31 : 1 steigen. Da die Aktivität der Nox1-NADPH-Oxidase im Gegensatz zu Nox4^{107;108} von der Anwesenheit der Aktivator- und Organisorproteine Noxo1/Noxa1 bzw. p47phox/p67phox abhängig ist, würde sich eine Veränderung der Expression der regulatorischen Untereinheiten durch PDGF-Stimulation überwiegend auf die Nox1 Aktivität auswirken.

Interessanterweise kam es unter PDGF zu einer Reduktion der Noxa1-Expression bei gleichzeitiger Induktion der p67phox-Expression. Falls mit dieser Veränderung der mRNA-Level eine gleichwertige Veränderung auf Proteinebene einherginge, könnte das Verhältnis von Noxa1 zu p67phox eine erhöhte Steuerbarkeit der ROS-Produktion durch Proteinkinase C bei gleichzeitig verminderter konstitutiver Aktivität von Nox1 begünstigen²³. Die Nox1-Aktivität würde dann während der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen anders reguliert als während der Interphase. Die Bestätigung oder Widerlegung dieser Hypothesen bleibt jedoch zukünftigen Arbeiten überlassen.

Erst die genaue Kenntnis der funktionellen Bedeutung und Steuerung der ROS-Produktion im Gefäßsystem wird ein gezieltes therapeutisches Eingreifen in die pathophysiologischen Vorgänge ermöglichen.

5.3 Nox-Expression in einem pathophysiologischen Modell der renalen Hypertonie

Anhand der unter 4.3 beschriebenen Versuche wurde der Mechanismus der gestörten Endothel-abhängigen Relaxation bei der renovaskulären Hypertonie mittels eines Mausmodells identifiziert. Die Deletion des Nox2-Gens aus dem Genom der Mäuse verhinderte die durch den Clip verursachte endotheliale Dysfunktion und milderte das Ausmaß der renovaskulären Hypertonie. Bei den Wildtyp-Mäusen war die renovaskuläre Hypertonie mit einer erhöhten Elimination von exogen zugeführtem NO verbunden. Dieser Effekt wird durch Entfernung des Endothels oder Deletion des Nox2-Gens beeinträchtigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass das durch eine endotheliale NADPH-Oxidase gebildete Superoxid durch die Elimination endothelialer NOs die endotheliale Dysfunktion bei der renalen Hypertonie verursacht.

Die renovaskuläre Hypertonie entsteht aufgrund einer erhöhten Bildung von Angiotensin II infolge erhöhter Reninsekretion durch die Niere. Angiotensin II erhöht den Blutdruck auf verschiedenen Wegen. Dazu gehört die Aldosteron-vermittelte Retention von Natrium und Wasser und die Erhöhung des Sympathikotonus. Außerdem führt Angiotensin II zur Induktion und Aktivierung von NADPH-Oxidasen in allen Schichten der Gefäßwand. Dieser Prozess führt dann zur Elimination endothelialer NOs mit nachfolgend gestörter endothelabhängiger Relaxation sowie „Remodeling“ und Hypertrophie der Gefäße. Trotz gleicher Angiotensin II-Spiegel in Wildtyp- und Nox2-Knockout-Mäusen war die renale Hypertonie in den Nox2-Knockout-Mäusen signifikant geringer ausgeprägt, was die Wichtigkeit des durch Nox2 produzierten Superoxids für die Kontrolle des Blutdrucks veranschaulicht. Dennoch waren die gemessenen Unterschiede klein und betonten dadurch die Rolle der o. g. anderen hypertonie-induzierenden Mechanismen der renalen Hypertonie.

Der Mangel an Nox2 verhinderte auch die durch den Clip induzierte endotheliale Dysfunktion, was eine unerwartete Beobachtung war. Warum ist Nox2 so wichtig, wenn man doch annimmt, dass alle Gefäßzellen fähig sind, als Reaktion auf Angiotensin II mittels verschiedener NADPH-Oxidase-Isoformen Superoxid zu produzieren? Eine mögliche

Erklärung lässt sich aus der Ex-vivo-Inkubation mit Angiotensin II ableiten. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Stimulation mit höheren Angiotensin II-Spiegeln als sie in vivo bei der renalen Hypertonie erreicht werden auch in Gefäßen von Nox2-Knockout-Mäusen eine endotheliale Dysfunktion auslösen. Dies weist darauf hin, dass sich die verschiedenen Gefäßschichten oder NADPH-Oxidase-Isoformen in ihrer Sensitivität gegenüber Angiotensin II unterscheiden. Tatsächlich produziert das Endothel sogar in Gegenwart geringer Angiotensin II-Konzentrationen über einen AT₁-Rezeptor-vermittelten Effekt Superoxid, während höhere Angiotensin II-Konzentrationen über den AT₂-Rezeptor die Radikalbildung verhindern^{58;113}; der letztere Mechanismus wurde allerdings nicht in VSMC beobachtet, da sie keinen AT₂-Rezeptor exprimieren¹¹⁰.

