

Aus dem IUF - Leibniz Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Krutmann

Der unausgeglichene Redoxstatus in seneszenten
Endothelzellen ist bedingt durch eine Dysregulation von
Thioredoxin-1 und NADPH Oxidase 4

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Philip Peters, geb. Czypiorski

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Philip Peters, geb. Czypiorski

Dekan/in: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Meinen geliebten Eltern Melita und Peter K. Czypiorski.

Ohne sie wäre dieser Weg niemals möglich gewesen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

The imbalanced redox status in senescent endothelial cells is due to dysregulated Thioredoxin-1 and NADPH oxidase 4.

Goy C, Czypiorski P, Altschmied J, Jakob S, Rabanter LL, Brewer AC, Ale-Agha N, Dyballa-Rukes N, Shah AM, Haendeler J.

Exp Gerontol. 2014 Aug; 56:45-52. doi: 10.1016/j.exger.2014.03.005. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24632182

Zusammenfassung:

Sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Veränderungen sind dafür bekannt oxidativen Stress und Alterungsprozesse zu verstärken. Mitochondriale und nukleäre Dysfunktionen tragen zu einem Einsetzen der Alterung bei. Einer der wichtigsten Regulatoren des Redoxstatus in primären humanen Endothelzellen ist Thioredoxin-1 (Trx-1), ein 12 kD großes Protein mit zusätzlichen anti-apoptischen Eigenschaften. Zelluläre Produzenten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind die NADPH Oxidasen (NOX), wovon NOX4 das höchste Expressionslevel in Endothelzellen zeigt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Regulation von Trx-1 und NOX4 im Zellmodell der stressinduzierten vorzeitigen Seneszenz in Endothelzellen zu untersuchen. Es wurden primäre humane Endothelzellen über einen Zeitraum von zwei Wochen mit H₂O₂ behandelt um in ihnen eine stressinduzierte vorzeitige Seneszenz zu erzeugen. In diesem Zellmodell sind die Seneszenzmarker seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase und nukleäres p21 erhöht. Zudem kommt es zu einer vermehrten Bildung totaler und mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies. Eine unausgeglichene Homöostase des Redoxstatus zeigt sich durch erhöhte NOX4- und reduzierte Trx-1-Level. Durch eine lentivirale Expression von Trx-1 kann dies ausgeglichen werden. Weiterhin ist die lysosomale Protease Cathepsin D überaktiviert, was zu einer Reduktion der Trx-1 Proteinmenge führt. Eine Inhibition der überaktiven Cathepsin D Protease durch den spezifischen zellpermeablen Inhibitor Pepstatin A kann den Anstieg des nukleären p21 Proteins, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und den Abbau des Proteins Trx-1 aufheben. Dies führt zu einer Blockade der stressinduzierten vorzeitigen Seneszenz durch eine Stabilisierung der zellulären Redoxhomöostase. Weiterführend zeigt sich im Vergleich von NOX4 transgenen Mäusen, welche exklusiv NOX4 in Endothelzellen exprimieren, zu Wildtyp-Mäusen eine reduzierte Menge aortalen Trx-1 und eine erhöhte Aktivität von Cathepsin D. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl der Verlust an Trx-1, als auch die Hochregulation von NOX4 einen wichtigen Beitrag zu einem unausgeglichene Redoxstatus in seneszenten Endothelzellen - ex vivo und in vivo - liefert.

Abstract:

Environmental stressors as well as genetic modifications are known to enhance oxidative stress and aging processes. Mitochondrial and nuclear dysfunctions contribute to the onset of aging. One of the most important redox regulators in primary human endothelial cells is Thioredoxin-1 (Trx-1), a 12 kD protein with additional anti-apoptotic properties. Cellular generators of reactive oxygen species are NADPH oxidases (NOXs), of which NOX4 shows highest expression levels in endothelial cells. Therefore, the aim of the study was to investigate how Trx-1 and NOX4 are regulated during stress-induced premature senescence in endothelial cells. We treated primary human endothelial cells for two weeks with H₂O₂ to generate stress-induced premature senescence in these cells. In this model senescence-associated β -Galactosidase and nuclear p21 as senescence markers are increased. Moreover, total and mitochondrial reactive oxygen species formation is enhanced. An imbalanced redox homeostasis is detected by elevated NOX4 and decreased Trx-1 levels. This can be rescued by lentiviral expression of Trx-1. Moreover, the lysosomal protease Cathepsin D is over-activated, which results in reduced Trx-1 protein levels. Inhibition of "over-active" Cathepsin D by the specific, cell-permeable inhibitor pepstatin A abolishes the increase in nuclear p21 protein, ROS formation and degradation of Trx-1 protein, thus leading to blockade of stress-induced premature senescence by stabilizing the cellular redox homeostasis. Aortic Trx-1 levels are decreased and Cathepsin D activity is increased in NOX4 transgenic mice exclusively expressing NOX4 in the endothelium when compared to their wildtype littermates. Thus, loss of Trx-1 and upregulation of NOX4 importantly contribute to the imbalance in the redox-status of senescent endothelial cells ex vivo and in vivo.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Demographische Entwicklung in Deutschland und das Ausmaß kardiovaskulärer Erkrankungen	1
1.2 Das Endothel und die endotheliale Dysfunktion	4
1.3 Pro- und antioxidative Systeme in Endothelzellen	6
1.3.1 Prooxidative Systeme	7
1.3.2 Antioxidative Systeme	11
1.3.3 Cathepsin D	14
1.4 Ziel der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Geräte:	18
2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze:	19
2.1.5 Verwendete Primärzelle und Komplettmedium:	19
2.1.6 Verwendete Primer:	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellkultur	21
2.2.2 Klonierung eines lentiviralen Trx-1 Expressionsvectors, Produktion des Lentivirus und Transduktion der Endothelzellen	26
2.2.3 Tierexperimente	26
2.2.4 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies	27
2.2.5 Mitochondrienpräparation	27
2.2.6 Analyse von Seneszenzparametern	28
2.2.7 Immunfluoreszenzfärbungen	28
2.2.8 Methoden zur Analyse der Genexpression	29
2.2.9 Cathepsin D Aktivitätsmessung	34
2.2.10 Statistik	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Prüfung des in-vitro Modells der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz unter Behandlung mit H₂O₂	35
3.1.1 Nachweis der Zunahme SA-β-Galaktosidase positiver Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung	35
3.1.2 Nachweis der Zunahme p21 positiver Zellkerne in der Immunfluoreszenzfärbung	36
3.1.3 Nachweis der Zunahme der Proteinmenge p21 unter Behandlung mit H ₂ O ₂	37
3.1.4 Nachweis des Anstiegs reaktiver Sauerstoffspezies mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	37
3.2 Regulation der NOX4 im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz	38
3.2.1 Anstieg der NOX4 mRNA Level in der Real-time-PCR Untersuchung	39
3.2.2. Zunahme der NOX4 Proteinmenge im Immunoblot	39
3.2.3. Zunahme der mitochondrialen und zytosolischen NOX4 im fraktionierten Immunoblot	39

3.2.4. Zunahme der Kolo­kalisierung von NOX4 und TIM23 unter der Behandlung mit H ₂ O ₂	40
3.3 Regulation von Trx-1 im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz	41
3.3.1 Abnahme der Trx-1 Proteinmenge im Immunoblot	41
3.3.2 Untersuchung der ursächlichen Rolle von Trx-1 in der Seneszenzentwicklung von Endothelzellen	41
3.4 Rolle von Cathepsin D im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz	42
3.4.1 Messung der Cathepsin D Aktivität unter H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ /PepA im ELISA	43
3.4.2 Aufhebung der Zunahme von p21 positiven Zellen unter Koinkubation mit H ₂ O ₂ /PepA im Immunostaining	43
3.4.3 Nachweis der Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies unter Koinkubation mit H ₂ O ₂ /PepA mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	44
3.4.4 Aufhebung der Reduktion der Trx-1 Proteinmenge unter Koinkubation mit H ₂ O ₂ /PepA im Immunoblot	45
3.4.5 Aufhebung der Zunahme der NOX4 Proteinmenge unter Koinkubation mit H ₂ O ₂ /PepA im Immunoblot	45
3.5 Regulation von Trx-1 und Cathepsin D in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen	46
3.5.1 Reduktion der Trx-1 Proteinmenge in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen	46
3.5.2 Korrelation des NOX4 mRNA und Trx-1 Protein Levels in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen	47
3.5.3 Cathepsin D Aktivität in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen	47
4 Diskussion	49
4.1 Die Regulation von NOX4 und Trx-1 im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz in primären, humanen Endothelzellen	49
4.2 Die Rolle von Cathepsin D im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz	51
4.3 Die Rolle der NOX4 Überexpression für das Trx-1Proteinlevel und der Cathepsin D Aktivität in vivo	52
5 Literaturverzeichnis	55
6 Abkürzungsverzeichnis	60
7 Danksagung	63

1 Einleitung

Alterung wird als einer der Hauptrisikofaktoren für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen betrachtet (Strait & Lakatta, 2012). Da das gesamte vaskuläre System durch Endothel ausgekleidet wird, welches eine Barriere zwischen Blut und Gewebe bildet, für den Gasaustausch in den Endorganen zuständig ist, an der Blutdruckregulation beteiligt ist und viele weitere Aufgaben übernimmt, wird ihm eine exponierte Rolle im Zusammenhang mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben (Godo & Shimokawa, 2017). In einer immer älter werdenden Gesellschaft werden die Veränderungen des Endothels bzw. das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion umso bedeutsamer (Vanhoutte, 1997). Zum Verständnis dieses Zusammenhangs ist es notwendig den Pathomechanismus der endothelialen Dysfunktion zu untersuchen. Eine der Ursachen ist hierbei die Dysbalance der zellulären Redoxhomöostase im Sinne eines Ungleichgewichts zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und deren Elimination (Czypiorski, Rabanter, Altschmied, & Haendeler, 2013; Haendeler, Tischler, Hoffmann, Zeiher, & Dimmeler, 2004b; Harman, 1956). Es wird vermutet, dass oxidativer Stress, d.h. ein Überschuss an ROS, ursächlich an der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion beteiligt ist (Lee & Griendling, 2008; Vita, 2011). Eine balancierte Redoxhomöostase ist folglich für die Zelle unverzichtbar (Goy et al., 2014). Die vorliegende Arbeit untersucht die Regulation zweier Schlüsselmoleküle pro- und antioxidativer Systeme im *in vitro*-Modell der stressinduzierten vorzeitigen endothelialen Seneszenz und vergleicht die Ergebnisse mit Untersuchungen im Tiermodell.

1.1 Der demographische Wandel und die Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen

Alterung wird umschrieben als ein fortschreitender Funktionsverlust des Organismus und eine zunehmende Schwächung der Fähigkeit sich auf veränderte Umweltbedingungen einzustellen. Dabei wird der Prozess des Alterns von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst wie z.B. Ernährung, physische Aktivität, Nikotin- und Alkoholkonsum (Gaziano, Reddy, Paccaud, Horton, & Chaturvedi, 2006). Die demographische Entwicklung der letzten Jahrzehnte, insbesondere in Industrienationen der westlichen Welt, zeigt einen deutlichen Trend hin zu einer Überalterung

Einleitung

der Gesellschaft. Der demografische Wandel setzt sich dabei grundsätzlich aus drei Grundbausteinen zusammen: Sterblichkeit, Geburtenrate und Migration. Für den Teilaspekt Sterblichkeit lässt sich ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren feststellen. Zu nennen sind hier vor allem der steigende Wohlstand, eine insgesamt gesündere Ernährung, verbesserte Arbeitsbedingungen im Sinne eines geringeren körperlichen Verschleißes, verbesserte hygienische Zustände, die soziale Fürsorge und die verbesserte medizinische Versorgung in Prävention, Diagnose und Therapie.

So wird laut der 13. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung des statistischen Bundesamtes (2015) für das Jahr 2060 eine weitgehend vorgezeichnete Bevölkerungsentwicklung prognostiziert. Insgesamt wird je nach zugrunde gelegter Nettozuwanderung eine Gesamteinwohnerzahl in Deutschland zwischen 67,6 Millionen und 73,1 Millionen Menschen (zum Vergleich 2013: 80,8 Millionen Menschen) kalkuliert. Hierbei wird eine deutliche strukturelle Veränderung der Bevölkerungszusammensetzung erwartet. Der Anteil der Menschen im Alter ab 65 Jahren wird insbesondere in den kommenden 20 Jahren deutlich steigen, da die Jahrgänge um 1960 vergleichsweise geburtenstark waren. So wird die Anzahl der Menschen ab 65 Jahren für das Jahr 2060 auf 22-23 Millionen Menschen geschätzt. Der Anteil dieser Bevölkerungsgruppe an der Gesamtbevölkerung wird dann ca. 30% betragen, wohingegen im Jahr 2013 nur ein Fünftel der Bevölkerung zu dieser Gruppe (2013: 21%) zählte. Noch deutlicher wird sich die demografische Entwicklung im Anteil der Hochbetagten an der Gesamtbevölkerung widerspiegeln. Im Jahr 2013 lebten 4,4 Millionen 80-Jährige und ältere in Deutschland. Für 2060 wird eine Zahl von 9 Millionen und damit eine Verdopplung vorhergesagt. Der Bevölkerungsanteil der >80-Jährigen würde damit von 5% (Jahr 2013) auf zu erwartende 12% (Jahr 2060) steigen. Abb. 1 veranschaulicht die Berechnungen des statistischen Bundesamtes. Gleichzeitig schrumpft der Anteil der Bevölkerung im erwerbsfähigen Alter. Die Anzahl der 20-64-Jährigen (2013: 49 Millionen) wird ab 2020 spürbar zurückgehen und 2060, je nach tatsächlicher Nettozuwanderung, etwa 34-38 Millionen Menschen betragen, dies entspricht einem Rückgang um rund 30%. Der Anteil der Personen im erwerbsfähigen Alter wird von 61% im Jahr 2013 auf rund 51% im Jahr 2060 sinken. Dies stellt eine enorme Herausforderung für die sozialen Sicherungssysteme und Gesundheitssysteme künftiger Generationen dar.

Einleitung

Bevölkerung nach Altersgruppen

in %

0 bis 19

20 bis 64

65 bis 79

80 und älter

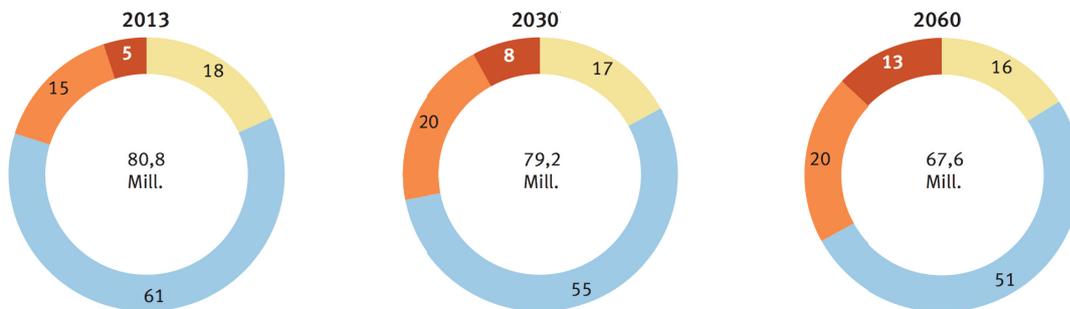


Abb.1: Bevölkerungsentwicklung nach Altersgruppen für die Jahre 2013, 2030 und 2060; Quelle: statistisches Bundesamt aus der 13.koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung, 2015

In einer immer älter werdenden Gesellschaft nimmt die Bedeutung des Alters als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen an Bedeutung zu. Schon jetzt sind kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit die Todesursache Nummer eins. Deutlich wird dies durch Zahlen der Weltgesundheitsorganisation (WHO), wonach jährlich mehr Menschen an den Folgen einer kardiovaskulären Erkrankung als an irgendeiner anderen Ursache sterben. Schätzungen der WHO aus dem Mai 2017 gehen von 17,7 Millionen an kardiovaskulären Erkrankungen verstorbenen Menschen im Jahr 2015 aus, was einem Anteil von 31% an allen weltweiten Todesursachen entspricht. Von diesen Todesfällen sind wiederum 7,4 Millionen durch eine koronare Herzerkrankung und 6,7 Millionen durch einen Schlaganfall bedingt. Seit dem Jahr 2010 sind kardiovaskuläre Erkrankungen, laut Einschätzung der WHO, die führende Todesursache sowohl in Entwicklungsländern als auch in entwickelten Ländern. In Europa stellen kardiovaskuläre Erkrankungen laut den Zahlen der WHO sogar mehr als die Hälfte aller Todesursachen. Neben dem unabhängigen Risikofaktor Alter, sind es vor allem vermeidbare Gewohnheiten wie Nikotingebrauch, eine ungesunde Diät und körperliche Inaktivität welche die Hauptrisikofaktoren bilden. Dabei treten kardiovaskuläre Erkrankungen nahezu gleichverteilt bei Männern und Frauen auf.

Der Definition der WHO zufolge gehören zur Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen die koronare Herzerkrankung, die cerebrovaskuläre Erkrankung, die periphere arterielle Erkrankung, die rheumatische Herzerkrankung, kongenitale Herzerkrankungen und die tiefe

Einleitung

Beinvenenthrombose mit pulmonaler Embolisation. Im Vergleich zu den bedeutendsten Infektionserkrankungen verursachen sie dabei in Europa 46mal mehr Todesfälle als durch HIV-Infektionen und AIDS entstehen und 11mal mehr Todesfälle als durch Tuberkulose und Malaria zusammen entstehen.

1.2 Das Endothel und die endotheliale Dysfunktion

Das Gefäßsystem des Menschen folgt einem dreischichtigen Aufbau aus Intima, Media und Adventitia. Die Intima wird aus Endothel, einem einschichtigen lückenlosen Belag aus polygonalen Zellen, und der subendothelialen Schicht gebildet. Die Media besteht aus glatter Muskulatur und elastischen Fasern. Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht mit den die Blutgefäße versorgenden Blut- und Lymphgefäßen sowie Nerven. Eine Ausnahme von diesem Dreischicht-Prinzip bildet die Endstrombahn, deren Kapillaren und postkapillären Venolen nur aus Endothel und Basallamina sowie einzelnen Perizyten bestehen.

Zu den Funktionen des Endothels zählen unter anderem die Aufrechterhaltung einer Diffusionsbarriere zwischen dem Intravasalraum und den tieferen Wandschichten, die Regulation der Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten sowie die Beteiligung an der primären Hämostase. Zusätzlich beteiligt sich das Endothel durch Bildung von Stickstoffmonoxyd (NO) und Endothelin an der Regulation der Gefäßweite (Vita, 2011). Für die Gefäße ist die Integrität des Endothels daher von essentieller Bedeutung (Shimokawa, 1999). Der Alterungsprozess korreliert hierbei mit dem Vorhandensein bzw. der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion.

Für die endotheliale Dysfunktion werden drei wesentliche Merkmale beschrieben: eine verminderte Telomeraseaktivität bzw. eine verminderte Telomerase Reverse Transkriptase (TERT)-Proteinmenge, eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO und eine Erhöhung bzw. Überschuss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).

Telomere bezeichnen die DNA-Sequenzen an den 3'-Enden linearer eukaryotischer Chromosomen, diese zeichnen sich durch multiple, tandemartig angeordnete Oligonucleotid-Sequenzabfolgen aus. Bei jedem vollständigen Zellzyklus verkürzen sich die Telomere und die DNA-Polymerase ist nicht in der Lage das terminale Ende der Chromosomen zu replizieren. Es

Einleitung

entsteht das so genannte Endreplikationsproblem. Ab einer kritischen Telomerlänge kommt es in der Folge zu einem Zellzyklusarrest, welcher als replikative Seneszenz bezeichnet wird (Hayflick & Moorhead, 1961). Im Rahmen der endothelialen Dysfunktion wird eine verminderte Telomeraseaktivität bzw. eine verminderte Telomerase Reverse Transkriptase (TERT)-Proteinmenge als Ursache für die kürzer werdenden Telomere beschrieben. TERT ist die katalytische Untereinheit der Telomerase (Greider & Blackburn, 1989). Zu einer Reduktion der TERT-Menge tragen intrazelluläre ROS und eine geringere NO-Bioverfügbarkeit bei. Proliferierende Endothelzellen zeigen bei reduzierter TERT-Menge einen seneszenten Phänotyp (Erusalimsky & Skene, 2009). Weitere Funktionen der katalytischen Untereinheit TERT sind z.B. die Apoptoseinhibition unter anderem in Endothelzellen (Haendeler, Hoffmann, Rahman, Zeiher, & Dimmeler, 2003). Weiterhin konnte TERT in den Mitochondrien von u.a. Endothelzellen nachgewiesen werden und übernimmt hier eine schützende Funktion für die mtDNA (Czypiorski et al., 2014; Haendeler et al., 2009).

Für die Entdeckung von Stickstoffmonoxid (NO) und die Beschreibung seiner Bedeutung für die Blutversorgung von Organen (vasodilatative Wirkung) sowie die Untersuchung als Signalmolekül wurde 1998 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an die drei Wissenschaftler, Robert Furchgott, Ferid Murad und Louis J. Ignarro verliehen. NO hat in mehrfacher Hinsicht eine hohe Bedeutung für das kardiovaskuläre System.

Die der Endothelzelle eigene NO-Synthase (eNOS) katalysiert NO über die Reaktion von Arginin und Sauerstoff zu Citrullin und NO. Seine Wirkung entfaltet NO nach Diffusion in die glatten Muskelzellen über die Aktivierung der NO-sensitiven, löslichen Guanylatcyclase (GC). Trotz der kurzen Halbwertszeit von 2-30 Sek erzielt NO hierdurch eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und damit eine Vasodilatation. Im Hinblick auf die vasodilatative Wirkung konnte gezeigt werden, dass sich während des Alterungsprozesses die NO-Bioverfügbarkeit reduziert (Muller-Delp, Gurovich, Christou, & Leeuwenburgh, 2012). Die vorherrschenden Daten aus Tiermodellen zeigen so zum Beispiel, dass die altersabhängige endotheliale Dysfunktion innerhalb der Mikrozirkulation durch eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit bedingt ist (Muller-Delp et al., 2012).

Hinsichtlich seiner Funktion als Signalmolekül hat NO vielfache Funktionen. Zum einen spielt NO eine Rolle im Zusammenhang mit der Migrationsfähigkeit von Endothelzellen (Hoffmann et al.,

Einleitung

2001). Weiterhin verhindert es die Adhäsion von Leukozyten, inhibiert die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Anheftung von Thrombozyten (Ross, 1995). Außerdem inhibiert NO die Apoptose von Endothelzellen durch die Hemmung der pro-apoptotischen Signalwege (Hirst & Robson, 2011). Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Verfügbarkeit von NO als wichtigem Schutzfaktor des Endothels im Alter abnimmt (Hoffmann et al., 2001; Muller-Delp et al., 2012). Die verringerte NO-Bioverfügbarkeit ist einer der Gründe für eine altersbedingte endotheliale Dysfunktion.

Als drittes Merkmal der endothelialen Dysfunktion wurde in gealterten Endothelzellen ein Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beobachtet (Haendeler et al., 2004b). Schon Harman postulierte 1956 eine Theorie der Alterung, in welcher es mit zunehmendem Alter der Zellen zu einem Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies kommt (Harman, 1956).

Reaktive Sauerstoffspezies sind hoch reaktiv und in der Lage diverse zelluläre Makromoleküle zu schädigen. Dies geschieht z.B. durch die Oxidation von Proteinen und Lipiden oder die Schädigung der DNA. Auch niedermolekulare Substanzen können in ihrer Wirkungsweise verändert werden (Sies & Cadenas, 1985). In der Zelle unterliegt die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und ihre Elimination einem steten Prozess. Zur Regulation dieser sog. Redoxhomöostase existieren pro- und antioxidative Systeme, die im Weiteren näher vorgestellt werden.

1.3 Pro- und antioxidative Systeme in Endothelzellen

Reaktive Sauerstoffspezies sind per definitionem Moleküle, die molekularen Sauerstoff oder Sauerstoffradikale beinhalten. Sie werden von aeroben Organismen gebildet und abgebaut. Wichtige Vertreter intrazellulärer ROS sind Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxid (O_2^-) und das Hydroxylradikal (OH^\cdot). Es besteht seit langem eine Debatte darüber ob reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ursächlich beteiligt oder unbeteiligte Nebenprodukte im Prozess des Alterns sind. Sicher anzunehmen ist, dass Anpassungsreaktionen in Zellen stattfinden und das physiologische Konzentrationen an ROS, welche von Zelle zu Zelle unterschiedlich sind, zur intrazellulären Signaltransduktion notwendig sind. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen so z.B. die Aktivierung und Deaktivierung von Kinasen und Phosphatasen, die Regulation von Transkriptionsfaktoren und in der Folge die Veränderung von Genexpressionsmustern (Lukosz et

Einleitung

al., 2010). Somit ist eine balancierte Redoxhomöostase für die Zelle unverzichtbar. Diese Tatsache kann auch im Zusammenhang eines Therapieversagens bei der Applikation genereller Antioxidantien gesehen werden. So konnte für diesen Ansatz in mehrfachen klinischen Studien kein Vorteil gezeigt werden (Otani, 2013).

Im Rahmen der Redoxhomöostase existieren oxidative und anti-oxidative Systeme in der Zelle. Schlüsselmoleküle in Endothelzellen zur Regulation der Redoxhomöostase sind die NADPH-Oxidasen (NOXs), welche ausschließlich ROS produzieren, und das Thioredoxin-1 System, bestehend aus Thioredoxin-1 (Trx-1) und Thioredoxin-1 Reduktase, welches das oxidierte Protein reduziert.

1.3.1 Oxidative Systeme

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen aus verschiedenen endogenen Quellen, wobei sie auf der einen Seite physiologisch vorgesehen sind und auf der anderen Seite im Rahmen von fehlgeleiteten Reaktionen entstehen. Hauptsächliche ROS-Quellen sind NADPH-Oxidasen (NOX), die Xanthinoxidase (XO), die Elektronentransportkette der Mitochondrien und eine entkoppelte endotheliale NO-Synthase.

Die Xanthinoxidase katalysiert die Oxidation von Xanthin und Hypoxanthin im Purinstoffwechsel. Darüber hinaus ist es an der Entstehung von Superoxiden in Endothelzellen beteiligt (Phan, Gannon, Varani, Ryan, & Ward, 1989; Zweier, Kuppusamy, & Lutty, 1988). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die quantitative Bedeutung der NADPH-Oxidase für die ROS Entstehung deutlich größer ist.

In Mitochondrien entstehen vor allem Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid (Boveris & Chance, 1973; Nohl & Hegner, 1978). Im Rahmen der Atmungskette wird in Mitochondrien molekularer Sauerstoff durch Übertragung von Elektronen zu Wasser reduziert. Hierbei wird ein Teil des Sauerstoffs unvollständig metabolisiert. Von einer Entkopplung der eNOS spricht man wenn die enzymatische Reduktion des molekularen Sauerstoffs durch Oxidation des Kofaktors von der katalytischen Reaktion mit L-Arginin entkoppelt. In der Folge zerfällt der stabilisierende Komplex des Sauerstoffes und O_2^- entsteht. Bei Knappheit des Substrates L-Arginin kommt es auch zu einem Zerfall des stabilisierenden Komplexes und die eNOS wird von einem NO produzierenden Enzym zu einem O_2^- produzierenden (Forstermann & Munzel, 2006).

Einleitung

In der vorliegenden Arbeit richtet sich das Hauptaugenmerk auf die NADPH Oxidasen. Die Familie der NADPH Oxidasen beinhaltet sieben Mitglieder: Die klassischen NADPH Oxidasen NOX1-NOX5 und die dual-Oxidasen Duox1 und Duox2 (Bedard & Krause, 2007). Diese Enzyme wurden zunächst in weißen Blutzellen identifiziert, wo sie für den "respiratory burst" während der Immunantwort verantwortlich sind (Babior, Kipnes, & Curnutte, 1973). Die Hauptaufgabe der NOX ist die Produktion von Superoxid-Anionen bzw. H_2O_2 (Takac, Schroder, & Brandes, 2012). Unter physiologischen Bedingungen werden die NADPH Oxidasen als die Hauptquelle für ROS im Gefäßsystem aufgefasst (Takac et al., 2012).

NADPH-Oxidasen sind Proteinkomplexe, die sich in ihrer membrandurchspannenden katalytischen Untereinheit (NOX) unterscheiden. NOX sind membrangebundene Enzyme, die Elektronen über Membranen hinweg transportieren. Diese werden letztlich an Sauerstoff als finalen Elektronenakzeptor übertragen und Superoxid wird generiert (Brieger, Schiavone, Miller, & Krause, 2012). Dies gilt im Wesentlichen für NOX 1,2 und 5. Im Gegensatz dazu produziert NOX4 hauptsächlich H_2O_2 (Takac et al., 2012). Die katalytische Untereinheit aller NOX-Proteine besteht aus einer C-terminalen Dehydrogenase-Domäne mit einer NADPH-Bindungsstelle und einem gebundenen FAD (Brieger et al., 2012). Die Isoformen unterscheiden sich aufgrund ihres Vorkommens in verschiedenen Geweben, der Struktur ihrer Domänen, der Struktur der katalytischen Untereinheit und ihrem Aktivierungsmechanismus.

NOX1

NOX1 unterliegt einem strengen Aktivierungsmechanismus durch dazu notwendige Untereinheiten. Namentlich handelt es sich um Nox-organizing protein I (NOXO I) und Nox-activating protein I (NOXA I), homologe Proteine zu p47phox und p67phox. Fraglich sind zudem p40phox und Rac. Erst nach deren Anlagerung ist NOX1 aktiv. NOX1 wird insbesondere im Colonepithel exprimiert, findet sich aber auch in anderen Epithelzellen wie dem Alveolarepithel. Im weiteren ist es in Endothel, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und in der Mikroglia vorhanden (Brieger et al., 2012).

Einleitung

NOX2

Der Prototyp der NADPH-Oxidasen, die NOX2, wurde ursprünglich in Phagozyten entdeckt und beschrieben. Hier spielt sie eine wesentliche Rolle in der unspezifischen „host-defence“ gegen Bakterien. Sie generiert in Granulozyten den zur Abwehr notwendigen „oxidative burst“, d.h. nach ihrer Aktivierung produziert sie große Mengen an Superoxid (Ray & Shah, 2005). Zur Aktivierung sind eine Reihe von Untereinheiten notwendig, die sich an die katalytische Untereinheit anlagern: p67phox, p47phox, p40phox und Rac2. Die Aktivierung findet in einem hoch regulierten Prozess aus Translokation und Anlagerung der Untereinheiten an die katalytische Untereinheit statt (Ray & Shah, 2005). Neben dem beschriebenen Vorkommen, wird NOX2 in kleineren Mengen auch in anderen Geweben wie Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Neuronen und Beta-Zellen des Pankreas exprimiert (Brieger et al., 2012).

NOX3

NOX3 kommt im auditiven und vestibulären Anteil des Innenohrs vor. Wie NOX1 und NOX2 ist die NOX3 Aktivierung von der Anlagerung der Untereinheiten abhängig (Banfi et al., 2004).

NOX4

NOX 4 wird insbesondere in der Niere exprimiert. Daneben kommt es in allen Zellen des Gefäßsystems wie Fibroblasten der Adventitia, glatten Muskelzellen und Endothelzellen vor. Weiterhin lässt es sich in Osteoklasten und Neuronen nachweisen (Brieger et al., 2012) (Takac et al., 2012). Generell übertrifft NOX4 in der Expressionsmenge NOX1 und NOX2 (Ago et al., 2004). Besonders in Endothelzellen wird NOX4 konstitutiv in hohen Mengen exprimiert (Takac et al., 2012). NOX4 ist dabei an lokalen Adhäsionen, im Nukleus und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Hilenski, Clempus, Quinn, Lambeth, & Griendling, 2004). Eine Besonderheit von NOX4, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Familie ist, dass es konstitutiv aktiv ist und die Aktivität primär über das Expressionslevel gesteuert wird (Brieger et al., 2012).

NOX5

NOX 5 wird in Schilddrüsengewebe und Testikeln exprimiert. Es unterscheidet sich durch eine zusätzliche zytosolische N-terminale regulatorische Domäne. Die Aktivierung wird über eine

Einleitung

Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Menge und durch Phosphorylierung gesteuert (Bedard & Krause, 2007) (Brieger et al., 2012). NOX 5 ist bisher nur im Menschen gefunden worden (Takac et al., 2012).

DUOX1 und DUOX2

Besondere Bedeutung haben diese Isoformen der NADPH-Oxidasen im Schilddrüsengewebe. Zusätzlich wurden sie im Epithel des Respirationstraktes und des digestiven-Traktes gefunden. Ähnlich zu NOX5 läuft die Aktivierung über Ca^{2+} . Beide Isoformen haben sieben trans-membran-Domänen und sind stark glykosyliert. Man nimmt an, dass sie hauptsächlich H_2O_2 produzieren (Brieger et al., 2012).

Die in Endothelzellen am häufigsten vorkommende NADPH-Oxidase ist die NOX4 (Ray & Shah, 2005). Die Rolle der NADPH-Oxidasen im Prozess der Alterung wurde lange unterschätzt, da die Überproduktion an ROS im Alter und im Rahmen von Erkrankungen auf eine Fehlfunktion in der Atmungskette der Mitochondrien zurückgeführt wurde (Krause, 2007). Eine Studie von Lener et al. zeigt jedoch, dass ein knock-out von NOX4 in humanen Endothelzellen zu einer verzögerten replikativen Seneszenz führt (Lener et al., 2009). Eine Hochregulation von NOX4 in gealterten Endothelzellen ist somit vorstellbar, wurde aber bisher nicht untersucht.

Einleitung

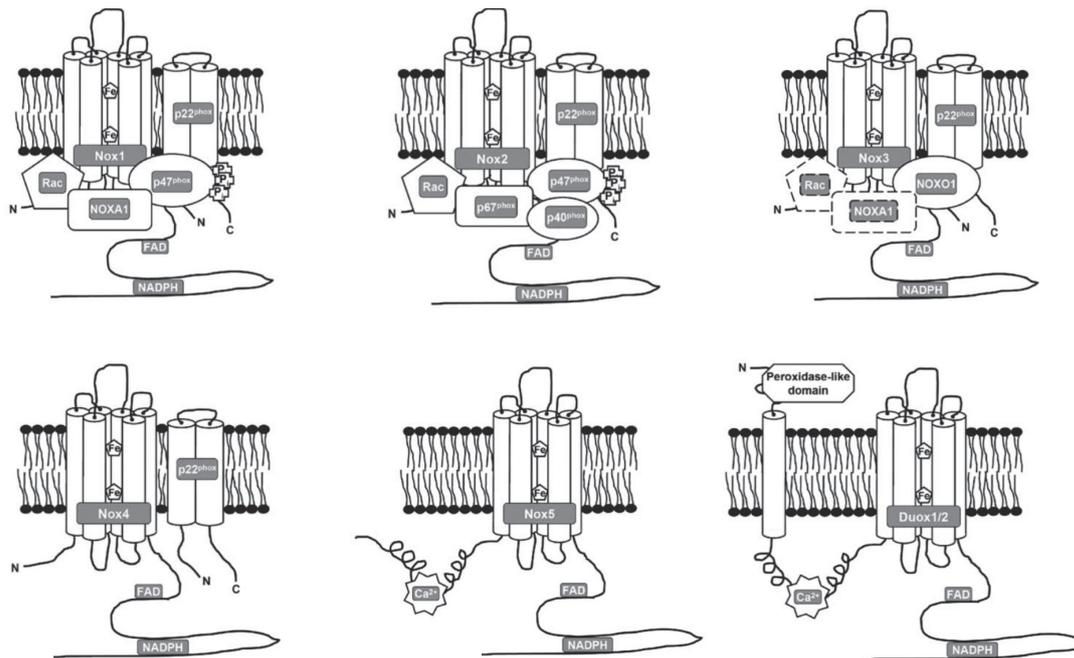


Abb.2: Schematische Darstellung der Struktur der NOX Komplexe; aus "Nitric Oxide, NADPH-Oxidase and Atherosclerosis" von Gregor Muller und Henning Morawietz, 2009.

1.3.2 Antioxidative Systeme

Ein Gegengewicht zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies bzw. zur Begrenzung auf ein physiologisches Niveau stellen die antioxidativen Systeme der Zelle dar. Dieses Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Systemen wird als Redoxhomöostase bezeichnet. Oxidativer Stress beschreibt somit ein Überwiegen von ROS, sei es durch eine übermäßige Produktion z.B. im Rahmen des Alterungsprozesses oder durch eine Reduktion der antioxidativen Systeme der Zelle (Sies & Cadenas, 1985). Verschiedene Enzymsysteme bzw. Substanzen sind in der Lage ROS zu reduzieren oder zu binden. Beispiele hierfür sind das Thioredoxinsystem, die Superoxiddismutase, die Peroxireduktase, die Katalase, das Glutathion, die Glutathionperoxidase, die Peroxidase und das Glutaredoxin.

So katalysiert z.B. die Superoxiddismutase die Reduktion von O_2^- zu H_2O_2 , welches dann durch die Katalase zu H_2O und molekularem Sauerstoff reagiert. Die Glutathionperoxidase ist zusammen mit Glutathion ebenfalls in der Lage diese Reaktion zu katalysieren. Glutathion besteht aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin und ist in vielen Zellen in hohen

Einleitung

Konzentrationen vorhanden. Es liegt zum überwiegenden Teil in der reduzierten Form vor und bildet somit einen reduktiven bzw. antioxidativen Puffer innerhalb der Zellen. Ebenfalls unter Mitwirkung von Glutathion reduziert Glutaredoxin Proteine über ein eigenes aktives Zentrum, welches durch Glutathion selbst wieder reduziert wird und das Enzym so wiederherstellt (Lillig, Berndt, & Holmgren, 2008). Peroxiredoxine reduzieren unter Oxidation der Cysteine im katalytischen Zentrum und werden enzymatisch durch das Thioredoxinsystem regeneriert (Chae, Kim, Kang, & Rhee, 1999).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Thioredoxin-1 als antioxidativem Gegenspieler zu NOX4. Thioredoxin-1 wird in allen Säugetierzellen exprimiert (Holmgren, 2000) und ist in Endothelzellen eines der wichtigsten anti-oxidativen Enzyme (Haendeler, 2006). Die Bedeutung dieses Enzyms wird durch die Tatsache hervorgehoben, dass ein Fehlen von Trx-1 in Mäusen zu einem frühen Tod führt (Matsui et al., 1996). In Endothelzellen ist Trx-1 eines der wichtigsten anti-oxidativen Enzyme (Haendeler, 2006). Neben der enzymatischen Aktivität als Oxidoreduktase, interagiert Trx-1 auch direkt mit anderen Proteinen im Zytosol, Nukleus und Plasmamembran und moduliert dadurch deren Funktion (Zschauer et al., 2013). Hierdurch spielt Trx-1 in verschiedenen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose eine wichtige Rolle. Die physiologischen Funktionen von Trx-1 in verschiedenen Organsystemen hat sich von der fundamentalen Reaktion der Reduktion oxidierter Proteine zu einer Vielzahl an spezialisierten Funktionen entwickelt.

Thioredoxin-1 ist ein 12kDa großes Protein. Ursprünglich wurde es 1964 erstmalig in Bakterien beschrieben (Holmgren, 1968). Es zeigt eine Aminosäuresequenz von 104 Aminosäuren, die eine konservierte redoxregulatorische Domäne in Position 32-35 mit der Aminosäuresequenz Cys32-Gly-Pro-Cys35 aufweist (Holmgren, Soderberg, Eklund, & Branden, 1975). Trx-1 ist über die Cysteine 32 und 35 in der Lage Disulfidbrücken anderer Proteine zu reduzieren. Es selbst wird hierbei oxidiert, daher wird Trx-1 auch als Redox-Regulator angesehen. Eine Regeneration von oxidiertem Trx-1 ist in Abhängigkeit von NADPH und durch die Anwesenheit von Thioredoxin-Reduktase möglich. Zu 90% liegt Trx-1 intrazellulär in reduzierter Form vor. Die

Einleitung

Aminosäuresequenz ist namensgebend für die Thioredoxin-Proteinfamilie und essentiell für die redox-regulatorische Funktion von Trx-1 (Holmgren, 1989).

Insgesamt sind drei Thioredoxine bekannt. Trx-1 ist im Zytosol und nukleär lokalisiert. Trx-2 wird ubiquitär exprimiert, ist aber in den Mitochondrien lokalisiert. Des Weiteren gibt es ein Testis-spezifisches Thioredoxin (spTrx), welches in Spermatozoen exprimiert wird. Das Thioredoxin System besteht aus zwei Oxidoreduktasen, Thioredoxin (Trx-1) und Thioredoxin Reduktase 1 (Holmgren, 1989; Nordberg & Arner, 2001). Prinzipiell wirkt Trx-1 anti-oxidativ, anti-apoptotisch und promigratorisch. Trx-1 wird ubiquitär in eukaryotischen Zellen exprimiert.

Es ist bekannt, dass eine Interaktion von Trx-1 mit TxNIP zu einer Inhibition der Trx-1 Aktivität führt. Des Weiteren ist bekannt, dass diese Bindung durch kardioprotektive Substanzen, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) verhindert wird. Die Aktivität von Trx-1 kann also durch NO gesteigert werden (Schulze et al., 2006). Letztlich kann eine Steigerung der Trx-1 Aktivität und eine Reduktion der TxNIP Expression eine erhöhte anti-oxidative und anti-apoptotische Kapazität von Trx-1 bewirken (Haendeler et al., 2002; Haendeler et al., 2004b; Schulze et al., 2006; Yamawaki & Berk, 2005). *In vivo* zeigte sich, dass dies zu einer gesteigerten Lebensspanne und zu einer Protektion gegenüber Erkrankungen wie z.B. Myokardinfarkt und Apoplex führte (Tao et al., 2004; Yamamoto et al., 2003; Yoshida, Nakamura, Masutani, & Yodoi, 2005; Yoshioka et al., 2004).

Die Idee, dass Trx-1 eine Rolle im Alterungsprozess spielen könnte entstand durch die Beobachtung, dass Trx-1 defiziente *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) eine reduzierte Lebenserwartung aufweisen (Fierro-Gonzalez, Gonzalez-Barrrios, Miranda-Vizuete, & Swoboda, 2011). Für menschliche Endothelzellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass hohe Konzentrationen von ROS eine Degradation von Trx-1 Protein bewirken (Haendeler et al., 2005). Weiterhin zeigte sich im Alterungsmodell der replikativen Seneszenz ein reduziertes Vorkommen von Trx-1, welches durch "re-introduction" von Trx-1 wieder erhöht werden konnte (Altschmied & Haendeler, 2009). Folglich ist von einer wichtigen Rolle für Trx-1 im Alterungsprozess auszugehen und die Möglichkeit den Verlust im Alter zu verhindern könnte von potentiell wichtigem klinischen Interesse sein.

1.3.3 Thioredoxin und Cathepsin D

In Vorversuchen der Arbeitsgruppe zeigte sich eine Regulation von Trx-1 unter hohen Dosen H_2O_2 (100-200 μM). Unter dieser hohen Konzentration kam es zu einem Verlust an Trx-1, der nicht auf eine veränderte Transkriptionsrate zurückzuführen war. Weiterhin wurde eine erhöhte Cathepsin D Aktivität gemessen. Es konnte dann in Endothelzelllysaten gezeigt werden, dass die Trx-1-Proteinmenge nach Behandlung mit rekombinantem Cathepsin D abnahm. Die Inkubation von Endothelzellen mit verschiedenen anderen Proteasen, z.B. Metalloproteasen (EDTA), Cysteinproteasen (E64c), Caspasen (zVAD), Serinproteasen (PMSF) und Ubiquitin-Proteasomenkomplex (MG132) zeigte dagegen keine Abnahme von Trx-1. Des Weiteren konnte durch spezifische Inhibition von Cathepsin D durch Pepstatin A ein Verlust an Trx-1 verhindert werden. Somit konnte durch Überexpression von Cathepsin D in Endothelzellen ein Abbau von Trx-1 nachgewiesen werden. Spezifischer konnte die Notwendigkeit der katalytischen Untereinheit festgestellt werden, da eine katalytisch-inaktive Cathepsin D-Mutante keinen Effekt auf die Trx-1-Proteinmenge hatte. Letztlich konnte sogar durch eine Reduktion der Cathepsin D-Expression mit Hilfe von antisense-Oligonukleotiden gezeigt werden, dass sich die Trx-1 Proteinmenge selbst unter hohen Dosen H_2O_2 stabilisierte und die durch H_2O_2 -induzierte Apoptose vollständig unterbunden werden konnte. Ergänzend wurde in Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen, dass es unter diesen Bedingungen zu einer Verschiebung von Trx-1 in die Lysosomen kommt. Cathepsin D verblieb hingegen in den Lysosomen. Hieraus erschließt sich, dass es unter dem Einfluss von hohen Konzentrationen an H_2O_2 zunächst zu einer Translokation von Trx-1 in die Lysosomen kommt, wo es von Cathepsin D gespalten wird. Letztlich induziert dies die Apoptose der Endothelzelle (Haendeler et al., 2005).

1.4 Ziele der Arbeit

Eines der wichtigsten redoxregulatorischen Enzyme in primären humanen Endothelzellen ist Thioredoxin-1 (Trx-1), ein 12 kD großes Protein mit zusätzlich anti-apoptotischen Eigenschaften. Eine wichtige Quelle intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies sind die NADPH Oxidasen (NOX), hierbei zeigt der Subtyp NOX4 die höchste Expression in Endothelzellen. Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst eine mögliche Regulation des anti-oxidativen Proteins Trx-1 und des oxidativen Proteins NOX4 im Alterungsmodell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz in primären

Einleitung

humanen Endothelzellen zu untersuchen. Die Endothelzellen wurden hierzu zwei Wochen lang mit H_2O_2 behandelt um diese vorzeitige, stressinduzierte Seneszenz zu erzeugen. In diesem Modell konnte ein Anstieg der seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase und des nukleären p21 als Seneszenzmarker gezeigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl die totale, als auch die mitochondriale Menge an reaktiven Sauerstoffspezies erhöht war und dass es zu einer "Überaktivierung" von Cathepsin D kommt. Dieses Ungleichgewicht der intrazellulären Redoxhomöostase konnte auf erhöhte Level NOX4 und reduzierte Level Trx-1 zurückgeführt werden. In einem weiterführenden Ansatz wurde versucht diesem Ungleichgewicht durch eine lentivirale Expression von Trx-1 entgegenzuwirken. Zugleich sollte das Zusammenspiel von Cathepsin D, einer lysosomalen Protease welche aus Vorversuchen für den Abbau von Trx-1 bekannt war, und Trx-1 untersucht werden. Ziel war es durch die Stabilisierung der intrazellulären Redoxhomöostase dem Auftreten einer vorzeitigen stressinduzierten Seneszenz entgegenzuwirken. Hierzu sollte die "überaktive" Protease Cathepsin D durch den spezifischen und zellpermeablen Inhibitor Pepstatin A gehemmt werden um so der Degradation von Trx-1, den erhöhten ROS Leveln und dem Eintritt einer vorzeitigen stressinduzierten Seneszenz entgegenzuwirken.

Letztlich war es Ziel dieser Arbeit die Ergebnisse dieser *in vitro* Untersuchungen mit einem bestehenden Mausmodell, welches ausschließlich NOX4 in Endothelzellen überexprimiert, zu vergleichen. Es zeigte sich eine Reduktion der aortalen Trx-1 Level der transgenen Mäuse und eine gesteigerte Cathepsin D Aktivität im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern.

Mit diesen Versuchen sollte gezeigt werden, dass der Verlust an Trx-1 und die Hochregulation an NOX4 einen wichtigen Beitrag zur imbalancierten Redoxhomöostase in seneszenten Endothelzellen, *ex vivo* und *in vivo*, liefert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamidmix	AppliChem
Agarose UltraPure™	Invitrogen
APS	Sigma
Aprotinin	Sigma
BSA	Roth
Cathepsin D	Sigma
DMSO	Roth
DTT	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Gen ruler 1kb DNA Leiter	Thermo Scientific
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Sigma
Glycin	Roth
GoTaq Polymerase	Promega
HCl	Roth
Isopropanol	Roth
KCl	Roth
Leupeptin	Sigma
Low Range Rainbow Molecular Weight Marker	GE Healthcare
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
NaCl	Roth

Material und Methoden

Paraformaldehyd	Roth
Pepstatin A	Sigma
PMSF	Roth
Polybren	Sigma
Prolong® Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen
Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards	Bio-Rad
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Protein Assay	Bio-Rad
Puromycin	Roth
RQ1 RNase-Free DNase Product-Kit	Promega
Saccharose	Roth
SDS	Roth
SuperScript™ III First-Strand Synthesis System	Invitrogen
TEMED	AppliChem
Tris Base	Roth
Triton X-100	Sigma
TRIzol	Invitrogen
Tween 20	Sigma
X-Gal	Applichem

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Roth
Kulturflaschen für die Zellkultur (Cellstar), 75 cm ²	Greiner
Kulturschalen für die Zellkultur, 100 mm	TPP
6 well-Platten für die Zellkultur	Greiner
96 well-Platten für die Zellkultur	Greiner
Zellschaber	TPP
Falconröhrchen (15, 50 ml)	TPP
Einmalküvetten	Sarstedt

Material und Methoden

UV Küvetten (UV Küvette mikro)	Plastibrand
Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare
Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare
Pipetten (0,5-10, 2-20, 10-100, 20-200, 100-1000 µl)	Eppendorf
Stabpipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner
Spitzen (TipOne) (0,1-100, 1-100, 101-1000 µl)	Starlab
Parafilm	Pechiney Plastic Packing

2.1.3 Geräte:

Brutschrank (Hera cell 240)	Heraeus
Elektrophoreseapparaturen für SDS-PAGE und Proteintransfer	Bio-Rad
Elektrophoresekammern für DNA	
FACS Calibur	PEQ Lab
FluorChem 8900	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer D1	Alpha Innotech
Fluorometer	Zeiss
Mikroskop (Zeiss Axiorot 25)	TECAN i-control
Mikroskop (Axio Oberserver A1)	Zeiss
pH-Meter (pH 211 Microprocessor pH Meter)	Zeiss
Proteintransferapparatur (Mini PROTEAN TetraCell)	HANNA instruments
Obrbitalschüttler (KS 260 basic)	Bio-Rad
Schüttler (MKR 10/13)	IKA
Spektrometer Smart Spec™ Plus	HLC
Sterilbank (Hera safe)	Bio-Rad
Thermocycler GS482	Heraeus
Thermo-Schüttelschrank	G-Storm
Thermomixer compact	Infors HAT
Vortex-Genie 2	Eppendorf
Wasserbad	Scientific Industries

Material und Methoden

Zentrifugen (Micro 22R)	Bayer-Enders
Zentrifugen (Rotina 420R)	Hettich
	Hettich

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze:

BBE	Lonza
Dulbecco`s Modified Eagle Medium + GlutaMAX (DMEM)	Invitrogen
Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Invitrogen
Endothelial Cell Basal Medium (EBM)	Lonza
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
GA-1000 (50 mg/ml Gentamicin; 50 µg/ml Amphotericin B)	Lonza
Geneticin (50 mg/ml)	Invitrogen
Hydrocortison (1 mg/ml)	Lonza
NEAA (10 mM)	Invitrogen
PenStrep (5000 U/ml Penicillin; 5000 µg/ml Streptomycin)	Invitrogen
rhEGF (10 µg/ml)	Lonza
Trypsin/ EDTA 0,5%	Invitrogen

2.1.5 Verwendete Primärzelle und Kompletmedium:

Zellen	Kulturmedium mit Zusätzen (Kompletmedium)
HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) Hersteller: Lonza	EBM mit 0,1% rhEGF recombinant human Epidermal Growth Factor, 0,1% Hydrocortison, 0,1% GA-1000 und 0,4% (v/v) Bovine Brain Extract (BBE), 10% (v/v) FCS nicht hitzeinaktiviert

Material und Methoden

2.1.6 Verwendete Primer:

Name	forward/reverse	Sequenz
NOX4	hNox4 for 1	5'AGTCAAACAGATGGGATA 3'
	hNox4 rev 1	5' TGTCCCATATGAGTTGTT 3'
Erk 1	hERK1 Ex 03 for 1	5' TCCAACCTGCTCATCAACAC 3'
	h ERK1 Ex04/05 rev 1	5' TAGCCCTTGGAGTTCAGCAT 3'
Erk 2	hERK2 Ex 08 for 1	5' TGCTAGATTCCAGCCAGGAT 3'
	hERK2 Ex 09 rev 1	5' ACGGCTCAAAGGAGTCAAAG 3'

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von humanen venösen Nabelschnur Endothelzellen (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)

Primäre humane Endothelzellen wurden in Endothelzell-Basalmedium (EBM; Clonetics, Cell Systems, St. Katharinen) mit folgenden Zusätzen (Fa. Clonetics): Hydrocortison (1 µg/ml), epidermaler Wachstumsfaktor (10 ng/ml), Gentamicin (50 µg/ml), Amphotericin B (50 ng/ml) und Rinderhirnextrakt (12 µg/ml) und 10% fötales Kälberserum (FCS; Fa. GibcoBRL, Karlsruhe) kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einer 5% CO₂-Atmosphäre in einem CO₂-Inkubator. Die Zellen wurden für die Versuche mittels Trypsinverdau passagiert. Die Zellen wurden spätestens in Passage 3 für Versuche genutzt. Sämtliche Zellarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

2.2.1.2 Passagierungsmodell zur Seneszenzentwicklung

HUVEC wurden in 75 cm² Kulturflaschen in einer Dichte von 5x10⁵ Zellen/Flasche ausgebracht. Nach einigen Tagen Anzucht wuchsen die Zellen zu einem konfluenten Monolayer zusammen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Trypsinverdaus passagiert und erneut mit einer Zellzahl von 5x10⁵ ausgebracht. Die Verdopplungsraten wurden wie folgt bestimmt:

Verdopplungsrate (population doubling, PDL):

$$\text{PDL} = (\log_{10} F - \log_{10} I) / 0,301$$

F = Anzahl der Zellen am Ende der Passage

I = Anzahl der Zellen beim Aussähen

In jeder Passage wurden Zellen zur Seneszenzbestimmung in Zellkulturschalen ausgebracht.

2.2.1.2 Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz

HUVEC wurden in 60mm Zellkulturschalen mit 1x10⁵ ausgebracht. Nach 48 stündiger Anzucht der Zellen wurde die Behandlung begonnen. Das Behandlungsprotokoll unterteilte sich in vier verschiedene Behandlungsgruppen. Vor jeder Behandlung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden mit 50µM H₂O₂ oder mit 50 ng/ml (72,89 nM) Pepsatin A oder koinkubiert mit H₂O₂ (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) und Pepstatin A (Fa. Sigma). Zur Kontrolle

Material und Methoden

wurden Zellen ohne Behandlung kultiviert. Die Behandlung erfolgte alle 48 Stunden für insgesamt zwei Wochen.

Behandlungsgruppe:	Kontrolle	H ₂ O ₂	PepA	H ₂ O ₂ +PepA
Behandlung:	Mediumwechsel	50 µM H ₂ O ₂	50 ng/ml PepstatinA	50 µM H ₂ O ₂ + 50 ng/ml PepstatinA

Tab. 1: Behandlungsschema des Modells der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz

2.2.1.3 Proteinisolation aus Endothelzellen

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit RIPA-Puffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer; 0,5% (w/v) Desoxycholat, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NONIDET P-40, 0,1% (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, additiv wurde auf 10 ml Puffer eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor zugegeben) auf Eis 30 Min lysiert. Das entstandene Zellhomogenat wurde bei 16.000 xg, 4 °C für 10 Min zentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im Überstand nach der Methode von Bradford (siehe unten). Das Zelllysate wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.4 Proteinisolation aus Tierorganen

Nach Vorlage von flüssigem Stickstoff in einem Mörser wurden die Organe von C57BL/6J Mäusen bzw. Wildtyp-Mäusen mit dem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. In Abhängigkeit der Organmasse wurden 200 bis 1000 µl RIPA-Puffer zur Lyse hinzugegeben. Ab dem Zeitpunkt des Auftauens wurde für 30 Min lysiert. Nach dem Zentrifugieren (16.000 xg, 4 °C, 15 Min) wurde der Überstand wie unter 2.1.5 erläutert auf seinen Proteingehalt untersucht.

Tierversuchsgenehmigung:

Aktenzeichen des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV): 84-02.05.20.12.237, Datum: 28.09.2012, Antragssteller: PD Dr. Klaus Unfried

2.2.1.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration folgte dem Standardverfahren nach Bradford (Bradford, 1976). Hierzu wurde das BioRad Protein Assay Reagenz (Fa.Bio-Rad, München) verwendet. 800 μl dH_2O , 200 μl Bradford Reagenz, 1 μl zu bestimmendes Proteinlysate bzw. RIPA-Puffer (Referenz) wurden vermischt und 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Absorptionsmessung wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595 \text{ nm}$ als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Umrechnung in eine Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve. Diese wurde mit BSA (Rinderserumalbumin) erstellt.

2.2.1.6 Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine diskontinuierliche gelelektrophoretische Auftrennung von komplexen Proteingemischen in der Reihenfolge des Molekulargewichtes der Proteine (Laemmli, 1970). SDS ist ein anionisches Detergenz, welches die hydrophoben Bereiche der Proteine mit negativer Ladung überdeckt. Dadurch wandern die Proteine in der Gelmatrix in Abhängigkeit ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode. Die Auftrennung der Proteine findet im Trenngel statt, diesem geht ein Sammelgel voraus, welches einen saureren pH-Wert als das Trenngel hat. Hierdurch sammeln sich die Proteine am Übergang zum Trenngel.

Innerhalb des Trenngels entscheidet der Anteil an Acrylamid/Bisacrylamid über die erreichte Vernetzung innerhalb des Gels. Je höher der Acrylamid/Bisacrylamid-Anteil ist, desto kleinere Proteine können dargestellt werden.

Zwischen zwei Glasplatten der Gel-Apparatur wurde dem Pipettierschema (siehe unten) folgend zunächst die Trenngellösung eingefüllt und mit 100% Ethanol überschichtet, nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Ethanol abgenommen und die Sammelgellösung (siehe unten) eingefüllt. Ein Probenkamm wurde eingesteckt. Zur Probenvorbereitung wurden die in RIPA-Puffer lysierten Proteinproben mit 6x SDS-Ladepuffer (5% (v/v) beta-Mercaptoethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 30% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 350 mM Tris-HCl, pH 6,8) und dH_2O auf einheitliches Endvolumen eingestellt. Die Proteine wurden durch im Ladepuffer enthaltenes Mercaptoethanol und 5 minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert und anschließend 1 Min bei 13.000 xg zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Konzentration des Trenngels lag bei 14% (w/v), die des Sammelgels bei 5% (w/v). Als Proteinstandard bzw.

Material und Methoden

Molekulargewichtsmarker wurde der Precision Plus Proteinstandard verwendet. Zur Konzentration der Proben im Sammelgel wurde anfänglich eine Spannung von 80 V für ca. 15-20 Min angelegt, nach Eintritt der Proben in das Trenngel wurde diese auf 100 V erhöht und die Proben für ca. 60-90 Min aufgetrennt. Die Auftrennung fand in einer mit Laemmli-Laufpuffer (192 mM Glycin, 1% (w/v) SDS, 25 mM Tris) befüllten Elektrophoresekammer statt.

Komponenten	Sammelgel (5%)	Trenngel (14%)
H ₂ O	3400 µl	2800 µl
30% (w/v) Acrylamid-Mix	830 µl	4600 µl
1,5 M Tris-HCl (pH8,8)	-	2600 µl
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	630 µl	-
10% APS	50 µl	100 µl
10% SDS	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	4 µl

Tab.2: Pipettierschema für 5 ml Sammelgel und 10 ml Trenngel

2.2.1.7 Proteintransfer auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Western Blot)

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) übertragen und fixiert. Hierzu wurde ein WET-Blot genutzt. Vor dem Blotten wurde die PVDF-Membran für 90 sec in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer (193 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 24 mM Tris-Base) äquilibriert. Der Aufbau des Blotsandwiches

erfolgte luftblasenfrei zwischen zwei "Scotch pads": auf die Kathodenseite wurden übereinander, ein Schwamm, drei Whatmann Filterpapiere, das Gel, die PVDF-Membran, drei Whatmann Filterpapiere und ein Schwamm geschichtet. Wichtig ist ein luftblasenfreier Aufbau des Blotsandwiches, da durch Luftblasen hindurch keine Proteinübertragung stattfinden kann. Das Blotsandwich wurde in die Transferapparatur eingesetzt und mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte bei 100 V für eine Stunde. Zur Kühlung während des Transfers wurden ein Kühlakku und ein Wassereisbad genutzt.

2.2.1.8 Immundetektion membrangebundener Proteine

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran kurz in TBS-T (Trishydroxymethyl-aminomethan bufferd saline -Tween; 150 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH8,0, 0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen und danach für eine Stunde, bei Raumtemperatur, in 5% (w/v) Magermilchpulver, gelöst in TBS-T, auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Dieser Schritt diente der Absättigung unbesetzter Bindungsstellen auf der Membran. Danach folgte die Inkubation des Primärantikörpers. Der Antikörper wurde in 1% Milchpulver in TBS-T verdünnt. Die Inkubation fand über Nacht bei 4°C statt. Hiernach wurde die Membran viermalig für 10 Min in TBST-T auf einem Orbitalschüttler gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers der wiederum in 1% Milchpulver in TBS-T verdünnt wurde. Die Inkubationszeit betrug 1 Std. bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran viermalig 10 Min in TBS-T auf einem Orbitalschüttler gewaschen.

Der Sekundärantikörper ist ein enzymgekoppelter Antikörper und bindet spezifisch an den Primärantikörper. Das an ihn gekoppelte Enzym ist die Meerrettich Peroxidase. Die Meerrettich Peroxidase katalysiert durch Zugabe von ECL Reagenz die Oxidation von Luminol, welche durch ein Chemolumineszenzsignal nachweisbar ist. Dafür wurde die Membran mit Enhanced-Chemiluminescence-System (GE Healthcare, Muenchen, Germany) inkubiert. Zur Detektion des spezifischen Chemolumineszenzsignals wurde die Membran getrocknet, in eine Filmkassette eingelegt und in einer Dunkelkammer über einen Röntgenfilm gelegt. Nach der Entwicklung und Fixierung des Films zeigten sich die Proteinbanden als Schwärzungen des Röntgenfilms. Es erfolgte eine semi-quantitative Auswertung der eingescannten Immunoblots unter Verwendung von ImageJ (Abramoff, 2004).

Material und Methoden

Erstantikörper:

NOX4 (1:500 (Anilkumar, Weber, Zhang, Brewer, & Shah, 2008), Thioredoxin-1, TIM23 (beide 1:500, BD Biosciences, Heidelberg, Germany), ERK1/2 und p21 (beide 1:500, Cell Signaling/NEB, Frankfurt, Germany).

2.2.2 Klonierung eines lentiviralen Trx-1 Expressionsvektors, Produktion des Lentivirus und Transduktion der Endothelzellen

Zur Herstellung eines lentiviralen Expressionsvektors wurde der menschliche U6 Promoter in pLKO.1 puro (Moffat et al., 2006) durch einen Immediate-Early-Promotor des Zytomegalovirus (CMV) ersetzt. Die codierende Sequenz der FLAG-Trx-1 Bindung wurde in diesen Vektor mit Hilfe des Gibson-assembly-cloning-kit (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben eingebracht um pLenti-FLAG-Trx-1 herzustellen. Virus-Partikel wurden durch Kotransfektion von HEK293FT Zellen mit pMD2.G, pCMVΔR8.91 (<http://tronolab.epfl.ch/lentivectors>) und pLenti-FLAG-Trx-1, in einem Verhältnis von 3,5:6,5:10 hergestellt, hierbei wurde das Calcium-Phosphate-Transfection-Kit (Sigma, Deisenhofen, Germany) benutzt. Der Vektor ohne die CMV/FLAG-Trx-1 Kasette wurde zur Herstellung von Kontroll-Viruspartikeln genutzt. Der den Virus enthaltende Zellüberstand wurde für sechs Tage mit Hilfe von einigen Mediumwechseln gesammelt. Dieser wurde hiernach durch eine 0,45 µm PVDF Membran gefiltert und mit Hilfe eines Centricon Plus-70 Zentrifugenfilters durch Ultrafiltration konzentriert. Dieser hat einen Cut-off des molekularen Gewichtes von 100.000 (Merck Millipore, Schwalbach, Germany). Der Virustiter wurde mit Hilfe des QuickTiter™ Lentivirus Titer Kit (Lentivirus- Associated HIV p24) (Cell Biolabs, San Diego, USA) bestimmt. Die Transduktion der Endothelzellen erfolgte durch eine Vielzahl von Infektionen, circa 3 Stück. Ein Tag nach der Transduktion der Zellen wurden diese dreimal gewaschen und das Medium ersetzt. Sechs Stunden später begann die Behandlung mit H₂O₂.

2.2.3 Tierexperimente

C57BL/6J Mäuse exprimieren humanes NOX4 ausschließlich im Endothel, sie zeigen keine Genmutation der nicotinamiden nucleotiden Transhydrogenase (Ronchi et al., 2013). Sie waren ein Geschenk von Ajay Shah. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation unter Pentobarbital-

Material und Methoden

Anästhesie getötet. Vor der Präparation der thorakalen Aorta und der Leber wurde der Kreislauf mit PBS gespült, die Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle Tierversuche wurden nach Erteilung aller notwendigen Genehmigungen und unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2.4 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies

Lebende Zellen wurden in $5\text{ }\mu\text{M}$ 6-carboxy-2',7'-dichloro- dihydrofluorescein diacetate (DCFH₂-DA), $5\text{ }\mu\text{M}$ dihydroethidium (DHE) oder $5\text{ }\mu\text{M}$ MitoSox für 30 Min bei 37°C inkubiert (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Die Zellen wurden einmalig mit PBS gespült und anschließend durch Trypsinverdau gelöst, das Reaktionsende erfolgte durch Zugabe von PBS mit 10% FCS. Die Zellen wurden durch zentrifugieren (800 g , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 Min) pelletiert und in PBS resuspendiert. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Messung mit Hilfe des FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.2.5 Mitochondrienpräparation

Zur Untersuchung der Regulation von NOX4 wurde die mitochondriale und cytosolische Fraktion aus Endothelzellen isoliert und getrennt auf eine SDS-PAGE aufgetragen um die jeweiligen Proteinlevel zu untersuchen.

Die mitochondriale und zytosolische Fraktion der Endothelzellen wurde hierbei durch unterschiedliche Zentrifugation isoliert. Die Zellen wurden geerntet und bei 600 g für 10 Min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden einmalig in kaltem PBS gewaschen und in Puffer A resuspendiert (20 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM sodium EDTA, 1 mM sodium EGTA, 1 mM dithiothreitol, und 0,1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) dieser enthielt 250mM Saccharose. Die Zellen wurden durch die zehnmalige Verwendung eines Teflonhomogenisators homogenisiert und zweimalig bei 750 g für 10 Min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 10.000 g für 15 Min bei 4°C zentrifugiert, das resultierende mitochondriale Pellet wurde in Puffer A resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Überstand nach der 10.000 g Zentrifugation wurde bei 100.000 g für 1 Std bei 4°C erneut zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Es erfolgte eine Immunpräzipitation der zytosolischen und der mitochondrialen Fraktion mit $5\text{ }\mu\text{g}$

Material und Methoden

Trx-1 Antikörper, 5 µg TIM23 Antikörper und 5 µg NOX4 Antikörper bei 4°C über Nacht im Lysepuffer. Nach der Inkubation mit A/G Plus Agarose (Santa Cruz) für 2 Std. bei 4°C erfolgte das dreimalige Waschen der entstandenen Beads im zuvor genannten Puffer und das Auftragen auf die SDS-PAGE.

2.2.6 Analyse von Seneszenzparametern

Die Seneszenz der Endothelzellen wurde mit Hilfe von Fluoreszenzfärbungen auf seneszenzassoziierte (SA)- β -Galactosidase Aktivität (pH = 6) und auf den Zellzyklusinhibitor p21 (Methode siehe 2.8) untersucht.

Die SA- β -Gal-Färbung bei einem definierten pH-Wert (pH6) ist eine Standardfärbung zum Nachweis seneszenten Zellen (Itahana, Campisi, & Dimri, 2007). Die in seneszenten Zellen erhöhte Expression der sauren lysosomalen beta-Galactosidase kann durch die Reaktion von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid) zu Galactose und einem blauen zytosolischen Präzipitat nachgewiesen werden. Die Zellen wurden zunächst in einer Fixierlösung (0,2% Glutaraldehyd, 2% Para-Formaldehyd (PFA)) 7 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal eine Minute mit PBS gewaschen. Die Färbung mit X-Gal-Lösung (5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 40 mM Citric Acid/ Na₂HPO₄ pH 6,0) erfolgte durch Inkubation für 24 Std bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen fünfmalig eine Minute mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem AXIOVERT 200 M Mikroskop (Zeiss, Jena, Germany) gemacht. Die Auswertung der Bilder erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher (Haendeler et al., 2004a). Die Quantifizierung der Gesamtintensität der Färbung auf p21 wurde mit Hilfe von ImageJ (Abramoff, 2004) durchgeführt.

2.2.7 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert und mit einer Lösung aus 0.3% Triton-X 100 und 3% BSA (bovine serum albumin) in PBS permeabilisiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen anti-p21 (1:50, NEB, Frankfurt, Germany), anti-NOX4 (1:100 (Anilkumar et al., 2008)), und anti-TIM23 (1:100, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) in PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und im Sekundäntikörper Alexa 488-coupled goat anti-mouse IgG (H + L) (1:800) oder Alexa 594-coupled goat anti-rabbit IgG (H + L) (1:800) für 1Stunde bei 37

Material und Methoden

°C inkubiert. Die Färbung von Actin erfolgte durch Inkubation in Alexa 350-coupled phalloidin für 30 Min bei Raumtemperatur (200 U/ml, Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 300 nM, Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Die Zellen wurden gewaschen und mit ProLong Gold antifade mounting medium (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) befestigt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem AXIOVERT 200 M Mikroskop (Zeiss, Jena, Germany) gemacht.

2.2.8 Methoden zur Analyse der Genexpression

2.2.8.1 Isolierung zellulärer Gesamt-RNA

Zur RNA Extraktion wurden generell RNase/DNase-freie Materialien und Reagenzien verwendet. Die RNA wurde mit Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) nach Herstellerangaben isoliert. Zur Lyse wurden die Zellpellets zunächst auf Eis aufgetaut, anschließend in 1 ml Trizol resuspendiert und 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200 µl wassergesättigtes-Chloroform hinzugegeben, 15 Sek auf einem Vortex-Mixer vermischt, für 3 Min bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 12.000xg, 4°C für 15 Min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß übernommen. Anschließend wurden 500 µl Isopropanol (99% v/v) zur Fällung der RNA hinzu pipettiert und die Lösung für 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss erneut bei 12.000xg, 4°C für 10 Min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml Ethanol (75% v/v) gewaschen und auf einem Vortex-Mixer gemischt. Im Anschluss wurde die RNA erneut bei 7.500xg, 4°C für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Reaktionsgefäß mit dem Pellet bei geöffnetem Deckel zum Trocknen in einen Heizblock bei 37°C gestellt. Das trockene RNA-Pellet wurde in 30 µl RNase/DNase-freiem Wasser gelöst. Zur vollständigen Lösung der RNA wurde die Probe 10 Min bei 55°C erwärmt.

Die Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt und die Integrität der RNA wurde gelelektrophoretisch überprüft. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.8.2 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von RNA

Zur photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm (OD260) und $\lambda = 280$ nm (OD280) bestimmt. Die zu untersuchenden Proben wurden in RNase/DNase-freiem Wasser verdünnt und gegen Wasser als

Material und Methoden

Referenz gemessen. Eine Absorption von 1 bei $\lambda = 260$ nm (OD260) entspricht hierbei einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Der Quotient der Absorption (OD260 / OD280) liegt bei sauberer Präparation zwischen 1,8 und 2,0. Bei Verunreinigung durch Proteine oder Phenol sinkt der Quotient.

2.2.8.3 Agarose-Checkgel

Zur Integritätskontrolle von RNA und zur Analyse von PCR-Produkten wurden Agarose-Gelelektrophoresen verwendet. Für diese Gelelektrophoresen wurden 1,5 % (w/v) Agarosegele verwendet. Hierzu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer; 40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf unter 50°C wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,2-0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung in einen gereinigten Gelträger gegossen und mit einem 1mm Probenkamm versehen. Das Gel wurde nach dem Erstarren in seinem Gelträger in die Gelelektrophoreseapparatur eingesetzt und diese mit 1x TAE-Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80V (8V/cm). Die Gelelektrophorese wurde mit 0,5-1 μg RNA nach Zugabe von 6x Probenpuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 1 mM EDTA, 30% (v/v) Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) durchgeführt. Es wurde eine 1kb DNA-Leiter als Größenstandard verwendet. Zur Detektion der Banden wurde das Gel im durchscheinenden UV-Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 302$ nm fotografiert. Hierbei zeigten sich nach erfolgreicher Präparation klar definierte Banden für die 28S und 18S ribosomale RNA.

2.2.8.4 DNase-Verdau von RNA

Der DNase-Verdau wurde eingesetzt um Reste genomischer DNA zu entfernen. Es wurden 5 μg RNA mit RNase/DNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 13 μl aufgefüllt. Es wurden 2 μl 10x Reaktionspuffer (RQ1 DNase Puffer) und 5 μl RNase freie DNase (RQ1 DNase, 1 U/ μl) zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 Min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden anschließend 5 μl RQ1 DNase Stop Solution hinzugegeben und 10 Min bei 65°C inkubiert. Anschließend konnte die Probe bei -80°C gelagert werden.

2.2.8.5 Reverse Transkription zu cDNA

Aliquots der RNA wurden mit Hilfe von SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) revers transkribiert. Es wurden 2 µg zelluläre gesamt RNA oder 1,4 µg DNase verdaute RNA eingesetzt. Es wurde ein Thermocycler genutzt. Die Einzelschritte der reversen Transkription wurden der Anleitung des Herstellers folgend durchgeführt.

Der erste Reaktionsansatz enthielt:

- 2 µg zelluläre gesamt RNA oder 1,4 µg DNase verdaute RNA
- 1 µl Oligo dT20 (50µM)
- 1 µl pdN6 (50 ng/µl)
- 1 µl dNTP-Mix (10mM)
- dieser Ansatz wurde mit RNase/DNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt.

Dieser erste Reaktionsansatz wurde für 5 Min auf 65°C erhitzt und im Anschluss auf 4°C gekühlt.

Der zweite Reaktionsansatz wurde hinzugegeben und für 2 Min bei 37°C erwärmt.

Der zweite Reaktionsansatz enthielt:

- 2 µl 10x FirstStrand Puffer
- 2 µl DTT (0,1M)
- 1 µl RNaseOUT (40U/µl)

Als letzte Komponente wurde 1 µl Reverse Transkriptase (SuperScript III, 200 U/µl) hinzugegeben.

Es folgten 10 Min bei 25°C, 50 Min bei 37°C und 15 Min bei 70°C Inkubation. Danach wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Als Polymerase wurde die GoTaq Polymerase eingesetzt. Die Amplifikation fand in 35-40 Zyklen statt.

Material und Methoden

Die Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 30µl setzten sich wie folgt zusammen:

Komponenten	µl
Forward Primer (10µM)	1
Reverse Primer (10µM)	1
dNTP-Mix (10mM)	1
PCR-Puffer 5x	6
Template	1
go Taq	0,4
MgCl ₂ 3,6 mM	3,6
dH ₂ O	11

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Die Amplifikation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Protokollschritt	Zeit (Sek)	Temperatur (°C)
Initiale	300	94
Denaturierung		
Denaturierung	30	94
Oligonukleotid-	30	55
Annealing		
Elongation	45 Sek/kb	72
Finale Elongation	420	72
Kühlung	∞	4

Die Wahl der Temperatur während des Annealing Schrittes war abhängig von den verwendeten Primern, ebenso richtete sich die Dauer der Elongation nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Nach Ende der Reaktion wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.8.6 Messung genspezifischer mRNA Level mit Hilfe semi-quantitativer real-time PCR Messungen

Bei der quantitativen real-time RT-PCR ist es wie bei der herkömmlichen RT-PCR nötig RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Nach Zugabe spezifischer Primer können bestimmte DNA-Produkte amplifiziert werden. Das LightCycler-System (Fa.Roche, Mannheim) ist in der Lage die Amplifikation während der Reaktion visuell darzustellen. Die PCR Reaktion wurde mit Hilfe von SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt. Es wird die Zunahme der Fluoreszenz des Farbstoffs, welcher sich in die DNA einlagert, gemessen. Aus der entstehenden Reaktionskinetik kann im Vergleich zu einer Standardkurve auf die Ausgangskonzentration der RNA geschlossen werden.

Folgende Primer-Pärchen wurden verwendet:

NOX4 human/mouse: hmNOX4 for 5'-CCTCTTCTTT GTCTTCTACATGCTG-3', hmNOX4 rev 5'-GGCACAAAGGTCCAGAAATCC- 3';

RPL32 human/mouse: RPL32 for 5'- GTGAAGCCCAAGATCGTCAA-3', RPL32 rev 5'-TTGTTGCACATCAGCAGCAC.-3'.

Es wurden in jede LightCycler-Kapillare (20 µl) hinzugegeben: Template 500 ng, 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix 10 µl, Primer A (finale Konzentration 0,3 µM) 1,2 µl, Primer B (finale Konzentration 0,3 µM) 1,2 µl, QuantiTect RT Mix 0,2 µl, RNase freies Wasser variabel.

Das Zytokin-Kontrollkit (Fa. Roche) wurde nach folgendem Pipettierschema gemischt: Standardtemplate (3,15 pg/µl) 1 µl, 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix 10 µl, Primer Mix, Endkonzentration je 0,3 µM 1,2 µl, QuantiTect RT Mix 0,2 µl, RNase freies Wasser 7,6 µl.

Die reverse Transkription und die Amplifikation der cDNA wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Programmtyp	Dauer	Temperatur
Reverse Transkription	20 Min	50 °C
Initiale Aktivierung	15 Min	95 °C
Denaturierung	15 S	94 °C 45 Zyklen
Annealing	20 S	55 °C 45 Zyklen
Elongation	10 S	72 °C 45 Zyklen
Schmelzkurve	variabel	60 °C

Die Schmelzkurvenanalyse dient dem Ausschluss unspezifischer Produkte wie z.B. Primer-Dimere.

2.2.9 Cathepsin D Aktivitätsmessung

Die Aktivität von Cathepsin D wurde mit Hilfe eines Assays von Biocat (Heidelberg, Germany) gemessen, die Bestimmung erfolgte streng nach Angaben des Herstellers.

Es wurde eine definierte Zellmenge zur Untersuchung eingesetzt. Die Zellen wurden für die Versuche mittels Trypsinverdau geerntet und in 200 µl CD Cell Lysis Buffer für 10 Min auf Eis inkubiert, anschließend wurde die Lösung bei 16.000xg, 4°C für 5 Min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zelllysat wurde 1:50 in den Assay eingesetzt. Eine Probe enthielt: Zelllysat und 0,1 µl DMSO. Negativkontrollen wurden hitzeinaktiviert (95°C, 5 min) oder in 1 µg/ml Pepstatin A präinkubiert. Pepstatin A als spezifischer Inhibitor von Cathepsin D wurde eingesetzt um die unspezifische Hintergrundaktivität zu ermitteln. Die Cathepsin D Aktivitätsmessung wurde dann um diese Hintergrundaktivität bereinigt. Jeder Ansatz enthielt 52µl Master Mix. Dies ist eine Lösung aus 50µl CD Reaction Buffer und 2 µl des CD Substrates. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Cathepsin D spaltet das Substrat und setzt dabei einen fluoreszierenden Farbstoff frei, der bei $\lambda = 328/460$ nm gemessen werden kann. Die Aktivität von Cathepsin D drückte sich dabei in relativen Fluoreszenzeinheiten aus (relative fluorescence units, RFU) die pro Mikrogramm Protein der eingesetzten Probe berechnet wurden. Die Cathepsin D Aktivität wurde auf den Proteingehalt normalisiert. Zur Positivkontrolle wurde rekombinantes menschliches Cathepsin D (Sigma, Deisenhofen, Germany) genutzt.

2.2.10 Statistik

Die statistischen Analysen zur Signifikanzbestimmung wurden mit dem Student's t-test mit Hilfe von WinXLSTAT durchgeführt. Ein Wert wurde als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ betrug. Alle Werte werden ausgedrückt als Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM). Mit n wird die Anzahl unabhängiger Experimente bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Prüfung des *in vitro*-Modells der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz unter Behandlung mit H₂O₂

3.1.1 Behandlungsgruppen

Es wurden primäre humane Endothelzellen in Passage 2-3 für zwei Wochen jeden zweiten Tag mit 50µM H₂O₂ behandelt. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Dieses Modell spiegelt die physiologische Situation des Endothels *in vivo* deutlich besser wider als es das Modell der replikativen Seneszenz kann. Die Seneszenz wurde durch den Nachweis von (SA)-β-Galaktosidase und die Zunahme des Zell-Zyklus-Inhibitor p21 in den Endothelzellen bestätigt.

3.1.2 Nachweis der Zunahme SA-β-Galaktosidase positiver Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung

Wie erwartet und in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits publiziert (Haendeler et al., 2004a) induziert die Behandlung mit H₂O₂ Seneszenz. Diese ist mit einem Anstieg der (SA)-β-Galaktosidase assoziiert. Die Überprüfung der Seneszenz erfolgte daher mittels einer (SA)-β-Galaktosidase Färbung (Abb. 3). Der Versuch wurde fünfmal durchgeführt (n = 5) und von zwei unabhängigen Untersuchern ausgezählt. Es bestätigte sich ein signifikanter Anstieg (*p<0,05) des prozentualen Anteils der SA-β-Galaktosidase positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe wurden insgesamt 4193 Zellen und in der H₂O₂ Behandlungsgruppe insgesamt 3985 Zellen analysiert.

Ergebnisse

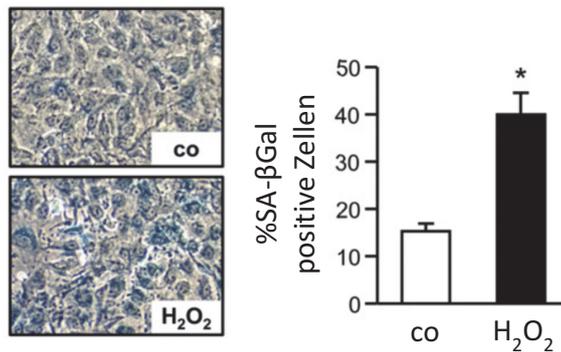


Abb.3: Modell der stressinduzierten Seneszenz in primären humanen Endothelzellen. Die Zellen wurden wie unter 3.1.1. beschrieben behandelt. Gezeigt sind Beispielbilder der (SA)-β-Galaktosidase Färbung, der Graph zeigt den prozentualen Anteil der β-Galaktosidase positiven Zellen (Mittelwerte ± SEM, n=5, *p<0,05, insgesamt wurden 4193 (co) und 3985 (H₂O₂) Zellen analysiert)

3.1.3 Nachweis der Zunahme p21 positiver Zellkerne in der Immunfluoreszenzfärbung

Als zweiter Marker der Seneszenz wurde der bekannte Zell-Zyklus-Inhibitor p21 in Immunfluoreszenzfärbungen quantifiziert. Es wurde der prozentuale Anteil an p21-positiven Zellkernen im Vergleich zur Basisintensität der Färbung mittels ImageJ-Software (Abramoff, 2004) analysiert (Abb. 4). Dieser Versuch wurde viermal durchgeführt (n = 4). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg (*p<0,05) des prozentualen Anteils der p21 positiven Zellkerne unter der Behandlung mit H₂O₂ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gesamtfluoreszenzintensität stieg signifikant (*p<0,05) auf 162 ± 5% im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe wurden insgesamt 2463 Zellen und in der H₂O₂-Behandlungsgruppe insgesamt 2242 Zellen analysiert.

Ergebnisse

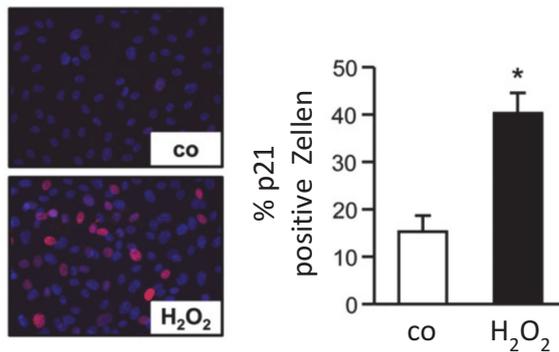


Abb.4: Modell der stressinduzierten Seneszenz in primären humanen Endothelzellen. Die Zellen wurden wie unter 3.1.1. beschrieben behandelt. Gezeigt sind Beispielbilder der p21 Immunfluoreszenzfärbung, der Graph zeigt den prozentualen Anteil p21 positiver Zellkerne (Mittelwerte \pm SEM, n=4, *p<0,05, insgesamt wurden 2463 (co) und 2242 (H₂O₂) Zellen analysiert)

3.1.4 Nachweis der Zunahme der Proteinmenge p21 unter Behandlung mit H₂O₂

Es wurden Immunoblots zur Quantifizierung von p21 und ERK1/2 durchgeführt. ERK1/2 dient zur Normalisierung der semiquantitativen Analyse des p21 Levels. Dieser Versuch wurde fünfmal durchgeführt (n = 5). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg (*p<0,05) des p21-Proteinlevels im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 5). Die Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt.

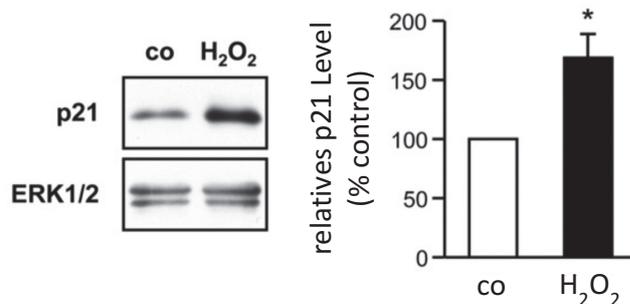


Abb.5: Modell der stressinduzierten Seneszenz in primären humanen Endothelzellen. Die Zellen wurden wie unter 3.1.1. beschrieben behandelt. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel der p21 Immunoblots. Der Graph zeigt eine semiquantitative Analyse des p21 Levels im Verhältnis zu ERK 1/2 (Mittelwerte \pm SEM, n=5, *p<0,05, co auf 100% gesetzt)

3.2 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Durchflusszytometrie

Es wurde untersucht ob die Behandlung der Zellen mit H₂O₂ im Alterungsmodell der stressinduzierten Seneszenz zu einer Erhöhung der totalen und der mitochondrialen ROS Entwicklung führt. Reaktive Sauerstoffspezies wurden durchflusszytometrisch durch Messung

Ergebnisse

von Ethidium ($n = 4$) und DCF ($n = 5$) festgestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($*p < 0,05$) der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität für Ethidium und DCF unter der Behandlung mit H_2O_2 . Zusätzlich wurden die Zellen mithilfe von MitoSox Inkubation auf mitochondriale ROS Produktion untersucht. Dieser Versuch wurde zehnmal wiederholt ($n = 10$) und zeigt einen signifikanten Anstieg ($*p < 0,05$) der durchschnittlichen Fluoreszenz von MitoSox.

Es zeigt sich, dass die Behandlung mit H_2O_2 zu einer Zunahme der totalen ROS-Entwicklung und der mitochondrialen ROS-Produktion führt (Abb. 6 A-C).

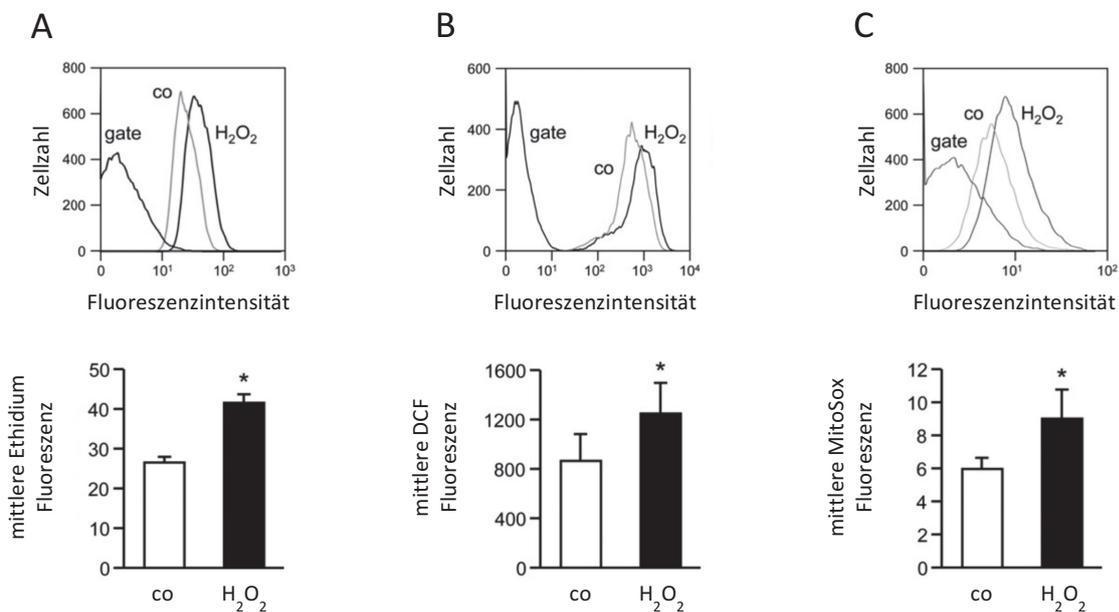


Abb.6: Modell der stressinduzierten Seneszenz in primären humanen Endothelzellen. Die Zellen wurden wie unter 3.1.1. beschrieben behandelt. (A und B) Die Zellen wurden mittels Ethidium (A) und DCF (B) auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies untersucht. Gezeigt sind Beispielbilder des durchflusszytometrischen Profils und Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (Graph, Mittelwerte \pm SEM, $n=4$ (Ethidium), $n=5$ (DCF), $*p < 0,05$). (C) Zusätzlich wurden die Zellen mit Hilfe von MitoSox hinsichtlich der mitochondrialen ROS Produktion untersucht. Gezeigt ist ein Beispielbild des durchflusszytometrischen Profils und der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (Graph, Mittelwerte \pm SEM, $n=10$, $*p < 0,05$).

3.3 Regulation der NOX4 im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten

Seneszenz

Im Wissen, dass im Modell der stressinduzierten Seneszenz das ROS-Level erhöht ist wurde folgend die Regulation von NOX4, der häufigsten NADPH-Oxidase in primären humanen Endothelzellen, untersucht.

Ergebnisse

3.3.1 Anstieg der NOX4 mRNA-Level in der Real-time-PCR Untersuchung

Zur Bestimmung der NOX4 mRNA-Level wurden real-time PCR Untersuchungen durchgeführt. Diese wurden im Vergleich zu RPL32 normalisiert. Der Versuch wurde viermal durchgeführt (n = 4). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg (*p<0,05) der NOX4 mRNA Level unter der Behandlung mit H₂O₂ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 7A).

3.3.2. Zunahme der NOX4-Proteinmenge im Immunoblot

Zur Bestimmung der NOX4-Proteinmenge wurden Immunoblots durchgeführt. Es erfolgte die semiquantitative Auswertung der NOX4 Proteinmenge normalisiert auf ERK1/2. Dieser Versuch wurde sechsmal durchgeführt (n = 6). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg (*p<0,05) der NOX4-Proteinmenge unter der Behandlung mit H₂O₂ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 7B).

3.3.3. Zunahme der mitochondrialen und zytosolischen NOX4-Proteinmenge im fraktionierten Immunoblot

Die signifikante Hochregulation von NOX4 spiegelt die Zunahme der totalen ROS Entwicklung wieder. Darüber hinaus gibt es bekannte Studien, welche ein Vorkommen der NOX4 auch im Mitochondrium vorschlagen (Ago et al., 2010; Block, Gorin, & Abboud, 2009; Koziel et al., 2013). Unter der Hypothese, dass der Anstieg der mitochondrialen ROS-Entwicklung im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenzentwicklung in Endothelzellen durch eine Zunahme an NOX4 im Mitochondrium bedingt ist, wurden fraktionierte Immunoblots für mitochondriale und zytosolische NOX4 durchgeführt. TIM23 diente hierbei der Reinheitskontrolle der mitochondrialen Fraktion und Trx-1 zur Reinheitskontrolle der zytosolischen Fraktion. Es zeigte sich, dass NOX4 im Mitochondrium vorkommt. Weiterhin zeigte sich, dass die Proteinmenge von NOX4 unter der Behandlung mit H₂O₂ nicht nur im Zytosol sondern auch im Mitochondrium zunimmt (Abb. 7C).

Ergebnisse

3.3.4. Zunahme der Co-Lokalisation von NOX4 und TIM23 unter der Behandlung mit H₂O₂

Ergänzend zu der zuvor gemachten Beobachtung, der Zunahme der mitochondrialen und zytosolischen NOX4 im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz, zeigte sich eine Zunahme der Co-Lokalisation von NOX4 und dem mitochondrialen Marker TIM23 unter der Behandlung mit H₂O₂. Es wurde ein Co-Immunostaining auf NOX4 (rot), TIM23 (grün) und Actin (blau) durchgeführt. Die Negativkontrolle wurde nur mit Alexa 350-coupled phalloidin und einem Sekundärantikörper gefärbt um die Intaktheit der Zellen zu zeigen. Die Belichtungszeit der Fluoreszenzkanäle ist bei jedem Bild identisch gewählt worden. Endothelzellen, die mit H₂O₂ behandelt wurden, zeigen eine stärkere NOX4-Immunfluoreszenzintensität und eine gesteigerte Co-Lokalisation zu TIM23 verglichen mit unbehandelten Zellen (Abb. 7D).

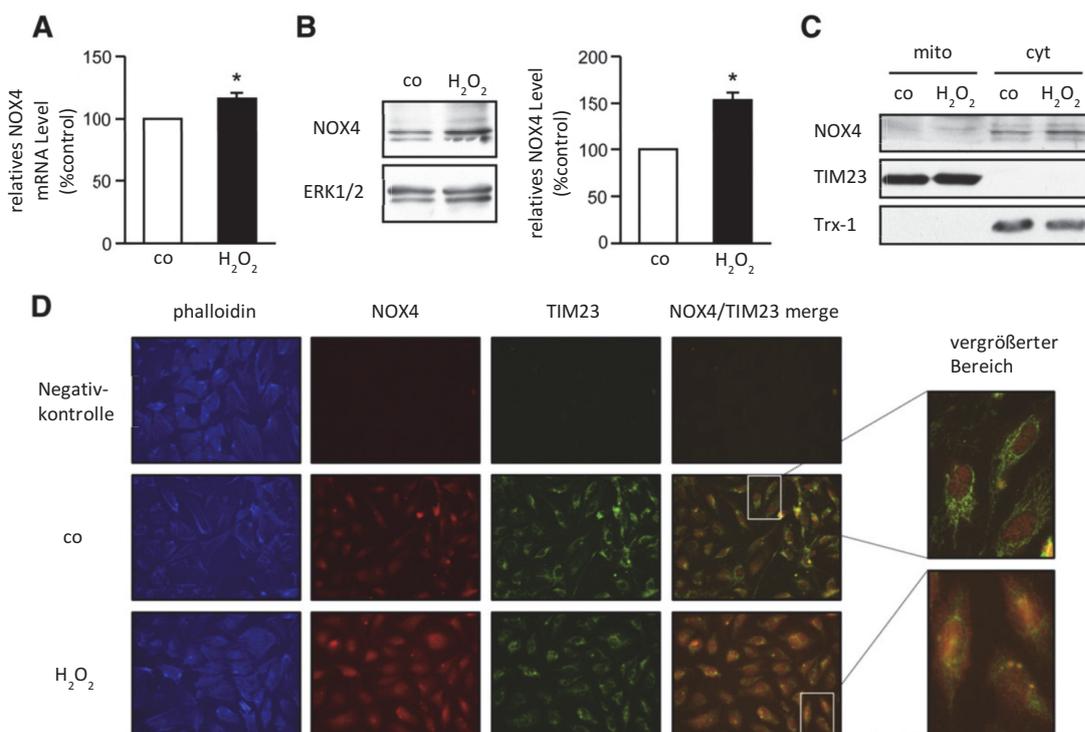


Abb.7: Regulation von NOX4 im Modell der stressinduzierten Seneszenz. Primären humanen Endothelzellen wurden wie unter 3.1.1. beschrieben behandelt. (A) zeigt die Bestimmung der NOX4 mRNA Level mit Hilfe von real time PCR Untersuchungen im Verhältnis zu RPL32 (Mittelwerte \pm SEM, n=4, *p<0,05, co auf 100% gesetzt). (B) zeigt NOX4 Immunoblots. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel. Der Graph zeigt eine semiquantitative Analyse des NOX4 Levels im Verhältnis zu ERK 1/2 (Mittelwerte \pm SEM, n=6, *p<0,05, co auf 100% gesetzt). (C) zeigt die getrennte Untersuchung der zytosolischen (cyt) und mitochondrialen (mito) Fraktion im Immunoblot hinsichtlich NOX4. TIM23 dient zur Reinheitskontrolle der mitochondrialen Fraktion und Trx-1 zur Reinheitskontrolle der zytosolischen Fraktion. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Immunoblots. (D) zeigt ein Co-Immunostaining für NOX4 (rot),

Ergebnisse

TIM23 (grün) und Actin (blau). Die Negativkontrolle ist ausschließlich mit Alexa 350-gekoppeltem Phalloidin und den Sekundärantikörpern zur Darstellung der Zellintaktheit gefärbt. Die Belichtungszeit in allen Fluoreszenzkanälen war für jedes aufgenommene Bild identisch. Rechts außen sind Vergrößerungen der überlagerten Bilder gezeigt.

3.4 Regulation von Trx-1 im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten

Seneszenz

Bisher konnte im nicht-physiologischen Modell der replikativen Seneszenz von Endothelzellen gezeigt werden, dass es zu einer Vermehrung der ROS-Entstehung und zu einer Abnahme des anti-oxidativen Proteins Trx-1 kommt (Altschmied & Haendeler, 2009; Haendeler et al., 2004a). Weiterhin stellte sich dar, dass eine Kurzzeit-Behandlung von primären, humanen Endothelzellen mit 200µM H₂O₂ zu einer Verminderung der Trx-1-Proteinmenge ohne Veränderung des mRNA-Levels führt (Haendeler et al., 2004b). Die daraus entwickelte Hypothese ist, dass Trx-1 auch im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz reguliert wird.

3.4.1 Abnahme der Trx-1 Proteinmenge im Immunoblot

Im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz wurden Immunoblots zur Semiquantifizierung von Trx-1 durchgeführt. Es erfolgte eine Auswertung in Relation zum Proteinlevel von ERK1/2. Dieser Versuch wurde achtmal durchgeführt (n = 8). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme (*p<0,05) der Trx-1-Proteinmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 8 A).

3.4.2 Konstitutive Expression von Trx-1 verhindert stressinduzierte Seneszenz in Endothelzellen

Die Reduktion der Trx-1-Proteinmenge in seneszenten Endothelzellen könnte den Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. 6 A und B) erklären. Zur Untersuchung einer ursächlichen Rolle in der Entstehung von Seneszenz in Endothelzellen wurde ein Experiment zur Rettung von Trx-1 durchgeführt. Hierzu wurde ein lentiviraler Trx-1 Expressionsvektor geklont. Vor Beginn des zweiwöchigen Behandlungsschemas mit 50µM H₂O₂ wurden die Zellen mit diesem Vektor oder dem Kontrollvirus transduziert. Nach Beendigung der zweiwöchigen Behandlung wurden Immunoblots für p21 durchgeführt und auf ERK1/2 bezogen. Dieser Versuch wurde dreimalig

Ergebnisse

durchgeführt (n = 3). Es zeigte sich, dass eine konstitutive Expression von Trx-1 nicht zu einem signifikanten Anstieg (*p<0,05) des Seneszenzmarkers p21 führt (Abb. 8 B).

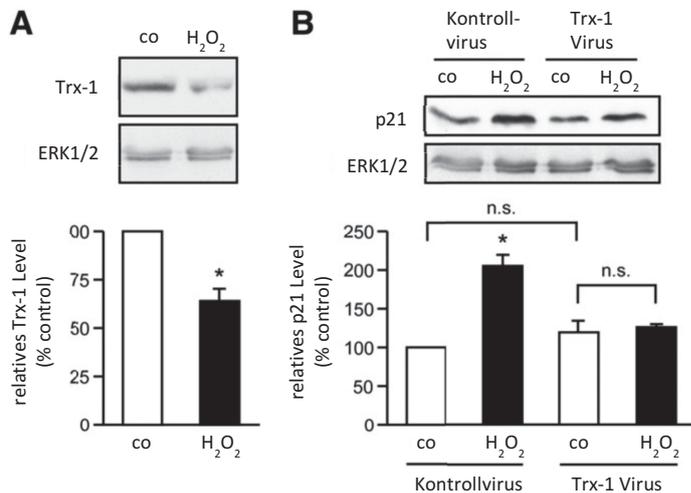


Abb.8: Die Rolle von Trx-1 im Modell der stressinduzierten Seneszenz. Primären humanen Endothelzellen wurden wie unter 3.1.1. beschrieben behandelt. (A) zeigt Trx-1 Immunoblots. Gezeigt sind repräsentative Beispiele. Der Graph zeigt eine semiquantitative Analyse des Trx-1 Levels im Verhältnis zu ERK 1/2 (Mittelwerte \pm SEM, n=8, *p<0,05, co auf 100% gesetzt). (B) Primären humanen Endothelzellen wurden mit einem Kontrollvirus oder einem Trx-1 Expressionsvirus transduziert und anschließend wie unter 3.1.1. beschrieben behandelt. Gezeigt sind die Untersuchungen der p21 Level im Verhältnis zu ERK1/2 (Mittelwerte \pm SEM, n=3, *p<0,05 vs Kontrollvirus transduzierten Zellen und unbehandelten Zellen (co), co auf 100% gesetzt).

3.5 Rolle von Cathepsin D im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz

Ein Kennzeichen des Alterns ist eine Regulationsstörung des Protein-Degradationssystems (Lopez-Otin, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013). Es ist bereits bekannt dass eine Kurzzeitinkubation (18 Stunden) mit hohen Konzentrationen H₂O₂, welches Apoptose in Endothelzellen induziert, den Abbau von Trx-1 durch aktiviertes lysosomales Cathepsin D induziert (Haendeler et al., 2005). Um zu untersuchen ob eine erhöhte Cathepsin D-Aktivität ursächlich in die Seneszenzentwicklung und eine Trx-1 Degradation involviert ist, musste zunächst eine geeignete Konzentration des zellpermeablen Pepstatin A gefunden werden. Pepstatin A ist ein spezifischer Inhibitor von Cathepsin D. Eine vollständige Hemmung von Cathepsin D führt zum Zelltod (Follo et al., 2011) und dysfunktionaler Autophagie (Barnett & Brewer, 2011). Die verwendete Pepstatin A-Konzentration von 50 ng/ml reduziert jedoch nicht die Lebensfähigkeit

Ergebnisse

der Endothelzellen ($99 \pm 2\%$ der Kontrollzellen) und unterdrückt nicht die basale Cathepsin D Aktivität ($105 \pm 4\%$ der Kontrollzellen).

3.5.1 Messung der Cathepsin D-Aktivität unter H_2O_2 und H_2O_2 /PepA im ELISA

Es wurde die Aktivität von Cathepsin D im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz untersucht. Neben der vorbekannten Behandlung der Endothelzellen mit $50\mu M H_2O_2$ an jedem zweiten Tag für zwei Wochen, wurden die Zellen in einer weiteren Behandlungsgruppe zusätzlich auch mit dem spezifischen Cathepsin D-Inhibitor Pepstatin A ($50ng/ml$) inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde unbehandelt belassen. Der Versuch wurde viermalig durchgeführt ($n = 4$). Die Aktivität von Cathepsin D wurde im ELISA gemessen und drückt sich als OD_{460} pro μg Protein aus. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($*p < 0,05$) der Cathepsin D-Aktivität unter der Behandlung mit H_2O_2 . Dies wird als Überaktivität des Cathepsin D angesehen. Eine zusätzliche Inkubation mit Pepstatin A reduzierte signifikant den Aktivitätsanstieg von Cathepsin D durch H_2O_2 ($*p < 0,05$ vs H_2O_2) (Abb. 9A).

3.5.2 Aufhebung der Zunahme von p21 positiven Zellen unter Inkubation mit H_2O_2 /PepA im Immunostaining

Primäre humane Endothelzellen wurden für zwei Wochen jeden zweiten Tag mit $50\mu M H_2O_2$ (H_2O_2) oder $50 ng/ml$ Pepstatin A (PepA) bzw. beiden Substanzen behandelt. Die Kontrollgruppe (co) verblieb unbehandelt. Es erfolgte ein Immunostaining auf p21-positive Zellen. Der Versuch wurde viermal durchgeführt ($n = 4$). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($*p < 0,05$ vs co) der p21-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin zeigte sich eine Aufhebung des Anstiegs p21-positiver Zellen unter gleichzeitiger Inkubation mit H_2O_2 und Pepstatin A. Hierbei zeigte die Behandlungsgruppe H_2O_2 /PepA einen signifikanten Rückgang ($^{\#}p < 0,05$ vs H_2O_2) gegenüber der Behandlung mit H_2O_2 . Die Menge der p21 positiven Zellen zeigte sich vergleichbar mit der in der Kontrollgruppe. Eine alleinige Behandlung mit Pepstatin A zeigte hingegen keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb.9 B).

Ergebnisse

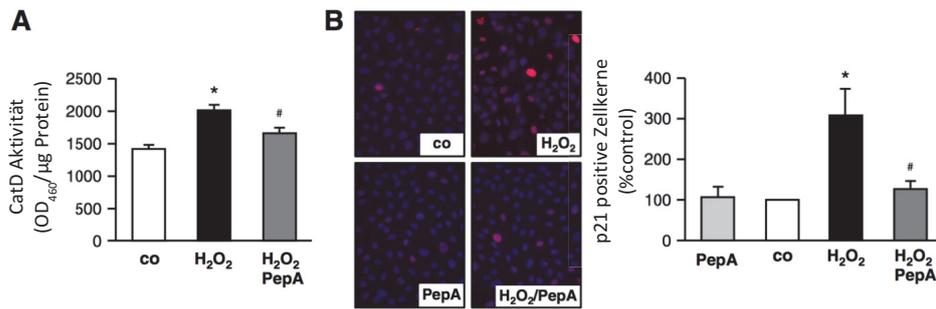


Abb.9: Die Rolle von Cathepsin D im Modell der stressinduzierten Seneszenz. Primären humanen Endothelzellen wurden wie unter 3.5.2. beschrieben behandelt. (A) zeigt die im ELISA gemessene Cathepsin D Aktivität, der Wert ist als OD₄₆₀/µg Protein angegeben (Mittelwerte ± SEM, n=4, *p<0,05 vs co, #p<0,05 vs H₂O₂) (B) Immunostaining auf p21. Gezeigt sind repräsentative Beispielbilder. Der Graph zeigt den prozentualen Anteil der p21 positiven Zellkerne (Mittelwerte ± SEM, n=4, *p<0,05 vs co, #p<0,05 vs H₂O₂, co auf 100% gesetzt)

3.5.3 Nachweis der Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies unter Inkubation mit H₂O₂/PepA mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Primäre humane Endothelzellen wurden wie zuvor beschrieben behandelt. Es wurde untersucht ob die Behandlung der Zellen mit H₂O₂ und Pepstatin A zu einer Veränderung der totalen und der mitochondrialen ROS-Entwicklung führt. Reaktive Sauerstoffspezies wurden mittels Durchflusszytometrie durch die Fluoreszenzfärbung mit Ethidium (n = 4) und DCF (n = 6) nachgewiesen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg (*p<0,05 vs co) der Fluoreszenz von Ethidium und DCF unter der Behandlung mit H₂O₂. Unter Koinkubation mit H₂O₂ und Pepstatin A zeigte sich eine Aufhebung dieses Anstiegs bzw. eine signifikante Reduktion der Fluoreszenz von Ethidium und DCF gegenüber der Behandlung mit H₂O₂ (#p<0,05 vs H₂O₂).

Zusätzlich wurden die Zellen mithilfe von MitoSox-Inkubation auf mitochondriale ROS Produktion untersucht. Dieser Versuch wurde viermal wiederholt (n = 4) und zeigt einen signifikanten Anstieg (*p<0,05) der durchschnittlichen Fluoreszenz von MitoSox unter Behandlung mit H₂O₂. Unter Koinkubation mit H₂O₂ und Pepstatin A zeigte sich eine Aufhebung dieses Anstiegs bzw. eine signifikante Reduktion der Fluoreszenz von MitoSox gegenüber der Behandlung mit H₂O₂ (#p<0,05 vs H₂O₂).

Es zeigt sich, dass die Behandlung mit H₂O₂/PepA zu einer Reduktion der totalen ROS-Entwicklung und der mitochondrialen ROS-Produktion führt (Abb. 9 C-E).

Ergebnisse

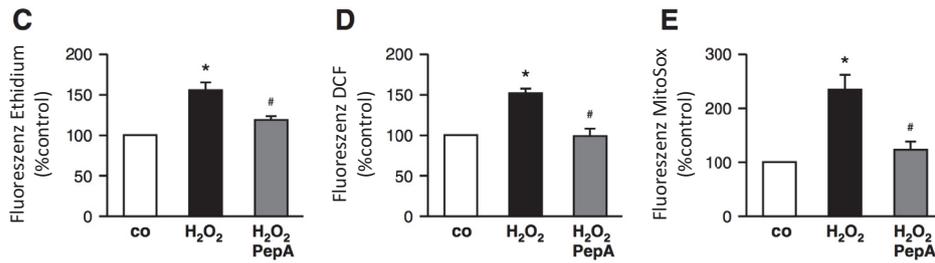


Abb.9: Die Rolle von Cathepsin D im Modell der stressinduzierten Seneszenz. Primären humanen Endothelzellen wurden wie unter 3.5.2. beschrieben behandelt. (C und D) Die Zellen wurden mittels Ethidium (C) und DCF (D) auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies untersucht. (Mittelwerte \pm SEM, n=4 Ethidium, n=6 DCF, *p<0,05 vs co, #p<0,05 vs H₂O₂, co auf 100% gesetzt) (E) Zusätzlich wurden die Zellen mit Hilfe von MitoSox hinsichtlich der mitochondrialen ROS Produktion untersucht. (Mittelwerte \pm SEM, n=4, *p<0,05 vs co, #p<0,05 vs H₂O₂, co auf 100% gesetzt).

3.5.4 Aufhebung der Reduktion der Trx-1 Proteinmenge unter Koinkubation mit H₂O₂/PepA im Immunoblot

Als Nächstes wurde untersucht ob die Inhibition von „überaktivem“ Cathepsin D durch Pepstatin A und die Reduktion der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies auch die Trx-1 Proteinmenge beeinflusst. Im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz wurden primäre humane Endothelzellen für zwei Wochen jeden zweiten Tag mit 50 μ M H₂O₂ (H₂O₂) oder 50 ng/ml Pepstatin A (PepA) oder koinkubiert mit H₂O₂ und Pepstatin A (H₂O₂/PepA) behandelt. Die Kontrollgruppe (co) verblieb unbehandelt. Es wurden Immunoblots auf Trx-1 durchgeführt. Es erfolgte eine semiquantitative Auswertung mit einer Normalisierung auf ERK1/2. Dieser Versuch wurde viermal durchgeführt (n = 4). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme (*p<0,05 vs co) der Trx-1 Proteinmenge unter Behandlung mit H₂O₂ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin zeigte sich, dass die Reduktion der Trx-1 Proteinmenge unter Koinkubation mit H₂O₂/PepA aufgehoben ist (#p<0,05 vs H₂O₂) (Abb. 9F).

3.5.5 Aufhebung der Zunahme der NOX4 Proteinmenge unter Koinkubation mit H₂O₂/PepA im Immunoblot

Weiterhin wurde der Einfluss der Inhibition von „überaktivem“ Cathepsin D durch Pepstatin A auf die NOX4 Proteinmenge untersucht. Die Endothelzellen wurden wie zuvor beschrieben behandelt. Es wurden Immunoblots auf NOX4 durchgeführt. Es erfolgte eine semiquantitative Auswertung mit einer Normalisierung auf ERK1/2. Dieser Versuch wurde fünfmal durchgeführt (n

Ergebnisse

= 5). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($*p < 0,05$ vs co) der NOX4 Proteinmenge unter Behandlung mit H_2O_2 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin zeigte sich ein Ausbleiben dieses Anstieges unter Koinkubation mit H_2O_2 /PepA ($^{\#}p < 0,05$ vs H_2O_2) (Abb. 9 G). Dies zeigt sich in Übereinstimmung mit einem reduzierten totalen ROS Level (Abb. 9 C-E).

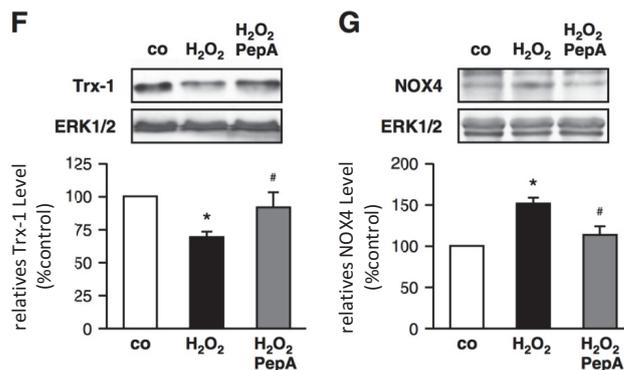


Abb.9: Die Rolle von Cathepsin D im Modell der stressinduzierten Seneszenz. Primären humanen Endothelzellen wurden wie unter 3.5.2. beschrieben behandelt. (F) Trx-1 Immunoblots. Gezeigt sind repräsentative Beispiele. Der Graph zeigt eine semiquantitative Analyse des Trx-1 Levels im Verhältnis zu ERK 1/2 (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$, $*p < 0,05$ vs co, $^{\#}p < 0,05$ vs H_2O_2 , co auf 100% gesetzt). (G) NOX4 Immunoblots. Gezeigt sind repräsentative Beispiele. Der Graph zeigt eine semiquantitative Analyse des NOX4 Levels im Verhältnis zu ERK 1/2 (Mittelwerte \pm SEM, $n=5$, $*p < 0,05$ vs co, $^{\#}p < 0,05$ vs H_2O_2 , co auf 100% gesetzt).

3.6 Regulation von Trx-1 und Cathepsin D in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen

Nachdem in Endothelzellen gezeigt werden konnte, dass ein Anstieg an NOX4 und der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies begleitet ist von einer Abnahme an Trx-1 wurde nun untersucht ob die Trx-1 Proteinmenge in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen beeinflusst ist. Diese Mäuse überexprimieren ausschließlich in Endothelzellen humanes NOX4. Es wurde bereits veröffentlicht, dass die ROS Entwicklung im Endothel dieser Mäuse gesteigert ist (Ray et al., 2011). Es wurden die thorakalen Aorten von NOX4 transgenen Mäusen (tg) und ihrer Wildtyp-Geschwister (wt) im Alter von 4-7 Monaten präpariert, in flüssigem Stickstoff gefroren und zu Pulver zerkleinert. Hieraus erfolgte die RNA- und Proteinisolierung.

3.6.1 Reduktion der Trx-1 Proteinmenge in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen

Es wurden Immunoblots auf Trx-1 durchgeführt. Es erfolgte eine semiquantitative Auswertung mit einer Normalisierung der Proteinlevel auf ERK1/2. Dieser Versuch wurde siebenmal pro Gruppe durchgeführt ($n = 7$). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme ($*p < 0,05$ vs wt) der Trx-1

Ergebnisse

Proteinmenge in den transgenen Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern (Abb. 10 A).

3.6.2 Korrelation des NOX4 mRNA und Trx-1 Protein Levels in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen

Weiterhin wurde das kombinierte NOX4 Level in den Aorten der Tiere gemessen, endogenes Mausgen und humanes Transgen, dieses wurde mit der Trx-1 Proteinmenge korreliert. Alle 14 Tiere wildtyp und transgen wurden in die Analyse eingeschlossen. Es zeigte sich, dass die relative NOX4 Expression negativ mit der Trx-1 Proteinmenge korreliert (Pearson Korrelationskoeffizient: -0,68) (Abb. 5B).

3.6.3 Cathepsin D Aktivität in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen

Um eine mögliche Verbindung zu einem Anstieg der Cathepsin D Aktivität zu finden, wurde die Aktivität von Cathepsin D in der Leber, einem stark vaskularisierten Organ, der Tiere gemessen. Die Leberprobengewinnung erfolgte analog zu den zuvor beschriebenen Aortenproben. Die Aktivität von Cathepsin D wurde im ELISA gemessen und drückt sich als OD₄₆₀ pro µg Protein aus. Dieser Versuch wurde siebenmal pro Gruppe durchgeführt (n = 7). Es zeigte sich, dass die Cathepsin D Aktivität in NOX4 transgenen Mäusen signifikant gesteigert ist (*p<0,05 vs wt) (Abb. 10 C).

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass eine gestörte Redox-Homöostase von einer „Überaktivität“ von Cathepsin D begleitet ist, dies zeigt sich auch *in vivo*.

Ergebnisse

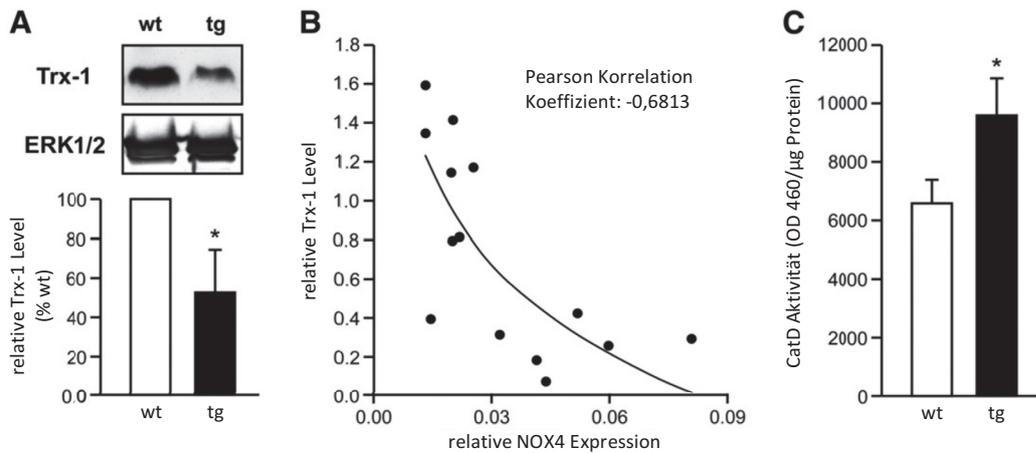


Abb.10: Regulation von Trx-1 und Cathepsin D in Tie-2-NOX4 transgenen Mäusen. Es wurden die thorakalen Aorten von Tie-2-NOX4 transgenen Mäusen (tg) und ihren wildtyp Geschwistern (wt) auf Trx-1 Proteinlevel (Immunoblot) und NOX4 RNA Level (real-time PCR) untersucht. (A) Gezeigt sind repräsentative Beispiele. Der Graph zeigt eine semiquantitative Analyse des Trx-1 Levels im Verhältnis zu ERK 1/2 (Mittelwerte \pm SEM, n=7 Mäuse pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs wt, wt wurde auf 100% gesetzt). (B) Korrelation zwischen den NOX4 RNA Level und Trx-1 Proteinlevel aus den thorakalen Aorten der Mäuse. Alle 14 Tiere wurden in die Analyse eingeschlossen (Pearson's Korrelationskoeffizient: -0,68). (C) Gemessen wurde die Cathepsin D Aktivität mit Hilfe von ELISA, der Wert ist als OD₄₆₀/ μ g Protein angegeben (wt: wildtyp; tg: Tie-2-NOX4 transgene Mäuse; Mittelwerte \pm SEM, n=7 pro Mäusegruppe, * $p < 0,05$ vs wt).

4 Diskussion

4.1 Die Regulation von NOX4 und Trx-1 im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz in primären, humanen Endothelzellen

Zur Untersuchung des oxidativen Proteins NOX4, dem am häufigsten vorkommende NADPH-Oxidase-Subtyp in Endothelzellen, und Trx-1, einem der wichtigsten anti-oxidativen Proteine, wurde das Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz gewählt. Dieses Modell spiegelt die physiologische *in vivo*-Situation des Endothels sehr viel deutlicher wider als das Modell der replikativen Seneszenz.

Wie erwartet und bereits zuvor publiziert (Haendeler et al., 2004a) zeigte die Prüfung des Modells, dass unter der Behandlung mit H_2O_2 Seneszenz induziert werden kann. Diese Seneszenzentwicklung konnte durch zwei Immunfluoreszenzfärbungen mit Nachweis von seneszenzassoziierter β -Galaktosidase und dem bekannten Seneszenzmarker p21 bestätigt werden (Abb. 3 und 4). Weiterführend konnte auch ein erhöhtes Proteinlevel für p21 nachgewiesen werden (Abb. 5). Das nachgewiesenermaßen erhöhte Proteinlevel für p21 entspricht dem Anstieg der totalen Färbungsintensität für p21 unter der Behandlung mit H_2O_2 . Nachfolgend galt es zu untersuchen ob die Behandlung der Endothelzellen mit H_2O_2 zu einer Steigerung der totalen bzw. mitochondrialen ROS-Entwicklung führt. In FACS-Analysen mit Ethidium-, DCF- und MitoSox-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Behandlung zu einer solchen Steigerung der totalen und mitochondrialen ROS Entwicklung führt (Abb. 6).

Im Wissen, dass im Modell der stressinduzierten Seneszenz ein erhöhtes ROS-Level vorliegt, wurde als nächstes die Regulation von NOX4, der häufigsten NADPH Oxidase in Endothelzellen, untersucht. Es zeigte sich eine relativ erhöhte NOX4-Expression (Abb. 7A) und -Proteinmenge (Abb. 7B) unter der Behandlung mit H_2O_2 . Die signifikante Hochregulation von NOX4 spiegelt dabei den Anstieg der totalen ROS-Entstehung wider (Abb. 6 A-B). Darüber hinaus wird ein Vorkommen von NOX4 auch im Mitochondrium vermutet (Ago et al., 2010; Block et al., 2009; Koziel et al., 2013). Es ist daher anzunehmen, dass der Anstieg des mitochondrialen ROS-Levels im Modell der stress-induzierten Seneszenz (Abb. 6 C) im Zusammenhang mit einem erhöhten Vorkommen von NOX4 im Mitochondrium steht. Bei Überprüfung dieser Hypothese zeigen

Diskussion

weitere Immunoblot-Untersuchungen von präparierten Mitochondrien aus H₂O₂-behandelten Zellen im Vergleich zu den zugehörigen Kontrollgruppen, dass NOX4 im Mitochondrium vorhanden ist und dass die Proteinmenge unter der Behandlung im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenzentwicklung nicht nur im Zytosol sondern auch im Mitochondrium steigt (Abb. 7C).

Weiterhin zeigte sich ein Anstieg der Kolo-kalisation des mitochondrialen Markers TIM23 mit NOX4 unter der Behandlung mit H₂O₂ (Abb. 7D).

Ergänzend wurde Trx-1 im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz untersucht. Im Modell der replikativen Seneszenz von Endothelzellen konnte bereits ein Anstieg der ROS-Level und eine Reduktion des anti-oxidativen Proteins Trx-1 gezeigt werden (Altschmied & Haendeler, 2009) (Haendeler et al., 2004a). Zudem zeigte eine Kurzzeitbehandlung von primären humanen Endothelzellen mit 200µM H₂O₂ eine Degradation des Trx-1 Proteins ohne dass sich hierbei die Menge der mRNA änderte (Haendeler et al., 2004b). Daher ist es naheliegend anzunehmen, dass eine zweiwöchige Behandlung mit H₂O₂ sowohl in einem Anstieg der ROS-Entstehung als auch in einer Abnahme der Menge von Trx-1 resultiert. Abb. 3a zeigt die Abnahme der Trx-1 Proteinmenge in humanen Endothelzellen im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz. Die Reduktion der Trx-1-Proteinmenge in seneszenten Endothelzellen könnte den Anstieg in der totalen Menge ROS im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz erklären (Abb. 6).

Um zu klären ob die Abnahme der Trx-1-Proteinmenge ursächlich mit der Entstehung von Seneszenz in Endothelzellen verbunden ist wurde ein "Trx-1-Rettungsexperiment" gemacht. Hierzu wurde ein lentiviraler Trx-1-Expressionsvektor geklont. Die Endothelzellen wurden transduziert und nach einem Tag wurde mit dem üblichen Behandlungsschema begonnen (50µM H₂O₂ jeden zweiten Tag für zwei Wochen). Es zeigte sich, dass eine konstitutive Expression von Trx-1 die Entstehung einer vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenzentwicklung verhindert, was sich durch die Aufhebung des Anstieges von p21 zeigt (Abb. 8B). Dieses Ergebnis stehen im Einklang der *in vivo*-Erkenntnis, dass Mäuse und *C. elegans* welche Trx-1 überexprimieren eine verlängerte Lebensspanne im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern haben (Fierro-Gonzalez et al., 2011; Yoshida et al., 2005). Weiterhin reduziert eine Deletion von Trx-1 in *C.elegans* die

Lebensspanne, kann aber durch eine Re-Expression von Trx-1 normalisiert werden (Fierro-Gonzalez et al., 2011).

4.2 Die Rolle von Cathepsin D im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenz

Eines der Kennzeichen des Alterns ist eine Regulationsstörung des Proteinabbausystems (Lopez-Otin et al., 2013). Es finden sich Hinweise, dass Lysosomen im Zuge der Zellalterung einer Dysregulation unterliegen. Terman et al. spricht von einer mitochondrialen-lysosomalen Achse als eine Theorie des Alterns. Hierbei ist Altern und Seneszenz durch eine zunehmende Anhäufung von makromolekulären Schäden im Zusammenhang mit oxidativem Stress der Zellen charakterisiert. Zellalterung wird hierbei durch eine langsame Insuffizienzentwicklung der Lysosomen infolge einer ROS-induzierten Schädigung bedingt. Dies kann in einer lysosomalen Ruptur und einer Freisetzung von lysosomalen Enzymen gipfeln (Terman, Gustafsson, & Brunk, 2006). Auch Repnik et. al vermutet im Zusammenhang mit Zellalterung und endogenen Faktoren ein erhöhtes ROS-Level, das zu einer Permeabilisierung der lysosomalen Membran führen kann (Repnik, Stoka, Turk, & Turk, 2012).

Wie zuvor beschrieben war durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bekannt, dass eine Kurzzeitinkubation (18 Stunden) mit hohen Konzentrationen H_2O_2 , welche zu einer erhöhten Apoptose in Endothelzellen führt, die Degradation von Trx-1 durch aktiviertes lysosomales Cathepsin D induziert (Haendeler et al., 2005). Daher wurde als nächstes die Aktivität von Cathepsin D im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenzentwicklung untersucht. Es zeigte sich, dass die zweiwöchige Behandlung mit H_2O_2 eine "Überaktivierung" von Cathepsin D bewirkt (Abb. 4A). Dieses Ergebnis stimmt mit Erkenntnissen aus pyramidalen Neuronen von an Morbus Alzheimer erkrankten Patienten überein, bei denen sich in mehr als 90% eine Anhäufung von Cathepsin D zeigte (Cataldo et al., 1995).

Zur Klärung der Frage ob eine erhöhte Cathepsin D-Aktivität ursächlich in die Seneszenzentwicklung und eine Trx-1-Degradation involviert ist, musste zunächst eine geeignete Konzentration von Pepstatin A gefunden werden. Pepstatin A ist ein spezifischer Inhibitor von Cathepsin D, für den die Zellmembran permeabel ist. Eine vollständige Hemmung oder ein knockdown von Cathepsin D führt zum Zelltod (Follo et al., 2011) und dysfunktionaler Autophagie

Diskussion

(Barnett & Brewer, 2011). Eine Pepstatin A-Konzentration von 50 ng/ml reduzierte nicht die Lebensfähigkeit der Endothelzellen ($99 \pm 2\%$ der Kontrollzellen) und unterdrückte nicht die basale Cathepsin D Aktivität ($105 \pm 4\%$ der Kontrollzellen).

Im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenzentwicklung wurden die Endothelzellen für zwei Wochen jeden zweiten Tag mit H_2O_2 in der zusätzlichen An- oder Abwesenheit von Pepstatin A behandelt. Es zeigte sich, dass eine Koinkubation mit Pepstatin A den Aktivitätsanstieg von Cathepsin D durch H_2O_2 reduziert (Abb. 4A). Weiterhin zeigte sich, dass der Anstieg von p21 durch H_2O_2 durch die Koinkubation mit Pepstatin A aufgehoben wird (Abb. 9B). Eine alleinige Behandlung mit Pepstatin A zeigte hingegen keinen Unterschied zu unbehandelten Zellen.

Ergänzende Untersuchungen zeigten, dass die totale und die mitochondriale ROS-Entstehung ebenfalls durch die Koinkubation von Pepstatin A reduziert wird (Abb. 9 C-E).

Als Nächstes wurde untersucht ob die Inhibition von „überaktivem“ Cathepsin D durch Pepstatin A und die Reduktion der ROS-Menge auch die Menge an Trx-1-Protein beeinflusst. Es zeigte sich, dass die Reduktion der Trx-1-Proteinmenge unter H_2O_2 bei Koinkubation mit Pepstatin A aufgehoben ist (Abb. 9F). Weiterhin zeigte sich, dass eine Koinkubation mit Pepstatin A und H_2O_2 die H_2O_2 -induzierte Hochregulation von NOX4 rückgängig macht (Abb. 9G). Dies geht entsprechend mit einem reduzierten totalen ROS-Level einher (Abb. 9 C-E).

Es zeigte sich somit, dass im Modell der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenzentwicklung in Endothelzellen eine Dysbalance der Redox-Homöostase besteht. Diese wird von einer „Überaktivierung“ von Cathepsin D begleitet, welche zu einer Degradation von Trx-1 führt. Eine Inhibition der Cathepsin D-Aktivität in der Kontrollgruppe hebt die Zeichen der vorzeitigen, stressinduzierten Seneszenzentwicklung und die Dysbalance der Redox-Homöostase vollständig auf.

4.3 Die Rolle der NOX4-Überexpression für das Trx-1-Proteinlevel und der Cathepsin D-Aktivität *in vivo*

Nachdem in Endothelzellen gezeigt werden konnte, dass ein Anstieg von NOX4 und ROS mit einer Abnahme von Trx-1 einhergeht, wurde nun untersucht ob sich die Trx-1-Proteinmenge in Tie2-NOX4 transgenen Mäusen ebenfalls verändert. Diese Mäuse überexprimieren ausschließlich in Endothelzellen humanes NOX4. Bereits bekannt ist, dass die ROS-Menge im Endothel dieser

Diskussion

Mäuse gesteigert ist (Ray et al., 2011). Es wurden die thorakalen Aorten der NOX4 transgenen Mäuse und ihrer Wildtyp-Geschwister im Alter von 4-7 Monaten präpariert. Es zeigte sich, dass die Trx-1-Proteinmenge in transgenen NOX4-Mäusen reduziert ist (Abb. 10A).

Weiterhin wurde die kombinierte NOX4-Menge aus endogenem Mausgen und humanem Transgen in den Aorten gemessen und diese mit der Trx-1-Proteinmenge korreliert. Es zeigte sich, dass die relative NOX4-Expression negativ mit der Trx-1-Proteinmenge korreliert (Pearson Korrelationskoeffizient: -0,68) (Abb. 10B).

Um eine mögliche Verbindung zu einem Anstieg der Cathepsin D-Aktivität nachzuweisen, wurde die Aktivität von Cathepsin D in der Leber, als einem stark vaskularisierten Organ der Tiere, gemessen. Es zeigte sich, dass die Cathepsin D-Aktivität in NOX4 transgenen Mäusen gesteigert ist (Abb. 10C).

