Aus der Abteilung Klinische Pharmakologie (Prof. Dr. med. J. Brockmöller) im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Biomarker für oxidativen Stress bei Entzündungsreaktionen: Bedeutung von Genpolymorphismen und Genexpression der NADPH-Oxidase unter pro- und anti-inflammatorischen Bedingungen

# INAUGURAL – DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

# Robert-Günther Goetze

aus Gera

Göttingen 2012

Dekan: I. Berichterstatter: II. Berichterstatter/in: III Berichterstatter/in: Tag der mündlichen Prüfung Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer Prof. Dr. med. J. Brockmöller Prof. Dr. med. Oppermann Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp 30.10.2013

# I Inhaltsverzeichnis

II AE	BKÜRZUNGSVERZEICHNIS	iv
III T	ABELLENVERZEICHNIS	vii
IV A	BBILDUNGSVERZEICHNIS	viii
1	EINLEITUNG	1
1.1	Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS)	1
1.2	Bildung von ROS	2
1.3	Detoxifikation von ROS	3
1.4	Medizinische Bedeutung von ROS	3
1.5	NADPH-Oxidasen: Aufbau und Funktion	5
1.6	Genetische Variabilität in der phagozytären NADPH-Oxidase	8
1.7	Zielsetzung	9
1.8	Arbeitsprogramm	
2	MATERIAL	12
2.1	Geräte	
2.2	Verbrauchsmaterialien	
2.3	Chemikalien	15
2.4	Wiederverwendete Materialien	
2.5	Medien	17
2.6	Zelllinien	17
2.0 2.0	<ul> <li>6.1 Primäre humane T-Lymphozyten, Monozyten und B-Zellen</li> <li>6.2 Lymphoblastoide Vorläuferzellen (LCLs)</li> </ul>	17 17
2.7	Lösungen	
2.8	Kits und Assays	
2.9	Software	
2.10	Datenbanken	20
3	METHODEN	21
3.1	Kultur von LCLs	21
3.2	Probandenkollektiv	21

3.3	Gewinnung von Leukozyten-Subfraktionen	22
3.3.1	1 Dichtegradienten-Zentrifugation	
3.3.2	2 Separation im Durchflusszytometer	23
3 1	Zellhehandlung	24
3.4	2 Behandlung von LCLs	
3.4.2	2 Behandlung von Leukozyten-Subpopulationen	
3.5	Nachweis von ROS	25
3.6	Zellvitalitätsmessungen	26
3.6.	1 AlamarBlue-Assay	
3.6.2	2 Zell vitalitätsmessungen mittels Durchflusszytometrie (FACS)	
3.6.3	3 Caspase-Assay	27
3.7	Genexpression	
3.7.	1 RNA-Asservierung	
3.7.2	2 Isolation und Quantifizierung von RNA	
3.7.3	3 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)	29
3.7.4	4 Quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR)	29
38	Bestimmung von Genvarianten	33
3.8	1 Isolierung und Quantifizierung genomischer DNA	33
3.8	2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
3.8.3	3 Genotypisierung mittels Primerextension (SNaPshot)	34
3.9	Bioinformatik	
3.10	Statistik	
4 E	RGEBNISSE	41
4.1	NADPH-Oxidase-Aktivität und ROS-Produktion	41
4.1.	1 NADPH-Oxidase-Aktivität in isolierten Leukozytenfraktionen	41
4.1.2	2 ROS in lymphoblastoiden Zelllinien	43
42	Basale Genexpression von Untereinheiten	44
7.2		
4.3	Genotypen der NADPH-Oxidase	45
4.4	Determinanten der NADPH-Oxidase-Aktivität	48
4.4.1	1 Transkription der Untereinheiten und Enzymaktivität	
4.4.2	2 Einfluss von Genpolymorphismen auf die Enzymaktivität	50
4.4.3	3 NOX-Aktivität: Einfluss von Genpolymorphismen und -expression	53
4.4.4	4 NOX-Polymorphismen mit Effekten auf Genexpression und Aktivität	54
4.5	Einfluss von NOX-Aktivität und -Genetik auf Zellvitalität	56
4.6	Effekte durch Bestrahlung	
4.6.	1 NOX-Expression, -Aktivitat und Zellvitalitat nach 3 Gy	
4.6.2	2 Genetische Prädiktoren der Bestrahlungseffekte	59
4 7		
4.7	Effekte durch TGFβ1	62
<b>4.7</b>	Effekte durch TGFβ1 1 NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach TGFβ1	<b>62</b>
<b>4.7</b> . 4.7.	<b>Effekte durch TGFβ1</b> 1 NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach TGFβ1 2 Genetische Prädiktoren der Effekte von TGFβ1	<b>62</b> 62 63
4.7. 4.7. 4.7.2	Effekte durch TGFβ1         1       NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach TGFβ1         2       Genetische Prädiktoren der Effekte von TGFβ1         Effekte durch IL10	
4.7. 4.7. 4.7. <b>4.8</b> 4.8.	Effekte durch TGFβ1         1       NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach TGFβ1         2       Genetische Prädiktoren der Effekte von TGFβ1         2       Effekte durch IL10         1       NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach IL10	
4.7. 4.7.2 4.8. 4.8.2 4.8.2	Effekte durch TGFβ1         1       NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach TGFβ1         2       Genetische Prädiktoren der Effekte von TGFβ1         2       Effekte durch IL10         1       NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach IL10         2       NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach IL10         2       Genetische Prädiktoren der Effekte von IL10	62 

5	DISKUSSION	69
5.1	NOX-Aktivität und -Expression in CD3, 14, 19, 56 und in LCLs	69
5.2	NOX-Genexpression: Bezug zu Enzymaktivität und Zellvitalität	72
5.3	Assoziationen von NOX-Genpolymorphismen	73
5.4	NOX und Strahlenreaktion	74
5.5	NOX und TGFβ1	75
5.6	NOX und IL10	75
5.7	Fazit	76
5.8	Ausblick	77
6	ZUSAMMENFASSUNG	79
7	LITERATURVERZEICHNIS	81

# II Abkürzungsverzeichnis

0	Grad (als Winkelmaß)
°C	Grad Celsius
А	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
Вр	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CD3	CD3-positive Zellen, d.h. T-Lymphozyten
CD14	CD14-positive Zellen, d.h. Monozyten/Makrophagen
CD19	CD19-positive Zellen, d.h. B-Lymphozyten
CD56	CD56-positive Zellen, d.h. natural killing cells
cDNA	komplementäre oder copy DNA
cm	Zentimeter
$CO_2$	Kohlendioxid
Da	Dalton
dbSNP	database SNP, innerhalb NCBI-Datenbank
DCFH-DA	Dichlorofluoresce in-Diacetat
ddH <sub>2</sub> O	(doppelt destilliertes) Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPI	Diphenylen-Iodonium-Chlorid
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetic Acid
ЕНН	Extended haplotype homozygosity
et al.	et alii, und andere
exp	expected, erwartete Anzahl
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAD	Flavinadenind inuk leotid
FAM	6-Carboxyfluorescein

FCS	Fetal Calf Serum, Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceiniso thio cyanat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
h	Stunde
HBSS	Hank`s buffered salt solution
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-1
HRP	Horseradish peroxidase
JT-Test	Jonckheere-Terpstra-Trend-Test
Κ	Kalium
k	Kilo
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LCLs	lymphoblastoid cell line, lymphoblastoide Zelllinien
LM	Lymphozyten Medium
m	Meter
Μ	mol/l
MeV	Mega-Elektronenvolt
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
μl / μg	Mikroliter / Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
NaCl	Natriumchlorid
ng / nm	Nanogramm / Nanometer
NK	natural killing cells
NOX	NADPH-Oxidase(n)
obs	observed, beobachtete Anzahl
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, mononukleäre Zellen des peripheren Bluts

PBS	Phosphat-Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pН	pondus Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
Primer-F	Vorwärts-Primer
Primer-R	Rückwärts-Primer
r / r <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient / Bestimmtheitsmaß
RLUs	relative light units, Einheit des Lumineszenz-Signals
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffverbindungen
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnuk leotid- Polymorphismus
Т	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Units (Einheit für Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehung/Minute
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
UTR	untranslated region, nicht abgelesener Bereich auf der mRNA
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
VIC	6-Carboxyrhodamin
WHO	World Health Organization
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

# III Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Arten von ROS und deren intrazelluläre Halbwertszeit
Tab. 2 NADPH-Oxidase-Isoformen.    6
Tab. 3 Belegung der 12-Well-Platte für die Versuchsreihe mit den LCLs
Tab. 4 PCR-Bedingungen für die einzelnen Gene der qRT-PCR
Tab. 5 Pipettierschema f    ür Einzel-PCR
Tab. 6 Pipettierschema der hier verwendeten Multiplex-PCR
Tab. 7 Fluoreszenz-Markierungen der verwendeten ddNTPs für die SNaPshot <sup>TM</sup> -Reaktion 35
Tab. 8 Verwendete Primer f    ür die Genotypisierung
Tab. 9 Basale Genexpression und -Korrelationen zwischen NOX-Untereinheiten
Tab. 10 Chromosomale Lokalisation der untersuchten Genpolymorphismen
Tab. 11 Korrelation zwischen basaler mRNA-Expression und Enzymaktivität der NOX 48
Tab. 12 NOX-Genexpression und ROS-Bildung auf Basalniveau in 48 LCLs 49
Tab. 13 Lineare Regressionsmodelle für genetische Prädiktoren der NOX-Aktivität
Tab. 14 Regressionsmodelle für kombinierten Einfluss von Expression und Genvarianten 54
Tab. 15 Korrelation zwischen NOX-Expression und Zellvitalitätsparametern
Tab. 16 Einfluss von Genexpression und -varianten auf Zellvitalität in LCLs und CD3 57
Tab. 17 Einfluss von NCF4-Expression und rs6572 auf Vitalitätsabnahme durch 3Gy
Tab. 18 SNP-Prädiktoren für 2 Gy-vermittelte Änderungen von ROS und Vitalität in CD3 62
Tab. 19 Prädiktoren der TGFβ1-modulierten, stimulierbaren ROS-Produktion in CD3 65
Tab. 20 Einflussfaktoren für die Wirkung von IL10 auf ROS und Proliferation in CD3 67

# IV Abbildungsverzeichnis

# 1 Einleitung

## 1.1 Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS)

Der ubiquitär vorhandene molekulare Sauerstoff bildet die Grundlage aller aeroben Lebensformen. Auf Grund seiner hohen Elektronegativität dient er als Elektronenakzeptor bei einer Vielzahl biochemischer Reaktionen. In der Atmungskette ermöglicht Sauerstoff unter Beteiligung von Reduktionsäquivalenten die Bildung des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP). Bei Eintreten eines Sauerstoffmangels entstehen bereits nach wenigen Minuten irreversible Schädigungen der abhängigen Gewebe.

Der für den Menschen lebensnotwendigen Bedeutung von Sauerstoff einerseits steht die potenzielle Schädigung durch zum Teil sehr reaktive Sauerstoffverbindungen (engl. *reactive oxygen spezies*) gegenüber. Diese entstehen ständig bei praktisch allen Körperfunktionen (z.B. Atmung, Verdauung, Muskelaktivität). Zu den ROS zählt man freie Radikale wie das Superoxid-Anion und das Hydroxyl-Radikal sowie nicht-radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Ozon (O<sub>3</sub>) sowie alle aus diesen hervorgehende Reaktionsprodukte. Da einige dieser Verbindungen extrem instabil sind und eine sehr kurze Halbwertszeit im Millisekundenbereich besitzen, stellt ihre Detektion eine messtechnische Herausforderung dar. Die unteschiedlichen ROS-Arten sind in Tab. 1 aufgelistet. Die intrazellulären Halbwertszeiten sind sowohl Ausdruck der hohen Reaktivität dieser Verbindungen als auch von Detoxifikationsreaktionen.

ROS	Chemisches Symbol	Intrazelluläre Halbwertszeit $t_{1/2}$
Hydroxyl-Radikal	•ОН	10 <sup>-9</sup> s
Alkoxyl-Radikal	R-O'	10 <sup>-6</sup> s
Superoxidanion-Radikal	O2 <sup>•-</sup>	10 <sup>-4</sup> s
Singulett-Sauerstoff	$^{1}O_{2}$	$10^{-3}$ s
Peroxyl-Radikal	R-OO'	0,1 s
Ubisemiquinon-Radikal	UQH <b>'</b>	0,1 s
Peroxynitrit	ONOO-	0,1 s
Hypochlorige Säure	HOCl	0,1 s
Stickstoffmonoxid	NO	0,4 s
Wasserstoffperoxid	$H_2O_2$	1,0 s

Tab. 1 Arten von ROS und deren intrazelluläre Halbwertszeit (modifiziert nach Sies 1993, S. 215).

#### 1.2 Bildung von ROS

Als Ausgangsverbindung für ROS gilt das Superoxid-Anion. Durch die frühe Entdeckung von Enzymen wie Superoxiddismutase und Katalase (McCord und Fridovich 1969) ist man lange Zeit von einer überwiegend akzidenziellen, unregulierten Produktion von Superoxid ausgegangen. So ensteht dieses als Beiprodukt der Aktivität von diversen Enzymen wie der Xanthin-Oxidase, der Glukose-Oxidase und vielen Cytochrom-P450-Enzymen der Leber. Die mitochondriale Produktion von Superoxid steuert nur einen sehr geringen Teil zur ROS-Synthese bei. Höhere Mengen wurden nur nachgewiesen, sofern Mutationen von Elektron-Transport-Enzymen vorlagen (Ishii et al. 2005) oder eine Exposition zu diversen Zellgiften bestand.

Heute weiß man, dass Superoxid auch gezielt produziert wird. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen können Superoxid in hohen Mengen (wahrscheinlich im molaren Bereich) produzieren (Reeves et al. 2002). Nachfolgend kann Superoxid autokatalytisch oder vermittelt durch die Superoxiddismustase zu Wasserstoffperoxid umgesetzt werden. Dabei besitzt Eisen eine besondere katalytische Funktion. In Form zweiwertiger Eisenkationen werden pro Molekül Wasserstoffperoxid in der so genannten Fenton-Reaktion ein Hydroxyl-Radikal und ein Hydroxid-Anion gebildet.



Abb. 1 Bildung und Umwandlung von ROS (modifiziert nach Lambeth 2004, S. 182).

Eine besonders starke Reaktivität zeigen Hydroxyl-Radikale und Peroxynitrit, die nahezu uneingeschränkt mit Verbindungen wie Nukleotiden, Proteinen und Lipiden reagieren können. Peroxynitrit kann durch Nitrierung von Tyrosin-Resten die DNA erheblich schädigen (Maeda und Akaike 1998). Des Weiteren gilt Wasserstoffperoxid als eine relativ langlebige Verbindung mit guter Fähigkeit zur Membrandiffusion. Auf Grund seiner hohen Reaktivität reagiert es unspezifisch und initiiert eine Radikalkettenreaktion mit erheblichem zellulärem Schaden.

## 1.3 Detoxifikation von ROS

Die Bildung von ROS hat auf zellulärer Ebene eine ambivalente Bedeutung. Einerseits werden für die Infektabwehr hohe Konzentrationen von ROS benötigt. Anderseits muss eine Zelle zur Wahrung ihrer Integrität das Ausmaß potentieller Schädigungen minimieren. Die Stoffwechsellage einer übermäßig hohen intrazellulären Bildung von ROS und/oder deren insuffizienter Detoxifikation wird als Oxidativer Stress bezeichnet. Die ROS können dabei mit allen Biomolekülen reagieren. Dabei kommt es zu vermehrter Lipidperoxidation (Dexter et al. 1989) sowie einer Modifikation von Proteinen (Good et al. 1998), Zuckern und Nukleinsäuren (Alam et al. 1997). Daraus können Interaktionen mit strukturellen Änderungen (z.B. Zerstörung von Doppelbindungen) oder Funktionsverluste (z.B. Verschiebung von nukleophilen Zentren) resultieren. Im besonderen Maße stellen Veränderungen an der DNA eine Gefährdung der Zelle dar. Einer oxidativen Veränderung von DNA können genomische Muationen oder Strangbrüche folgen mit dem potenziellen Risiko maligner Transformation.

Als Abwehr gegen oxidativen Stress haben sich unterschiedliche antioxidative Mechanismen etabliert. Durch enzymatische Reaktionen (z.B. Katalase, Peroxidasen und Superoxiddismutasen) können ROS detoxifiziert werden (siehe auch Abb.1). Wichtig zur Verringerung von oxidativem Stress sind auch niedermolekulare Verbindungen (z.B. Vitamin C, Harnsäure, Glutathion, Thioredoxin, Polyphenole, Flavonoide), welche als Reduktionsäquivalente dienen. Einige dieser Verbindungen werden enzymatisch durch Redoxreaktionen regeneriert (z.B. Glutathion, Thioredoxin).

#### 1.4 Medizinische Bedeutung von ROS

Die große medizinische Bedeutung von ROS ist Ausdruck einer Vielzahl zellphysiologischer Funktionen, welche durch ROS beeinflusst werden. ROS können beispielsweise Redoxsensitive Cysteinreste der Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch Oxidation reversibel inaktivieren (Lee et al. 1998). Diese Enzyme sind Teil wichtiger Signalkaskaden der Zellproliferation und Zelldifferenzierung, deren Phosphorylierungs- und damit Aktivierungszustand durch ROS reguliert werden (Hunter 2000). Weiterhin modulieren ROS die Funktion von Ionenkanälen (Hidalgo et al. 2004), Calcium-abhängigen Prozessen (Wang G et al. 2004), MAP-Kinasen (Djordjevic et al. 2005) und beeinflussen pro- oder anti-apoptotische Vorgänge (Bedard und Krause 2007).

Nachfolgend soll an Hand der aufgeführten Beispiele die medizinische Relevanz dargestellt werden. Die Produktion von ROS beeinflusst stark das kardiovaskuläre System. So konnte in Knockout-Mäusen, denen die regulatorische Untereinheit p47phox fehlte, ein deutlich niedrigerer systolischer Blutdruck nachgewiesen werden. Dadurch kommt es zu einer verringerten Bildung an Superoxid, wobei Endothel- und Gefäßmuskelzellen schwächer auf Angiotensin II reagieren (Landmesser et al. 2002).

Bei Hypercholesterinämie (Ohara et al. 1993) und Hypertonie (Moreno et al. 2006) konnte ebenfalls eine verstärkte endotheliale Superoxid-Produktion nachgewiesen werden. Durch Reaktion von Superoxid mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit verringert sich die Bioverfügbarkeit von vasodilatierendem Stickstoffmonoxid und die Fähigkeit zur Relaxation nimmt ab (Munzel et al. 1995). Konsistent damit nahm in Arterien durch Gabe von Superoxid-Dismutase die HWZ von Stickstoffmonoxid und dessen biologische Wirkung zu (Rubanyi und Vanhoutte 1986, Abrahamsson et al. 1992). Der von Brown et al. (2006) durchgeführte Gentransfer von extrazellulärer Superoxid-Dismutase konnte diese Beobachtungen bekräftigen und den protektiven Einfluss auf eine vorhandene endotheliale Dysfunktion eindrucksvoll bestätigen.

Es ist bekannt, dass Kardiomyozyten besonders anfällig gegenüber oxidativem Stress sind, u.a. bedingt durch ihre metabolische Aktivität und ein Fehlen von ROS-detoxifizierender Katalase (Kloner et al. 1989). Dazu passt eine Beobachtung, der zufolge sich eine p47phox-Defizienz protektiv gegenüber Myokardinfarkt auswirkte (Doerries et al. 2007). In diesem Zusammenhang könnte die Entwicklung von spezifischen NOX-Hemmern eine neue therapeutische Option darstellen.

Bei Erkrankungen des ZNS wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Amyotropher Lateralsklerose scheinen ROS eine destruktive Wirkung auf den Krankheitsverlauf zu haben (Andersen 2004). So wird beim Morbus Parkinson durch Oxidation von Dopamin und gleichzeitiger intrazellulärer Anreicherung von oxidiertem  $\alpha$ -Synuklein der vesikuläre Dopamin-Transport entscheidend verschlechtert (Conway et al. 2001). Dabei gibt es Hinweise darauf, dass L-DOPA auch über Detoxifikation von ROS wirkt (Prigione et al. 2006).

Bei der chronischen Granulomatose handelt es sich um eine Immundefekterkrankung, die mit schweren systemischen Infektionen einhergeht. Hierbei treten gehäuft Pneumonien, Osteomyelitiden und Abszesse auf. Ursächlich für diese Erkrankung ist eine Unfähigkeit von Granulozyten, internalisierte Bakterien durch die Bildung toxischer Verbindungen wie hypochlorige Säure und Wasserstoffperoxid zu vernichten. Ein Mangel dieser Substanzen wird durch die verminderte Aktivität der NADPH-Oxidase bedingt. Es sind sowohl für die katalytische Untereinheit gp91phox als auch für die Bereiche der regulatorischen Untereinheiten p22, p47 und p67 Defektvarianten beschrieben worden (Schaper et al. 2003, Heyworth et al. 2003).

Unter den vielen weiteren medizinischen Kontexten, in denen ROS eine wichtige Rolle spielen, sei an dieser Stelle nur noch die Strahlentherapie genannt. Mindestens 95% der initialen Strahlenwirkung in den Zellen ist über die Bildung von ROS vermittelt (Hellman 1993). Diese entstehen als Folge der Wechselwirkung der ionisierenden Strahlen mit Wasser. Durch ROS können viele intrazelluläre Prozesse beeinflusst und potenziell alle Arten von Makromolekülen geschädigt werden. Aus direkten Interaktionen der Strahlung wie auch indirekt z.B. über ROS können DNA-Schäden resultieren. Quantitativ dominieren darunter Basenschäden (ca. 3000/Gy/Zelle) und Einzelstrangbrüche (ca. 1000/Gy/Zelle), die zusammen ~90% der durch Röntgenstrahlung verursachten DNA-Schäden ausmachen. Seltener sind die besonders schwer wiegenden DNA-Doppelstrangbrüche (40/Gy/Zelle).

## 1.5 NADPH-Oxidasen: Aufbau und Funktion

Bereits seit Mitte des letzten Jahrhunderts wurde die Abhängigkeit des "Respiratory Burst" in Phagozyten von einem Energie verbrauchenden Prozess eines Enzyms vermutet (Sbarra und Karnovsky 1959). Heute werden als NADPH-Oxidasen eine Gruppe von Plasmamembranassoziierten Enzymen beschrieben, die besonders stark in Zellen des phagozytären Systems exprimiert werden. Sie dienen dort der Abwehr von Bakterien und Pilzen durch Produktion von Superoxid, welches als Ausgangssubstanz zur Generierung weiterer ROS mit antimikrobieller Wirkung dient (Babior 1978b, Babior 1978a). Im Laufe des letzten Jahrzehnts rückte zunehmend die Bedeutung von Superoxid als intrazelluläres Signaltransduktionsmolekül in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Dies betrifft vielfältigste zelluläre Funktionen wie z.B. Differenzierung (Shen et al. 2006), Proliferation (Buggisch et al. 2007) und Zellvitalität.

Je nach Lokalisation der NADPH-Oxidase kann Superoxid, welches selbst nicht Membranpermeabel ist, nach extrazellulär, intrazellulär oder intravesikulär in abgegrenzte Kompartimente (z.B. in Lysosomen) abgegeben werden. Die extrazelluläre und intravesikuläre Freisetzung dient vor allem der mikrobiellen Abwehr, die intrazelluläre insbesondere der Regulation zellulärer Funktionen. Beispielsweise scheint Superoxid im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid eher einen Apoptose-inhibierenden Effekt zu haben (Pervaiz und Clement 2002; Pervaiz et al. 1999).

Bis heute konnten insgesamt sieben NADPH-Oxidase-Isotypen in einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben gefunden werden (Cheng et al. 2001). Diese sind in Tab. 2 aufgeführt. Die Verteilung verdeutlicht, dass die Bildung von ROS nicht nur ein spezifisches Merkmal phagozytärer Zellen, sondern vielmehr eine Fähigkeit vieler Zelltypen darstellt. Die Nomenklatur der NADPH-Oxidase-Isoformen orientiert sich an der großen katalytischen Untereinheit, die beim phagozytären Typ der NADPH-Oxidase als NOX2 bzw. gp91phox bezeichnet wird.

Isotyp	hohe Expression	mittlere Expression
NOX 1	Kolon	glatte Muskulatur, Endothel, Uterus, Plazenta
NOX 2	Phagozyten	B-Lymphozyten, Neuronen, Hepatozyten
NOX 3	Innenohr	fetale Niere, Milz, Schädelknochen, Gehirn
NOX 4	Niere, Blutgefäße	Osteoklasten, Endothel, glatte Muskulatur
NOX 5	Lymphatisches Gewebe	Endothel, glatte Muskulatur, Pankreas, Ovar
DUOX 1	Schilddrüse	Bronchialgewebe, Kleinhirn, Hoden
DUOX 2	Schilddrüse	Speicheldrüsen, GI-Trakt, Uterus, Gallenblase

Tab. 2 NADPH-Oxidase-Isoformen (modifiziert nach Lambeth 2004, S. 183).

Die phagozytäre NADPH-Oxidase setzt sich aus zwei membranständigen Untereinheiten und vier im Zytosol befindlichen regulatorischen Untereinheiten zusammen (siehe Abb. 2). Der katalytische Kern des Enzyms wird aus der Untereinheit gp91phox und der überwiegend als Stabilisator dienenden Proteinuntereinheit p22phox gebildet. Nach Einlagerung einer Häm-Gruppe in gp91phox kommt es zur Zusammenlagerung mit der Untereinheit p22phox (DeLeo et al. 2000). Als membranständiges Heterodimer wird es auch als Flavocytochrom b558 bezeichnet - besitzt aber hier allein noch keine katalytische Aktivität (Vignais 2002), im Unterschied zu einigen anderen NADPH-Oxidase-Isoformen. Die Aktivierung mit nachfolgender Bildung von Superoxidradikalen vollzieht sich bei der NOX2 erst nach vollständiger Anlagerung der zytosolischen Untereinheiten p40phox, p47phox, p67phox sowie der GTPase Rac2 an die Membran-ständigen gp91phox und p22phox. Eine Aktivierung kann durch physiologische Stimuli (Kontakt zu Mikroorganismen oder inflammatorische Zytokinfreisetzung) als auch experimentell induziert (Zugabe von Zymosan A oder dem Phorbolester PMA) erfolgen. Als primärer Schritt der Aktivierung erfolgt die Anlagerung von Rac2 an die Plasmamembran (Park et al. 1997). Rac-Proteine besitzen im inaktiven Zustand an der carboxy-terminalen hydrophoben Gruppe ein inhibitorisches Protein. Die Freisetzung dieses Inhibitionsfaktors (rhoGDI) wird durch den Austausch von GDP gegen GTP ermöglicht (Abo et al. 1991). Über die daraufhin frei vorliegende hydrophobe Geranylgruppe kann rac-GTP an Membranstrukturen binden (Knaus et al. 1991).

Im nachfolgenden Schritt wird die Untereinheit p47phox sequentiell an bestimmten Serinresten durch die Proteinkinase C phosphoryliert (Johnson et al. 2008; Lopes et al. 1999). Die resultierende Konformationsänderung bewirkt die Freilegung einer "phox homology" (PX)-Domäne, wodurch p47phox mit Phospholipiden der Plasmamembran assoziiert wird. Weiterhin kann durch Phosphorylierung einer autoinhibitorischen Region eine Bindung der SRC-Homology-3 (SH3)-Domäne mit p22phox als auch der PRR-Domäne mit p67phox stattfinden. Durch diese Anlagerung der "Organisations-Untereinheit" p47phox wird nach de Mendez et al. (1997) die aktivierende Untereinheit p67phox den membrangebundenen Untereinheiten angenähert. Somit kommt es durch Protein-Protein-Interaktion mit p67phox zur Aktivierung der gp91phox (Han et al. 1998).



regulatorische Proteine

Abb. 2 Darstellung der phagozytären NADPH-Oxidase. Ein aktivierender Stimulus führt zur Zusammenlagerung der regulatorischen Untereinheiten mit den membranständigen Einheiten.

Die Bedeutung der Untereinheit p40phox im Rahmen der Aktivierung ist noch nicht abschließend geklärt. Die Interaktion von p40phox Membranstrukturen mit (Phosphatidylinositol-3-Phosphaten), die im besonderen Maße bei internalisierten Phagosomen zu finden sind, spricht für eine Bedeutung dieser Untereinheit bei der Stimulation der Phagozytose-induzierten Superoxid-Produktion. (Tian et al. 2008; Ueyama et al. 2007)

NADPH-Oxidasen katalysieren die Bildung von Superoxid gemäß der Reaktionsgleichung:

 $NADPH + 2 O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2 O_2^{\bullet-}$ 

Die NADPH-Oxidasen fungieren in dieser Reaktion als eine Elektronentransportkette. NADPH dient als primärer Elektronendonor und Sauerstoff als finaler Akzeptor. Entsprechende K<sub>M</sub>-Werte liegen bei 40-45 µM für NADPH im Gegensatz zu 2,5 mM für NADH (Clark et al. 1987). Der Elektronenfluss läuft dabei wie folgt ab: Die Aktivierung von p67phox resultiert in einer Reduktion von FAD zu FADH<sub>2</sub> durch die Elektronen von NADPH/NADH (Nisimoto et al. 1999). Die Bindungsstellen für NADPH/NADH und FAD befinden sich im carboxyterminalen Bereich von gp91phox. In einer aus sechs transmembranären α-Helices bestehenden hydrophoben Domäne sind fünf Histidin-Reste eingegliedert, von denen vier Histidine an der Bindung von zwei Hämgruppen beteiligt sind (die transmembranären α-Helices III und V enthalten jeweils zwei Histidin-Reste, welche asymmetrisch Häm-Gruppen binden). Diese beiden Häm-Moleküle sind relativ mittig in der Plasmamembran eingebettet. Unter Benutzung der beiden Häm-Gruppen werden Elektronen einzeln schrittweise nach extrazellulär transportiert und auf molekularen Sauerstoff übertragen, der dadurch zum Superoxid reduziert wird. Effektiv werden durch einen Enzymeigenen Protonenkanal die Ladungen ausgeglichen, so dass die Bilanz der transportierten Ladungen 0 beträgt.

#### 1.6 Genetische Variabilität in der phagozytären NADPH-Oxidase

Als genetische Polymorphismen werden Varianten des genetischen Codes bezeichnet, die mit einer Frequenz von mindestens 1% in der Allgemeinbevölkerung auftreten. Die Kombination mehrerer Polymorphismen auf einem Chromosom oder einem Abschnitt davon wird als Haplotyp bezeichnet. Genetische Polymorphismen können das Risiko für eine Erkrankung, deren Verlauf sowie die Therapie in positiver wie negativer Hinsicht beeinflussen. Im Serum gesunder Individuen unterliegt die Bildung von ROS relativ starken Schwankungen, die zu 20-35% auf genetische Faktoren zurückgeführt werden können (Lacy et al. 2000). Die meisten NOX-Isoformen und Untereinheiten weisen ein hohes Maß an Interspezies-Konservierung auf (Bedard und Krause 2007). Innerhalb der menschlichen Spezies zeigt insbesondere der Genbereich von CYBB ein extrem hohes Kopplungsungleichgewicht (eng. linkage disequilbrium, LD). Das bedeutet, dass hier konservierte Haplotypen über einen langen Genbereich vorliegen als Folge von wenig Rekombination bei der Keimzellbildung. Im kodierenden Bereich für CYBB sind bislang keine Varianten bekannt, die das Kriterium eines SNPs erfüllen. Da über 300 seltene krankheitsauslösende Mutationen für CYBB beschrieben wurden (Piirila et al. 2006), kann von einer geringen Toleranz gegenüber Variationen ausgegangen werden.

Der Bereich für das CYBA-Gen weist mit sieben kodierenden nicht-synonymen SNPs eine relativ hohe Variationsbreite zwischen den menschlichen Individuen auf. Der C242T-Polymorphismus im CYBA-Gen liegt in einer Häm-bindenden Untereinheit, die für die Stabilität des Proteins essenziell ist. Ob sich die Variante funktionell auswirkt, ist allerdings umstritten. Es gibt Berichte, denen zufolge das T-Allel an dieser Position mit einer Reduktion der NADPH-Oxidase-Aktivität um 20-40% einhergeht (Guzik et al. 2000, Wyche et al. 2004). Demgegenüber stehen Beobachtungen ohne einen Effekt des 242T-Allels (Schirmer et al. 2008) oder gar mit einer Steigerung der NADPH-Oxidase-Aktivität in Gegenwart dieses Allels (Shimo-Nakanishi et al. 2004). Der -930A>G SNP im Promotorbereich von CYBA wurde mit einem höheren Risiko für essenzielle Hypertonie assoziiert, was u.a. an einer verstärkten Promoteraktivität und damit einer erhöhten CYBA-Expression liegen könnte (San Jose et al. 2004). Ein Einfluss dieses SNPs auf die NADPH-Oxidase-Aktivität konnte in anderen Studien jedoch nicht belegt werden (Schirmer et al. 2008; Wyche et al. 2004). Demgegenüber war ein SNP in der 3'UTR von CYBA, 640A>G, reproduzierbar mit einer geringeren Enzymaktivität verbunden (Schirmer et al. 2008). In einer umfassenderen genetischen Analyse, welche so genannte tagging SNPs für die einzelnen NADPH-Oxidase-Untereinheiten einschloss, zeigte nur der SNP 640A>G (und eine eng gekoppelte Variante) eine funktionelle und klinische Assoziation mit dem Outcome einer Zytostatika-Therapie bei Non-Hodgkin-Lymphomen (Hoffmann et al. 2010).

## 1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung genetischer Varianten, welche die NADPH-Oxidase beeinflussen. Als funktionelle Phänotypen dienten Expressions-, Aktivitäts- und Zellvitalitätsmessungen unter ausgewählten Behandlungen: Röntgenstrahlung, die Zytokine TGFβ1, IL10, IL1β und anti-TGFβ. Für diese Bedingungen wird ein Effekt auf die Funktion der NADPH-Oxidase vermutet. Die Arbeit setzte sich aus zwei Studienteilen zusammen: zum einen aus lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) mit genomweit vorliegenden Genotyp-Daten, zum anderen aus einer Probandenstudie, für welche gezielt die *tagging* SNPs der Gene für die Untereinheiten der phagozytären NADPH-Oxidase bestimmt werden sollten. Für die letzt genannte Studie sollten die funktionellen Messungen getrennt für die aus Blut zu isolierenden T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Monozyten durchgeführt werden. Die Daten aus den funktionellen Messungen waren dann mit den Genotypen in Beziehung zu setzen.

#### 1.8 Arbeitsprogramm

Der Zielsetzung folgend ergaben sich für die Teilaspekte meiner Arbeit folgende Aufgabenstellungen:

#### A: Lymphoblastoide Zellen

- A1: Kultur von lymphoblastoiden Zellen (LCLs)
- A2: Behandlung der LCLs mit einer Bestrahlung von 3 Gy, TGF $\beta$ 1 und IL10
- A3: Analysen zur Zellvitalität per Fluoreszenz (AlamarBlue<sup>®</sup>) und FACS 30 h sowie per Caspase-Lumineszenz-Assay 4 h nach Behandlung
- A4: Asservierung von RNA 4h und 24 h nach Behandlung, Lagerung bei -80°C und spätere Isolierung, Quantifizierung, reverse Transkription und *Real-time*-Expressionsmessungen der für die Unterheiten der NADPH-Oxidase kodierenden Gene

#### **B:** Probandenstudie

- **B1:** Rekrutierung von 120 kaukasischen, gesunden Probanden und Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs)
- **B2:** Durchflusszytometrische Auftrennung in einzelne Subpopulationen (T-Zellen, Monozyten, B-Zellen)
- **B3:** Behandlung der isolierten Zellen mit TGFβ1, anti-TGFβ, IL10, IL1β sowie Bestrahlung mit 2 Gy
- **B4:** Lumineszenz-Messung für alle drei Zellfraktionen mit den unter B3 genannten Bedingungen nach 24 h Inkubation bei 37°C, pro Ansatz in Triplikaten
- **B5:** Asservierung von RNA nach 24-stündiger Inkubation der unter B3 genannten Behandlungen
- **B6:** Fluoreszenz-Messung mittels AlamarBlue<sup>®</sup> (nach 28 und 48 h Inkubation bei 37°C)
- **B7:** Isolierung, reverse Transkription und Genexpressionsmessungen mittels *Real-time*-PCR aus den unter B5 gewonnenen Proben

#### C: Genotypisierung

- C1: Isolierung und Quantifizierung genomischer DNA
- **C2:** Genotypisierung der *tagging* SNPs für sechs Untereinheiten der phagozytären NADPH-Oxidase (ca. 50 SNPs) mittels Primerextensionsmethode (SNaPshot<sup>TM</sup>)

# D: Zusammenstellung der Daten und statistische Auswertung

- D1: Datenauswertung der einzelnen Messungen mit der jeweiligen Software
- D2: Zusammenstellung der Messdaten in umfassenden EXCEL-Tabellen ("Masterfiles")
- **D3:** Deskriptive und analytische Statistik mit entsprechender Software.

# 2 Material

# 2.1 Geräte

Accu-jet <sup>®</sup>	Brand, Wertheim
Bestrahlungsgerät Xstrahl RS225	Gulmay MEDICAL, UK
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioRobot <sup>®</sup> EZ1	Qiagen, Hilden
ComPhor L Mini-Gelkammer	Biozym, Hessisch Oldendorf
FACSAria II	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
FACScan	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Feinwaage BL 610	Sartorius, Göttingen
Fluor-S <sup>™</sup> MultiImager	BioRad, München
Hämatocytometer (Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Typ Improved)	
Inkubator cellsafe	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Inkubator Function Line	Heraeus, Hanau
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Magnetrührer (IKAMAG RET)	IKA, Staufen
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroliter-Küvette für Photometer	Implen, München
(LabelGuard <sup>™</sup> )	
Mikroplatten-Reader (96-Well, Tecan	Tecan, Crailsheim
ULTRA)	
Mikroskop Telaval 31	Zeiss, Jena
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Schorndorf
Mini-Centrifuge, Model GMC-060	LMS, Tokyo, Japan
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
Netzteil Elektrophoresekammer Standard	Biometra, Göttingen
Power Pack P25	
PCR-Gradienten-Cycler (384-Well), Typ	Eppendorf, Hamburg
Master Cycler	

PCR-Gradienten-Cycler (96-Well), PTC-	MJ Research/BioRad. Hercules, USA
200 Peltier	
pH-Meter CG 822	Schott Geräte, Mainz
Photometer (Biophotometer 6313)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-	Eppendorf, Hamburg
1000 µl), Typen Research und Reference	
Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierer 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Darmstadt
Stauschlauch zur Blutentnahme	Prämeta, Troisdorf
Sterilbank Clean Air Typ DFL/REC4 KL	Mahl, Trendelburg
2A	
TaqMan ABI PRISM 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank VIP Series -86°C	Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Vertikal-Autoklav KSG 40/60	KSG, Olching
Vertikal-Autoklav: FV für Sterilgut	Tecnorama, Fernwald
Vortexer (MS 2 Minishaker)	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
2.2 Verbrauchsmaterialien	
Alkoholisches Haut-Desinfektionsspray (Kodan <sup>®</sup> )	Schülke & Mayr, Norderstedt
Blutentnahme-Besteck (Butterfly, SaftyMultifly <sup>®</sup> -Set)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser für Hämatocytometer	Menzel Gläser, Braunschweig
Einweg-Pasteurpipetten, Glas, 230 mm	Brand, Wertheim
Einweg-Pasteurpipetten, Kunststoff, 3 ml	Roth, Karlsruhe
Labortücher	Kimberly-Clark, Surrey, UK

13

Mehrkanal Pipette (8er) 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Monovetten Kalium-EDTA, 2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Monovetten Lithium-Heparin, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Multipipette plus, 0,1 ml und 5 ml	Eppendorf, Hamburg
PCR Softtubes Flachdeckel, RNase- und DNase-frei (0,2 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf
PCR-Folien (Adhesive PCR Foil Seals)	Abgene, Epsom
Pipetten, serologisch, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl), extended length	Starlab, Ahrensberg
Pipettenspitzen RNase-, Dnase-frei	Kisker, Steinfurt
(10 µl, 100 µl, 1000 µl)	
Platten, 6-Well steril für Zellkultur	Nunc, Roskilde, Dänemark
Platten, 12-Well steril für Zellkultur	Nunc, Roskilde, Dänemark
Platten für Fluoreszenz, 96-Well, schwarz	Costar, Corning, USA
Platten für Lumineszenz, 96-Well, weiß	Greiner, Solingen
Platten, Thermo fast 96-Well	Abgene, Epsom
Platten, Thermo fast 384-Well	Abgene, Epsom
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 1,5 ml; Protein LoBind	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 5 ml für FACS	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Röhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spitzen für Multipipette plus (Combitip plus 0,1 ml; 0,2 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 2,5 ml; 5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterile Filter, 50 µm Porengröße	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Streifen (8er) für PCR-Platten	Abgene, Epsom
Streifen (8er) für PCR-Platten, RNAse frei	ThermoScientific, UK
TaqMan Adhesive Optical Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
Tupfer (aus Zellstoff)	Hartmann, Heidenheim

# 2.3 Chemikalien

Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe	
Annexin, FITC-markiert	Alexis, Lörrach	
Anti-TGFB1	R&D, Wiesbaden	
Anodenpuffer (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt	
CD3-Antikörper (UCHT1-Klon), APC-	NatuTec, Frankfurt	
markiert		
CD14-Antikörper, PerCP-5.5-markiert	NatuTec, Frankfurt	
CD19-Antikörper, PE-markiert	NatuTec, Frankfurt	
CD56-Antikörper, FITC-markiert	NatuTec, Frankfurt	
DCF; DCFH-DA	Sigma, Deisenhofen	
di-Natriumhydrogen-phosphat	Merck, Darmstadt	
dNTP-Set	ABgene, Epsom	
Ethanol	J. T. Baker, Phillipsburg, USA	
Ethidiumbromid (1% in H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt	
Exonuk lease I	USB, Staufen	
FACS Flow / Rinse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	
Ficoll-Paque <sup>™</sup> Plus	GE Healthcare, Uppsala, Schweden	
GeneScan <sup>™</sup> LIZ <sup>®</sup> 120 Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt	
GENESCAN <sup>®</sup> 400 HD[ROX]	Applied Biosystems, Darmstadt	
Size Standard		
Glycerol 85%	Zentralapotheke Klinikum Göttingen	

HBSS-Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	
Helipur <sup>®</sup> H plus N Desinfektionsmittel	Braun, Melsungen	
Hepes	Applied Biosystems, Darmstadt	
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt	
IL1β	NatuTec, Frankfurt	
IL10	NatuTec, Frankfurt	
Kaliumchlorid	Riedel-DeHaën AG, Seelze	
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt	
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt	
L-012	Wako, Osaka (Japan)	
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen	
Natriumchlorid	J. T. Baker, Phillipsburg, USA	
Penicillin-/Streptomycin-Lösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	
(10000 U/ml Penicillin G-Natrium und		
10000 µg/ml Streptomycin-Sulfat)		
PicoGreen <sup>®</sup>	Applied Biosystems, Darmstadt	
PMA	Sigma, Deisenhofen	
Polymer POP7 (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt	
Primer für PCR und qRT-PCR	MWG-Biotech, Ebersberg	
Propidiumiodid	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	
Random Primer dN6	Roche, Mannheim	
Rnase-Inhibitor, rekombinant	USB, Staufen	
RNase Zap	Ambion, Austin, USA	
RPMI Medium 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	USB, Staufen	
TGFβ1-Protein, human rekombinant	Promocell, Heidelberg	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe	
1 kb-Leiter	Rapidozym, Berlin	
100 bp-Leiter	Rapidozym, Berlin	

# 2.4 Wiederverwendete Materialien

Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt	
Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Darmstadt	
Stauschlauch zur Blutentnahme	Prämeta, Troisdorf	

# 2.5 Medien

HBSS-2%	HBSS-Medium	98% (v/v)
	FCS	2% (v/v)
LM-15%	<b>RPMI-Medium</b>	84% (v/v)
	FCS	15% (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
LM-10%	<b>RPMI-Medium</b>	89% (v/v)
	FCS	10% (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
LM-2%	<b>RPMI-Medium</b>	80% (v/v)
	LM-10%	20% (v/v)

#### 2.6 Zelllinien

#### 2.6.1 Primäre humane T-Lymphozyten, Monozyten und B-Zellen

Zur Gewinnung dieser Zelllinien wurde freiwilligen Spendern venöses Blut entnommen und durch Isolations- und Aufreinigungsschritte von anderen Blutbestandteilen getrennt. Die Arbeitsschritte sind im Methodenteil erläutert.

#### 2.6.2 Lymphoblastoide Vorläuferzellen (LCLs)

Als LCLs (*lymphoblastoid cell lines*) werden Zelllinien von B-Lymphozyten beschrieben, die durch Transfektion mit dem Eppstein-Barr-Virus immortalisiert wurden. Für diese Arbeit wurden die Zelllinien kaukasischer nicht verwandter Spender des Coriell Institute for Medical Research, Camden, New Jersey, USA verwendet. Dabei handelte es sich um Zelllinien von denselben Personen, die auch im Rahmen des HapMap-Projektes genotypisiert wurden. Von 59 vorhandenen Zelllinien konnten 48 erfolgreich kultiviert werden, die folgende ID-Nummer des Coriell Institutes haben: GM07000, GM11839, GM11840, GM11993, GM12003, GM12005, GM12056, GM12154, GM12750, GM12760, GM12762, GM12763, GM12812,

GM12814, GM12873, GM06993, GM06994, GM07022, GM07034, GM07055, GM07056, GM07345, GM07357, GM11832, GM11992, GM11994, GM12004, GM12006, GM12043, GM12044, GM12057, GM12144, GM12145, GM12146, GM12155, GM12156, GM12234, GM12239, GM12248, GM12249, GM12717, GM12751, GM12813, GM12815, GM12872, GM12874, GM12891, GM12892.

# 2.7 Lösungen

PBS-Puffer, pH 7,4	NaCl	128,5 mM
hergestellt als 10x-Konzentrat,	KCl	2,8 mM
1x-Verdünnungen mit NaOH	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM
eingestellt	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Probenpuffer für	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Gelelektrophorese	Ficoll Puffer Typ 400	15 % (w/v)
	gelöst in 1 x TBE-Puffer	
TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer),	Tris	1 M
als 10x konzentriert hergestellt,	Borsäure	1 M
mit HClauf pH 8,3 eingestellt	EDTA	30 mM
TE-Puffer, pH 7,5, eingestellt mit	Tris	10 mM
HC1	EDTA	1 mM

# 2.8 Kits und Assays

AlamarBlue <sup>®</sup> zur Messung der Zellvitalität	Invitrogen, Karlsruhe
Caspase-Glo <sup>TM</sup> 3/7-Assay	Promega, Mannheim
EZ1 DNA Blood Kit zur DNA-Isolierung aus	Qiagen, Hilden
Gesamtblut, vollautomatisch	
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
Real-time-PCR-Mastermix mit SYBR <sup>®</sup> green	USB, Staufen
RNA-Isolierungskit (RNeasy Mini Plus) für	Qiagen, Hilden

QuiCUBE Roboter	
SNaPshot <sup>™</sup> -Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
2.9 Software	
Adobe Photoshop	graphische Aufbereitung von Abbildungen
Cell-QuestVersion1.1.2 <sup>™</sup>	Software zur Durchführung und Visualisierung der durchfluss-zytometrischen Messungen für das FACS-Scan Gerät, Becton Dickinson
3100 Data Collection Software Version 1.0 (Applied Biosystems)	Verarbeitung von Daten mit dem 3100 Genetic Analyser Sequenzierer
GeneScan Analysis Version 3.5.1 (Applied Biosystems)	DNA-Fragment-Analysen im Sequenziergerät
HaploView-Software	(http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview): Software zur grafischen Aufbereitung von Daten aus den Genotyp-Datenbanken.
MS Office (Microsoft)	Textverarbeitung Präsentationen Tabellenkalkulation
Oligo (Version 6.58)	Molecular Biology Insights, USA
Phase-Software (Version 2.1)	Software zum Berechnen der Haplotypen
Quantity One S Version 4.2.1 (BioRad)	Auswertung von Gelläufen mit Bestimmung von Fragmentlängen

SDS 2.1 (Applied Biosystems)	Erfassung von Expressionsmessungen, die	
	mit TaqMan 9100 HAT gewonnen wurden	
SPSS Version 12.0	Grafische Darstellung von Messdaten und Testung auf mögliche Assoziationen.	
XFluor4 (Tecan)	Erfassung von Lumineszenz- und Fluoreszenz-Messdaten des Tecan-Ultra	

## 2.10 Datenbanken

#### NCBI (http://www.nih.gov/)

Umfassende Datenbank mit Informationen zu Literatur, Struktur von Genen, mRNA und Proteinen sowie Informationen zu dokumentierten Microarray-Expressions- und Polymorphismen-Daten.

#### HapMap-Projekt (http://www.hapmap.org/index.html.en)

Das 2002 begonnene HapMap-Projekt stellt eine internationale Kooperation zur physikalischen Kartographierung von Polymorphismen im menschlichen Genom dar.

# 3 Methoden

Diese Arbeit setzte sich aus zwei Studienteilen zusammen. Im ersten Teil sollten mit bereits in der Abteilung Klinische Pharmakologie vorhandenen lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) die Effekte unterschiedlicher Behandlungen auf die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen, die Genexpression der NADPH-Oxidase und die Zellvitalität dargestellt werden. Im zweiten Teil wurden primäre Leukozytenpopulationen aus dem Blut gesunder Spender/innen gewonnen und hinsichtlich derselben Fragestellungen untersucht.

## 3.1 Kultur von LCLs

Nach dem Auftauen der in flüssigem Stickstoff bei -170°C gelagerten Zellen wurde für jede Linie eine Primärkultivierung in einer kleinen Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) mit 5 ml LM-15% angelegt. Nachdem die kleinen Kulturflaschen dicht bewachsen waren, wurden die Zellen zur Expansion in größere Kulturflaschen (Grundfläche 75 cm<sup>2</sup>) mit einem Gesamtvolumen von 20 ml überführt. Für die Versuchsreihe wurden pro Zelllinie etwa 25\*10<sup>6</sup> Zellen benötigt und wie unten beschrieben behandelt.

## 3.2 Probandenkollektiv

Zur Durchführung dieses Studienteils wurde 120 gesunden Probanden Blut abgenommen. Bei vier Personen musste die Blutabnahme wegen Unwohlseins abgebrochen werden. Mit den Zellen einer weiteren Probandin wurde zwar die gesamte Versuchsreihe durchgeführt, im Nachhinein diese Daten aber wegen asiatischer Abstammung aus der Analyse genommen. Bei den übrigen 115 Probanden handelte es sich um Kaukasier, die zueinander kein Verwandtschaftsverhältnis aufwiesen. Diese 115 Personen (davon 69 Frauen) waren im Mittel 25,8 (Bereich 18-50) Jahre alt. Als Ausschlusskriterien galten Nikotinkonsum, das Vorhandensein einer akut- oder chronisch-entzündlichen Erkrankung sowie dauerhafte Medikamenteneinnahme. Die regelmäßige Einnahme eines Kontrazeptivums sowie antiallergische Medikation wurden nicht als Ausschlusskriterium gewertet. Probanden, welche bereits an früheren Studien der Abteilung Klinische Pharmakologie mit ähnlicher Fragestellung teilgenommen hatten, wurden nicht zugelassen, da meine Studie u.a. zur unabhängigen Validierung der früheren Befunde dienen sollte. Vor Beginn der Blutentnahme Spender ausführlich Ziel und Zweck der Studie, wurden alle über geltende Datenschutzrichtlinien eventuelle Risiken der Teilnahme Hand und an eines Informationsbogens und eines persönlichen Gespräches aufgeklärt. Die Durchführung der Probandenstudie erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission der Georg-August-Universität Göttingen sowie schriftlicher Einwilligung der Probanden.

Den Studienteilnehmern wurden ca. 60 ml peripher-venöses Blut aus einer Kubitalvene entnommen. Dabei dienten 6 x 9 ml Blut in Heparin-Monovetten zur Zellgewinnung, welche etwa 20 min nach Blutentnahme begann. Zudem wurden 2 x 2,5 ml Blut in EDTA-Monovetten zur späteren DNA-Analytik bei -20°C eingefroren. Zudem wurde mit 2,5 ml EDTA-Blut ein Differentialblutbild (durch die Abteilung Klinische Chemie der UMG) erstellt.

## 3.3 Gewinnung von Leukozyten-Subfraktionen

Es sollten für diese Studie aus dem venösen Blut T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>), B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup>), Monozyten (CD14<sup>+</sup>) und NK-Zellen (*natural killing cells*, CD56<sup>+</sup>) isoliert werden. Diese stellen Subpopulationen der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs: *peripheral mononuclear blood cells*) dar. Zunächst mussten über eine Dichtegradienten-Zentrifugation die PBMCs aus dem Blut gewonnen werden, welche dann im nächsten Schritt mittels durchflusszytometrischer Sortierung in die einzelnen gewünschten Fraktionen zu trennen waren.

#### 3.3.1 Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Gewinnung der PBMCs aus den heparinisierten Vollblutproben wurde Ficoll Paque Plus eingesetzt. Bei Ficoll handelt es sich um eine pH-neutrale Lösung eines stark verzweigten Polysaccharids aus Sukrose und Epichlorhydrin. Auf Grund der Dichte von 1,077 g/ml kann es zur Isolierung von PBMCs eingesetzt werden, die sich an der Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll ansammeln.

In zwei 50-ml-Zentrifugenröhrchen wurden zunächst mit einer sterilen Einmalpipette jeweils 23 ml Blut mit gleichem Volumen RPMI-Medium vereinigt und gut durchmischt. In weiteren sechs 50-ml-Röhrchen wurden 15 ml Ficoll vorgelegt und anschließend mit jeweils 15 ml des Blut-Medium-Gemisches vorsichtig überschichtet. Nachfolgend wurde 30 min bei 500 g zentrifugiert (mit geringer Beschleunigung und ohne Bremse). Die zellulären Blutbestandteile sedimentieren zunächst in Richtung der Trennschicht zwischen Blut und Ficoll. Durch das Ficoll wird den Erythrozyten und Granulozyten an der Grenzschicht osmotisch Wasser entzogen, woraufhin diese aggregieren und auf Grund der höheren Dichte gegenüber Ficoll sedimentieren. Durch ihre geringere Dichte können PBMCs nicht in das Ficoll eintreten und lagern sich während der Zentrifugation als Zellring auf der Trennschicht ab. Dieser Zellring, auch als *buffy coat* bezeichnet, wurde mit einer sterilen 3,5-ml-Einwegpipette in ein neues

50-ml-Röhrchen überführt. Durch zwei anschließende Waschschritte zunächst in PBS-Puffer und dann in HBSS-Medium (2% FCS) sollte verbliebenes Ficoll und Serum möglichst vollständig entfernt werden. Dabei war im Sinne einer guten Zellausbeute wichtig, dass durch die Waschlösung eine ausreichende Verdünnung erreicht wurde und sich beim Zentrifugieren möglichst viele Zellen im Pellet sammelten (andernfalls könnten bei nicht ausreichend verdünntem Ficoll wegen dessen Dichte viele Zellen nicht pelletiert werden). Deshalb konnten nicht alle sechs abgenommenen Zellringe in einem Röhrchen gewaschen werden, sondern wurden dafür auf zwei Röhrchen aufgeteilt. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt mit HBSS wurde der Überstand bis auf 0,5 ml Restvolumen abgesaugt, dann 1 ml LM-10% zugefügt und das Pellet resuspendiert.

#### 3.3.2 Separation im Durchflusszytometer

Um aus den gewonnenen PBMCs mittels Durchflusszytometrie die gewünschten Subpopulationen zu isolieren, mussten diese zuvor mit entsprechenden Antikörpern markiert werden. T-Lymphozyten wurden mittels CD3-Antikörper (mit Fluoreszenzfarbstoff APC gekoppelt), B-Lymphozyten über CD19 (mit PE), Monozyten über CD14 (mit PerCP-5.5) und NK-Zellen über CD56 (mit FITC) detektiert. Diese Antikörper wurden dem PBMC-Gemisch in einer zuvor ausgetesteten Konzentration zugegeben und für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurden diesen Proben noch 2 ml LM-2% zugegeben und dann steril in ein 5-ml-Röhrchen filtriert (Einmalfilter mit Porengröße 50 µm) und anschließend der Filter noch mit 1 ml LM-2% gespült. Nun befanden sich etwa 4,5 ml in dem 5-ml-Röhrchen. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation bei 500 g für 5 min an. Von diesem Überstand wurden zur Aufkonzentrierung der Zellen 3 ml vorsichtig entnommen und das Pellet in den verbleibenden 1,5 ml resuspendiert.

Nun folgte die durchflusszytometrische Sortierung mit einem FACS Aria II in der Abteilung Hämatologie und Onkologie an der UMG. Durchflusszytometrie ermöglicht es, Zellen in Hinblick auf Größe, Granularität und weitere Eigenschaften (z.B. an Oberflächen-Antigene bindende Fluoreszenz-markierte Antikörper) zu charakterisieren und aufzutrennen. Während der FACS-Analyse werden die Farbstoffmarkierungen zur Lichtemission angeregt. Spezifische Filter und Photodetektoren registrieren selektiv die Emissionswellenlänge des Fluoreszenz-Farbstoffs, durch welche eine Auftrennung ermöglicht wird. Die hier verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe haben Maxima der Exzitations-/Emissionswellenlängen von 488/518 nm (FITC), 488/575 nm (PE), 488/690 nm (PerCP-Cy5.5) und 633/660 nm (APC). Die sortierten Zellen wurden in zuvor mit 300 µl FCS befüllte, auf Eis gekühlte 5-ml-Röhrchen gesammelt. Nach der Sortierung wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zellen derselben Subpopulation wurden vereinigt und für 10 min bei 500 g zentrifugiert. Zur Einstellung der Zelldichte dienten die bei der Durchflusszytometrie ermittelten Zellzahlen. Für alle weiteren Messungen wurden die CD3-positiven und CD19positiven Fraktionen jeweils auf 1\*10<sup>6</sup> Zellen/ml, die CD14-positiven auf 1\*10<sup>5</sup> Zellen/ml und für die CD56-positiven auf 2,5\*10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt.

## 3.4 Zellbehandlung

### 3.4.1 Behandlung von LCLs

Davon wurden auf einer sterilen 6-Well-Platte 3,9 ml Zellsuspension mit 10<sup>6</sup> Zellen/ml in jedes Well ausgebracht. Die Zellen eines Wells wurden mit TGFβ1 in einer Endkonzentration von 5 ng/ml versetzt und die Platte 16 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO2 inkubiert. Vor der Bestrahlung wurden 4 der 5 nicht mit TGFβ1 vorbehandelten Wells als Doppelansatz entsprechend Tab. 3 auf eine 12-Well-Platte transferiert. Von diesen acht Wells dienten vier als Kontrolle, je zwei wurden mit TGFβ1 und IL10 jeweils ad 5 ng/ml behandelt. Die auf der 6-Well-Platte verbliebenen Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt und danach ebenfalls auf die 12-Well-Platte in je zwei Parallelansätzen gebracht (untere Reihe in Tab. 3) und anschließend im Brutschrank weiter kultiviert. Vier und 24 h später wurden je Well 800 μl Suspension zur RNA-Gewinnung entnommen, wobei jeweils die beiden Parallelansätze vereinigt wurden. Zudem wurde zum 24-Stundenzeitpunkt der unten beschriebene Caspase-Glow-Assay durchgeführt. Vitalitätskontrollen erfolgten mittels FACS und AlamarBlue nach 30 h.

<u>K1-a</u>	<u>K1-b</u>	<u>K2-a</u>	<u>K2-b</u>
1500 µl Zellen	1500 µl Zellen	1500 µl Zellen	1500 µl Zellen
IL10-a	<u>IL10-b</u>	<u>T-a</u>	<u>T-b</u>
1500 µl Zellen	1500 µl Zellen	1800 µl Zellen	1800 µl Zellen
+ IL10 ad 5ng/ml	+ IL10 ad 5ng/ml	+ TGFβ1 ad 5ng/ml	+ TGFβ1 ad 5ng/ml
<u>(3Gy-a)</u>	(3Gy-b)	(T+3Gy-a)	(T+3Gy-b)

Tab. 3 Belegung der 12-Well-Platte für die Versuchsreihe mit den LCLs.

#### 3.4.2 Behandlung von Leukozyten-Subpopulationen

Mit allen sortierten Zellpopulationen der Probanden sollten die durch PMA stimulierbare NADPH-Oxidase-Aktivität (als "Nativproben" bezeichnet) sowie die basale Expression von Genen für die Untereinheiten dieses Enzyms gemessen werden (siehe unten). Zusätzlich sollten entsprechende Messungen für die T-Lymphozyten auch nach Behandlung mit unterschiedlichen Zytokinen durchgeführt werden. Dazu wurden je 900 µl dieser Zellen (10<sup>6</sup> Zellen/ml) auf einer sterilen 12-Well-Platte ausgebracht. In parallelen Doppelansätzen wurden

insgesamt sechs unterschiedliche Behandlungen vorgenommen: Kontrolle ohne weitere Intervention, Bestrahlung mit 2 Gy sowie Inkubation mit den humanen rekombinanten Zytokinen IL10, IL1 $\beta$ , TGF $\beta$ 1 sowie mit einem TGF $\beta$ -neutralisierenden Antikörper (nachfolgend kurz "anti-TGF $\beta$ " genannt). Die Bestrahlung mit 2 Gy erfolgte in der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der UMG an einem Bestrahlungsgerät (Xstrahl RS225). Es wurden Röntgenstrahlen mit 6 MeV eingesetzt (Dosisrate 1 Gy/min). Die Zugabe der Zytokine erfolgte in einer Endkonzentration von je 5 ng/ml. Es schloss sich für alle Platten eine Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und relativer Luftfeuchte von 70% an. Nach 24 h wurde für jedes Well in Doppelbestimmung (somit in Vierfachbestimmung pro Behandlung) eine Lumineszenz-Messung (Kinetik über 90 min) durchgeführt sowie RNA-Proben asserviert.

#### 3.5 Nachweis von ROS

in LCLs experimiert. NADPH-Oxidase ist Die Expressionsstärke beträgt nach Literaturangaben jedoch nur 5% verglichen mit derjenigen in neutrophilen Granulozyten (Chetty et al. 1995). Es sollte in den 48 LCL-Linien die Auswirkung unterschiedlicher Behandlungen (Bestrahlung, Zytokine) auf die ROS-Produktion quantifiziert werden. In der Literatur ist die Durchführbarkeit eines Cytochrom-C-Assays zur Messung von Superoxid beschrieben (Cohen-Tanugi et al. 1991). Für meine Arbeit wurde dieses Verfahren sowie Assays basierend auf Lumineszenz (mit Nachweisreagenz L-012) und Fluoreszenz (mit Dihydroethidium) im Mikroplattenmaßstab ausgetestet. Einzelne Proben wurden zur Kontrolle mittels ESR gemessen (mit CMH, (Dikalov et al. 2007)). Außerdem wurde durch FACS-Analysen die Oxidation von intrazellulär aktiviertem DCFH-DA quantifiziert. Letzteres weist vornehmlich Wasserstoffperoxid nach. Ein allgemein ak zeptiertes Verfahren, durchflusszytometrisch mit einer singulären Substanz Superoxid nachzuweisen, gibt es nach gegenwärtigem Literaturstand nicht.

Für die Probandenstudie wurde zur Detektion von ROS das Luminophor L-012 verwendet. Bei L-012 handelt es sich um ein hoch empfindliches Nachweismittel für extrazelluläre Superoxid- und Peroxynitritteilchen. Bei der chemischen Reaktion dieser Teilchen mit dem Luminophor L-012 zerfällt dieses unter Abgabe von Lichtquanten, welche gemessen werden können (Daiber et al. 2004). Auf diese Weise werden reaktive Sauerstoffverbindungen als Momentensignal ohne Akkumulation detektiert.

Alle Messungen erfolgten mit PBS-Puffer, welcher mit 5mM Glukose versetzt war. Daraus wurde eine Messlösung mit 100 µM L-012 und mit PMA ad 10 ng/ml zur Stimulation der NADPH-Oxidase zugesetzt. Parallele Ansätze enthielten zusätzlich noch DPI in einer

Konzentration von 10 µM, welches Flavin-abhängige Enzyme wie NADPH-Oxidase hemmt. Durch Subtraktion der Ansätze ohne und mit DPI kann der Anteil der NADPH-Oxidase näher spezifiziert werden. Allerdings liegt hier keine vollständige Spezifität vor, da es noch andere Flavin-abhängige Reaktionen gibt.

Je 200 µl Reaktionslösung wurden auf einer weißen 96-Well-Platte (in Dreifachbestimmung für die Nativproben und Doppelbestimmung für behandelte Proben) ausgebracht und jeweils 22,2 µl Zellsuspension von der 12-Well-Platte 24 h nach Beginn der entsprechenden Behandlungen dazugegeben. Mit den oben genannten Zelldichten ergaben sich somit Gesamtzellen pro Well von 22000 (CD3<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>), 2200 (CD14<sup>+</sup>) und 55000 (CD56<sup>+</sup>). Diese Zellzahlen wurden durch Vorexperimente optimiert. Für diese Reaktionsansätze wurde nach gutem Durchmischen die Lumineszenz im Plattenmessgerät Tecan Ultra über einen Zeitraum von 90 min bei 37°C gemessen. Zur Verbesserung der Versorgung mit Sauerstoff wurde vor und zwischen den Messzyklen für fünf Sekunden leicht geschüttelt. Die Detektion der Lichtsignale erfolgte bei einer Wellenlänge zwischen 530 und 570 nm. Alle gemessenen Daten wurden durch das Programm X-Fluor aufgezeichnet mit einer Integrationszeit der Datenerfassung von 1 s pro Well.

## 3.6 Zellvitalitätsmessungen

#### 3.6.1 AlamarBlue-Assay

Die Zellvitalität nach Behandlung der LCLs und der Leukozyten-Subpopulationen wurde mit dem AlamarBlue-Assay gemessen. Hierbei handelt es sich um die wässrige Lösung eines ungiftigen Indikators, welcher durch Elektronenaufnahme in den Mitochondrien einen Farbumschlag von dunkelblau (Resazurin, oxidierte Form) nach rot (Resorufin, reduzierte Form) bewirkt. Letzteres wird fluorometrisch quantifiziert: je stärker das Signal, desto vitaler die Zellen.

Je Ansatz wurden pro Well der 12-Well-Platte in Doppelbestimmung 100 µl LCL-Suspension (unmittelbar vor Entnahme gut durchmischt) auf eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte mit klarem Boden übertragen und mit 10 µl AlamarBlue versetzt. Anschließend erfolgte eine 90minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO2. Die Messung der Alamar Blue-Fluoreszenz erfolgte mittels Fluorometer (Tecan Ultra) bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 612 nm. Mittels der Software XFLUOR wurden die Daten in EXCEL-Makros gespeichert.
### 3.6.2 Zellvitalitätsmessungen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse (FACS) erlaubt es, bestimmte Eigenschaften von Zellen über Fluoreszenz-Detektion zu messen. So kann z.B. die Vitalität von Zellen mit Annexin (als ein Marker der Apoptose) oder mit Propidiumiodid (als ein Marker der Nekrose) bestimmt werden. Aus früheren Studien der Abteilung Klinische Pharmakologie war bekannt, dass bei LCLs 24-48 h nach einer zytotoxischen Behandlung Apoptose- und Nekrosemarker sehr stark korreliert sind (Kuschel 2012). Wegen der einfacheren Handhabbarkeit von Propidiumiodid (keine speziellen Bindungspuffer erforderlich) wurde dieses hier zur Detektion der Zellvitalität verwendet. Dessen Anregung findet bei einer Wellenlänge von 488 nm statt. Das Emissionsspektrum besitzt eine relativ weite Spanne zwischen 575 und 620 nm. Da andere, interferierende Färbesubstanzen in diesem Bereich nicht gemessen wurden, konnten die Messungen problemlos erfolgen.

#### 3.6.3 Caspase-Assays

Während der Apoptose wird über einen mitochondrialen Weg oder über die Aktivierung eines Liganden-Rezeptorkomplexes eine Proteasekaskade induziert. Als Endstrecke dieser Signalwege erfolgt die Aktivierung der zu den Cysteinproteasen gehörenden Caspasen. Diese erkennen innerhalb einer polypeptidischen Sequenz spezifisch Asparaginsäurereste, hinter denen die Spaltung von Substrat-Proteinen einsetzt. Dabei werden u.a. Nukleasen aktiviert und es kommt nachfolgend zur DNA-Fragmentierung. Die Bestimmung der Apoptoserate in dieser Arbeit erfolgte über die Enzymaktivität der Effektor-Caspasen 3/7 mittels des Caspase-Glo<sup>®</sup>-3/7-Assays von Promega. Hierbei wird als luminogenes Substrat Amino-Luciferin eingesetzt, welches über den Aminoterminus mit einer tetrapeptidischen Sequenz (DEVD-Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat) verbunden ist. Folglich wird Amino-Luciferin freigesetzt. Dieses kann durch das in der Lösung enthaltene thermostabile Enzym Luciferase umgesetzt werden, so dass ein Lichtsignal resultiert. Das freigesetzte Lumineszenzsignal ist proportional zur Aktivität der Caspasen.

Jeweils 10 µl der Zellsuspensionen wurden 24 h nach Behandlung auf einer weißen 96-Well-Platte ausgebracht. Nach Zugabe von 10 µl Substratlösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert und anschließend die Lumineszenz im Tecan-Ultra-Gerät gemessen.

# 3.7 Genexpression

In dieser Arbeit sollte der Expressionszustand von Untereinheiten der NADPH-Oxidase in lymphoblastoiden Zelllinien sowie in isolierten Subpopulationen des peripheren Blutes quantitativ bestimmt werden.

#### 3.7.1 RNA-Asservierung

Grundsätzlich wurden alle Proben zur späteren RNA-Analytik in RLT-Puffer (aus dem RNeasy Mini Plus Kit der Firma Qiagen, noch versetzt mit  $\beta$ -Mercaptoethanol *ad* 1%) aufgenommen.

Sofort nach Sortierung wurden Proben zur Bestimmung des Expressionszustandes unbehandelter Aliquots der vier Subpopulationen gewonnen. Zusätzlich wurden nach 24 h Inkubation bei 37°C für die sechs unterschiedlichen Behandlungen der T-Lymphozyten (siehe 3.4) entsprechende Proben asserviert. Hierbei wurden 600 µl Zellsuspension aus beiden Parallelansätzen in ein 5-ml-Röhrchen überführt, mit sterilem PBS-Puffer aufgefüllt und bei 500 g 7 min (bei RT) zentrifugiert. Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstands wurde 350 µl RLT-Puffer zugegeben. Alle Proben wurden in vorbeschriftete 2-ml-Eppendorf-Cups überführt, für weitere 5 Minuten bei RT inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Mit den behandelten LCL-Proben wurde nach 4 h Inkubation in analoger Weise verfahren.

#### 3.7.2 Isolation und Quantifizierung von RNA

Zur Bestimmung des Expressionszustandes der interessierenden Zielgene in Nativproben von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Monozyten sowie in behandelten T-Lymphoyzten musste zunächst die RNA isoliert werden. Bezüglich der NK-Zellen (CD56+) war die Zellausbeute sehr gering, so dass auf eine Isolierung von RNA hier verzichtet wurde.

Da RNA sehr empfindlich gegenüber abbauenden RNasen ist, müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Zur Isolierung der RNA mussten möglichst RNasefreie Bedingungen vorliegen, um eine enzymatische Degradation von RNA zu vermeiden. Vor Präparationsbeginn wurden der Arbeitsplatz sowie Pipetten, Spitzenbehälter und Handschuhe mit einer RNase-inaktivierenden Lösung (RNase-Zap) übersprüht. Die auf -80°C gelagerten Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut. Die nachfolgende Isolierung erfolgte unter Benutzung des RNeasy-Plus-mini-Kit sowie des QiaCUBE-Roboters von der Firma Qiagen. Es wurde nach Herstelleranleitung verfahren, wobei grundsätzlich ein Protokoll mit Entfernung genomischer DNA verwendet wurde (RNeasy mini plus, Firma Qiagen). Anschließend erfolgte die Messung der RNA-Konzentration spektrophotometrisch bei 260 nm mit einem Biophotometer der Firma Eppendorf. Für die Quantifizierung wurde es mit einer für den Mikroliter-Bereich konzipierten Messzelle (LabelGuard<sup>™</sup>, Firma Implen) versehen. Absorptionsmaxima für Nukleinsäuren liegen im Bereich von 260 nm, jene von Proteinen bei etwa 280 nm. Über den Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> kann eine Aussage über das Maß einer Verunreinigung mit Protein und somit über die Qualität der RNA-Probe getroffen werden. Dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Es wurde darauf geachtet, dass die isolierten RNA-Proben während der Quantifizierung auf Eis lagerten. Danach wurden sie bei -80°C eingefroren.

### 3.7.3 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Üblicherweise erfolgt die Quantifizierung von RNA über PCR-basierte Verfahren mit DNA. Demnach muss zuvor die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Standardmäßig wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Das Volumen an RNA-haltiger Probe wurde mit 1 µl dN6 Random-Primer und H<sub>2</sub>O auf 18,5 µl ergänzt. Random-Primer sind 6 Basenpaar-lange Oligonukleotide jedweder Basenkombination. Damit sollen alle RNA-Sequenzen erfasst und zu cDNA umgeschrieben werden. Dieser Ansatz wurde zur Denaturierung der RNA für 10 min bei 72°C im Thermocycler inkubiert und danach sofort auf Eis gebracht. Dadurch soll die Anlagerung der Random-Primer gegenüber der Ausbildung von RNA-Tertiärstrukturen begünstigt werden.

Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden je 11,5 µl eines Mixes aus Puffer, DTT, dNTPs, einem RNase-Inhibitor sowie dem Enzym SuperScript<sup>™</sup>-II-Reverse-Transkriptase (Firma Invitrogen) dazugegeben. Zur reversen Transkription wurden diese Ansätze dann bei 42°C für 60 min im Thermocycler inkubiert. Dabei sollte man bedenken, dass die Effizienz dieser Reaktion sehr variabel sein kann, weshalb eine Normierung der Messergebnisse auf Referenzgene erforderlich ist.

Im Anschluss wurden die Proben mit TE-Puffer auf 2 ng/ml cDNA eingestellt und auf 96-Well-Platten verteilt. Mit diesen Platten wurden dann die quantitativen *Real-time*-PCR-Messungen durchgeführt.

## 3.7.4 Quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR)

Das Funktionsprinzip der *Real-time*-PCR beruht auf einer PCR, wobei die Produktzunahme während der Elongationszyklen direkt durch Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes gemessen wird. In der linearen Phase der Amplifikation verhält sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des PCR-Produktes. In diesem Bereich wird eine bestimmte

Signalstärke festgelegt und die Anzahl der dafür erforderlichen PCR-Zyklen für jede Probe bestimmt (sogenannte *cycle threshold*, kurz Ct-Wert genannt). Dadurch wird eine quantitative Aussage über die in einer Probe ursprünglich vorhandene RNA-Kopienzahl des gemessenen Gens möglich.

In dieser Arbeit wurde ein direkt verwendbarer Mastermix der Firma USB benutzt, welcher als Nachweisreagenz SYBR<sup>®</sup>-Green enthält. Spezifische Primerpaare wurden von der Firma MWG (Ebersberg) in Auftrag synthetisiert. Bei einigen wenigen Genen konnte auf diese Weise keine befriedigende qRT-PCR-Reaktion erzielt werden. In diesen Fällen wurden bereits etablierte Primerpaare der Firma Qiagen eingesetzt. Als Qualitätskriterien wurden eine gute Effizienz und Spezifität gefordert. Erstere wurde über eine Eichgerade aus einer gepoolten und seriell verdünnten Probe ermittelt. Die Spezifität wurde für jede gemessene Probe über eine Schmelzkurvenanalyse direkt im Anschluss an die qRT-PCR durchgeführt, beispielhaft dargestellt in Abb. 3. Dabei sollte in der Ableitung des Fluoreszenzsignals nur ein Peak zu sehen sein. Während der Etablierungsphase eines Assays wurden zudem über eine Agarose-Gelelektrophorese Nebenprodukte ausgeschlossen. Im Unterschied zu Sondenassays sind diese Kontrollen hier von besonderer Bedeutung, da sich das verwendete Nachweisreagenz SYBR<sup>®</sup>-Green Sequenz-unspezifisch in DNA-Doppelstränge einlagert.



Abb. 3 Schmelzpunktkurve nach qRT-PCR am Beispiel des Assays für das NCF2-Gen.

Um messtechnische Variabilitäten so gering wie möglich zu halten, wurden alle Proben einer Messreihe für jedes zu analysierende Gen einzeitig auf einer Platte gemessen. Zunächst wurde eine Mischung aus dem 2- fach konzentrierten Reaktions-Mastermix, den spezifischen Primern (Endkonzentration 200 nM) und H<sub>2</sub>O hergestellt und davon je 7 µl auf einer 384-Well-Platte vorgelegt. Es folgte die Zugabe von 3 µl cDNA der zu messenden Proben in Form von Doppelbestimmungen mittels 8-Kanal-Pipette. Zur Messung wurde die 384-Well-Platte mit einer Fluoreszenzlicht-durchlässigen Folie verschlossen. Jede einzelne Zeile und Spalte wurde mittels eines Kantstückes sorgfältig nachgezogen, um ein Verdampfen der Proben zu unterbinden. Die Platte wurde kurz abzentrifugiert und die qRT-PCR im Messgerät ABI 7900HT (Firma Applied Biosystems) gestartet. Jede Reaktion begann mit einer initialen Aktivierung der durch Antikörper geblockten Polymerase bei 95°C für 2 min. Die anschließenden PCR-Zyklen setzten sich aus einer Denaturierung bei 95°C für 15 s sowie variablen Bedingungen für das Annealing und die Elongation zusammen (siehe Tab. 4). Die Fluoreszenzdetektion erfolgte während der Elongationsphase. Zur Messung der abschließenden Schmelzpunktkurve wurde die Platte im Messgerät auf 95°C für 15 s erhitzt, dann auf 60°C für 15 s abgekühlt und dann mit minimaler ramp rate (2%) bis auf 95°C erhitzt. Während dieses letzten Schrittes wurde das Fluoreszenz-Signal gemessen. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software SDS 2.1.

In dieser Arbeit sollte die mRNA-Expressionsstärke der NADPH-Oxidase-Untereinheiten CYBA, CYBB, NCF2, NCF4 und RAC2 sowie der Referenzgene GAPDH, HPRT1, SDHA, UBC und YWHAZ gemessen werden. Die Amplifikation der Referenzgene musste wie die der Zielgene spezifisch sein und sollte eine ähnlich Effizienz haben. Zur Normierung der unterschiedlich exprimierten Zielgene wurde ein gewichtetes Mittel aus Referenzgenen gebildet, welche einen weiten Bereich an Expressionsstärken abdecken.

Gen	Annealing	Elongation	Zyklen	Produktlänge	ePrimer, vorwärts	Primer, rückwärts	Quelle
BAX	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	143 bp	GCGAGTGTCTCAAGCGCATC	CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGAA	1
BCL2	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	97 bp	ACATCGCCCTGTGGATGACT	GGGCCGTACAGTTCCACAAA	2
CYBA	60°C, 30 s	72°C, 60 s	40	341 bp	CGCTGGCGTCCGGCCTGATCCTCA	ACGCACAGCCGCCAGTAGGTAGAT	3
CYBB	55°C, 30 s	72°C, 60 s	40	403 bp	GCTGTTCAATGCTTGTGGCT	TCTCCTCATCATGGTGCACA	4
FAS	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	196 bp	CCTACCTCTGGTTCTTACGTCT	GTCCCTAGCTTTCCTTTCACC	5
GAPDH	60°C, 30 s	72°C, 60 s	40	407 bp	CCCTTCATTGACCTCAACTACAT	ACGATACCAAAGTTGTCATGGAT	6
HPRT1	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	93 bp	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	6
NCF2	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	125 bp	GGATGCCTTCAGTGCCGT	TGTCTCGGTTAATGCTTCTGGTAA	7
NCF4	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	147 bp	nicht verfügbar*	nicht verfügbar*	
SDHA	60°C, 30 s	72°C, 60 s	40	269 bp	CCCGAGGTTTTCACTTCACTGT	CCAGTTGTCCTCCTCCATGTTC	8
SOD1	55°C, 30 s	72°C, 60 s	40	177 bp	AGGGCATCATCAATTTCGAGC	GCCCACCGTGTTTTCTGGA	5
UBC	60°C, 20 s	72°C, 40 s	45	123 bp	CGGTGAACGCCGATGATTAT	ATCTGCATTGTCAAGTGACGA	8
YWAHZ	Z60°C, 20 s	72°C, 30 s	40	94 bp	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT	9

Tab. 4 PCR-Bedingungen für die einzelnen Gene der qRT-PCR. \*In diesem Fall wurde ein Primerpaar der Firma Qiagen mit der Assay-Nummer QT00077847 verwendet. Die Literaturquellen für die Primersequenzen sind: <sup>1</sup>(Xu et al. 2008), <sup>2</sup>(Steger et al. 2008), <sup>3</sup>(Kim et al. 2005), <sup>4</sup>(Morawietz et al. 2006), <sup>5</sup>(Wang X und Seed 2003), i.e. PrimerBank (<u>http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html</u>), <sup>6</sup>(Calcagno et al. 2006), <sup>7</sup>(Barker et al. 2005), <sup>8</sup>(Cicinnati et al. 2008), <sup>9</sup>(Szardening-Kirchner et al. 2009).

## 3.8 Bestimmung von Genvarianten

### 3.8.1 Isolierung und Quantifizierung genomischer DNA

Jedem Probanden wurde eine 2,7-ml-Blutprobe zur Aufreinigung von DNA entnommen, die bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert wurde. Die Isolierung wurde mit Hilfe des BioRobot EZ1 von Qiagen unter Verwendung des Isolations-Kit für DNA-Blut (350  $\mu$ l) von Qiagen nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die DNA-Menge wurde anhand der optischen Dichte mit dem Photometer gemessen. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml. Anschließend wurde eine 96-Well-Platte angelegt, wobei jede DNA-Probe auf 10 ng/ $\mu$ l in Wasser verdünnt wurde. Mit diesen Platten konnte später zeitsparend mit 8-Kanal-Pipetten gearbeitet werden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

#### 3.8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR können *in vitro* bestimmte Abschnitte der DNA um viele Zehnerpotenzen vervielfältigt werden. Im Idealfall erfolgt pro Zyklus eine Verdopplung der DNA-Stränge. Bei typischerweise 35 Zyklen entspräche das einer Amplifikation um etwa 30 Milliarden Moleküle. Der klassische Reaktionsansatz enthält Reaktionspuffer, Nukleotide mit den vier unterschiedlichen Basen, die beiden spezifischen Oligonukleotidprimer, eine thermostabile DNA-Polymerase und Template-DNA. Zur Verbesserung der Amplifikation von GC-reichen Regionen können Zusätze wie etwa die Q-Solution der Firma Qiagen verwendet werden. Die zyklische Abfolge von Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation) gilt als das Hauptprinzip einer PCR. Initial ist noch ein Denaturierungsschritt bei 95°C vorgeschaltet. Am Ende schließt sich eine 10-minütige Elongationsphase an, um nicht komplett synthetisierte Fragmente aus der PCR-Reaktion zu vervollständigen. Die Spezifität einer PCR wird durch die Sequenz der Primer bestimmt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden manuell unter Zuhilfenahme des Programms OLIGO ausgewählt. Eine Auflistung aller verwendeten Primer findet sich am Ende dieses Kapitels. Die PCR-Bedingungen (optimale Annealing-Temperatur, mit oder ohne Q-Solution) wurden über eine Gradienten-PCR ermittelt. Für diese Arbeit musste ein Fragment (F8, siehe Primertabelle Tab. 8 S.36-38) mit besonders hohem GC-Gehalt in klassischer Weise als Einzel-PCR durchgeführt werden (Pipettierschema siehe Tab. 5 S. 34). Als optimale Annealing-Temperatur waren für dieses Fragment 63°C ermittelt worden. Alle anderen Fragmente konnten im Multiplex-Verfahren amplifiziert werden. Dazu wurde ein Mastermix der Firma Qiagen verwendet, der eine gleichzeitige Vervielfältigung von bis zu 25 PCR-Fragmenten in einer Reaktion ermöglicht (Pipettierschema siehe Tab. 6). Als Annealing-Temperaturen wurden für beide Multiplex-PCRs 64,8°C bestimmt, indem die Produkte einer Gradienten-PCR im Temperaturintervall von 57 bis 70°C durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert wurden.