Andererseits könnte auch die enge räumliche Nachbarschaft der endothelialen NO-Bildung mit der endothelialen Nox2-vermittelten Elimination von NO eine größere Relevanz für die NO-Bioverfügbarkeit haben als die Elimination von NO in der glatten Gefäßmuskelschicht. Ein wichtiger dritter Punkt ist die mögliche Entkopplung der endothelialen NO-Synthase in unserem Modell. Das Clipping der Nierenarterie scheint in der Verminderung der Relaxation auf exogen-appliziertes NO weniger effektiv zu sein als bei der Verminderung der Relaxation auf Acetylcholin, dem Stimulus für die endotheliale NO-Synthase. Dies könnte darauf hinweisen, dass das in der renalen Hypertonie durch die Nox2-enthaltende endotheliale NADPH-Oxidase gebildete Superoxid nicht nur das NO eliminiert, sondern auch die NO-Synthase-abhängige NO-Bildung beeinträchtigt, ein Mechanismus, der kürzlich als NO-Synthase-Entkopplung beschrieben wurde¹¹⁴⁻¹¹⁶. Tatsächlich scheint die Aktivierung der NADPH-Oxidase eine Voraussetzung für eine solche Entkopplung zu sein¹¹⁶.

In der vorliegenden Studie waren zwar die Angiotensinspiegel erhöht, aber die Expression der NADPH-Oxidase blieb unverändert. Das weist darauf hin, dass der endothelialen Dysfunktion im 2-Nieren-1-Clip-Modell eher eine Aktivierung der NADPH-Oxidase zugrunde liegt, als eine Induktion. Tatsächlich führten drei voneinander vollkommen unabhängige Inhibitoren, die zuvor in Zellkultur die Aktivierung der NADPH-Oxidase nachweislich hemmen, zur Normalisierung der endothelabhängigen Relaxation in geklippten Wildtyp-Mäusen, ohne die Reaktionen in Nox2-Knockout-Mäusen zu verändern⁵³. In diesem Sinne ist darauf hingewiesen worden, dass die Aktivität von Proteinkinase C, die an der Aktivierung der NADPH-Oxidase beteiligt ist, in der renalen Hypertonie konstitutiv erhöht ist¹¹⁷. Darüberhinaus ist bekannt, dass erhöhte Wandspannung, Angiotensin II und Hypertonie an sich die Aktivität der Proteinkinase C erhöhen¹¹⁸⁻¹²¹.

Ohne Zweifel war der Einfluss der renalen Hypertonie auf die endothelabhängige Relaxation in der gegenwärtigen Studie gering im Vergleich zu früheren Beobachtungen bei Menschen¹²² und Ratten¹¹⁷. Es ist jedoch bekannt, dass Mäuse für endotheliale Dysfunktion weniger anfällig sind, als zum Beispiel Ratten. Die Mäuseaorta enthält große Mengen extrazellulärer SOD, was den Einfluss von oxidativem Stress auf die NO-Bioverfügbarkeit vermindert¹²³, eine Tatsache, die auch den relativ geringen Anstieg der vaskulären Superoxidproduktion nach dem Clipping der Wildtyp-Mäuse erklären könnte. Darüberhinaus kann sogar eine dysfunktionale NO-Synthase bei Mäusen über die Bildung von vasodilatierendem H₂O₂ eine gewisse Störung der endothelabhängigen Relaxation hervorrufen¹¹⁵. Letztendlich hat das kleine Kaliber der Mauseaorta ein günstigeres Intima-Media-Verhältnis zur Folge und damit eine relativ höhere Bioverfügbarkeit für NO bei dessen Effektor-Enzym, der löslichen Guanylatcyclyase in den VSMC. Sogar beim Menschen ist die endotheliale Dysfunktion in größeren Gefäßen am offensichtlichsten.

