

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. W. Jelkmann

Molekulare Mechanismen der sauerstoffabhängigen Genexpression

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Just Joachim Klaus Genius
aus Köln

Lübeck 2004

1. Berichterstatter : Herr Prof. Dr. med. J. Fandrey, Essen

2. Berichterstatter : Herr Prof. Dr. med. A. Peters

Tag der mündlichen Prüfung : 11. April 2005

Zum Druck genehmigt : Lübeck, den 11. April 2005-12-19

Gez. Prof. Dr. med. P. Dominiak
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Fragestellung	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Zellkulturen und Vitalitätstests	16
3.2 Radioimmunoassay für Erythropoietin (EPO-RIA).....	17
3.3 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies.....	18
3.3.1 Messung von H ₂ O ₂ durch HRP-katalysierte Luminol-Chemilumineszenz	18
3.3.2 Quantitativer Nachweis von O ₂ ⁻ durch Lucigenin-Chemilumineszenz.....	19
3.3.3 Cytochemischer Nachweis von ROS in situ	20
3.4 Bestimmung der antioxidativen Kapazität.....	21
3.5 Molekularbiologische Verfahren	22
3.5.1 RNA-Isolation mit saurem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	22
3.5.2 Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration	23
3.5.3 Reverse Transkription von mRNA in cDNA	23
3.5.4 Amplifikation von cDNA mittels Polymerase chain reaction (PCR)	23
3.5.5 Luciferase Reporter gen Assay	27
3.5.6 Transiente Transfektion von Hep3B-Zellen	28
3.6 Gelelektrophorese und Immunoblot (Western Blot).....	28
3.6.1 Proteinauftrennung durch Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.6.2 Elektrophoretischer Proteintransfer im semi-dry blot Verfahren	29
3.6.3 Immunologischer Proteinnachweis	29
3.7 Statistische Analysen	31
3.8 Enzymkinetische Analysen	31
4. Ergebnisse	33
4.1 Zusammenhang zwischen H ₂ O ₂ -Produktion und EPO- Expression.....	33
4.2 Reaktion der Zellen auf die Zugabe von H ₂ O ₂	34
4.3 Einfluss von NADPH und NADH auf die EPO-Synthese.....	38
4.4 Eigenschaften der nichtphagozytären NAD(P)H-Oxidase	39
4.4.1 Vergleich mit Phagozyten.....	39
4.4.2 Enzymkinetische Parameter. Vergleich von NADPH und NADH.....	41
4.4.3 Lokalisation der O ₂ ⁻ -Synthese	42
4.4.4 Morphologische Identifizierung von ROS-Quellen.....	43
4.5 Relativer Beitrag anderer Enzymsysteme zur ROS-Produktion	45
4.6 Abhängigkeit der NAD(P)H-Oxidase vom NADPH/NADP ⁺ -Verhältnis	45

4.7 Expression von Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase in Hep3B und HepG2	47
4.8 Effekte des NAD(P)H-Oxidaseinhibitors DPI.....	50
4.8.1 Hemmung der NAD(P)H-Oxidase durch DPI	50
4.8.2 Einfluss von DPI auf die O ₂ -abhängige Genexpression	53
4.9 Effekte von Stickstoffmonoxid (NO).....	56
4.9.1 Wirkung von NO auf die NAD(P)H-Oxidase.....	56
4.9.2 Einfluss von NO auf H ₂ O ₂ -Produktion und O ₂ -abhängige Genexpression	58
5. Diskussion.....	63
5.1 Das Konzept des „O ₂ -Sensors“	63
5.2 Die Doppelrolle reaktiver Sauerstoffspezies in der Zellbiologie.....	63
5.3 Modulation der EPO-Genexpression durch H ₂ O ₂	65
5.4 Die NAD(P)H-Oxidase als potentieller O ₂ -Sensor.....	66
5.5 Vergleich der phagozytären und nicht-phagozytären Isoform der Oxidase	67
5.6 Genetische Analogien zur phagozytären NAD(P)H-Oxidase.....	70
5.7 Untersuchungen zur O ₂ -abhängigen Genexpression mit DPI.....	71
5.8 Einfluss von NO auf NAD(P)H-Oxidase und O ₂ -abhängige Genexpression....	73
6. Zusammenfassung.....	76
8. Danksagung.....	85
9. Lebenslauf.....	86
10. Publikationen.....	87

1. Einleitung

Eine ausreichende Verfügbarkeit von Sauerstoff (O_2) sichert Funktion und Struktur aerober Organismen. Entscheidend ist die Versorgung der Atmungskette mit Reduktionsäquivalenten und O_2 , um die Produktion des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) aufrechtzuerhalten. Ebenso wichtig ist, dass dabei zu hohe, und damit möglicherweise toxische, O_2 -Konzentrationen vermieden werden. Um diese Balance zu gewährleisten, werden alle Veränderungen der O_2 -Versorgung von vielzelligen Organismen mit physiologischen Reaktionen auf verschiedenen Organisationsebenen beantwortet. Neben rasch verfügbaren reflektorischen Veränderungen von mechanischen Parametern der Atmung und der Hämodynamik verfügt der Organismus über die Möglichkeit der O_2 -Adaptation durch veränderte Genexpression [1]. Ein ideales Modell für die Untersuchung solcher Mechanismen ist die durch hypoxische Reize induzierbare Produktion des Hormons Erythropoietin (EPO) [2, 3]. EPO, ein aus 165 Aminosäuren bestehendes Sialoglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 30,4 kDa, ist der zentrale Faktor für die Erhaltung einer ausgeglichenen Erythrozytenbilanz durch Steuerung einer kontinuierlichen und bedarfsgerechten Erythropoese im Knochenmark. Unter Hypoxie, dem primären Stimulus für seine Expression, fördert EPO gemeinsam mit anderen Wachstumsfaktoren, wie stem cell factor (SCF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und Interleukin-3, im Knochenmark die Proliferation und Reifung erythrozytär determinierter Vorläufer-Zellen zu adulten Erythrozyten [4]. Dabei wirkt EPO als Antiapoptosefaktor. EPO wird im Wesentlichen in renalen interstitiellen Zellen, den peritubulären Fibroblasten, produziert. Die Produktionsrate ist strikt O_2 -abhängig und steigt unter anämischer oder hypobarer Hypoxie bis zum 1000-fachen der Normalwerte [5]. Noch weitgehend unverstanden ist die funktionelle Bedeutung der (quantitativ geringen) Expression von EPO in Organen wie der Leber, den Hoden [6], dem Zentralnervensystem [7] und der Milz [5], sowie die davon abweichende Expression während der Fetalzeit [8] oder in maligne transformiertem Gewebe [9, 10]. Neben endokrinen werden auch parakrine Wirkungen des EPO diskutiert, etwa im Zusammenhang mit dem Nachweis EPO-synthetisierender Makrophagen im Knochenmark [11].

Durch den EPO-vermittelten Anstieg der roten Blutzellmasse und die damit verbesserten Oxygenierungsbedingungen entfällt der Stimulus für die weitere

Produktion des Hormons. Damit verfügt das System über eine funktionelle Rückkopplung [3]. Analog hierzu ist die EPO-Synthese unter Hyperoxie und Polyzythämie supprimiert [12].

Eine unzureichende Bildung von EPO, etwa bei einer chronischen Niereninsuffizienz [13], chronisch-entzündlichen Zuständen [14], AIDS [15] oder malignen Prozessen [16] verursacht eine Erythropoietinmangel-Anämie und kann heute mit humanem rekombinanten Erythropoietin (rh-EPO) behandelt werden.

Für die Perzeption des O_2 -Partialdrucks (pO_2) in EPO-produzierenden Zellen wird die Existenz eines „ O_2 -Sensors“, der den Transkriptionsapparat und damit die Proteinsynthese kontrolliert, postuliert [17, 18]. Aufgrund der Komplexität der physiologischen Antwort auf Hypoxie im Gesamtorganismus war die erfolgreiche Etablierung eines Zellmodells zum Studium der Physiologie des O_2 -Sensors von entscheidender Bedeutung. Die humanen Hepatomzell-Linien HepG2 und Hep3B eignen sich wegen ihrer biologischen Ähnlichkeit mit EPO-synthetisierenden fetalen Leberzellen für solche Studien, da auch diese beiden Zell-Linien in Abhängigkeit vom pO_2 das EPO-Gen exprimieren und biologisch aktives EPO in den Zellkulturüberstand sezernieren [19, 20]. Selbstverständlich ist der Modellcharakter dieses *in vitro* Tumorzellsystems bei der Interpretation stets zu berücksichtigen. Weiterhin bieten diese *in vitro* Modelle die Möglichkeit direkter molekularbiologischer Manipulationen, etwa der Transfektion von Reportergenkonstrukten mit regulierenden DNA-Abschnitten, und damit der Analyse molekularer Mechanismen der O_2 -abhängigen Genexpression. Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche weitere O_2 -abhängige Proteine beschrieben wurden, darunter angiogenetische und vasoproliferative Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) [21] und Proteine des anaeroben Glucosekatabolismus [22] und damit prinzipiell jede einzelne Zelle über einen „ O_2 -Sensor“ zu verfügen scheint, bleibt EPO aufgrund seiner klar definierten physiologischen Funktion in der O_2 -Homöostase weiterhin das Paradigma der Gruppe O_2 -abhängig exprimierter Gene [23].

Analog zum Gesamtorganismus oder zum isoliert perfundierten Organ kann im Zellmodell eine hypoxische Stimulation der EPO-Synthese zuverlässig und mit einer ähnlichen Beziehung von pO_2 und EPO-Konzentration erreicht werden [24]. Welche intrazellulären Signalwege zwischen der Registrierung des perizellulären O_2 und der

Transkription des EPO-Gens beschriftet werden und welche Zellelemente am „O₂-Sensing“ beteiligt sind, blieb zunächst ungeklärt.

Zur Funktion des O₂-Sensors wurden zahlreiche Modelle entwickelt [1, 17, 18, 22, 25]. Aufgrund der relativen Einfachheit des FixL/FixJ-System mancher Prokaryonten, in dem das Hämoprotein FixL nach O₂-abhängiger Autophosphorylierung den Transkriptionsfaktor FixJ durch Transphosphorylierung aktiviert [26], erschien ein ähnliches Konzept zunächst auch für phylogenetisch jüngere Organismen naheliegend [27]. Experimentelle Hinweise auf eine solche unmittelbare Interaktion zwischen dem Sensor und einem Transkriptionsfaktor konnten für eukaryontische Organismen bisher allerdings nicht vorgelegt werden.

Ein anderes Konzept geht von einem hypothetischen membranständigen Sensor aus, der in Gegenwart von O₂ als spezifischem Liganden intrazelluläre Signalwege aktiviert und damit die Transkriptionsrate O₂-abhängiger Gene kontrolliert. Dieses Modell impliziert die Beteiligung eines beweglichen intrazellulären Signals, das als „second messenger“ zwischen dem O₂-Sensor und dem Zellkern als Ort der Transkription vermittelt.

Gestützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen zur O₂-abhängigen EPO-Bildung in HepG2-Zellen. Nach Inkubation von Zellkulturen unter definierten Oxygenierungsbedingungen erwies sich die bei hohem pO₂ vermehrt produzierte reaktive Sauerstoffverbindung Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als potenter Suppressor der EPO-Synthese [28-30]. Umgekehrt führt jeder Eingriff, der die zelluläre H₂O₂-Konzentration reduziert, z.B. dessen Abbau durch enzymatische oder nichtenzymatische Antioxidantien, zu einer Induktion der EPO-Synthese, deren Ausmaß der unter Hypoxie erreichten Induktion nahe kommt [31]. H₂O₂ entsteht in der Regel aus Superoxid (O₂⁻), einem instabilen Intermediärprodukt, das bei der univalenten Elektronenreduktion von O₂ auftritt [32]. Eine solche Reduktion ist charakteristisch für die Reaktion verschiedener Oxidasen, z.B. NAD(P)H-Oxidase, Lipoxygenase, Cyclooxygenase oder Xanthinoxidase [32].

Auch der Elektronenfluss durch die Atmungskette trägt zum kontinuierlichen Anfall solcher reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei [33, 34], wobei Elektronenkurzschlüsse („shunts“) während der Redoxreaktion an Komplex II und III die quantitativ bedeutendste Rolle spielen sollen. ROS treten auch bei der spontanen Autoxidation von Indolaminen, Katecholaminen, Thiolen und Übergangsmetallen ,bei photochemischen Reaktionen oder durch Einwirkung ionisierender Strahlung auf. Das

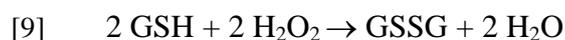
bei diesen Reaktionen entstehende $O_2^{\cdot-}$ unterliegt einer spontanen oder enzymkatalysierten Dismutation durch cytosolische Kupfer-, Zink- oder mitochondriale manganhaltige Metalloproteine, die Superoxiddismutasen (SOD, EC 1.15.1.1). Dabei entsteht H_2O_2 (*Reaktionsschema 1*).



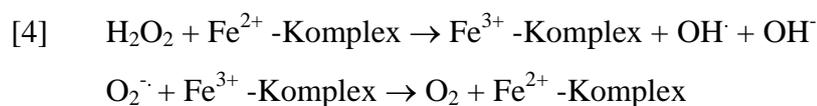
Auch unter biochemischen Aspekten erscheint H_2O_2 als zellulärer Botenstoff geeignet: Die große Lipophilie dieses elektrisch neutralen Moleküls ermöglicht eine ungehinderte Passage durch Membranen. Darüber hinaus weist H_2O_2 gegenüber anderen ROS mit ungepaarten Elektronen eine relativ hohe Lebensdauer und eine geringe Tendenz auf, mit Makromolekülen zu reagieren. Damit kann es auf dem Wege der Diffusion auch zwischen räumlich getrennten subzellulären Strukturen, wie einem membranständigen Rezeptor, und membranfernen intrazellulären Strukturen, wie dem Transkriptionsapparat, vermitteln, bevor es größtenteils durch ein peroxisomales Enzym, die Katalase (EC 1.11.1.6) abgebaut wird (*Reaktionsschema 2*):



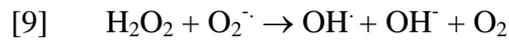
Die antioxidative Aktivität der Katalase wird durch die Glutathion (GSH)-Peroxidase (EC 1.11.1.9) unterstützt (*Reaktionsschema 3*):



Durch eine weitere, durch Übergangsmetallionen katalysierte Reduktion, die sogenannte Fenton-Reaktion, kann H_2O_2 alternativ zum hochaggressiven Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) reduziert werden (*Reaktionsschema 4*):

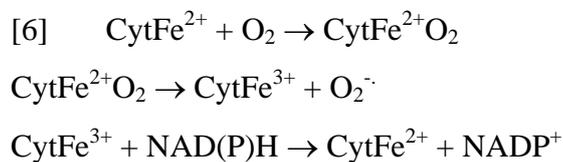


Alternativ kann OH^{\cdot} bei der Haber-Weiss-Reaktion entstehen (*Reaktionsschema 5*):



Alle zuvor aufgeführten H_2O_2 -Quellen kämen bei dem hier zugrunde gelegten Modell als O_2 -Sensoren prinzipiell in Frage, wobei allerdings lediglich die NAD(P)H-Oxidase (Nicotinamid-adenin-dinucleotid[phosphat]: O_2 -Oxireductase; EC 1.6.99.6) und die mitochondriale Atmungskette in Relation zur gesamten ROS-Produktion einen quantitativ bedeutsamen Beitrag leisten.

Aus der Beobachtung, dass Substituenten des Hämeisens, wie Kobaltionen (Co^{2+}) und Nickel (Ni^{2+}) [35], sowie ein Eisenchelator, wie Desferrioxamin [35, 36], die Synthese hypoxieinduzierbarer Gene stimulieren, und Inhibitoren der Hämsynthese die Fähigkeit der Zelle auf Hypoxie zu reagieren beeinträchtigen, wurde die Beteiligung einer Hämgruppe am hypothetischen O_2 -Sensor abgeleitet [37]. Die Wirkung dieser Substanzen wird durch die Substitution bzw. Chelierung eines zentralen Eisenatoms der Hämgruppe mit konsekutiver Änderung des Redoxstatus erklärt. Lichtabsorptionsspektrophotometrisch konnte in Typ I Zellen des Glomus caroticum und in HepG2-Zellen durch die Analyse von Differenzspektren ein nichtmitochondriales Cytochrom b_{558} mit relativ niedriger O_2 -Affinität identifiziert werden, das seine Absorptionseigenschaften mit dem Oxygenierungsgrad der Zellen ändert [38, 39]. Ein Cytochrom mit ähnlichen spektralen Eigenschaften ist auch in der NADPH-Oxidase der Phagocyten (polymorphkernige Granulozyten, Makrophagen und eosinophile Granulozyten) vorhanden [40] und könnte nach folgendem Muster molekularen Sauerstoff zu O_2^- reduzieren (*Reaktionsschema 6*):



Die NADPH-Oxidase (Abb. 1.1) besteht in ihrer vollständig zusammengesetzten, d.h. biologisch aktiven, Form aus den membrangebundenen $\text{p}22^{\text{phox}}$ und $\text{gp}91^{\text{phox}}$ -Untereinheiten, die gemeinsam das Flavocytochrom b_{558} bilden, und den assoziierten zytoplasmatischen Untereinheiten $\text{p}47^{\text{phox}}$, $\text{p}67^{\text{phox}}$ und $\text{p}40^{\text{phox}}$, die noch durch die GTPase Proteine $\text{rac}1$ und $\text{rac}2$ ergänzt werden. Die beteiligten Untereinheiten

assoziiieren in einem äquimolaren Verhältnis [41]. Die vollständig zusammengesetzte NAD(P)H-Oxidase führt bei Phagozyten die Zerstörung pathogener Stimuli durch einen "respiratory burst" herbei [40], bei dem lokal erhebliche Konzentrationen von H_2O_2 und hochreaktiven Folgeprodukten entstehen. Mit der Aktivierung wird die Untereinheit $\text{p}47^{\text{phox}}$ an drei Serin-Resten (Ser_{303} , Ser_{304} und Ser_{328}) durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert und damit eine Membrantranslokation der zytosolischen Untereinheiten $\text{p}67^{\text{phox}}$, $\text{p}40^{\text{phox}}$ und $\text{p}47^{\text{phox}}$ induziert [42, 43]. $\text{P}47^{\text{phox}}$ unterliegt dabei einer Konformationsänderung. Ebenfalls transloziert wird rac , ein GTP-bindendes Protein, mit offenbar komplexstabilisierender Funktion [44-46]. Ein zweites G-Protein (Rap1A) soll an der Deaktivierung der NAD(P)H-Oxidase beteiligt sein [47]. Noch weitgehend unklar ist die Funktion des für die Aktivierung des Multienzyms nicht essentiellen $\text{p}40^{\text{phox}}$. Die Untereinheit $\text{p}67^{\text{phox}}$ vermittelt den Elektronentransfer von NAD(P)H auf oxidiertes Flavinadeninindinukleotid (FAD) [48]. Eine Aktivierungsdomäne in $\text{p}47^{\text{phox}}$ ist in der Lage, den Elektronenfluss im Cytochrom b_{558} zu aktivieren [49]. Das hämbindende Protein $\text{gp}91^{\text{phox}}$ überträgt schliesslich die Elektronen vom NAD(P)H auf O_2 , wobei $\text{p}22^{\text{phox}}$ nach neueren Befunden ähnlich wie $\text{p}67^{\text{phox}}$ regulatorisch wirkt [50].

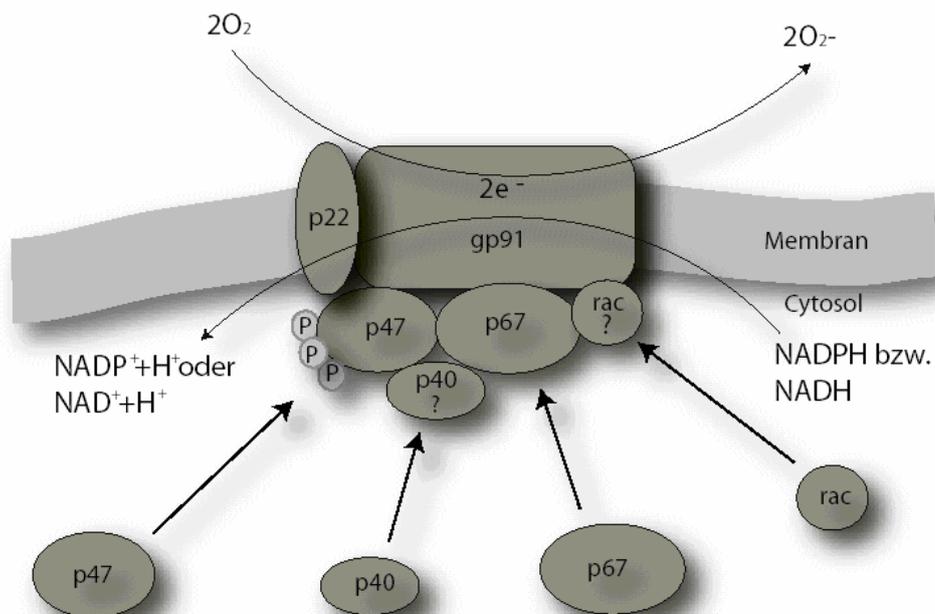


Abb. 1.1 Modell der phagozytären NADPH-Oxidase

Eine funktionell spezialisierte Isoform der NADPH-Oxidase könnte O₂-kontrolliert ROS generieren und damit als O₂-Sensor fungieren [29, 38, 51, 52]. Die Umsatzrate der NADPH-Oxidase und damit die Konzentration regulatorischer ROS wäre dabei eine Funktion des jeweiligen pO₂. Die Hypothese einer Oxidase als O₂-Sensor wird durch den Nachweis von Teilkomponenten dieser NADPH-Oxidase in mehreren O₂-responsiven Zelltypen, namentlich Typ I Zellen des Glomus caroticum [53], pulmonalen vaskulären Myocyten [54] und pulmonalen neuroepithelialen Körperchen [55], gestützt.

Einfluss auf die Transkription nehmen ROS vermutlich durch die Degradation der α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 (HIF-1), eines durch eine basische Helix-Loop-Helix Domäne gekennzeichneten Proteinheterodimers aus der Familie der PAS (Per/ARNT/Sim)-Proteine [56, 57]. Dieser Transkriptionsfaktorkomplex kontrolliert die hypoxische Induktion von EPO und von zahlreichen weiteren O₂-abhängig exprimierten Genen durch Bindung an entsprechende regulatorische DNA-Abschnitte in den Enhancer- oder Promoterregionen des EPO-Gens [1, 58]. Nach der Translokation dimerisiert HIF-1 α mit dem konstitutiv exprimierten HIF-1 β (identisch mit dem aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ARNT) zum aktiven HIF-1-Komplex und bindet innerhalb des ca. 120 Basenpaare (bp) hinter der Polyadenylierungsregion des EPO-Gens befindlichen Enhancers an das „hypoxieresponsive Element“ (HRE). Nach Interaktion mit dem vor dem EPO-Gen lokalisierten Promoter wird die Transkription eingeleitet [59]. HREs konnten inzwischen auch in den für VEGF, die glykolytischen Enzyme Aldolase A, Enolase 1, Laktatdehydrogenase A und Phosphoglyceratkinase 1, sowie in den für den Glukosetransporter 1 kodierenden Genen nachgewiesen werden.

Unter Hypoxie (also bei geringer ROS-Produktion) könnte das HIF-1 Dimer infolge einer fehlenden posttranslationalen Hydroxylierung der Aminosäure Prolin an den Positionen 402 und 564, der „oxygen-dependent degradation domain“ (ODD) des HIF-1 α Proteins akkumulieren [60-65]. Unter diesen Bedingungen wäre die normoxische Degradation gehemmt, da nur Hydroxy-Prolin-modifiziertes HIF-1 α von dem von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein (pVHL) erkannt und unter dessen Vermittlung durch eine E3-Ligase ubiquitiniert wird [66]. Ubiquitiniertes HIF-1 α wird von den Proteasomen so rasch abgebaut, dass HIF-1 α unter hohem pO₂ nur eine

Halbwertszeit von wenigen Minuten aufweist [67, 68]. Möglicherweise beeinflusst H_2O_2 in Gegenwart von Fe^{2+} auch durch eine lokale Fentonreaktion mit Entstehung hochreaktiver Hydroxylradikale (vgl. Gleichung 4) die Ubiquitinierung. Abbildung 1.2 zeigt ein vereinfachtes Modell der molekularen Grundlagen des O_2 -Sensings.

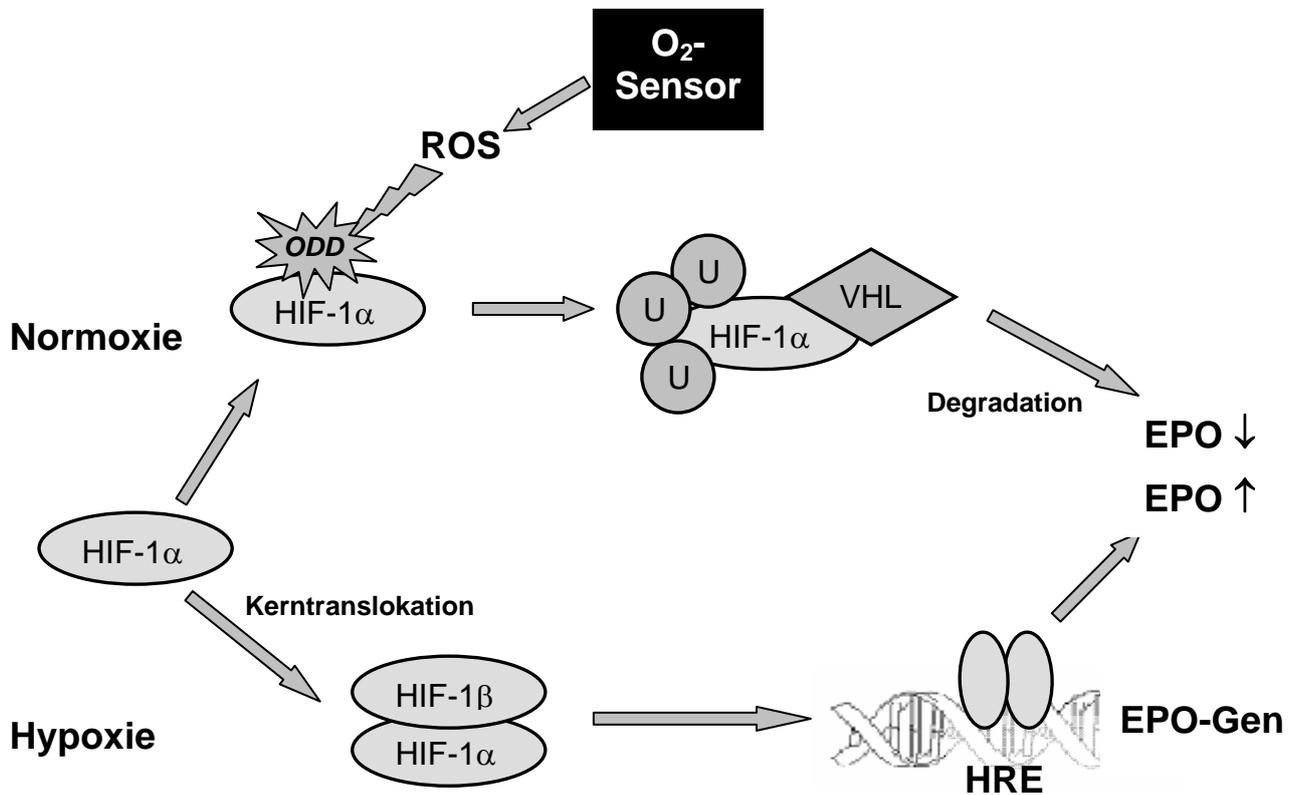


Abb.1.2 **Modell der O_2 -abhängigen Genexpression.** Die Details sind im Text erörtert. Im Hinblick auf die offenen Fragen zur Identität des O_2 -Sensors wird dieser als „Black box“ dargestellt.

2. Fragestellung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren der Nachweis und die weitere funktionelle Charakterisierung einer NAD(P)H-Oxidase als Teil eines hypothetischen O₂-Sensors in humanen Hepatomzellen. Im Zentrum stand die Frage, ob und in welcher Weise von dieser Oxidase produzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Signalübermittler an der molekularen Adaptation an verschiedene Oxygenierungszustände beteiligt sein könnten. Ferner sollten der Einfluss von reaktiven Stickstoffspezies (Stickstoffmonoxid, NO) und Verschiebungen des zellulären Redoxäquilibriums auf die O₂-abhängige Genexpression geprüft werden, insbesondere im Hinblick auf mögliche Interaktionen mit ROS. Alternative Konzepte zur Physiologie des O₂-Sensors, z.B. solche unter Beteiligung der mitochondrialen Atmungskette, sollten kritisch reflektiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkulturen und Vitalitätstests

Hep3B und HepG2 (American Type Culture Collection [ATCC] No. HB 8065 und HB 8064, Rockville, MD, USA) wurden in RPMI 1640 Medium (GIBCO Life Technologies, Meckenheim) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Sigma, München), 2 mM L-Glutamin, 2,2 g/l Natriumbicarbonat und Penicillin/Streptomycin (100 Einheiten bzw. 100 µg/ml) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (5% CO₂ in Luft) bei 37°C (Heraeus Inkubator; Heraeus, Hanau) kultiviert. EPO3-Zellen (OSI Pharmaceuticals, Uniondale, NY, USA) wurden unter den gleichen Bedingungen in DMEM (GIBCO Life Technologies, Meckenheim) mit 10% FCS und G418 (400 µg/ml) kultiviert. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurde das Medium gewechselt, spätestens jedoch nach 3 Tagen. Bei Konfluenz des Zellrasens, d.h. bei einer Zelldichte von etwa 5×10^5 Zellen/cm², wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS⁻ (phosphate buffered saline ohne Ca²⁺ und Mg²⁺: 160 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und nach 6-8 minütiger Inkubation mit Trypsinlösung (0,05% [w/v] Trypsin; 0,02% EDTA) durch sanftes Beklopfen der Zellkulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in RPMI 1640 resuspendiert und im Verhältnis 1:3 auf weitere Zellkulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht) verteilt.

Hypoxische Bedingungen wurden in einer luftdichten Durchflussgasinkubationskammer geschaffen [69]. Mässige Hypoxie (perizellulärer pO₂ ca. 50 mmHg) und Normoxie (perizellulärer pO₂ ca. 100-110 mmHg) wurden auf einem Orbitalrüttler durch Aufrechterhaltung einer permanenten Flüssigkeitskonvektion erreicht. Bei besonderen Anforderungen an kontrollierte Inkubationsbedingungen, etwa wenn ein besonders hoher pO₂ (ca. 145 mmHg) auf Zellebene angestrebt wurde, wurden die Zellen in petriPerm[®] Kulturschalen (Vivasciences AG, Hannover) mit einer gaspermeablen Bodenfläche aus einer 25 µm dicken hydrophilen Fluorethylenpropylen-Kopolymermembran, die eine exakte Einstellung des perizellulären pO₂ erlaubt, gezüchtet [70].

Die Zellvitalität wurde nach Instruktionen des Herstellers fluorimetrisch mit dem Redoxindikator Alamar Blue[®] geprüft (BioSource, Ratingen). Weiterhin wurden

Trypanblaufärbungen (Endkonzentration 0,125%) unter lichtmikroskopischer Kontrolle durchgeführt. Eine Anfärbung der Zelle (fehlende Trypanblauexklusion) zeigt eine Aufhebung der Integrität der Zellmembran und damit eine Zellschädigung an. Insbesondere in Versuchsanordnungen, in denen die Zellen vereinzelt und in Suspension übergeführt werden, können diese durch mechanischen Stress geschädigt werden. Wurden in der Trypanblaufärbung mehr als nur vereinzelt positive Zellen angetroffen (3/Gesichtsfeld bei 100x Vergrößerung), wurde der Ansatz verworfen. Das Gesamtprotein als Indikator der Zelldichte wurde kolorimetrisch bestimmt. Hierzu wurden 350 µl H₂O, 100 µl Bradford Reagenz (0,2 g Coomassie Brilliant Blue G250, 100 ml 50% (v/v) Ethanol, 200 ml 85% H₃PO₄ auf 2 l H₂O) und 25 µl Zellysate inkubiert und nach Kalibration mit einer Rinderserumalbuminlösung die Extinktion bei 595 nm im Photometer (Tecan Rainbow Microplate Reader, Tecan GmbH, Crailsheim) gemessen. Inkubationsexperimente wurden, um konstante Versuchsbedingungen zu garantieren, stets mit frühkonfluenten Kulturen nach lichtmikroskopischer Kontrolle (Zeiss Axiovert 25, Carl Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Die durchschnittliche Zelldichte in diesem Stadium betrug 5×10^5 Zellen/cm². Die eingesetzten Pharmaka Spermin-NONOat (N-[2-Hydroxy-2-Nitrosohydrazino]-1,2-Ethylendiamin), sowie SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin), Spermin-tetrahydrochlorid und N-Acetyl-D,L-Penicillamin-Disulfid wurden von Calbiochem (jetzt Merck Biosciences GmbH, Bad Soden) bezogen, MnT-BAP (Mn[III] Tetrakis[4-Benzoessäure]Porphyrin) und MnTMPyP (Mn[III] Tetrakis[1-Methyl-4-Pyridyl]Porphyrin) von Alexis Biochemicals (Grünberg). Alle weiteren Reagenzien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma Chemicals (München) erworben. Zur Herstellung von Lösungen und Reaktionsansätzen wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet. Für RNA-Analysen wurde ddH₂O eingesetzt, das zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden war. Dazu wurde 1 l ddH₂O mit 100 µl DEPC über Nacht inkubiert und DEPC anschliessend durch Autoklavieren inaktiviert.

3.2 Radioimmunoassay für Erythropoietin (EPO-RIA)

EPO-Proteinkonzentrationen wurden im Zellkulturüberstand mit einem Radioimmunoassay (RIA) unter Verwendung von ¹²⁵I-markiertem, rekombinanten

humanen EPO (rh-EPO, Amersham, Braunschweig) und gegen rh-EPO gerichtetem Kaninchenantiserum bestimmt [71]. Als Standard diente rekombinantes humanes EPO (Janssen-Cilag, Neuss), dessen Aktivität gegen die internationale Standardpräparation B kalibriert wurde. Die Proben wurden über 24 Stunden bei 4°C mit ¹²⁵I-markiertem rh-EPO und mit Antiserum inkubiert. Anschliessend wurde das antikörpergebundene EPO mit 16% PEG 6000 präzipitiert und die Aktivität in einem Gammazähler gemessen. Die Kalibrationskurve wurde mit einer log-logit Operation transformiert, um die Probenkonzentration errechnen zu können. Die untere Nachweisgrenze lag bei 20 mU/ml.

3.3 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

3.3.1 Messung von H₂O₂ durch HRP-katalysierte Luminol-Chemilumineszenz

In den Zellkulturüberstand freigesetztes H₂O₂ wurde mit Hilfe der durch Meerrettichperoxidase (HRP) katalysierten Luminolchemilumineszenz (LMCL) bestimmt [72].

Luminol (5-Amino-2,2-Dihydro-1,4-Phthalazin-Dion) wird in einem basischen Medium in ein Dianion konvertiert, das mit H₂O₂ unter Katalyse durch ein Ein-Elektronenoxidans oder eine Peroxidase zu einem energetisch angeregten Aminophthalation reagiert. Unter Lichtemission kehrt dieses in seinen Grundzustand zurück. Das Standardmedium wurde 3 Tage vor Versuchsbeginn durch phenolrotfreies RPMI 1640 ohne FCS ersetzt, da deutliche Interferenzen des Indikators mit der Nachweisreaktion festzustellen waren („quenching“) [73] und FCS die Präzision der Messung durch Schaumbildung beeinträchtigen könnte. Vor Entnahme der Proben wurden H₂O₂-Gradienten im Zellkulturüberstand durch manuelles Schütteln ausgeglichen. Innerhalb von 30 Sekunden erfolgte die Messung in einem Luminometer (Microlumat LB96 EG&G Berthold, Bad Wildbad) bei Raumtemperatur. Hierzu wurden 25 µl des Zellkulturüberstandes in die Kavitäten einer lichtundurchlässigen Mikrotiterplatte, die bereits mit Meerrettichperoxidase versehen waren, pipettiert.

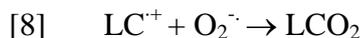
Luminol wurde am Versuchstag frisch aus einer Stammlösung (10 mM in DMSO) angesetzt, auf einen pH von 9,5 eingestellt [74, 75] und bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt. Die Luminol-Lösung wurde automatisch in die Kavität der Mikrotiterplatte injiziert. Die Endkonzentrationen betragen 10 µg/ml Peroxidase und 20 µM Luminol. Nach Korrektur des Grundrauschens wurde die gemessene Lichtemission über 3 Sekunden integriert, ein Zeitfenster, das die initiale Lichtentwicklung erfasst. H₂O₂-Standards wurden mit einer 30% Lösung (Merck, Darmstadt) in der gleichen Probenmatrix angesetzt. Das untere Detektionslimit lag bei ca. 400 nM.

3.3.2 Quantitativer Nachweis von O₂^{•-} durch Lucigenin-Chemilumineszenz

Die intra- und extrazelluläre O₂^{•-}-Produktion wurde mit Hilfe der Lucigenin-Chemilumineszenz bestimmt [76]. Durch eine Einelektronenreduktion reagiert das Dikation des Lucigenin (Bis-N-Ethylacridiniumnitrat) zum Lucigenin-Kationradikal (*Reaktionsschema 7*):



Dieses Radikal reagiert seinerseits mit O₂^{•-} unter Auftreten eines instabilen Dioxoethans, welches spontan zerfällt (*Reaktionsschema 8*):

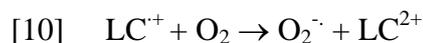


Dabei entsteht ein energetisch angeregtes Acridon, welches unter Photonenemission spontan in den Ruhezustand zurückkehrt (*Reaktionsschema 9*):



Die methodische Validität der Lucigenin-Lumineszenz zur Messung von O₂^{•-} wurde bisweilen in der Literatur in Frage gestellt: Mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz konnte gezeigt werden, dass Lucigenin aufgrund eines Redox-Cyclings *per se*

Superoxidanionen generiert und somit unabhängig von der Gegenwart biologischer Systeme eine Lichtemission auftritt [77, 78] (*Reaktionsschema 10*):



Um diesen systematischen Fehler zu vermeiden, wurde hier die Messung der Lucigenin-Lumineszenz nicht zur Quantifizierung basaler $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Produktionsraten, sondern ausschliesslich zur Bestimmung veränderter $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildungsraten in Enzymaktivierungsexperimenten verwendet. Die Eignung der Methode für diese Fragestellungen ist in der Fachliteratur akzeptiert [76].

Für unsere Experimente wurden konfluente Hep3B bzw. HepG2 Zellen mit Trypsin bis zum Verlust der Adhärenz und des interzellulären Zusammenhangs angedaut, durch mehrfache Aspiration durch eine 18 Gauge Injektionskanüle vorsichtig separiert und bei 800 Upm über 5 Minuten zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden mehrfach in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen, um Spuren von Phenolrot und Zellfragmente zu entfernen. Aliquots der Zellsuspension wurden auf die Mikrotiterplatte übertragen und die spontane Sedimentation abgewartet, um Einflüsse von Lichtstreuungseffekten (Tyndall-Effekt) auf die Detektion der Chemilumineszenz zu reduzieren. Nach Zugabe von Lucigenin (Endkonzentration 100 μM) wurde die Mikrotiterplatte in die Messkammer des Luminometers eingeführt. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation im Dunkeln zur Reduktion der Autolumineszenz wurde die Lichtemission in 5 Sekunden-Intervallen ermittelt. Die gleichzeitig in Kontroll-Lösungen gemessene Hintergrundaktivität (Thermisches Rauschen des Photomultipliers und Spontanlumineszenz von Reagenzien und Plastikmaterial) wurde subtrahiert.

3.3.3 Cytochemischer Nachweis von ROS *in situ*

Die in der klinisch-hämatologischen Routinediagnostik gut etablierte Reduktion von Nitroblautetrazoliumsalzen (NBT) zum Nachweis von Superoxidanionen wurde bei den meisten Experimenten ergänzend hinzugezogen [79, 80]. Hierzu wurde die kumulative Ausfällung nach Inkubation mit 0,25 mM des Farbstoffs in Form von Formazanaggregaten lichtmikroskopisch semiquantitativ erfasst. In Kooperation mit

dem Institut für Anatomie der Universität Lübeck (seinerzeit Direktor Prof. Dr. Dr. W. Kühnel) wurden darüber hinaus Präparate zur transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) subzellulären Lokalisation der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies angefertigt [80]. Hierzu wurden die Zellen in Standardmedium über 72 Stunden auf einem Kunststoffträger kultiviert. Nach Induktion der ROS-Synthese durch NAD(P)H- (250 μ M über 30 Minuten) wurde intrazellulär generiertes H_2O_2 durch Ceriumchlorid (1 mM Endkonzentration) immobilisiert und eine Anfärbung des nicht weiter diffusiblen H_2O_2 -Cerium-Komplexes ($Ce[OH]_2OOH$) mit 3,3'-Diaminobenzidintetrachlorid (DAB; 1mg/l) durchgeführt. Zur Abschätzung des Effektes der unspezifischen Oxidation von DAB durch endogene Peroxidasen und Katalasen wurde den Inkubationspuffern in einigen Experimentserien 1 mM des Peroxidaseinhibitors Natriumazid und 2,5 mM des Katalaseinhibitors 3-Amino-1,2,4-Triazol beigefügt. Zur Kontrastverstärkung wurde die Elektronentransmission der $Ce[OH]_2OOH$ -DAB-Aggregate mit 1 mM Cobaltchlorid, das eine hohe Affinität zu oxidiertem DAB aufweist, weiter reduziert. Nach Fixierung in gepuffertem 2% Glutaraldehyd, einer schwach kontrastierenden Postfixation mit 0,5% Osmiumtetroxid über 1 Stunde und einer Dehydrierung in einer Alkoholreihe schloss sich die Einbettung des Kunststoffträgers in Epoxydharz und die weitere Aufarbeitung im Ultradünnschnitt an. Diese und die elektronenmikroskopische Darstellung wurden durch Mitarbeiter des Instituts für Anatomie der Universität Lübeck durchgeführt.

3.4 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Eine leichte Modifikation der Methodik zum Nachweis von H_2O_2 (3.3.1) gestattet die Bestimmung der antioxidativen Kapazität: Hierzu wurden durch Ultraschalleinwirkung hergestellte Zell-Lysate mit frisch angesetzttem H_2O_2 (Endkonzentration 20 μ M) inkubiert. Konventionelle Tests, die in der Regel auf der Messung der Cytochrom_c-Oxidation beruhen, erfordern den Zusatz erheblich höherer H_2O_2 -Konzentrationen. Damit besteht die Gefahr einer Enzyminaktivierung, die für Katalase beschrieben, prinzipiell aber auch für andere Enzymsysteme vorstellbar ist. Mit unserer Modifikation konnten wir diese Limitation umgehen.

Die annähernd lineare Kinetik des H_2O_2 -Abbaus lässt sich durch wiederholte Bestimmung der Luminol-Lumineszenz in Aliquots des Reaktionsansatzes verfolgen. Dabei gibt $\Delta\text{H}_2\text{O}_2/\Delta t$ Auskunft über die antioxidative Kapazität. Der relative Anteil der Katalase kann unter den gleichen Bedingungen nach Zusatz von 2,5 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol, einem Katalaseinhibitor, ermittelt werden. Die nach Zugabe von Aminotriazol verbleibende antioxidative Kapazität entspricht im Wesentlichen der Summe der Aktivität der Glutathionperoxidase und quantitativ weniger bedeutsamer antioxidativen Systemen. Die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) wurde mit einem O_2^- -generierenden Xanthin/Xanthinoxidase-System bestimmt. Dabei wurden 100 mU/ml Xanthin-Oxidase mit 500 μM Xanthin inkubiert und die in Gegenwart von 1-250 μM Lucigenin (in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4) entstehende Chemilumineszenz in einem Mikrotiterplattenluminometer bei 550 nm Wellenlänge gemessen. Die nach Zugabe eines Zell-Lysats gemessene Reduktion der Lumineszenz entspricht der Aktivität der SOD.

3.5 Molekularbiologische Verfahren

3.5.1 RNA-Isolation mit saurem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

Hierzu wurden die Zellen in 4 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung (GTC) mit 0,1 M β -Mercaptoethanol lysiert. Die Gesamt-RNA aus den Zell-Lysaten wurde mit einer modifizierten Methode nach [81] isoliert. 700 μl Zell-Lysat in GTC wurden mit 560 μl saurem Phenol (pH 4,5) und 280 μl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 25:24:1 sowie 70 μl NaOAc (pH 4,0) in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gemischt. Der Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschliessend bei 12000 Upm bei 4°C, für 20 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Kühlzentrifuge 5402; Hamburg). Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase abpipettiert und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die RNA präzipitierte für 1 Stunde bei -20°C und wurde anschliessend erneut unter den gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde in 500 μl GTC resuspendiert, um Reste der organischen Lösungsmittel zu entfernen, und anschliessend ein zweites Mal mit dem gleichem Volumen Isopropanol gefällt. Die so aufgereinigte RNA wurde mit 75% Ethanol in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-

behandeltem Wasser gewaschen, getrocknet und zur Lagerung bei -70°C in DEPC-behandeltem Wasser aufgelöst.

3.5.2 Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration

Um Qualität und Quantität der RNA-Proben zu bestimmen, wurden diese in Wasser 1:100 verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm in einer Quarzglaszelle gemessen. Die Konzentration der Nucleinsäuren wurde aus folgender Beziehung bestimmt: 1 OD entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Der Quotient der Absorptionen entspricht dem Reinheitskoeffizienten, der anzeigt, wie gut die RNA von Protein, das bei 280 nm absorbiert, befreit wurde. Er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen [82].

3.5.3 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

10 μg der RNA wurden revers mit M-MLV SuperScript[®] Reverse Transkriptase (GIBCO-BRL Life Technologies, Eggenstein) unter Zugabe von 1 μg oligo-dT₁₅ in einem Endvolumen von 25 μl in Erststrang (first strand)-cDNA übersetzt. Nach initialer Denaturierung bei 68°C über 15 Minuten wurden 200 μM jedes Desoxynucleotids (dNTP), Tris-Puffer sowie 100 Einheiten (U) Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die Endkonzentrationen betragen 50 nM Tris-HCl (pH 8,3); 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 und 10 mM Dithiothreitol. Die Reaktion wurde durch eine 45-minütige Inkubation bei 42°C eingeleitet. Anschliessend wurde über 45 Minuten bei 52°C inkubiert. Die reverse Transkriptase wurde durch 10-minütige Inkubation bei 95°C denaturiert.

3.5.4 Amplifikation von cDNA mittels Polymerase chain reaction (PCR)

Die PCR wurde in Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5-2 mM MgCl_2) mit 200 μM der dNTP und 0,4 μM des jeweiligen „primer“-Oligonucleotids, 1 μl der cDNA Matrize und 1 U der TaqDNA Polymerase (GIBCO-BRL Life Technologies, Eggenstein) in einem Endvolumen von 50 μl durchgeführt (T3 Thermocycler,

Biometra, Göttingen). Die Primersequenzen und die PCR-Protokolle können den nachfolgenden Tabellen (Tab. 1 und 2) entnommen werden. Die Amplifikate wurden durch Elektrophorese in einem 1,5-4% Agarosegel aufgetrennt und nach einer Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht sichtbar gemacht. Hierzu wurde die jeweilige Menge Agarose durch Erhitzen in Tris-Borat-EDTA(TBE)-Puffer (89 mM Tris-HCl, pH 8,0; 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und Ethidiumbromid (1,5 µl/100 ml, Endkonzentration 0,15 µg/ml) zugegeben. Die Lösung wurde in einen Gelträger gegossen und nach Erstarrung zu einem Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Horizontalgelelektrophoresekammer überführt. Die Proben wurden mit Probenpuffer (50% (v/v) Tris-EDTA(TE)-Puffer [10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0]; 50% (v/v) Glycerol; 0,5% (w/v) Bromphenolblau) gemischt und bei 6-8 V/cm im elektrischen Feld getrennt. Die Länge der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe parallel aufgetrennter DNA-Längenstandards (GIBCO-BRL Life Technologies) bestimmt. Oligonucleotide wurden von der Firma MWG Biotech (München) synthetisiert.

Die Photodokumentation erfolgte in einem CCD-Geldokumentationssystem (Easywin 32, HeroLab, Wiesloch) bei einer UV-Wellenlänge von 312 nm. Zur Überprüfung der Konstanz der cDNA-Konzentrationen und der Effizienz der RNA-Extraktion wurden parallel PCRs für β -Actin und GAPDH als sogenannte „housekeeping“-Gene (d.h. konstitutiv exprimierte Gene) durchgeführt. Die Möglichkeit falsch-positiver Ergebnisse durch DNA-Kontamination wurde durch mitgeführte Negativkontrollen ausgeschlossen. RNA-Extraktion und PCR-Reaktionen wurden räumlich getrennt und mit verschiedenen Reagenzienchargen vorgenommen. Die Genexpression wurde nur als positiv bewertet, wenn in mehreren separat durchgeführten Experimenten der Nachweis in RNA-Extrakten von Zell-Linien des jeweiligen Typs, die sich hinsichtlich Herkunft, Proliferationszustand und Passagezahl unterschieden, erbracht werden konnte.

Zielgen (Genbank accession Nr.)	Primersequenz	Fragment- länge
gp91 ^{phox} (NM 000397)	sense: 5'-GCTGTTCAATGCTTGTGGCT-3' antisense: 5'-TCTCCTCATCATGGTGCACA-3'	404 bp
gp91 ^{phox} (NM 000397)	sense: 5'-CCAACTGGGATAATGAATTC-3' antisense: 5'-TCCACTGACATTACTGAGAGG-3'	417 bp
p22 ^{phox} (NM 000101)	sense: 5'-GTTTGTGTGCCTGCTGGAGT-3' antisense: 5'-GGGCGGCTGCTTGATGGT-3'	317 bp
p67 ^{phox} (NM 000433)	sense: 5'-ATGCCTTCAGTGCCGTCCAG-3' antisense: 5'-TGCTTCCAGACACACTCCATC-3'	427 bp
p47 ^{phox} (NM 000265)	sense: 5'-AAGTGGTTTGACGGGCAG-3' antisense: 5'-TGGACGGAAAGTAGCCTG-3'	598 bp
β-Actin	sense: 5'-CGGGAAATCGTGCGTGAC-3' antisense: 5'-GAACTTTGGGGGATGCTCGC-3'	711 bp
Epo (S 65485)	sense: 5'-TCTGGGAGCCCAGAAGGAAGC-3' antisense: 5'-CTGGAGTGTCATGGGACAG-3'	301bp

Tabelle 1 Auswahl der Primer-Oligonukleotide für die RT-PCR

Zielgen	Reaktionsbedingungen	Zielgen	Reaktionsbedingungen
gp91 ^{phox}	95°C 60 sec.	p47 ^{phox}	95°C 60 sec.
	95°C 30 sec.		95°C 30 sec.
	62°C 20 sec.		54°C 20 sec.
	72°C 25 sec.		72°C 25 sec.
	72°C 10 min.		72°C 10 min.
	x41		x40
gp91 ^{phox}	95°C 60 sec.	β-Actin	95°C 60 sec.
	95°C 30 sec.		95°C 30 sec.
	62°C 20 sec.		57°C 20 sec.
	72°C 25 sec.		72°C 25 sec.
	72°C 10 min.		72°C 10 min.
	x41		x29
p22 ^{phox}	95°C 60 sec.	Epo	95°C 60 sec.
	95°C 30 sec.		95°C 30 sec.
	52°C 20 sec.		58°C 20 sec.
	72°C 25 sec.		72°C 25 sec.
	72°C 10 min.		72°C 10 min.
	x33		x33
p67 ^{phox}	95°C 60 sec.		
	95°C 30 sec.		
	57°C 20 sec.		
	72°C 25 sec.		
	72°C 10 min.		
	x35		

Tabelle 2 Reaktionsbedingungen bei der RT-PCR

3.5.5 Luciferase Reportergen Assay

EPO3 Zellen wurden freundlicherweise von OSI Pharmaceuticals (Uniondale, NY, USA) zur Verfügung gestellt. Dies sind stabil transfizierte Hep3B Zellen, in denen das Reportergen Luciferase unter der Kontrolle des „hypoxia responsive element“ (HRE), d.h. des Promoters und des Enhancers des EPO-Gens steht. Die Expression der Luciferase verhält sich deshalb analog zu der des EPO-Gens. EPO3 Zellen wurden in DMEM (GIBCO Life Technologies, Meckenheim) mit 10% FCS und G418 (400 µg/ml) als positiv selektionierendes Antibiotikum angezüchtet.

Die Reportergenassays wurden mit Zell-Lysaten nach Instruktionen des Herstellers (Promega, Heidelberg) durchgeführt. Alle Ergebnisse sind auf den Gesamtproteingehalt bezogen und werden als Quotient von Luciferaseaktivität der Probe zur Luciferaseaktivität einer unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. Um unspezifische Effekte von Substanzen auf die Reportergenaktivität ausschliessen zu können, wurden Kontrollexperimente mit HepG2 Zellen durchgeführt, die transient mit dem pGL2-Kontrollvektor (Promega, Heidelberg) transfiziert wurden. Im pGL2-Kontrollvektor steht das Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40-Promoters und Enhancers (Abbildung 3.1). Das Vektorplasmid pGL2 enthält neben multiplen Klonierungsregionen die kodierende Sequenz des dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* entnommenen und klonierten *luc* Gens sowie stromabwärts dieses Gens eine SV40 poly(A)region. Aufgrund der vergleichsweise geringen Halbwertszeit des Luciferaseenzym eignet sich dieses System besonders für das Studium induzierbarer und transientser Effekte.

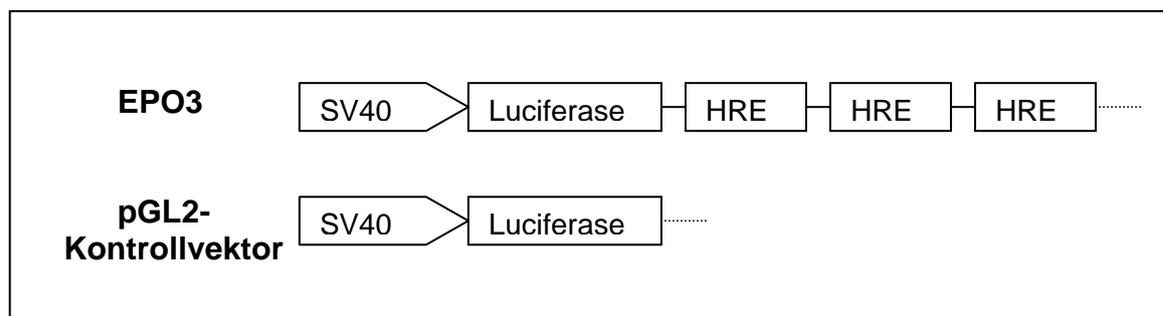


Abb. 3.1 Vektorkonstrukte für die Reportergenassays

3.5.6 Transiente Transfektion von Hep3B-Zellen

Die transiente Transfektion wurde durch Elektroporation von Hep3B Zellen erreicht. Dafür wurden 5×10^6 Zellen mit 5 μg des pGL2-Vektors in serumfreies Medium überführt und in einem Gene Pulser (Bio-Rad) in 0,4 mm dicken Küvetten bei 975 μF , 230V elektroporiert.

3.6 Gelelektrophorese und Immunoblot (Western Blot)

3.6.1 Proteinauftrennung durch Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Lyse-Puffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl; 1% Triton-X100; 1,5 mM PMSF; pH 7,5) aufgeschlossen. Die Proteinkonzentration im Lysat wurde mit der Bradford-Methode bestimmt [83]. Fraktionen von jeweils 150 μg Protein wurden in Laemmli-Puffer (4x Laemmli-Puffer: 0,62 g DTT; 0,4 g SDS; 6 ml Glycerol; 2 ml 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,2 mg Bromphenolblau; ad 10 ml ddH₂O) aufgenommen.

Die Proteintrennung in der PAGE [84] erfolgte in einem Vertikalelektrophoresesystem (Mini-PROTEAN II Cell-System, Bio-Rad, München) unter denaturierenden Bedingungen in einem 12% Polyacrylamidgel. Für die Herstellung des 12% Trenngels wurden 7,5 ml 40% Acrylamidlösung (40% (w/v) Acrylamid und 1% (w/v) Bisacrylamid) 10,9 ml H₂O und 6,25 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris HCl pH 8.8) gemischt und für ca. 30 Minuten entgast. Nach Zugabe von 500 μl 5% SDS, 250 μl 5% APS (Ammoniumpersulfat) und 25 μl 10% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid) wurde die Lösung zur Polymerisation zwischen zwei durch 1 mm dicke Abstandhalter getrennte Glasplatten gegossen und mit H₂O-gesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach ca. 45 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen. Nach Entfernen des Alkohols wurde das 4% Sammelgel nach dem gleichen Verfahren hergestellt und auf das Trenngel gegossen.

Die Gelkassette wurde in die mit 1x Laufpuffer (4x Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 380 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS) versehene Elektrophoresekammer eingebracht. Die Elektrophorese wurde zunächst bei einer Feldstärke von 12 V/cm² durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Farbstoff die Grenze zwischen Sammel -und Trenngel

erreichte. Anschliessend wurde die Feldstärke auf 20 V/cm^2 erhöht. Sobald die Bromphenolblau-Farbstofffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Parallel aufgetrennte Proteinstandards (Rainbow Marker, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit bekannten Molekulargewichten erlaubten eine Grössenbestimmung der aufgetrennten Proteine.

3.6.2 Elektrophoretischer Proteintransfer im semi-dry blot Verfahren

Die in der PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Zunächst wurden das Gel und die Membran für 20 Minuten im Transferpuffer (39 mM Glycin; 48 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,037% (w/v) SDS; 10% (v/v) Methanol) äquilibriert. Mehrere ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtete Lagen Filterpapier (Whatman International Ltd., Maidstone, GB) wurden unter Vermeidung von Luftblasenbildung auf eine Graphitanode gelegt. Darauf wurden (in der genannten Reihenfolge) die Membran, das Polyacrylamidgel, weitere Lagen des mit Transferpuffer angefeuchteten Filterpapiers und die Graphitkathode angeordnet. Bei einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 Gelfläche wurden die Proben auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Anschliessend wurde das Proteingel mit Coomassie-Farblösung (1 g Coomassiebrillantblau G-250 gelöst in 1 l Methanol; Zugabe von 500 ml Essigsäure und 400 ml ddH₂O) über Nacht gefärbt und mit Entfärberlösung (20% (v/v) Ethanol; 1% (v/v) Essigsäure) differenziert. Die Nitrocellulosemembran wurde mit Ponceau-S-Farblösung (0,5 g Ponceau S gelöst in 1 ml Essigsäure, Zugabe von 100 ml ddH₂O) gefärbt, um den Erfolg der Proteinübertragung zu überprüfen.

3.6.3 Immunologischer Proteinnachweis

Die Nitrocellulosemembran wurde nach der Proteinübertragung über Nacht bei 4°C in trisgepufferter Salzlösung mit Tween (TBS-T: 10 mM Tris-HCl, pH 7,3; 500 mM NaCl; 0,2% (v/v) Tween 20) + 3% (w/v) Magermilchpulver (Milupa) blockiert, anschliessend 3x 15 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und mit dem jeweiligen

primären Antikörper (Tabelle 3) für 4 Stunden inkubiert. Dazu wurde der primäre Antikörper in TBS-T-Puffer verdünnt. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran 3 x 30 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und mit dem jeweiligen Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000-1:10000 für 45 Minuten inkubiert. Es folgten 4x 10 minütige Waschschrirte mit TBS-T-Puffer und eine Äquilibriumierung in PBS.

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	Endkonzentration
Kaninchen anti-CAT	Chemicon, Hofheim	1:5000-1:20000	500-2000 ng/ml
Kaninchen anti- Cu/Zn SOD	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:1000- 1:2000	100-200 ng/ml
Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Biomol, Hamburg	1:2000-1:10000	100-500 ng/ml

Tabelle 3 **Auswahl der Antikörper für den Western Blot**

Die HRP-konjugierten sekundären Antikörper induzierten in Gegenwart eines Luminolreagens (ECL Western-Blot Detection-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) die Emission von Chemilumineszenz. Die Bandenintensität steht dabei in proportionaler Beziehung zur Menge des nachzuweisenden Proteins. Die Nitrocellulose-Membran wurde nach den Angaben des Herstellers mit den Reagenzien inkubiert. Anschliessend erfolgte die Belichtung eines hochsensitiven Films (Kodak, Rochester, USA) in einer mit Verstärkerfolie versehenen Röntgenfilmkassette. Nach 0,5-25 Minuten Belichtung wurde der Film manuell entwickelt.

3.7 Statistische Analysen

Innerhalb der beschriebenen Versuchsreihen kann von einer Normalverteilung ausgegangen werden, sofern die Experimente an einem Versuchstag und mit derselben Charge von Versuchsmaterial und Reagenzien durchgeführt werden konnten. In diesem Fall konnten die Daten mit Hilfe des Student's *t*-Tests bzw. der ANOVA-Methode ausgewertet werden (SPSS 10.0, SPSS Inc., Chicago, USA) . Im Zweifelsfalle wurde die Abweichung von der Normalverteilung mit einem Algorithmus des Programmes SPSS bestimmt. Ausreisser wurden mit dem Grubbs-Test identifiziert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Bei Experimenten mit mehreren Versuchszeitpunkten wurde primär auf den nonparametrischen Wilcoxon Test für gepaarte Messwerte zurückgegriffen. Für signifikant (*) wurden in allen Experimenten Unterschiede bei der Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ befunden. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben und mit dem Programm Sigma Plot Version 4.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) graphisch aufgearbeitet.

3.8 Enzymkinetische Analysen

Für unsere Betrachtungen der Enzymaktivität wurde die uneingeschränkte Gültigkeit der Michelis-Menten Kinetik angenommen. Dabei gilt (*Gleichung 1*):

$$[1] \quad v = v_{\max} [S] / (K_M + [S])$$

mit v =Reaktionsgeschwindigkeit; v_{\max} =maximale Reaktionsgeschwindigkeit;

$[S]$ =Substratkonzentration; K_M =Michaelis-Menten-Konstante

Für die Hälfte der bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat erreichten Reaktionsgeschwindigkeit $v = 1/2 v_{\max}$ kann näherungsweise folgende Beziehung abgeleitet werden (*Gleichung 2*):

$$[2] \quad [S]_{\text{bei } 1/2 v_{\max}} = K_M$$

Bei Inkubation der Enzympräparation mit steigenden Mengen des Substrats können somit experimentell die wichtigsten enzymkinetischen Parameter mit hinreichender Genauigkeit ermittelt werden, sofern nur ein Enzym und ein Substrat beteiligt sind. Da die ausschliessliche Betrachtung der Primärkurve (Substratkonzentration vs. Reaktionsgeschwindigkeit) für die Untersuchung von Inhibitionsmechanismen zu ungenau ist, beruhen alle weiterführenden kinetischen Analysen in dieser Arbeit auf dem „direct linear plot“ [85, 86]. Im Gegensatz zu konventionellen Verfahren gestattet der „direct linear plot“ den Umgang mit den Parametern v_{\max} und K_M als Variablen, die gegeneinander aufgetragen werden können. Mit dieser Methode können bei jeder Inhibitorkonzentration Medianwerte für v_{\max} und K_M kalkuliert werden. Werden die daraus abgeleiteten Grössen $1/v_{\max\text{apparent}}$ bzw. $K_{M\text{apparent}}/v_{\max\text{apparent}}$ gegen die jeweilige Inhibitorkonzentration aufgetragen, entstehen Sekundärdarstellungen, die sich besonders gut für die Bestimmung des Inhibitionsmechanismus eignen und zugleich die Überprüfung der Gültigkeit des Michaelis-Menten-Modells erlauben.

4. Ergebnisse

4.1 Zusammenhang zwischen H_2O_2 -Produktion und EPO-Expression

Aufgrund des eingeschränkten O_2 -Transfers in konventionellen Kulturschalen [69] wurden die Zellen für diese Versuchsreihe in einem gaspermeablen Zellkultursystem (petriPerm[®]) kultiviert. In diesem System ist eine rasche Äquilibration des perizellulären Gaspartialdrucks mit dem der Umgebung möglich [70]. Um konstante Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden alle Zugriffe auf die Zellkulturschalen durch Schleusen, die in den eigens für diesen Zweck konstruierten Deckel der gasdichten Inkubationskammer eingearbeitet wurden, vorgenommen. Im Durchfluss-System der Kammer herrschte stets ein leichter Überdruck, der ein Eindringen von Umgebungsluft verhinderte. Kulturen von Hep3B Zellen mit einem Konfluenzgrad von 95-100% wurden verschiedenen O_2 -Konzentrationen ausgesetzt und stabile Signalniveaus in der Luminol-Lumineszenz abgewartet. Das H_2O_2 -generierende System ist bereits im nahezu anoxischen bis stark hypoxischen Bereich aktiv und erreicht eine Sättigung bei einer Sauerstofffraktion von 20-30% (Abb. 4.1).

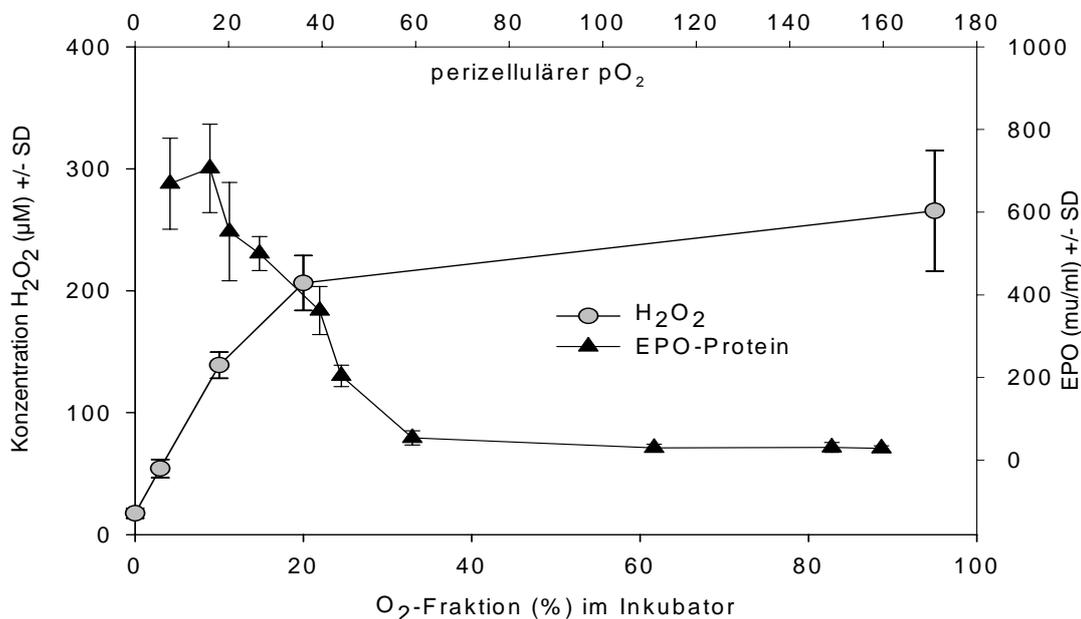


Abb. 4.1 Einfluss der O_2 -Fraktion im Inkubator auf die Konzentration von H_2O_2 und EPO im Überstand von Hep3B-Kulturen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± 1 Standardabweichung der mit der Luminol-Lumineszenz nach 3 Stunden Inkubation bei verschiedenen pO_2 gemessenen H_2O_2 -Konzentrationen in μM und die Konzentration des EPO-Proteins ($n=6$).

Toxische Effekte wurden selbst bei maximaler, normobarer Oxygenierung (ca. 95% O₂) über bis zu 48 Stunden nicht beobachtet. Verlaufsbeobachtungen zeigten, dass die O₂-abhängige H₂O₂-Produktion auch über mehrere Stunden konstant blieb und dabei eine strikte Dosis-Wirkungsbeziehung aufwies. Die Abbildung zeigt neben diesen Zusammenhängen auch die unter den jeweiligen Oxygenierungsbedingungen nach 24 Stunden gemessene EPO-Konzentration im Kulturüberstand. Zwischen dieser und der H₂O₂-Konzentration bestand eine inverse Korrelation.

4.2 Reaktion der Zellen auf die Zugabe von H₂O₂

Die EPO-Proteinspiegel im Zellkulturüberstand waren noch 24 Stunden nach experimenteller Zugabe eines H₂O₂-Bolus dosisabhängig ebenso vermindert wie die Aktivität der HIF-1-vermittelten EPO3-Reportergenaktivität (Abb. 4.2).

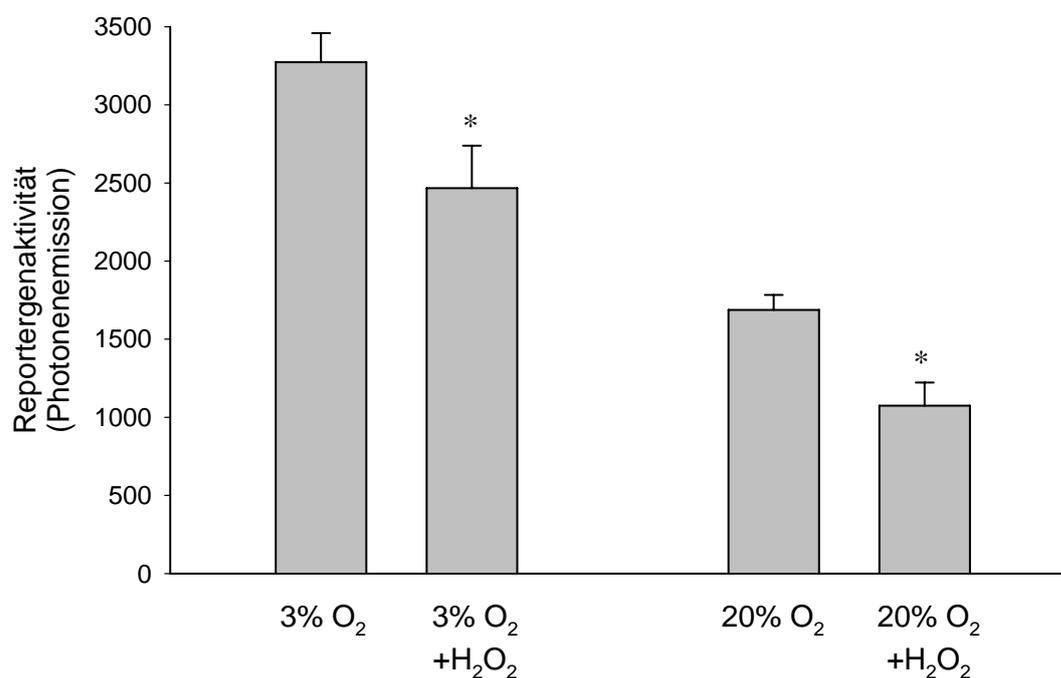


Abb. 4.2 **Einfluss von H₂O₂ auf die EPO3-Reportergenexpression.** EPO3-Kulturen wurden mit 250 µM H₂O₂ behandelt und bei 3% bzw. 20% O₂ inkubiert. Nach 2 Stunden wurde die Reporteraktivität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) (n=5).

Der H_2O_2 -Bolus wurde dabei überraschend schnell abgebaut. Bereits wenige Minuten nach der Zugabe von H_2O_2 waren die Ausgangskonzentrationen, die der basalen endogenen H_2O_2 -Produktion entsprechen, wieder erreicht (Abb. 4.3).

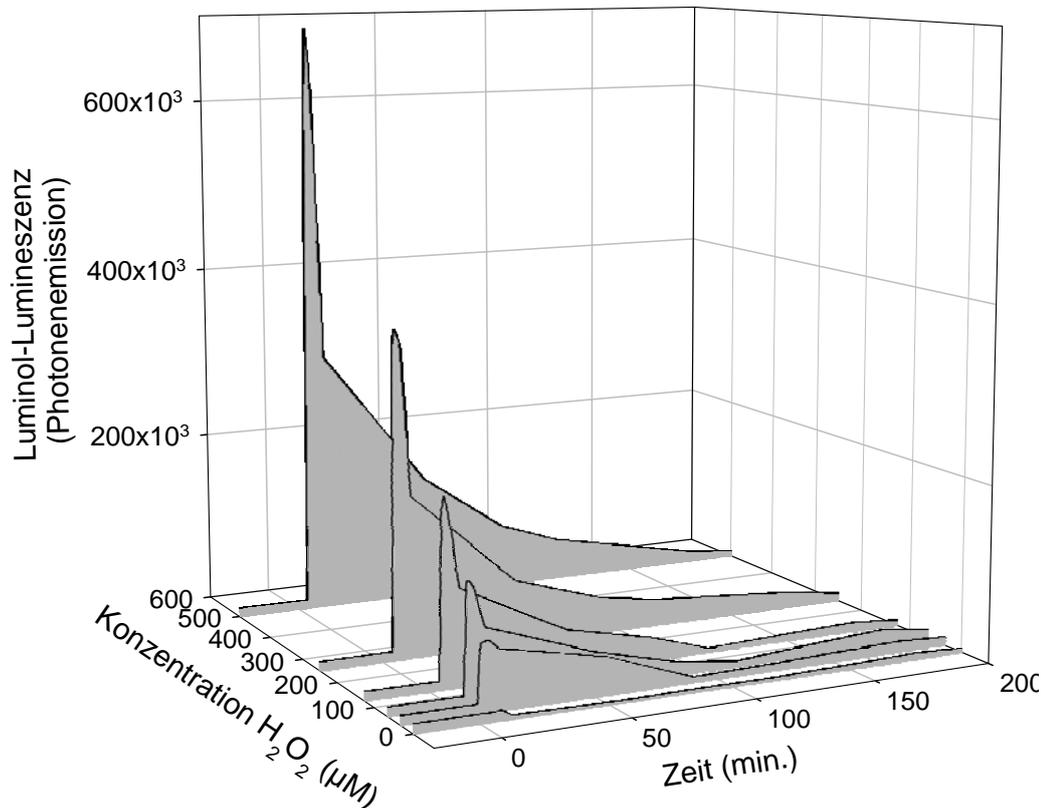


Abb. 4.3 **Zeitliche Charakteristik des Abbaus von exogen zugeführtem H_2O_2 in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration.** Hep3B-Kulturen wurden mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen (500 μM ; 250 μM ; 125 μM ; 62,5 μM ; 31,25 μM ; 16,126 μM) inkubiert. Durch wiederholte Messungen wurde der Abbau über 200 Minuten mit der Luminol-Lumineszenz verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=3$).

Mit einer Verzögerung von 16-22 Stunden konnten indessen wieder erhöhte H_2O_2 -Konzentrationen gemessen werden, die mit einer Reduktion der antioxidativen Kapazität einhergingen (Abb. 4.4 und 4.5).

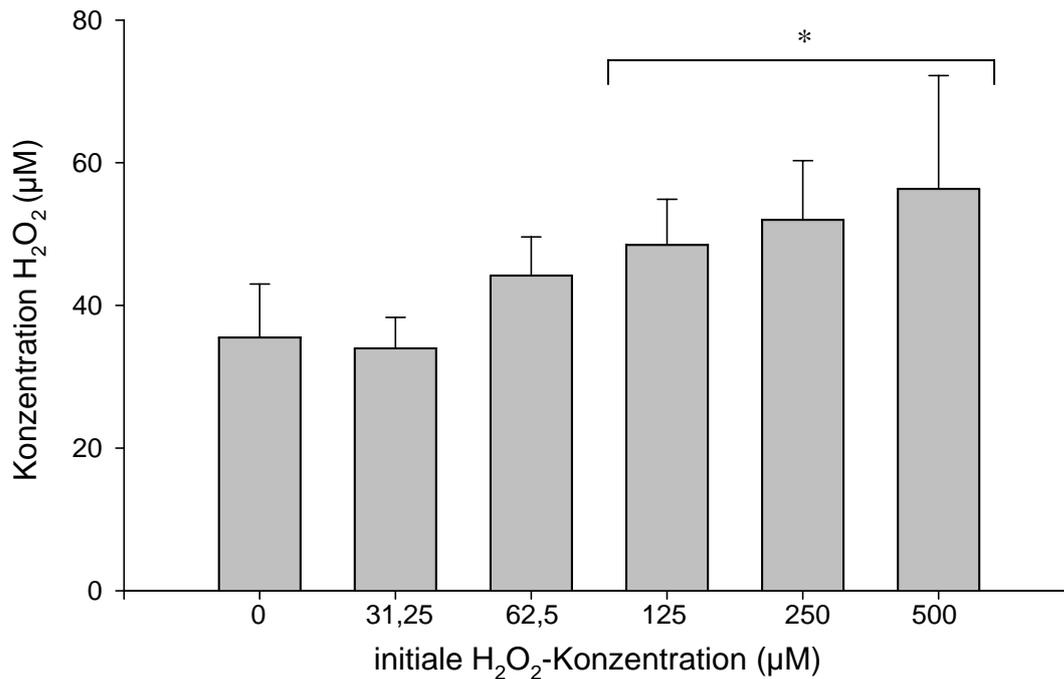


Abb. 4.4 **Abhängigkeit der endogenen H₂O₂-Produktion von exogenem H₂O₂.** Hep3B-Zellen wurden über 24 Stunden verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ im Kulturmedium ausgesetzt. Anschliessend wurde die spontane H₂O₂-Produktion bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der innerhalb von 30 Minuten erreichten H₂O₂-Konzentration im Zellkulturüberstand (n=6).

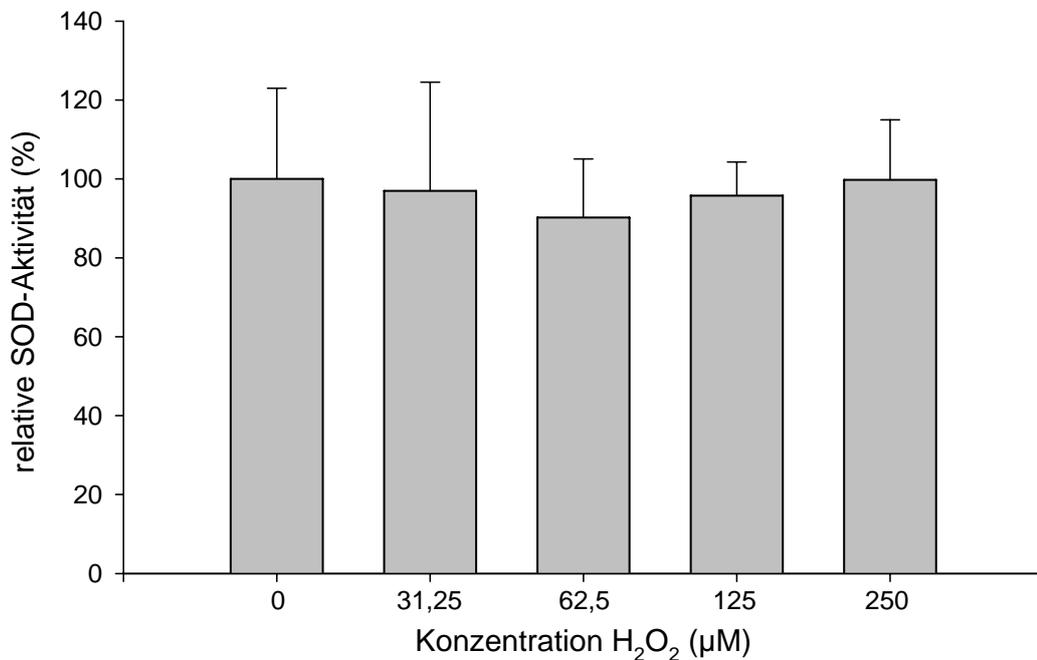


Abb. 4.5.1 **Einfluss von H₂O₂ auf die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD).** Hep3B-Kulturen wurden über 24 Stunden mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen behandelt. Die SOD-Aktivität wurden in Lysaten bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der Enzymaktivitäten in Relation zu unbehandelten Kontrollen (n=6).

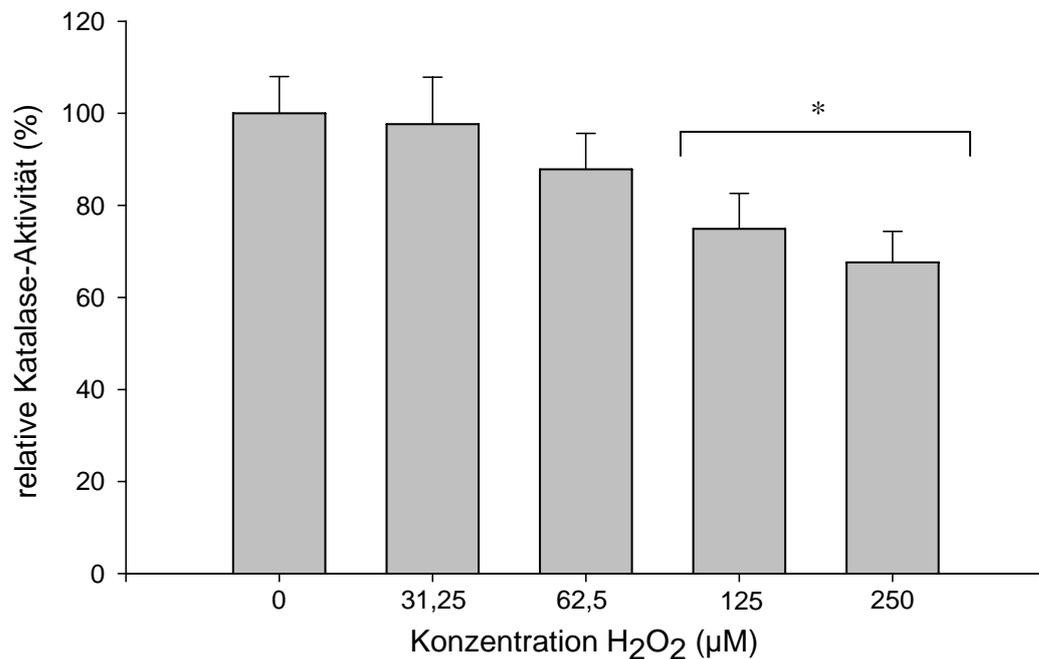


Abb. 4.5.2 **Einfluss von H₂O₂ auf die Aktivität der Katalase.** Hep3B-Kulturen wurden über 24 Stunden mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen behandelt. Die Katalaseaktivität wurden in Lysaten bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (\pm 1 Standardabweichung) der Enzymaktivitäten in Relation zu unbehandelten Kontrollen (n=6).

Im Western Blot analysierte Lysate H₂O₂-behandelter Zellen wiesen eine deutlich reduzierte Expression der Katalase auf, während die Expression der Superoxiddismutase konstant blieb (Abb. 4.6).

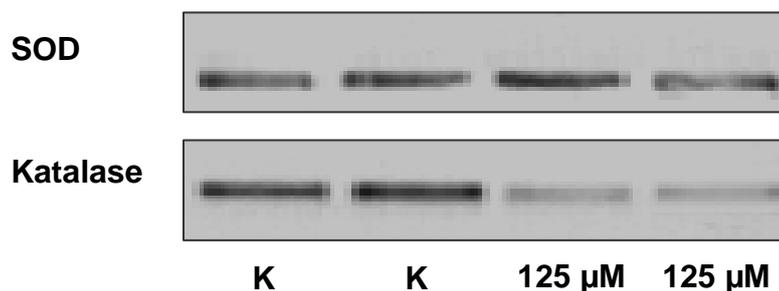


Abb. 4.6 **Einfluss von H₂O₂ auf die Expression von Superoxiddismutase (SOD) und Katalase.** Hep3B-Kulturen wurden über 24 Stunden mit 125 µM H₂O₂ behandelt bzw. unbehandelt gelassen (K=Kontrolle). Die Zell-Lysate wurden im Immunoblot (Western blot) analysiert (n=2).

4.3 Einfluss von NADPH und NADH auf die EPO-Synthese

Die EPO-Proteinkonzentrationen im Überstand waren nach Inkubation mit NADPH bzw. NADH reduziert. Bei gleichzeitiger Inkubation mit beiden Nukleotiden konnte keine Summierung der Einzeleffekte festgestellt werden. Insgesamt waren Effekte von NADPH/NADH nicht mehr signifikant, wenn die EPO-Synthese bereits durch normoxische Inkubationsbedingungen weitgehend supprimiert war (Abb. 4.8)

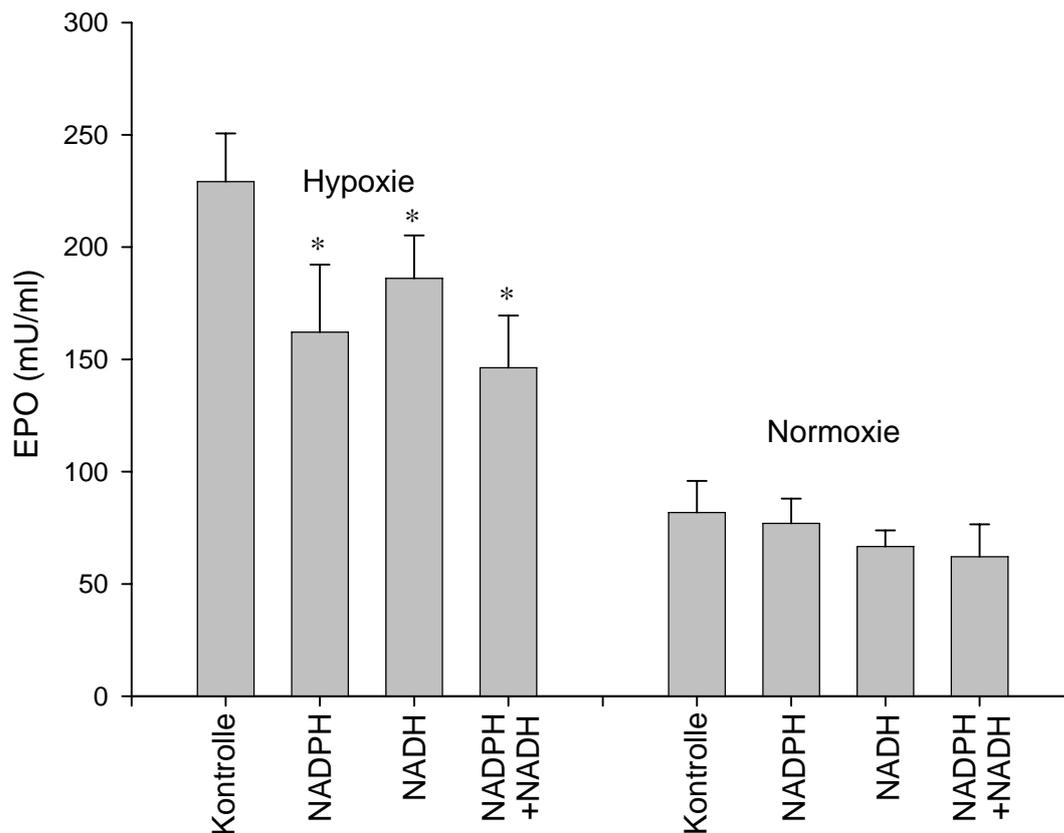


Abb. 4.8 Einfluss von NADPH, NADH oder der Kombination beider Kosubstrate auf die hypoxieinduzierte Produktion des EPO-Proteins. HepG2-Zellen wurden 24 Stunden mit NADPH (250 μ M), NADH (250 μ M) oder einer Kombination (jeweils 250 μ M) inkubiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (\pm 1 Standardabweichung) der im RIA bestimmten Konzentration des in den Zellkulturüberstand sezernierten EPO-Proteins unter Hypoxie (3 % O₂) und Normoxie (20 % O₂) (n=6).

4.4 Eigenschaften der nichtphagozytären NAD(P)H-Oxidase

4.4.1 Vergleich mit Phagozyten

Die Umsatzrate der NAD(P)H-Oxidase in phagozytär differenzierten HL-60 und in primären Granulozyten blieb selbst nach Stimulation mit inflammatorischen Mediatoren (hier dem chemotaktischen Peptid N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin [fMLF/fMLP] und dem Phorbol-ester 4-B-Phorbol-12-Myristat-13-Acetat [PMA]) in Gegenwart hoher Konzentrationen von NADH bzw. NADPH konstant (Abb. 4.9).

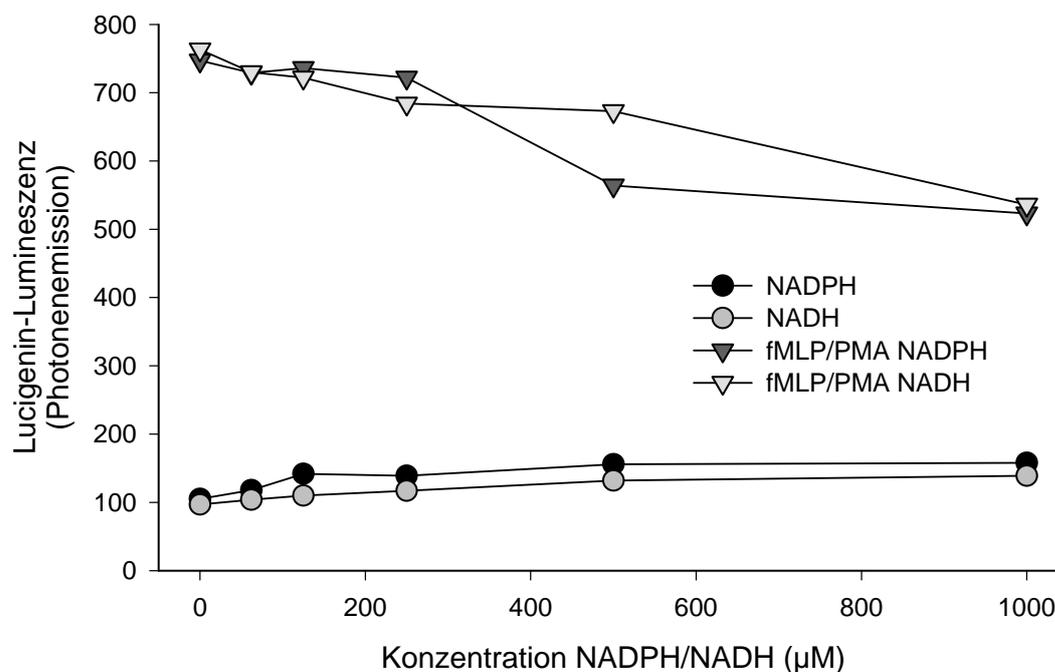


Abb. 4.9 **Unabhängigkeit der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase in unstimulierten und stimulierten Phagozyten vom extrazellulären Kosubstratangebot.** Primäre Granulozyten wurden über 15 Minuten mit einer Kombination von PMA (150 ng/ml Endkonzentration) und fMLP (500 ng/ml Endkonzentration) stimuliert bzw. unbehandelt gelassen. Dargestellt sind die Mittelwerte der maximalen NADPH/NADH-induzierten $O_2^{\cdot -}$ -Produktion (n=4).

Demgegenüber wurden die Kosubstrate von der Oxidase intakter Hepatomzellen vollständig umgesetzt: Um ausschliessen zu können, dass diese Effekte auf präparatorischen Artefakten, etwa dem Auftreten freier Enzyme oder

Membranpartikel beruhen, wurden alle an Zellsuspensionen durchgeführten Experimente ergänzend mit völlig intakten, d.h. adhären und morphologisch unauffälligen Zellverbänden wiederholt. Hierzu wurden konfluente Kulturen von Hep3B in die Kammer eines Einkammerluminometers (TD-20, Turner Instruments) eingeführt. Die im Fokus des Detektors gemessene Lichtemission entsprach dem Integral einer Zellpopulation von ca. $5-8 \times 10^6$ Zellen. Wegen der besseren Standardisierung der Zelldichte und der höheren Sensitivität beruhen die quantitativen Angaben allerdings ausschliesslich auf der Lumineszenzmessung in Zellsuspensionen. Die Produktion von O_2^- folgte der Zugabe von NADPH bzw. NADH mit einer sehr geringen zeitlichen Verzögerung. Im Unterschied zu Phagozyten war keine vorausgehende Induktion („Triggerung“) des Enzyms erforderlich. Während Phagozyten nach einmaliger Stimulation refraktär waren, erschöpfte sich die Aktivität der nichtphagozytären NAD(P)H-Oxidase auch bei wiederholter Stimulation nicht (Abb. 4.10).

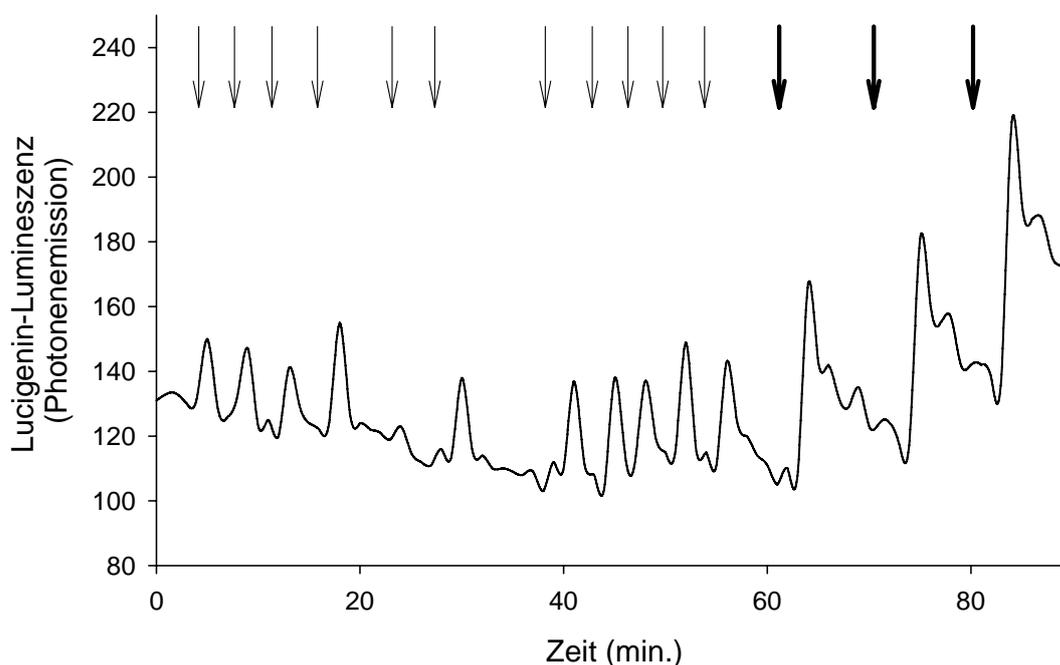


Abb. 4.10 O_2^- -Produktion bei wiederholter Stimulation von Hep3B-Zellen in Suspension mit extrazellulärem NADPH. Jeder Pfeil entspricht der Zugabe von $3 \mu\text{M}$ NADPH. Die dicken Pfeile (ab $t=60 \text{ min.}$) entsprechen jeweils $12 \mu\text{M}$ NADPH. Dargestellt ist die induzierte Lucigenin-Lumineszenz eines repräsentativen Versuchs.

4.4.2 Enzymkinetische Parameter. Vergleich von NADPH und NADH

Die NAD(P)H-Oxidase wies in Hepatomzellen für NADPH eine mediane K_M von 441 μM auf. Durch Extrapolation wurde das Erreichen der Sättigung (v_{\max}) näherungsweise für eine NADPH-Konzentration von 1497 μM ermittelt. Mit einer medianen K_M von 72 μM unterschied sich die kinetische Charakteristik für NADH: Hier wurde die v_{\max} bei 885 μM NADPH erreicht (Abb. 4.11). Bei Koinkubation zeigten beide Koenzyme ein strikt additives Verhalten im gesamten Dosisbereich (Abb. 4.12).

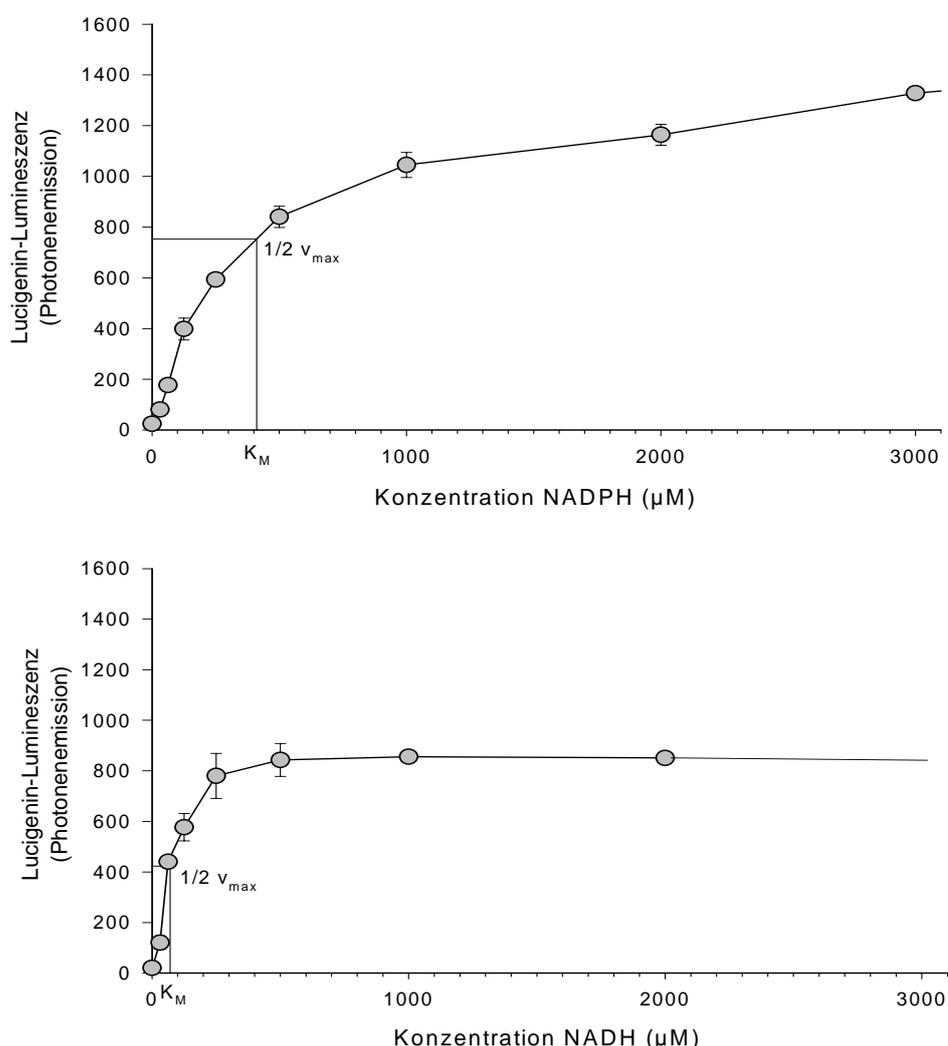


Abb. 4.11 Graphische Ableitung von K_M und v_{\max} für NADPH (oben) und NADH (unten) in Hep3B-Lysaten. Gegen die Konzentration des jeweiligen Kosubstrats ist der Mittelwert der induzierten Lucigenin-Lumineszenz (± 1 Standardabweichung) aufgetragen. Die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ($1/2 v_{\max}$) und die K_M wurden durch Extrapolation ermittelt ($n=7$).

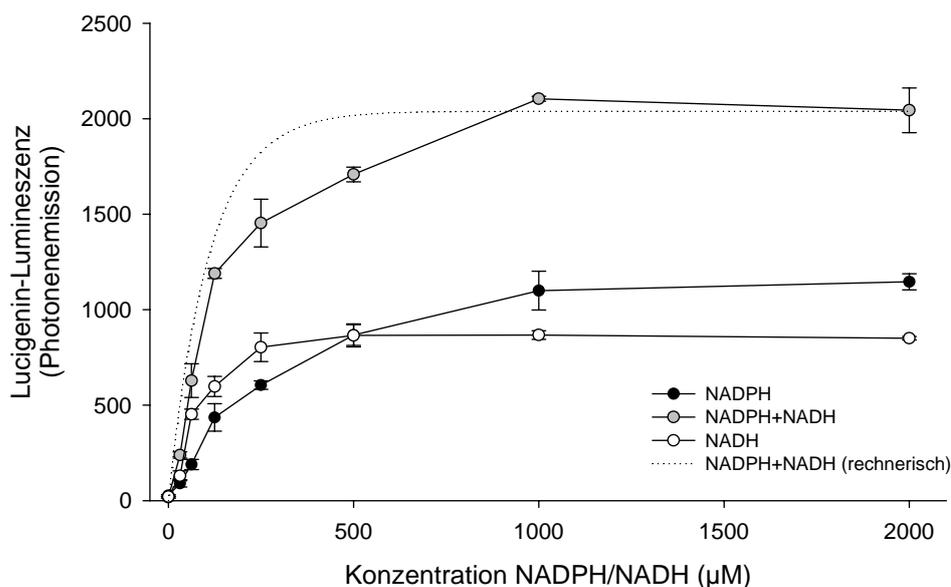


Abb. 4.12 **Additives Verhalten von NADPH und NADH in Hep3B-Lysaten.** Die Kosubstrate wurden einzeln und in Kombination mit Hep3B-Zell-Lysaten inkubiert und die resultierende Lucigenin-Lumineszenz gemessen (Mittelwerte \pm 1 Standardabweichung; n=4). Die gestrichelte Kurve entspricht dem rechnerisch und durch Regression ermittelten idealen Verlauf bei einem rein additiven Verhalten.

4.4.3 Lokalisation der $O_2^{\cdot-}$ -Synthese

Der Einsatz verschiedener Antioxidantien gestattet Rückschlüsse auf den Ort der $O_2^{\cdot-}$ -Synthese und die Verteilung zwischen intra- und extrazellulärem Kompartiment. Nach Zusatz von Superoxiddismutase (SOD), die ihre Aktivität lediglich extrazellulär entfalten kann, wurde eine maximal 50%ige Reduktion der $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration erreicht. Mit Substanzen, die einen lipophilen Charakter und damit Zugang zum Intrazellulärraum haben, konnte $O_2^{\cdot-}$ nahezu vollständig neutralisiert werden. Hierzu gehören die synthetischen SOD-Analoga MnT-BAP und MnT-MPyP [87] und Tiron als niedermolekularer $O_2^{\cdot-}$ -Fänger (Abb. 4.13).

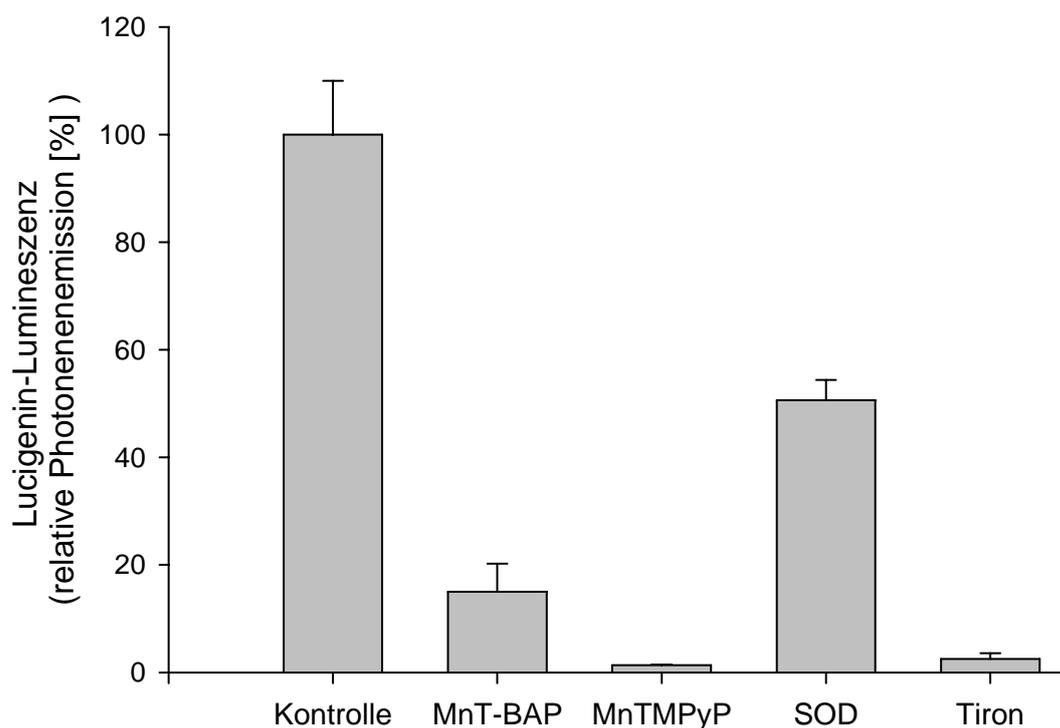


Abb. 4.13 **Einfluss von Superoxiddismutase (SOD) und synthetischen SOD-Analoga auf die $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration.** Hep3B-Zellen wurden mit 125 μ M NADPH stimuliert. Nach der Zugabe der Testsubstanzen wurde die Lucigenin-Lumineszenz gemessen. Die Säulen entsprechen den Mittelwerten der $O_2^{\cdot-}$ -Produktion in Relation zu unbehandelten Kontrollen in % (± 1 Standardabweichung) (n=5).

4.4.4 Morphologische Identifizierung von ROS-Quellen

In Kooperation mit dem Institut für Anatomie der Universität Lübeck wurden transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung von ROS durchgeführt. Hierzu wurde die Produktion von ROS in Kulturen von HepG2 mit NADPH oder NADH und hohen O_2 -Konzentrationen stimuliert. Die Aufnahmen zeigen insgesamt ultrastrukturell intakte Zellen mit einer homogenen Kontrastierung des gesamten Intrazellularraums unter Aussparung des Zellkerns. Weiter ist ersichtlich, dass amorphe elektronendichte Ablagerungen als Zeichen einer lokalen Akkumulation reaktiver Spezies in den Mitochondrien (mit deutlicher Kontrastierung der Cristae) sowie in unmittelbarer Umgebung des Zellkerns vorherrschen. Vereinzelt Areale der äusseren Zellmembran weisen ebenfalls eine Kontrastanhebung mit Deposition von granulärem Material (vermutlich DAB-Mangan-Komplexe) auf. Zytopathologisch-morphologische Hinweise für einen cytotoxischen Effekt der unter NADPH/NADH-Stimulation produzierten ROS liegen

nicht vor. Ferner fällt auf, dass jeweils nur einige disseminiert angeordnete Zellen (ca. 20% der Gesamtpopulation) überhaupt zur Gesamtproduktion reaktiver Spezies beitragen, während andere Zellen selbst unter Einsatz hoher Dosen von NADPH oder NADH ein ähnliches Kontrastverhalten zeigen wie Negativkontrollen (Osmiumfärbung ohne vorausgehende Cerium/DAB-Inkubation) (Abb. 4.14). Feinstrukturell weisen die ROS-produzierenden Zellen keine Unterschiede zu den übrigen Zellen auf (etwa Hinweise auf Apoptose). Auch in Mitose oder Vorstadien derselben befindliche Zellen zeigen keine Besonderheiten bezüglich der ROS-Produktion.

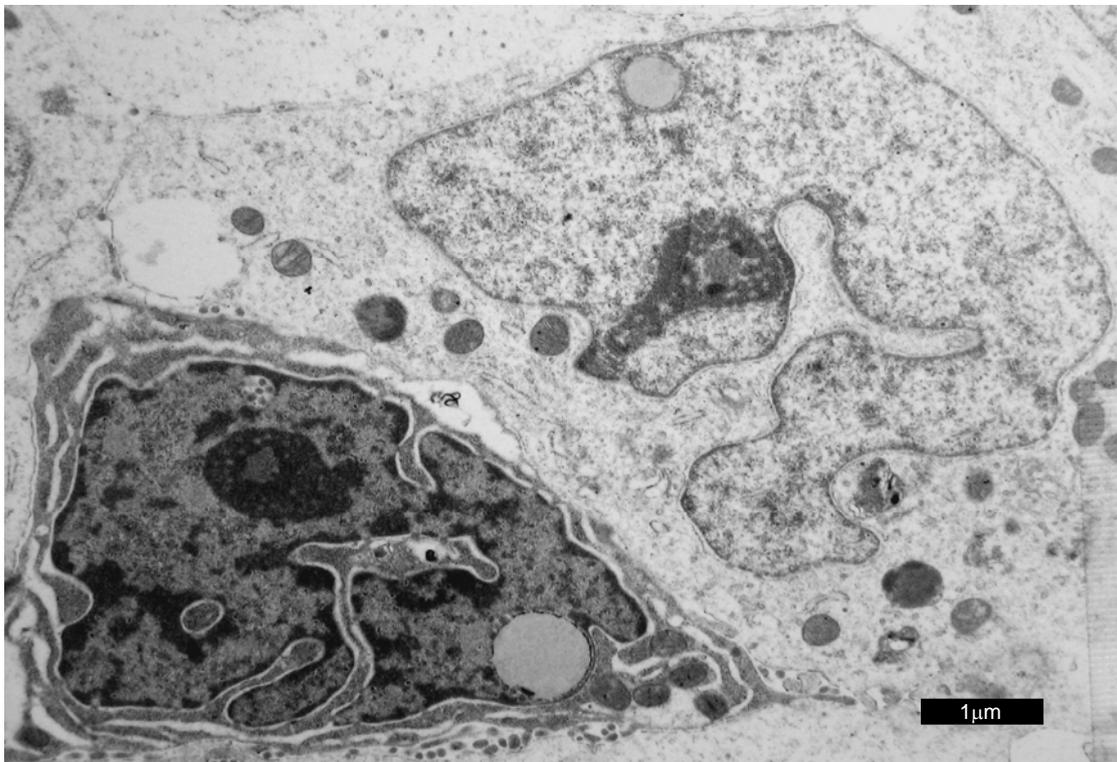


Abb. 4.14 **Lokalisation der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in der transmissionselektronenmikroskopischen Darstellung.** Die Abbildung zeigt das unmittelbare Nebeneinander einer ROS-produzierenden HepG2-Zelle (kontrastreich) und einer areaktiven Zelle (hell) nach 3-stündiger Inkubation bei 60% O₂ und Zugabe von 50 μM in der Cerium-DAB-Färbung (Vergrößerung 5600x).

4.5 Relativer Beitrag anderer Enzymsysteme zur ROS-Produktion

Zur orientierenden Bestimmung des relativen Beitrags der NAD(P)H-Oxidase und anderer Enzymsysteme (Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Lipoxygenase, Xanthinoxidase, Cyclooxygenase) zur Basisproduktion von $O_2^{\cdot-}$ wurden durch Ultraschallhomogenisierung gewonnene Lysate von Hep3B mit verschiedenen Substraten und Inhibitoren inkubiert. Die Befunde können der Tabelle entnommen werden (Tab. 4.1).

Zielenzym	Inhibitor/Substrat	Veränderung der $O_2^{\cdot-}$ -Produktion \pm SD
NAD(P)H-Oxidase	DPI (10 μ M)	-52 \pm 13%*
	NADPH (100 μ M)	+1520 \pm 412%*
	NADH (100 μ M)	+5744 \pm 1624%*
Xanthinoxidase	Allopurinol (500 μ M)	-11 \pm 2%
	Hypoxanthin (200 μ M)	+7 \pm 6%
Cyclooxygenase	Indomethacin (25 μ M)	-14 \pm 4%
Atmungskette	Succinat (10 mM)	+23 \pm 8%*
	Antimycin (50 μ M)	+31 \pm 11%*
	Succinat+Antimycin	+68 \pm 15%*
	Rotenon (25 μ M)	+19 \pm 7%*
Lipoxygenase+Cyclooxygenase	Arachidonsäure (50 μ M)	+3 \pm 2%

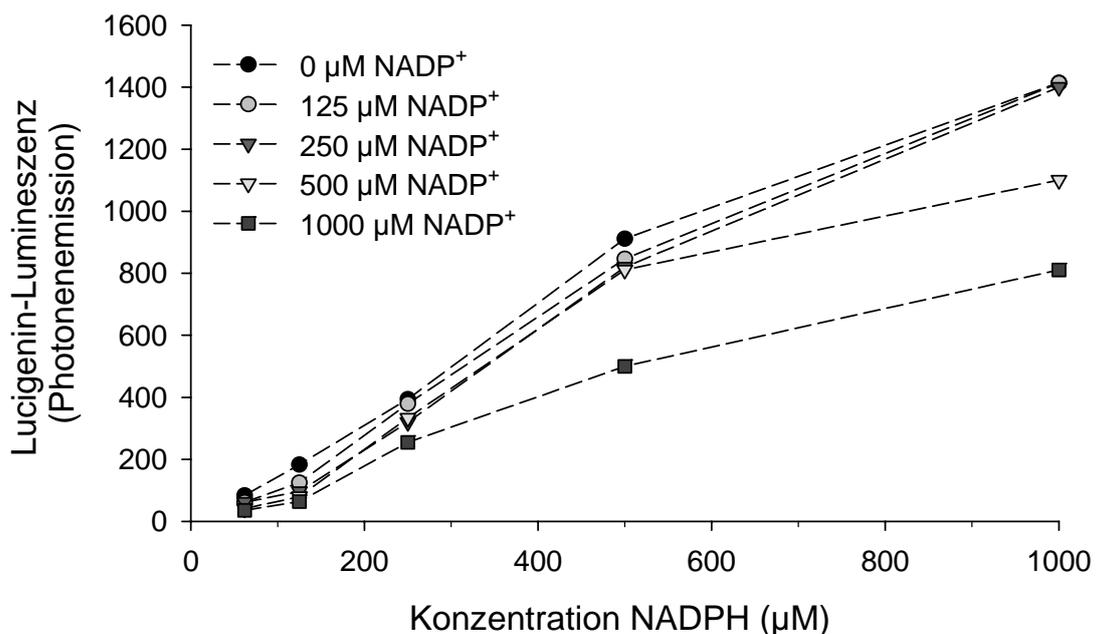
Tab. 4.1 **Einfluss verschiedener Enzymsubstrate und Inhibitoren auf die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion.** Zell-Lysate von Hep3B wurden mit hohen, jedoch sicher untoxischen Konzentrationen verschiedener Enzyminhibitoren bzw. Substrate inkubiert. Die Tabelle zeigt die Veränderung der $O_2^{\cdot-}$ -Produktion gegenüber der Basalproduktion in % (\pm 1 Standardabweichung). Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,05$) von der Basalproduktion.

4.6 Abhängigkeit der NAD(P)H-Oxidase vom NADPH/NADP⁺-Verhältnis

Das metabolische Gleichgewicht von reduzierten zu oxidierten Nukleotiden liegt normalerweise weit auf Seiten der reduzierten Form und verschiebt sich bei Aktivitätsänderungen NAD(P)H-verbrauchender Vorgänge. Durch Einsatz von definierten molaren Verhältnissen des Redoxpaares NADPH/NADP⁺ wurden

Redoxbedingungen simuliert, wie sie unter extremen Stoffwechselbedingungen auftreten können. NADP^+ wies eine ausgeprägte inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase auf.

Für das Redoxpaar $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ zeigt die Abbildung 4.15 die Details der enzymkinetischen Analyse: Entsprechend einer typischen kompetitiven Hemmung zeigen die Sekundärdarstellungen einen linearen Anstieg von $K_{M\text{apparent}}/v_{\text{maxapparent}}$ mit ansteigender NADP^+ -Konzentration bei einem annähernd konstanten Wert für $1/v_{\text{max}}$. Der Schnittpunkt der Darstellung von $K_{M\text{apparent}}/v_{\text{maxapparent}}$ mit der Abszisse entspricht der kompetitiven Inhibitionskonstante $K_{i\text{c}}$. Diese betrug für NADP^+ 1167.

A**B**

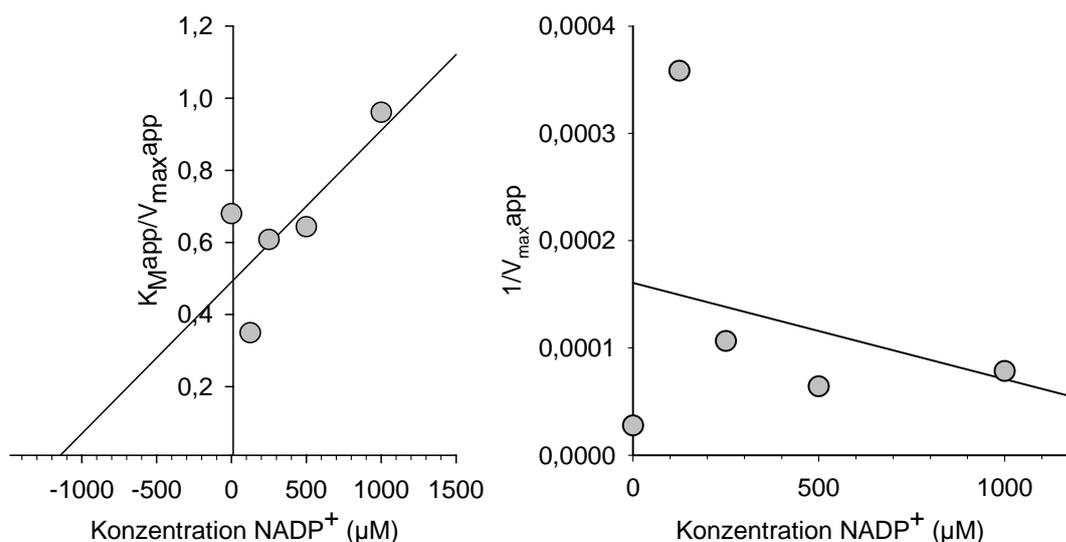


Abb. 4.15 **Einfluss von NADP⁺ auf die NADPH-induzierte O₂⁻-Produktion.** Lysate von Hep3B wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-1000 µM, vgl. Legende) von NADP⁺ vorinkubiert. In Abbildung **A** ist die Dosis-Wirkungsbeziehung der NADPH-induzierten Lucigenin-Lumineszenz dargestellt. Für Abbildung **B** wurden die Medianwerte der apparenten K_M und der apparenten v_{max} bei den verschiedenen Inhibitor (NADP⁺)-Konzentrationen bestimmt und der Quotient von K_Mapp und v_{max}app (links) bzw. der Reziprokwert von v_{max}app (rechts) gegen die zugehörige Inhibitorkonzentration aufgetragen.

4.7 Expression von Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase in Hep3B und HepG2

Anhand publizierter Sequenzdaten wurden geeignete Primeroligonukleotidpaare für den Nachweis der Transkription funktionell interessanter Genregionen mit der RT-PCR ausgewählt. Als Positivkontrollen für sämtliche RT-PCR-Protokolle dienen RNA-Isolate aus immortalisierten humanen Leukämiezell-Linien wie HL-60 oder PLB sowie aus primären Leukozyten, die im Ficoll-Hypaque-Gradienten aus heparinisiertem Vollblut isoliert wurden. Die genannten Zellen verfügen über alle Komponenten der NAD(P)H-Oxidase und wiesen die für Phagozyten charakteristische Fähigkeit zum „oxidative burst“ auf. Die Expression der Untereinheiten NAD(P)H-Oxidase durch diese Zellen wurde in der RT-PCR und funktionell anhand der Fähigkeit auf inflammatorische Stimuli mit einem „respiratory burst“ zu antworten, überprüft.

In Hep3B und HepG2 gelang der Nachweis der Expression von p22^{phox}, p67^{phox} und gp91^{phox}. Die PCR-Produkte erwiesen sich hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Eigenschaften als identisch mit den jeweiligen Positivkontrollen aus primären Leukozyten oder durch DMSO-Behandlung differenzierten PLB-985. Als Negativkontrolle dienten undifferenzierte PLB-985 (Abb. 4.16). Zur Bestimmung des Homologiegrades wurden gp91^{phox}-Amplifikate aus Hep3B, HepG2 sowie aus primären Leukozyten sequenziert. Der Sequenzvergleich zeigte einen Homologiegrad von 95% (Abb. 4.17).

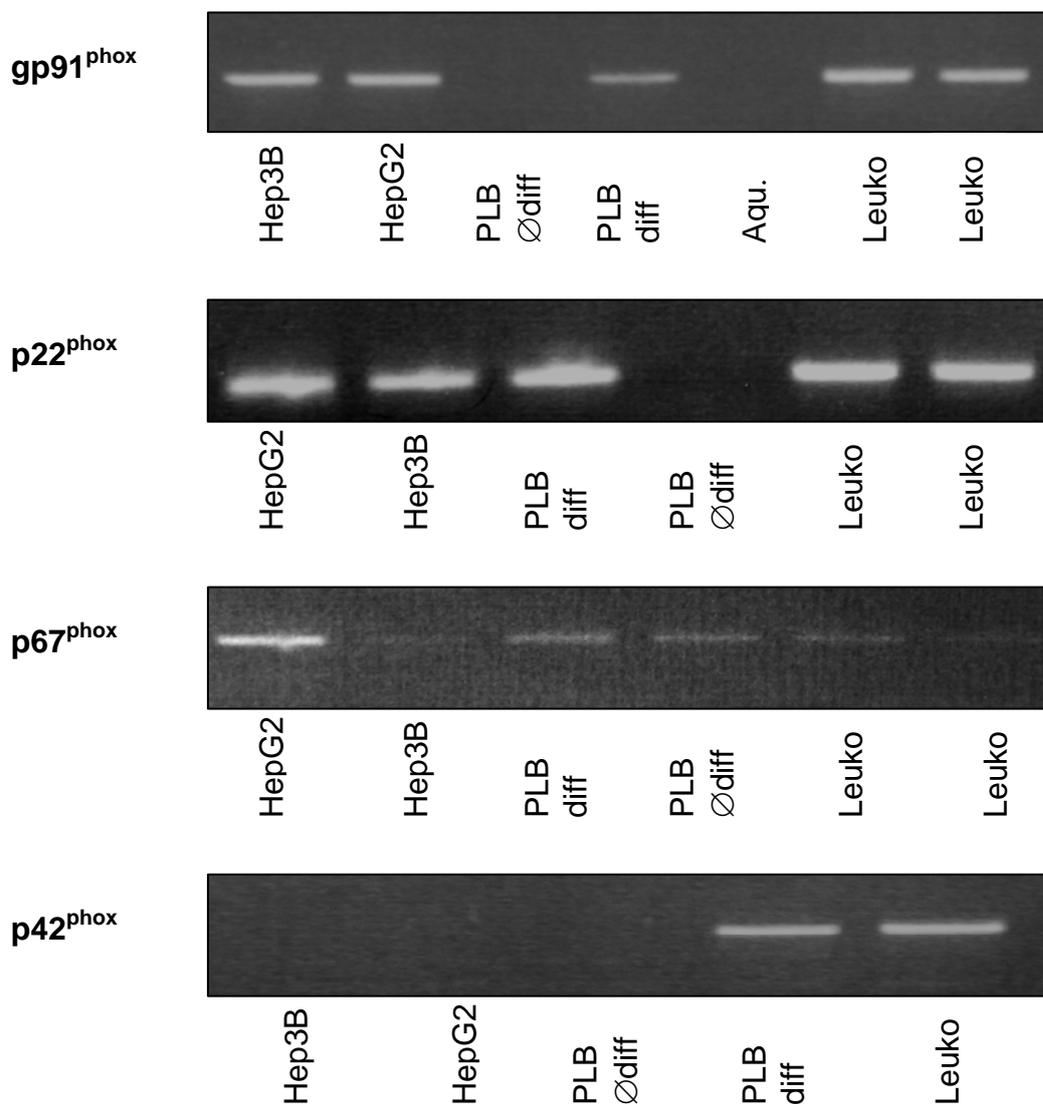


Abb. 4.16 Nachweis von Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase in Hepatomzellen und Leukocyten durch RT-PCR.

HepG2:	34	aataggagttttcctt	gtggacctgaagccttg	gctgaaaccctgagta	aaacaaagcat	93
Sbjct:	1607	aataggagttttcctt	gtggacctgaagccttg	gctgaaaccctgagta	aaacaaagcat	1666
<i>P47^{phox} binding region</i>						
HepG2:	94	ctccaactCTGAGTCTGGCCCTCGG	ggaAGGNAGAGG	cattt	gtcaacaaggaaaactnc	153
Sbjct:	1667	ctccaactCTGAGTCTGGCCCTCGG	ggaGTGCATTT	-cattt	-tcaacaaggaaaacttc	1724
<i>Flavin shield area</i>						
HepG2:	154	caacttgactcttncatgagg	aaataaatgtgggttg	tgctgncaaatgctcna	ataatg	213
Sbjct:	1725	caacttgcctcttccatgagg	aaataaatgtgggttg	tgctgccaatgctcaa	ataatg	1784
HepG2:	214	ctaattgataatataaataccc	ctgcttaaaaatggacaaa	agaactataatgta	at	273
Sbjct:	1785	ctaattgataatataaataccc	ctgcttaaaaatggacaaa	agaactataatgta	at	1844
HepG2:	274	ggttttcccttaaaggaatgt	caaagattggttgatagt	gataagttacatttat	gtgga	333
Sbjct:	1845	ggttttcccttaaaggaatgt	caaagattggttgatagt	gataagttacatttat	gtgga	1904
HepG2:	334	gctctatggttttgagagcact	ttttac			360
Sbjct:	1905	gctctatggttttgagagcact	ttttac			1931

Abb.4.17 **Vergleich des gp91phox-Amplifikats aus HepG2 mit publizierten Sequenzdaten.** Eine Teilsequenz des gp91phox-Transkripts wurde mit der RT-PCR amplifiziert und anschliessend sequenziert. Die Sequenzdaten wurden mit dem BLAST-Algorithmus des „National Centre for Biotechnological Information“ (www.ncbi.nlm.nih.gov) analysiert. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Sequenzvergleichs in einer funktionell bedeutsamen Region. Nicht-identische Basenpaare sind grau unterlegt. Lesefehler („n“) wurden nicht berücksichtigt.

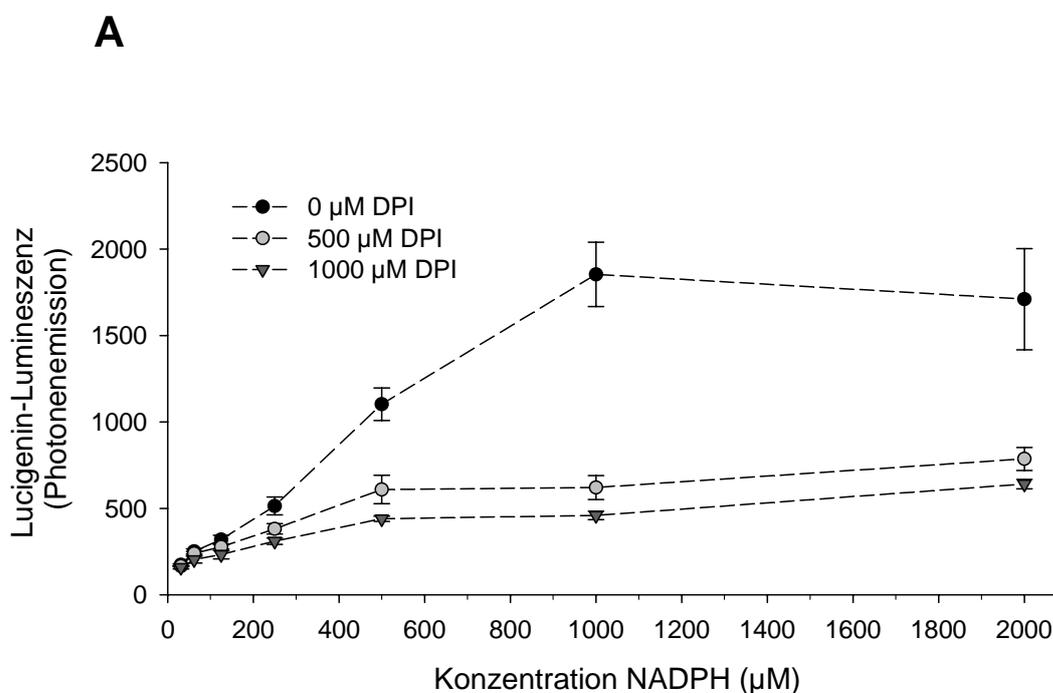
Bei der RT-PCR von p22_{phox} traten auch unter optimalen Amplifikationsbedingungen unspezifische Nebenprodukte auf. Um dennoch genug qualitativ hochwertiges Amplifikat für eine Sequenzierung zu erhalten, wurde die cDNA aus der spezifischen Bande für p22^{phox} isoliert und erneut amplifiziert. Hierzu wurde die Bande unter UV-Licht (325 nm) aufgesucht und unter sterilen Bedingungen entnommen. Das Gelstück wurde in Gegenwart eines chaotropen Reagens (Triton-X) bei 57°C geschmolzen. Die freie DNA wurde durch Zentrifugation über Filterpapier in TE-Puffer eluiert. Die erneute Amplifikation ergab eine singuläre Bande und konnte sequenziert werden. Der Homologiegrad betrug im untersuchten Sequenzabschnitt 100%.

4.8 Effekte des NAD(P)H-Oxidaseinhibitors DPI

4.8.1 Hemmung der NAD(P)H-Oxidase durch DPI

Der mit fMLP induzierte „oxidative burst“ in Phagozyten war nach Vorinkubation mit submikromolaren Konzentrationen von DPI deutlich vermindert. Die DPI-Konzentration, bei der die NADPH-Oxidaseaktivität auf 50% reduziert war (IC_{50}), betrug 820 ± 71 nM.

Auch in Hepatomzellen waren sowohl die basale als auch die durch NADPH oder NADH induzierte ROS-Produktion vermindert, wobei sich in diesen Zellen die kinetischen Parameter und der Inhibitionsmodus für beide Nukleotide unterschieden: Die K_M unbehandelter Zellen für NADPH betrug $449,8 \mu\text{M}$. Nach Präinkubation mit 500 (1000) nM DPI reduzierte sich diese auf $140,1$ ($100,8$) μM . Die maximale Umsatzrate wurde dabei auf 36 (25)% der Kontrollwerte reduziert. Entsprechend einer *unkompetitiven* Inhibition veränderten sich für NADPH in Gegenwart von DPI sowohl Substrataffinität als auch die maximale Umsatzrate. Für diese Art der Hemmung ist auch der konstante Quotient K_{Mapp}/v_{maxapp} charakteristisch. Die unkompetitive Inhibitionskonstante K_{iu} betrug 366,7 (Abb 4.18).



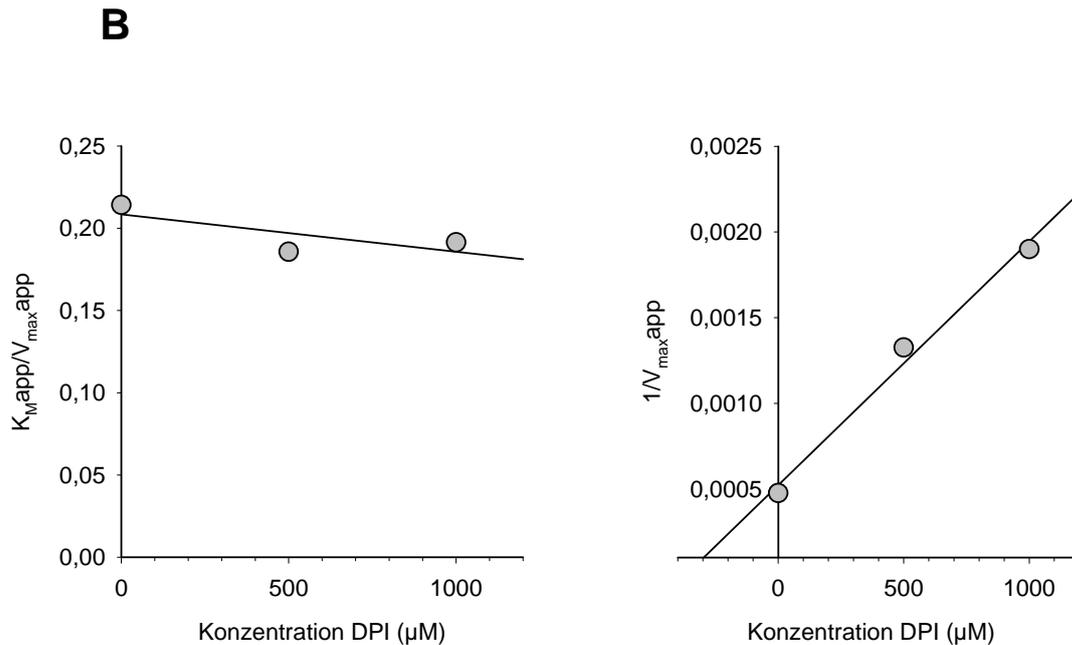


Abb. 4.18 **Einfluss von Diphenyliodoniumchlorid (DPI) auf die NADPH-induzierte $O_2^{\cdot-}$ -Produktion.** Lysate von Hep3B wurden für 20 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 500 nM, 1000 nM, vgl. Legende) DPI vorinkubiert. In Abbildung **A** ist die Dosis-Wirkungsbeziehung der NADPH-induzierten Lucigeninlumineszenz. Für Abbildung **B** wurden die Medianwerte der apparenten K_M und der apparenten v_{max} (links) bzw. der Reziprokwert von v_{maxapp} (rechts) bei den verschiedenen Inhibitor (DPI)-Konzentrationen bestimmt und der Quotient von K_{Mapp} und v_{maxapp} gegen die zugehörige Inhibitor-Konzentration aufgetragen ($n=8$).

Bei NADH lag eine *nichtkompetitive* Hemmung vor: Die K_M veränderte sich auch in Gegenwart des Inhibitors mit 56,4 vs. 58,3 (66,1) μM (unbehandelte bzw. mit 500 [1000] nM DPI behandelte Zellen) nur unwesentlich ($K_{Mapp} \approx K_M$), während die maximale Reaktionsgeschwindigkeit auf 63,3 (48,8) % der Kontrollwerte abfiel (Abb. 3.21). Da für eine reine nichtkompetitive Hemmung $K_{ic} = K_{iu}$ gilt, muss hier von einer minimalen kompetitiven Komponente ausgegangen werden ($K_{ic} = 698,1$; $K_{iu} = 970,7$) (Abb. 4.19).

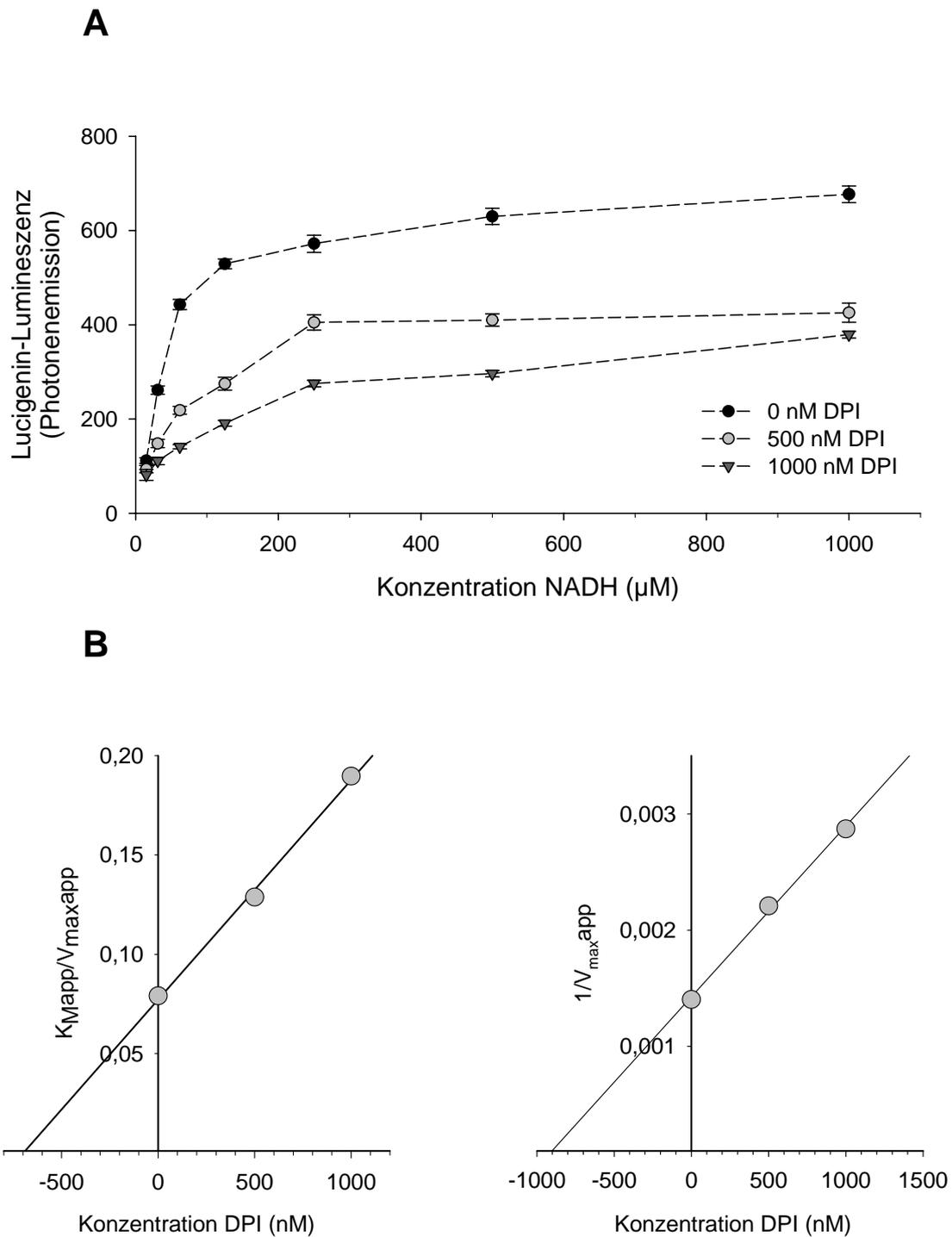


Abb. 4.19 **Einfluss von Diphenyliodoniumchlorid (DPI) auf die NADH-induzierte $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Produktion.** Lysate von Hep3B wurden für 20 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 500 nM, 1000 nM, vgl. Legende) DPI vorinkubiert. In Abbildung **A** ist die Dosis-Wirkungsbeziehung der NADH-induzierten Lucigeninlumineszenz dargestellt. Für Abbildung **B** wurden die Medianwerte der apparenten K_M und der apparenten v_{max} (links) bzw. der Reziprokwert von $v_{max,app}$ (rechts) bei den verschiedenen Inhibitor (DPI)-Konzentrationen bestimmt und der Quotient von K_{Mapp} und $v_{max,app}$ gegen die zugehörige InhibitorKonzentration aufgetragen ($n=8$).

Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) war mit 310 ± 26 nM (bestimmt in Lysaten von Hep3B nach 20 Minuten Präinkubation mit DPI und Stimulation mit $125 \mu\text{M}$ NADPH) vergleichbar mit für Leukozyten bestimmten IC_{50} (820 ± 71 nM).

4.8.2 Einfluss von DPI auf die O_2 -abhängige Genexpression

Die im RIA gemessene EPO-Expression in HepG2-Zellen war nach einer 24-stündigen Inkubation mit DPI vermindert (Abb. 4.20).

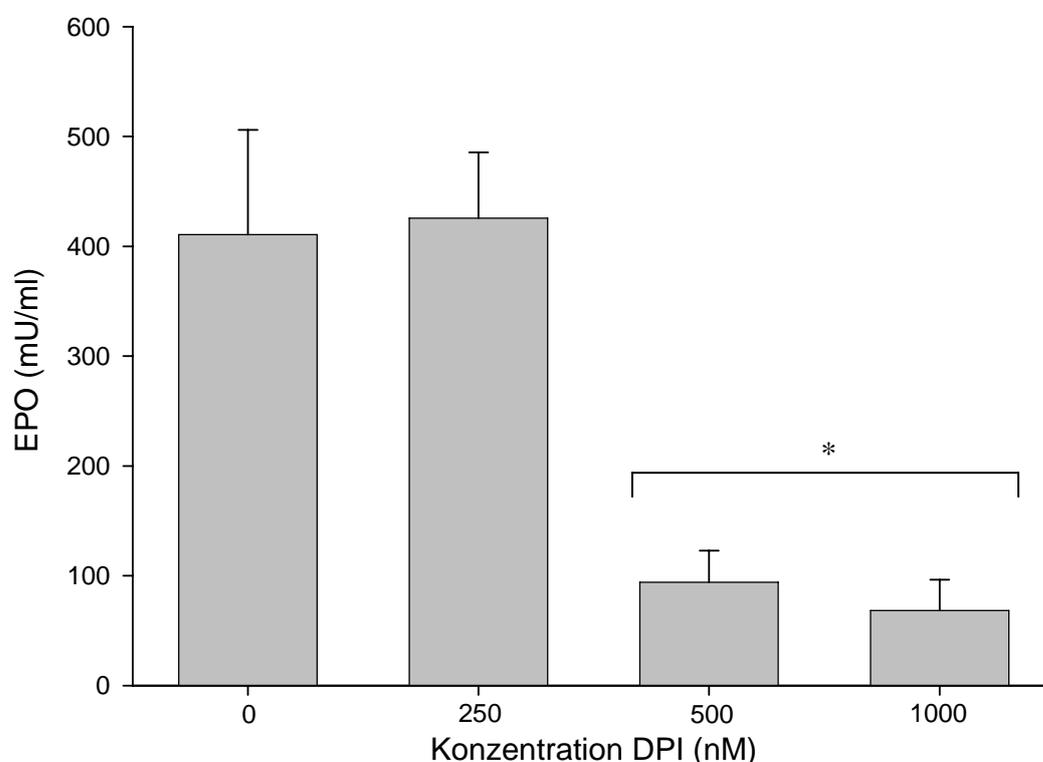


Abb. 4.20 **Einfluss von Diphenyliodoniumchlorid (DPI) auf die hypoxieinduzierte Produktion des EPO-Proteins.** HepG2-Zellen wurden 24 Stunden mit DPI in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der Konzentration des in den Zellkulturüberstand sezernierten EPO-Proteins unter Hypoxie (3 % O_2) ($n=6$).

Die Verschiebungen der Reportergenaktivität wiesen ein biphasisches Verhalten auf: Nach einer wahrscheinlich durch Reoxygenierung bedingten Reduktion der Reportergenaktivität innerhalb der ersten 2 Stunden nach Zugabe von $100 \mu\text{M}$ DPI war die Expression des Reportergens bereits nach 4 Stunden auf etwa 180% der

Basalrate gesteigert. Die H_2O_2 -Konzentrationen waren zu diesem Zeitpunkt deutlich vermindert. Nach etwa 7 Stunden kehrten sich die Verhältnisse um: Parallel zu einer erhöhten H_2O_2 -Konzentration fiel die Luciferasegenexpression auf unter 50% der Kontrollwerte ab. Diese Hemmung bestand noch nach 24 Stunden (Abb. 4.20). Als mögliche Ursache konnte eine leicht gesteigerte Aktivität der SOD bei unveränderter Aktivität der Katalase beobachtet werden (Abb. 4.21). Unterschiede der SOD-Expression konnten im Immunoblot nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 4.22).

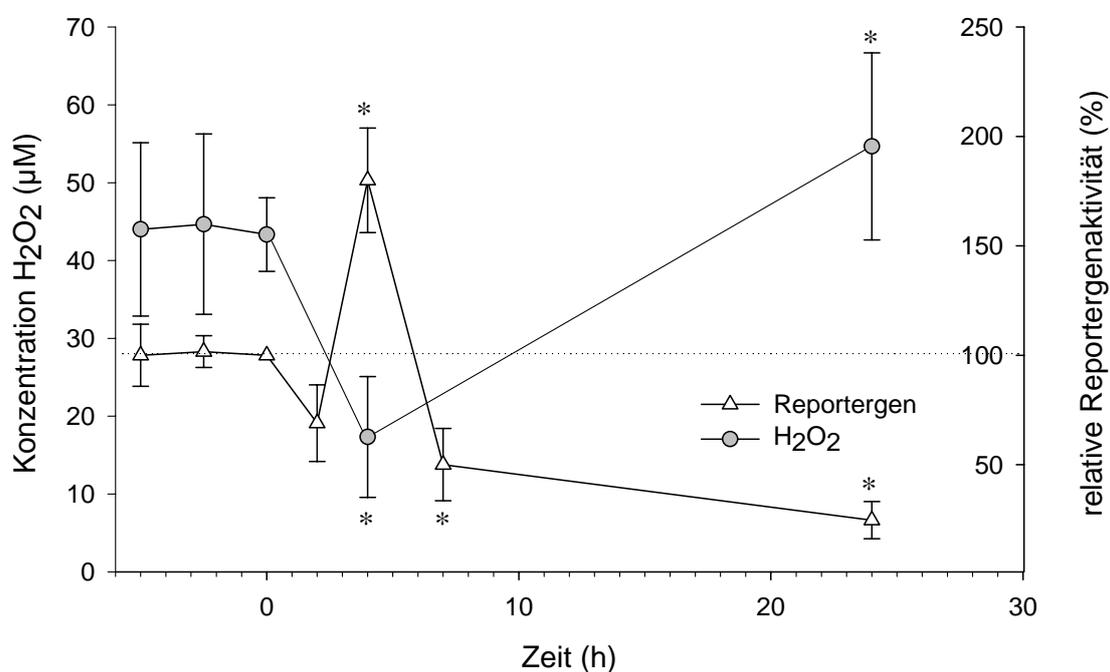


Abb. 4.20 **Einfluss von Diphenyliodoniumchlorid (DPI) auf H_2O_2 -Produktion und Reportertranskription.** EPO3-Zellen wurden bei 3% O_2 mit 100 μM DPI inkubiert. DPI wurde zum Zeitpunkt $t=0$ hinzugegeben. Die H_2O_2 -Produktion und die Reportergenaktivität wurden parallel verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der absoluten H_2O_2 -Konzentrationen ($n=6$) und die auf unbehandelte Kontrollen ($n=6$) bezogenen Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der relativen Reportergenaktivität ($n=5$). Die gestrichelte Linie entspricht der Reportergenaktivität unbehandelter Kontrollen bei 3% O_2 .

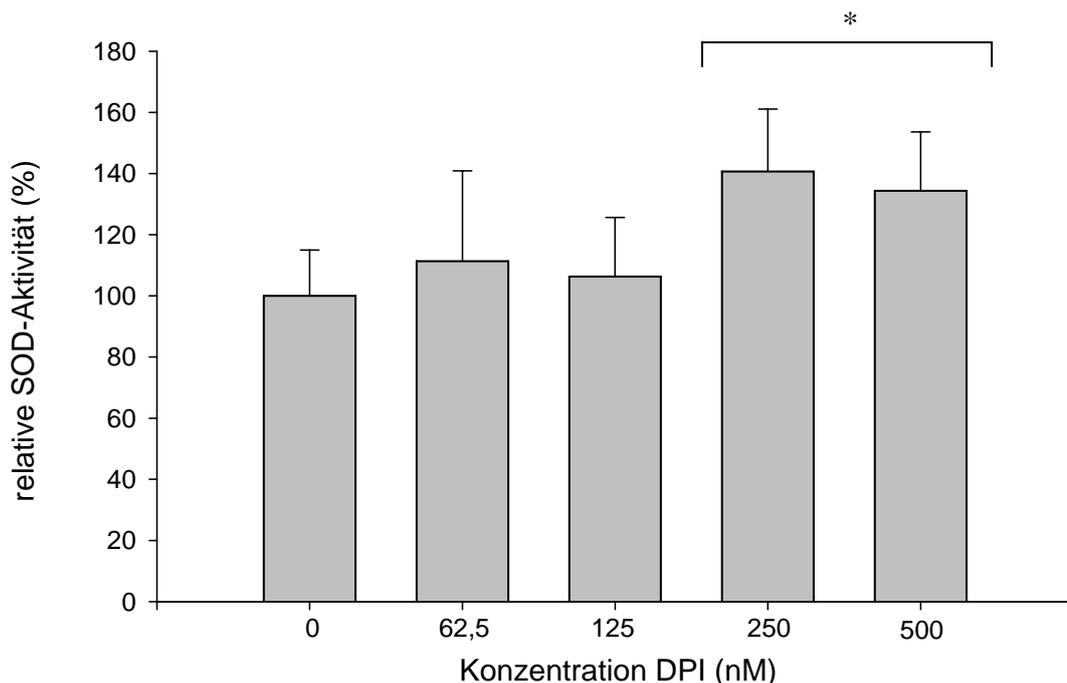
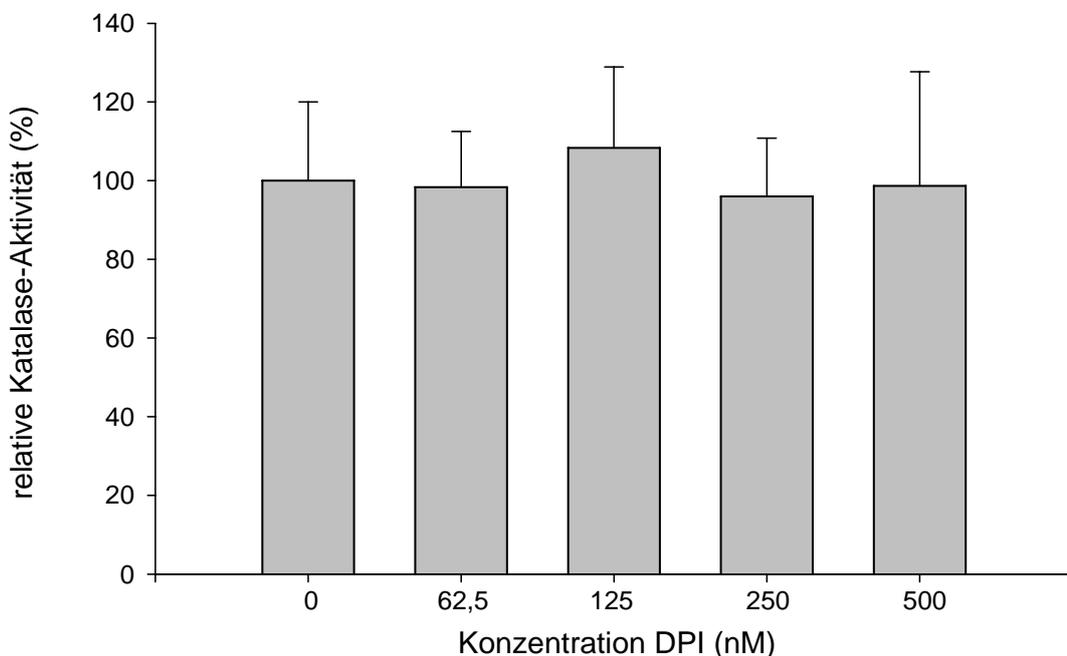


Abb. 4.21.1 **Einfluss von Diphenyliodoniumchlorid (DPI) auf die Aktivität von Superoxiddismutase (SOD).** Hep3B-Kulturen wurden über 45 Minuten mit unterschiedlichen DPI-Konzentrationen behandelt. Die SOD-Aktivität wurde in Lysaten gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der Enzymaktivitäten in Relation zu unbehandelten Kontrollen (n=6).



s

Abb. 4.21.2 **Einfluss von Diphenyliodoniumchlorid (DPI) auf die Aktivität von Katalase.** Hep3B-Kulturen wurden über 45 Minuten mit unterschiedlichen DPI-Konzentrationen behandelt. Die Katalaseaktivität wurde in Lysaten gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der Enzymaktivitäten in Relation zu unbehandelten Kontrollen (n=6).

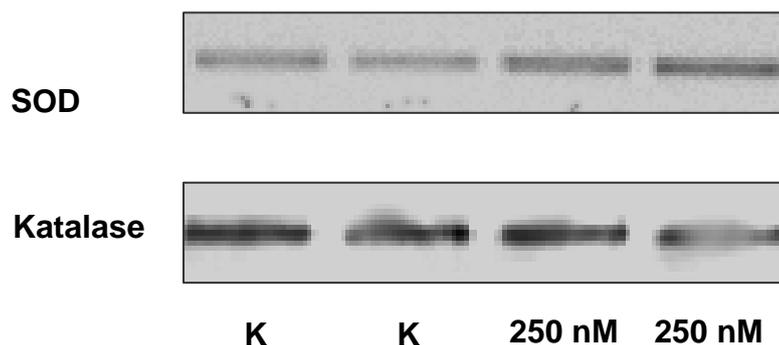


Abb. 4.22 **Einfluss von DPI auf die Expression von Superoxiddismutase (SOD) und Katalase.** Hep3B-Kulturen wurden über 24 Stunden mit 250 nM DPI behandelt bzw. unbehandelt gelassen (K=Kontrolle). Die Zell-Lysate wurden im Immunoblot (Western blot) analysiert (n=2).

4.9 Effekte von Stickstoffmonoxid (NO)

4.9.1 Wirkung von NO auf die NAD(P)H-Oxidase

Bei Inkubation von Hepatomzellen mit ansteigenden Konzentrationen des synthetischen NO-Donors Spermin-NONOat fiel eine Verminderung der Lucigenin-Lumineszenz auf. Zur näheren Charakterisierung dieses Effektes wurde die Umsetzung von NADPH in Gegenwart verschiedener NO-Donoren und strukturanaloger Negativkontrollen untersucht [88]. Die mediane apparente K_M für NADPH stieg nach einer Präinkubation mit 250 μM Spermin-NONOat von 495 μM auf 719 μM bei weitgehend konstanter v_{max} . In Gegenwart von 500 μM betrug die apparente K_M 2198 μM . Unter Zugabe sehr hoher NADPH-Dosen war diese Inhibition voll reversibel. Der Verlauf der aus dem „direct linear plot“ abgeleiteten Sekundärarstellungen legt die Annahme nahe, dass es sich um eine rein kompetitive Hemmung mit einer Inhibitionskonstanten von $K_{\text{ic}}=412$ handelt (Abb. 4.23).

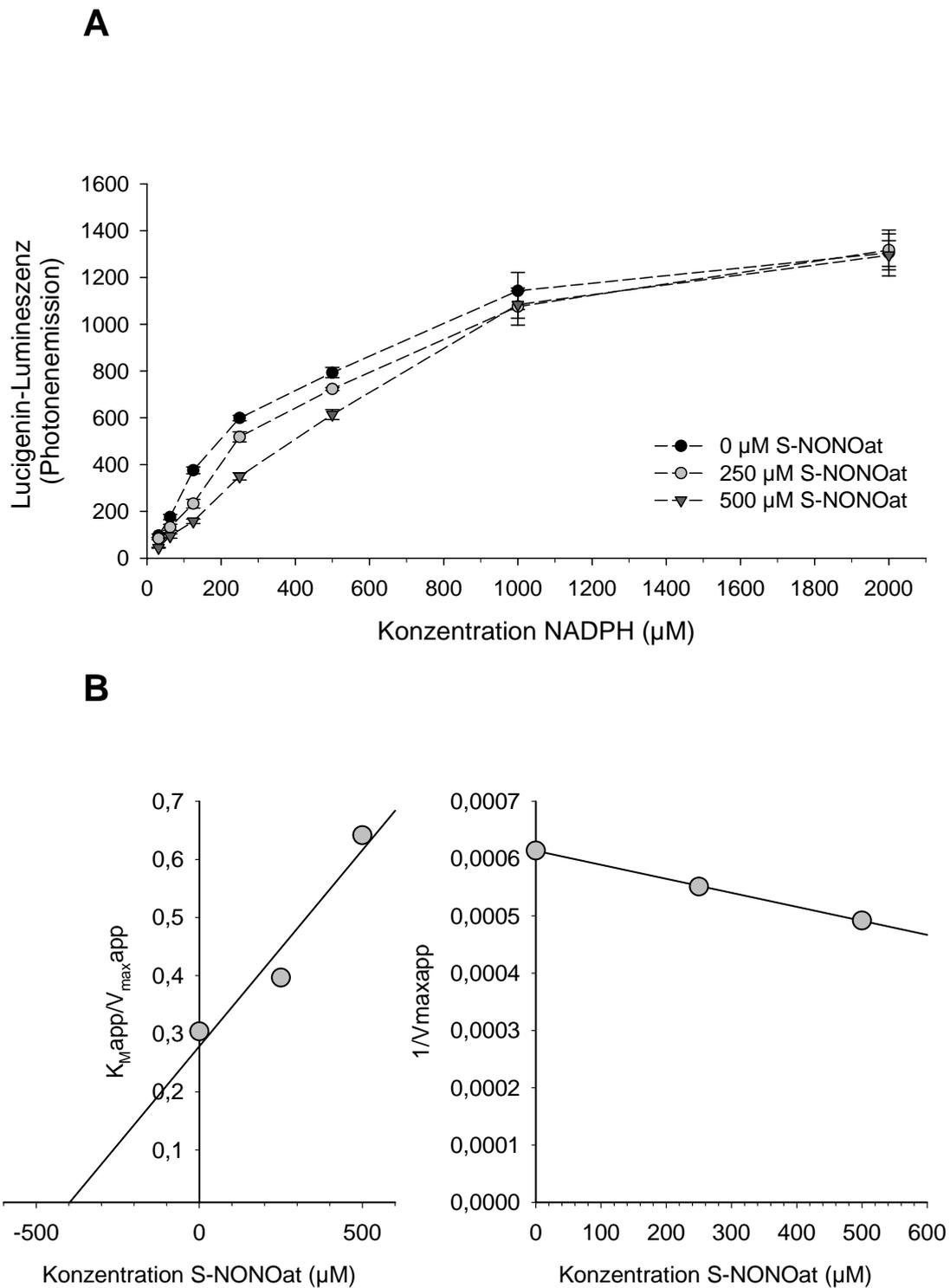


Abb. 4.23 **Einfluss des NO-Donors Spermin-NONOat auf die NADPH-induzierte O_2^- -Produktion.** Lysate von Hep3B wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-500 μM , vgl. Legende) von S-NONOat vorinkubiert. In Abbildung A ist die Dosis-Wirkungsbeziehung der NADPH-induzierten Lucigeninlumineszenz dargestellt. Für Abbildung B wurden die Medianwerte der apparenten K_M und der apparenten v_{max} bei den verschiedenen Inhibitor (S-NONOat)-Konzentrationen bestimmt und der Quotient von $K_{M,app}$ und $v_{max,app}$ (links) bzw. der Reziprokwert von $v_{max,app}$ (rechts) gegen die zugehörige Inhibitorkonzentration aufgetragen ($n=4$).

Um sicherzustellen, dass die Inhibition spezifisch durch NO selbst, nicht aber durch eine pharmakologische Eigenwirkung der Trägersubstanz (Spermin) vermittelt wurde, wurde diese in Kontrollexperimenten bei pH=8,0 mit dem Zellsystem inkubiert. Bei diesem pH (der von den Zellen kurzfristig gut toleriert wird) war die spontane NO-Freisetzung durch den Donor auf 25% der bei pH=7,4 gemessenen Rate reduziert (Messung in Hep3B-Zellkulturen durch Prof. Fandrey mit einer NO-sensitiven Elektrode [World Precision Instruments Inc, Sarasota, Florida, USA]). Unter diesen Bedingungen konnte kein signifikanter Effekt auf die ROS-Produktion nachgewiesen werden (Kontrolle $100 \pm 21\%$; $250\mu\text{M}$ $103 \pm 26\%$, nicht signifikant). Die Hemmung der NADPH-Oxidaseaktivität konnte in Parallelexperimenten auch mit weiteren strukturell andersartigen NO-Donoren, so z.B. SNAP (S-Nitroso-N-acetylpenicillamin), nachvollzogen werden. Eine Beeinträchtigung des luminometrischen Nachweises von O_2^- wurde in Kontrollexperimenten mit zellfreien Systemen ausgeschlossen.

4.9.2 Einfluss von NO auf H_2O_2 -Produktion und O_2 -abhängige Genexpression

Messungen der EPO-Proteinspiegel im Zellkulturüberstand zeigten, dass die hypoxieinduzierbare EPO-Expression in beiden Hepatomzell-Linien durch Spermin-NONOat dosisabhängig gehemmt wurde, während die EPO-Expression unter Normoxie konstant blieb. (Abb. 4.24).

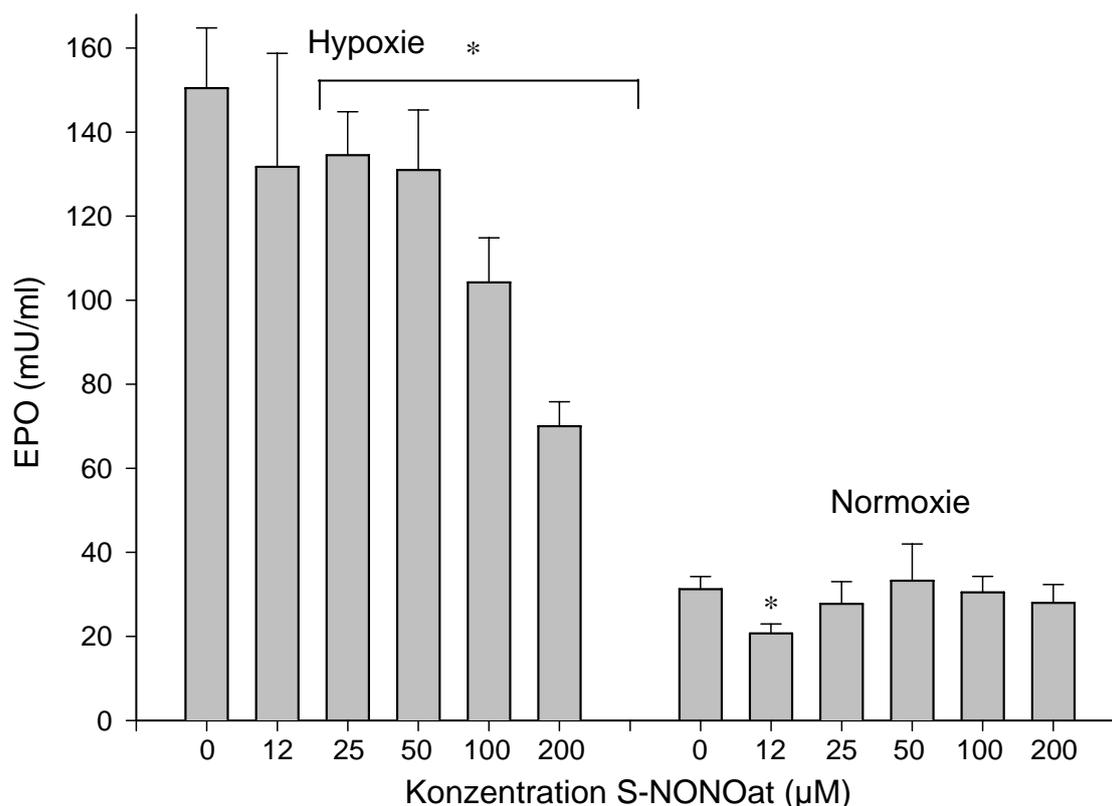


Abb. 4.24 **Einfluss von Spermin-NONOat auf die hypoxieinduzierte Produktion des EPO-Proteins.** HepG2-Zellen wurden 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des NO-Donors inkubiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der im RIA bestimmten Konzentration des in den Zellkulturüberstand sezernierten EPO-Proteins unter Hypoxie (3 % O₂) und Normoxie (20 % O₂) (n=4).

In den gleichen Konzentrationen wie das aktive Strukturisomer Spermin-NONOat eingesetzt, blieb ein Strukturanalagon, das kein NO freisetzt (Spermintetrahydrochlorid), ohne Effekt auf die EPO-Produktion.

Verfolgte man die H₂O₂- und NO Konzentrationen sowie die Expression des EPO3-Reportergens in Spermin-NONOat-behandelten Zellen parallel über längere Zeiträume hinweg, zeigte sich ein komplexes Verhalten (Abb. 4.25): Auf die akut unter Inkubation mit SNAP auftretende Hemmung der H₂O₂-Produktion folgte mit einer Verzögerung von etwa 4 Stunden ein sukzessiver Übergang in eine Phase mit vermehrter Produktion von H₂O₂.

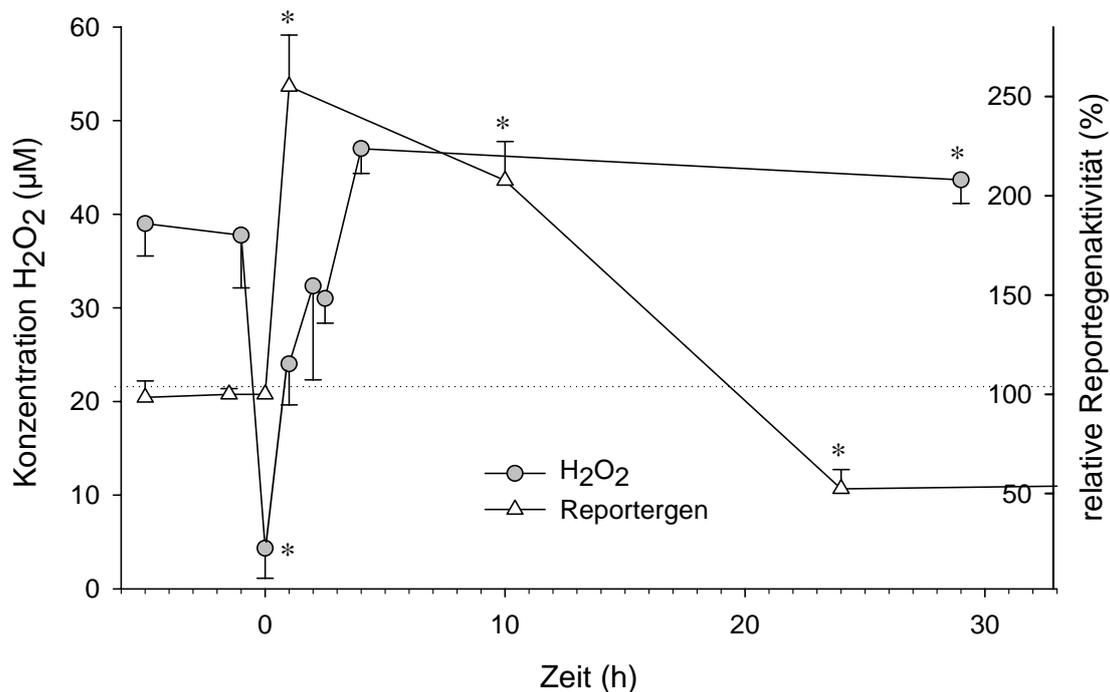


Abb. 4.25 **Einfluss von Spermin-NONOat auf H₂O₂-Produktion und Reportertranskription.** EPO3-Zellen wurden bei 3% O₂ mit 250 µM des NO-Donors Spermin-NONOat inkubiert. Die H₂O₂-Produktion und die Reportertranskription wurden nach Zugabe von S-NONOat zum Zeitpunkt t=0 parallel verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der absoluten H₂O₂-Konzentrationen (n=6) und die auf unbehandelte Kontrollen (n=6) bezogenen Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der relativen Reportertranskription (n=5). Die gestrichelte Linie entspricht der Reportertranskription unbehandelter Kontrollen bei 3% O₂. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Standardabweichung nur in eine Richtung dargestellt

Die NO-Konzentrationen nach einem Spermin-NONOat-Bolus (Endkonzentration 250 µM) wurden im Kulturüberstand mit der NO-sensitiven Elektrode verfolgt. Initial wurden Spitzenwerte von 6,3 µM NO über 9 bis 10 Minuten erreicht, die nach etwa 20 Minuten auf ein stabiles Niveau von 2,6 \pm 0,2 µM abfielen. Nach etwa 200 Minuten fielen die Konzentrationen innerhalb der nächsten 9 Stunden auf 250 \pm 40 nM ab. Spätestens nach 16 Stunden konnte keine NO-Freisetzung mehr registriert werden. Eine ähnliche Zeitcharakteristik wurde auch für SNAP beobachtet.

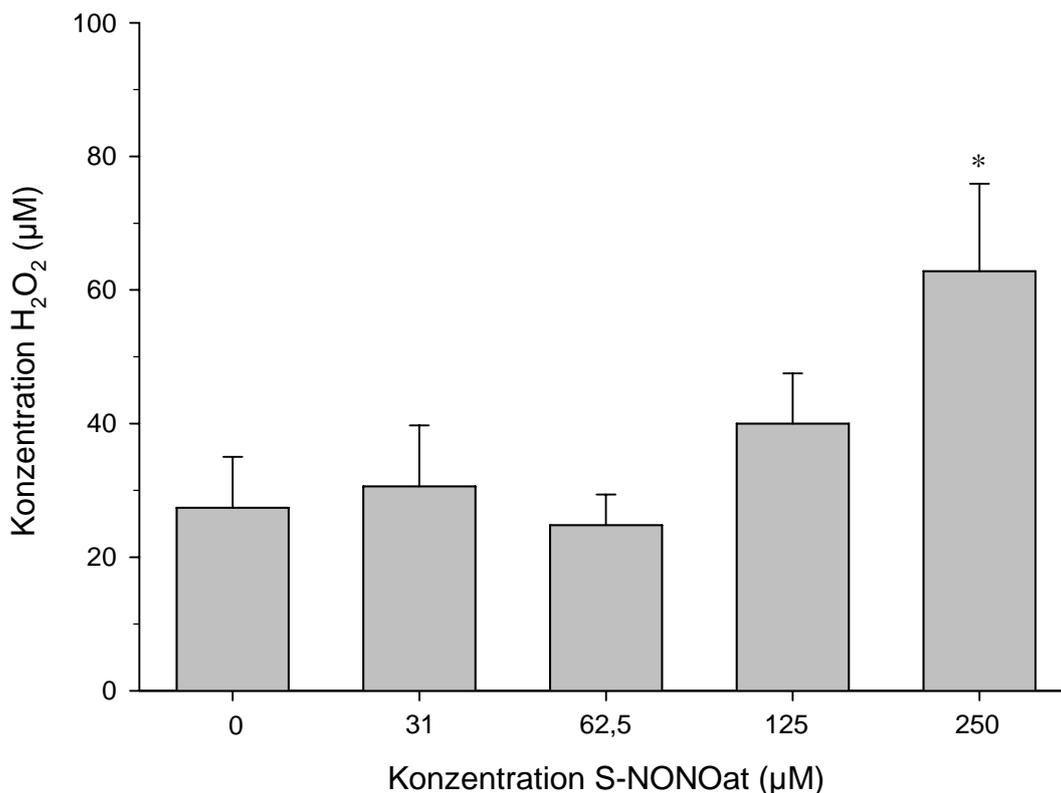


Abb. 4.26 **Einfluss von Spermin-NONOat auf die Konzentration von H₂O₂.** EPO3-Kulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des NO-Donors bei 3% O₂ inkubiert. Nach 26 Stunden wurde die H₂O₂-Konzentration im Überstand bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (± 1 Standardabweichung) der H₂O₂-Konzentration in μM (n=6).

Parallel zur akuten Reduktion der H₂O₂-Konzentration durch 250 μM Spermin-NONOat konnte eine vermehrte Aktivität im EPO3-Reporterassay festgestellt werden. Mit den im weiteren Zeitverlauf wieder ansteigenden H₂O₂-Konzentrationen normalisierte sich die Transkription des EPO-Gens wieder, um schliesslich in eine noch nach 55 Stunden nachweisbare Hemmung überzugehen, die mit anhaltend erhöhten H₂O₂-Spiegeln korrespondierte (Abb. 4.26).

Die Aktivität der Katalase war nach 3-stündiger Inkubation mit 250 μM Spermin-NONOat deutlich und dauerhaft reduziert ($51 \pm 10\%$ der Kontrollwerte, $p < 0,05$).

Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine ähnliche Zeitcharakteristik: Hierzu wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation mit dem NO-Donor SNAP unter den gleichen Bedingungen wie im zuvor beschriebenen Experiment die relative Menge von EPO-Gentranskripten durch RT-PCR ermittelt. Hierbei trat ein zu den anderen Parametern analoges Verhalten zutage. Am deutlichsten war die Stimulation der EPO-Gentranskription nach 3,25 Stunden. Zur Kontrolle aus der gleichen cDNA amplifiziertes β -Actin und GAPDH wurden über den Inkubationszeitraum konstant exprimiert und blieben von Spermin-NONOat unbeeinflusst (Abb. 4.27).

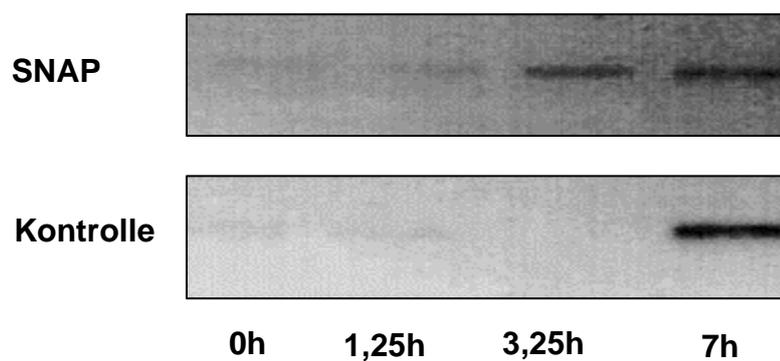


Abb. 4.27 **Zeitlicher Verlauf der EPO-mRNA Transkription nach Behandlung mit SNAP.** Die Abbildung zeigt den Zeitverlauf der hypoxieinduzierten EPO-Genexpression (3% O₂) in Gegenwart von 250 μ M des NO-Donors SNAP, sowie in unbehandelten Kontrollen. Die Genexpression wurde mit der RT-PCR analysiert. Aufgrund der schwachen Signale wurde eine Negativdarstellung des Elektrophorese gewählt.

Spermintetrahydrochlorid diente wiederum als Negativkontrolle für Spermin-NONOat. Diese Substanz hatte keinen Einfluss auf die Luciferasereporterexpression (Kontrolle $100 \pm 8\%$; 250 μ M $91 \pm 14\%$, nicht signifikant) und auf die Expression des EPO-Gens. Zur Überprüfung unspezifischer Effekte von NO-Donoren auf das Reportersystem wurden identische Experimente mit Hep3B-Zellen, die nur transient mit dem nativen pGL2-Vektor (Luciferasegen unter der Kontrolle des SV40 Promoter/Enhancers) transfiziert waren, durchgeführt. In diesen Zellen hatten 250 μ M Spermin-NONOat oder Veränderungen des pO₂ keinen Effekt.

5. Diskussion

5.1 Das Konzept des „O₂-Sensors“

Variable Umweltbedingungen machen eine physiologische Anpassung erforderlich. Für den Faktor Sauerstoff ist die rasche Verwirklichung und sorgfältige Abstimmung dieser Adaptation besonders kritisch, da der Organismus eine Abweichung vom biologischen Optimum längerfristig nicht ohne Funktionseinbuße oder eine Schädigung toleriert. Auch krankhafte Veränderungen des „milieu interne“, z.B. Störungen der mechanischen Respiration, des konvektiven Gastransportes oder der mitochondrialen Atmungskette, können zu einer Störung des Verhältnisses von O₂-Angebot zu O₂-Bedarf führen.

Ein wesentlicher Teilaspekt dieser Anpassung, der erst in den letzten Jahren zunehmend Beachtung findet, ist die O₂-abhängige Änderung der Expression spezifischer Gene [1, 22]. An einfacheren Organismen wie Prokaryonten oder Hefen durchgeführte molekularbiologische Studien sind nur bedingt übertragbar auf die Verhältnisse in Eukaryonten [26]. Die Hypothese, dass -analog dem in Bakterien verwirklichten Prinzip- die unmittelbare Wechselwirkung eines hämbasierten Transkriptionsfaktors mit O₂ die Genexpression kontrolliert, konnte für Eukaryonten nicht aufrechterhalten werden. Nach dem derzeit favorisierten Modell wird davon ausgegangen, dass der O₂-Sensor O₂-abhängig Signale entsendet, die erst indirekt einen Einfluss auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren ausüben [17, 25, 29, 30]. Als geeigneter Kandidat für ein solches Signalmolekül erwies sich die reaktive Sauerstoffverbindung H₂O₂ [29, 30]. Die Identität des eigentlichen O₂-Sensors, an dem die O₂-abhängige H₂O₂-Produktion erfolgen könnte, blieb zunächst ungeklärt.

5.2 Die Doppelrolle reaktiver Sauerstoffspezies in der Zellbiologie

Die unterschiedlichsten biochemischen Reaktionen konvergieren in der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [32]. Die Gesamtheit der bei diesen Vorgängen anfallenden ROS pflegt man, unabhängig von ihrer Herkunft, Funktion oder

Lokalisation, als „oxidativen Stress“ zu bezeichnen. Dieser stark verallgemeinernde Begriff, wird dem Stellenwert dieser Moleküle in der Zellbiologie nicht gerecht. Tatsächlich mag es zunächst paradox erscheinen, ROS als physiologisch bedeutsame Signalmoleküle zu diskutieren, gerade in einem kritischen Funktionsbereich wie der Regulation genetischer Programme. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die unkontrolliert, z.B. bei Shuntprozessen in der terminalen Oxidation oder bei der Aktivität diverser Oxidasen (Xanthinoxidase, Lipoxygenase, Cyclooxygenase) auftretenden ROS im Hepatomzellmodell auch dann nur einen geringen Anteil an der basalen ROS-Produktion ausmachen, wenn für die Aktivität des jeweiligen Enzyms optimale Reaktionsbedingungen geschaffen werden. Analog hierzu führt bei keinem der genannten Systeme eine selektive Hemmung zu einer signifikanten Abnahme der basalen $O_2^{\cdot-}$ -Synthese. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei Manipulation des Elektronenflusses durch die mitochondrialen Atmungskette mit Inhibitoren und Substraten eine zum Teil erhebliche Stimulation der $O_2^{\cdot-}$ -Synthese erreicht werden kann. Die dabei produzierten ROS dürften jedoch keinerlei Relevanz als Signalüberträger haben, da die Ausstattung der intramitochondrialen Räume mit antioxidativen Enzymen, vor allem Superoxiddismutase, keinen nennenswerten Übertritt der ROS in andere Zellkompartimente zulässt [32]. Gegen eine Beteiligung der Mitochondrien am O_2 -Sensing sprechen weiterhin der äusserst niedrige intramitochondriale pO_2 und die erhebliche Abhängigkeit von metabolischen Fluktuationen [1].

Durch unabhängig von der NAD(P)H-Oxidase produzierte ROS ist also die Gefahr einer Störung eines Regulationssystems, das auf der strikt O_2 -abhängigen Produktion von ROS beruht, faktisch nicht gegeben. Unter normoxischen bis hyperoxischen Bedingungen verschiebt sich die Relation unspezifischer (d.h. nicht O_2 -abhängig gebildeter) zu regulatorisch relevanten (d.h. O_2 -abhängig gebildeten) ROS noch weiter zu Gunsten der letzteren. Dies belegt die potentielle Eignung reaktiver Spezies als zelluläre Botenstoffe und lässt zugleich erahnen, wie tiefgreifend das zelluläre Gleichgewicht beeinträchtigt wird, wenn z.B. vor einem pathophysiologischen Hintergrund ROS in extremen Mengen produziert werden. Die daraus folgende Dysregulation ganzer Gengruppen könnte von zentraler Bedeutung für die molekularen Pathomechanismen der unterschiedlichsten Krankheiten sein. Diskutiert werden solche Zusammenhänge für die Karzinogenese, neurodegenerative

Erkrankungen, Atherosklerose, akute und chronische Lungenerkrankungen, sowie für den Alterungsprozess [32, 89].

5.3 Modulation der EPO-Genexpression durch H₂O₂

Das Ausmass des Effektes selbst geringer Konzentrationen von exogen zugeführtem H₂O₂ auf die EPO-Expression ist angesichts der kurzen endogenen Halbwertszeit dieser reaktiven O₂-Verbindung überraschend. In unseren Inkubationsexperimenten wies H₂O₂ eine Halbwertszeit von etwa 20 Minuten (Bolus von 100 µM H₂O₂ in Hep3B) auf, unterliegt also einem raschen Abbau durch antioxidative Enzyme wie Katalase oder Glutathion-Peroxidase. Noch nach 24 Stunden liessen sich allerdings deutlich verminderte EPO-Konzentrationen nachweisen, während Toxizitätstests durchweg negativ ausfielen. Für die anhaltende Hemmung der EPO-Synthese konnte bislang noch keine plausible Erklärung vorgelegt werden, zumal bekannt ist, dass sich die Konzentration des Transkriptionsfaktors HIF-1α selbst nach vollständiger Depletion rasch wieder erholt [67, 68]. Die Persistenz des H₂O₂-Effektes auf die EPO-Expression kann nur schlüssig erklärt werden, wenn das flüchtige initiale Signal (H₂O₂) sehr viel umfangreichere Veränderungen einleitet als bisher angenommen. Erst dies würde erklären, dass die Transkriptionskontrolle noch wirksam ist, wenn sich der Redoxstatus der Zelle bereits längst wieder normalisiert haben müsste.

Unsere Befunde sprechen für eine H₂O₂-vermittelte negative Regulation antioxidativer Systeme als Grundlage dieses Phänomens. Noch mehr als 24 Stunden nach einem H₂O₂-Bolus waren signifikant erhöhte H₂O₂-Spiegel festzustellen, die auch zeitlich gut mit dem Verhalten der EPO-Expression übereinstimmten. Die NAD(P)H-Oxidase selbst war dabei hinsichtlich ihrer O₂- und Substrataffinität unverändert. Ein antioxidatives Enzym indessen –die Katalase- wies wider Erwarten nach Einwirkung von oxidativem Stress einen verminderten Substratumsatz auf. Um zu unterscheiden, ob es sich dabei um eine Regulation auf der Ebene der Proteinexpression oder der Enzymaktivität handelt, wurden neben den Aktivitätstests auch Immunoblots angefertigt. Diese zeigten eine merklich reduzierte Katalase-Expression nach Inkubation mit H₂O₂. Insgesamt konnte damit ein Mechanismus aufgezeigt werden, der die zeitliche Dynamik der Beziehung zwischen H₂O₂ und EPO plausibel erklären könnte, wengleich die biologische Bedeutung dieses scheinbar paradoxen Zusammenhangs nur schwer zu erkennen ist.

Auf der Grundlage dieser Befunde erscheint es angebracht, die verbreitete experimentelle Praxis bei Inkubationsexperimenten kritisch zu betrachten: Die experimentelle H_2O_2 -Applikation *im Bolus* erscheint wenig geeignet, die endogene *kontinuierliche* H_2O_2 -Produktion unter physiologischen Bedingungen zu simulieren.

5.4 Die NAD(P)H-Oxidase als potentieller O_2 -Sensor

Die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren, ist vielen Enzymen zueigen und qualifiziert als solche noch nicht für die Funktion als O_2 -Sensor. Hierzu müssen weitere funktionelle Voraussetzungen erfüllt sein, die in dieser Arbeit für die NAD(P)H-Oxidase in kinetischen und funktionellen Experimenten untersucht wurden:

Gut vereinbar mit einer Funktion der NAD(P)H-Oxidase als O_2 -Sensor ist die hier gezeigte, im gesamten relevanten pO_2 -Bereich verwirklichte Proportionalität der H_2O_2 -Produktion zum pO_2 : Im Bereich eines sehr niedrigen pO_2 , wie er etwa in gering kapillarisiertem Gewebe vorliegt, reagierte das System bereits auf geringste Verschiebungen des pO_2 mit einer überproportionalen Produktion von H_2O_2 . Im Bereich hoher O_2 -Konzentrationen strebte das System einer Sättigung zu. Diese hyperbole Kurvencharakteristik ermöglicht eine optimale Adaptationsleistung, vor allem im biologisch relevanten pO_2 -Bereich. Oberhalb eines Maximums bei einem pO_2 von ca. 60 mmHg stieg die Syntheserate nur noch unwesentlich. Da solche O_2 -Werte im Gewebe selten erreicht werden, ist dieser Bereich biologisch wenig relevant. Ausgehend von der Modellvorstellung, dass dieses O_2 -abhängige, H_2O_2 -produzierende System die Funktion des gesuchten Sensors wahrnimmt, war mit dieser Arbeit der experimentelle Nachweis zu erbringen, dass die Expression der von diesem System kontrollierten Gene einer ähnlichen Dosis-Wirkungsbeziehung für O_2 folgen müsste wie die H_2O_2 -Produktion.

Methodisch wurden dabei neben der EPO-Proteinbildung auch Veränderungen auf der Transkriptionsebene untersucht. Dieses Vorgehen gewährleistet eine sichere Unterscheidung zwischen einer Transkriptionskontrolle und einer postrationalen Regulation und gestattet damit Aussagen darüber, auf welcher Ebene die eigentliche Regulation, also das „ O_2 -Sensing“ stattfindet. Um ein funktionelles Gesamtbild der Signalkaskade von der Rezeption des pO_2 bis hin zur Genexpression zu erlangen,

wurde zusätzlich in einem Reporterassay die Interaktion des Transkriptionsfaktors HIF-1 mit den korrespondierenden Promotersequenzen des EPO-Gens untersucht. Der Vergleich der in dieser Experimentserie auf Transkriptions- und Proteinebene erhaltenen Dosis-Wirkungsbeziehungen mit der O_2 -Abhängigkeit der H_2O_2 -Produktion legt nahe, dass eine Kausalbeziehung zwischen pO_2 , H_2O_2 und hypoxieinduzierter EPO-Expression vorliegt. Es gelang also, die Signalkaskade für die O_2 -abhängige EPO-Expression zu verfolgen und dabei sowohl Dosis-Wirkungsbeziehungen als auch zeitliche Zusammenhänge aufzuzeigen. Damit erscheint die NAD(P)H-Oxidase als O_2 -Sensor prinzipiell geeignet.

Nach wie vor schwer mit unserem Modell zu vereinbaren ist die Beobachtung, dass genetische Anomalien einzelner Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase, die z.B. als chronische Granulomatose klinisch manifest werden können, nicht mit merklichen funktionellen Defiziten des O_2 -Sensing, z.B. einer dysregulierten Erythropoese, verbunden sind [90-92]. Einerseits könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei der NAD(P)H-Oxidase im Dienste des O_2 -Sensing um eine Isoform handelt, deren Funktion nicht durch die Mutationen beeinträchtigt wird. Andererseits wäre es denkbar, dass mehrere redundante Systeme bei der Kontrolle der O_2 -abhängigen Genexpression kooperieren, so dass geringfügige Normabweichungen toleriert werden können [66, 93]. Auch wenn damit das Konzept eines singulären O_2 -Sensors in Frage gestellt wäre, sprechen unsere Befunde recht eindeutig für eine bedeutende Rolle der NAD(P)H-Oxidase beim „oxygen sensing“. Auch die nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit von verschiedenen Arbeitsgruppen publizierten wegweisenden Befunde zur O_2 -abhängigen kovalenten Modifikation von HIF-1 α durch eine Prolyl-4-Hydroxylase [60-65] stehen nicht im Widerspruch zu unseren Befunden. Es wäre eher verwunderlich wenn die Kontrolle einer so komplexen Funktion wie der O_2 -abhängigen Gentranskription von einem singulären System wahrgenommen würde. Wie diese Systeme interagieren, bedarf weiterer Untersuchungen.

5.5 Vergleich der phagozytären und nicht-phagozytären Isoform der Oxidase

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [52-55] konnte gezeigt werden, dass ein Grossteil der ROS von einer NAD(P)H-metabolisierenden

Oxireduktase produziert wird. Um Einblick in die molekularen Grundlagen des „O₂-Sensings“ zu erhalten, wurde eine genaue Charakterisierung des in Hepatozyten exprimierten Isoenzym angestrebt. Dazu wurde die Metabolisierung der Koenzyme NADH bzw. NADPH enzymkinetisch untersucht.

Hepatomzellen unterschieden sich sehr grundlegend von Phagozyten durch die Spontanaktivität der NAD(P)H-Oxidase. Während es bei Phagozyten eines Stimulus bedurfte, der das Zusammentreten der Untereinheiten des Enzymsystems einleitet und damit den massiven, rasch erschöpflichen „respiratory burst“ ermöglicht, war die NAD(P)H-Oxidase der Hepatomzellen, wenn auch bei einer niedrigeren Maximalumsatzrate, konstitutiv aktiv. Dies würde die Möglichkeit einer kontinuierlichen Registrierung des pO₂ eröffnen. Für eine solche Spontanaktivität muss allerdings vorausgesetzt werden, dass zumindest ein Teil der NAD(P)H-Oxidase in Hepatomzellen stets in assoziierter, d.h. funktionsfähiger Form vorliegt. Hierfür spricht auch unsere Beobachtung, dass die Aktivitätsmaxima nahezu verzögerungsfrei nach Zugabe von NADPH bzw. NADH auftraten.

Ein strikt additives Bindungsverhalten bei gleichzeitiger Zugabe von NADH und NADPH und unterschiedliche enzymkinetische Verhalten für diese Koenzyme in Gegenwart von Inhibitoren wie DPI weisen auf die Existenz getrennter Nukleotidbindungsstellen, möglicherweise sogar zweier Oxidasen mit unterschiedlicher Substratspezifität, hin. Die aus Gründen der nomenklatorischen Konvention auch hier gebrauchte, nicht weiter differenzierende Bezeichnung „NAD(P)H-Oxidase“ ist unpräzise, da sie von einer beliebigen Austauschbarkeit der Nukleotide ausgeht. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass auch die leukozytäre NADPH-Oxidase in der gp91^{phox} Untereinheit zwei potentiell zur Interaktion mit Nukleotiden befähigte funktionelle Zentren mit Präferenz für NADPH aufweist [40].

Insgesamt wies die Oxidase in intakten Hepatomzellen zu NADH mit einer K_M von 72 µM eine deutlich grössere Affinität auf als zu NADPH mit einer K_M von 441 µM. Die K_M kann in intakten Phagozyten nicht ermittelt werden. Für aufgereinigte NAD(P)H-Oxidase stimulierter Phagozyten sind in der Literatur Werte im Bereich von 20-40 µM für NADPH beschrieben [94]. NADH kann von diesem Enzym nicht metabolisiert werden [95]. Selbst wenn man die methodischen Unterschiede berücksichtigt, deutet auch dieser Vergleich auf erhebliche funktionelle Unterschieden zwischen beiden Isoenzymen hin.

Auch die hier nachgewiesene Rückwärtsinhibition („biologisches feedback“) durch NADP^+ ist für phagozytäre Zellen nicht beschrieben.

Dieses Phänomen könnte als Adaptation an die geänderten funktionellen Anforderungen interpretiert werden: Eine Selbstlimitierung durch sich ansammelndes NADP^+ könnte eine unkontrollierte ROS-Produktion verhindern, die für einen O_2^- -Sensor biologisch nicht sinnvoll wäre. Phagozyten indessen fallen in der Regel ihrem eigenen „oxidative burst“ zum Opfer.

Aus den Inkubationsexperimenten mit enzymatischer Superoxiddismutase und synthetischen SOD-Analoga auf der Basis von Porphyrinringsystemen (MnT-BAP, MnT-MPyP) können indirekt Aussagen über die Lokalisation der NAD(P)H-Oxidase und die Kompartimentierung der ROS-Produktion abgeleitet werden. Bei der Interpretation der Experimente ist zu bedenken, dass eine Umverteilung von O_2^- über die Membrangrenze hinweg physikochemisch höchst unwahrscheinlich ist. Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts bleibt exogene SOD vollständig im extrazellulären Raum, während die Lucigenin-Lumineszenz sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Produktion von O_2^- erfasst. Die Reduktion der Lucigenin-Lumineszenz in Gegenwart exogener SOD in Sättigungskonzentration muss also den Anteil extrazellulärer O_2^- widerspiegeln. Dieser betrug etwa 50% der Gesamtsynthese. Wurden hingegen membrangängige Analoga der SOD oder niedermolekulare Antioxidantien eingesetzt, konnte O_2^- auf nicht messbare Konzentrationen reduziert werden.

Auch bei der in den Inkubationsexperimenten aufgezeigten Fähigkeit, exogen zugeführtes NAD(P)H zu nutzen, scheint es sich um ein bislang wenig bekanntes Phänomen zu handeln. Phagozyten verfügen nicht über diese Fähigkeit [95].

Im Zusammenhang mit den Befunden zur Wirkung von SOD und SOD-Analoga sind damit zumindest vorläufige Angaben über die räumliche Organisation der Oxidase in Hepatozyten möglich: Die strikte räumliche Trennung von intrazellulärer Nukleotidbindung und extrazellulärer O_2^- -Produktion wie bei Phagozyten (vgl. Abb 1.1), scheint bei Hepatomzellen aufgehoben zu sein. Aus dieser Beobachtung schliessen wir auf eine unterschiedliche räumliche Organisation beider Isoenzyme in der Zellmembran.

5.6 Genetische Analogien zur phagozytären NAD(P)H-Oxidase

Angesichts der erheblichen funktionellen Unterschiede der NAD(P)H-Oxidase in Phagozyten einerseits und in Hepatomzellen andererseits, erschien ein Homologievergleich zur Prüfung der genetischen Identität des Enzyms geboten. Der immunologische Nachweis einiger der phagozytären NAD(P)H-Oxidaseuntereinheiten ist für hepatozytäre Zell-Lysate bereits erbracht worden: Mit polyklonalen Antikörpern wurde immunoreaktives Protein im Bereich der jeweils publizierten Molekulargewichte für p22^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} angetroffen (Fandrey, unveröffentlicht). Inwieweit es sich dabei um identische oder lediglich um kreuzreagierende Proteine handelt, blieb zunächst offen. Aufgrund dieser Limitation des immunologischen Nachweises wurde hier auf den genetischen Nachweis mit der RT-PCR zurückgegriffen, die einen direkten Homologievergleich ermöglicht. Nachgewiesen werden konnte die Transkription von p22^{phox}, p67^{phox} und gp91^{phox} in Hep3B und HepG2. Damit sind in Hepatomzellen die Minimalanforderungen für die ROS-Produktion, die auf der Grundlage von zellfreien Rekonstitutionsexperimenten mit verschiedenen Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase definiert wurden, erfüllt. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von p22^{phox} und gp91^{phox}, die zusammen das katalytisch aktive Cytochrom₅₅₈ bilden, O₂⁻ zu produzieren vermag [96]. Die weiteren Untereinheiten haben lediglich regulatorische Bedeutung und sind damit nicht essentiell.

Unsere Sequenzanalyse konzentrierte sich im Wesentlichen auf funktionell bedeutsame Regionen der gp91^{phox} und der p22^{phox}, die das katalytisch aktive Zentrum des NADPH-Oxidase Komplexes repräsentieren: Erwartungsgemäss wiesen die Amplifikate aus Hepatomzellen keine vollständige Homologie mit den entsprechenden phagozytären Sequenzen auf. Insbesondere die Mutationen in der gp91^{phox} Untereinheit als katalytische Untereinheit des Enzymmultimers dürften auch funktionelle Konsequenzen für die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase haben. Im Bereich der Basenposition 1653-1707 des gp91^{phox} Gens befindet sich die sogenannte „flavin shield area“ [97]. Ausserdem erfolgt in dieser Region eine Interaktion des gp91^{phox} Proteins mit p47^{phox} [98]. In unmittelbarer Nachbarschaft dieser Genregion konnten wir 5 Mutationen durch Basenaustausch nachweisen (1696 G→A; 1697

T→G; 1701 T→G; 1702 T→A; 1703 T→G; 1726 T→C; 1733 T→A). Zwischen Position 1704 und 1710 wies das Amplifikat aus Hepatomzellen eine Lücke auf, die mit einer Verschiebung des Leserasters einhergeht.

Überwiegend nach Abschluss der experimentellen Phase dieser Arbeit mehrten sich die Befunde über die Expression von NAD(P)H-Oxidase-Homologen auch in weiteren verschiedenen humanen Körperzellen [99-101]

Etwas verwirrend gestaltet sich hierbei die Nomenklatur: Phagozytäres gp91^{phox} kann nun auch unter der Bezeichnung Nox2 und seine nicht-phagozytären Homologe als Nox1, Nox3, Nox4 und Nox5 angetroffen werden. Weitere NAD(P)H-Oxidasen, die über eine zusätzliche Peroxidase-Domäne verfügen, werden mitunter als Duox1 und 2 (duale Oxidasen) angesprochen. Die unterschiedliche Expression einzelner Homologe in verschiedenen Gewebstypen, z.T. mit differentieller Verteilung in verschiedenen Zellkompartimenten, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen [101]. In vaskulären Zellen konnte neben gp91^{phox} auch Nox1 und Nox4 nachgewiesen werden. Auch glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren Nox1 und Nox4, allerdings nur geringe Mengen von gp91^{phox}. Endothelzellen bzw. Fibroblasten verfügen neben gp91^{phox} auch über Nox4, jedoch nur über geringste Mengen Nox1 [102]. Den von diesen Enzymsystemen produzierten ROS wird eine parakrine Signalfunktion zugeschrieben. Die biologische Bedeutung dieser Distributionsmuster ist nach wie vor unklar, spricht aber für eine Rolle der NAD(P)H-Oxidase bei der funktionellen Differenzierung verschiedener Zelltypen.

5.7 Untersuchungen zur O₂-abhängigen Genexpression mit DPI

Der Einsatz eines spezifischen pharmakologischen Inhibitors der NAD(P)H-Oxidase wäre die optimale Strategie, um die Rolle der NAD(P)H-Oxidase zu untersuchen. Bei Hemmung der NAD(P)H-Oxidase sollten bezüglich O₂-abhängiger Genexpression ähnliche Bedingungen zu erwarten sein wie unter Hypoxie. Ob und inwieweit dies zutrifft, wurde mit dem Flavoproteininhibitor Diphenyliodoniumchlorid (DPI) untersucht, einem Aryliodonium, das durch nukleophile Addition und kovalente Adduktbildung mit dem prosthetischen Flavocytochrom_b und FAD-Gruppen reagiert [103, 104]. An der NAD(P)H-Oxidase verhindert es auf diesem Wege die Produktion von ROS. Wir konnten zeigen, dass sich der Inhibitionsmodus für die beiden

Kosubstrate unterscheidet. Diese Beobachtung untermauert die in Kapitel 5.5. geäußerte Annahme, das es sich bei der NAD(P)H-Oxidase in Hepatomzellen möglicherweise um mehrere Isoenzyme mit unterschiedlicher Spezifität für NADPH bzw. NADH handeln könnte.

Die mit DPI gewonnenen Befunde zum Einfluss auf die O₂-abhängige Genexpression in der Literatur sind zum Teil inkonsistent. Auch in unseren Experimenten zeigte sich, dass DPI –anders als bei verminderten H₂O₂-Konzentrationen zu erwarten gewesen wäre- die EPO-Expression hemmte. Insgesamt waren die Ergebnisse nicht mit dem in den vorigen Kapiteln entwickelten Modell einer negativen Kontrolle der EPO-Genexpression durch H₂O₂ vereinbar. Erst zusätzliche Experimente mit besonderer Berücksichtigung der zeitlichen Dynamik der DPI-Effekte ermöglichten eine Erklärung:

Der EPO-RIA ist eine kumulative Messung, die der EPO-Bilanz der gesamten Inkubationszeit entspricht. Damit entziehen sich vorübergehende Effekte dem Nachweis. Eine bessere zeitliche Auflösung bot der hier eingesetzte Reporterassay, mit dem auch kurzfristige Effekte auf die Genexpression innerhalb der Inkubationsperiode erkannt werden konnten. Mit dem EPO3-Konstrukt konnte schliesslich das postulierte inverse Verhältnis von EPO zu H₂O₂ in der initialen Phase der Inkubation mit DPI nachgewiesen werden. Die nach Langzeitinkubation gemessene Reduktion der EPO-Reportergenaktivität bzw. der EPO-Synthese korrespondierte mit erhöhten H₂O₂-Spiegeln im Zellkulturüberstand, die auch dem in der Gesamtbilanz über 24 Stunden gemessenen Inhibitionseffekt zugrundeliegen dürften. Der biphasische Effekt von DPI auf die H₂O₂-Produktion ist die wahrscheinlichste Erklärung für die inkonsistenten Befunde in der Literatur. Inwieweit dabei die Veränderung der SOD-Aktivität, die wir in DPI-behandelten Zellen nachweisen konnten, oder aber Vorgänge an der NAD(P)H-Oxidase selbst eine Rolle spielen, ist noch offen.

An anderer Stelle in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zelle prinzipiell über die Möglichkeit der Rückkopplungshemmung der NAD(P)H-Oxidase durch Metabolite (NADP⁺) verfügt. Es wäre also vorstellbar, dass die NAD(P)H-Oxidase nach zeitweiliger völliger Inaktivität und damit Abwesenheit dieser Inhibitoren zunächst überschüssend reagiert bis sich ein neues Gleichgewicht einstellen kann.

Insgesamt zeigen unsere Versuche, dass DPI zur experimentellen Induktion hypoxieähnlicher Zustände geeignet ist und damit einen Beitrag zur Untersuchung der

O₂-abhängigen Genexpression leistet. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die Inhibition der NAD(P)H-Oxidase in einem bestimmten Zeitfenster manifestiert und sekundäre Anpassungsreaktionen der Zelle bei der Interpretation berücksichtigt werden müssen.

5.8 Einfluss von NO auf NAD(P)H-Oxidase und O₂-abhängige Genexpression

Stickstoffmonoxid (NO) ist ubiquitär im Organismus anzutreffen und vermittelt eine Vielzahl biologischer Effekte [105]. Auch die O₂-abhängige Genexpression scheint Beziehungen zum NO-Stoffwechsel aufzuweisen, wobei der Interaktion von HIF mit Peroxynitrit (ONOO⁻) eine besondere Rolle zufallen soll. Die hierzu publizierten Daten deuten auf komplexe Verhältnisse: So konnte einerseits eine Verminderung der hypoxischen Akkumulation und Transaktivierung von HIF-1 α durch NO-Behandlung oder bei ektopter Expression der NOS nachgewiesen werden [106, 107], andererseits aber eine Stabilisierung des HIF-1 α unter Normoxie [108-112]. Für die EPO-Expression wurden sowohl inhibitorische Effekte [113] als auch eine Stimulation [114] beschrieben.

Die Möglichkeiten der Wechselwirkung von ROS mit NO sind ausgesprochen vielfältig: Zunächst ist die spontane Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) aus äquimolaren Mengen von O₂⁻ und NO anzusprechen. Dieser Vorgang ist thermodynamisch begünstigt, da die Reaktionsgeschwindigkeit mit $6,7 \cdot 10^9 \text{ mol/L} \cdot \text{s}^{-1}$ um den Faktor 3 schneller ist als die enzymatische Umsetzung von O₂⁻ durch die Superoxiddismutase. Möglicherweise bewirkt diese aggressive Verbindung die Nitrierung von Tyrosingruppen, die funktionell bedeutsame Proteinstrukturen modifizieren kann. In bikarbonatgepufferten Systemen ist die Wahrscheinlichkeit der Bildung von 3-Nitrotyrosin durch das molare Verhältnis von O₂⁻ zu NO bestimmt. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, steht die Produktion von O₂⁻ in Relation zum zellulären pO₂. Als durch die Verfügbarkeit von O₂⁻ limitierte Reaktion unterliegt deshalb auch die Entstehung von 3-Nitrotyrosin dem pO₂, womit eine Bedingung für einen Mechanismus O₂-abhängiger Proteinmodifikation erfüllt wäre. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass die Inkubation mit einem Bolus von bis zu 10 μM ONOO⁻ in HepG2 und Hep3B über 24 Stunden keinen Effekt auf die EPO-Produktion hatte (Kontrolle $142 \pm 28 \text{ mU/ml}$; 10 μM ONOO⁻ $131 \pm 36 \text{ mU/ml}$, nicht signifikant). Die

kontinuierliche endogene Entstehung von ONOO^- konnte mit dieser Versuchsanordnung selbstverständlich nicht nachvollzogen werden.

Unsere Experimente zur O_2 -abhängigen Genexpression legen eine Kontrolle des O_2 -Sensing durch NO nahe. Diese ist nach unseren Daten im Wesentlichen auf die direkte Inhibition der Produktion von ROS zurückzuführen. Neu ist dabei die Beobachtung, dass NO bereits die Bildung von O_2^- an der hepatozytären NAD(P)H-Oxidase durch kompetitive Inhibition beeinflussen kann. Bei längerfristiger Inkubation mit NO-Donatoren wurde dieser Effekt von einer Hemmung der Katalase überlagert und schliesslich soweit antagonisiert, dass erhöhte Konzentrationen von H_2O_2 auftraten. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits im Zusammenhang mit den Langzeiteffekten einer Inkubation mit H_2O_2 beschrieben (Kapitel 5.3.). Konsequenz dieses Übergangs von reduzierten zu erhöhten H_2O_2 -Konzentrationen ist ein mehrphasiges Verhalten der EPO-Expression. Darauf dürften auch die unterschiedlichen Aussagen in der Literatur zurückzuführen sein.

Ungeklärt muss einstweilen der genaue molekulare Mechanismus der kompetitiven Inhibition der NAD(P)H-Oxidase bleiben. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich der Inhibitionsmodus von dem unterscheidet, den Fujii et al. für die leukozytäre NAD(P)H-Oxidase beschrieben haben [94]. In diesem System ist die Inhibition Folge einer Störung der Assoziation der regulatorischen zytoplasmatischen Untereinheiten mit dem membranständigen Komplex aus gp91^{phox} und p22^{phox} zur aktiven Oxidase. Nach Aktivierung der Oxidase ist NO in Phagozyten wirkungslos. Demgegenüber konnten wir im Hepatomzellsystem eine Verschiebung der K_M für das nachweisen, unabhängig davon, ob NO vor oder nach Stimulation mit NADPH oder NADH eingesetzt wurde. Die vollständige Reversibilität der Hemmung durch Gabe von NADPH bzw. NADH im Überschuss schliesst eine unspezifisch-toxisch bedingte Inaktivierung, etwa durch Nitrosylierung, aus.

Ein weitere Möglichkeit der Wechselwirkung von ROS mit NO liegt in der direkten chemische Interaktion von NAD(P)H mit aus NO entstehenden Oxidantien (besonders ONOO^-), die einer Konkurrenz mit der NAD(P)H-Oxidase um das Kosubstrat und damit einer Verschiebung der K_M entspräche.

Über die biologische Bedeutung der hier in Modellsystemen nachgewiesenen Wirkungen von NO auf die O_2 -abhängige Genexpression können derzeit nur Vermutungen angestellt werden. Bei bestimmten pathophysiologischen Situationen könnte jedoch eine Kontrolle der ROS-Produktion durch NO sinnvoll sein: ROS

werden z.B. bei einer Entzündung oder bei der Reperfusion ischämischen Gewebes in potentiell toxischen Dosen produziert. Eine Koaktivierung der NO-Synthese könnte nicht nur eine teilweise Neutralisierung dieser hochreaktiven Verbindungen zu geringer toxischen Derivaten bewirken, sondern die Entzündungskaskade durch direkte Hemmung ROS-produzierender Systeme eindämmen. In diesem Zusammenhang bemerkenswert erscheint die z.B. bei Entzündungsreaktionen durch Zytokine verursachte Aktivierung von NO-Synthasen.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass NO eine Rolle bei der O₂-abhängigen Genexpression spielt und eine isolierte Betrachtung einzelner sauerstoffbasierter Signalüberträger den realen Verhältnissen nicht gerecht werden dürfte [88]. Die Wechselwirkungen zwischen ROS und NO sind in Abb.5.1 schematisch zusammengefasst.

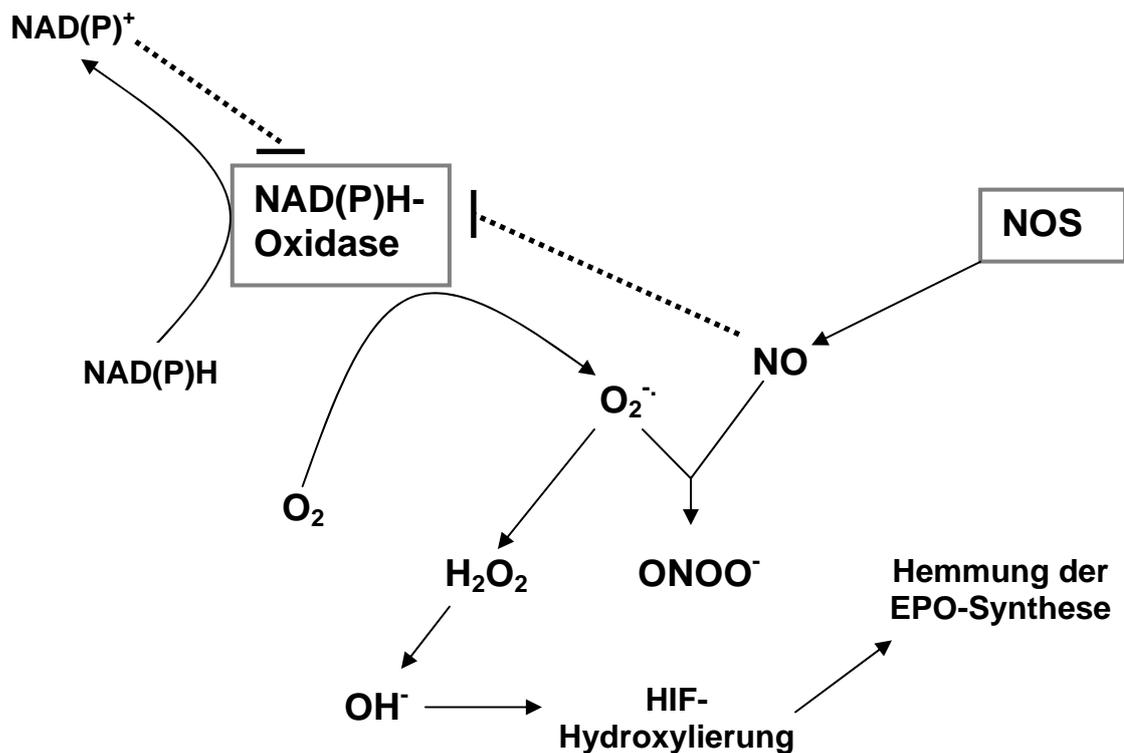


Abb 5.1 **Interaktion von NO und ROS und Kontrolle der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase.** Neben einer spontanen Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) aus Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxidationen (O₂^{•-}) kann NO die O₂^{•-}-Produktion durch die Hemmung der NAD(P)H-Oxidase reduzieren und damit mittelbar die Hydroxylierung des Transkriptionsfaktors HIF beeinflussen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer metabolischen Kontrolle der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase durch die oxidierte Form des NADPH.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit legt weitere Befunde für die Kontrolle der O₂-abhängigen Genexpression durch eine NAD(P)H-Oxidase vor. In den Hepatomzelllinien Hep3B und HepG2, sowie in Reportergensystemen für das „hypoxia responsive element“ (HRE) konnte gezeigt werden, dass O₂-abhängig durch eine Isoform der phagozytären NADPH-Oxidase generierte reaktive O₂-Spezies (ROS) die Expression des EPO-Gens modulieren. Neben der enzymkinetischen und pharmakologischen Charakterisierung wurde in der RT-PCR die Expression einzelner Untereinheiten der NADPH-Oxidase untersucht. Dabei konnten mRNA-Transkripte von 3 der 5 bekannten Untereinheiten nachgewiesen werden (p22^{phox}, gp91^{phox}, p47^{phox}). Exemplarisch konnte am Beispiel der gp91^{phox} aufgezeigt werden, dass diese Transkripte bei einem insgesamt hohen Homologiegrad funktionell bedeutsame Mutationen an regulatorisch relevanten Genregionen aufweisen.

Im Gegensatz zu seiner phagozytären Isoform ist die NAD(P)H-Oxidase der Hepatomzellen konstitutiv aktiv und verfügt über Kontrollmechanismen im Sinne einer physiologischen Rückkopplung durch den Redoxstatus, speziell durch das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem NADPH. Diese Hemmung konnte als kompetitiv charakterisiert werden. Auch Unterschiede bei der Affinität für die Kosubstrate NADPH und NADH und vor allem die Fähigkeit, exogen zugeführtes NADPH zu metabolisieren, sprechen für eine biologische Spezialisierung beider Isoformen. Insgesamt entspricht die nicht-phagozytäre NAD(P)H-Oxidase den Anforderungen an einen hypothetischen O₂-Sensor. Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als relativ lipophiles und langlebiges Molekül vermittelt dabei als „second messenger“ zwischen der Oxidase und dem Signaltransduktionsapparat

Eine bisher unbekannte Möglichkeit der Regulation der O₂-abhängigen Genexpression wurde durch Untersuchung der Effekte des Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO) auf allen Ebenen des postulierten Signaltransduktionsweges demonstriert. NO moduliert die Aktivität der NAD(P)H-oxidase durch direkte Interaktion und übt damit einen unmittelbaren Einfluß auf die O₂-abhängige Genexpression aus.

7. Literatur

1. Bunn, H.F. and R.O. Poyton, *Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia*. *Physiol Rev*, 1996. **76**(3): p. 839-85.
2. Jelkmann, W., *Erythropoietin: structure, control of production, and function*. *Physiol Rev*, 1992. **72**(2): p. 449-89.
3. Jelkmann, W. and E. Metzen, *Erythropoietin in the control of red cell production*. *Anat Anz*, 1996. **178**(5): p. 391-403.
4. Semenza, G.L., *Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1994. **8**(5): p. 863-84.
5. Fandrey, J. and H.F. Bunn, *In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction*. *Blood*, 1993. **81**(3): p. 617-23.
6. Magnanti, M., et al., *Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells*. *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2872-4.
7. Marti, H.H., et al., *Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain*. *Eur J Neurosci*, 1996. **8**(4): p. 666-76.
8. Dame, C., et al., *Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue*. *Blood*, 1998. **92**(9): p. 3218-25.
9. Acs, G., et al., *Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**(9): p. 3561-5.
10. Stolze, I., et al., *Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2623-8.
11. Rich, I.N., *Haemopoietic regulation and the role of the macrophage in erythropoietic gene expression*. *Adv Exp Med Biol*, 1988. **241**: p. 55-66.
12. Kurtz, A., et al., *Regulation of erythropoietin production*. *Contrib Nephrol*, 1988. **66**: p. 1-16.
13. Santoro, A., *Anemia in renal insufficiency*. *Rev Clin Exp Hematol*, 2002. **Suppl 1**: p. 12-20.
14. Jelkmann, W.E., et al., *Inhibition of erythropoietin production by cytokines. Implications for the anemia involved in inflammatory states*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **718**: p. 300-9; discussion 309-11.
15. Wang, Z., M.A. Goldberg, and D.T. Scadden, *HIV-1 suppresses erythropoietin production in vitro*. *Exp Hematol*, 1993. **21**(5): p. 683-8.

16. Jelkmann, W., M. Wolff, and J. Fandrey, *Inhibition of erythropoietin production by cytokines and chemotherapy may contribute to the anemia in malignant diseases*. Adv Exp Med Biol, 1994. **345**: p. 525-30.
17. Wenger, R.H., *Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation*. J Exp Biol, 2000. **203 Pt 8**: p. 1253-63.
18. Lahiri, S., *Historical perspectives of cellular oxygen sensing and responses to hypoxia*. J Appl Physiol, 2000. **88**(4): p. 1467-73.
19. Goldberg, M.A., et al., *The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(22): p. 7972-6.
20. Nielsen, O.J., et al., *Regulation of erythropoietin production in a human hepatoblastoma cell line*. Blood, 1987. **70**(6): p. 1904-9.
21. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4604-13.
22. Fandrey, J., *Hypoxia-inducible gene expression*. Respir Physiol, 1995. **101**(1): p. 1-10.
23. Bunn, H.F., et al., *Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation*. J Exp Biol, 1998. **201 (Pt 8)**: p. 1197-201.
24. Eckardt, K.U., et al., *Production of erythropoietin by liver cells in vivo and in vitro*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **718**: p. 50-60; discussion 61-3.
25. Semenza, G.L., *Perspectives on oxygen sensing*. Cell, 1999. **98**(3): p. 281-4.
26. Gilles-Gonzalez, M.A., G.S. Ditta, and D.R. Helinski, *A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of Rhizobium meliloti*. Nature, 1991. **350**(6314): p. 170-2.
27. Gilles-Gonzalez, M.A. and G. Gonzalez, *Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins*. J Appl Physiol, 2004. **96**(2): p. 774-83.
28. Fandrey, J. and J. Genius, *Reactive oxygen species as regulators of oxygen dependent gene expression*, in *Oxygen sensing- Molecule to man*, S. Lahiri and N.R. Prabhakar, Editors. 2000, Kluwer academic publishers.
29. Fandrey, J. and J. Genius, *Reactive oxygen species as regulators of oxygen dependent gene expression*. Adv Exp Med Biol, 2000. **475**: p. 153-9.
30. Fandrey, J., S. Frede, and W. Jelkmann, *Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production*. Biochem J, 1994. **303 (Pt 2)**: p. 507-10.
31. Canbolat, O., J. Fandrey, and W. Jelkmann, *Effects of modulators of the production and degradation of hydrogen peroxide on erythropoietin synthesis*. Respir Physiol, 1998. **114**(2): p. 175-83.

32. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed. 1989: Oxford University Press.
33. Liu, S.S., *Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria*. *Biosci Rep*, 1997. **17**(3): p. 259-72.
34. Staniek, K. and H. Nohl, *Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species?* *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1460**(2-3): p. 268-75.
35. Fandrey, J., et al., *Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoietin production by reactive oxygen species*. *Kidney Int*, 1997. **51**(2): p. 492-6.
36. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction*. *Blood*, 1993. **82**(12): p. 3610-5.
37. Goldberg, M.A., S.P. Dunning, and H.F. Bunn, *Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein*. *Science*, 1988. **242**(4884): p. 1412-5.
38. Porwol, T., et al., *The influence of nickel and cobalt on putative members of the oxygen-sensing pathway of erythropoietin-producing HepG2 cells*. *Eur J Biochem*, 1998. **256**(1): p. 16-23.
39. Gorlach, A., et al., *Photometric characteristics of haem proteins in erythropoietin-producing hepatoma cells (HepG2)*. *Biochem J*, 1993. **290** (Pt 3): p. 771-6.
40. Vignais, P.V., *The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism*. *Cell Mol Life Sci*, 2002. **59**(9): p. 1428-59.
41. Wallach, T.M. and A.W. Segal, *Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes*. *Biochem J*, 1996. **320** (Pt 1): p. 33-8.
42. Ago, T., et al., *Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(47): p. 33644-53.
43. El Benna, J., et al., *Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(11): p. 6374-8.
44. Dagher, M.C., et al., *Small G proteins and the neutrophil NADPH oxidase*. *Biochimie*, 1995. **77**(7-8): p. 651-60.

45. Karlsson, A. and C. Dahlgren, *Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes*. *Antioxid Redox Signal*, 2002. **4**(1): p. 49-60.
46. Dinauer, M.C., *Regulation of neutrophil function by Rac GTPases*. *Curr Opin Hematol*, 2003. **10**(1): p. 8-15.
47. Leusen, J.H., A.J. Verhoeven, and D. Roos, *Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family*. *J Lab Clin Med*, 1996. **128**(5): p. 461-76.
48. Dang, P.M., B.M. Babior, and R.M. Smith, *NADPH dehydrogenase activity of p67PHOX, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase*. *Biochemistry*, 1999. **38**(18): p. 5746-53.
49. Babior, B.M., *The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues*. *Antioxid Redox Signal*, 2002. **4**(1): p. 35-8.
50. Yu, L., L. Zhen, and M.C. Dinauer, *Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(43): p. 27288-94.
51. Fandrey, J. and J. Genius, *The role of reactive oxygen species in oxygen-dependent gene expression*, in *Environmental stress and gene regulation*. 2000, BIOS Scientific Publishers, Oxford. p. 47-60.
52. Cross, A.R., et al., *Involvement of an NAD(P)H oxidase as a pO₂ sensor protein in the rat carotid body*. *Biochem J*, 1990. **272**(3): p. 743-7.
53. Acker, H., et al., *Indications to an NADPH oxidase as a possible pO₂ sensor in the rat carotid body*. *FEBS Lett*, 1989. **256**(1-2): p. 75-8.
54. Wolin, M.S., T.M. Burke-Wolin, and H.K. Mohazzab, *Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms*. *Respir Physiol*, 1999. **115**(2): p. 229-38.
55. Youngson, C., et al., *Oxygen sensing in airway chemoreceptors*. *Nature*, 1993. **365**(6442): p. 153-5.
56. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
57. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
58. Maxwell, P. and P. Ratcliffe, *Regulation of expression of the erythropoietin gene*. *Curr Opin Hematol*, 1998. **5**(3): p. 166-70.

59. Ebert, B.L. and H.F. Bunn, *Regulation of the erythropoietin gene*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1864-77.
60. Epstein, A.C., et al., *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. Cell, 2001. **107**(1): p. 43-54.
61. Huang, L.E., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7987-92.
62. Ivan, M., et al., *HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing*. Science, 2001. **292**(5516): p. 464-8.
63. Wenger, R.H., *Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression*. Faseb J, 2002. **16**(10): p. 1151-62.
64. Masson, N. and P.J. Ratcliffe, *HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O2 levels*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 15): p. 3041-9.
65. Yu, F., et al., *HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9630-5.
66. Daghman, N.A., et al., *Regulation of erythropoietin gene expression depends on two different oxygen-sensing mechanisms*. Mol Genet Metab, 1999. **67**(2): p. 113-7.
67. Jewell, U.R., et al., *Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous*. Faseb J, 2001. **15**(7): p. 1312-4.
68. Gorlach, A., et al., *Efficient translation of mouse hypoxia-inducible factor-1alpha under normoxic and hypoxic conditions*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1493**(1-2): p. 125-34.
69. Metzen, E., et al., *Pericellular PO2 and O2 consumption in monolayer cell cultures*. Respir Physiol, 1995. **100**(2): p. 101-6.
70. Wolff, M., J. Fandrey, and W. Jelkmann, *Microelectrode measurements of pericellular PO2 in erythropoietin-producing human hepatoma cell cultures*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 1): p. C1266-70.
71. Jelkmann, W., J. Fandrey, and G. Wiedemann, *Immunoreactive erythropoietin in the anemia of non-renal chronic diseases*. Biomed Biochim Acta, 1990. **49**(2-3): p. S265-70.
72. Thorpe, G.H. and L.J. Kricka, *Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase*. Methods Enzymol, 1986. **133**: p. 331-53.

73. Bottu, G., *The effect of quenchers on the chemiluminescence of luminol and lucigenin*. J Biolumin Chemilumin, 1989. **3**(2): p. 59-65.
74. Ginsburg, I., et al., *Chemiluminescence in activated human neutrophils: role of buffers and scavengers*. Inflammation, 1993. **17**(3): p. 227-43.
75. Oosthuizen, M.M., et al., *The effect of pH on chemiluminescence of different probes exposed to superoxide and singlet oxygen generators*. J Biolumin Chemilumin, 1997. **12**(6): p. 277-84.
76. Gyllenhammar, H., *Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production*. J Immunol Methods, 1987. **97**(2): p. 209-13.
77. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production*. Arch Biochem Biophys, 1997. **337**(1): p. 115-20.
78. Sohn, H.Y., et al., *Pitfalls of using lucigenin in endothelial cells: implications for NAD(P)H dependent superoxide formation*. Free Radic Res, 2000. **32**(3): p. 265-72.
79. Melinn, M. and H. McLaughlin, *Nitroblue tetrazolium reduction in lymphocytes*. J Leukoc Biol, 1987. **41**(4): p. 325-9.
80. Karnovsky, M.J., *Robert Feulgen Lecture 1994. Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective*. Histochemistry, 1994. **102**(1): p. 15-27.
81. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**: p. 156-159.
82. J.E.Sambrook, F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Vol. 1-3. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory.
83. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-254.
84. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
85. Cornish-Bowden, A. and R. Eisenthal, *Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods*. Biochem J, 1974. **139**(3): p. 721-30.
86. Eisenthal, R. and A. Cornish-Bowden, *The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters*. Biochem J, 1974. **139**(3): p. 715-20.

87. Faulkner, K.M., S.I. Liochev, and I. Fridovich, *Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo*. J Biol Chem, 1994. **269**(38): p. 23471-6.
88. Genius, J. and J. Fandrey, *Nitric oxide affects the production of reactive oxygen species in hepatoma cells: implications for the process of oxygen sensing*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(6): p. 515-21.
89. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
90. Dinauer, M.C., *The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1993. **30**(4): p. 329-69.
91. Segal, A.W., *The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease*. Mol Med Today, 1996. **2**(3): p. 129-35.
92. Babior, B.M., *The respiratory burst oxidase and the molecular basis of chronic granulomatous disease*. Am J Hematol, 1991. **37**(4): p. 263-6.
93. Daghman, N.A., et al., *Erythropoietin production: evidence for multiple oxygen sensing pathways*. Ann Hematol, 1999. **78**(6): p. 275-8.
94. Fujii, H., et al., *Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32773-8.
95. Suzuki, H. and K. Kakinuma, *Evidence that NADPH is the actual substrate of the oxidase responsible for the "respiratory burst" of phagocytosing polymorphonuclear leukocytes*. J Biochem (Tokyo), 1983. **93**(3): p. 709-15.
96. Rotrosen, D., C.L. Yeung, and J.P. Katkin, *Production of recombinant cytochrome b558 allows reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase solely from recombinant proteins*. J Biol Chem, 1993. **268**(19): p. 14256-60.
97. Rotrosen, D., et al., *Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase*. Science, 1992. **256**(5062): p. 1459-62.
98. De Leo, F.R., et al., *Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox*. J Biol Chem, 1996. **271**(29): p. 17013-20.
99. Bokoch, G.M. and U.G. Knaus, *NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(9): p. 502-8.
100. Bengtsson, S.H., et al., *Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(11): p. 849-54.
101. Cheng, G., et al., *Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5*. Gene, 2001. **269**(1-2): p. 131-40.

102. Lassegue, B. and R.E. Clempus, *Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **285**(2): p. R277-97.
103. Doussiere, J., J. Gaillard, and P.V. Vignais, *The heme component of the neutrophil NADPH oxidase complex is a target for arylidonium compounds*. Biochemistry, 1999. **38**(12): p. 3694-703.
104. O'Donnell, B.V., et al., *Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase*. Biochem J, 1993. **290** (Pt 1): p. 41-9.
105. Stamler, J.S., D.J. Singel, and J. Loscalzo, *Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1898-902.
106. Huang, L.E., et al., *Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 9038-44.
107. Sogawa, K., et al., *Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7368-73.
108. Palmer, L.A., B. Gaston, and R.A. Johns, *Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(6): p. 1197-203.
109. Metzen, E., et al., *Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(8): p. 3470-81.
110. Sandau, K.B., J. Fandrey, and B. Brune, *Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide*. Blood, 2001. **97**(4): p. 1009-15.
111. Kimura, H., et al., *Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide*. Blood, 2000. **95**(1): p. 189-97.
112. Sheta, E.A., et al., *Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1alpha via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways*. Oncogene, 2001. **20**(52): p. 7624-34.
113. Schobersberger, W., G. Hoffmann, and J. Fandrey, *Nitric oxide donors suppress erythropoietin production in vitro*. Pflugers Arch, 1996. **432**(6): p. 980-5.
114. Yoshioka, K. and J.W. Fisher, *Nitric oxide enhancement of erythropoietin production in the isolated perfused rat kidney*. Am J Physiol, 1995. **269**(4 Pt 1): p. C917-22.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Joachim Fandrey für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit, vor allem aber für die langjährige, exzellente Betreuung. Er war ein jederzeit hilfsbereiter Ansprechpartner, der mein Interesse an der Zellbiologie auch weit über diese Arbeit hinausgehend wecken konnte.

Herrn Professor Dr. Wolfgang Jelkmann danke ich für die freundliche Aufnahme an dem von ihm geleiteten Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck und den mir großzügig gewährten Freiraum in wissenschaftlicher Hinsicht. Ich fühlte mich dort sowohl in fachlicher, als auch in persönlicher Hinsicht hervorragend integriert.

Hierzu trugen insbesondere auch die konstruktiven und anregenden Diskussionen und die freundschaftliche Unterstützung durch Frau Privatdozentin Dr. Dörthe Katschinski und Herrn Professor Dr. Roland Wenger bei. Nicht minder wichtig war für mich die angenehme Zusammenarbeit mit meiner Mitdotorandin Frau Almut Udolph.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Patricia Rouina für die Einarbeitung in die Zellkulturtechnik bedanken. Frau Dr. Eva Wolber, Herrn Dr. Eric Metzen und Herrn Dr. Thomas Hellwig-Bürgel danke ich herzlich für den kompetenten Rat mit dem sie mir bei Fragen zu PCR, Western blot und anderen molekularbiologischen Verfahren stets bereitwillig zur Verfügung standen.

Natürlich möchte ich es nicht versäumen, auch allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Physiologie der Universität Lübeck für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor zu danken.

9. Lebenslauf

- 17.9.1973* geboren als 2. Kind der Eheleute Dr. jur. Klaus und Heide Genius in Köln
- 1993* Abitur am Max-Ernst-Gymnasium Brühl
- 1993-1994* Wehrdienst beim Sanitätsdienst der Bundesluftwaffe
- 1994* Immatrikulation an der Medizinischen Universität zu Lübeck
- 1996* Ärztliche Vorprüfung
Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
Beginn der Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. J. Fandrey am Institut für Physiologie der Universität Lübeck (Leitung Prof. Dr. W. Jelkmann)
- 1997* 1. Staatsexamen
- 08.-12.1999* Tropenmedizin in Khartoum, Sudan (Reisestipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes)
- 2000* 2. Staatsexamen
- 2000-2001* Praktisches Jahr (Innere Medizin: Forschungszentrum Borstel; Chirurgie: MUL und University of Otago, Neuseeland; Pathologie: MUL)
- 09.2001* 3. Staatsexamen. Gesamtnote der ärztlichen Prüfung: 1,0
- 11.2001-
05.2003* Arzt im Praktikum an der Neurologischen Klinik der Universität Heidelberg
- Seit 06.2003* Assistenzarzt an der Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Sektion Molekulare und Klinische Neurobiologie)

10. Publikationen

Genius, J. and J. Fandrey, *Nitric oxide affects the production of reactive oxygen species in hepatoma cells: implications for the process of oxygen sensing*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(6): p. 515-21.

Fandrey, J. and **J. Genius**, *Reactive oxygen species as regulators of oxygen dependent gene expression*. Adv Exp Med Biol, 2000. **475**: p. 153-9.

Fandrey, J. and **J. Genius**, *Reactive oxygen species as regulators of oxygen dependent gene expression*, in *Oxygen sensing- Molecule to man*, S. Lahiri and N.R. Prabhakar, Editors. 2000, Kluwer academic publishers

Fandrey, J. and **J. Genius**, *The role of reactive oxygen species in oxygen-dependent gene expression*, in *Environmental stress and gene regulation*. 2000, BIOS Scientific Publishers, Oxford. p. 47-60.