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich, dass eine gestörte Redox-Homöostase von einer „Überaktivität“ von CathepsinD begleitet ist. Dies zeigt sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Ob diese gestörte Redox-Homöostase auch die Lebenspanne der transgenen NOX4-Mäuse verkürzt werden weitere Untersuchungen zeigen.

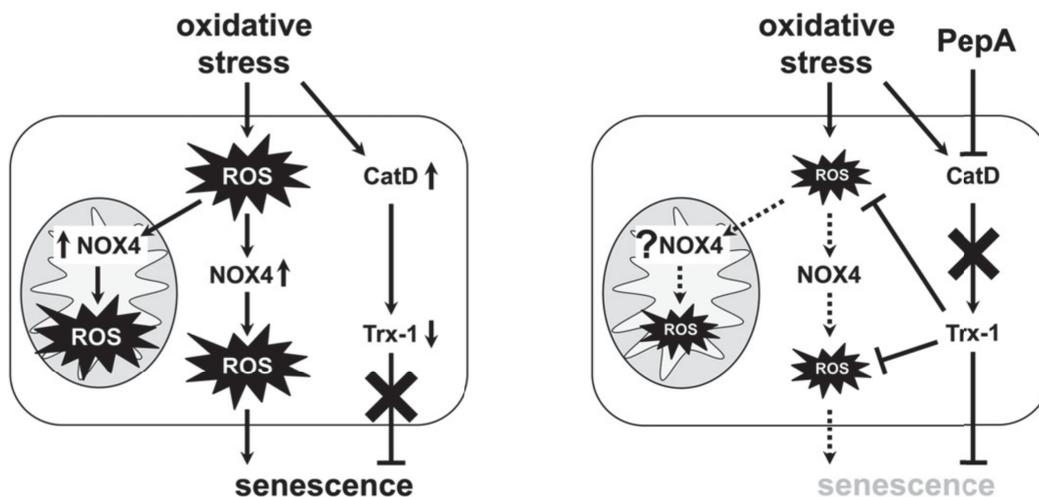


Abb. 11: Zeigt den Modellvorschlag einer unausgeglichene Redoxhomöostase in seneszenten Endothelzellen. Die linke Seite zeigt die Zunahme von NOX4 unter ständigem exogenen oxidativem Stress und führt zu einer weiteren Produktion von ROS. Zusätzlich ist Cathepsin D "über-aktiv" und reduziert die Menge an Thioredoxin 1 (Trx-1). Der Verlust des anti-oxidativen Enzyms zusammen mit erhöhten ROS Levels führt zur Seneszenz der Zelle. Der Einfluss von Pepstatin A auf diesen Ablauf zeigt die rechte Seite.

Diskussion

Die erhobenen Daten weisen deutlich daraufhin, dass vorzeitige, stressinduzierte Seneszenzentwicklung in primären, humanen Endothelzellen NOX4 aktiviert, einen totale und mitochondriale ROS-Anstieg induziert und zu einer „Überaktivierung“ von lysosomalem Cathepsin D führt. Dies führt zusammen mit einer begleitenden Downregulation der Trx-1-Proteinmenge zu einer dysregulierten Redox-Homöostase. Der Verlust an Trx-1, einem antioxidativem Enzym, und das gleichzeitig erhöhte ROS-Level induzieren vorzeitige, stressinduzierte Seneszenz. Eine vorzeitige, stressinduzierte Seneszenzentwicklung kann vollständig durch eine Hemmung der „Überaktivität“ von Cathepsin D verhindert werden. Die Anwesenheit von Pepstatin A, einem spezifischen Inhibitor von Cathepsin D, verhindert eine Degradation von Trx-1, wodurch die Trx-1-Proteinmenge wiederhergestellt wird. Begleitend wird die Hochregulation von NOX4 verhindert. Trx-1 regeneriert ROS-Verwertungssysteme, senkt hierdurch die ROS-Level und verhindert somit eine Seneszenzinduktion.

Auch in transgenen NOX4-Mäusen zeigt sich eine reduzierte Trx-1-Proteinmenge und eine gesteigerte Cathepsin D-Aktivität. Dies legt nahe, dass dieselben Prozesse auch *in vivo* stattfinden. Abb. 6 zeigt ein Modell der dysbalancierten Redox-Homöostase in humanen Endothelzellen im Überblick.

Ein wichtiges Ziel möglicher Behandlungen, die auf eine gesunde Alterung zielen, wird es sein einen Anstieg der NOX4-Expression und einen Rückgang der Trx-1-Proteinmenge im Gefäßsystem zu verhindern um somit ein funktionstüchtiges Endothel zu bewahren.

5 Literaturverzeichnis

- Abramoff, M. D. M., Paulo J.; Ram, Sunanda J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics*.
- Ago, T., Kitazono, T., Ooboshi, H., Iyama, T., Han, Y. H., Takada, J., . . . Iida, M. (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*, *109*(2), 227-233. doi:10.1161/01.cir.0000105680.92873.70
- Ago, T., Kuroda, J., Pain, J., Fu, C., Li, H., & Sadoshima, J. (2010). Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res*, *106*(7), 1253-1264. doi:10.1161/circresaha.109.213116
- Altschmied, J., & Haendeler, J. (2009). Thioredoxin-1 and endothelial cell aging: role in cardiovascular diseases. *Antioxid Redox Signal*, *11*(7), 1733-1740. doi:10.1089/ars.2008.2379
- Anilkumar, N., Weber, R., Zhang, M., Brewer, A., & Shah, A. M. (2008). Nox4 and nox2 NADPH oxidases mediate distinct cellular redox signaling responses to agonist stimulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *28*(7), 1347-1354. doi:10.1161/atvbaha.108.164277
- Babior, B. M., Kipnes, R. S., & Curnutte, J. T. (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*, *52*(3), 741-744. doi:10.1172/jci107236
- Banfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., & Krause, K. H. (2004). NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*, *279*(44), 46065-46072. doi:10.1074/jbc.M403046200
- Barnett, A., & Brewer, G. J. (2011). Autophagy in aging and Alzheimer's disease: pathologic or protective? *J Alzheimers Dis*, *25*(3), 385-394. doi:10.3233/jad-2011-101989
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, *87*(1), 245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Block, K., Gorin, Y., & Abboud, H. E. (2009). Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(34), 14385-14390. doi:10.1073/pnas.0906805106
- Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, *134*(3), 707-716.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., Jr., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, *142*, w13659. doi:10.4414/smw.2012.13659
- Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Berman, S. A., Li, J., Quarless, S., Bursztajn, S., . . . Nixon, R. A. (1995). Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron*, *14*(3), 671-680.
- Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W., & Rhee, S. G. (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract*, *45*(2-3), 101-112.
- Czypiorski, P., Altschmied, J., Rabanter, L. L., Goy, C., Jakob, S., & Haendeler, J. (2014). Outfielders playing in the infield: functions of aging-associated "nuclear" proteins in the mitochondria. *Curr Mol Med*, *14*(10), 1247-1251.
- Czypiorski, P., Rabanter, L. L., Altschmied, J., & Haendeler, J. (2013). Redox balance in the aged endothelium. *Z Gerontol Geriatr*, *46*(7), 635-638. doi:10.1007/s00391-013-0536-2

Literaturverzeichnis

- Erusalimsky, J. D., & Skene, C. (2009). Mechanisms of endothelial senescence. *Exp Physiol*, 94(3), 299-304. doi:10.1113/expphysiol.2008.043133
- Fierro-Gonzalez, J. C., Gonzalez-Barrios, M., Miranda-Vizuete, A., & Swoboda, P. (2011). The thioredoxin TRX-1 regulates adult lifespan extension induced by dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 406(3), 478-482. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.079
- Follo, C., Ozzano, M., Mugoni, V., Castino, R., Santoro, M., & Isidoro, C. (2011). Knock-down of cathepsin D affects the retinal pigment epithelium, impairs swim-bladder ontogenesis and causes premature death in zebrafish. *PLoS One*, 6(7), e21908. doi:10.1371/journal.pone.0021908
- Forstermann, U., & Munzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708-1714. doi:10.1161/circulationaha.105.602532
- Gaziano, T., Reddy, K. S., Paccaud, F., Horton, S., & Chaturvedi, V. (2006). Cardiovascular Disease. In D. T. Jamison, J. G. Breman, A. R. Measham, G. Alleyne, M. Claeson, D. B. Evans, P. Jha, A. Mills, & P. Musgrove (Eds.), *Disease Control Priorities in Developing Countries* (2nd ed.). Washington (DC).
- Godo, S., & Shimokawa, H. (2017). Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37(9), e108-e114. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309813
- Goy, C., Czypiorski, P., Altschmied, J., Jakob, S., Rabanter, L. L., Brewer, A. C., . . . Haendeler, J. (2014). The imbalanced redox status in senescent endothelial cells is due to dysregulated Thioredoxin-1 and NADPH oxidase 4. *Exp Gerontol*, 56, 45-52. doi:10.1016/j.exger.2014.03.005
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337(6205), 331-337. doi:10.1038/337331a0
- Haendeler, J. (2006). Thioredoxin-1 and posttranslational modifications. *Antioxid Redox Signal*, 8(9-10), 1723-1728. doi:10.1089/ars.2006.8.1723
- Haendeler, J., Drose, S., Buchner, N., Jakob, S., Altschmied, J., Goy, C., . . . Dimmeler, S. (2009). Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(6), 929-935. doi:10.1161/atvbaha.109.185546
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Diehl, J. F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2004a). Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circ Res*, 94(6), 768-775. doi:10.1161/01.res.0000121104.05977.f3
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Rahman, S., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2003). Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation. *FEBS Lett*, 536(1-3), 180-186.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Tischler, V., Berk, B. C., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2002). Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol*, 4(10), 743-749. doi:10.1038/ncb851
- Haendeler, J., Popp, R., Goy, C., Tischler, V., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2005). Cathepsin D and H₂O₂ stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*, 280(52), 42945-42951. doi:10.1074/jbc.M506985200

Literaturverzeichnis

- Haendeler, J., Tischler, V., Hoffmann, J., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2004b). Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett*, *577*(3), 427-433. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.041
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, *11*(3), 298-300.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, *25*, 585-621.
- Hilenski, L. L., Clempus, R. E., Quinn, M. T., Lambeth, J. D., & Griendling, K. K. (2004). Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *24*(4), 677-683. doi:10.1161/01.ATV.0000112024.13727.2c
- Hirst, D. G., & Robson, T. (2011). Nitric oxide physiology and pathology. *Methods Mol Biol*, *704*, 1-13. doi:10.1007/978-1-61737-964-2_1
- Hoffmann, J., Haendeler, J., Aicher, A., Rossig, L., Vasa, M., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2001). Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res*, *89*(8), 709-715.
- Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from escherichia coli B. *Eur J Biochem*, *6*(4), 475-484.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*, *264*(24), 13963-13966.
- Holmgren, A. (2000). Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal*, *2*(4), 811-820. doi:10.1089/ars.2000.2.4-811
- Holmgren, A., Soderberg, B. O., Eklund, H., & Branden, C. I. (1975). Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *72*(6), 2305-2309.
- Itahana, K., Campisi, J., & Dimri, G. P. (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol*, *371*, 21-31.
- Koziel, R., Pircher, H., Kratochwil, M., Lener, B., Hermann, M., Dencher, N. A., & Jansen-Durr, P. (2013). Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4. *Biochem J*, *452*(2), 231-239. doi:10.1042/bj20121778
- Krause, K. H. (2007). Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol*, *42*(4), 256-262. doi:10.1016/j.exger.2006.10.011
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.
- Lee, M. Y., & Griendling, K. K. (2008). Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal*, *10*(6), 1045-1059. doi:10.1089/ars.2007.1986
- Lener, B., Koziel, R., Pircher, H., Hutter, E., Greussing, R., Herndler-Brandstetter, D., . . . Jansen-Durr, P. (2009). The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells. *Biochem J*, *423*(3), 363-374. doi:10.1042/bj20090666
- Lillig, C. H., Berndt, C., & Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta*, *1780*(11), 1304-1317. doi:10.1016/j.bbagen.2008.06.003
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), 1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
- Lukosz, M., Jakob, S., Buchner, N., Zschauer, T. C., Altschmied, J., & Haendeler, J. (2010). Nuclear redox signaling. *Antioxid Redox Signal*, *12*(6), 713-742. doi:10.1089/ars.2009.2609

Literaturverzeichnis

- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., & Taketo, M. M. (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol*, *178*(1), 179-185. doi:10.1006/dbio.1996.0208
- Moffat, J., Grueneberg, D. A., Yang, X., Kim, S. Y., Kloepfer, A. M., Hinkle, G., . . . Root, D. E. (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell*, *124*(6), 1283-1298. doi:10.1016/j.cell.2006.01.040
- Muller-Delp, J. M., Gurovich, A. N., Christou, D. D., & Leeuwenburgh, C. (2012). Redox balance in the aging microcirculation: new friends, new foes, and new clinical directions. *Microcirculation*, *19*(1), 19-28. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00139.x
- Nohl, H., & Hegner, D. (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur J Biochem*, *82*(2), 563-567.
- Nordberg, J., & Arner, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, *31*(11), 1287-1312.
- Otani, H. (2013). Site-specific antioxidative therapy for prevention of atherosclerosis and cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*, *2013*, 796891. doi:10.1155/2013/796891
- Phan, S. H., Gannon, D. E., Varani, J., Ryan, U. S., & Ward, P. A. (1989). Xanthine oxidase activity in rat pulmonary artery endothelial cells and its alteration by activated neutrophils. *Am J Pathol*, *134*(6), 1201-1211.
- Ray, R., Murdoch, C. E., Wang, M., Santos, C. X., Zhang, M., Alom-Ruiz, S., . . . Shah, A. M. (2011). Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *31*(6), 1368-1376. doi:10.1161/atvbaha.110.219238
- Ray, R., & Shah, A. M. (2005). NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)*, *109*(3), 217-226. doi:10.1042/cs20050067
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta*, *1824*(1), 22-33. doi:10.1016/j.bbapap.2011.08.016
- Ronchi, J. A., Figueira, T. R., Ravagnani, F. G., Oliveira, H. C., Vercesi, A. E., & Castilho, R. F. (2013). A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radic Biol Med*, *63*, 446-456. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.049
- Ross, R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, *57*, 791-804. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.004043
- Schulze, P. C., Liu, H., Choe, E., Yoshioka, J., Shalev, A., Bloch, K. D., & Lee, R. T. (2006). Nitric oxide-dependent suppression of thioredoxin-interacting protein expression enhances thioredoxin activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *26*(12), 2666-2672. doi:10.1161/01.ATV.0000248914.21018.f1
- Shimokawa, H. (1999). Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*, *31*(1), 23-37. doi:10.1006/jmcc.1998.0841
- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *311*(1152), 617-631.
- Strait, J. B., & Lakatta, E. G. (2012). Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail Clin*, *8*(1), 143-164. doi:10.1016/j.hfc.2011.08.011
- Takac, I., Schroder, K., & Brandes, R. P. (2012). The Nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system? *Curr Hypertens Rep*, *14*(1), 70-78. doi:10.1007/s11906-011-0238-3

Literaturverzeichnis

Tao, L., Gao, E., Bryan, N. S., Qu, Y., Liu, H. R., Hu, A., . . . Ma, X. L. (2004). Cardioprotective effects of thioredoxin in myocardial ischemia and reperfusion: role of S-nitrosation [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(31), 11471-11476. doi:10.1073/pnas.0402941101

Terman, A., Gustafsson, B., & Brunk, U. T. (2006). The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. *Chem Biol Interact*, *163*(1-2), 29-37. doi:10.1016/j.cbi.2006.04.013

Vanhoutte, P. M. (1997). Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J*, *18 Suppl E*, E19-29.

Vita, J. A. (2011). Endothelial function. *Circulation*, *124*(25), e906-912. doi:10.1161/circulationaha.111.078824

Yamamoto, M., Yang, G., Hong, C., Liu, J., Holle, E., Yu, X., . . . Sadoshima, J. (2003). Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, *112*(9), 1395-1406. doi:10.1172/jci17700

Yamawaki, H., & Berk, B. C. (2005). Thioredoxin: a multifunctional antioxidant enzyme in kidney, heart and vessels. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, *14*(2), 149-153.

Yoshida, T., Nakamura, H., Masutani, H., & Yodoi, J. (2005). The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process. *Ann N Y Acad Sci*, *1055*, 1-12. doi:10.1196/annals.1323.002

Yoshioka, J., Schulze, P. C., Cupesi, M., Sylvan, J. D., MacGillivray, C., Gannon, J., . . . Lee, R. T. (2004). Thioredoxin-interacting protein controls cardiac hypertrophy through regulation of thioredoxin activity. *Circulation*, *109*(21), 2581-2586. doi:10.1161/01.cir.0000129771.32215.44

Zschau, T. C., Matsushima, S., Altschmied, J., Shao, D., Sadoshima, J., & Haendeler, J. (2013). Interacting with thioredoxin-1--disease or no disease? *Antioxid Redox Signal*, *18*(9), 1053-1062. doi:10.1089/ars.2012.4822

Zweier, J. L., Kuppusamy, P., & Lutty, G. A. (1988). Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(11), 4046-4050.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
ADP	Adenosin-Diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BBE	Rinderhirnextrakt (Bovine Brain Extract)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad
ca.	Celsius circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBM	Endothelial Cell Basal Medium
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GA-1000	Gentamicin-Amphotericin B
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GRHL 3	grainyhead-like 3
h	Stunde
HCl	Salzsäure

Abkürzungsverzeichnis

rhEGF	rekombinanter menschlicher epidermaler Wachstumsfaktor (recombinant human Epidermal Growth Factor)
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren (non-essential amino acids)
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PAC	Puromycin N-Acetyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PenStrep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	

Abkürzungsverzeichnis

PMSF	pH-Wert
Prolong antifade reagent + DAPI	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Prolong® Gold Antifade reagent with DAPI
ROS	Polyvinylidendifluorid
rRNA	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RT	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Raumtemperatur
sec	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Ser-Tyr-Gly	Sekunden
SOM	Serin-Tyrosin-Glycin
TAE	sister-of-mammalian grainyhead
TBS	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tris-EDTA-Puffer
Tris	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tRNA	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx-1	transfer Ribonukleinsäure
U	Thioredoxin-1
UpM	Einheit (unit)
UV	Umdrehungen pro Minute
V	ultraviolette Strahlung
v/v	Volt
WT	Volumen/ Volumen (volume/ volume)
w/v	Wildtyp Gewicht/Volumen (weight/volume)

7 Danksagung

Mein besonderer Dank im Rahmen dieser Arbeit gilt Frau Prof. Dr. Judith Haendeler, Priv.-Doz. Dr. Joachim Altschmied und Christine Goy welche mich maßgeblich während der Promotion betreut haben. Allen dreien bin ich für ihre unermüdliche Geduld, Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit zu großem Dank verpflichtet.

Ein gleichwertiger Dank gilt meiner Frau Andrea Peters und meinem Bruder Peter H. Czypiorski, den zwei größten Unterstützern die man sich wünschen kann.