Schlussendlich zeigt diese Untersuchung, dass die endotheliale Dysfunktion bei der renalen Hypertonie in Mäusen durch die Aktivierung der endothelialen NADPH-Oxidase bedingt wird.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung der Expression der NADPH-Oxidase-Isoformen in verschiedenen Organen der Maus sowie Zellkulturen aus HUVEC und VSMC von Maus, Ratte und Mensch mittels real-time RT-PCR. Darüberhinaus wurde der Einfluss von für die Pathophysiologie der Atherosklerose bedeutsamen Wachstumsfaktoren auf die Expression verschiedener NADPH-Oxidase-Untereinheiten in Gefäßmuskelzellen sowie die Bedeutung von Nox2 für die endotheliale Dysfunktion in einem Maus-Modell für renovaskuläre Hypertonie untersucht.

Nox1 und Nox4 konnten bemerkenswerterweise in fast allen untersuchten Proben nachgewiesen werden, wobei sich große quantitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Organen fanden. Für Nox1 und Nox4 betragen diese Unterschiede bis zu drei Zehnerpotenzen, für Nox2-mRNA bis zu zwei Zehnerpotenzen. Sortiert man die verschiedenen Organe nach der Stärke ihrer Nox-Expression gilt für Nox1 Colon > Milz > Niere > Aorta, für Nox2 Milz > Niere = Aorta > Colon und für Nox4 Niere > Milz > Colon > Aorta.

Im der Aorta werden gleichzeitig drei verschiedene NADPH-Oxidase-Isoformen exprimiert: Nox1, Nox2 und Nox4. Das individuelle Expressionsmuster von Nox1, Nox2 und Nox4 in der Aorta variierte zwischen einzelnen Tieren zum Teil beträchtlich. Insbesondere Endothelzellen exprimieren alle drei Nox-Isoformen, während VSMC der Aorta nur Nox1 und Nox4 und Fibroblasten der aortalen Adventitia v. a. Nox2 exprimieren.

Die in nicht-phagozytären Zellen exprimierten NADPH-Oxidasen unterscheiden sich von der Phagozyten-NADPH-Oxidase nicht nur in der maximalen ROS-Produktionskapazität und der intrazellulären Lokalisation, sondern auch in der Zusammensetzung des Enzymkomplexes aus den verschiedenen Untereinheiten. Sortiert man die verschiedenen Organe wiederum nach der Stärke der Expression der verschiedenen Untereinheiten ergibt sich für p67phox, Nox1 und Nox1 die gleiche Reihenfolge, Colon > Aorta > Niere. Die quantitativen Expressionsunterschiede betragen dabei für p67phox nur eine Zehnerpotenz, für Nox1 drei Zehnerpotenzen und für Nox1 zwei Zehnerpotenzen.

Die quantitative Untersuchung der Expression der Aktivatoruntereinheiten der NADPH-Oxidase in vaskulären Zellen ergab eine stärkere Nox1-Expression in HUVEC als in VSMC während letztere mehr p67phox exprimieren als HUVEC. Überraschenderweise exprimierten menschliche VSMC der Aorta um ein Vielfaches mehr p67phox als murine VSMC der Aorta,

während die quantitative Noxa1- und Nox1-Expression in menschlichen und murinen VSMC keine derart großen Unterschiede zeigten.

Wahrscheinlich sind diese Expressionsunterschiede der NADPH-Oxidase-Untereinheiten Teil einer bedarfs- und situationsgerechten, zelltypspezifischen Regulation der Sauerstoffradikalproduktion durch die NADPH-Oxidase. So zeigt sich zum Beispiel in VSMC unter Stimulation mit PDGF ein Anstieg der p67phox-Expression und eine Reduktion der Noxa1-Expression, während Angiotensin II keinen signifikanten Effekt auf die Noxa1-Expression hat. PDGF, ein proliferationsfördernder Faktor für VSMC, unterstützt auf diese Weise eine durch Proteinkinase C-regulierte Aktivität der NADPH-Oxidase. Angiotensin II, das v. a. die Hypertrophie glatter Gefäßmuskelzellen induziert, fördert dagegen die Noxa1-Expression, was eher für eine konstitutive NADPH-Oxidase-Aktivität förderlich ist. Anhand der hier gezeigten quantitativen Expressionsuntersuchungen lassen sich leider allenfalls Spekulationen über die möglichen Regulationsmechanismen der ROS-Produktion in VSMC anstrengen. Dennoch haben sich mit Hilfe der in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse, ähnlich einem Puzzle, dem großen Bild der NADPH-Oxidasen und ihrer Regulation ein paar kleine Teilchen hinzugefügt.