	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10 x PCR Puffer	1,2 µl	1 x
Q-Solution (5x)	2,4 µl	1 x
dNTP (10mM)	0,24 µl	0,2 mM
Primer-forward (100 µM)	0,06 µl	0,5 μM
Primer-reverse (100 µM)	0,06 µl	0,5 μM
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,06 µl	0,025 U/µl
ddH <sub>2</sub> O	5,98 µl	
Total	10 µl	
Genomische DNA	2 µl	

Tab. 5 Pipettierschema für Einzel-PCR

	Volumen/Reaktion
Mastermix	6 µl
Q-Solution (5x)*	1,2 µl
Primer-Pool 1	1,2 µl
Primer Pool 2	1,2 µl
ddH <sub>2</sub> O	1,6 µl

Tab. 6 Pipettierschema der hier verwendeten Multiplex-PCR. \* Die Q-Solution ist dieselbe wie bei der Einzel-PCR, wird bei der Multiplex-PCR aber 1:10 eingesetzt. Es wurden für alle Proben zwei solcher Multiplex-PCRs mit je zwei Primer pools durchgeführt. In den Primer pools (siehe Tab. 8) lag jeder Primer in einer Konzentration von 2 µM vor.

## 3.8.3 Genotypisierung mittels Primerextension (SNaPshot)

In dieser Arbeit wurden insgesamt 48 SNPs in fünf Genen für Untereinheiten der NADPH-Oxidase über die Methode der Primerextension bestimmt. Das Funktionsprinzip beruht darauf, dass zunächst der die interessierende Stelle flankierende Genombereich durch PCR amplifiziert wird. Danach müssen nicht eingebaute Primer und dNTPs degradiert werden. Dies erfolgte hier enzymatisch mit Exonuklease 1 (Exo1) bzw. alkalischer Phosphatase (SAP), welche zusammen mit den PCR-Produkten für 3 h bei 37°C inkubiert wurden. Dabei wurden pro Probe je 4  $\mu$ l eines Verdau-Mixes (0,8  $\mu$ l SAP-Puffer, 0,94  $\mu$ l Exo1 mit 10 U/ $\mu$ l und 2,26  $\mu$ l SAP mit 1 U/ $\mu$ l) vorgelegt und je 4  $\mu$ l Produkt aus den beiden Multiplex-PCRs zugegeben. Dann wurden die Enzyme bei 80°C für 15 min inaktiviert. Bei der nun folgenden SNaPshot-Reaktion findet eine Einzelbasenverlängerung am 3'-Ende eines direkt neben der polymorphen Stelle bindenden Primers statt. Hierbei handelt es sich um Fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs (siehe Tab. 7), denen am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe fehlt, weshalb keine weitere Elongation möglich ist. Es wird jeweils ein ddNTP komplementär zum vorliegenden Allel des Polymorphismus angelagert. Über die Fluoreszenzfarbstoffmarkierung kann das vorliegende Allel in einem Sequenziergerät bestimmt werden. Auf diese Weise können mehrere polymorphe Stellen in einer Reaktion nachgewiesen werden, wenn die zu extendierenden Primer unterschiedliche Längen haben und dadurch mittels Kapillarelektrophorese getrennt werden können. Die Sequenz dieser SNaPshot-Primer ist am Ende dieses Kapitels aufgeführt. Dabei wurden diejenigen Primer in einem Pool zusammengefasst, die gemeinsam in einem Elektropherogramm analysiert wurden.

Jede SNaPshot-Reaktion bestand aus 5 µl Gesamtvolumen. Zunächst wurden pro Probe 3 µl eines Reaktionsmixes bestehend aus 2 µl ddH<sub>2</sub>O, 0,5 µl SNaPshot-Mastermix (Applied Biosystems) und 0,5 µl gepooltem Primermix (10-fach konzentriert) vorgelegt. Die Konzentration der Primer in diesem Mix variierte zwischen 2 und 15 µM und wurde jeweils der Signalstärke angepasst. Dazu kamen 2 µl des aufgereinigten PCR-Produktes. Die SNaPshot-Reaktion wurde in einem 384-Well-Thermocycler nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine kleine Ergänzung bestand darin, dass ein initialer Denaturierungss chritt bei 95°C für 2 min vorgeschaltet wurde und die Platte erst in das Gerät gestellt wurde, nachdem der Heizblock diese Temperatur erreicht hatte. Danach schloss sich eine zweite Aufreinigung mit SAP (pro Probe 1 µl einer 1:1-Mischung aus SAP-Puffer und SAP mit 1 U/µl) an. Dabei sollten nicht verbrauchte ddNTPs, die durch Nebenreaktionen zu unspezifischen Signalen führen könnten, entfernt werden. Nach Zugabe wurde der Ansaz bei 37°C für ca. 30 min im Wärmeschrank inkubiert. Sofern eine Weiterbenutzung des Ansatzes am gleichen Tag erfolgte, konnte auf eine Hitzeinaktivierung des Enzyms verzichtet werden.

ddNTP	Fluoreszenzfarbstoff	Farbe
А	dR6G	grün
С	dTAMRA <sup>TM</sup>	schwarz
G	dR110	blau
Т	dROX <sup>TM</sup>	rot

Tab. 7 Fluoreszenz-Markierungen der verwendeten ddNTPs für die SNaPshot<sup>™</sup>-Reaktion.

<i>Gen</i> rs-Nummer	PCR-Primer, vorwärts (5'->3')	PCR-Primer, rückwärts (5'->3')F	L (bp	) PP	SNaPshot-Primer (5'->3')	SP
CYBA						
rs3736112	GCTGCCGCAGGTGTGAGAACA	GTGCAGGTGAGCGCTGAGAAGAAG	185	2	(GACT) 7AGAGGCTGAGGGCAGAGC	D
rs8854	ACCGAGGCTCTGCCAGTTCTCA	CAGGGCCTCAAATCCTGGATGAC	346	2	GGAGCTAGGGAGCGGATGT	Ε
rs9932581	GGAAACCACCAAGTGCCTCGGATGG <sup>1</sup>	TCTGCACCCTGATGCTACCAAGGAC <sup>1</sup>	664	4	(CTGA) 5CTCCATGGGGAATAAACCAGCATT	А
rs16966671	"	"	"	4	(GACT) 7TCTGAGTGACCCTGGCACCT	А
rs72811418	"		"	4	(TGAC) 9TCGTCACGTCCGGCCTGGGT	С
rs13306296	"		"	4	(TGAC) <sub>8</sub> TGCTCTGGGCTGGCACAGGC	С
rs4673	TGGTAAAGGGCCCGAACAGCTTC	CCCTCCCCAGGGGACAGAAG	61	3+4	(TGAC) <sub>2</sub> TCTTCACCACGGCGGTCATGT	А
rs3180279	GACCACGGGATTCCACTGGCTTTTAC	CATGCTTTCTGGTGAGGGTCTGTTAACTTG	402	2	TGACTGGTGAGGGTCTGTTAACTTGGC	D
rs1049254 <sup>3</sup>	CCCGGGATTTCGTGTGCTGCT	CGCAGATCGGAGGCACCATCAA	383	Е	(GACT) 5GCGAGGAGGAGGCTGCGG	А
rs1049255 <sup>3</sup>	"		"	Е	CCCGGACCTGCCCTCCC	А
rs2254073	ACACCCACCAGCGCTCCATCT	GCGAAGGCCAGCTTCTGTGGATAG	586	1	(GACT) 3GCCCACTTGACAGGTGAGAACC	A
CYBB						
rs7059081	ACTTGGGGAAGTCCTGACCCTTATCTG	AATGGAGGGAGTGAGGCTAATGGTACTG	328	1	(CTGA) 6CTATTGGCTGGTTCACATTTCT	А
rs4422908	п	"	"	1	(GACT) 7CTGTTTGGGTTGGTCAGAATAT	А
rs5917471	GTGCCAGAGGTACTGGATTTGATTCTTAA	C AGAACCAAGGAGACAAGGCAATTCTAGTG	600	2	(ACTG) 8CCAGCAATTAGGCATTCA	С
rs12848910	CAGGCACTCTGAAACCAGGTGATT	AGTATGGCTTGTACTGAAGTATGGCTTCTA	250	1	(GACT) 5AGTATGGCTTCTACTGAATGCA	A

Gen rs-Nummer	PCR-Primer, vorwärts (5'->3')	PCR-Primer, rückwärts (5'->3')	L (pb)	) PP	SNaPshot-Primer (5'->3')	SP
NCF2						
rs12096702	GGACCATGCCTTTTCATTCTAGGAT	GGCTAGAAAAGTCTTGGCAGTCAGATT	309	1	(TGAC) <sub>6</sub> TTACTCAATACATGATGAAGGGAT	С
rs2333682	CTGGGCCTTGATTTCCACACCCTTGTTA	TTTGCAGGAAATTGGTCCCCTCTGAACT	570	1	(TGAC) $_5$ TCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAG	С
rs789192	GCACCCCACTTCGCTCTCACATTTAG	GAATGCACACCATTGTCCCAGACTTC	57	3+4	TGACTACCATTGTCCCAGACTTCAGCT	С
rs789191	TGCCTTGCCTCCCAGTGAGAGCTT	GTTGCGGGCTTGGTGTTTGAGCAGT	126	1	(CTGA) <sub>3</sub> CTAGTGAGAGCTTCTGCCTCACCT	С
rs3845466	ACACCTGCACCCAGGACAATGGAAT	CTCCATAGCAAAGCCTTCTTCCTGCTGAC	152	1	(ACTG) 2ACTCACTGCAGCATCCCAAAGATG	С
rs10911363	CTGTTTGGGAGCTCGCTGAAGGTCTC	CTGGGCTCATGCAATGCCAGATAGAC	159	3	(ACTG) 2ACTCTCATGCAATGCCAGATAGACC	Ε
rs2274064	AATCCCACCTACCGTCGCCTTGCCTA	AGAACCCCACGGACAGCACAGAGT	408	1	(TGAC) 4TGTCTCTCATTTGGTCGAAACAGC	С
rs789181	ACCCTTCCCCACCCCTAATTGTGATC	GCACCAGTGCCTTAATGTCTGATCTAGATG	968	2	(GACT) 4CTGCCAGT (A) 5TCAGACAACTTAGGTA	ΤE
rs789180	"	n	"	2	CTCGTTGTTCAATTTCTTTGACCCTTC	D
NCF4						
rs1883113	AGCTTCCCCTGAGTGCAGCTCAGA	CGCAATCTGTCATCCGCTCTCATC	306	2	(GACT) <sub>8</sub> AATCTGTCATCCGCTCTCATCA	Ε
rs4820258	GATTCCTGACCCCTCTCTTTGATCCTAC	AGCTACACACGCTCACACACTCGTATTC	139	2+3	CTACTTTAAACATACAAGTCCCAGCTAAA	С
rs9607388	GGAGGGCCTTAATTTAGGGTGTGTGG	CCCATCACCCTGTGCTCAGGATAAAG	282	1	(TGAC) 3TCATGAGCATAGGCCTTGGG	С
rs10854694	п	"	"	1	(TGAC) 4TAGGCAGGGCAAGGACTCTG	A
rs4821544	GCCTGGGGCTGGAAGTAGAACCTG	AGGAAGTGCCCAAGCCTCAAACAG	230	2	CCGCACGCAAACTCGAA	D
rs741997	CGCGCAGCGGGGACTTTCT	CTCAAGACACACTCGCACAGTTCACAGAC	243	2	CGCGCAGCGGGGACTTTCT	D
rs741998	"	"	"	2	(GACT) <sub>5</sub> AGGTGAGACATCCAAAGATGGG	D
rs746713	CTGCATGACCACCCGGAGACATAAGTAC	GCAGCACTGGGGACAAGAAGATCAAG	120	2	(CTGA) 4CTACCCGGAGACATAAGTACTTCTCC	Ε
rs909484	CCCCCACAACACCCCTGTCATATTC	CTTGGAGGTCATGGTGCAGAGTGAAC	100	3	TGACTGACTGGAGGGGGCATCCTGC	A
rs3788524	GAGGTGAGGTTGCTTCAGGCATTG	AACAGGCTGACTCTGAGTTCACACTCTTC	526	1+4	ACCTGCCTGGATCTCCAGG	D
rs6000462	AATGCCAAGTCCTCGGCTGTGTG	CCCTGTGGACACCTAGCATTCAGAACTG	745	2+4	(CTGA) 7CTAGTCCTCGGCTGTGTGATGA	D
rs8137602	"	п	"		(ACTG) 9TGCCCTTAGAACAATTTCCAGA	Ε
rs5756379	GAAATCTTGGTGGCCGGCAAT	CCGTTTCCCCTACAATGTGTAGCTTATG	706	1	(TGAC) 4TAGGACTACAGTCATCCCTGAGGA	D
rs5750326	"	"	"	1	(GACT) <sub>8</sub> TGGTTTCACCCCTTACTTTT	Ε

Gen	PCP-Primer worwärte (51->31)	PCP-Primer rückwärte (51-231)	FL (bp)	ЪD	SNaDebot-Drimor (51->31)	SЪ
rs-Nummer	FOR FILMEL, VOLWAILS (5 >5)	rec riimer, idexwaits (5 >5)	гц(рр)	EE	SWAFSHOU FILMEL (5 /5 )	51
RAC2						
rs2213430	CAAAGCCTTGGGCTGCTCCTCTGTAG	TGCCTGCCAGCAGCCACATCTTAG	120	2	(CTGA) 4CTCCCTTCCAGCTAGAACATGC	Ε
rs2239775	AGTGCTGCCTTCTTGGCTGGACTG	GGCTGGACCCTGAAGTCTCCACTTTAAC	448	2	(CTGA) <sub>3</sub> CTCGGGTGTGAGAACACAGACA	Ε
rs2284038	CCAACCCCCAGCAAACCTACCATC	CCCCAAATCTCTGGCACCTGAGATTAAG	75	2	(CTGA) 4CTTCAGCCCAGAAGCTCTCTCC	D
rs5756573	GGAGAGGTGGAGCAGGAGGGAACAGAA	TGCTCCTTTGCTGCCACTCCTCCTCT	475	1	TGACTGCCCATTCCTGTTGCTCCGT	A
rs13058338	CGCTGCTATTTCATGGCTGGAAATG	CAATCCTTTCTCACCCCCAAGTCACTAG	254	3	TGACTGTCTCTGGGTTCCTTGAATGC	Ε
rs9607433	GCCCAGAATGTCCTTCCCACCTTA	TCCAGGCAAAGTAGTCACCTGAGAGAG	268	1	(CTGA) 10CTAGTGAAATGGGGCTGGAAGC	A
rs1476002	п	п	"	1	(GACT) 9CCATATGTTCTCACCAACCTGG	A
rs11089831	GCCCCCTGTGTTGAGGAGGTGTC	ACCCTCCTTGCCCTCTCTGTAGCTC	310	3	CTCAGCTTGATGAGCCATCG	Е
rs6572	TCAACCAGCCCTGCCATTTCTTA	CAGAAGGCAGAGCCCAGAGCTAAACAAG	262	2	(CTGA) <sub>8</sub> CTAGCTCAGGATCCTGTGAGTG	A
rs9798725	н	ч	"	2	TGACTGACTCAAGCCTCGATGACATCATTTGAA	T D

Tab. 8 Verwendete Primer für die Genotypisierung. Die untersuchten Polymorphismen sind jeweils mit ihrer rs-Nummer (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/</u>) angegeben. Rechts davon stehen jeweils die Primerpaare für die PCR (vorwärts und rück wärts in 5'-3'-Orientierung) mit der dazugehörigen Fragmentlänge (FL) des PCR-Produktes sowie die Zuteilung in die vier Multiplex-PCR-Pools (PP), wobei ein Fragment als Einzel-PCR durchgeführt werden musste (als "E" gekennzeichnet). Daneben ist die Sequenz der SNaPshot-Primer angegeben, mit welchen die einzelnen Polymorphismen nachgewiesen wurden; die Analyse erfolgte mit vier unterschiedlichen Pools an SNaPshot-Primern (A, C, D und E, entsprechend Spalte "SP").

# 3.9 Bioinformatik

Für die Auswahl der zu bestimmenden Genvarianten wurden folgende Kriterien angewandt: Zunächst kamen alle Polymorphismen mit einer Frequenz des selteneren Allels (MAF, *minor allele frequency*) von mindestens 5% in Betracht, für welche in der Literatur bereits eine klinische oder funktionelle Assoziation beschrieben ist. Danach wurden – unter Berücksichtigung der zuvor genannten – weitere Genvarianten ausgewählt, um eine komplette Repräsentation der genetischen Variabilität der Gene CYBA, CYBB, NCF2, NCF4 und RAC2 mit einer MAF  $\geq$  5% zu gewährleisten. Dazu wurden die Genotypen aus dem HapMap-Projekt verwendet und mit der Software HaploView illustriert. Dabei wurde ein paarweiser Tagging-Algorithmus mit einer Stringenz von r<sup>2</sup> = 0,5 benutzt, d.h. zwei Genvarianten wurden dann als redundant betrachtet, wenn die Genotypverteilung einer Variante zu mindestens 50% durch die andere bestimmt war.

# 3.10 Statistik

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl deskriptive als auch analytische Statistikverfahren angewandt. Die deskriptive Statistik beschreibt Messgrößen hinsichtlich Lage- und Streuungsmaß. Darüber lässt sich die Art der Verteilung charakterisieren. Oftmals werden zur Aufbereitung grafische Darstellungsformen verwendet wie beispielsweise Boxblots und Scatterblots sowie Histogramme zur Darstellung von Häufigkeitsverteilungen. Dies dient auch zur Einschätzung, ob eine Verteilung parametrisch d.h. durch mathematische Parameter beschreibbar (in der Regel Normalverteilung) oder nicht-parametrisch ist, was für die Auswahl der Tests für die analytische Statistik wichtig ist.

Die analytische Statistik bezeichnet all diejenigen Verfahren, mit denen erhobene Messdaten anhand mathematischer Tests geprüft werden, um eine zu Beginn aufgestellte Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen. Alle entsprechenden Tests wurden unter Verwendung von SPSS Version 12.0 durchgeführt. Zusammen mit der deskriptiven Statistik wurde in meiner Arbeit die Nullhypothese auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft. Lag keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung vor (p > 0,05), konnten parametrische Testverfahren verwendet werden, ansonsten wurde auf nicht-parametrische Methoden zurückgegriffen.

Zum Vergleich der Beziehungen zweier stetiger Variablen zueinander wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Diese ermöglicht es, Aussagen über das Ausmaß eines Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen zu treffen. Bei einer parametrischen Verteilung der Messdaten konnte hierzu der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet werden. Für nicht normalverteilte Variablen wurde stattdessen der Rangsummen-Korrelationskoeffizient nach Spearman herangezogen. In beiden Fällen erhält man für die Stärke der Korrelation einen Koeffizienten zwischen -1 und +1. Je stärker ein Zusammenhang, desto mehr strebt dieser Koeffizient dem Betrag nach gegen Eins (-1 = perfekt negativ, +1 = perfekt positiv korreliert).Die statistische Signifikanz der Korrelation wird durch den p-Wert angegeben. Korrelationen zwischen Messgrößen wurden unter Angabe der entsprechenden Koeffizienten in einem X-Y-Scatterplot widergegeben. Zur Analyse der behandlungsinduzierten Veränderungen von den LCLs und den CD3 (verbundene Stichproben) wurde bei parametrischer Verteilung der gepaarte t-Test oder der vom Verteilungstyp unabhängige Wilcoxon-Rangsummentest angewandt. Der Einfluss von Genpolymorphismen auf funktionelle Parameter (d.h. diskrete unabhängige und kontinuierliche abhängige Variable) wurde nicht-parametrisch mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test bewertet. Dieser Test basiert auf der Annahme eines Alleldosis-abhängigen Effekts. Der kombinierte Einfluss von stetigen (z.B. Expressionsdaten) und diskreten Variablen (z.B. Genotypen) auf eine intervallskalierte Größe (z.B. Enzymaktivität) wurde mittels linearer Regression untersucht. Genotypen können durch ihre Art (drei diskrete äquidistante Konfigurationen entsprechend Wildtyp, Heterozygotie und homozygotem Variantenallelstatus) als Variablen in einem linearen Regressions modell berücksichtigt werden.

# 4 Ergebnisse

# 4.1 NADPH-Oxidase-Aktivität und ROS-Produktion

Ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit bestand in der Quantifizierung der Aktivität der NADPH-Oxidase. Dieses Enzym produziert - wie in der Einleitung dargelegt -Superoxidanionen, welche mäßig reaktive Sauerstoffverbindungen darstellen und aus denen weitere reaktivere ROS-Verbindungen entstehen können. Die direkte Messung von Superoxidanionen ist auf Grund deren kurzer biochemischer Halbwertszeit von 10<sup>-4</sup> s technisch mit der üblichen Laborausstattung nicht möglich. Daher erfolgte eine indirekte Messung über das Luminophor L-012, welches nach Reaktion mit ROS, und insbesondere mit Superoxid Lichtquanten emittiert. Allerdings ist die Bildung von Superoxid nicht NADPH-Oxidase-spezifisch. Eine weitgehende Spezifierung kann erzielt werden, indem man parallele Ansätze mit DPI, einem Inhibitor von FAD-haltigen Enzymen, behandelt. Der DPI-hemmbare Anteil bildet somit die Menge des von diesen Enzymen produzierten Superoxids ab. Der größte Anteil davon entfällt bei Leukozyten bzw. deren Subfraktionen auf die NADPH-Oxidase. Diese Messungen sollten in vier aus peripheren Blutleukozyten isolierten Zelltypen (T- und B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und NK-Zellen) und an lymphoblastoiden Zelllinien durchgeführt werden. Eine globalere Möglichkeit der Messung von ROS besteht in der fluorometrischen Analyse der Oxidation von DCFH-DA. Diese Reaktion weist insbesondere Wasserstoffperoxid nach.

### 4.1.1 NADPH-Oxidase-Aktivität in isolierten Leukozytenfraktionen

Zunächst sollte in T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>), B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup>), Monozyten bzw. sich aus diesen differenzierenden Makrophagen (CD14<sup>+</sup>) und NK-Zellen (CD56<sup>+</sup>) von ca. 110 gesunden Spendern die PMA-stimulierbare Aktivität der NADPH-Oxidase quantitativ über Chemolumineszenz mit dem Substrat L-012 bestimmt werden. Dies erfolgte direkt im Anschluss an die durchflusszytometrische Sortierung in die vier Zell-Subpopulationen. Jede Population wurde mit PMA stimuliert und ein jeweils parallel mitgeführter Ansatz zusätzlich mit DPI behandelt. Die Häufigkeitsverteilungen für die vier Zelltypen sind als Differenz der Signale ohne und mit DPI in Abb. 4 illustriert.

Mit Ausnahme der CD14<sup>+</sup>-Zellen konnte erst nach dekadischem Logarithmieren der Messdaten eine Verteilung erzielt werden, die mit einer Normalverteilung vereinbar war. Bezogen auf die CD3<sup>+</sup>-Zellen, war die Aktivität einer einzelnen Zelle bei den CD14<sup>+</sup> etwa um Faktor 1000 und bei den CD19<sup>+</sup> etwa um den Faktor 10 höher. Die CD56<sup>+</sup> lagen gegenüber den CD3<sup>+</sup> im Mittel um etwa den Faktor 4 niedriger. Die inter-individuelle Streubreite war bei den CD19<sup>+</sup> und den CD56<sup>+</sup> höher als bei den CD3<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>.



Abb. 4 Verteilung der NADPH-Oxidase-Aktivität in CD3, CD14, CD19 und CD56. Nach Isolierung von PBMCs und Separierung in die Subfraktionen wurde in einem Gesamtvolumen von 222  $\mu$ l auf weißen 96-Well-Platten die Chemolumineszenz von L-012 bei 37°C über 90 min quantifiziert, wobei für die Aus wertung das in diesem Zeitraum auftretende Maximum verwendet wurde. Pro Well wurden bei den CD3 und CD19 22000, bei den CD14 2200 und bei den CD56 55000 Zellen eingesetzt und die dargestellten Aktivitäts werte beziehen sich auf je eine Zelle. Dabei wurden pro Zelllinie zwei Ansätze, mit 10 ng/ml PMA bz w. mit 10 ng/ml PMA und 10  $\mu$ M DPI (jeweils in Triplikaten), gemessen. Die Differenz aus beiden Ansätzen wurde als NADPH-Oxidase-spezifischer Anteil der gemessenen Aktivität gewertet. Deren Häufigkeitsverteilungen sind hier für 112 genetisch unterschiedliche Präparationen von CD3, für 109 won CD14, für 114 von CD19 und für 105 von CD56 veranschaulicht. Es wurde das Vorliegen einer Normal verteilung geprüft (Kolmogorov-Smirnov-Test), welche für die Rohdaten nur bei den CD14 gegeben war. Nach Logarithmieren konnte näherungsweise auch für die drei anderen Populationen eine solche angenommen werden (p > 0,05 nach Kolmogorov-Smirnov). RLUs = *relative light units*, Einheit des Lumineszenz-Signals.

Beim Vergleich der NADPH-Oxidase-Aktivität dieser Zelltypen zeigten sich die stärksten Korrelationen zwischen CD56 und CD14 (r=0,57) und zwischen CD3 und CD19 (r=0,48). Überhaupt keinen Zusammenhang gab es zwischen CD19 und CD56 (r=-0,01). Die anderen paarweisen Korrelationen waren mäßig ausgeprägt.



Abb. 5 Korrelationen der NADPH-Oxidase-Aktivität der vier Leukozyten-Populationen. der In Grafik sind für 105 Zelllinien für die vier Zellfraktionen die paarweisen Korrelationen dargestellt und das Bestimmtheitsmaß je weilige  $\mathbf{r}^2$ (parametrisch nach Pearson) ist angegeben. Für diese parametrische Berechnung wurden von CD14 die Rohdaten des **DPI-hemmbaren** Signalanteils, bei CD3, CD19 und CD56 der dekadische Logarithmus dieser Werte verwendet, damit eine Normalverteilung angenommen und parametrische eine Analyse durchgeführt werden konnte (siehe Abb. 4 S. 42, Versuchsbedingungen entsprechen den dort genannten).

#### 4.1.2 ROS in lymphoblastoiden Zelllinien

Zur Detektion von ROS in LCLs wurden mehrere Messverfahren ausgetestet. Hierbei erwiesen sich die Mikrotiterplatten-Verfahren (Lumineszenz mit L-012, Lucigenin und Luminol sowie Fluoreszenz mit Dihydroethidium) sämtlich als ungeeignet, da die Messsignale durch Reaktion mit FCS stark supprimiert werden. Dies gilt auch für die bei den Elektronenspinresonanz (ESR)-Messungen eingesetzten Spinprobes. Mit letzterem Verfahren konnte gezeigt werden, dass die bei FCS-Entzug gemessenen Signale unspezifisch und nicht durch die NADPH-Oxidase-Aktivität bedingt sind (Parallelansätze mit und ohne NADPH-Oxidase-Inhibitor).

Weiterhin konnte in durchflusszytometrischen Messungen nachgewiesen werden, dass LCLs bei Fehlen von FCS bereits nach 15 min mit massiver unspezifischer ROS-Freisetzung reagieren und in einen präapoptotischen Zustand übergehen. Die hierbei ermittelte Schwellenkonzentration für eine nicht beeinträchtigte Vitalität liegt etwa bei 1,5 % FCS (v/v) für 4 h. Für o.g. Verfahren muss FCS jedoch deutlich < 1% sein. Daher musste das ursprüngliche Ziel der PMA-stimulierbaren Quantifizierung der NADPH-Oxidase-Aktivität in LCLs verlassen werden. Einzig Bestrahlungs- und Zytokin-induzierte Effekte auf die nicht

durch PMA stimulierte NADPH-Oxidase konnten nach 30 h Inkubationszeit durchflusszytometrisch mit DCFH-DA, welches hauptsächlich Wasserstoffperoxid nachweist, sinnvoll analysiert werden. Dieses Verfahren beruht auf intrazellulärer Aktivierung und Oxidation von DCFH-DA durch Wasserstoffperoxid und ist auch in Gegenwart von FCS durchführbar.

# 4.2 Basale Genexpression von Untereinheiten

Zur Bestimmung der basalen Genexpression von Untereinheiten der NADPH-Oxidase wurde direkt im Anschluss an die Sortierung in die Zellfraktionen mRNA von CD3, CD14 und CD19 asserviert (bei CD56 war die Zellausbeute zu gering). Bei den LCLs entspricht der basale Expressionszustand der unbehandelten Kontrolle, wie sie 4 h nach Behandlungsbeginn gewonnen wurde. Später erfolgte eine reverse Transkription in cDNA und die Quantifizierung mittels qRT-PCR.

Bei Betrachtung der basalen Expressionsstärke fiel auf, dass die NOX-Gene bei den isolierten Blutzellfraktionen weitaus stärker exprimiert waren als bei den LCLs. Diese Daten sind direkt vergleichbar, da sie jeweils auf dieselben Referenzgene bezogen sind. CYBB wies bei CD3 und CD14 und zusammen mit CYBA auch bei CD19 die höchsten Transkriptzahlen auf (in Bezug auf den jeweiligen Median der Verteilung). Unter den primär zytoplasmatischen Untereinheiten war bei CD3 und CD14 NCF2 stärker transkribiert als NCF4 und RAC2, bei CD19 in etwa gleich stark.

Es zeigte sich eine positive Korrelation bei paarweisem Vergleich aller fünf betrachteter Gene in allen drei hier untersuchten Zellpopulationen (Tab. 9). Dabei fiel auf, dass bei CD3 verglichen mit CD19 die paarweisen Korrelationskoeffizienten in den meisten Fällen ähnlicher waren als im Vergleich zu CD14. Bei letzteren war insbesondere der Zusammenhang zwischen den für die beiden Membran-ständigen Untereinheiten kodierenden Genen CYBA und CYBB auffällig schwach ausgeprägt. Ein Einfluss des Geschlechts der Probanden auf die Expression des X-chromosomal kodierten CYBB war nicht zu sehen.

Ganz anders stellte sich dies bei den LCLs dar. Stark korreliert waren hier CYBA und CYBB und jedes dieser beiden mit RAC2. NCF2 zeigte hier sogar einen negativen Zusammenhang mit CYBB und keinen mit CYBA, NCF4 und RAC2.

		Min	Q1	Q2	Q3	Max	f	CYBB	NCF2	NCF4	RAC2
CD3	СҮВА	0,6	5,1	7,7	10,7	86,4	154,3	0,76	0,44	0,77	0,68
	CYBB	1,0	12,1	15,6	22,8	97,6	96,2		0,51	0,79	0,71
	NCF2	0,6	4,5	6,8	9,8	33,3	53,0			0,57	0,42
	NCF4	0,2	1,3	1,9	2,3	5,9	25,9				0,70
	RAC2	0,5	2,0	3,4	5,1	12,9	27,7				
CD14	CVBA	15	30	52	7.0	106 7	73 3	0.10	0.34	0.48	0 50
CD14	CYBR	73	33.0	3,2 47 8	7,0 79.5	337.5	75,5 46 A	0,17	0,54	0,40	0,55
	NCF2	7,5 2 4	7.8	<b>9</b> 1	10.6	67.2	-0,- 28 5		0,70	0,50	0,55
	NCF4	2, <del>1</del> 0.6	2.1	2.6	3.1	30.9	53.2			0,00	0.56
	RAC2	0,9	2,5	3,1	3,7	32,1	35,5				-,
CD19	СҮВА	4,9	22,2	28,5	32,4	60,1	12,2	0,60	0,45	0,75	0,70
	CYBB	4,5	21,1	27,3	34,3	63,7	14,2		0,74	0,63	0,68
	NCF2	0,7	2,2	3,1	4,2	11,6	17,3			0,48	0,33
	NCF4	0,6	1,7	2,3	2,6	5,3	9,1				0,66
	RAC2	0,6	2,4	3,5	4,2	6,2	9,8				
LCL	CYBA	0,3	0,6	0,7	1,0	1,5	5,3	0,67	0,04	0,33	0,68
	CYBB	0,2	0,5	0,7	1,0	2,2	9,5		-0,20	0,07	0,61
	NCF2	0,1	0,3	0,4	0,6	1,5	10,6			0,09	0,25
	NCF4	0,1	0,1	0,2	0,4	1,5	17,1				0,04
	RAC2	0,5	1,1	1,4	1,9	4,0	7,5				

Tab. 9 Basale Genexpression und -Korrelationen zwischen NADPH-Oxidase-Untereinheiten. Die Transkriptstärke der NOX-Gene ist relativ zu einem gewichteten Mittel aus den drei Referenzgenen GAPDH, HPRT1 und UBC ausgedrückt. In der linken Hälfte der Tabelle ist die Verteilung der basalen Expressionsstärke durch die Angabe von Minimum (Min), Quartil 1 (Q1), Median (Q2 in Fettschrift), Quartil 3 (Q3) und Maximum (Max) ausgedrückt. Das Verhältnis aus Maximum und Minimum kennzeichnet die Streubreite und ist als Quotient f angegeben. In der rechten Tabellenhälfte sind die paarweisen Korrelationen der fünf untersuchten Gene innerhalb der untersuchten Zellpopulationen – angegeben als nicht-parametrischer Koeffizient rho nach Spearman – aufgelistet.

# 4.3 Genotypen der NADPH-Oxidase

Als weiterer wichtiger Aspekt meiner Arbeit sollte der Einfluss von Genvarianten in Untereinheiten der NADPH-Oxidase auf Enzymaktivität und Genexpression untersucht werden. Als Grundlage für die Auswahl der zu bestimmenden Genvarianten diente die HapMap-Datenbank, welche zum Zeitpunkt meiner Dissertation die dichteste Kartierung der humanen genetischen Keimbahnvariabilität darstellt. Mit dem paarweisen Tagging-Algorithmus der Software HaploView wurde ein Satz an Genvarianten ermittelt, welcher die genetische Variabilität im Genbereich von CYBA, CYBB, NCF2, NCF4 und RAC2 jeweils einschließlich 5 kb 5'- und 3'-flankierender Sequenzen mit einer Stringenz von  $r^2 = 0.5$ abbildet. Das heißt im Umkehrschluss, dass Varianten, bei welchen die jeweiligen Allele zu  $\geq 50\%$  gemeinsam vererbt werden, nicht bestimmt wurden. Dies ergab für die fünf Gene zusammen eine Gesamtzahl von 48 zu analysierenden Genvarianten, welche alle Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) darstellten.

Von den insgesamt 48 SNPs liegen 11 im Bereich von CYBA, 4 von CYBB, 9 von NCF2, 14 von NCF4 und 10 von RAC2 (Tab. 10). Die untersuchten SNPs waren in unterschiedlichen Genbereichen lokalisiert: 5 in Exonen einschließlich der UTRs, 25 in Introns und 18 in der Promotor- bzw. 3'-Region bis zu einer Entfernung von ±5 kb zum jeweiligen Gen. Bezüglich der Frequenz des selteneren Allels ergab sich folgende Verteilung: 14 SNPs mit 5-10%, 12 mit 10-20%, 6 mit 20-30%, 5 mit 30-40% und 11 mit 40-50%. Die Genotypisierung wurde für 117 Probanden und 48 LCLs durchgeführt. Zur Kontrolle wurde die Bestimmung an 20 DNA-Proben wiederholt. Insgesamt konnten 99,5% aller Genotypen sicher bestimmt werden.

Gen	SNP	Genetisches Element	Chromosomale Lokalisation <sup>1</sup>	Basen- austausch	Wt/Wt <sup>2</sup> (%)	Wt/Var <sup>2</sup> (%)	Var/Var <sup>2</sup> (%)	MAF (%) <sup>3</sup>	Chi- Test <sup>4</sup> (HWE)
СҮВА	rs3736112	Promotor, -4589	16:88722012	C>T	67,3	31,0	1,7	17,2	0,6
	rs 8854	Promotor, -1442	16:88718865	G>A	83,8	15,4	0,8	8,5	1,0
	rs9932581	Promotor, -930	16:88718353	G>A	44,4	43,6	12,0	33,8	1,0
	rs 16966671	Promotor, -852	16:88718275	G>C	23,1	56,4	20,5	48,7	0,4
	rs72811418	Promotor, -675	16:88718096	A>T	85,3	13,8	0,9	7,8	0,9
	rs 13306296	Promotor, -536	16:88717957	G>A	48,3	41,4	10,3	31,0	0,9
	rs4673	Exon 4 His72Tyr	16:88713236	C>T	40,2	52,1	7,7	33,8	0,2
	rs 31 80 279	Intron 5	16:88710833	C>G	27,6	48,3	24,1	48,3	0,9
	rs 1049254	Exon 6, Val174Ala	16:88709828	C>T	36,2	44,8	19,0	41,4	0,7
	rs 1049255	Exon 6, c.640	16:88709737	A>G	28,5	51,7	19,8	45,7	0,9
	rs2254073	3' Region	16:88705804	G>A	50,4	43,6	6,0	27,8	0,6
CYBB	rs 7059081	Intron 2	X:37641484	C>G	87,2	8,5	4,3	8,5	0,8*
	rs4422908	Intron 2	X:37641526	G>T	79,5	9,4	11,1	15,8	0,09*

Gen	SNP	Genetisches Element	Chromosomale Lokalisation <sup>1</sup>	Basen- austausch	Wt/Wt <sup>2</sup> (%)	Wt/Var <sup>2</sup> (%)	Var/Var <sup>2</sup> (%)	$\frac{MAF}{(\%)^3}$	Chi- Test <sup>4</sup> (HWE)
	rs 5917471	Intron 4	X:37652518	C>T	45,7	25,0	29,3	41,8	0,6*
	rs12848910	Intron 11	X:37666245	T>C	86,3	11,1	2,6	8,1	1,0*
NCF2	rs 12096702	Promotor	1:183561697	A>G	87,1	12,1	0,8	6,9	0,8
	rs2333682	Promotor	1:183560761	A>G	86,2	12,9	0,9	7,3	0,9
	rs789192	Intron 1	1:183556291	A>G	28,4	50,0	21,6	46,6	1,0
	rs789191	Intron 2	1:183555879	G>A	88,8	9,5	1,7	6,5	0,06
	rs 3845466	Intron 2	1:183551760	C>T	74,1	22,4	3,5	14,7	0,5
	rs 1091 1363	Intron 2	1:183549757	G>T	60,7	33,3	6,0	22,6	0,9
	rs2274064	Exon 5	1:183542387	T>C	27,6	50,0	22,4	47,4	1,0
	rs789181	Intron 14	1:183526338	A>G	82,9	16,2	0,9	9,0	1,0
	rs 789180	Intron 14	1:183525620	T>A	78,5	19,8	1,7	11,6	0,9
NCF4	rs 1883113	Promotor	22:37252684	C>G	89,7	9,4	0,9	5,6	0,5
	rs4820258	Promotor	22:37255858	T>C	76,7	22,4	0,9	12,1	0,8
	rs9607388	Promotor	22:37256351	G>T	75,9	21,5	2,6	13,4	0,8
	rs 10854694	Promotor	22:37256476	G>A	28,2	47,9	23,9	47,9	0,9
	rs4821544	Intron 1	22:37258503	T>C	51,7	38,8	9,5	28,9	0,8
	rs741997	Intron 1	22:37258813	A>G	86,6	13,4	0,0	6,7	0,7
	rs741998	Intron 1	22:37258844	G>A	77,6	19,8	2,6	12,5	0,6
	rs746713	Intron 1	22:37259359	T>C	57,3	34,2	8,5	25,6	0,5
	rs909484	Intron 2	22:37260601	G>A	67,5	28,2	4,3	18,4	0,8
	rs 3788524	Intron 7	22:37269556	A>G	70,7	27,6	1,7	15,5	0,9
	rs 6000462	3' Region	22:37274347	G>A	88,8	11,2	0,0	5,6	0,8
	rs8137602	3' Region	22:37274649	G>C	87,1	12,9	0,0	6,5	0,8
	rs 57 56 379	3' Region	22:37275904	T>C	53,4	37,1	9,5	28,0	0,7
	rs 57 50 326	3' Region	22:37276285	G>T	25,7	50,4	23,9	49,1	1,0
RAC2	rs2213430	Intron 1	22:37638960	C>T	29,1	46,1	24,8	47,9	0,7
	rs2239775	Intron 1	22:37637841	G>T	76,9	20,5	2,6	12,8	0,7
	rs 2284038	Intron 2	22:37635055	A>G	46,5	41,4	12,1	32,8	0,8
	rs 57 56 57 3	Intron 2	22:37633775	C>T	75,2	22,2	2,6	13,7	0,8

Gen	SNP	Genetisches Element	Chromosomale Lokalisation <sup>1</sup>	Basen- austausch	Wt/Wt <sup>2</sup> (%)	Wt/Var <sup>2</sup> (%)	Var/Var <sup>2</sup> (%)	MAF (%) <sup>3</sup>	Chi- Test <sup>4</sup> (HWE)
	rs13058338	Intron 2	22:37632770	T>A	61,6	33,3	5,1	21,8	1,0
	rs9607433	Intron 2	22:37630862	G>A	82,1	16,2	1,7	9,8	0,7
	rs1476002	Intron 2	22:37630788	C>T	64,1	32,5	3,4	19,6	1,0
	rs11089831	Intron 5	22:37625277	G>A	92,3	7,7	0,0	3,8	0,9
	rs 6572	Exon 7 3'TR	22:37621445	C>G	29,9	45,3	24,8	47,4	0,6
	rs9798725	3' Region	22:37621269	C>A	41,4	44,8	13,8	36,2	1,0

Tab. 10 <sup>1</sup>Chromosomale Lokalisation der untersuchten Genpolymorphismen gemäß Version Genome Build 37.1 in der Datenbank NCBL <sup>2</sup>Häufigkeitswerteilung der beobachteten Genotypkonfigurationen (Wt/Wt = homozgot für Wildtyp-Allel; Wt/Var = Wildtyp- und Variantenallel, d.h. Heterozygotie; Var/Var = homozygot für Varianten-Allel). <sup>3</sup>MAF = minor allele frequency, Frequenz des selteneren Allels). <sup>4</sup>Chi-Quadrat-Test zur Abschätzung des Hardy-Weinberg-Äquilibriums (HWE) als Maß für die Richtigkeit der Verteilung von Genotypen und Allelfrequenzen. Bei X-chromosomalen Genvarianten (betrifft hier das Gen CYBB) ist das HWE nur für die weiblichen Studienteilnehmer angegeben und mit \* gekennzeichnet.

# 4.4 Determinanten der NADPH-Oxidase-Aktivität

Als naheliegende Determinanten für die Aktivität der NADPH-Oxidase kommen u.a. die mRNA-Expression ihrer Untereinheiten sowie Genpolymorphismen in den zugehörigen Genen in Betracht.

## 4.4.1 Transkription der Untereinheiten und Enzymaktivität

Nun sollte geprüft werden, inwieweit die Variabilität in der Aktivität der NADPH-Oxidase durch unterschiedliche Transkription ihrer Untereinheiten bestimmt wird. Die stärkste Korrelation wurde dabei für NCF2 bei den CD19 beobachtet (Tab. 11).

	Genexpression, normiert											
	CYBA		CYBB		NCF2		NCF4		RAC2			
	rho	p-Wert	rho	p-Wert	rho	p-Wert	rho	p-Wert	rho	p-Wert		
Aktivität CD3	0,08	0,4	0,22	0,03	0,31	0,002	0,10	0,3	0,01	1,0		
Aktivität CD14	0,01	0,9	0,20	0,05	0,22	0,03	0,19	0,07	0,26	0,01		
Aktivität CD19	0.09	0,4	0,38	0,00006	0.61	<0.000001	0,12	0.2	0.03	0.8		

Tab. 11 Korrelation zwischen basaler mRNA-Expression und Enzymaktivität der NADPH-Oxidase. Die Aktivität der in den drei Zellfraktionen CD3, CD14 und CD19 gemessenen PMA-stimulierten Enzymaktivität wurde mit der zu diesem Zeitpunkt vorliegenden basalen Genexpression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten CYBA, CYBB, NCF2, NCF4, und RAC2 auf Korrelation untersucht. Die Expressionsmessungen wurden auf den Mittelwert der Referenzgene GAPDH, HPRT1 und UBC normiert. Statistisch auffällige Beziehungen (p < 0,1) sind durch Fettschrift hervorgehoben.

Eine hohe Transkription von NCF2 war statistisch extrem signifikant mit einer höheren Aktivität verbunden. Da die Messwerte von NCF2 näherungsweise normalverteilt waren, konnte der durch diesen Faktor erklärbare Anteil an der Variabilität der Enzymaktivität in CD19 mittels linearer Regression berechnet werden: Die Expression von NCF2 war allein für 44% der beobachteten Streuung in der Aktivität verantwortlich. Die Hinzunahme von CYBB in die lineare Regressionsanalyse – mit der Einschränkung einer nicht-normalen Verteilung – verbesserte das Modell nicht. Dies passt zu der oben beschriebenen engen Korrelation von CYBB und NCF2 in CD19 (Tab. 9). Ebenfalls deutlich war bei CD19 auch der Zusammenhang mit CYBB. Die anderen drei Gene waren nicht mit der Aktivität in CD19 assoziiert. Schwächere Korrelationen zeigten sich für NCF2 und CYBB auch bei den anderen beiden Zelltypen. Bei CD14 bestand zudem eine schwache Beziehung noch mit NCF4 und RAC2. Zur Veranschaulichung der Zusammenhänge zwischen Aktivität und Genexpression sind für CD19 beispielhaft die Gene CYBA, CYBB und NCF2 grafisch darges tellt (Abb. 6).



Abb. 6 Grafische Illustration der ROS-Produktion in CD19 und Expression von CYBA, CYBB und NCF2. Die ROS-Produktion ist in relativen Lichteinheiten (RLUs) angegeben und bezieht sich auf den PMAstimulierbaren und DPI-hemmbaren Anteil. Die Lumineszenz-Messung mit L-012 erfolgte unmittelbar nach Gewinnung der Zellen, wobei die Signale kontinuierlich über 90 min bei 37°C aufgezeichnet wurden. In die Auswertung ging das während dieses Zeitraums gemessene Aktivitätsmaximum ein. Die Genexpressionsdaten entsprechen dem Zustand zu Beginn der Lumineszenz-Messung. Die Zielgene wurden auf ein arithmetisches Mittel der Referenzgene GAPDH, HPRT1 und UBC normalisiert und dann relativ zum jeweils niedrigsten Wert der Messreihe dargestellt. Die Stärke der Korrelation ist durch den Koeffizienten rho nach Spearman ausgedrückt. Diese Daten beruhen auf einem Stichprobenumfang von 105 isolierten Zelllinien.

Wie bereits oben beschrieben, konnte für die LCLs keine spezifische NOX-Aktivitätsmessung, sondern nur eine globale Quantifizierung von ROS durch Oxidation von DCFH-DA und sich anschließende Messung per Durchflusszytometrie erfolgen. Der Zusammenhang zwischen den auf diese Weise bestimmten ROS und der Basalexpression von NOX-Genen ist in Tab. 12 dargestellt. Der stärkste Zusammenhang zeigte sich hier mit der Genexpression von RAC2, schwächer mit CYBA und CYBB.

	СҮВА		CYBB		NCF2		NCF4		RAC2	
	rho	р	rho	р	rho	р	rho	р	rho	р
ROS	0,33	0,02	0,29	0,04	-0,01	1,0	-0,17	0,3	0,46	0,001

Tab. 12 NOX-Genexpression und ROS-Bildung auf Basalniveau in 48 LCLs. Die hier aufgeführten Daten entsprechen der unbehandelten Kontrolle der LCL-Messreihe (Kultivierung in Medium bei 37°C). Zur

Normierung der Genexpression diente ein gewichtetes Mittel aus GAPDH, HPRT1, SDHA, UBC und YWHAZ. Die Korrelationstestung erfolgte nicht-parametrisch nach Spearman; die entsprechenden Korrelationskoeffizienten rho mit den p-Werten sind angegeben.

## 4.4.2 Einfluss von Genpolymorphismen auf die Enzymaktivität

Zunächst wurde mit dem nicht-parametrischen Jonckheere-Terpstra-Trend-Test univariat der potenzielle Einfluss der 48 SNPs auf die Aktivität der NADPH-Oxidase geprüft. Nur diejenigen SNPs, deren p-Wert in dieser Analye < 0,2 war, wurden für das nachfolgende lineare Regressionsmodell berücksichtigt. Diese Berechnungen wurden jeweils für CD3, CD14, CD19 und CD56 durchgeführt, wobei außer bei CD14 die logarithmierten Aktivitätswerte wegen der Vereinbarkeit mit einer Normalverteilung verwendet wurden. Die Ergebnisse der Regressionsanalyse sind in Tab. 11 S.48 zusammengestellt.

Bei CD3 wurde als alleiniger genetischer Einflussfaktor der SNP rs1883113 in der Promotorregion von NCF4 identifiziert. Messtag und Geschlecht der Probanden zeigten hier keinen Einfluss. Ingesamt konnten hier nur 5% der funktionellen Variabilität durch die betrachteten Variablen erklärt werden.

Deutlich höher war dieser Anteil mit 18% bei CD14. Hier wirkten sich drei Varianten, RAC2 rs5756573, NCF2 rs789181 und NCF4 rs4820258, nominal statistisch signifikant (p < 0,05) auf die Enzymaktivtät aus, wobei das Variantenallel bei rs789181 mit einer erhöhten, bei den beiden anderen SNPs mit einer erniedrigten Aktivität einherging. Außerdem hatte hier der Messtag einen Einfluss, welcher durch im Mittel niedrigere Aktivitätswerte bei den ersten zehn Zellpräparationen bedingt war (evtl. durch die anfangs noch länger dauernde Zellgewinnung und daraus resultierend eine möglicherweise geringere Zellvitalität und – Aktivität). Blieben die ersten zehn Präparationen unberücksichtigt, war kein Effekt des Messtages mehr zu erkennen und nur die drei genannten SNPs erwiesen sich als signifikante Prädiktoren.

Ein starker Tageseffekt war auch bei den CD19 zu verzeichnen, was hier wiederum durch die ersten zehn Tage bedingt war. Weiterhin hatten hier CYBB rs12848910 und NCF2 rs10911363 einen nennenswerten Einfluss. Insgesamt lag die Modellprädiktion mit diesen drei Variablen hier bei 19% (p = 0,00001).

Bei CD56 erwiesen sich zwei SNPs als Marker für die Enzymaktivität, die auch bei CD14 von Bedeutung waren: RAC2 rs5756573 und NCF4 rs4820258. Zusammen waren diese beiden für 11% der funktionellen Variabilität der NADPH-Oxidase in CD56 verantwortlich.

Zell-	Parameter	Koeffizient,	Statistische	r <sup>2</sup> , adjustiert
typ		standardisiert	Signifikanz (p-Wert)	-
CD3	Modell		0,009	0,05
	NCF4 rs1883113	0,25	0,009	
CD14	Modell		0,00009	0,18
	Tag	0,25	0,008	
	RAC2 rs5756573	-0,26	0,004	
	NCF2 rs789181	0,22	0,02	
	NCF4 rs4820258	-0,21	0,02	
CD19	Modell		0,00001	0,19
	Tag	0,34	0,0002	
	CYBB rs12848910	-0,22	0,01	
	NCF2 rs10911363	-0,20	0,02	
CD56	Modell		0,002	0,11
	RAC2 rs5756573	-0,24	0,01	
	NCF4 rs741997	-0,23	0,02	

Tab. 13 Lineare Regressionsmodelle für genetische Prädiktoren der NADPH-Oxidase-Aktivität. Als abhängige Variable diente für die vier Zelltypen jeweils die PMA-stimulierbare und DPI-hemmbare NADPH-Oxidase-Enzymaktivität. Als unabhängige Variablen wurden all diejenigen SNPs mit p < 0,2 im Jonckheere-Terpstra-Test betrachtet. Die lineare Regressionsanalyse wurde mit dem Modus "*stepwise*" in SPSS mit den Standardeinstellungen (d.h. 0,05 für "*entry*" und 0,1 für "*removal*") verwendet. In die Regressionsgleichung wurde ein konstanter Term eingeschlossen und fehlende Werte wurden paarweise zwischen den zu analysierenden Variablen ausgeschlossen. Es sind jeweils für das Gesamtmodell der p-Wert und die Prädiktion  $r^2$  sowie für die das Modell definierenden SNPs die standardisierten Koeffizienten (positiver Wert bedeutet, Variantenallel war mit erhöhter, negativer Wert mit erniedrigter Aktivität verbunden) und zugehörige p-Werte aufgeführt.

Die aus der Regressionsanalyse (Tab. 13) ermittelten potenziellen genetischen Marker für die NOX-Aktivität sind nachfolgend grafisch veranschaulicht.

Für den SNP NCF4-rs1883113 konnte für Träger des Variantenallels eine signifikante Erhöhung der NOX-Aktivität in CD3 und CD56 gezeigt werden, wobei diese im heterozygoten Zustand im Median etwa doppelt so hoch war wie beim homozygoten Wildtyp-Allel. Die NOX-Aktivität in CD14 und CD19 war von diesem SNP unbeeinflusst (Abb. 7).





Abb. 7 Einfluss von SNP NCF4-rs1883113 auf NOX-Aktivität in CD3, CD14, CD19 und CD56. Hier wurden die heterozygoten und homozygoten Variantenallelträger zusammengefasst und mittels des Mann-Whitney-U-Tests auf einen statistischen Unterschied gegenüber Personen mit homozygotem Wildtypallel getestet.

Von den drei in der Regressionsanalyse nominal signifikanten SNPs erreichten in der Einzelbetrachtung mit dem Mann-Whitney-U-Test nur NCF4-rs4820258 und RAC2-rs5756573 einen p-Wert < 0,05. Bei beiden SNPs ging das Variantenallel mit einer Verminderung der NOX-Aktivität einher (Abb. 8). Zellen, welche homozygot für das Variantenallel waren, wurden hier mit den heterozygoten kombiniert.



Abb. 8 Boxplots der SNP-Prädiktoren aus der Regressionsanalyse für die NOX-Aktivität in CD14. Die Darstellungs weise und statistische Testung ist analog zu der in Abb. 7.

Die Effekte der die NOX-bedingte ROS-Produktion in CD19 bzw. CD56 beeinflussenden SNPs sind in Abb. 9 und Abb. 10 veranschaulicht. Variantenallele waren hier ebenfalls mit einer Abnahme der NOX-Aktivität verbunden. Auch die Effekte waren hier nur mäßig ausgeprägt und die statistische Signifikanz bewegte sich um die nominale Grenze von p = 0,05 (bei NCF4-rs741997 und CD56 sogar etwas darüber).



Abb. 9 Boxplots der SNP-Prädiktoren aus der Regressionsanalyse für die NOX-Aktivität in CD19. Im linken Bild wurden für die statistische Bewertung wiederum die heterozygoten mit den homozygoten Variantenallelträgern zusammengefasst (Mann-Whitney-U-Test). Rechts wurden alle drei Genotypkonfigurationen separat betrachtet, da jede Gruppe mehr als fünf Ausprägungen aufwies (hier Anwendung des Jonckheere-Terpstra-Trend-Tests).



Abb. 10 Boxplots der SNP-Prädiktoren aus der Regressionsanalyse für die NOX-Aktivität in CD56. Für beide SNPs erfolgte die Signifikanztestung mit dem Mann-Whitney-U-Test (im rechten Bild kamen homozyg ote Variantenallelträger nicht vor).

#### 4.4.3 NOX-Aktivität: Einfluss von Genpolymorphismen und -expression

Als nächstes stellte sich die Frage, ob durch kombinierte Betrachtung von Genpolymorphismen und –expression eine bessere Prädiktion der Enzymaktivität erzielt werden kann. Dafür wurden in einer linearen Regressionsanalyse die zuvor mit einem p-Wert < 0,5 als statistisch signifikant identifizierten Parameter der Genexpression (Tab. 11 S.45) und der Genpolymorphismen (Tab. 13 S.53) als unabhängige Variablen in das Modell gegeben.

Bei allen drei Zellarten, mit denen RNA-Analysen durchgeführt wurden, erwies sich die Expression von NCF2 als stärkster mit der Aktivität assoziierter Faktor. Bei den CD3 kann unter Einschluss der NCF2-Expression mit dem SNP NCF4-rs1883113 für die Beschreibung der funktionellen Variabilität eine Steigerung der Modellprädiktion auf 12% erreicht werden. In CD14 und CD19 war bei Berücksichtigung der NCF2-Expression der oben beschriebene artifizielle Effekt des Messtages (Tab. 13 S.53) nicht mehr sichtbar. Die Modellprädiktion der funktionellen Variabilität in CD19 wurde auf 51% gesteigert, was einen extrem hohen Wert bedeutet.

Zell-	Parameter	Koeffizient,	Statistische	r <sup>2</sup> , adjustiert
typ		standardisiert	Signifikanz (p-Wert)	
CD3	Modell		0,001	0,12
	NCF2-Expression	0,28	0,004	
	NCF4 rs1883113	0,22	0,02	
CD14	Modell		0,00004	0,22
	NCF2-Expression*	0,32	0,001	
	RAC2 rs5756573	-0,22	0,02	
	NCF2 rs789181	0,19	0,04	
	NCF4 rs4820258	-0,28	0,004	
CD19	Modell		$3*10^{-16}$	0,51
	NCF2-Expression	0,65	$1*10^{-15}$	
	CYBB rs12848910	-0,22	0,002	
	NCF2 rs10911363	-0,18	0,009	

Tab. 14 Regressionsmodelle für kombinierten Einfluss von Expression und Genvarianten. Hier wurden als unabhängige Variablen nur die Parameter verwendet, die sich in den vorherigen Analysen (Tab. 11 und Tab. 13) mit einem p-Wert <0,05 auf die NADPH-Oxidase-Aktivität ausgewirkt hatten. Ansonsten entspricht die Vorgehensweise der in Tab. 13 beschriebenen. Die mit \*gekennzeichnete NCF2-Expression in CD14 war nicht normal verteilt.

#### 4.4.4 NOX-Polymorphismen mit Effekten auf Genexpression und Aktivität

Ein konsistenter Effekt auf Gentranskription und NOX-Aktivität in CD14 konnte für den SNP NCF4-rs741997 aufgezeigt werden (Abb. 11): verminderte Zahl an NCF4-Transkripten und geringere Enzymaktivität bei Vorliegen des Variantenallels (im heterozygoten Zustand). Ein entsprechender Trend auf die Aktivität fand sich auch in CD56 (Abb. 10, rechts S.53); wegen des geringen Anteils dieser Subpopulation an den Leukozyten konnten hier keine RNA gewonnen und somit keine Expressionsanalysen durchgeführt werden.



Abb. 11 Enfluss von NCF4-rs741997 auf NCF4-Genexpression und NOX-Aktivität in CD14. Homozygotie für das Variantenallel trat in der Studienpopulation nicht auf. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Eine gleichsinnige Modulation von Expression und Aktivität lag auch für den CYBB-SNP rs12848910 vor (Abb. 12). Bei Vorliegen des Variantenallels war in CD19 die ROS-Produktion und in den aus CD19 hergestellten LCLs die CYBB-Transkription vermindert. In den ausdifferenzierten CD19 selbst war zumindest auf RNA-Ebene kein Zusammenhang dieses Polymorphismus mit der CYBB-Expression zu sehen. Der Proteingehalt wurde nicht bestimmt.



Abb. 12 CYBB-SNP rs12848910 und NOX-Aktivität in CD19 (links) bzw. Expression in LCLs (rechts). Das linke Bild ist bereits in Abb. 9 gezeigt und beschrieben. Die CYBB-Transkripte sind auf ein gewichtetes Mittel aus GAPDH, HPRT1, SDHA, UBC und YWHAZ normiert. Für die statistische Testung mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde die heterozygote und homozygote Ausprägung des Variantenallels zusammengefasst.

# 4.5 Einfluss von NOX-Aktivität und -Genetik auf Zellvitalität

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die Genexpression von CYBA, CYBB, NCF2, NCF4 und RAC2 die Vitalität der LCLs und der CD3 beeinflusst. Hierfür wurden für die LCLs drei unterschiedliche Verfahren angewandt, für die CD3 nur der Zellvitalitätsassay mit AlamarBlue (Tab. 15).

In den LCLs wurde beobachtet, dass ein höheres Expressionsniveau von NCF2 mit einem deutlich geringeren Anteil lebender Zellen und in ähnlicher Weise auch mit einer reduzierten Zellvitalität verbunden war. In den CD3 war ein entsprechender Zusammenhang nicht zu sehen. Hier zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Expression von CYBB bzw. NCF4 mit der Zellvitalität, welche jedoch insgesamt nur leicht ausgeprägt war und sich mit zunehmender Zeitdauer noch etwas verstärkte.

	CYBA	A	CYBI	3	NCF2	2	NCF <sup>2</sup>	1	RAC2	2
	rho	р	rho	р	rho	р	rho	р	rho	р
LCLs Caspase	-0,02	0,9	-0,09	0,5	0,20	0,2	-0,05	0,7	0,20	0,2
Vitalität	0,07	0,6	0,20	0,2	-0,33	0,02	0,16	0,3	0,06	0,7
Lebende Zeller	n -0,02	0,9	0,13	0,4	-0,45	0,001	-0,04	0,8	-0,08	0,6
CD3 Vitalität, t <sub>28</sub>	n.b.	n.b.	0,23	0,03	-0,01	1,0	0,19	0,07	n.b.	n.b.
Vitalität, t <sub>48</sub>	n.b.	n.b.	0.25	0.01	0.09	0.4	0.23	0.02	n.b.	n.b.

Tab. 15 Korrelation zwischen NOX-Expression und Zellvitalitätsparametern. Bei den LCLs repräsentieren diese Daten die Verhältnisse auf Kontrollniveau und wurden in Zusammenhang mit der LCL-Studie gewonnen (Kultivierung bei 37°C in Medium). Die Caspase-Aktivität wurde über den Lumineszenz-basierten Caspase-Glo<sup>TM</sup>-3/7-Assay bestimmt, wobei der Messung eine einstündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur mit dem Assaysubstrat vorausging. Die Zellvitalität wurde fluorometrisch mittels des AlamarBlue-Assays erfasst (die 90 CD3-Linien 28 h bzw. 48 h nach Ende der Zellpräparation). Der Anteil lebender Zellen wurde durchflusszytometrisch durch fehlende Anfärbung mit Propidiumiodid bestimmt. Zur Normierung der Genexpression diente ein gewichtetes Mittel aus GAPDH, HPRT1, SDHA, UBC und YWHAZ. Die Stärke der Korrelation ist durch den Spearman Korrelationskoeffizienten rho angegeben, die zugehörige statistische Signifikanz als p-Wert. "n.b." = nicht bestimmt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die 48 NOX-Genvarianten einen Einfluss auf die Zellvitalitätsparameter in LCLs haben. Dabei wurden in der univariaten nicht-parametrischen Analyse mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test vier SNPs mit einer Assoziation von p < 0,05 mit der über AlamarBlue gemessenen Zellvitalität identifiziert. Diese wurden dann zusammen mit der NCF2-Expression als oben beschriebenem Einflussfaktor (Tab. 15) in einem linearen Regressionsmodell analysiert. Der stärkste Faktor war dabei die NCF2-Expression, welche allein etwa 10% der variablen Vitalität erklären konnte. Die Hinzunahme von NCF4-rs741998 erhöhte die Modellprädiktion auf 16% und der zusätzliche Einschluss von NCF2-rs10911363 sogar auf 22%. In den CD3 konnte für die Expression von CYBB allein eine Modellprädiktion von 10% ohne und bei Einschluss von NCF4-rs741998 von 16%

erzielt werden. Somit hatte der SNP NCF4-rs741998 in den LCLs und den CD3 einen nahezu identischen Effekt auf die durch AlamarBlue gemessene Zellvitalität, wobei diese bei Vorliegen des Variantenallels reduziert war.

In CD3 wurde nach 24 h in unbehandelten Zellen eine weitere PMA-stimulierte NOX-Aktivitätsmessung sowie nach 28 und 48 h eine Vitalitätsmessung mittels AlamarBlue-Assay vorgenommen. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen ROS-Produktion und Zellvitalität, stärker noch in Bezug zur Vitalitätsmessung nach 48h (Pearson-Korrelationskoeffizient r = 0,44;  $p = 7*10^{-6}$ ).

Parameter	Prädiktoren	Koeffizient,	Statistische	r <sup>2</sup> , adjustiert
		standardisiert	Signifikanz (p-Wert	)
LCL	Modell		0,003	0,22
	NCF2-Expression	-0,36	0,009	
	NCF4 rs741998	-0,28	0,04	
	NCF2 rs10911363	0,27	0,04	
CD3, t <sub>48</sub>	Modell		0,0002	0,16
,	CYBB-Expression	0,31	0,001	
	NCF4 rs741998	-0,25	0,01	

Tab. 16 Kombinerter Einfluss von Genexpression und –varianten auf Zellvitalität in LCLs und CD3. Die abhängige Variable dieser linearen Regressionsanalyse war die mit AlamarBlue gemessene Vitalität (bei CD3 der Messwert 48 h nach Zellpräparation). Als unabhängige Variablen wurden die Genexpressionsdaten und SNPs, welche bei univariater Analyse mit dem Jonckheere-Terpstra-Test ein Signifikanzniveau < 0,05 erreichten, ins Modell gegeben. Ansonsten sind Vorgehensweise und Darstellung wie in Tab. 13 beschrieben.

# 4.6 Effekte durch Bestrahlung

Die bei einer Strahlentherapie auftretenden biologischen Effekte sind zu ca. 95% durch die Bildung von ROS bedingt. Daher war ein weiteres Ziel meiner Arbeit, zu untersuchen, ob durch Röntgenstrahlung die Expression von NOX-Genen verändert wird. Weiterhin war zu prüfen, ob Expression und Polymorphismen in NOX-Genen einen Einfluss auf ROS-Produktion und Zellvitalität nach Bestrahlung haben. Als Untersuchungsmaterial dienten isolierte CD3 von 97 Spendern und 48 kommerziell erworbene LCLs (siehe Methodenteil).

## 4.6.1 NOX-Expression, - Aktivität und Zellvitalität nach 3 Gy

Mit 3 Gy bestrahlte LCLs zeigten nach 4 h eine Abnahme der Genexpression vor allem von CYBB und NCF4 (Suppression um ca. 20% im Median), geringer von NCF2, jedoch nicht von CYBA und RAC2 (Abb. 13). Bei den ROS wurde hier eine starke Zunahme um ca. 50% beobachtet, bei einer insgesamt starken Streuung. Wie erwartet kam es zu einer Steigerung der Caspase-Aktivität und einer Reduktion der Vitalität und des Anteils lebender Zellen, wobei letztere beiden Parameter nach 30 h im Median nur um ca. 10% vermindert





Abb. 13 Effekte von 3 Gy auf Expression von NOX-Genen, ROS-Produktion und Zellvitalität in 48 LCLs. Es sind jeweils die Behandlungs-induzierten Veränderungen nach Behandlungsbeginn in Relation zum Kontrollniveau dargestellt. Die Expression von fünf NOX-Genen wurde nach einer Inkubationszeit von 4 h, ROS als Oxidation von DCFH nach 30 h, Caspase-Aktivität nach 24 h, Vitalität als AlamarBlue-Assay nach 30 h sowie der Anteil lebender Zellen durchflusszytometrisch nach 30 h bestimmt. Die Richtung der Veränderung ist durch ein Pfeilsymbol angezeigt mit Angabe des p-Wertes für die statistische Signifikanz (berechnet mit dem gepaarten Wilcoxon-Rangsummentest).

Da sich Änderungen der Genexpression in den LCLs nach Bestrahlung bei CYBB, NCF2 und NCF4 zeigten, konzentrierten sich entsprechende Analyen bei den CD3 auf diese drei Gene. Eine Suppression wie bei den LCLs konnte hier jedoch nicht beobachtet werden. Es fiel im Gegenteil eine Expressionssteigerung um ca. 20% von CYBB und NCF2 24 h nach 2 Gy auf (Abb. 14). Die Zunahme von ROS fiel hier mit etwa 20% geringer aus als bei den LCLs. Die Messung der Zellvitalität zeigte nach 28 h eine nahezu identische Verminderung wie bei den LCLs nach 30h. Nach 48 h hatte sich diese noch etwas verstärkt.



Abb. 14 Effekte von 2 Gy auf Expression von NOX-Genen, ROS-Produktion und Zellvitalität in CD3. Die Daten beziehen sich auf isolierte Zellen von 97 genetisch unterschiedlichen Spendern. Durch die Behandlungen hervorgerufene Veränderungen wurden relativ auf einen mitgeführten Kontrollansatz bezogen. Die Expression von CYBB, NCF2 und NCF4 wurde nach 24 h bestimmt. ROS wurden nach Stimulation mit PMA (*ad* 10 ng/ml) ohne Parallelansatz mit DPI über L012-vermittelte Lumineszenz gemessen. Die Zellvitalität wurde mit dem AlamarBlue-Assay 28 und 48 h nach Behandlungs beginn erfasst. Die Richtung der Veränderung ist durch ein Pfeilsymbol angezeigt mit Angabe des p-Wertes für die statistische Signifikanz (berechnet mit dem gepaarten Wilcoxon-Rangsummentest).

### 4.6.2 Genetische Prädiktoren der Bestrahlungseffekte

Die oben beschriebenen Effekte von 3 Gy auf ROS und Zellvitalitätsparameter in LCLs (Abb. 13) wurden nun auf einen möglichen Zusammenhang mit Expressionsänderungen von NOX-Genen und zugehörigen Polymorphismen untersucht. Während Expressionsdaten zwischen wiederholten Messungen einer Zelllinie dynamisch sind, werden Genpolymorphismen als konstante Faktoren betrachtet, welche nur dann einen relevanten Einfluss haben können, wenn eine gewisse Reproduzierbarkeit der Messdaten bei Wiederholungsmessungen gegeben ist.

Von 13 LCLs wurden Wiederholungsmessungen mit neu aufgetauten und kultivierten Aliquots durchgeführt und geprüft, inwieweit Effekte durch 3 Gy, IL10 und TGFβ1 reproduzierbar sind. Für korrespondierende Behandlungen wurde nicht-parametrisch mit dem Koeffizienten rho nach Spearman der Korrelationsgrad bestimmt. Bei den durch die Behandlungen hervorgerufenen Effekten war bei den Caspase-Messungen kein statistisch signifikanter Zusammenhang als Hinweis auf Reproduzierbarkeit der induzierten Veränderungen nachweisbar. Bei der Bestimmung des Anteils lebender Zellen war zwischen den unabhängigen Experimenten für die Bestrahlung mit 3 Gy eine positive Korrelation nachweisbar (Abb. 15). Beim mit AlamarBlue durchgeführten Proliferationsassay zeigten sich nur unter TGFβ1 (siehe nächstes Kapitel) positive Korrelationen zwischen den beiden im Abstand von 4-6 Wochen durchgeführten Experimenten (Abb. 15). Folglich erschien die Analyse von Genpolymorphismen als möglichen Prädiktoren der Funktionsmessungen bei den LCLs nur für die beiden in Abb. 15 dargestellten Parameter sinnvoll.



Abb. 15 Inter-Messtag-Korrelation von Funktionsparametern bei LCLs. Die Messungen waren für 13 Zelllinien im Abstand von 4-6 Wochen wiederholt worden. Im linken Bild ist die Reduktion des Anteils lebender Zellen durch 3 Gy dargestellt (nach 30 h durchflusszytometrisch analysiert). Rechts ist die auf das Kontrollniveau bezogene Vitalität 30 h nach Behandlung mit TGF $\beta$ 1 gezeigt (gemessen mit AlamarBlue). Die Stärke der Korrelation ist durch den nicht-parametrischen Koeffizienten rho nach Spearman mit dem zugehörigen Signifikanzniveau angegeben.

In LCLs zeigte sich nach Bestrahlung mit 3 Gy eine positive Korrelation zwischen dem Anteil lebender Zellen und der NCF4-Expressionsänderung (Pearson-Korrelationskoeffizient r = 0,38, p = 0,009, Abb. 16). Weiterhin war der Anteil lebender Zellen positiv mit der Proliferation korreliert (Spearman rho = 0,32 und p = 0,03). Die durch 3 Gy hervorgerufene und noch nach 24 h nachweisbare ROS-Induktion (Abb. 13) war weder mit den betrachteten drei Zellvitalitätsparametern noch mit der Expression der fünf untersuchten NOX-Gene verbunden.



Abb. 16 Beziehung zwischen NCF4-Transkription und Anteil lebender Zellen nach Bestrahlung von LCLs mit 3 Gy. Beide Parameter sind Kontroll-bereinigt und genügen der Annahme einer Nor mal ver teilung (gemäß Kol mogor ov-Smirnov-Test), weshal b eine parametrische Analyse durchgeführt werden konnte (Stärke der Korrlelation dements prechend als Pearson r ausgedrückt).

Da sich für den durch 3 Gy veränderten Anteil lebender Zellen eine substanzielle Korrelation bei den Wiederholungsmessungen zeigte (Abb. 15 links), wurden hier auch ein potenzieller Einfluss von Genpolymorphismen als innerhalb einer Zelllinie konstanten Parameter geprüft. Die Kombination aus NCF4-Transkriptmenge und dem SNP RAC2 rs6572 ergab für die Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen nach 3Gy-Behandlung eine Modellprädiktion von 21%.

Parameter	Prädiktoren	Koeffizient,	Statistische Sig	nifikanz r², adjustiert
		standardisiert	(p-Wert)	
$\Delta$ vitale Zellen	Modell		0,007	0,21
nach 3Gy	$\Delta NCF4$ -Expression	on0,37	0,02	
	RAC2 rs6572	-0,34	0,03	

Tab. 17 Kombinierter Einfluss von *NCF4*-Expression und rs6572 auf Vitalitätsabnahme durch 3Gy. Darstellung entsprechend wie oben.

Bei den CD3 konnte nach 2-Gy-Behandlung kein Einfluss der Expressionsänderung von CYBB, NCF2 oder NCF4 auf die Menge an ROS nachgewiesen werden. Ebenso wirkten sich die Behandlungs-induzierten Expressionsänderungen dieser Gene nicht auf die durch 2 Gy veränderte Vitalität aus. Die verstärkte Transkription von NCF2 nach Bestrahlung war durch den SNP rs2274064 im Exon 5 dieses Gens beeinflusst, ohne dass jedoch ein Zusammenhang dieser Genvariante mit der ROS-Produktion und Zellvitalität bestand.

Bezüglich eines möglichen Einflusses von Genpolymorphismen auf durch 2 Gy veränderte ROS-Produktion und Vitalität in CD3 wurde zunächst eine univariate Analyse mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test durchgeführt. Nur Genvarianten, die in dieser Analyse ein Signifikanzniveau von  $p \le 0.05$  erreichten, wurden für das nachfolgende lineare Regressionsmodell berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in Tab. 18 zusammengefasst. Durch kombinierte Betrachtung der SNPs RAC2 rs221343 und NCF4 rs741997 konnten im Regressionsmodell 11% der funktionellen Variabilität der durch 2 Gy veränderten, PMAinduzierbaren ROS-Produktion erklärt werden. Mit entsprechenden Analysen für die Vitalität waren nach 28 bzw. 48 h durch vier bzw. eine Genvariante 18 bzw. 7% der Variabilität determiniert. Somit hatten die untersuchten NOX-Varianten bei fortschreitender Inkubationszeit einen zunehmend geringeren Einfluss auf die Vitalität (einzig der Effekt von RAC2 rs9607388 war auch bei der längeren Inkubationszeit noch vorhanden).

Parameter	Prädiktoren	Koeffizient,	Statistische Signifikanz r <sup>2</sup> , adjustiert		
		standardisiert	(p-Wert)	-	
ROS 2Gy zu	Modell		0,002	0,11	
Kontrolle	RAC2 rs2213430	0,27	0,006		
	NCF4 rs741997	0,22	0,02		
Proliferation	Modell		0,0005	0,18	
28 h nach 2Gy	RAC2 rs9607388	0,22	0,03		
	NCF4 rs741998	-0,28	0,01		
	NCF4 rs8137602	-0,21	0,03		
	CYBB rs7059081	-0,20	0,05		
Proliferation	Modell		0,006	0,07	
48 h nach 2Gv	RAC2 rs9607388	0.28	0.006		

Tab. 18 SNP-Prädiktoren für 2-Gy-vermittelte Änderungen von ROS und Vitalität in CD3. Die Vitalität war mit dem AlamarBlue-Assay bestimmt worden, wobei das Substrat 24 h nach Bestrahlung zugegeben wurde und dann eine Inkubation für weitere 4 und 24 h erfolgte. Die Darstellungsweise entspricht analogen obigen Tabellen.

Im Regressionsmodell mit mehreren unabhängigen Variablen nicht signifikant war der SNP rs6572, der univariat nach Jonckheere-Terpstra mit der Zellvitalität 28 h nach 2 Gy-Bestrahlung assoziiert war (p = 0,04). Wie bei den LCLs war hier die Vitalität in Gegenwart des Variantenallels stärker reduziert.

# 4.7 Effekte durch TGFβ1

Als bedeutendes proinflammatorisches Zytokin ist ein Zusammenhang von TGF $\beta$ 1 und ROS-Produktion naheliegend. Daher sollte untersucht werden, ob TGF $\beta$ 1-vermittelte Effekte auf ROS durch Expression und Polymorphismen von NOX-Genen moduliert werden.

# 4.7.1 NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach TGFβ1

In den LCLs war 4 h nach TGFβ1-Behandlung keine Modulation der NOX-Genexpression feststellbar. Die ROS-Produktion war nach 30 h gesteigert, die Vitalitätsparameter (Caspase-
Aktivität, Proliferationsassay mit AlamarBlue und Anteil lebender Zellen bestimmt mit Durchflusszytometrie) waren unverändert.

Auch bei den CD3 fand sich nach TGF $\beta$ 1-Behandlung eine erhöhte Menge an PMAinduzierbaren ROS (Abb. 17). Auf Expressionsebene waren CYBB und NCF2 um ca. 25% gesteigert, NCF4 dagegen um etwa 25% gegenüber der Kontrolle vermindert. Die Zellvitalität war leicht verringert. Dabei wies die über DCFH bestimmte Menge an ROS eine negative Korrelation mit dem Anteil lebender Zellen nach TGF $\beta$ 1-Behandlung auf (rho = -0,35, p = 0,02).



Abb. 17 TGFβ1-Effekte auf NOX-Expression, ROS und Vitalität in 97 CD3-Linien. Hier war mit 5 ng/ml rekombinantem humanem TGFβ1 bei 37°C für 24 h (Expression und ROS) bzw. für 28 und 48 h (Vitalität) inkubiert worden. Darstellung analog zu Abb. 14.

#### 4.7.2 Genetische Prädiktoren der Effekte von TGFβ1

Bei den LCLs wies nach TGFβ1-Behandlung nur die mit AlamarBlue gemessene Zellproliferation eine signifikant positive Korrelation zwischen zwei Messtagen auf (siehe oben Abb. 15 rechts S.60). Für diesen Parameter wurden daher neben den Expressionsdaten auch Genpolymorphismen als potenzielle Prädiktoren der Auswirkungen einer TGFβ1-Behandlung auf die Zellvitalität berücksichtigt. Dabei war in univariater Analyse nur der exonische NCF2-SNP rs2274064 mit p < 0.05 assoziiert: im Median zeigte sich bei Homozygotie für das Variantenallel von rs2274064 eine um 13% gesteigerte Proliferation.

Die Auswirkungen von TGF $\beta$ 1 auf die ROS-Menge in CD3 waren abhängig von der Anzahl von CYBB-Transkripten: je höher die Menge an CYBB-Transkripten, desto mehr ROS (siehe Abb. 18). Ein Einfluss von Polymorphismen fand sich hier nur für den SNP RAC2 rs2239775 (p < 0,05 gemäß Jonckheere-Terpstra-Test). Zusammen mit der CYBB-Transkription konnten dadurch 13% der funktionellen Variabilität bestimmt werden (Tab. 19). Ein Effekt von Genpolymorphismen in CYBB, NCF2 und NCF4 auf die Expressionsänderungen der jeweiligen Gene war nicht nachweisbar.



Abb. 18 **Korrelation** zwischen den TGF<sub>81</sub> Effekten von auf CYBB-Transkription und ROS in 97 CD3-Linien. Die ROS wurden als relative light units (RLUs) nach Stimulation mit 10 ng/ml **PMA** durch L-012-vermittelte Chemilumineszenz gemessen und das Maximum innerhalb von 90 min bei 37°C nach Zugabe von PMA für die Auswertung verwendet. Zur Normierung der CYBB-Transkripte dienten GAPDH, HPRT1. UBC und YWHAZ als Referenzgene. Beide Parameter wurden nach 24 h Inkubation mit 5 ng/ml TGF<sup>β</sup>1 erfasst. Sie sind Kontroll-bereinigt und genügen einer der Annahme Nor mal ver teilung (gemäß Kol mogor ovweshal b Smirnov-Test), eine parametrische Analyse durchgeführt werden konnte (Stärke der Korrlelation de ments prechend als Pearson ausgedrückt).

Die bei den LCLs beobachtete Abhängigkeit der TGF $\beta$ 1-Proliferationshemmung von NCF2 rs2274064 war bei den CD3 nicht zu sehen, weder nach 28 noch nach 48 h Inkubationsdauer. Hingegen war beim 28-h-Intervall die TGF $\beta$ 1-vermittelte Proliferationshemmung bei Vorliegen homozygoter Variantenallele von CYBB rs4422908 bzw. rs5917471 aufgehoben (univariat p = 0,04 bzw. 0,01). Im multipen Regressionsmodell wurde jedoch für diese SNPs die Signifikanzschwelle von 0,05 nicht ganz erreicht. Nach der Inkubationszeit von 48 h waren univariat je zwei SNPs in CYBA und RAC2 mit der Proliferation mit p < 0,05 assoziiert, wobei sich die beiden RAC2 SNPs rs11089831 und rs2284038 auch im Regressionsmodell als signifikante Prädiktoren erwiesen (Tab. 19).

Parameter	Prädiktoren	Koeffizient,	Statistische Signifikanz	r <sup>2</sup> , adjustiert
		standardisiert	(p-Wert)	
$\Delta \operatorname{ROS}$ nach	Modell		0,001	0,13
TGFβ1	$\Delta$ CYBB-Expression	0,30	0,003	
	RAC2 rs2239775	-0,22	0,03	
$\Delta$ Proliferation	Modell		0,0003	0,15
nach TGFβ1	RAC2 rs11089831	0,36	0,001	
	RAC2 rs2284038	-0,36	0,001	

Tab. 19 Prädiktoren der TGFβ1-modulierten, stimulierbaren ROS-Produktion in CD3. Vorgehensweise wie oben beschrieben.

Ähnlich wie bei TGF $\beta$ 1 waren in CD3 auch die Auswirkungen einer IL1 $\beta$ -Behandlung auf die ROS stark positiv mit der CYBB-Expression korreliert (r = 0,4, p = 0,00004). In einem linearen Regressionsmodell hatte hier zudem der RAC2-SNP rs13058338 einen Einfluss (r = 0,24, p = 0,01). Beide Parameter zusammen waren für 23% der durch IL1 $\beta$ -modulierten und PMA-stimulierbaren ROS-Produktion verantwortlich (p = 0,00003).

#### 4.8 Effekte durch IL10

IL10 ist eines der wichtigsten anti-entzündlichen Zytokine des menschlichen Körpers. Die anti-inflammatorische Wirkung dürfte sich unter anderem auch in einer Hemmung der ROS-Produktion widerspiegeln.

#### 4.8.1 NOX-Expression, -Aktivität und Zellvitalität nach IL10

In LCLs war nach einer Behandlungszeit von 4 h bei 37°C mit 5 ng/ml rekombinatem humanem IL10 keine Veränderungen der Expression der NOX-Gene messbar. Auch die ROS-Level waren 30 h nach Beginn der Inkubation mit dem Zytokin auf Kontrollniveau, ebenso die Zellproliferation und der Anteil lebender Zellen. Lediglich die Caspase-Aktivität zeigte sich nach 24 h vermindert (ohne Abbildung).

In den CD3 blieb die Expression von CYBB nach IL10 unverändert (Abb. 19), während NCF2 eine deutliche Abnahme um mehr als 50% und NCF4 eine starke Zunahme zeigte. Bei TGFβ1 war dies umgekehrt (siehe Abb. 17). Ein starker Effekt zeigte sich auch auf die PMA-stimulierbaren ROS, welche nach 24 h Inkubation mit IL10 im Median auf etwa die Hälfte reduziert waren. Die Vitalität war nach 28 h geringfügig, nach 48 h etwas stärker vermindert.



Abb. 19 IL10-Effekte auf NOX-Expression, ROS und Vitalität in 97 CD3-Linien. Die Behandlungszeit mit 5 ng/ml rekombinantem humanem IL10 bei 37°C betrug für Expression und ROS 24 h und für Zellvitalität (AlamarBlue-Asssay) 28 und 48 h. Darstellung analog zu Abb. 14.

#### 4.8.2 Genetische Prädiktoren der Effekte von IL10

Wenngleich bei den LCLs insgesamt keine signifikante Veränderung der Expression der NOX-Gene durch die IL10-Behandlung zu verzeichnen war, zeigte sich eine tendenziell positive Korrelation zwischen den IL10-induzierten Effekten auf die CYBB-Expression und die ROS-Produktion (Spearman rho = 0,27, p = 0,07). Die mit dem AlamarBlue-Assay gemessene Proliferationsänderung durch IL10 (gegenüber der Kontrolle insgesamt nicht nennenswert verändert) war negativ mit der Expressionsänderung von NCF4 bzw. RAC2 (beide rho = -0,32, p = 0,03) und tendenziell auch mit der von CYBB (rho = -0,27, p = 0,07) korreliert. Eine Testung auf Assoziation mit Genpolymorphismen erschien an dieser Stelle nicht sinnvoll, da für die Wiederholungsmessungen keine substanzielle Reproduzierbarkeit der nach IL10-Behandlung gemessenen funktionellen Parameter vorlag.

Bei den CD3 war ein extrem starker Zusammenhang zwischen den IL10-Effekten auf die ROS-Produktion und die NCF4-Expression nachweisbar. Weiterhin bestand ebenfalls eine deutliche, wenngleich etwas schwächere positive Korrelation mit der NCF2-Expressionsänderung. Des Weiteren wurde eine positive Assoziation zwischen der Veränderung der ROS durch IL10 und den beiden SNPs NCF4 rs1883113 und CYBB rs4422908 ermittelt, die jedoch nicht in Beziehung zu den Expressionsänderungen der jeweiligen Gene standen.

Unter Einschluss dieser vier Faktoren in ein Regressionsmodell konnten 38% der IL10vermittelten ROS-Änderung determiniert werden. Diese vier Prädiktoren sind in Abb. 20 und Abb. 21 bildlich veranschaulicht. Im Hinblick auf die Zellproliferation zeigte sich nur eine geringgradige Beeinflussung durch einen bzw. zwei SNPs (ohne Abbildung).

Parameter	Prädiktoren	Koeffizient,	Statistische Signifikanz	r <sup>2</sup> , adjustiert
		standardisiert	(p-Wert)	
$\Delta$ ROS nach IL10 Modell			2*10 <sup>-9</sup>	0,38
	NCF4-Expression	0,44	1*10 <sup>-6</sup>	
	NCF2-Expression	0,29	0,001	
	NCF4 rs1883113	-0,18	0,03	
	CYBB rs4422908	-0,17	0,04	
$\Delta$ Proliferation	Modell		0,02	0,05
28 h nach IL10	RAC2 rs1476002	-0,25	0,02	
$\Delta$ Proliferation	Modell		0,005	0,09
48 h nach IL10	RAC2 rs2213430	0,25	0,02	
	CYBB rs12848910	0,23	0,02	

Tab. 20 Einflussfaktoren für die Wirkung von IL10 auf ROS und Proliferation in CD3. Die Vorgehensweise für dieses Modell war wie oben beschrieben. Es wurden nur Faktoren berücksichtigt, die in der univariaten Analyse eine Assoziation von p < 0.05 aufwiesen. Bei den ROS wurden der dekadische Logarithmus der Rohdaten verwendet, damit eine Normalverteilung angenommen werden konnte (die Messwerte von zwei CD3-Linien desselben Isolationstages blieben als Ausreißer hier unberücksichtigt; dies führte zu einer konservativeren Modell prädiktion).



Abb. 20 Korrelation zwischen den Effekten von IL10 auf NOX-Expression und ROS-Produktion. Links sind die Verhältnisse für NCF2, rechts die für NCF4 dargestellt. Es wurden dieselben Daten wie in Tab. 20 zu Grunde gelegt.



Abb. 21 Einfluss von SNPs auf IL10-modulierte ROS-Produktion. Bei NCF4 rs1883113 wurde der eine homozygote Variantenallelstatus mit den heterozygoten Trägern zusammengefasst und mit dem Mann-Whitney-U-Test gegenüber dem homozygoten Wildtyp-Allel werglichen. Bei CYBB rs4422908 wurde zur Prüfung der statistischen Signifikanz der Jonckheere-Terpstra-Trend-Test angewandt, der eine ordinale Skalierung der drei Genotyp-Konfigurationen annimmt.

# 5 Diskussion

Die gewonnenen Ergebnisse sollen nun anhand der nachstehenden Gliederung diskutiert und mit bestehenden Literaturbefunden verglichen werden:

- Vergleichende Darstellung der NOX-Aktivität und der NOX-Expression in vier Leukozyten-Fraktionen und in aus B-Lymphozyten durch EBV-Immortalisierung generierten LCLs.
- 2. Genexpression von NOX-Untereinheiten in Bezug zu NOX-Aktivität und Zellvitalität.
- 3. Funktionelle Bedeutung von NOX-Genpolymorphismen.
- NOX-bezogene Biomarker f
  ür die Effekte von Bestrahlung, TGF
  β1, IL1
  β und IL10 auf NOX-Expression, ROS-Produktion und Zellvitalit
  ät.

### 5.1 NOX-Aktivität und -Expression in CD3, 14, 19, 56 und in LCLs

Die weitaus stärkste PMA-stimulierbare NOX-Aktivität pro Zelle war in CD14 nachzuweisen (siehe nachfolgende Abb. 22 S. 70 und Abb. 4 S. 42 im Ergebnisteil). Wegen dieser erheblichen Unterschiede ist die Gewinnung einer möglichst homogenen Zellpopulation essenziell. Daher wurde eine aufwändige Separation – bestehend aus Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und spezifischer Antikörper-basierter FACS-Sortierung – durchgeführt und anschließend auf eine definierte Zelldichte eingestellt, um die Zellen unterschiedlicher Probanden miteinander vergleichen und einen möglichen Einfluss von Expressions- und Genotyp-Parametern prüfen zu können.

Zunächst war man davon ausgegangen, dass NADPH-Oxidasen auf phagozytäre Zellen beschränkt sind (Babior 1978b; Babior 1978a). Heute weiß man, dass NOX-Enzyme in zahlreichen Zelltypen vorkommen (siehe Tab. 2 S.6). Bei letzteren dient die Produktion von Superoxid meist als intrazelluläres Signalmolekül. Inwieweit andere als phagozytierende Zellen auch zur extrazellulären Abgabe von Superoxid – wie von mir mittels des L-012-Assays gemessen – befähigt sind, ist in der Literatur kontrovers diskutiert. Klar ist, dass eine etwaige extrazelluläre Superoxid-Freisetzung in nicht-phagozytierenden Zellen quantitativ weit gegenüber derjenigen in phagozytierenden Zellen zurücksteht. Dies ist in meinen Daten aus dem Vergleich der NOX-Aktivität in CD14 gegenüber den anderen drei Zelllinien ersichtlich (Unterschied etwa drei Zehnerpotenzen).



Abb. 22 Vergleich der PMA-stimulierbaren NOX-Aktivität zwischen CD3, CD14, CD19 und CD56. Damit die sehr unterschiedlichen Aktivitäten in einer Grafik dargestellt werden konnten, wurde eine logarithmische Auftragung gewählt.

Die Expression eines den Phagozyten ähnlichen NOX-Systems wurde für B-Lymphozyten bereits 1989 postuliert (Maly et al. 1989). Nach Stimulierung mit PMA konnte nur etwa 1% an ROS-Aktivität verglichen mit Monozyten (CD14) oder neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Kobayashi et al. 1990). Mittlerweile wurde erkannt, dass es sich hierbei um dieselbe NOX-Isoform 2 wie bei den Phagozyten handelt (siehe Tab. 2 S.6), allerdings schwächer exprimiert. Auch in meinen Messungen war das NOX-2 entsprechende CYBB-Gen in CD19 geringer exprimiert als in CD14 (Tab. 9 S.45). Ein ähnlicher Befund lag für die aktivierende zytosolische Komponente NCF2 vor, wohingegen für die anderen Untereinheiten in CD19 nicht weniger (bei NCF4 und RAC2) bzw. sogar mehr RNA-Transkripte (CYBA) gefunden wurden. Eine klare Korrelation zwischen der mRNA-Expressionsstärke und der NOX-Aktivität scheint demnach nicht vorzuliegen. Ein Grund hierfür könnte eine unterschiedlich starke Translationseffizienz sein, welche durch Western Blot untersucht werden kann.

Lange Zeit war nicht bekannt, dass T-Lymphozyten eine Phagozyten-ähnliche NADPH-Oxidase besitzen. Es konnte jedoch vor einigen Jahren eindeutig nachgewiesen werden, dass die phagozytären NOX-Untereinheiten auch in diesen Zellen exprimiert sind (Jackson et al. 2004). Ein niedriges Expressionsniveau auf Proteinebene im Vergleich zu CD14 und CD19 war dabei v.a. für NOX2 beobachtet worden. Dies steht in Einklang mit meinen mRNA-Messdaten (Tab. 9), wobei wieder eine mutmaßlich sehr variable Translation zu berücksichtigen ist.

Bereits 1982 war von einer ROS-vermittelten Chemolumineszenz in NK-Zellen (CD56) berichtet worden (Helfand et al. 1982), was aber kurz danach bestritten wurde (Domzig und Maly 1985). Die von mir parallel durchgeführte Messung mit DPI ließ eindeutig auf eine Flavoenzym-spezifische ROS-Produktion in CD56 schließen. In Anbetracht des sehr kleinen Anteils dieser Population an der Zellpräparation muss die Möglichkeit einer – wenn auch absolut betrachtet geringen, so doch relativ gesehen – relevanten Kontamination durch Zellen mit hoher NOX-Aktivität (CD14) erwogen werden. Der grafische Verlauf nach PMA-Stimulation unterschied sich jedoch deutlich von dem der CD14, so dass zumindest ein Teil der in der CD56-Fraktion gemessenen NOX-Aktivität tatsächlich von diesen Zellen herrühren könnte. Neuere Daten dazu fanden sich in der Literatur nicht.

Für LCLs wurde über die Messung einer NOX-Aktivität berichtet. Diese soll nach PMA-Stimulation bis zu 5% derjenigen in neutrophilen Granulozyten betragen (Batot et al. 1998). In dieser Arbeit wurde zum ROS-Nachweis die photometrische Reduktion von Cytochrom-c eingesetzt. Diese Technik ist auch in unserem Labor verfügbar und eine spezifische PMAstimulierbare NOX-Aktivität war - in Gegenwart einer für LCLs ausreichend hohen FCS-Konzentration – nicht nachzuweisen. Dies galt sowohl für Lumineszenz- als auch Fluoreszenz-basierte Verfahren. Ein Entzug von FCS unter 1%, wie er für diese Messungen erforderlich gewesen wäre, führte aber bereits binnen 15 min zu einer erheblichen Minderung der Vitalität der LCLs und wurde daher verworfen. Wurde mit dem heutigen Goldstandard der Elektronenspinresonanz unter FCS-Entzug über 60 min ohne und mit dem Inhibitor DPI gemessen, zeigte sich, dass die PMA-stimulierbare ROS-Produktion in LCLs praktisch nicht auf Flavoenzymen und damit auch nicht auf NOX-Enzymen beruhte. Eventuell könnten sinnvolle ESR-Messungen mit LCLs innerhalb des für den FCS-Entzug tolerablen Zeitfensters von etwa 10 min durchgeführt werden, wie in der Literatur erfolgreich beschrieben (Dikalov et al. 2007). Aus Gründen des Versuchsablaufs erschien dieser Zeitrahmen für die Serienmessungen in meiner Arbeit als ungeeignet. Zudem ist zu berücksichtigen, dass nach Zugabe von PMA eine Inkubationszeit von etwa 20-30 min zur vollen Stimulierung der NADPH-Oxidase-Aktivität erforderlich ist. Hinzu kommt, dass PMA selbst in geringen Konzentrationen die durchflusszytometrisch bestimmte Vitalität der LCLs innerhalb von 1530 min deutlich reduzierte. Damit ging eine massive ROS-Bildung einher, die jedoch unspezifisch und nicht auf die NADPH-Oxidase zurückzuführen war.

Eine neuere Arbeit, welche ebenfalls die Machbarkeit einer NOX-Aktivitätsmessung in LCLs suggeriert (Bedard et al. 2009), basiert auf einem Redox-Assay (AmplexRed), welcher aber primär Wasserstoffperoxid und nicht Superoxid nachweist. Mit diesem Assay konnte auch in unserem Labor eine PMA-abhängige und Flavoenzym-spezifische ROS-Produktion aufgezeigt werden. Gegen eine nennenswerte NOX-Aktivität in den LCLs spricht auch die – in Relation zu den verwendeten Referenzgenen – geringere Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten (v.a. der katalytischen NOX2) im Vergleich zu den Blutzellfraktionen (Tab. 9 S.45).

#### 5.2 NOX-Genexpression: Bezug zu Enzymaktivität und Zellvitalität

Der stärkste Zusammenhang wurde zwischen der NOX-Aktivität in CD19 und der mRNA-Transkripte von NCF2 und CYBB beobachtet (Tab. 11 S.48). Auf den ersten Blick erscheint eine stark positive Beziehung der Expression von NOX-Untereinheiten mit der Enzymaktivität sehr naheliegend; diese ist aber, wenn man andere Untereinheiten wie CYBA und NCF4 betrachtet, keinesfalls selbstverständlich. Besonders für die katalytische CYBB-Untereinheit ist die Korrelation von Genexpression (mRNA und Protein) in der Literatur durch zahlreiche mechanistische Untersuchungen zwar gut belegt. spezifische Korrelationsanalysen zur quantitativen Beschreibung in einer großen Stichprobe gibt es bislang aber nicht. Auffällig in meinen Daten ist ebenfalls, dass dieser Zusammenhang offenbar v.a. für CD19 gilt. In Bezug auf CD3 und CD14 war die mRNA-Expression von CYBB und NCF2 ebenfalls statistisch signifikant korreliert, wenngleich deutlich schwächer ausgeprägt. Die Heterogenität der Beziehung zwischen den mRNA-Transkripten von CYBB und NCF2 einerseits und der NOX-Aktivität andererseits in den unterschiedlichen Zelltypen Ausdruck einer Variabilität in der Translationseffizienz oder in könnte der Stimulationskaskade sein. Bei LCLs ergab die Korrelationsanalyse zwischen Expression von NOX-Untereinheiten und ROS-Produktion den stärksten Einfluss für RAC2 und in geringerem Ausmaß für CYBA und CYBB (Tab. 12). Für LCLs ist eine positive Korrelation zwischen dem Proteingehalt an CYBB bzw. NCF1 und der NOX-Aktivität beschrieben (Condino-Neto und Newburger 1998). Im Hinblick auf CYBB deckt sich dies mit meinen Befunden. Auf die Messung von NCF1 wurde in meiner Arbeit verzichtet, da beim Menschen auf DNA-Ebene drei Pseudogene existieren und die eindeutige Bestimmung mit den üblichen Methoden nicht möglich ist (auch die kommerziellen Assays zur Genexpression sind nicht

spezifisch). Zum hier beobachteten starken Effekt von RAC2 in LCLs gibt es zur Zeit noch keine Vergleichsdaten.

Nicht nur die NOX-Aktivität zeigte sich in erheblichem Maße von der Expressionsstärke von NCF2 abhängig, sondern auch die Zellvitalität. In LCLs, welche den CD19 sehr ähnlich sind, war die basale Vitalität negativ mit der Transkriptionsstärke von NCF2 korreliert (Tab. 15 S.56). Zu diesem Sachverhalt gibt es in der Literatur bislang keinen eindeutigen Vergleich. Einen indirekten Hinweis der Bedeutung von NCF2 für die Zellvitalität lieferte eine Arbeit, in welcher durch spezifische Behandlungen u.a. die bei der phago zytären Stimulation der NOX auftretende Translokation des Proteinprodukts von NCF2 (p67phox) an die Zellmembran verhindert wurde und parallel die Expression pro-apoptotischer Gene und apoptotischer Vorgänge abnahm (Yu et al. 2005).

### 5.3 Assoziationen von NOX-Genpolymorphismen

Für die PMA-stimulierte NOX-Aktivität konnte kein NOX-Genpolymorphismus gefunden werden, der in allen vier untersuchten Zellarten einen nominal signifikanten Effekt gezeigt hätte (Tab. 13 S.51). Dies ist aber keine Erfodernis für die Funktionalität einer Genvariante, da auch Kontext-abhängige Effekte vorliegen können bzw. sich die Zusammensetzung der NADPH-Oxidase Zelltyp-abhängig unterscheidet. Nimmt man als wesentliches Kriterium für eine Funktionalität eine gleichsinnige Beeinflussung von Genxpression und Aktivität, so zeichnet sich eine mögliche biologische Plausibilität für die nachfolgend aufgeführten vier Genpolymorphismen ab.

Der SNP rs741997 in NCF4 zeigte einen konsistenten Einfluss auf die Transkription des entsprechenden Genprodukts und die NOX-Aktitvität in CD14 (Abb. 11 S.55). Zudem zeigte sich auch ein entsprechender Trend in CD56 (Abb. 10, rechts S.53). Über eine medizinische oder biologische Bedeutung dieser Variante ist bislang nichts bekannt. Auf Grund der Lokalisation in Intron 1 des NCF4-Gens ist denkbar, dass sich dieser Polymorphismus in einem die Expression regulierenden Element befindet. Dies könnte z.B. durch Reportergenanalysen weiter untersucht werden. Im Falle eines Hinweises auf eine Allelspezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren könnten dann auch Untersuchungen mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) zur weiteren Klärung beitragen.

Das Variantenallel des SNPs rs12848910 in CYBB war in CD19 mit einer geringeren Aktivität und in den aus CD19 gewonnenen LCLs mit einer entsprechend geringeren CYBB-Transkription verbunden (Abb. 12 S. 55). Dieser Polymorphismus befindet sich nahe dem 3'- Ende des CYBB-Gens in Intron 11. In der Literatur gibt es zu diesem Polymorphismus noch keinerlei Daten.

Das Variantenallel des in Intron 2 von NCF2 gelegenen SNPs rs10911363 ging in CD19 mit einer reduzierten NOX-Aktivität einher (Abb. 9, rechts S.53). Dasselbe Allel war in den LCLs mit einer höheren basalen Zellvitalität verbunden (Tab. 16 S.57). In einer Genom-weiten SNP-Chip-Analyse wurde dieses als Risikoallel für systemischen Lupus erythematodes identifiziert (Gateva et al. 2009).

Eine potenziell interessante Beobachtung war auch ein Einfluss des NCF4-SNPs rs741998 auf die basale Vitalität von LCLs und CD3. Obgleich dieser Befund in zwei unabhängigen Zelllinien gefunden wurde, kann gegenwärtig keine klare Bewertung erfolgen, da dieser Polymorphismus weder Genexpression noch Enzymaktivität modulierte und auch dazu nichts in der Literatur beschrieben ist.

#### 5.4 NOX und Strahlenreaktion

Die Induktion von ROS durch radioaktive Strahlung ist lange bekannt. Bei einer Strahlentherapie wird ein Großteil der Effekte über die Bildung von ROS vermittelt. Eine direkte Beteilung von durch NADPH-Oxidase generierten ROS an der zytotoxischen Strahlenwirkung konnte erst vor kurzem aufgezeigt werden (Liu et al. 2008). Bei meinen Messungen waren nach Bestrahlung in Relation zur unbestrahlten Kontrolle in LCLs (Abb. 13 S.58) etwa 50% mehr ROS zu verzeichnen gegenüber einer Zunahme von etwa 20% in CD3 (Abb. 14 S.59). Zu beachten ist hierbei, dass die Messungen der ROS 30 h (bei LCLs) bzw. 24 h (bei CD3) nach Bestrahlung erfolgten. Es handelt sich bei der nachgewiesenen ROS-Induktion folglich nicht um einen kurzzeitigen Effekt. Der quantitativ stärkere Anstieg bei den LCLs könnte auch auf die höhere Strahlendosis (3 *versus* 2 Gy) zurückzuführen sein.

Hinsichtlich der Auswirkungen von Bestrahlung auf die NOX-Genexpression betrug die Veränderung gegenüber der Kontrolle in keinem Fall mehr als 20%. Dabei zeichnete sich im Vergleich von LCLs und CD3 kein einheitliches Bild ab. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass bei den CD3 die RNA-Syntheserate *ex vivo* merklich eingeschränkt sein dürfte. Andererseits ist das Expressionsniveau sämtlicher NOX-Untereinheiten in LCLs deutlich niedriger als in den ausdifferenzierten Leukozyten (Tab. 9 S.53). Die Expression von NCF4 scheint nach Bestrahlung stärker affektiert zu sein als diejenige von CYBB oder NCF4. Das wird auch dadurch unterstrichen, dass sich NCF4 als der stärkste der untersuchten Einflussfaktoren für die Strahlen-induzierte Minderung der LCL-Vitalität erwies (Abb. 16 S.61 und Tab. 17 S.63): je mehr die NCF4-Expression abnahm, desto stärker auch der Rückgang an Vitalität. Die

RAC2-Variante rs6572 wirkte sich sowohl bei LCLs als auch bei CD3 auf die Strahlenvermittelte Zellvitalität aus. Dieser zwar potenziell interessante Befund muss momentan noch vorsichtig bewertet werden und bedarf weiterer Überprüfungen, auch deshalb, weil ein Effekt auf ROS nach Bestrahlung nicht festzustellen war.

### 5.5 NOX und TGFβ1

Das Zytokin TGF $\beta$ 1 induziert offenbar Veränderungen in Bezug zur NADPH-Oxidase (Abb. 17 S.63). Neben einer leichten Zunahme PMA-stimulierbarer ROS fiel v.a. die positive Korrelation mit der Expression der katalytischen Untereinheit CYBB in CD3 auf (Abb. 18 S.64). Ein ähnlicher Zusammenhang stellte sich nach IL1 $\beta$ -Behandlung dar. Eine Beziehung zu einer der untersuchten CYBB-Genvarianten bestand jedoch nicht. Außer CYBB wurde nach TGF $\beta$ 1-Inkubation auch verstärkt NCF2 gebildet, wohingegen die RNA-Expression von NCF4 deutlich supprimiert war. Somit konnten die zuvor in PBMCs beobachteten Effekte von TGF $\beta$ 1 auf die Genexpression dieser drei Untereinheiten in der homogeneren CD3-Subpopulation bestätigt werden (Kaya 2008). Das Fehlen einer nennenswerten Veränderung in LCLs kann – wie bereits zuvor genannt – durch die relativ geringe Bedeutung der NOX-Expression in diesen Zellen erklärt werden.

In der Literatur ist für Hepatozyten eine Induktion von NOX4, einer Isoform von CYBB (siehe Tab. 2 S.6), durch TGF $\beta$ 1 beschrieben (de Mochel et al. 2010). Hinsichtlich einer Modulation von NCF2 und NCF4 durch TGF $\beta$ 1 gibt es keine publizierten Daten als Vergleich.

### 5.6 NOX und IL10

Ein gänzlich anderes Bild für die Modulation der NOX-Genexpression – verglichen mit Bestrahlung oder TGF $\beta$ 1 – ergab sich nach Behandlung mit IL10 (Abb. 19 S.66). Einer markanten Reduktion von NCF2 in CD3 stand eine Induktion von NCF4 gegenüber mit einer parallelen Abnahme der ROS-Produktion. Über die Expression dieser beiden Parameter war ein erheblicher Anteil der IL10-vermittelten Reduktion an ROS bestimmbar (Tab. 20 S. 67 und Abb. 20 S.67). CYBB zeigte durch IL10 keine Veränderung gegenüber dem Kontrollniveau.

Die Befunde für NCF2 und NCF4 entsprechen sehr gut den zuvor für PBMCs beschriebenen (Kaya 2008). Im Gegensatz zu meinen Daten fand sich in letzt genannter Arbeit jedoch auch eine spürbare Suppression von CYBB durch IL10. Über eine Unterdrückung der Transkription von CYBB und NCF1 durch IL10 in normalen humanen Monozyten, nicht jedoch in leukämischen Zellen, wurde berichtet (Kuga et al. 1996), wobei NCF2 und NCF4 nicht untersucht wurden. Dieses Fehlen einer Interaktion von IL10 mit der NOX-Expression steht in Einklang mit meinen an LCLs erhobenen Daten. Der hier genannte Effekt auf CYBB in Monozyten könnte die zuvor angesprochene Diskrepanz meiner Ergebnisse mit denen aus einer früheren Studie (Kaya 2008) erklären, da in letzterer PBMCs einschließlich darin enthaltener Monozyten verwendet wurden.

### 5.7 Fazit

Bei einem Vergleich der stimulierbaren NOX-Aktivität fiel auf, dass diese in Monozyten um 2-3 Größenordnungen größer war als bei den anderen PBMC-Subfraktionen. In LCLs ist nach Austestung einer Reihe von Messtechniken eine sinnvolle Quantifizierung der NOX-Aktivität nicht möglich. Dies legt auch die nur sehr geringe relative Expression der NOX-Untereinheiten in LCLs nahe.

Bei der Assoziationsprüfung von Prädiktoren für die NOX-Aktivität ist grundsätzlich das Problem des Multiplen Testens zu berücksichtigen, da sonst mit einer Vielzahl falschpositiver Befunde zu rechnen ist. Diesem Sachverhalt soll im folgenden Rechnung getragen werden. Für die PMA-stimulierbare NOX-Aktivität stellte sich v.a. die mRNA-Expression von CYBB und noch deutlicher von NCF2 heraus, wobei die stärkste Korrelation in CD19 beobachtet wurde und ein erheblicher Anteil der Variabilität in der NOX-Aktivität hierüber bestimmt war. Letzterer Zusammenhang ist so stark, dass er auch unter Anwendung strenger Kriterien für multiples Testen als signifikant betrachtet werden kann. A priori bestand eine spezifische Hypothese für die Funktionalität der CYBA-Variante 640A>G. Für diese konnte jedoch keine Assoziation gefunden werden. Ein möglicher Effekt der anderen Varianten wurde explorativ eruiert. In Anbetracht der Zahl der analysierten Funktionsparameter und der Zahl der Genvarianten war keine Assoziation so stark, dass eine statistische Signifikanz auch nach Adjustierung auf Multiples Testen noch erkennbar gewesen wäre. Hier wurde - im Bewusstsein einer eingeschränkten Aussagekraft - als Kriterium für eine mögliche biologische unabhängige Relevanz eine Beeinflussung von mindestens zwei Funktionsparametern gefordert. Diesen Vorgaben entsprechend kommt eine funktionelle Bedeutung am ehesten folgenden drei Genpolymorphismen zu: rs741997 in NCF4, rs12848910 in CYBB und rs10911363 in NCF2.

Röntgenstrahlung, wie sie therapeutisch eingesetzt wird, interagiert offenbar nachhaltig mit der PMA-stimulierbaren Form der NADPH-Oxidase (phagozytäre NOX) und der Produktion von ROS. Diese Interaktion scheint insbesondere NCF4 zu betreffen. Die Herunterregulation dieser Untereinheit zeigte eine gewisse Parallelität zum Verlust an Zellvitalität nach Bestrahlung.

Das proinflammatorische Zytokin TGF $\beta$ 1 zeigte eine dem Ausmaß nach zwar moderate, aber angesichts des Stichprobenumfangs hoch signifikante Induktion von CYBB und NCF2, wobei sich v.a. erstere funktionell auf die ROS-Produktion auswirkte. NCF4 war dagegen supprimiert. Im Gegensatz dazu fand sich eine massive Induktion von NCF4 durch IL10 bei gleichzeitiger starker Suppression von NCF2 begleitet von einer Abnahme der stimulierbaren NOX-Aktivität.

Für diejenigen Befunde, die auch unter Berücksichtigung der Zahl der durchgeführten Tests als signifikant betrachtet werden können, wäre nun zu prüfen, in welchen medizinischen Kontexten diese von Bedeutung sind. Naheliegend wären hier solche Prozesse, bei welchen ROS eine große Rolle spielen: Dies betrifft u.a. kardiovaskuläre, immunologische, neurologische und onkologische Erkrankungen. Für die NOX-Genpolymorphismen ist die statistische Evidenz im Unterschied zu den auf Expressionsebene beobachteten Veränderungen deutlich schwächer und es sind weitere Untersuchungen nötig, um eine Funktionalität dieser Varianten zu belegen.

### 5.8 Ausblick

Aufbauend auf den stärksten Befunden sollten weitere Untersuchungen zur tieferen Exploration der Bedeutung der NADPH-Oxidase und deren Expression sowie zur Aktivität determinierender Faktoren angestrengt werden.

Als Ergänzung zur starken Korrelation der Expression der Untereinheiten CYBB und NCF2 mit der NOX-Aktivität v.a. in CD19 wäre die Messung des Proteingehalts dieser Komponenten denkbar. Interessant aus meiner Sicht wäre eine Klärung der Frage, welche Faktoren diese enge Korrelation von Expression und Aktivität regulieren. Dafür kommen Transkriptionsfaktoren, miRNAs und epigenetische Mechanismen in Betracht.

Die Interaktionen von Röntgenstrahlung mit Biomolekülen, so auch den NOX-Enzymen, sind komplex und in weiten Teilen noch unverstanden. Die hier aufgezeigte Interaktion im Sinne einer NCF4-Suppression ist potenziell interessant und könnte an Modellzelllinien weiter verfolgt werden. Da NCF4 bei proinflammatorischen Prozessen (wie bei TGFβ1 beobachtet) offenbar hoch- und bei antiinflammatorischen (nach IL10) herunterreguliert wird, könnte dies zum Verständnis beitragen, warum es im Gefolge einer Strahlentherapie zu nachhaltigen Entzündungsprozessen kommt, die individuell höchst variabel sind.

Diese Variabilität dürfte zu einem Teil auch in ererbten Genpolymorphismen bestehen. So war die Strahlen-vermittelte Induktion an ROS u.a. von der NCF4-Variante rs741997 abhängig, welche auch die NCF4-Expression und stimulierbare NOX-Aktivität in CD14 beeinflusst hat. Um jedoch eine Funktionalität dieser Variante postulieren zu können, bedarf es weiterer Analysen. Sinnvoll könnten, auf Grund der Lokalisation in Intron 1, Reportergen-Untersuchungen und EMSAs (electrophoretic mobility shift assays) sein, um einerseits eine direkte Allel-spezifische Funktion bzw. ein differenzielles Binden von Transkriptionsfaktoren nachweisen zu können. Weiterhelfen bei der Suche nach funktionellen Genvarianten würden ggf. auch Genom-weite Assoziationsanalysen. Dafür ist aber ein hinreichend großer Stichprobenumfang nötig. Gegenwärtig wird Rahmen eines weltweiten im Resequenzierungsprojekts das Genom von etwa 2500 Menschen analysiert. Von einem großen Teil dieser Menschen wurden LCLs hergestellt, die von den betreffenden Biobanken - wie auch bei den in dieser Arbeit verwendeten LCLs geschehen - erworben werden können. Auf diese Weise könnten Genvarianten mit regulierender Funktion auf die Expression von NOX-Untereinheiten unter unterschiedlichen Bedingungen identifiziert werden. Diese könnten dann schließlich relativ einfach in klinischen Studien auf eine mögliche medizinische Relevanz überprüft werden.

# 6 Zusammenfassung

NADPH-Oxidasen (NOX) produzieren Superoxid, aus welchem durch chemische Reaktionen weitere reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) entstehen. Mittlerweile ist klar geworden, dass NOX in praktisch allen Zelltypen vorkommen, jedoch mehrere Isoformen existieren. Die medizinisch-biologische Bedeutung von ROS ist evident und reicht von der Bekämpfung von Pathogenen über inflammatorische Prozesse bis hin zur Funktion als *second messenger* für zelluläre Signalwege. Ziele dieser Arbeit waren eine umfassende Analyse der funktionellen NOX-Variabilität in Leukozyten im Hinblick auf Beeinflussung durch Expression von NOX-Untereinheiten sowie darin lokalisierter Genpolymorphismen und wie sich diese bei einer Simulation pro- und anti-inflammatorischer Bedingungen darstellen.

Als Untersuchungsmaterial dienten vier mittels Durchflusszytometrie gewonnene Fraktionen isolierter Leukozyten (CD3, CD14, CD19, CD56) von 120 gesunden freiwilligen Spendern sowie kommerziell erworbene lymphoblastoide Zelllinien (LCLs). In den Leukozyten-Fraktionen wurde sofort nach Isolierung die PMA-stimulierbare NOX-Aktivität (phagozytäre Form der NADPH-Oxidase) gemessen sowie die zugehörigen Expressionsprofile der NOX-Untereinheiten bestimmt. Die CD3 wurden zusätzlich einer Bestrahlung mit 2 Gy bzw. einer Behandlung mit den Zytokinen TGF $\beta$ 1, IL1 $\beta$  und IL10 unterzogen. Nach 24 h Inkubationszeit erfolgte wiederum eine Quantifizierung der NOX-Aktivität sowie eine Analyse des NOX-Expressionszustands. Nach weiteren 4 h wurde die Zellvitalität gemessen. Bei den LCLs wurde in ähnlicher Weise verfahren, jedoch musste hier nach Austestung zahlreicher Messverfahren auf eine Quantifizierung der NOX-Aktivität verzichtet werden. Es wurden insgesamt 48 NOX-Genpolymorphismen analysiert mit dem Primer-Extensionsverfahren, welche die häufig vorkommende genetische Variabilität in fünf zum NOX-Komplex gehörenden Genen (CYBA, CYBB, NCF2, NCF4 und RAC2) repräsentieren.

Die PMA-stimulierbare NOX-Aktivität war in CD14 um mindestens zwei Zehnerpotenzen stärker als in CD3, CD19 und CD56, während auf RNA-Ebene die NOX-Untereinheiten in diesen Zellarten in ähnlicher Größenordnung exprimiert waren. In den LCLs war deren Expression – in Relation zu Referenzgenen – um mehr als den Faktor 10 geringer als in den vier Blutzellfraktionen. Am stärksten exprimiert unter den NOX-Genen zeigte sich CYBB, am schwächsten NCF4. Eine außerordentlich stark positive Korrelation wurde zwischen der Basalexpression von CYBB bzw. NCF2 mit der NOX-Aktivität, v.a. in CD19, gefunden (jeweils p < 0,0001). In CD3, CD14 und CD19 erwies sich die basale Expression von NCF2 generell als der stärkste Prädiktor der stimulierbaren NOX-Aktivität. Das Variantenallel von

CYBB rs12848910 war in CD19 mit einer verminderten Aktivität und in LCLs mit einer geringeren Transkription verbunden. In CD14 bestand eine Assoziation von NCF4 rs741997 mit einer reduzierten Menge an NCF4-Transkripten und einer tendenziell niedrigeren NOX-Aktivität. Eine Zunahme der ROS-Produktion nach Bestrahlung war sowohl in CD3 als auch in LCLs zu beobachten, wobei eine gewisse Parallelität mit einer Suppression der NCF4-Expression festzustellen war. Die nach TGF $\beta$ 1-Behandlung beobachtete ROS-Induktion in CD3 schien v.a. durch eine gesteigerte CYBB-Transkription bedingt zu sein (r = 0,32, p = 0,001). Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen ROS und CYBB-Transkripten gab es auch durch IL1 $\beta$  (r = 0,4, p = 0,00004). Im Gegensatz dazu bewirkte das anti-inflammatorische IL10 in CD3 eine Abnahme der Expression von NCF2 um mehr als 50% und eine Zunahme derjenigen von NCF4 um mehr als 50%. Damit einher ging eine Verringerung der stimulierbaren ROS-Produktion um etwa 50%, welche stark positiv mit der Expression von NCF4 (r = 0,44) und NCF2 (r = 0,29) korreliert war. Die untersuchten NOX-Genpolymorphismen spielten bei der Simulation der pro- und anti-inflammatorischen Situationen eher eine nachgeordnete Rolle.

Während die Korrelationen der NOX-Aktivität mit Expressionsparametern der NOX-Untereinheiten sehr stark waren und diese durch Bestrahlung bzw. die verwendeten Zytokine Teil sehr massiv beeinflusst wurden, war die Abhängigkeit von NOXzum Genpolymorphismen weniger prägnant. Der enge Zusammenhang zwischen der Expression von CYBB bzw. NCF2 einerseits und der NOX-Aktivität v.a. in CD19 andererseits ist zum einen mechanistisch spannend, könnte aber auch unter immunologischen Gesichtspunkten von Bedeutung sein. Eine Frage für weiterführende Untersuchungen wäre die Identifizierung von Faktoren, welche diese auffällig starke Korrelation regulieren. Ähnliches gilt auch für die Modulation der Expression von NOX-Untereinheiten unter pro- und anti-inflammatorischen Konditionen. Hier liegt eine breite medizinische Implikation nahe, wenn es gelingt, für diese Veränderungen auf Transkriptionsniveau die determinierenden Faktoren (z.B. Genvarianten, miRNAs, epigenetische Modifikationen) ausfindig und damit einer gezielten Intervention zugänglich zu machen. Ein solcher Faktor könnte die in meiner Arbeit erstmals als möglicherweise funktionell beschriebene NCF4-Genvariante rs741997 sein. Eine Funktionalität dieses Genpolymorphismus sollte durch molekulargenetische Techniken geklärt werden. Die durchgeführten genetischen Analysen waren im Hinblick auf die NOX-Untereinheiten umfassend. Ein möglicher und wahrscheinlicher Einfluss von Varianten in anderen Genen blieb aber unberücksichtigt und kann nicht in einem Kandidatengen-gestützten Ansatz, sondern nur durch Genom-weite Analysen erschöpfend diskutiert werden.

# 7 Literaturverzeichnis

Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW (1991): Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* <u>353 (6345)</u>, 668-670

Abrahamsson T, Brandt U, Marklund SL, Sjoqvist PO (1992): Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ Res* 70(2), 264-271

Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B (1997): Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* <u>69 (3)</u>, 1196-1203

Andersen JK (2004): Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* <u>10 Suppl</u>S18-25

Babior BM (1978a): Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts). *N Engl J Med* <u>298 (13)</u>, 721-725

Babior BM (1978b): Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N* Engl J Med 298 (12), 659-668

Barker KS, Liu T, Rogers PD (2005): Coculture of THP-1 human mononuclear cells with Candida albicans results in pronounced changes in host gene expression. *J Infect Dis* <u>192 (5)</u>, 901-912

Batot G, Paclet MH, Doussiere J, Vergnaud S, Martel C, Vignais PV, Morel F (1998): Biochemical and immunochemical properties of B lymphocyte cytochrome b558. *Biochim Biophys Acta* <u>1406 (2)</u>, 188-202

Bedard K, Krause KH (2007): The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* <u>87 (1)</u>, 245-313

Bedard K, Attar H, Bonnefont J, Jaquet V, Borel C, Plastre O, Stasia MJ, Antonarakis SE, Krause KH (2009): Three common polymorphisms in the CYBA gene form a haplotype associated with decreased ROS generation. *Hum Mutat* <u>30 (7)</u>, 1123-1133

Brown KA, Chu Y, Lund DD, Heistad DD, Faraci FM (2006): Gene transfer of extracellular superoxide dismutase protects against vascular dysfunction with aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* <u>290 (6)</u>, H2600-2605

Buggisch M, Ateghang B, Ruhe C, Strobel C, Lange S, Wartenberg M, Sauer H (2007): Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J Cell Sci* <u>120 (Pt 5)</u>, 885-894

Calcagno AM, Chewning KJ, Wu CP, Ambudkar SV (2006): Plasma membrane calcium ATPase (PMCA4): a housekeeper for RT-PCR relative quantification of polytopic membrane proteins. *BMC Mol Biol* <u>7</u>29

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD (2001): Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* <u>269 (1-2)</u>, 131-140

Chetty M, Thrasher AJ, Abo A, Casimir CM (1995): Low NADPH oxidase activity in Epstein-Barr-virus-immortalized B-lymphocytes is due to a post-transcriptional block in expression of cytochrome b558. *Biochem J* <u>306 (Pt 1)</u> 141-145

Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S (2008): Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer* <u>8</u>350

Clark RA, Leidal KG, Pearson DW, Nauseef WM (1987): NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system. *J Biol Chem* <u>262 (9)</u>, 4065-4074

Cohen-Tanugi L, Morel F, Pilloud-Dagher MC, Seigneurin JM, Francois P, Bost M, Vignais PV (1991): Activation of O2(-)-generating oxidase in an heterologous cell-free system derived from Epstein-Barr-virus-transformed human B lymphocytes and bovine neutrophils. Application to the study of defects in cytosolic factors in chronic granulomatous disease. *Eur J Biochem* 202 (2), 649-655

Condino-Neto A, Newburger PE (1998): NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. *Arch Biochem Biophys* <u>360 (2)</u>, 158-164

Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT, Jr. (2001): Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* <u>294 (5545)</u>, 1346-1349

Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, Kleschyov AL, Munzel T (2004): Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radic Biol Med* <u>36 (1)</u>, 101-111

DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM (2000): Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* <u>275 (18)</u>, 13986-13993

de Mendez I, Homayounpour N, Leto TL (1997): Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol* <u>17 (4)</u>, 2177-2185

de Mochel NS, Seronello S, Wang SH, Ito C, Zheng JX, Liang TJ, Lambeth JD, Choi J (2010): Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection. *Hepatology* <u>52 (1)</u>, 47-59

Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD (1989): Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. J Neurochem 52 (2), 381-389

Dikalov SI, Li W, Mehranpour P, Wang SS, Zafari AM (2007): Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochem Pharmacol* <u>73 (7)</u>, 972-980

Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, Hess J, Gorlach A (2005): The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* <u>38 (5)</u>, 616-630

Doerries C, Grote K, Hilfiker-Kleiner D, Luchtefeld M, Schaefer A, Holland SM, Sorrentino S, Manes C, Schieffer B, Drexler H et al. (2007): Critical role of the NAD(P)H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. *Circ Res* <u>100 (6)</u>, 894-903

Domzig W, Maly FE (1985): Dissociation of natural killing and luminol-dependent chemiluminescence. *Immunobiology* <u>169 (2)</u>, 162-174

Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC, Nordmark G et al. (2009): A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* <u>41 (11)</u>, 1228-1233

Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW (1998): Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* <u>57 (4)</u>, 338-342

Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM (2000): Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* <u>102 (15)</u>, 1744-1747

Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD (1998): Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 273 (27), 16663-16668

Helfand SL, Werkmeister J, Roder JC (1982): Chemiluminescence response of human natural killer cells. I. The relationship between target cell binding, chemiluminescence, and cytolysis. J Exp Med 156 (2), 492-505

Hellman S: Principles of radiation therapy., 4th ed.; J.B. Lippincott Co, Philadelphia 1993

Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT (2003): Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* <u>15 (5)</u>, 578-584

Hidalgo C, Bull R, Behrens MI, Donoso P (2004): Redox regulation of RyR-mediated Ca2+ release in muscle and neurons. *Biol Res* <u>37 (4)</u>, 539-552

Hoffmann M, Schirmer MA, Tzvetkov MV, Kreuz M, Ziepert M, Wojnowski L, Kube D, Pfreundschuh M, Trumper L, Loeffler M et al. (2010): A functional polymorphism in the NAD(P)H oxidase subunit CYBA is related to gene expression, enzyme activity, and outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* <u>70 (6)</u>, 2328-2338

Hunter T (2000): Signaling--2000 and beyond. Cell 100 (1), 113-127

Ishii T, Yasuda K, Akatsuka A, Hino O, Hartman PS, Ishii N (2005): A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Res*  $\underline{65}$  (1), 203-209

Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS (2004): T cells express a phagocytetype NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol* <u>5 (8)</u>, 818-827

Johnson AD, Zhang Y, Papp AC, Pinsonneault JK, Lim JE, Saffen D, Dai Z, Wang D, Sadee W (2008): Polymorphisms affecting gene transcription and mRNA processing in pharmacogenetic candidate genes: detection through allelic expression imbalance in human target tissues. *Pharmacogenet Genomics* <u>18 (9)</u>, 781-791

Kaya E: Reaktive Sauerstoffverbindungen in menschlichen Leukozyten: Funktionelle Variabilität der NAD(P)H-Oxidase und Einfluss von Zytokinen und Genpolymorphismen. *Med. Diss.* Göttingen 2008

Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B (2005): A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* <u>97 (7)</u>, 629-636

Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P (1989): Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* <u>80 (5)</u>, 1115-1127

Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM (1991): Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* <u>254</u> (5037), 1512-1515

Kobayashi S, Imajoh-Ohmi S, Nakamura M, Kanegasaki S (1990): Occurrence of cytochrome b558 in B-cell lineage of human lymphocytes. *Blood* <u>75 (2)</u>, 458-461

Kuga S, Otsuka T, Niiro H, Nunoi H, Nemoto Y, Nakano T, Ogo T, Umei T, Niho Y (1996): Suppression of superoxide anion production by interleukin-10 is accompanied by a downregulation of the genes for subunit proteins of NADPH oxidase. *Exp Hematol* <u>24 (2)</u>, 151-157

Kuschel C: Funktionelle und genetische Variabilität bei der zytotoxischen Wirkung von Nukleosid-Analoga: Untersuchung in menschlichen Leukozyten und lymphoblastoiden Zelllinien. *Med. Diss.* Göttingen 2012

Lacy F, Kailasam MT, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW, Parmer RJ (2000): Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity. *Hypertension* <u>36 (5)</u>, 878-884

Lambeth JD (2004): NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* <u>4</u> (<u>3</u>), 181-189

Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG (2002): Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*  $\frac{40}{4}$ , 511-515

Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG (1998): Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* <u>273 (25)</u>, 15366-15372

Liu Q, He X, Liu Y, Du B, Wang X, Zhang W, Jia P, Dong J, Ma J, Wang X et al. (2008): NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species: A new mechanism for X-ray-induced HeLa cell death. *Biochem Biophys Res Commun* <u>377 (3)</u>, 775-779

Lopes LR, Hoyal CR, Knaus UG, Babior BM (1999): Activation of the leukocyte NADPH oxidase by protein kinase C in a partially recombinant cell-free system. *J Biol Chem* <u>274 (22)</u>, 15533-15537

Maeda H, Akaike T (1998): Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)* <u>63 (7)</u>, 854-865

Maly FE, Nakamura M, Gauchat JF, Urwyler A, Walker C, Dahinden CA, Cross AR, Jones OT, de Weck AL (1989): Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome b-245 components by human tonsillar B lymphocytes and B cell lines. *J Immunol* <u>142</u> (<u>4</u>), 1260-1267

McCord JM, Fridovich I (1969): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* <u>244 (22)</u>, 6049-6055

Morawietz H, Erbs S, Holtz J, Schubert A, Krekler M, Goettsch W, Kuss O, Adams V, Lenk K, Mohr FW et al. (2006): Endothelial Protection, AT1 blockade and Cholesterol-Dependent Oxidative Stress: the EPAS trial. *Circulation* <u>114 (1 Suppl)</u>, I296-301

Moreno MU, Jose GS, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G (2006): The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens* <u>24</u> (7), 1299-1306

Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG (1995): Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* <u>95 (1)</u>, 187-194

Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD (1999): The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 274 (33), 22999-23005

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG (1993): Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* <u>91 (6)</u>, 2546-2551

Park JW, Hoyal CR, Benna JE, Babior BM (1997): Kinase-dependent activation of the leukocyte NADPH oxidase in a cell-free system. Phosphorylation of membranes and p47(PHOX) during oxidase activation. *J Biol Chem* <u>272 (17)</u>, 11035-11043

Pervaiz S, Clement MV (2002): A permissive apoptotic environment: function of a decrease in intracellular superoxide anion and cytosolic acidification. *Biochem Biophys Res Commun* 290 (4), 1145-1150

Pervaiz S, Seyed MA, Hirpara JL, Clement MV, Loh KW (1999): Purified photoproducts of merocyanine 540 trigger cytochrome C release and caspase 8-dependent apoptosis in human leukemia and melanoma cells. *Blood* <u>93 (12)</u>, 4096-4108

Piirila H, Valiaho J, Vihinen M (2006): Immunodeficiency mutation databases (IDbases). *Hum Mutat* <u>27 (12)</u>, 1200-1208

Prigione A, Begni B, Galbussera A, Beretta S, Brighina L, Garofalo R, Andreoni S, Piolti R, Ferrarese C (2006): Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease: negative correlation with levodopa dosage. *Neurobiol Dis* 23 (1), 36-43

Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW (2002): Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K+ flux. *Nature* <u>416 (6878)</u>, 291-297

Rubanyi GM, Vanhoutte PM (1986): Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250 (5 Pt 2), H822-827

San Jose G, Moreno MU, Olivan S, Beloqui O, Fortuno A, Diez J, Zalba G (2004): Functional effect of the p22phox -930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension* <u>44</u> (2), 163-169

Sbarra AJ, Karnovsky ML (1959): The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem  $\underline{234}$  (6), 1355-1362

Schaper M, Leib SL, Meli DN, Brandes RP, Tauber MG, Christen S (2003): Differential effect of p47phox and gp91phox deficiency on the course of Pneumococcal Meningitis. *Infect Immun* <u>71 (7)</u>, 4087-4092

Schirmer M, Hoffmann M, Kaya E, Tzvetkov M, Brockmoller J (2008): Genetic polymorphisms of NAD(P)H oxidase: variation in subunit expression and enzyme activity. *Pharmacogenomics J*  $\underline{8}$  (4), 297-304

Shen WL, Gao PJ, Che ZQ, Ji KD, Yin M, Yan C, Berk BC, Zhu DL (2006): NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species regulate angiotensin-II induced adventitial fibroblast phenotypic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* <u>339 (1)</u>, 337-343

Shimo-Nakanishi Y, Hasebe T, Suzuki A, Mochizuki H, Nomiyama T, Tanaka Y, Nagaoka I, Mizuno Y, Urabe T. (2004): Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis*. <u>175 (4)</u>, 109–115.

Sies H (1993): Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem 215 (2), 213-219

Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, Kliesch S, Bergmann M, Weidner W (2008): Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 23 (1), 11-16

Szardening-Kirchner C, Konrad L, Hauck EW, Haag SM, Eickelberg O, Weidner W (2009): Upregulation of mRNA expression of MCP-1 by TGF-beta1 in fibroblast cells from Peyronie's disease. *World J Urol* <u>27 (1)</u>, 123-130

Tian W, Li XJ, Stull ND, Ming W, Suh CI, Bissonnette SA, Yaffe MB, Grinstein S, Atkinson SJ, Dinauer MC (2008): Fc gamma R-stimulated activation of the NADPH oxidase: phosphoinositide-binding protein p40phox regulates NADPH oxidase activity after enzyme assembly on the phagosome. *Blood* <u>112</u> (9), 3867-3877

Ueyama T, Tatsuno T, Kawasaki T, Tsujibe S, Shirai Y, Sumimoto H, Leto TL, Saito N (2007): A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox. *Mol Biol Cell* <u>18 (2)</u>, 441-454

Vignais PV (2002): The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* <u>59 (9)</u>, 1428-1459

Wang G, Anrather J, Huang J, Speth RC, Pickel VM, Iadecola C (2004): NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neurosci* <u>24 (24)</u>, 5516-5524

Wang X, Seed B (2003): A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res* <u>31 (24)</u>, e154

Wyche KE, Wang SS, Griendling KK, Dikalov SI, Austin H, Rao S, Fink B, Harrison DG, Zafari AM (2004): C242T CYBA polymorphism of the NADPH oxidase is associated with reduced respiratory burst in human neutrophils. *Hypertension* <u>43 (6)</u>, 1246-1251

Xu B, Liu ZZ, Zhu GY, Yang JF, Zhao JP, Wang JC, Cai JL (2008): Efficacy of recombinant adenovirus-mediated double suicide gene therapy in human keloid fibroblasts. *Clin Exp Dermatol* <u>33 (3)</u>, 322-328

Yu JH, Lim JW, Kim KH, Morio T, Kim H (2005): NADPH oxidase and apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar AR42J cells. *Free Radic Biol Med* <u>39 (5)</u>, 590-602

# 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich von ganzem Herzen allen jenen danken, die zur erfolgreichen Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. J. Brockmöller danke ich für die Vergabe des interessanten Themas. Während meiner Promotionszeit hat sich mein Verständnis von Arzneimitteln substanziell verbessert. Dies ist mir bei meiner jetzigen klinischen Tätigkeit sehr hilfreich.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. MSc. M. Schirmer, der mir in jeglicher Hinsicht mit seinem Ideenreichtum und analytischen Problemlösungen mehr beigebracht hat, als es die zahlreichen Vorlesungen und Seminare während des Studiums getan haben. Seine bildhaften Vergleiche haben oft in Momenten der Enttäuschung für Aufheiterung gesorgt und die Atmosphäre in der Arbeitsgruppe so unvergleichbar aufgeheitert. Die Laborzeit war einer der schönsten Abschnitte in meinem bisherigen Leben!

Ebenfalls ein ganz herzliches Dankeschön gebührt Herrn cand. med. Michael Neumann, welcher zur selben Zeit wie ich als Doktorand in der Abteilung Klinische Pharmakologie tätig war. Meine anfänglichen Zweifel hatten sich rasch zerstreut und wir haben zusammen alle Höhen und Tiefen unserer Arbeiten durchstanden und sind weiterhin freundschaftlich verbunden.

Ebenfalls möchte ich Herrn cand. med. Finn Lornsen für den tatkräftigen Einsatz während der Probandenakquirierung im zweiten Teil meiner Doktorarbeit als auch für die zahlreichen gemeinsamen Joggingtouren meinen herzlichen Dank aussprechen.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Klinische Pharmakologie im besonderen Dr. Mladen Tzetkov, Dr. Kristin Bokelmann, Karoline Jobst und Sven Müller danke ich für die Unterstützung bei technischen und organisatorischen Belangen. Dies gilt ebenso für Frau M. Rave-Fränk, Alexandra Bitter, Juliane Kasten-Krapp und Sandra Hoffmeister aus der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen.

## 9 Lebenslauf

Ich wurde am 25. Juni 1984 als Kind der Eheleute MR Dr. med. Günther Goetze und Petra Goetze geb. Kaden in Gera geboren. Hier besuchte ich von 1991-1995 die Grundschule und im Anschluss das Zabelgymnasium. Im Juni 2003 erhielt ich die Allgemeine Hochschulreife. Danach absolvierte ich von 07/2003-03/2004 den Grundwehrdienst. ImApril 2004 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen, wo ich 2006 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum) und im Mai 2011 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegte. Das Praktische Jahr absolvierte ich in der Abteilung Neurologie der Universitätsmedizin, im Royal London Hospital der Queen Mary University in London (Viszeralchirurgie) sowie in Lüneburg (Allgemeinchirurgie) und in Bremerhaven (Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie).

Seit August 2011 bin ich als Assistenzarzt in Weiterbildung in der Abteilung für Kardiologie des HELIOS Klinikums Gotha unter CA Dr. med. K. Reinig klinisch tätig.