An einem 2-Nieren-1-Clip-Modell für renovaskuläre Hypertonie wurde der Einfluss der NADPH-Oxidase-Aktivität und Expression auf die endotheliale Dysfunktion untersucht. In Aortenringen von geclippten Wildtyp-Mäusen kommt es zu einer erhöhten Elimination exogen zugeführten NOs sowie gestörter endothelvermittelter Relaxation der Gefäßmuskulatur auf Acetylcholin, was auch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet werden kann. Die durch den Clip verursachte endotheliale Dysfunktion wird durch Entfernen des Endothels aus den untersuchten Gefäßabschnitten oder Elimination des Nox2-Gens aus dem Genom der Mäuse verhindert. Damit zeigt diese Untersuchung, dass die endotheliale Dysfunktion bei der renalen Hypertonie in Mäusen durch die Aktivierung der endothelialen NADPH-Oxidase verursacht wird.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit demonstrieren daher ein mögliches therapeutisches Potential von Isoform-spezifischen-NADPH-Oxidase-Hemmstoffen als wirksame Medikamente in der Behandlung vaskulärer Dysfunktionen, wie sie z. B. bei der renovaskulären Hypertonie vorkommen. Unabdingbare Voraussetzung dafür sind jedoch detailliertere Kenntnisse der komplexen Mechanismen der NADPH-Oxidase-Regulation im Gefäßsystem.

7 Summary

Gene expression of several NADPH-oxidase isoforms was analyzed in different organ systems of the mouse as well as cell cultures of VSMC and endothelial cells of murine, human or rat origin by real-time RT-PCR. Furthermore, the effect of atherogenic growth factors such as angiotensin II on the expression levels of several NADPH-oxidase subunits was characterized. The importance of Nox2 regarding endothelial dysfunction was additionally investigated in a mouse model for renovascular hypertension.

Remarkably, Nox1 and Nox4 were found in almost all samples tested. There were big quantitative differences, however, in the rate of expression in distinct organs. These differences measured up to three decimal powers in case of Nox1 and Nox4 and two decimal powers in case of Nox2-mRNA. Sorting the examined organs according to their rate of expression results in the following descending orders: In case of Nox1 applies colon > spleen > kidney > aorta, in case of Nox2 applies spleen > kidney = aorta > colon, and in case of Nox4 applies kidney > spleen > colon > aorta.

In the aorta, there is coinstantaneous expression of Nox1, Nox2 and Nox4, partly with considerable variation in the isoforms' expression rate between individuals. In particular, endothelial cells express all three Nox-isoforms, whereas VSMC merely express Nox1 and Nox4 and adventitial fibroblast predominantly express Nox2.

NADPH oxidase forms of non-phagozytic cells differ from the phagozyte type NADPH oxidase not only in their maximum ROS production capacity and intracellular localization but also in the subunit composition of their enzyme complex. Sorting the different organs anew according to their rate of subunit expression, the same descending order applies for p67phox, Noxa1 and Noxo1: colon > aorta > kidney. The quantitative expression rate differences between organs measure in case of p67phox one decimal power, of Noxo1 two decimal powers and of Noxa1 three decimal powers.

The quantitative expression analysis of the NADPH oxidase activator subunits in vascular cells yielded a predominant Noxa1 expression in HUVEC compared to p67phox, and oppositely, a stronger expression of p67phox than Noxa1 in VSMC. Surprisingly, human aorta VSMC express p67phox to a much greater extend than murine aorta VSMC. By contrast, there is no big difference concerning the quantitative expression rate of Noxa1 and Noxo1 between human and murine VSMC.

These differences in expression of NADPH oxidase subunits are probably due to cell type specific regulation adapting the amount of oxygen radical generation to situational and

environmental conditions. In VSMC for example, there is a rise in p67phox expression and decrease of Nox1 expression under stimulation by PDGF, while angiotensin II has no significant influence on Nox1 expression. In this way, the proliferation enhancing factor PDGF supports protein kinase C dependent activity of the NADPH oxidase in VSMC. On the contrary, angiotensin II which, as a hypertrophy inducing factor for VSMC, enhances Nox1 expression and thereby rather supports constitutive activity of NADPH oxidase. By means of the quantitative analysis of differences in NADPH oxidase expression demonstrated here, one can unfortunately at the most speculate about possible regulatory mechanisms of ROS production in VSMC. By means of the results collected in this work, however, a couple of pieces have been added to the puzzle of knowledge about NADPH oxidases and their manner of regulation.

The influence of NADPH oxidase gene expression and activity on renovascular hypertension was investigated in a 2-kidney-one-clip-model. Clipping one renal artery of wild type mice leads to increased elimination of exogenous administered NO as well as impaired endothelial-dependant relaxation of the vascular musculature to acetylcholine in aortic rings, also referred to as endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction induced by the clip application can be prevented by removal of the endothelial layer of the aortic rings or alternatively by knocking out the Nox2 gene of the mouse genome. Hence, this study shows that endothelial dysfunction in renovascular hypertension in mice is caused by activation of the endothelial NADPH oxidase.

The findings of this work point out the potential therapeutic capability of isoform specific NADPH oxidase inhibitors as effective drugs in the treatment of vascular dysfunctions as for example in renovascular hypertension. Yet, more detailed knowledge of the complicated mechanisms of the NADPH oxidase regulation in the vascular system is an indispensable prerequisite for this objective in the future.

8 Literaturverzeichnis

1. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc.Res.* 1999;43(3):562-571.
2. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494-501.
3. Zou MH, Shi C, Cohen RA. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes* 2002;51(1):198-203.
4. Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1996;271(4 Pt 2):H1626-H1634.
5. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999;401(6748):79-82.
6. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 2004;279(44):46065-46072.
7. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaux N, Krause KH. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001;276(40):37594-37601.
8. Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278(22):20006-20012.
9. Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* 2001;276(2):1417-1423.
10. Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, Puttagunta L, Waite R, Nelson DP, Dinauer MC, Weir EK. O2 sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96(14):7944-7949.
11. Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000;97(14):8010-8014.
12. Ellmark SH, Dusting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc.Res.* 2005;65(2):495-504.
13. Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2002;22(1):21-27.
14. Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res.* 2000;87(1):26-32.
15. Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 2003;278(27):25234-25246.
16. Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, Fukumoto M. NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 2000;254(1-2):237-243.

17. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001;269(1-2):131-140.
18. Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.* 2002;90(11):1205-1213.
19. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* 2001;88(9):888-894.
20. Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 2005;386(Pt 3):401-416.
21. Fukui T, Lassegue B, Kai H, Alexander RW, Griendling KK. Cytochrome b-558 alpha-subunit cloning and expression in rat aortic smooth muscle cells. *Biochim.Biophys Acta* 1995;1231(3):215-219.
22. Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarium B, Arnold RS, Whorton AR, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Krenitsky K, Ardie KG, Lambeth JD, Hoidal JR. NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285(2):C353-C369.
23. Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 2003;278(6):3510-3513.
24. Radeke HH, Cross AR, Hancock JT, Jones OT, Nakamura M, Kaefer V, Resch K. Functional expression of NADPH oxidase components (alpha- and beta-subunits of cytochrome b558 and 45-kDa flavoprotein) by intrinsic human glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 1991;266(31):21025-21029.
25. Brandes RP, Miller FJ, Beer S, Haendeler J, Hoffmann J, Ha T, Holland SM, Goriach A, Busse R. The vascular NADPH oxidase subunit p47phox is involved in redox-mediated gene expression. *Free Radic.Biol Med.* 2002;32(11):1116-1122.
26. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol.Sci* 2003;24(9):471-478.
27. Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(12):1429-1435.
28. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004;109(2):227-233.
29. Guzik TJ, Sadowski J, Kapelak B, Jopek A, Rudzinski P, Pillai R, Korbut R, Channon KM. Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2004;24(9):1614-1620.
30. Cheng G, Lambeth JD. NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J Biol Chem* 2004;279(6):4737-4742.
31. Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH, Cox JA. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 2004;279(18):18583-18591.
32. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1997;94(26):14483-14488.
33. Ago T, Kitazono T, Kuroda J, Kumai Y, Kamouchi M, Ooboshi H, Wakisaka M, Kawahara T, Rokutan K, Ibayashi S, Iida M. NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke* 2005;36(5):1040-1046.

34. Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc.Res.* 2006;71(2):226-235.
35. Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res.* 2002;91(12):1160-1167.
36. Johnson JL, Park JW, Benna JE, Faust LP, Inanami O, Babior BM. Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem* 1998;273(52):35147-35152.
37. Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin JH, Tschlis PN, Babior BM. Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2003;100(9):5130-5135.
38. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr.Opin.Immunol.* 2004;16(1):42-47.
39. Miyano K, Ueno N, Takeya R, Sumimoto H. Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *J Biol Chem* 2006;281(31):21857-21868.
40. Cheng G, Diebold BA, Hughes Y, Lambeth JD. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* 2006;281(26):17718-17726.
41. Takeya R, Sumimoto H. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol Cells* 2003;16(3):271-277.
42. Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J* 2002;21(23):6312-6320.
43. Kreuzer J, Viedt C, Brandes RP, Seeger F, Rosenkranz AS, Sauer H, Babich A, Nurnberg B, Kather H, Krieger-Brauer HI. Platelet-derived growth factor activates production of reactive oxygen species by NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells through Gi1,2. *FASEB J* 2003;17(1):38-40.
44. Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C, Runge MS. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999;274(28):19814-19822.
45. Brandes RP, Viedt C, Nguyen K, Beer S, Kreuzer J, Busse R, Gorlach A. Thrombin-induced MCP-1 expression involves activation of the p22phox-containing NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thromb.Haemost.* 2001;85(6):1104-1110.
46. Kong G, Lee S, Kim KS. Inhibition of rac1 reduces PDGF-induced reactive oxygen species and proliferation in vascular smooth muscle cells. *J Korean Med.Sci* 2001;16(6):712-718.
47. Viedt C, Fei J, Krieger-Brauer HI, Brandes RP, Teupser D, Kamimura M, Katus HA, Kreuzer J. Role of p22phox in angiotensin II and platelet-derived growth factor AA induced activator protein 1 activation in vascular smooth muscle cells. *J Mol Med.* 2004;82(1):31-38.
48. Katsuyama M, Fan C, Yabe-Nishimura C. NADPH oxidase is involved in prostaglandin F2alpha-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF2alpha. *J Biol Chem* 2002;277(16):13438-13442.
49. Hu Q, Yu ZX, Ferrans VJ, Takeda K, Irani K, Ziegelstein RC. Critical role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in generating Ca2+ oscillations in human aortic endothelial cells stimulated by histamine. *J Biol Chem* 2002;277(36):32546-32551.
50. Li JM, Fan LM, Christie MR, Shah AM. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol Cell Biol* 2005;25(6):2320-2330.

51. Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB. PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res.* 2002;90(9):1012-1019.
52. Lee SL, Wang WW, Finlay GA, Fanburg BL. Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol* 1999;277(2 Pt 1):L282-L291.
53. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.* 2002;91(5):406-413.
54. Bleeke T, Zhang H, Madamanchi N, Patterson C, Faber JE. Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. *Circ Res.* 2004;94(1):37-45.
55. Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem* 2004;279(33):34250-34255.
56. Guijarro C, Egado J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int.* 2001;59(2):415-424.
57. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q, Taylor WR, Harrison DG, de LH, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res.* 1997;80(1):45-51.
58. Sohn HY, Raff U, Hoffmann A, Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U. Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br.J Pharmacol.* 2000;131(4):667-672.
59. Zhang H, Schmeisser A, Garlichs CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, Daniel WG. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH/NADPH-oxidases. *Cardiovasc.Res.* 1999;44(1):215-222.
60. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol.Rev.* 2000;52(4):639-672.
61. Freeman EJ, Ruehr ML, Dorman RV. ANG II-induced translocation of cytosolic PLA2 to the nucleus in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;274(1 Pt 1):C282-C288.
62. Silfani TN, Freeman EJ. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates angiotensin II-induced cytosolic phospholipase A2 activity and growth in vascular smooth muscle cells. *Arch.Biochem Biophys* 2002;402(1):84-93.
63. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. *New concepts. Hypertension* 1997;29(1 Pt 2):366-373.
64. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Minieri CA, Akers M, Lassegue B, Griendling KK. Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxid.Redox.Signal.* 1999;1(2):167-179.
65. Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer B. 5-Lipoxygenase is involved in the angiotensin II-induced NAD(P)H-oxidase activation. *Biochem Biophys Res.Commun.* 2003;308(3):668-672.
66. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998;32(3):488-495.
67. Li WG, Miller FJ, Jr., Zhang HJ, Spitz DR, Oberley LW, Weintraub NL. H(2)O(2)-induced O(2) production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem* 2001;276(31):29251-29256.
68. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2000;20(10):2175-2183.

69. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, Alexander RW. Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2001;21(4):489-495.
70. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2003;23(6):981-987.
71. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2000;20(4):940-948.
72. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res.* 1999;85(8):753-766.
73. Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, Rhee SG. Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2000;275(14):10527-10531.
74. Saito S, Frank GD, Mifune M, Ohba M, Utsunomiya H, Motley ED, Inagami T, Eguchi S. Ligand-independent trans-activation of the platelet-derived growth factor receptor by reactive oxygen species requires protein kinase C-delta and c-Src. *J Biol Chem* 2002;277(47):44695-44700.
75. Yeh LH, Park YJ, Hansalia RJ, Ahmed IS, Deshpande SS, Goldschmidt-Clermont PJ, Irani K, Alevriadou BR. Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS. *Am J Physiol* 1999;276(4 Pt 1):C838-C847.
76. Sorescu GP, Song H, Tressell SL, Hwang J, Dikalov S, Smith DA, Boyd NL, Platt MO, Lassegue B, Griendling KK, Jo H. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res.* 2004;95(8):773-779.
77. Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, Miura S, Satake S, Asai T, Kanda S, Hayashi T, Iguchi A. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 1998;18(7):1188-1196.
78. Stielow C, Catar RA, Muller G, Wingler K, Scheurer P, Schmidt HH, Morawietz H. Novel Nox inhibitor of oxLDL-induced reactive oxygen species formation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res.Commun.* 2006;344(1):200-205.
79. Chen JW, Chen YH, Lin SJ. Long-term exposure to oxidized low-density lipoprotein enhances tumor necrosis factor-alpha-stimulated endothelial adhesiveness of monocytes by activating superoxide generation and redox-sensitive pathways. *Free Radic.Biol Med.* 2006;40(5):817-826.
80. Vandesompele J, De PA, Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem* 2002;303(1):95-98.
81. Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem* 1998;265(2):368-374.
82. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22(1):130-138.
83. Liu W, Saint DA. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res.Commun.* 2002;294(2):347-353.
84. Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin.Chem* 2000;46(11):1738-1743.
85. Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for

- quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 2001;295(1):17-21.
86. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000;46(1-2):69-81.
 87. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245(2):154-160.
 88. Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension* 1997;29(4):1025-1030.
 89. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 2001;89(5):408-414.
 90. Brandes RP, Barton M, Philippens KM, Schweitzer G, Muggé A. Endothelial-derived superoxide anions in pig coronary arteries: evidence from lucigenin chemiluminescence and histochemical techniques. *J Physiol* 1997;500(Pt 2):331-342.
 91. Rao PV, Maddala R, John F, Zigler JS, Jr. Expression of nonphagocytic NADPH oxidase system in the ocular lens. *Mol Vis*. 2004;10:112-121.
 92. Mohazzab H, Kaminski PM, Agarwal R, Wolin MS. Potential role of a membrane-bound NADH oxidoreductase in nitric oxide release and arterial relaxation to nitroprusside. *Circ Res*. 1999;84(2):220-228.
 93. Meng QR, Gideon KM, Harbo SJ, Renne RA, Lee MK, Brys AM, Jones R. Gene expression profiling in lung tissues from mice exposed to cigarette smoke, lipopolysaccharide, or smoke plus lipopolysaccharide by inhalation. *Inhal Toxicol*. 2006;18(8):555-568.
 94. Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 2002;39(2):269-274.
 95. Teshima S, Kutsumi H, Kawahara T, Kishi K, Rokutan K. Regulation of growth and apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells by mitogenic oxidase 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279(6):G1169-G1176.
 96. Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Whorton AR, Hoidal JR. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(6):C1212-C1224.
 97. Kawahara T, Kuwano Y, Teshima-Kondo S, Takeya R, Sumimoto H, Kishi K, Tsunawaki S, Hirayama T, Rokutan K. Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 2004;172(5):3051-3058.
 98. Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S, Hewitt SM, Dana R, Malech HL, Leto TL. NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J Immunol*. 2003;171(1):299-306.
 99. Kawahara T, Kohjima M, Kuwano Y, Mino H, Teshima-Kondo S, Takeya R, Tsunawaki S, Wada A, Sumimoto H, Rokutan K. Helicobacter pylori lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer NOXO1 in guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288(2):C450-C457.
 100. Javaid K, Rahman A, Anwar KN, Frey RS, Minshall RD, Malik AB. Tumor necrosis factor- α induces early-onset endothelial adhesivity by protein kinase C ζ -dependent activation of intercellular adhesion molecule-1. *Circ Res*. 2003;92(10):1089-1097.

101. Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, Jopek A, Kapelak B, Przybylowski P, Wierzbicki K, Korbut R, Harrison DG, Channon KM. Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2006;26(2):333-339.
102. Miller AA, Drummond GR, Schmidt HH, Sobey CG. NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circ Res.* 2005;97(10):1055-1062.
103. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271(38):23317-23321.
104. Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK. Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension* 1998;32(2):331-337.
105. Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2004;24(4):677-683.
106. Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, Nakamura K, Takeya R, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Igarashi K, Shibata Y, Sueishi K, Sumimoto H. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* 2005;10(12):1139-1151.
107. Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2004;279(44):45935-45941.
108. Martyn KD, Frederick LM, von LK, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal.* 2006;18(1):69-82.
109. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin.Invest* 1996;97(8):1916-1923.
110. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74(6):1141-1148.
111. Berk BC, Elder E, Mitsuka M. Hypertrophy and hyperplasia cause differing effects on vascular smooth muscle cell Na⁺/H⁺ exchange and intracellular pH. *J Biol Chem* 1990;265(32):19632-19637.
112. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995;270(5234):296-299.
113. Ruettschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2002;22(11):1845-1851.
114. Cosentino F, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 1995;91(1):139-144.
115. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukui T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001;103(9):1282-1288.
116. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin.Invest* 2003;111(8):1201-1209.

117. Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, Macharzina R, Brasen JH, Meinertz T, Munzel T. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int.* 1999;55(1):252-260.
118. Bayer AL, Heidkamp MC, Patel N, Porter M, Engman S, Samarel AM. Alterations in protein kinase C isoenzyme expression and autophosphorylation during the progression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 2003;242(1-2):145-152.
119. Soloviev AI, Parshikov AV, Stefanov AV. Evidence for the involvement of protein kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats. *J Vasc.Res.* 1998;35(5):325-331.
120. Ruan X, Arendshorst WJ. Role of protein kinase C in angiotensin II-induced renal vasoconstriction in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* 1996;270(6 Pt 2):F945-F952.
121. Kanayama Y, Negoro N, Okamura M, Konishi Y, Nishimura M, Umetani N, Inoue T, Takeda T. Modulation of protein kinase C in aorta of spontaneously hypertensive rats with enalapril treatment. *Osaka City Med.J* 1994;40(2):83-97.
122. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N.Engl.J Med.* 2002;346(25):1954-1962.
123. Jung O, Marklund SL, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from eSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2003;93(7):622-629.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

"Quantifizierung der Expression der NADPH-Oxidasen mittels real-time RT-PCR"

in dem *Institut für Kardiovaskuläre Physiologie (Physiologie I)* unter Betreuung und Anleitung von *Prof. Dr. Ralf Brandes* mit Unterstützung durch *Dr. Oliver Jung* ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:
Circulation, Free Radical Biology and Medicine

Frankfurt, der

Judith Schreiber
Auestraße 7
63110 Rodgau
Tel.: 06106/266687
e-mail: judith-schreiber@web.de

Rodgau, 02.12.07

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 20.11.1979 in Frankfurt am Main
Nationalität: deutsch

Schulischer Werdegang:

1986 - 1990: Carl-Orff-Grundschule in Rodgau
1990 - 1996: Georg-Büchner-Schule, Gymnasialzweig, in Rodgau
1996 - 1997: L.C.Byrd-Highschool, Richmond, USA
1997 - 1997: Lord-Botetourte-Highschool, Roanoke, USA
1997 - 1999: Claus-von-Stauffenberg-Gymnasium, Rodgau
Abschluss: Abitur, Note 1,0

Studium:

Seit 1999: Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main
Sep. 2001: Physikum, Note: 1,3
Sep. 2002: 1. Staatsexamen, Note 2,0
Apr. 2005: 2. Staatsexamen, Note 2,3
Apr. 2005 – März 2006: Praktisches Jahr am Hospital zum Heiligen Geist, Frankfurt, Wahlfach: Dermatologie, Uniklinik Frankfurt
18. Mai 2006: 3. Staatsexamen, Note: 2

Promotion:

Jan. 2002 – Jul. 2007: Dissertation zum Thema
„*Quantifizierung der Expression der NADPH-Oxidasen mittels real-time RT-PCR*“
im Institut für kardiovaskuläre Physiologie

Veröffentlichungen: Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP.
„*gp91phox-Containing NADPH Oxidase Mediates Endothelial Dysfunction in Renovascular Hypertension*“
Circulation. 2004 April 13, 109 (14): 1795-801

Ambasta RK, Schreiber JG, Janiszewski M, Busse R, Brandes RP.
„*Nox1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase*“

in mice“

Free Radic Biol Med. 2006 Jul 15;41(2):193-201. Epub 2006 Jan 30.

Schroder K, Vecchione C, Jung O, Schreiber JG, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, Busse R, Brandes RP.

„*Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet.*“

Free Radic Biol Med. 2006 Nov 1;41(9):1353-60. Epub 2006 Apr 4.

berufliche Erfahrungen:

seit Okt. 2006

Assistenzärztin der Abteilung Nephrologie, Zentrum der Inneren Medizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt