

**Genetische Variabilität in der phagozytären NAD(P)H-Oxidase:
Funktionelle Charakterisierung und Bedeutung für die
Zytostatika-Therapie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marion Hoffmann

aus Hildesheim

Göttingen 2009

D7

Referent: PD Dr. W. Kramer

Korreferent: Prof. Dr. R. Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 23.4.2009

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 NAD(P)H-Oxidasen.....	1
1.1.1 Aufbau und Aktivierung der phagozytären NAD(P)H-Oxidase	1
1.1.2 Isoformen der NAD(P)H-Oxidase.....	4
1.2 Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS).....	5
1.2.1 Arten, Entstehung und Wirkung reaktiver Sauerstoffverbindungen	5
1.2.2 Physiologische Bedeutung von ROS	6
1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies	7
1.3 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)	7
1.3.1 Formen von NHL	7
1.3.2 Behandlung hochmaligner NHL	8
1.3.3 Therapienebenwirkungen.....	9
1.4 Doxorubicin	9
1.4.1 Wirkungsmechanismus des Doxorubicins	10
1.4.2 Nebenwirkungen einer Doxorubicin-Therapie	10
1.5 Funktionelle Bedeutung von SNPs der NAD(P)H-Oxidase	11
1.6 Fragestellung	12
2 MATERIAL	14
2.1 Chemikalien.....	14
2.1.1 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme, Kits	16
2.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.3 Geräte	18
2.4 Software, Datenbanken, Sequenzen	19
2.5 Biologisches Material	20
2.5.1 Enzyme	20
2.5.2 Zelllinien	20
2.5.3 Bakterienstamm.....	21
2.5.4 Expressionsvektoren.....	21
2.5.5 Antikörper	21
2.5.6 Patienten-DNA	21
3 METHODEN	22
3.1 Probandenrekrutierung und Blutabnahme	22
3.2 Steriles Arbeiten und Entsorgung von S1-Abfällen und Zytostatika.....	23
3.3 Gewinnung menschlicher Leukozyten durch Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation ..	23
3.3.1 Isolierung humaner Granulozyten durch Polymorphprep™.....	23

3.3.2	Isolierung von humanen PBMCs durch Ficoll.....	24
3.3.3	Bestimmung der Zellzahl.....	25
3.4	Detektion reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS)	26
3.4.1	Opsonierung von Zymosan A	26
3.4.2	Nachweis extrazellulärer ROS durch L-012	26
3.4.3	Nachweis intrazellulärer ROS durch DCFH-DA	27
3.4.4	Nachweis intrazellulärer ROS durch NBT	28
3.5	Durchflusszytometrie	28
3.5.1	Detektion der apoptotischen PBMCs durch Annexin V-Markierung	29
3.6	DNA-Analytik.....	30
3.6.1	Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen	30
3.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation).....	30
3.6.3	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Midipräparation).....	32
3.6.4	Mikrodialyse von Plasmid-DNA.....	32
3.6.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
3.6.6	Konzentrationsbestimmung von DNA mit PicoGreen	33
3.6.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
3.6.8	Multiplex-PCR	36
3.6.9	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	37
3.6.10	Aufbewahrung von DNA	38
3.6.11	Signalerzeugung in der Real-Time PCR	38
3.6.12	Bestimmung des Genotyps durch allelische Diskriminierung	38
3.6.13	Genotypisierung der DNA-Proben durch Primerextension (SNaPshot™)	40
3.6.14	Genotypisierung der DNA-Proben durch PCR-RFLP	44
3.6.15	Ortsspezifische Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i>)	45
3.6.16	Sequenzanalyse.....	46
3.7	RNA-Analytik.....	48
3.7.1	Isolierung von RNA.....	48
3.7.2	Handhabung und Aufbewahrung von RNA.....	49
3.7.3	cDNA-Synthese.....	49
3.7.4	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	50
3.7.5	Relative Quantifizierung der Real-Time PCR	53
3.7.6	Untersuchung der CYBA-Transkriptstabilität	53
3.7.7	Untersuchung der allelspezifischen Expression des CYBA-Gens (allelic expression imbalance) in Abhängigkeit von CYBA 640A>G	54
3.8	Proteinbiochemische Methoden.....	55
3.8.1	Isolierung von Gesamtprotein	55
3.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	56
3.8.3	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
3.8.4	Herstellung der Polyacrylamidgele	57
3.8.5	SDS-PAGE.....	57
3.8.6	Semidry-Transfer auf PVDF-Membranen (Western Blot)	58
3.8.7	Färbung des Polyacrylamidgels mit Coomassie	59
3.8.8	Immunochemischer Nachweis der Proteine GAPDH und p22 ^{phox}	59
3.8.9	Peroxidase-Nachweis über „Enhanced Chemiluminescence“	60
3.9	Zellkultur.....	61
3.9.1	Kultivierung von Zelllinien.....	61
3.9.2	LCL-Zellen.....	61
3.9.3	HEK293-Zellen	61
3.9.4	HeLa-Zellen	61
3.9.5	MCF7-Zellen.....	61
3.9.6	Kryokonservierung und Auftauen von Zellkulturen	62
3.9.7	Transfektion	62

3.10	Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	63
3.10.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	63
3.10.2	Einfrieren von Bakterien	63
3.10.3	Transformation durch Elektroporation.....	63
3.11	Bioinformatik	64
3.11.1	Auswahl der zu analysierenden Genvarianten	64
3.11.2	Haplotypen	65
3.11.3	Primerdesign.....	65
3.12	Statistische Auswertung.....	65
3.12.1	Deskriptive Statistik.....	65
3.12.2	Analytische Statistik	66
4	ERGEBNISSE	69
4.1	Auswahl der SNPs und Genotypisierung der Proben.....	69
4.2	Probandenstudien zur Untersuchung der Effekte von SNPs der NAD(P)H-Oxidase auf die Enzymaktivität und die Genexpression	72
4.2.1	NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in humanen Granulozyten	72
4.2.2	Korrelationen zwischen NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und Einzelnukleotid-polymorphismen	73
4.2.3	Genetische Kopplung und Haplotypenanalyse der CYBA-SNPs.....	77
4.2.4	Genetische Kopplung und Haplotypenanalyse der CYBB-SNPs	80
4.2.5	Einfluss genetischer Einzelnukleotidpolymorphismen auf die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten	83
4.2.6	Einfluss der Haplotypen des CYBA- und des CYBB-Gens auf die Genexpression.....	86
4.2.7	Expression der p22 ^{phox} -Untereinheit in humanen Granulozyten.....	87
4.3	NAD(P)H-Oxidase-SNPs und therapeutisches Ansprechen einer CHO(E)P-Chemotherapie..	88
4.3.1	Patientendaten und Chemotherapie	88
4.3.2	Einfluss von Genpolymorphismen der NAD(P)H-Oxidase auf das therapeutische Ansprechen von Patienten nach CHO(E)P-Behandlung.....	90
4.4	Einfluss von Genpolymorphismen der NAD(P)H-Oxidase auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz.....	93
4.5	Probandenstudie zur Untersuchung des Einflusses genetischer Varianten der NAD(P)H-Oxidase auf Doxorubicin-Effekte in humanen PBMCs	98
4.6	Molekularbiologische Untersuchungen zu CYBA 640A>G.....	102
4.6.1	Untersuchung der allelspezifischen Genexpression des CYBA 640A>G-Polymorphismus.....	102
4.6.2	Untersuchung der CYBA-Transkriptstabilität in Abhängigkeit vom CYBA 640A>G-Polymorphismus	103
4.6.3	Untersuchung der allelspezifischen Effekte des CYBA 640A>G-Polymorphismus in transfizierten Zellkulturen.....	105
5	DISKUSSION	108
5.1	Funktionalität von Polymorphismen des CYBA-Gens	109
5.2	Bedeutung des CYBA-SNPs 640A>G	110
5.2.1	Genexpression und ROS-Produktion von Granulozyten.....	110
5.2.2	Klinische Bedeutung von CYBA 640A>G (rs1049255).....	111
5.2.3	Molekulare Erklärungsansätze für CYBA 640A>G (rs1049255).....	114
5.3	CYBA-Haplotypen	116

5.4	Funktionell bedeutsame Polymorphismen des CYBB-Gens.....	117
5.5	SNPs in den Untereinheiten NCF1 und NCF2	119
5.5.1	NCF1.....	119
5.5.2	NCF2.....	119
5.6	SNPs in der Untereinheit NCF4.....	119
5.6.1	SNP rs1883113.....	120
5.6.2	SNP rs10854694.....	120
5.6.3	Weitere möglicherweise funktionelle SNPs in NCF4	121
5.7	SNPs in der Untereinheit RAC2	122
5.8	NAD(P)H-Oxidase und Herzinsuffizienz.....	123
5.9	NAD(P)H-Oxidase und Doxorubicin.....	124
5.10	Ausblick	126
6	ZUSAMMENFASSUNG	128
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	130
8	ANHANG	138
9	LEBENS LAUF.....	140
10	DANKSAGUNG	141

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance between groups</i> , einfaktorielle Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
a. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AUC	<i>Area Under the Curve</i> , Fläche unter der Kurve
β	Beta
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
B-Symptome	Begleitsymptome
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAD	<i>Coronary artery disease</i> , koronare Herzerkrankung
cDNA	komplementäre oder copy DNA
CHOP	Chemotherapie-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison)
CHO(E)P	CHOP-Schema, ergänzt durch Etoposid
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
CL	Chemilumineszenz
CO ₂	Kohlendioxid
CMH	1-Hydroxy-3-methoxy-carbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin
CYBA	Cytochrom b-245, alpha polypeptid
CYBB	Cytochrom b-245, beta polypeptid
d-	Desoxy-
DAG	Diacylglycerol
dbSNP	<i>database of SNPs</i> (SNP-Datenbank)
DCFH-DA	2-7-Dichlorofluorescein-Diacetat

DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH ₂ O	(doppelt destilliertes) Wasser
dd-	Didesoxy-
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPI	Diphenylen-Iodonium-Chlorid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiaminetetraessigsäure
et al.	et alii, und andere
EtBr	Ethidiumbromid
Exo1	Exonuklease1
F	Faraday
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
γ	Gamma
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat dehydrogenase
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-1-ethansulfonsäure
His	Histidin

HPRT-1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1
IgG	Immunglobulin G
IRE	<i>Iron response element</i>
IRF	<i>Iron regulatory factors</i>
i.v.	Intravenös
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
L-012	8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido[3,4-d]Pyridazin-1,4-(2H,3H)-Dion
LB	Lysogeny broth, Komplexmedium
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
μ	Mikro-, (1×10^{-6})
M	mol/l, Molarität
MAF	<i>minor allelic frequencies</i> , Häufigkeit des selteneren Allels
mA	Milliampere
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
ms	Millisekunde
n	Nano-, (1×10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat
NaOH	Natronlauge
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i> , Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Centre of Biotechnology Information</i>
NCF	<i>neutrophil cytosolic factor</i>
NCF1	Gen der NAD(P)H-Oxidase Untereinheit p47 ^{phox}
NCF2	Gen der NAD(P)H-Oxidase Untereinheit p67 ^{phox}

NCF4	Gen der NAD(P)H-Oxidase Untereinheit p40 ^{phox}
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Ω	Omega
O ₂ ^{·-}	Superoxidradikal
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
p. a.	pro analysi
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
PicoGreen [®]	2-[N-bis-(3-dimethylaminopropyl)-amino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl-quinolinium] ⁺
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RAC2	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 2</i> , GTP-bindendes Protein
RAC2	Gen der NAD(P)H-Oxidase Untereinheit rac2
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RLU	<i>relative light units</i> , Relative Lichteinheiten
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffverbindungen
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SAP	Shrimps Alkalische Phosphatase
SD	Standardabweichung

SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box –bindendes Protein
TE	Tris/EDTA Puffer
TEMED	N,N,N'NN'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tyr	Tyrosin
U	<i>unit(s)</i> , Enzymeinheit(en)
u. a.	unter anderem
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
Var	Variante
VIC	6-Carboxyrhodamin
v/v	Volumen pro Volumen, Volumenanteil
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen, Massenanteil
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 NAD(P)H-Oxidasen

NAD(P)H-Oxidasen sind Enzyme, die unter Verbrauch von NAD(P)H und molekularem Sauerstoff Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) gemäß der folgenden Reaktionsgleichung generieren:



Entdeckt wurden diese Enzyme zum ersten Mal in phagozytierenden Zellen des Immunsystems. Dort dient Superoxid als Ausgangsverbindung für die Bildung aggressiver Sauerstoffverbindungen, um körperfremde Organismen wie Pilze oder Bakterien abzutöten. Später wurden neben dieser phagozytären Form der NAD(P)H-Oxidase weitere Isoformen in vielen Zelltypen gefunden. In den nicht-phagozytären Zellen erfüllt Superoxid die Funktion eines intrazellulären Signaltransduktionsmoleküls und reguliert auf diese Weise eine Vielzahl zellulärer Prozesse.

1.1.1 Aufbau und Aktivierung der phagozytären NAD(P)H-Oxidase

Die komplexe Struktur der phagozytären NAD(P)H-Oxidase besteht aus sechs Untereinheiten: zwei Untereinheiten sind membranständig, vier sind im Zytosol lokalisiert. Die große katalytische Untereinheit gp91^{phox} bildet in der Zellmembran einen Komplex mit dem kleineren Protein p22^{phox}, dem hauptsächlich stabilisierende Funktionen zukommen. Nach DeLeo et al., 2000, lagert sich dazu eine noch nicht glykosylierte gp91^{phox}-Vorstufe nach Aufnahme einer Häm-Gruppe an eine p22^{phox}-Untereinheit an. Diese beiden Proteine werden zusammen auch als Flavocytochrom *b*₅₅₈ bezeichnet, welches für sich allein katalytisch weitgehend inaktiv ist (Vignais, 2002). Die Generierung der Superoxidradikale geschieht erst nach Anlagerung der zytosolischen Untereinheiten p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} und der kleinen GTPase Rac2. Unter physiologischen Bedingungen wird die Zusammenlagerung durch Kontakt mit Mikroorganismen oder inflammatorische Botenstoffe ausgelöst. Experimentell kann dieser Vorgang aber auch durch die Zugabe von Zymosan A oder dem Phorbolster PMA induziert werden.

Nach Park et al., 1997, besteht der erste Schritt der Enzymaktivierung in einer Membran-Anlagerung von Rac2. Rac-Proteine weisen eine C-terminale hydrophobe Gruppe auf, an die im Ruhezustand ein inhibitorisches Protein angelagert ist (Abo et al., 1991). Der Austausch von GDP durch GTP bewirkt die Freisetzung des Inhibitors und ermöglicht

durch die freiliegenden hydrophoben Geranylgruppen die Interaktion des Rac-Proteins mit den Membranstrukturen (Knaus et al., 1991).

Im zweiten Schritt erfolgt eine mehrfache Phosphorylierung der p47^{phox}-Untereinheit durch Proteinkinase C (Lopes et al., 1999). Dieser Vorgang bewirkt eine Konformationsänderung der carboxy-terminalen autoinhibitorischen Region des Proteins. Dies ermöglicht ihm sowohl die Bindung an die p22^{phox}-Untereinheit (Yuzawa et al., 2004) als auch die Interaktion mit dem p67^{phox}-Protein, welches infolgedessen an die membrangebundenen Untereinheiten dirigiert wird (de Mendez et al., 1997). Durch die Phosphorylierung einer weiteren autoinhibitorischen Region am N-Terminus des p47^{phox}-Proteins kann das Protein schließlich selbst an die Membran binden (Ago et al., 2003). Zusätzlich wird die Zusammenlagerung des Enzymkomplexes durch die Bindung des Rac2-Proteins an das p67^{phox}-Protein gefördert (Koga et al., 1999).

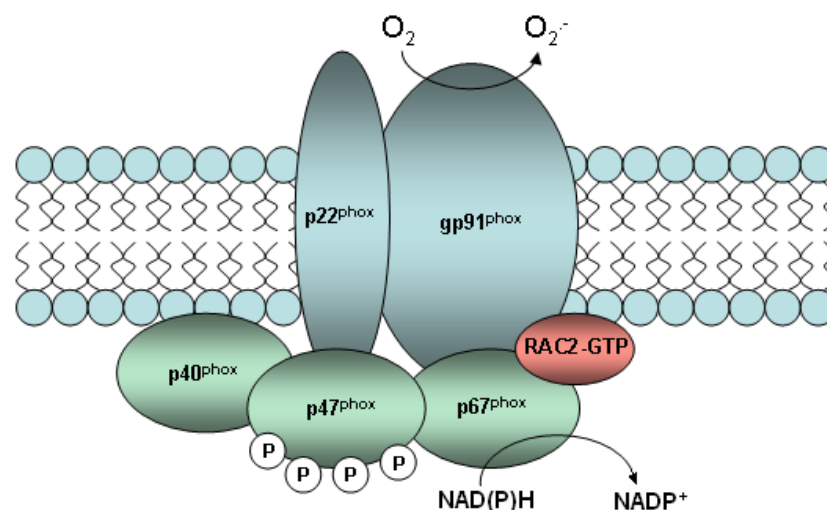


Abbildung 1-1 Zusammengelagerter NAD(P)H-Oxidase-Komplex

Die Funktion der Untereinheit p40^{phox} ist noch nicht eindeutig geklärt. Wie p47^{phox} und p67^{phox} verfügt auch p40^{phox} über so genannte PB1-Domänen (Sumimoto et al., 2007), über die es mit den anderen Proteinen interagieren kann (Moscat et al., 2006). Während einige Arbeitsgruppen eine hemmende Wirkung des Proteins auf die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität beschreiben (Sathyamoorthy et al., 1997, Vergnaud et al., 2000), konnten andere einen aktivierenden Effekt beobachten (Kuribayashi et al., 2002, Tsunawaki et al., 1996). Die Arbeit von Ueyama et al., 2007, liefert eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte. Demnach wird die p67^{phox}-Untereinheit durch p47^{phox} zur Zellmembran und durch p40^{phox} zu endosomalen Kompartimenten geleitet.

Ein weiterer Aktivierungsschritt liegt in der Modifikation von Lipiden, an welche p40^{phox} und p47^{phox} über ihre so genannten PX-Domänen binden können. Dies geschieht sowohl durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase als auch durch die Phospholipase C (Kanai et al., 2001, Zhan et al., 2002).

Eine Hypothese besagt, dass Flavocytochrom *b*₅₅₈ in drei verschiedenen Konformationen vorliegen kann. Dabei geht man davon aus, dass der Komplex unter normalen Bedingungen inaktiv ist. Durch die beschriebenen Aktivierungsvorgänge wechselt die Konformation dann über eine Zwischenstufe in die aktive Form (Cross et al., 1999). Dieser Vorgang wird höchstwahrscheinlich durch die Bindung von gp67^{phox} und Rac2 induziert. Der genaue Mechanismus der Aktivierung konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es unter Beteiligung von p67^{phox} zu einer Übertragung von zwei Elektronen des NAD(P)H auf eine gp91^{phox}-gebundene FAD-Gruppe kommt (Nisimoto et al., 1999). Anschließend erfolgt der weitere Transfer der Elektronen innerhalb der großen Untereinheit vom reduzierten FAD über zwei Häm-Gruppen auf molekularen Sauerstoff, der dadurch zu Superoxid reduziert wird.

Die gebildeten Superoxid-Radikale werden sowohl extrazellulär als auch in spezifische Granula innerhalb der phagozytierenden Zellen sezerniert. Genmutationen in Untereinheiten der phagozytären NAD(P)H-Oxidase verursachen die Entstehung einer schweren Immundefizienz, die als chronische Granulomatose bezeichnet wird. Die Patienten leiden dabei unter schweren Infektionen, da Mikroorganismen durch den Funktionsverlust des Enzyms nicht mehr abgetötet werden können (Heyworth et al., 2003).

1.1.2 Isoformen der NAD(P)H-Oxidase

In den vergangenen zehn Jahren konnten mehrere Isoformen der phagozytären NAD(P)H-Oxidase identifiziert werden. Im Zuge dessen wird die gp91^{phox} auch als Nox2 bezeichnet. Die Isoformen Nox1-5 unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre große katalytische Untereinheit, nach der sie auch benannt sind. Andererseits unterliegen diese Enzyme aber auch unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen. Während Nox1 und Nox3 ähnlich wie Nox2 auf spezifische zytosolische Untereinheiten angewiesen sind, konnten für Nox4 bislang keine regulatorischen Proteine identifiziert werden. Interessanterweise benötigen jedoch alle vier NAD(P)H-Oxidasen die membranständige p22^{phox}-Untereinheit. Im Gegensatz dazu funktioniert die Nox5 p22^{phox}-unabhängig und wird über eine N-terminale Calcium-bindende Domäne reguliert. In den so genannten DUOX-Enzymen 1 und 2 wird die Nox5 am aminoterminalen Ende zusätzlich durch eine transmembranäre α -Helix erweitert, an deren Ende sich extrazellulär eine Peroxidase-Domäne anschließt (daher duale Oxidase, DUOX, genannt). Auf diese Weise kann das produzierte Superoxid durch die räumliche Nähe einer Peroxidase-Domäne sofort weiter metabolisiert werden.

Abgesehen von den verschiedenen Aktivierungsmechanismen unterscheiden sich die Nox-Isoformen auch in ihrer Aktivität und Lokalisation. Während die Aktivität der Nox1-3 durch weitere assoziierte Proteine reguliert wird, produziert die Nox4 ständig Superoxid, wenn auch in wesentlich geringeren Mengen. Es wird daher vermutet, dass sie maßgeblich an der Regulation des zellulären ROS-Haushalts beteiligt ist und auf diese Weise die physiologischen Prozesse in der Zelle steuert. Gleiches gilt aber im Prinzip auch für die anderen Nox-Isoformen. Während in manchen Zellen nur eine NAD(P)H-Oxidase vorkommt, liegen in anderen Zelltypen unterschiedliche Isoformen nebeneinander vor.

1.2 Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS)

1.2.1 Arten, Entstehung und Wirkung reaktiver Sauerstoffverbindungen

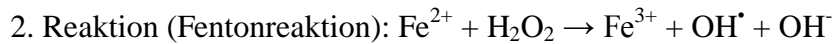
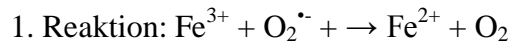
Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie das Superoxid entstehen als Nebenprodukte einer Vielzahl physiologischer Vorgänge und werden dabei als potenziell schädlich betrachtet. Demgegenüber steht die gezielte Bildung von ROS für wichtige zelluläre Funktionen: in phagozytären Zellen zur Abtötung von Pathogenen, in nicht-phagozytierenden Zellen zur Regulation von intrazellulären Signalwegen. In menschlichen Zellen ohne Phagozytenfunktion entstehen pro Tag ca. 2×10^9 ROS-Moleküle pro Zelle (Ames et al., 1993). Eine Auflistung über wichtige Arten von ROS gibt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1 ROS-Spezies, angeordnet nach ihrer intrazellulären Halbwertszeit (Sies, 1993)

ROS-Bezeichnung	Chemisches Symbol	Intrazelluläre Halbwertszeit $t_{1/2}$
Hydroxyl-Radikal	$\cdot\text{OH}$	10^{-9} s
Alkoxy-Radikal	$\text{R-O}\cdot$	10^{-6} s
Superoxidanion-Radikal	$\text{O}_2^{\cdot-}$	10^{-4} s
Singulett-Sauerstoff	$^1\text{O}_2$	10^{-3} s
Peroxy-Radikal	$\text{R-OO}\cdot$	0,1 s
Ubisemiquinon-Radikal	$\text{UQH}\cdot$	0,1 s
Peroxynitrit	ONOO^-	0,1 s
Hypochlorige Säure	HOCl	0,1 s
Stickstoffmonoxid	$\text{NO}\cdot$	0,4 s
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	1,0 s

Eine zentrale ROS-Verbindung ist das membranpermeable H_2O_2 , welches über Superoxid hauptsächlich in Mitochondrien durch stetig entweichende Elektronen der Atmungskette entsteht (Boveris and Chance, 1973). Weitere Quellen für Superoxid bzw. H_2O_2 sind Enzyme bzw. Prozesse, die Sauerstoff als (Ko-)Substrat benutzen. Dazu gehören z. B die Xanthin-Oxidase, das entgiftende Cytochrom p450-System oder die peroxisomale Oxidation von Fett- und Aminosäuren (Ames et al., 1993).

Durch Sekundärreaktionen des Wasserstoffperoxids mit Metallionen (insbesondere Fe^{2+}) entstehen als Teil der Haber-Weiss-Reaktion sehr reaktive Hydroxylradikale (Halliwell and Gutteridge, 1984):



Unter den ROS sind Hydroxylradikale potenziell am gefährlichsten. Sie können auf Grund ihres hohen Redoxpotentials Makromoleküle oxidieren und starke Zellschäden verursachen. Infolge von Oxidationsprozessen an Nukleinsäuren kann es zu Mutationen kommen, während Proteinschäden zu Enzymdefekten und Veränderungen des Cytoskeletts führen. Weiterhin können Lipidperoxidationen die Zellmembran schädigen und den Ionenhaushalt in der Zelle stören (Gosslau and Rensing, 2002). In diesem Zusammenhang spielt oxidativer Stress eine zentrale Rolle in der Zellalterung und damit einhergehenden Degenerations- und Krankheitsprozessen (Harman, 1956).

Um den beschriebenen Prozessen entgegenzuwirken, besitzen Zellen eine antioxidative Abwehr, die auf verschiedenen Ebenen wirksam ist. So können ROS-Verbindungen enzymatisch z. B. durch Glutathion-Peroxidasen oder Katalasen und nicht-enzymatisch durch Antioxidantien wie Vitamin C und E unschädlich gemacht werden. Zusätzlich können Chelatbildner wie Ferritin durch die Komplexbildung von Metallen einer ROS-Bildung entgegenwirken.

1.2.2 Physiologische Bedeutung von ROS

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurde entdeckt, dass reaktive Sauerstoffverbindungen nicht nur schädliche Wirkungen haben, sondern auch eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen spielen. Ein wesentlicher Hinweis darauf war die Identifizierung der verschiedenen Nox-Isoformen. Die Entdeckung von nicht-phagozytären NAD(P)H-Oxidasen, deren einzige Funktion die Produktion von Superoxid ist, ließ vermuten, dass diese Teil eines komplexen Systems der zellulären ROS-Regulation sind (Lambeth, 2004). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffverbindungen eine Vielzahl biologischer Funktionen beeinflussen. So können beispielsweise redox-sensitive Cysteinreste der Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch Oxidation inaktiviert werden. Auf diese Weise wird der Phosphorylierungszustand einer

Vielzahl von Proteinen verändert, die Teil wichtiger Signalkaskaden der Zellproliferation und Zelldifferenzierung sind (Hunter, 2000). Weitere Beispiele sind die Aktivierung von MAP-Kinasen (Djordjevic et al., 2005), die Regulierung von Ionenkanälen (Hidalgo et al., 2004, Tang et al., 2004) und Calcium-abhängigen Prozessen (Wang et al., 2004, Li et al., 1998) sowie die Beeinflussung pro- oder antiapoptotischer Vorgänge (Bedard and Krause, 2007).

1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies

Wenn das Gleichgewicht aus ROS-produzierenden und ROS-abbauenden Prozessen gestört wird, kann dies die Zellfunktionen empfindlich stören. Unphysiologisch hoher oxidativer Stress beschleunigt wie bereits erwähnt Alterungsprozesse und begünstigt eine Vielzahl von Krankheiten. So wird beispielsweise vermutet, dass ROS unter anderem die Entstehung und das Fortschreiten kardiovaskulärer (Bluthochdruck, Arteriosklerose, Herzinsuffizienz) und neurodegenerativer (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer) Erkrankungen begünstigt. Speziell Kardiomyozyten haben auf Grund eines Katalase-Mangels nur eine eingeschränkte antioxidative Abwehr. Außerdem scheinen ROS auch eine wichtige Rolle in der Entstehung und Bekämpfung von Krebs zu spielen und die Wirkungen von Arzneimitteln zu beeinflussen. Die Erforschung von oxidativem Stress gewann daher in den letzten zwanzig Jahren immer mehr an Bedeutung.

1.3 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)

1.3.1 Formen von NHL

Das Hodgkin-Lymphom ist ein bösartiger Tumor des Lymphsystems. Histologisch ist diese Erkrankung durch das Vorkommen einer bestimmten Zellart, der Sternberg-Reed-Zellen, gekennzeichnet, wodurch es sich von den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) abgrenzt.

Durch die große Zahl verschiedener Lymph- und Abwehrzellen gibt es unter den NHL eine Vielzahl von Lymphomtypen. Insgesamt beträgt die Inzidenz der NHL etwa 5-10/100.000/Jahr, Tendenz steigend. Das Geschlechterverhältnis von Männern zu Frauen beläuft sich auf 1,5:1. Vornehmlich sind Patienten im höheren Lebensalter betroffen, einige NHL-Formen haben jedoch einen zweiten Häufigkeitsgipfel in jüngerem Alter. AIDS-Patienten weisen ein bis zu 1000fach höheres Risiko für NHL auf.

NHL werden in indolente (niedrigmaligne) und aggressive (hochmaligne) Formen unterteilt. Das histologische Bild der indolenten Form (etwa 70 % aller NHL) wird hauptsächlich von kleinen, reifen Lymphozyten bestimmt, während bei den aggressiven Formen (etwa 30 % aller NHL) große unreife Zellen vorherrschen. NHL der B-Zell-Reihe sind in beiden Gruppen deutlich häufiger als von T-Zellen (80-85 % *versus* 15-20 %).

Niedrigmaligne Lymphome schreiten langsam voran. Generalisierte Formen (die Mehrzahl der Fälle) sind in der Regel nicht heilbar und nehmen typischerweise einen chronischen Verlauf, an deren Ende es häufig zu einem terminalen Blastenschub kommt, an dem die Patienten versterben. Die Überlebenszeiten nach Diagnosestellung betragen zwischen zwei und zehn Jahren. Nur bei den lokalisierten Formen besteht eine 50 %ige Heilungschance.

Aggressive (hochmalige) Lymphome sind hingegen rasch verlaufende Krankheiten. Unbehandelt ist die Überlebenszeit sehr kurz (nur Wochen bis wenige Monate).

1.3.2 Behandlung hochmaligner NHL

Für die verschiedenen Formen der hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphome gibt es eine Reihe von Behandlungsmethoden. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, werden häufig verschiedene Therapien miteinander kombiniert. Da diese Kombinationen für jedes Lymphom unterschiedlich sind, kann man nicht von einem generellen Standard in der NHL-Therapie sprechen. Nach aktuellem Stand sind mögliche Komponenten der Behandlung Bestrahlung und Chemotherapie, die Verabreichung von Zytokinen, Antikörpern oder Radioimmunkonjugaten, sowie eine Hochdosistherapie mit anschließender Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation. Prinzipiell wird hier durch eine Chemotherapie ein kurativer Therapieansatz verfolgt.

Für die herkömmliche Chemotherapie bei hochmalignen NHL wird häufig das CHOP bzw. CHOEP-Schema angewandt. Dieses besteht aus Cyclophosphamid (C), Doxorubicin (H), Vincristin (O), Prednison (P) und fakultativ Etoposid (E). Mit diesen Behandlungsregimen leben nach fünf Jahren – in Abhängigkeit von Patienten- und Tumorcharakteristika, zusammengefasst in den so genannten IPI-Faktoren (*international prognostic index*) – noch 30-80 % der Patienten (Pfreundschuh et al., 2004a und 2004b). Bei einem Teil der Patienten bietet sich auch die zusätzliche Behandlung mit ionisierender Strahlung an. Eine neuere, sehr erfolgreiche Option stellen Antikörper dar. So überlebten bei Hinzunahme von Rituximab nach drei Jahren 20 % mehr Patienten als bei alleiniger konventioneller Chemotherapie (Pfreundschuh et al., 2006).

1.3.3 Therapienebenwirkungen

Auf Grund mangelnder Selektivität der eingesetzten Substanzen werden leider auch gesunde, schnell proliferierende Gewebe in Mitleidenschaft gezogen, so dass eine Chemotherapie gleichzeitig mit intestinalen Schleimhautschädigungen, Knochenmarksdepression, Haarausfall und fruchtschädigenden Einflüssen in der Schwangerschaft einhergeht. Von den in CHOP/CHOEP enthaltenen Substanzen wirken Cyclophosphamid, Doxorubicin und Etoposid stark myelotoxisch. Die daraus resultierende Knochenmarksdepression mit nachfolgender Leukopenie ist dosislimitierend. In dieser Phase ist die Infektanfälligkeit massiv erhöht und führt im ungünstigsten Fall zum Tod des Patienten. Das Nebenwirkungsprofil von Vincristin ist grundsätzlich unterschiedlich, im Vordergrund steht die Neurotoxizität durch axonale Nervenschädigung. Prednison ist ein Medikament aus der Gruppe der Glukokortikoide und im engen Sinn kein Zytostatikum. Langfristig erhöht die Anwendung einer solchen Zytostatika-Therapie das Risiko für Zweittumore, insbesondere für Lymphome und Leukämien. Speziell für Doxorubicin ist eine kardiotoxische Wirkung bekannt, die sich auch noch Jahre nach der Therapie manifestieren kann.

1.4 Doxorubicin

Das Zytostatikum Doxorubicin ist ein chinonhaltiges Anthrazyklin-Antibiotikum, das auf Grund seiner guten Wirksamkeit Bestandteil vieler Therapieschemata ist. In den 60er Jahren wurde Doxorubicin erstmals aus den Fermentierungsprodukten des Pilzes *Streptomyces caesius peucetius* isoliert (Arcamone et al., 1969). Das Zytostatikum wird sowohl in der Behandlung von Leukämien und Lymphomen als auch von soliden Tumoren wie Brustkrebs und kleinzelligem Lungenkarzinom eingesetzt.

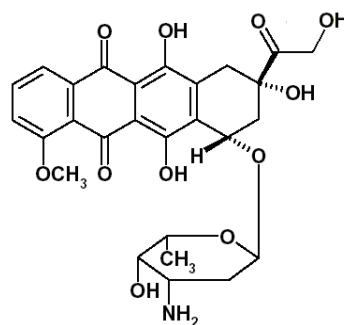


Abbildung 1-2 Strukturformel des Doxorubicins

1.4.1 Wirkungsmechanismus des Doxorubicins

Die Wirkung des Doxorubicins ist auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen. Zum einen kann es sich auf Grund seines planaren Ringsystems in DNA-Stränge einlagern und dadurch Strangbrüche hervorrufen (Gewirtz, 1999). Außerdem ist Doxorubicin ein Topoisomerase II-Hemmstoff (Binaschi et al., 2001). Es lagert sich durch seine Lipophilie sowohl in die Membran der Zellen als auch die der Mitochondrien ein und stört dadurch deren Funktion (Jung et al., 2004). Letztlich bewirken diese Prozesse den Zelluntergang durch Apoptose (Bellarosa et al., 2001). Zudem geht die Anwendung von Doxorubicin mit der Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen einher. Auch diese tragen zur zytotoxischen Wirkung bei. Nach enzymatischer Reduktion zu einem Semichinon-Radikal entsteht durch Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff Superoxid. Über die oben beschriebene Haber-Weiss-Reaktion können sehr aggressive radikalische Verbindungen (besonders das Hydroxylradikal) gebildet werden. Die Kardiotoxizität des Doxorubicins mit dem Risiko einer chronischen Kardiomyopathie wird mit diesen Mechanismen in Verbindung gebracht.

1.4.2 Nebenwirkungen einer Doxorubicin-Therapie

Eine charakteristische Nebenwirkung des Doxorubicins ist wie erwähnt seine Kardiotoxizität, die einen dosislimitierenden Faktor der Therapie darstellt. Man unterscheidet dabei zwischen der akuten und der chronischen Kardiotoxizität. Die akute Kardiotoxizität äußert sich 1-24 Stunden nach Verabreichung des Medikaments in Form von Herzrhythmusstörungen (Steinberg et al., 1987), die nach der Therapie wieder verschwinden. Die chronische Kardiotoxizität entwickelt sich hingegen ab einer kumulativen Doxorubicindosis von 550 mg/m². Etwa 6 % der behandelten Patienten entwickeln nach der Chemotherapie eine irreversible Herzinsuffizienz. Diese kann wenige Monate bis noch Jahrzehnte nach Therapieende auftreten und gilt als nicht heilbar. Doxorubicin verursacht weiterhin die typischen Nebenwirkungen eines auf sich schnell teilende Zellen stark zytostatisch wirkenden Medikaments: erhöhte Infektanfälligkeit, Durchfall, Übelkeit, Erbrechen und Alopezie.

1.5 Funktionelle Bedeutung von SNPs der NAD(P)H-Oxidase

In einer klinisch-epidemiologischen Studie wurden Assoziationen zwischen 210 Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotid polymorphism*, SNP) ausgewählter Kandidatengene und Doxorubicin-induzierter Kardiotoxizität getestet (Wojnowski et al., 2005). Es konnten insgesamt fünf SNPs identifiziert werden, die statistisch signifikante Assoziationen mit den klinischen Phänotypen zeigten. Zwei waren in Genen von Arzneimitteltransportern lokalisiert, diese waren aber nur mit der klinisch wenig relevanten akuten Kardiotoxizität verbunden. Die restlichen drei befanden sich in den Genen der phagozytären NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22^{phox}, p40^{phox} und Rac2. Die Variantenallele der SNPs in p22^{phox} und p40^{phox} gingen dabei mit einem erhöhten Risiko für die schwerwiegende chronische Kardiomyopathie einher. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Relevanz dieses Enzyms für die kardiotoxische Nebenwirkung des Doxorubicins hin.

Der Begriff SNP bezeichnet einen Basenaustausch in der DNA, der in einer Population mit einer Frequenz von mehr als einem Prozent vorhanden ist. Nach aktuellen Schätzungen befinden sich im menschlichen Genom etwa 12.000.000 SNPs. Nur für wenige ist bislang eine funktionelle Bedeutung bekannt. Es kann jedoch angenommen werden, dass es noch viele weitere biologisch und medizinisch relevante SNPs gibt, deren einzelner Beitrag zu einem von vielen Faktoren abhängigen Phänotyp aber jeweils gering sein dürfte. In medizinischer Hinsicht können SNPs das Risiko für eine Erkrankung, deren Verlauf und auch die Therapie beeinflussen. In Bezug auf die Wirkung von Medikamenten sind bislang einige funktionell bedeutsame Genpolymorphismen identifiziert worden, durch die sich die teilweise große Variabilität des therapeutischen Ansprechens erklären lässt. Abgesehen von dem primären Ziel, Arzneimitteltherapien weiter zu optimieren, geben Assoziationsanalysen oftmals wichtige Hinweise zur Aufklärung molekularbiologischer Zusammenhänge.

1.6 Fragestellung

NAD(P)H-Oxidasen sind Enzyme, die durch die Generierung von Superoxid Einfluss auf physiologische Prozesse, ebenso aber auch auf die Entstehung von Krankheiten und Arzneimittelnebenwirkungen nehmen können. Einer klinisch-epidemiologischen Studie zufolge waren drei SNPs der NAD(P)H-Oxidase signifikant mit der kardiotoxischen Nebenwirkung des Zytostatikums Doxorubicin assoziiert. Auf Basis dieses Befundes ergaben sich für meine Dissertation folgende Fragestellungen:

1. Lässt sich für diese drei SNPs ein Einfluss auf Enzymaktivität und Genexpression nachweisen? Dazu sollte die Enzymaktivität an Granulozyten gesunder Probanden sowie die Genexpression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten gemessen werden.
2. Können durch eine umfassende genetische Charakterisierung weitere Varianten in den einzelnen Untereinheiten mit Bedeutung für die Enzymfunktion identifiziert werden? Unter Berücksichtigung aktueller Literatur und Datenbankeinträgen sollten so genannte *tagging* SNPs, welche repräsentativ für die genetische Variabilität der NAD(P)H-Oxidase sind, analysiert werden. Anschließend waren diese mit den funktionellen Messungen (Aktivität und Genexpression) in Beziehung zu setzen.
3. Besteht ein Zusammenhang der unter 2. genannten Genvarianten mit der Dauer des therapeutischen Ansprechens und der Überlebenszeit von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen? Die meisten dieser Lymphome waren vom B-Zelltyp, in denen eine Expression der phagozytären NAD(P)H-Oxidase bekannt ist. Zudem erhielten alle diese Patienten unter anderem Doxorubicin, dessen kardiotoxische Wirkung mit NAD(P)H-Oxidase-SNPs assoziiert war.
4. Ist die beobachtete Beziehung zwischen SNPs der NAD(P)H-Oxidase und Kardiomyopathie spezifisch für Doxorubicin? Oder lässt sich Ähnliches auch für Patienten mit anderen Formen der Herzinsuffizienz beobachten?
5. Beeinflussen Genvarianten der NAD(P)H-Oxidase die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin in PBMCs gesunder Probanden? Dazu sollte mit fünf unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen eine Dosis-Wirkung-Kurve für die Apoptose-Induktion erstellt und mit den Genpolymorphismen verglichen werden.

-
6. Für den Fall, dass mit den zuvor genannten Fragen eine funktionell und medizinisch bedeutsame Genvariante identifiziert wird: Auf welchen Mechanismen beruhen diese Effekte? Dies sollte durch molekularbiologische Untersuchungen geklärt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamidlösung, wässrig, 40 % (w/v)	Biomol, Hamburg
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin min 99%	Applichem, Darmstadt
Annexin-FITC	Roche, Mannheim
APS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Bbv</i> I-Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
BigDye [®] Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid \geq 99,5%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CD3-Antikörper	BioSource, Nivelles, Belgien
Chloroform 99,8%	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Complete mini EDTA Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie [®] Brilliant Blue R 250	BioRad, München
DCF; DCFH-DA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMEM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid \geq 99,5 %	Merck, Darmstadt
DNA-Größenstandard 100 bp	Rapidozym, Berlin
DNA-Größenstandard 1 kb	Rapidozym, Berlin
di-Natriumhydrogen-phosphat	Merck, Darmstadt
dNTP Set	ABgene, Epsom, UK
EDTA 0,5 M in wässriger Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	J. T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethanol (vergällt, 99 %)	GeReSo mbH, Einbeck
Ethidiumbromid (1 % in H ₂ O)	Merck, Darmstadt
FACS Safe Clean	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
FACS Flow	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
FACS Rinse	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll Paque [™] PLUS	GE Healthcare, München
FUGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
GeneScan [™] -120 LIZ [™] size	Applied Biosystems, Darmstadt
Glycerol 85 %	Zentralapotheke Klinikum Göttingen
Helipur [®] H plus N Desinfektionsmittel	Braun, Melsungen
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
Kaliumchlorid	Riedel-De Haën AG, Seelze

Chemikalien	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-012	Wako, Osaka (Japan)
Magermilchpulver	Milasan-GmbH, MalliB
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid 100 %	J. T. Baker, Phillipsburg (USA)
Na-deoxycholate D670	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natronlauge 1 M	Merck, Darmstadt
NBT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Neodisher [®] A 8, Reinigungspulver	Chem. Fabrik Dr. Weigert, Mühlenhagen
NP-40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
PicoGreen [®]	Applied Biosystems, Darmstadt
PMA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polymorphprep [™]	AXIS-Shield PoC AS, Norway
PMSF \geq 98,5 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
POP7 Polymer	Applied Biosystems, Darmstadt
Random Hexamer Primer (dN6)	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNAguard Ribonuklease Inhibitor	Amersham, Freiburg
RNase Zap	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Röntgenfilmentwickler G153	AGFA, Leverkusen
Röntgenfilmfixierer G354	AGFA, Leverkusen
RPMI Medium 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure 1 M	Merck, Darmstadt
SeeBlue [®] Plus2 Prestained Standard (LC5925)	Invitrogen, Karlsruhe
Sephadex G 50 superfine	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	BioRad, München
TEMED \geq 99 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Türksche Lösung	Merck, Darmstadt
Tris 100 %	Roth, Karlsruhe
Tween 20	BioRad, München
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TrypLE [™] Express	Invitrogen, Darmstadt
Trypton	AppliChem, Darmstadt

2.1.1 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme, Kits

Kits	Lieferant/Hersteller
DNeasy [®] Tissue Kit	Qiagen, Hilden
EZ1 DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden
HotStart-IT [™] SYBRGreen qPCR MasterMix (2x)	USB, Staufen
Ligate-IT [™] Rapid Ligations Kit	USB, Staufen
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
PAXgene Blood RNA Kit (50)	PreAnalytiX GmbH, Schweiz
PureYield [™] Midiprep Kit	Promega, Mannheim
qPCR [®] Core Kit (RT-QP73-05)	Eurogentec, Köln
qPCR [®] Core Kit for SYBR [®] Green (RT-SN10-15)	Eurogentec, Köln
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
SNapShot [™] Multiplex Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
TaqMan [®] Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
TOPO [®] XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan [®] Genexpressionsassays (<i>Assay on Demand</i>):	Applied Biosystems, Darmstadt

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Lieferant/Hersteller
Adhäsive PCR-Aluminiumfolie	ABgene, Hamburg
Adhäsive PCR-Folie, klar	ABgene, Hamburg
Costar [®] Mikrotiterplatten, 96 Well, black	Corning, NY, USA
Dialysefilter, 0,025 µm PorendurchmesserVSWP01300	Millipore, Schwalbach
Elektroporationsküvetten 2 mm	PreLab, Erlangen
Einweg Pasteur Pipetten, steril	Roth, Karlsruhe
Filterpapier Nr. 2668	Schleicher und Schuell, Dassel
Filterpapier Nr. 2CHR	Schleicher und Schuell, Dassel
Flat cap strips, 8er, Deckel	ABgene, Hamburg
Glas Pasteur Pipetten 230 mm	WU, Mainz
Glaswaren	Schott, Mainz
Handschuhe, Nitratex, puderfrei	Ansell GmbH, München
Hyperfilm [™] ECL	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Kapillare für 3130xl Genetic Analyser; 50 cm	Applied Biosystems, Darmstadt

Verbrauchsmaterialien	Lieferant/Hersteller
Kryo-Röhrchen (2 ml)	Nunc, Wiesbaden
Kulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Küvetten (UVetten) 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Laborwischtücher	Kimberly-Clark®, Belgien
Latex-Handschuhe, puderfrei	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Lochplatte für Sephadex	Millipore, Schwalbach
MicroAmp™ Clear Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
Minisart Filter 2000 0,2 µm Porendurchmesser	Sartorius, Göttingen
Nunclon™ Multischalen 6, 12 und 24 Well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	Brand, Wertheim
PCR-Platten, 96er	ABgene, Hamburg
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Plattenfiltrationssystem MAHVN 550, Multiscreen	Millipore, Schwalbach
Pipetten steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Platten, 6-Well, steril	Nunc, Wiesbaden
Platten mit flachem Boden, steril 96 Well	Greiner, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen steril 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen sterile 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
PVDF-Membran, 0,45 µm Porendurchmesser	Millipore, Schwalbach
Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Reaktionsgefäße 0,2 ml steril, RNase frei	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml steril, RNase frei	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Monovetten (2,7 ml EDTA)	Sarstedt, Nümbrecht
Monovetten (9 ml und 5,5 ml Li-Heparin)	Sarstedt, Nümbrecht
Thermo-Fast 384-Well- Platten	ABgene, Hamburg
Thermo-Fast 96-Well- Platten	ABgene, Hamburg
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Beckman, München

2.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Accu-jet®	Brand, Wertheim
3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Absaugpumpe Typ N035,3.AN18	Schütt, Göttingen
Adapter für Biophotometer	Implen, München
Autoradiographie-Kassette 2040	Fujifilm, Tokio
Bakterieninkubator-Incudrive	Schütt, Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
BioRobot® EZ1	Qiagen, Hilden
Blot-Apparatur	Biometra, Göttingen
ComPhor L Mini-Gelkammer	Biozym, Hessisch Oldendorf
Elektrophoresekammer „Mighty Small II SE Dual Gel Caster“	Amersham, Pittsburgh, USA
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad, München
Eppendorf Reference® 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
FACScan	Becton Dickinson, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluor-S™ MultiImager	BioRad, München
Hämatocytometer Neubauer Improved	Brand, Wertheim
Inkubator cellsafe	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Inkubator function line	Heraeus, Hanau
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Schorndorf
Mini-Centrifuge, Model GMC-060	LMS, Tokyo, Japan
MS 2 Minishaker-Vortexer	IKA, Staufen
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Netzteil Elektrophoresekammer Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
pH-Meter CG 822	Krannich, Göttingen
Pumpe L-600°	Hitachi, Merck, Darmstadt
QIAcube	Qiagen, Hilden
Schüttler für Bakterien KS260 basic	IKA, Staufen
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Elektro GmbH, Kelheim
Semidry-Kammer mit Glas/Graphit-und Edelstahlelektrode	Phase, Lübeck
Sonotrode MS3	Hielscher, Teltow
Stereomikroskop Stemi 1000	Zeiss, Jena
Sterilbank Clean Air type DFL/REC4 KL2A	Mahl, Trendelburg

Geräte	Hersteller
TaqMan ABI PRISM 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Tecan Ultra Mikroplattengerät	Tecan, Crailsheim
Thermocycler gradient (96er & 384er)	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler PTC200	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallprozessor UP 50 H	Hielscher, Teltow
UV Detektor 655A	Hitachi, Merck, Darmstadt
Vakuumpumpe	Millipore, Schwalbach
Vertikal-Autoklav KSG 40/60	KSG, Olching
Vertikal-Autoklav: FV für Sterilgut	Tecnorama, Fernwald
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen
Wasserstrahlpumpe	Schütt, Göttingen
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge JA-20 Rotor	Beckman, München

2.4 Software, Datenbanken, Sequenzen

Software, Datenbanken, Sequenzen	Hersteller
3100 Data Collection Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, München
Biophotometer PC- Online V1.0	Eppendorf, Hamburg
Cell-Quest Version1.1.2TM	Becton & Dickinson, Heidelberg
Clone Manager Suite	Scientific & Educational Software, USA
CorelDraw 13.0	Corel® Corporation, Ottawa, Kanada
Data Becker Etikettendruck	Data Becker GmbH & Co. KG, Düsseldorf
GeneMapper, Version 3.7	Applied Biosystems, Foster City, USA
Haploview	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, UK
miRanda v3.0	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, USA
MS Office	Microsoft, Redmond, USA
Phase Version 2.1.1 (Haplotypberechnung)	Stephans et al., 2001
Primer Express	Applied Biosystems, Foster City, USA
Oligo	http://www.oligo.net
Quantity One S Version 4.3.1	BioRad, München
SDS 2.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
SigmaPlot 9.0	Systat.Software GmbH, Erkrath
Sequencing Analysis Version 5.2	Applied Biosystems, Foster City, USA

Software, Datenbanken, Sequenzen	Hersteller
SNP500Cancer	http://snp500cancer.nci.nih.gov
SPSS Version 12.0 für Window	SPSS Inc., Chicago, USA
Staden Package (Sequenzanalyse)	http://staden.sourceforge.net
TaqMan®-Analysesoftware SDS 2.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
XFluor4 Software	Tecan, Crailsheim
HapMap Datenbank	http://www.hapmap.org
NCBI-Datenbank	NCBI, Bethesda, USA, http:// www.ncbi.nlm.nih.gov
UCSC Genom Bioinformatics Site	http://genome.brc.mcw.edu

2.5 Biologisches Material

2.5.1 Enzyme

Enzyme	Hersteller
<i>BbvI</i>	New England BioLabs, Beverly, MA, USA
<i>Calf intestinal</i> alkalische Phosphatase (CIAP)	New England BioLabs, Beverly, MA, USA
<i>DpnI</i>	New England BioLabs, Beverly, MA, USA
<i>ExoI</i>	USB Europe GmbH, Staufen
KOD Hifi DNA Polymerase	Novagen, Wisconsin, USA
<i>Shrimps</i> alkalische Phosphatase (SAP)	USB Europe GmbH, Staufen
Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>RsaI</i>	New England BioLabs, Beverly, MA, USA
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

2.5.2 Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika	Bezug	ATCC-Nr.	DSMZ-Nr.
LCL	Humane B-Lymphozyten (lymphoblastoid), immortalisiert mit Eppstein-Barr-Virus, Spender kaukasischen Ursprungs	NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository Collection, Corriell Institute for Medical Research, Camden, New Jersey, USA		
HEK 293	Humane Embryonale Nierenzelllinie immortalisiert mit <i>human adenovirus type 5</i> DNA	DSMZ, Braunschweig		
Hela	Humane Zervix-Karzinom-Zelllinie	ATCC [®] , Wesel	CCL-2 [™]	
MCF7	Humane Brust-Adenokarzinom-Zelllinie	DSMZ, Braunschweig		ACC 115

2.5.3 Bakterienstamm

Stamm	Bakterium	Bezug
Top10	<i>Escherichia coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe

2.5.4 Expressionsvektoren

Nummer	Vektor	Resistenz	Bezug
V79020	pcDNA3.1	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe
IRATp970C1055D	pCMV-SPORT6::CYBB	Ampicillin	Imagenes, Berlin
IRATp970E0371D	pCMV-SPORT6::NOX4	Ampicillin	Imagenes, Berlin

Ein pcDNA3.1-Vektor, der das CYBA-Gen trug, wurde freundlicherweise durch Herrn Dr. M. Tzvetkov (Klinische Pharmakologie, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

2.5.5 Antikörper

Antikörper	Bezug
polyclonal rabbit anti-p22 ^{phox} (FL-195)	Santa Cruz Biotechnology [®] , Inc., Heidelberg
anti-GAPDH (# AHP996)	Serotec, Düsseldorf
goat anti rabbit IgG secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase	Serotec, Düsseldorf

2.5.6 Patienten-DNA

DNA-Proben der Patienten, die an der NHLB-Studie teilgenommen haben, wurden mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. M. Löffler (Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie, Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt.

DNA-Proben der Patienten, die an einer Doxorubicin-unabhängigen Kardiomyopathie erkrankt waren, wurden mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Prof. Dr. med. R. Knöll (Kardiovaskuläre Molekulargenetik, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

3 Methoden

3.1 Probandenrekrutierung und Blutabnahme

Zur Untersuchung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in humanen Granulozyten wurden insgesamt 132 gesunde männliche Kaukasier europäischen Ursprungs rekrutiert (Durchschnittsalter: 30 Jahre, Bereich 18-54, Nichtraucher). Diese Studie unterteilte sich in einen exploratorischen (n = 81, männlich) und einen konfirmatorischen Teil (n = 51, davon 21 Frauen). In eine dritten Studie zur Untersuchung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in Doxorubicin-behandelten humanen PBMCs wurden 142 gesunde Kaukasier europäischen Ursprungs eingeschlossen (davon 75 Frauen, Durchschnittsalter: 26 Jahre, Bereich 19-58, Nichtraucher). Alle Probanden befanden sich in gutem Allgemeinzustand. Eine akute Infektion konnte durch die Bestimmung eines Differentialblutbildes ausgeschlossen werden. Vor der Blutabnahme wurden alle Probanden durch das medizinische Personal und einen ausführlichen Informationsbogen über die Inhalte der Studien und mögliche Risiken bei der Blutabnahme informiert. Im Anschluss an das Aufklärungsgespräch wurde die Teilnahmebereitschaft der freiwilligen Probanden in einer Einverständniserklärung schriftlich festgehalten, die auch durch den Prüfarzt unterzeichnet wurde.

Zur Gewinnung von Granulozyten wurden pro Proband ca. 11 ml Blut in zwei 5,5 ml Li-Heparin-Monovetten entnommen. Außerdem wurden zwei 2,7 ml EDTA-Monovetten für die Isolierung genomischer DNA und für die Bestimmung eines Differentialblutbildes befüllt. Zur späteren Isolierung von RNA wurden von 59 Probanden zusätzlich je 2,5 ml Blut direkt in PAXgene™-Röhrchen entnommen, die bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren wurden. Zur Isolierung von PBMCs wurden pro Proband ca. 18 ml Blut in zwei 9 ml Li-Heparin-Monovetten entnommen. Zusätzlich wurden ebenfalls zwei 2,7 ml EDTA-Monovetten für die Isolierung genomischer DNA und für die Bestimmung eines Differentialblutbildes abgenommen. Die Zellpräparationen erfolgten jeweils innerhalb einer Stunde nach Entnahme des Blutes.

Die Durchführung der Probandenstudien erfolgte jeweils mit dem zustimmenden Votum der Ethikkommission der Georg-August-Universität Göttingen.

3.2 Steriles Arbeiten und Entsorgung von S1-Abfällen und Zytostatika

Alle Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße sowie gegebenenfalls Glasgeräte und Lösungen wurden vor Gebrauch durch Dampfsterilisation im Vertikalautoklav FV sterilisiert (20 min, 121 °C, 2 bar). Hitzeempfindliche Flüssigkeiten wie z. B. Glucoselösung wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Die Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einer Sterilbank (Clean Air type DFL/REC4 KL2A). Gentechnisch veränderte Zellen wurden durch Helipur[®]-Lösung abgetötet, Bakterien durch Zugabe von Neodisher[®]-Pulver. Einwegartikel, die mit gentechnisch veränderten Organismen in Kontakt gekommen waren, wurden vor der Entsorgung im KSG-Autoklav sterilisiert (20 min, 121 °C, 2 bar). Zytostatika-Abfälle und toxische Substanzen wurden vorschriftsgemäß gesammelt und einer gesonderten Entsorgung zugeführt.

3.3 Gewinnung menschlicher Leukozyten durch Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation

Die Gewinnung und Aufreinigung menschlicher Leukozyten erfolgte über eine Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation (isopyknische Zentrifugation). Diese Methode ermöglicht eine Trennung von Teilchen, die eine ähnliche Größe, aber unterschiedliche Dichten haben und sich durch eine herkömmliche Zentrifugation kaum separieren lassen. Dazu werden hochmolekulare Polysaccharide (z. B. Polymorphprep[™] oder Ficoll) mit dem gleichen Volumen an Heparin-Blut oder einer Blutverdünnung überschichtet. Anschließend zentrifugiert man über einen längeren Zeitraum in einem Dichtegradienten, bis sich ein Gleichgewichtszustand eingestellt hat. Die Teilchen bleiben im Schwebestand, wenn ihre Dichte der des umgebenden Mediums entspricht. Partikel mit einer größeren Dichte sedimentieren, Teilchen mit einer geringeren Dichte steigen auf. Die aufgetrennten Zellfraktionen können dann abgenommen und entsprechend weiter behandelt werden.

3.3.1 Isolierung humaner Granulozyten durch Polymorphprep[™]

Die Isolierung von Granulozyten erfolgte mit Hilfe von Polymorphprep[™]. Die Schwebedichten polymorphkerniger Leukozyten (Granulozyten) und Erythrozyten liegen sehr nahe beieinander: $\rho = 1,082\text{--}1,086$ g/ml für neutrophile Granulozyten, $\rho = 1,09\text{--}1,11$ g/ml für Erythrozyten. Um zu verhindern, dass sich bei Zentrifugation beide Zellsorten in einer Schicht anreichern, bedarf es eines kontinuierlichen Dichtegradienten, der eine saubere Trennung ermöglicht. Die Dichte von Polymorphprep[™] liegt bei 1,113 g/ml, also noch

oberhalb der Dichte der Erythrozyten. Die hohe Osmolalität des Polymorphprep™ (ca. 460 mOsm, dies entspricht in etwa einer 1,5fachen Erhöhung) bewirkt, dass die durch Dextran-500 aggregierten Erythrozyten, welche über 90 % der korpuskulären Anteile des Blutes ausmachen, in der hypertonen Umgebung Wasser abgeben und schrumpfen. Durch ihre somit erhöhte Dichte sedimentieren die Erythrozyten rasch durch das visköse Medium. Bei dieser Wanderung kommt es zum Aufbau eines kontinuierlichen Gradienten (oben geringste Dichte, nach unten zunehmend). Die oben an der Plasma-Medium-Grenze ("Interphase") zunächst zurückgehaltenen Granulozyten sinken nun durch die dort verringerte Dichte ab, bis sie innerhalb des Gradienten auf Höhe der ihnen entsprechenden Dichte schweben.

Die PBMCs (Monozyten, Lymphozyten) hingegen verbleiben auf Grund ihrer geringeren Dichte zum überwiegenden Teil in der Interphase. Die 2 %ige Verunreinigung der Granulozytenfraktion mit PBMCs ist vernachlässigbar gering.

Jeweils 5 ml Polymorphprep™ wurden mit 5 ml Gesamtblut überschichtet und für 30 min bei RT zentrifugiert ($500 \times g$, Beschleunigung: 1, Bremse: 0). Zunächst wurde die aus Monozyten und Lymphozyten bestehende Schicht mittels einer Pasteur-Pipette entfernt, um eine Verunreinigung der Granulozyten möglichst gering zu halten. Danach wurde die Schicht der polymorphkernigen Zellen aufgenommen und zunächst in 2-ml-Reaktionsgefäßen gesammelt. Danach wurde eine definierte Menge der Zellen in ein 5-ml-Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen an 0,45 % NaCl-Lösung versetzt, um die physiologische Osmolarität wiederherzustellen. Im Anschluss erfolgten zwei Waschstufen mit RPMI-Medium, wobei das Gesamtvolumen in den Röhrchen jeweils 4 ml betrug (10 min, $500 \times g$, Beschleunigung: 1, Bremse: 1, RT). Nach dem zweiten Waschen wurde das Zellpellet zunächst in 200 μ l PBS-Puffer aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension mit RPMI-Medium (10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) auf eine Konzentration von 2500 Granulozyten/ μ l eingestellt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.3.2 Isolierung von humanen PBMCs durch Ficoll

Bei Ficoll handelt es sich um ein neutrales, stark verzweigtes hydrophiles Sucrosepolymer. Blutzellen, die eine größere Dichte als Ficoll (Erythrozyten, Granulozyten) besitzen, sedimentieren bei Zentrifugation, Zellen geringerer Dichte (Lymphozyten, Monozyten, d. h. PBMCs) verbleiben in der Interphase.

Pro Proband wurden jeweils 15 ml Li-Heparin-Blut mit der gleichen Menge RPMI-Medium gemischt und 2×15 ml Ficoll mit der äquivalenten Menge der Mischung überschichtet. Die zwei 50-ml-Gefäße wurden 30 min zentrifugiert ($400 \times g$, Beschleunigung 1, Bremse 0), die Lymphozytenringe an der Interphase mittels Pasteur-Pipette entfernt und in zwei 15-ml-Gefäßen gesammelt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend mit RPMI-Medium auf je 14 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert ($500 \times g$, 5 min, Beschleunigung 1, Bremse 1). Die Überstände wurden abgesaugt und die Zellpellets in je 10 ml RPMI-Medium gewaschen (Zentrifugation bei $500 \times g$, 5 min, Beschleunigung 1, Bremse 1). Die Zellen wurden anschließend in 1 ml Lymphozyten-Medium vereint und ausgezählt. Die Zellsuspension wurde mit Lymphozyten-Medium auf eine Konzentration von 2000 Zellen/ μl verdünnt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Da bei der Isolierung humaner Granulozyten auch mononukleäre Zellen verschleppt wurden, wurde zur Anfärbung dieser Zellen Türk'sche Lösung verwendet. Das in der Lösung enthaltene Gentianaviolett färbt spezifisch die Zellkerne an, so dass die Granulozyten auf Grund ihres gelappten Zellkerns von den übrigen Zellen unterschieden werden konnten. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10 μl der Zellsuspension 1:11 in Türk'scher Lösung verdünnt. Anschließend wurde eine Neubauer-Zählkammer mit der Verdünnung befüllt und die Zellen mit Hilfe eines Mikroskops gezählt. Die Zählungen wurden von zwei unabhängigen Personen durchgeführt, welche jeweils unter definierten Bedingungen den Durchschnitt aus vier Großquadraten ermittelten. Die Abweichungen der Ergebnisse unterlagen einer Toleranz von maximal 10 %, gegebenenfalls wurde nochmals ausgezählt.

Die Zellzahl von PBMCs und Zellkulturen wurde nach Anfärbung mit Trypanblau ermittelt. Trypanblau kann beschädigte Zellmembranen durchdringen und führt dadurch zu einer tiefblauen Färbung toter oder beschädigter Zellen.

Die Konzentration n_z einer Zellsuspension bestimmt sich aus dem Verdünnungsfaktor f und dem Durchschnitt n_G der gezählten Zellzahl pro Großquadrat nach folgender Formel:

$$n_z \text{ [1/}\mu\text{l]} = 10 \times f \times n_G .$$

3.4 Detektion reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS)

3.4.1 Opsonierung von Zymosan A

Zymosan A ist ein Gemisch aus Protein-Carbohydrat-Komplexen, das aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* präpariert wird. Es handelt sich dabei um eine Substanz, die stimulierend auf die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität von Granulozyten wirken kann. Allerdings ist Zymosan A nur optimal wirksam, wenn es vor Verwendung mit humanem Plasma opsoniert wird. Dabei wird Zymosan A durch Immunglobuline und Faktoren des Komplementsystems bedeckt, so dass es durch Phagozyten als fremd erkannt und unschädlich gemacht werden kann. Die Opsonierung des Zymosans wurde wie im Folgendem beschrieben durchgeführt (Allen, 1986). Zunächst wurden 200 mg Zysosan A eingewogen und mit 50 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % w/v) versetzt. Die Suspension wurde anschließend für 20 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet opsoniert, indem es zunächst in 50 ml frisch aufgetautem, gepooltem humanem Plasma resuspendiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT unter regelmäßigem Schwenken wurde das Zymosan A erneut abzentrifugiert. Die beschriebenen Opsonierungsschritte wurden danach noch einmal wiederholt. Zum Abschluss wurde das Zymosan A-Pellet noch zweimal in je 50 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zuletzt in 50 ml PBS-Puffer resuspendiert. Die Endkonzentration der Zymosan A-Suspension betrug 4 mg/ml und wurde in 650- μ l-Portionen bei $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 3.1 PBS-Puffer, pH 7,4

NaCl	128,5 mM
KCl	2,8 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
H ₂ PO ₄	1,5 mM

3.4.2 Nachweis extrazellulärer ROS durch L-012

Das Luminophor L-012 ist ein hoch empfindliches Nachweismittel für extrazelluläres Superoxid und Peroxynitrit. Kommt es zu einer chemischen Reaktion der genannten Substanzen mit L-012, zerfällt das Luminonophor unter Abgabe von Lichtquanten (Daiber et al., 2004). Auf diese Weise können die gebildeten reaktiven Sauerstoffverbindungen im Moment der Entstehung in Form eines Lichtsignals detektiert werden. Die Bestimmung der

ROS-Produktion isolierter Granulozyten wurde in PBS-Puffer vorgenommen unter Zugabe des Luminophors L-012 in einer Endkonzentration von 100 μM . Zur Stimulierung der NAD(P)H-Oxidase wurde entweder PMA ad 10 ng/ml oder Zymosan A ad 400 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Die Aktivität der stimulierten Zellen wurde in einer Endkonzentration von 250 Zellen/ μl bestimmt. Die vollständigen Reaktionsansätze wurden gut gemischt und sofort auf einer weißen 96-Well-Platte verteilt (je $3 \times 200 \mu\text{l}$). Die Messung der Lumineszenz geschah bei 37 °C im Plattenmessgerät Tecan Ultra über einen Zeitraum von 90 Minuten. Die Erfassung der Messdaten geschah durch das Programm X-Fluor, wobei die Integrationszeit auf 1 s eingestellt wurde. Vor und zwischen den Messzyklen wurde jeweils für fünf Sekunden leicht geschüttelt. Die Messung der ROS-Produktion in Zellkulturen erfolgte ohne die Zugabe stimulierender Substanzen. Die Endkonzentration des L-012 betrug ebenfalls 100 μM , die Zellkonzentration in den Ansätzen jeweils 250 Zellen/ μl .

3.4.3 Nachweis intrazellulärer ROS durch DCFH-DA

Ein Folgeprodukt intrazellulär entstandener Superoxidradikale ist Wasserstoffperoxid, zu dessen Detektion die Substanz 2-7-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) verwendet wurde. Das DCFH-DA gelangt zunächst über die Zellmembran in das Zytosol, wird dort durch Esterasen deacetyliert und in DCFH umgewandelt. Erst in diesem Zustand kann es mit Wasserstoffperoxid reagieren, es handelt sich folglich um einen intrazellulären Nachweis. Das Folgeprodukt dieser Reaktion ist die fluoreszierende Verbindung DCF, welche über den Zeitverlauf des Experiments in der Zelle akkumuliert (LeBel et al., 1992). Die Messung der ROS-Produktion in Zellkulturen erfolgte ebenfalls bei einer DCFH-DA-Endkonzentration von 10 μM . Die Zellkonzentration in den Ansätzen betrug jeweils 500 Zellen/ μl . Pro Ansatz wurden drei Wells einer Mikrotiterplatte (schwarz mit klarem Boden) mit je 100 μl befüllt. Anschließend wurde die Platte für 1 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO_2) gelagert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte als Endpunktbestimmung bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 530 nm.

3.4.4 Nachweis intrazellulärer ROS durch NBT

Das Prinzip des NBT-Assays beruht auf der Oxidation von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) durch Superoxidradikale. Dabei entsteht zunächst ein unlösliches Formazansalz, welches nach Behandlung mit KOH und DMSO in Lösung gebracht werden kann. Im Anschluss daran kann die Extinktion der blauen Lösung bei einer Wellenlänge von 630 nm gemessen werden. Die Versuche wurden nach dem Verfahren von Rook et al. (1985) modifiziert durchgeführt. Die Reaktionen wurden in 5-ml-Röhrchen in einem Gesamtvolumen von 300 µl angesetzt. Dazu wurden $0,15 \times 10^6$ Zellen mit 1,6 mg/ml NBT in PBS-Puffer mit 5,6 mM Glucose gemischt und für 45 min im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gelagert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, und die Zellen wurden gründlich mit Methanol gewaschen, um noch vorhandenes NBT zu entfernen. Die Zellen wurden danach getrocknet und das Formazan durch Zugabe von 270 µl 2 M KOH und 230 µl DMSO in Lösung gebracht. Pro Ansatz wurden 2×200 µl der Lösung in eine durchsichtige Mikrotiterplatte pipettiert. Als Leerwert wurde über den gesamten Versuch ein Röhrchen ohne Zellen mitgeführt und wie die restlichen Proben behandelt.

3.5 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht sowohl die quantitative Vermessung als auch eine molekulare Charakterisierung intakter Zellen. Zur Messung im Durchflusszytometer (FACS-Gerät) wird eine Zellsuspension durch eine Kapillare aufgesogen und durch einen Hüllstrom verdünnt. In der so genannten Durchflusszelle wird die Suspension fokussiert in einer Sequenz von Einzelzellen im rechten Winkel an einem Laser (Extinktion: 488 nm) vorbeigeführt. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, kommt es in Abhängigkeit von der Größe und der Granularität innerhalb der Zelle zur Ablenkung des Strahls, so dass man Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht unterscheiden kann. Anhand dieser Parameter lassen sich beispielsweise die zellulären Bestandteile des Blutes gut charakterisieren: Mit zunehmender Größe der Zelle nimmt auch die Intensität des Vorwärtsstreulichtes zu, mit ansteigender Granularität erhöht sich der Anteil des Seitwärtsstreulichtes. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, mit einem Durchflusszytometer Fluoreszenzsignale zu detektieren. Durch die Zugabe fluoreszierender Farbstoffe oder fluoreszenzmarkierter Antikörper kann man somit spezifische Zellbestandteile oder -merkmale markieren und anschließend im FACS-Gerät messen. Die Erfassung der Emission erfolgt über Photodetektoren, wobei in dem verfügbaren FACScan-Gerät drei Wellenlängenbereiche mit Maxima bei 530, 585 und 670 nm gemessen werden können.

3.5.1 Detektion der apoptotischen PBMCs durch Annexin V-Markierung

Tabelle 3.2 Annexin-Puffer, pH 7,4

HEPES	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl ₂	5 mM

Während der Apoptose kommt es zur Verlagerung des Phospholipids Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran. Das Protein Annexin V ist in der Lage, an Phosphatidylserin zu binden. Die Verwendung von Annexin V, welches an Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelt ist, ermöglicht somit eine Fluoreszenz-Markierung der apoptotischen Zellen und kann durchflusszytometrisch bei 530 nm nachgewiesen werden. Da die Membranen nekrotischer Zellen durchlässig werden, kann Annexin V in diesem Fall auch an intrazelluläres Phosphatidylserin binden. Um apoptotische von nekrotischen Zellen zu unterscheiden, ist es daher notwendig, außer Annexin V zusätzlich den Farbstoff Propidiumiodid zu verwenden, der die defekten Zellmembranen nekrotischer Zellen durchdringen kann. In der Zelle interkaliert es in die DNA und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 670 nm. Da das Zytostatikum Doxorubicin eine Eigenfluoreszenz im selben Wellenlängenbereich aufweist, war eine kombinierte Färbung der Doxorubicin-behandelten PBMCs mit Annexin V und Propidiumiodid leider nicht möglich.

Zur Messung der mit Doxorubicin behandelten PBMCs wurden pro Doxorubicin-Konzentration zwei getrennte Ansätze in 5-ml-FACS-Röhrchen hergestellt. Jeder Ansatz wies ein Volumen von 200 µl auf und enthielt jeweils 200.000 Zellen in RPMI-Medium (10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) und Doxorubicin in einer der fünf Endkonzentrationen: 0,03 µM, 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM oder 3 µM. Außerdem wurden jeweils zwei unbehandelte Kontrollproben mitgeführt. Die Ansätze wurden für 48 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gelagert. Vor der Messung wurden die Zellen zunächst mit je 2 ml PBS-Puffer gewaschen (400 × g, 5 min, RT). Die Zellpellets wurden anschließend jeweils in 100 µl einer Mischung (Tabelle 3.3) aus Annexin-Puffer und Annexin (1:500 aus gebrauchsfertiger Lösung des Herstellers, Roche) resuspendiert. Diese Suspension wurde für 10 min im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 600 µl Annexin-Puffer verdünnt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte im FACScan-Gerät mit der Software Cell-QuestVersion 1.1.2™, die auch zur Auswertung verwendet wurde.

Tabelle 3.3 FACS-Mischung für 12 Proben

Annexin- Puffer	1200 µl
Annexin	2,4 µl

3.6 DNA-Analytik

3.6.1 Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen

Genomische DNA aus Blutproben wurde mit Hilfe des BioRobot[®] EZ 1 isoliert. Unter Verwendung des Qiagen EZ1 DNA Blood 350 µl Kit wurde die DNA aus 350 µl Blut automatisch nach Protokoll des Herstellers extrahiert. Zunächst wurden die Blutzellen mit Proteinase-K-haltigem Puffer lysiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von silikatbeschichteten, magnetischen Partikeln. In Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze binden die dehydrierten Nukleinsäuren auf Grund ihrer negativen Ladung an die modifizierte, silikatbeschichtete Oberfläche der Partikel. Diese wurden mittels eines Magneten aus dem Lysat separiert. Nach zwei Waschsritten erfolgte die Elution der DNA in einem Volumen von 200 µl durch Puffer mit geringem Salzgehalt.

DNA aus Zellkulturen (z. B. HEK-Zellen) wurden ohne Zuhilfenahme des Roboters mittels des DNeasy[®] Tissue Kits isoliert. Das Prinzip der DNA-Isolierung entspricht dem des EZ1 DNA Blood 350 µl Kits, mit dem Unterschied, dass die Nukleinsäuren hier an eine spezifische Silikagel-Membran binden.

3.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation)

Verwendete Puffer:

Tabelle 3.4 Resuspensionspuffer, pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase	100 µg/ml

Tabelle 3.5 Lysepuffer

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Tabelle 3.6 Neutralisationspuffer, pH 5,5

Kaliumacetat	3 M
--------------	-----

Tabelle 3.7 TE-Puffer, pH 7,5

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab, z. B. um positive Klone nach einer Transformation zu analysieren, erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dazu wurden 15-ml-Röhrchen mit je 5 ml LB-Medium (Tabelle 3.57) befüllt. Nach Zugabe des Antibiotikums Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml wurde den Bakterienkulturen etwas Material entnommen und das Medium beimpft. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln in Schräglage (~ 40 °C) inkubiert, um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min) und in 250 µl Resuspensionspuffer (+ 4 °C) aufgenommen. Dieser Puffer enthält zwei Komponenten: RNasen zum Abbau der RNA und EDTA, um zweiwertige Kationen zu komplexieren, was zu einer Destabilisierung der bakteriellen Zellwand führt. Nach Zugabe von 250 µl Lysepuffer wurden die Reaktionsgefäße kräftig geschüttelt. In diesem Schritt wurde die dsDNA durch NaOH aufgeschmolzen und Proteine durch das Detergens SDS denaturiert. Anschließend erfolgte die Fällung der Proteine und der genomischen DNA durch zügige Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer. Durch die schlagartige Neutralisierung der Lösung kam es dabei zu einer zufälligen Aggregation homologer Bereiche in der genomischen DNA, so dass diese als hochmolekulares Netzwerk zusammen mit den Proteinen als Niederschlag ausfiel. Die vergleichsweise kurzen, zirkulären komplementären Einzelstränge der Plasmid-DNA sind topologisch verbunden. Daher können sie wieder zu doppelsträngiger DNA hybridisieren und in Lösung bleiben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 × g, 10 min) wurden die Überstände mit 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt und die Plasmid-DNA ausgeschüttelt. Anschließend wurde nochmals für 5 min (13000 × g)

zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, in der die Plasmide enthalten waren, wurde abgenommen und mit 650 µl kalten Isopropanol (-20 °C) versetzt, um restliche Proteine, Salze und freie Oligonukleotide zu entfernen. Nach Zentrifugation bei 4 °C (13000 × g, 15 min) wurde das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei 4 °C abzentrifugiert (13000 × g, 15 min). Das Pellet wurde dann bei 37 °C für 5 min getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Midipräparation)

Die Gewinnung von Plasmid-DNA im größeren Maßstab geschah unter der Verwendung des PureYield™ Midiprep Kits. Die Aufreinigung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Minipräparation (3.6.2), allerdings unter Einsatz von mehr Ausgangsmaterial.

Zunächst wurde eine Vorkultur angelegt, um das Wachstum der Bakterien anzuregen. Dazu wurden 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit Bakterienmaterial angeimpft und für 5 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde der Vorkultur etwas Zellmaterial entnommen, um 50 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) zu beimpfen. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA nach Herstellerprotokoll des Pure Yield™ Midiprep Kits.

3.6.4 Mikrodialyse von Plasmid-DNA

Zur Vermeidung eines Kurzschlussstroms bei der Elektroporation von *E. coli* (3.10.3) wurde die Salzkonzentration der DNA-Lösung gesenkt, indem ein Tropfen der Lösung auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert und für 30 min bei RT gegen a. bidest. dialysiert wurde. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig mittels Pipette aufgenommen und konnte zur Transformation benutzt werden.

3.6.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration der absorbierenden Substanz wird in verdünnten Lösungen durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben:

$$A = \log(I_0 / I) = \varepsilon \cdot c \cdot d.$$

Dabei ist A die im Photometer gemessene Extinktion, I_0 die Intensität des eintretenden und I die Intensität des austretenden Lichtstromes, c die molare Konzentration der

absorbierenden Substanz (in mol/l) und d die Schichtdicke (gemessen in mm). Der molare Absorptionskoeffizient ϵ hat die Dimension $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$.

Die Konzentrationsbestimmung von RNA oder DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren bei 260 nm, welches durch die aromatischen Ringe der Basen hervorgerufen wird. Eine Lösung von doppelsträngiger DNA mit einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ besitzt bei einer Schichtdicke von 1 cm einen Absorptionswert von 1. Auf Grund des hyperchromen Effektes besitzen nicht basengepaarte Nucleinsäuren eine höhere Absorption. Eine Absorption von 1 entspricht daher einer RNA-Konzentration von nur 40 $\mu\text{g/ml}$. Die Qualität einer Nucleinsäurelösung ergibt sich aus ihrer Reinheit. Eine Verunreinigung durch Proteine lässt sich photometrisch bestimmen, da Proteine durch die aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. Durch die Bestimmung des Quotienten $\text{Extinktion}_{260}/\text{Extinktion}_{280}$ lässt sich die Reinheit einer Nucleinsäurelösung abschätzen. Eine reine DNA-Lösung weist einen Wert von 1,8 auf, eine reine RNA-Lösung einen Quotienten von 2,0.

Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden mit a. bidest. bzw. TE-Puffer 1:30 verdünnt und anschließend im Biophotometer (Eppendorf) unter Verwendung von UV-durchlässigen Küvetten (UVetten 50-1000 μl , Eppendorf) quantifiziert. Die Verwendung eines speziellen Adapters der Firma Implen ermöglichte außerdem die Messung kleiner Mengen unverdünnter Nucleinsäureproben (z. B. 3 μl).

3.6.6 Konzentrationsbestimmung von DNA mit PicoGreen

Diese extrem empfindliche Methode zur Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA (dsDNA) beruht auf dem Anstieg der Fluoreszenzintensität des PicoGreen[®] Reagenz nach dessen Interkalation in dsDNA (Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm). Zur Konzentrationsbestimmung wurde genomische DNA 1:20 in a. bidest. verdünnt. Dies geschah unter Verwendung einer 96-Well PCR-Platte in Volumina von je 100 μl . Die Platte wurde anschließend mit adhäsiver Aluminiumfolie zugeklebt und die DNA-Lösungen mit dem Vortex gemischt. Zur Herstellung der PicoGreen[®]-Gebrauchslösung wurde eine 1:400-Verdünnung in TE-Puffer hergestellt. PicoGreen[®] ist sehr lichtempfindlich – daher wurde die Lösung in einem mit Aluminiumfolie umwickelten Plastikgefäß aufbewahrt. Je 200 μl der Gebrauchslösung wurden in die Wells einer für Fluoreszenzmessungen geeigneten Mikrotiterplatte (schwarz mit durchsichtigem Boden) pipettiert und mit je 5 μl der zuvor hergestellten DNA-Lösung versetzt. Zur Erstellung

einer Eichgeraden wurde zusätzlich eine Reihe mit dsDNA-Standard (10 ng/μl) in sechs verschiedenen Mengen mitgeführt (0 ng, 10 ng, 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng). Die Ansätze in der Fluoreszenz-Platte wurden mit dem Vortex gemischt und kurz zentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz im Tecan Ultra. Die Standard Eichgerade wurde benutzt, um die Konzentration der dsDNA mit Hilfe folgender Formel zu berechnen:

$$c_{dsDNA} \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \frac{v \cdot m}{b \cdot V}$$

mit dem Verdünnungsfaktor v , dem Messwert m , der Steigung b der Eichgeraden in RFU/ng und dem Probenvolumen V in μl.

3.6.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine potente *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Die Reaktion verläuft in drei Schritten, die zyklisch wiederholt werden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA-Vorlage (Template) durch Erhitzen auf 95 °C in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Beim darauf folgenden Absenken der Temperatur lagern sich zwei Oligonukleotid-Primer (ca. 18-35 bp lange einzelsträngige DNA-Stücke) an die DNA an (Annealing) und flankieren die zu amplifizierenden komplementären Zielregionen. Mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase (*Taq* DNA Polymerase) werden die Primer komplementär zur ursprünglichen Duplex-DNA bei einer Temperatur von 72 °C verlängert. Es wird eine bestimmte Anzahl an Amplifikationszyklen (30-40) durchgeführt, wodurch das gewünschte Fragment im Reaktionsansatz vermehrt wird. Nach der letzten Amplifikationsrunde schließt sich ein finaler Elongationsschritt von 10 min bei 72 °C an, um zu gewährleisten, dass abschließend alle Elongationen vervollständigt werden können. In Abhängigkeit vom G/C-Gehalt und der Länge der eingesetzten Template- und Primer-DNA mussten die PCR-Bedingungen individuell angepasst werden. Zur Optimierung der Annealing-Temperaturen wurden Gradienten-PCRs durchgeführt, d. h. die Proben wurden im Heizblock entlang eines Temperaturgradienten (meist zwischen 57-70 °C) angeordnet. Auf diese Weise konnten mehrere Temperaturen gleichzeitig getestet werden. Da es sich bei den vorhandenen Thermocyclern um Geräte mit beheizbaren Deckeln handelte, konnte auf eine Überschichtung mit Wachs als Verdunstungsschutz verzichtet werden. Die Primer wurden mit Hilfe der Programme Oligo und Clone Manager generiert. Für einige

Anwendungen wurde anstatt der Qiagen *Taq*-Polymerase die genauer arbeitende KOD-Hifi-DNA-Polymerase verwendet.

Die PCR-Reaktionen zur Genotypisierung mittels PCR-RFLP (3.6.14) wurden in einem Gesamtvolumen von 25 μ l durchgeführt. Vor-PCRs zur Genotypisierung mittels Primer-Extension (3.6.13) wurden in einem Gesamtvolumen von 12 μ l durchgeführt.

Tabelle 3.8 Reaktionsansatz (12 μ l) für eine PCR mit *Taq*-Polymerase (Qiagen)

	(μ l)
Taq-Puffer (10 \times)	1,2
Q-Solution (5 \times) (optional)	2,4
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,24
Vorwärts-Primer (100 μ M)	0,12
Rückwärts-Primer (100 μ M)	0,12
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/ μ l)	0,06
ddH ₂ O	5,86
DNA (10 μ g/ml)	2,0

Tabelle 3.9 Standard-PCR-Bedingungen für *Taq*-Polymerase (Qiagen)

Phase	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95 °C	2 min	30-40 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Anlagerung	50-70 °C	30 s	
Verlängerung	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

Tabelle 3.10 Reaktionsansatz (16 μ l) für eine PCR mit KOD-Hifi-DNA-Polymerase (Novagen, Merck)

	(μ l)
ddH ₂ O	6,18
PCR-Puffer (10 \times)	1,6
Q-Solution (5 \times) (optional)	3,2
dNTPs (2 mM)	1,6
MgSO ₄ (25 mM)	0,64
Vorwärts-Primer (10 μ M)	0,64
Rückwärts-Primer (10 μ M)	0,64
KOD HotStart Polymerase (1 U/ μ l)	0,5
DNA	1

Tabelle 3.11 PCR-Bedingungen für KOD-Hifi-DNA-Polymerase (Novagen Merck)

Phase	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	94 °C	2 min	35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	15 s	
Anlagerung	59 °C	30 s	
Elongation	72 °C	40 s	
Finale Elongation	72 °C	3 min	

3.6.8 Multiplex-PCR

Die Genotypisierung von Proben mittels Primer-Extensions-Methode (3.6.13) erforderte die Generierung von bis zu sieben verschiedenen PCR-Fragmenten für eine Analyse. Um den Arbeitsaufwand so gering wie möglich zu halten, wurden Multiplex-PCRs durchgeführt. Unter Verwendung des Qiagen Multiplex PCR Kits bestand die Möglichkeit, bis zu zwei Fragmente parallel zu amplifizieren. Für eine Multiplex-PCR-Reaktion wurden ein selbst hergestellter Primermix (0,03 µM pro Primer) und ein Multiplex-Reaktionsmix (enthält *Taq*-Polymerase, dNTPs und MgCl₂) benötigt.

Tabelle 3.12 Reaktionsansatz (10 µl) für eine Multiplex PCR (Qiagen)

	(µl)
Multiplex-Reaktionsmix (2 ×)	6
Primermix (10 ×)	1,2
Q-Solution (5 ×) (optional)	1,2
ddH ₂ O	1,6
DNA (10 µg/ml)	2

Tabelle 3.13 Multiplex-PCR-Bedingungen:

Phase	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95 °C	15 min	39 Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 s	
Anlagerung	50-70 °C	1:30 min	
Elongation	72 °C	1:30 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

3.6.9 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen durch ein Trägermaterial in einem elektrischen Feld. Unterschiede in der Ladung und Größe der Teilchen führen zu einer unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit und folglich zu einer Auftrennung von Substanzgemischen. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten werden Gele aus Agarose verwendet. Dabei handelt es sich um ein Polymer, das aus verschiedenen verknüpften Galactoseeinheiten besteht. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA wird von mehreren Faktoren beeinflusst, wie z. B. der Form und Größe der DNA, der angelegten Spannung, der Art des Laufpuffers, der Anwesenheit interkalierender Stoffe und der Agarosekonzentration. Große lineare DNA-Fragmente werden üblicherweise in Gelen mit geringem Agarosegehalt (1-2 %) aufgetrennt, kleine Stücke in höherprozentigen Gelen (2-3 %). Zur Herstellung eines 2 %igen Agarogels wurde 1 g Agarose in 50 ml 1× TBE-Puffer resuspendiert und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich eine homogene Lösung ohne Schlieren gebildet hatte. Nach Abkühlen auf etwa 50-60 °C wurde das Gel mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt und in einen entsprechend vorbereiteten Gelträger gegossen. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA-Doppelhelix und ermöglicht dadurch die Sichtbarmachung der DNA-Banden im UV-Licht. Die Elektrophorese erfolgte in mit Tris-Borat (TBE)-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammern. Nukleinsäuren sind bei pH-Werten über 3 negativ geladen und wandern daher im elektrischen Feld zur Anode. Der Laufpuffer enthielt ebenfalls Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Als Referenz wurde auf jedes Gel ein DNA-Längenstandard (1 kb oder 100 bp DNA-Ladder) aufgetragen. Die Gesamtvolumina der Proben betragen bei analytischen Gelen 12 µl (10 µl DNA mit 2 µl Ladepuffer). Bei einer Spannung von 10 V/cm ergab sich eine Auftrennungszeit von ca. 90 min. Die Verwendung des Fluor-S™ MultiImagers und der Software Quantity One® S Version ermöglichte die Sichtbarmachung der Banden bei einer Wellenlänge von 302 nm und das Fotografieren der Gele zu Dokumentationszwecken.

Tabelle 3.14 TBE-Puffer, pH 8,3

Tris	0,1 M
Borsäure	0,1 M
EDTA	3,0 mM

Tabelle 3.15 Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25 % (v/v)
Ficoll Puffer Typ 400 in 1 % TBE	10 % (v/v)

3.6.10 Aufbewahrung von DNA

Zur kurzfristigen Lagerung (1-2 Tage) wurde DNA im Kühlschrank (+4 °C) gelagert. Über längere Zeiträume wurden die Proben bei -20 °C gelagert, um Spaltungen durch DNasen vorzubeugen.

3.6.11 Signalerzeugung in der Real-Time PCR

Mit Hilfe der Real-Time PCR TaqMan[®] Technik kann die Zunahme an amplifiziertem Produkt in jedem Zyklus verfolgt werden. Dem Reaktionsansatz werden dazu zusätzliche Oligonukleotide, die so genannten „TaqMan[®]-Sonden“ hinzugefügt, die mit zwei Farbstoffen markiert sind: einem fluoreszierenden „Reporter-Farbstoff“ am 5'-Ende und einem „Quencher-Farbstoff“ am 3'-Ende. Das Emissionsspektrum des Reporter-Farbstoffs ist so gewählt, dass es mit dem Anregungsspektrum des Quencher-Farbstoffs überlappt. Wird der Reporter-Farbstoff durch Laserlicht angeregt, führt die Überlappung der Spektren zu einer Energieübertragung auf den Quencher, sofern sich beide Farbstoffe in räumlicher Nähe befinden. Diese Energieübertragung („Fluorescence Resonance Energy Transfer“, FRET) führt dazu, dass nur der Quencher-Farbstoff Licht seiner spezifischen Wellenlänge emittiert. Sobald die TaqMan[®]-Sonde während der PCR komplementär bindet, wird sie durch die 5'-Nukleaseaktivität der Polymerase gespalten. Reporter- und Quencher-Farbstoff werden räumlich voneinander getrennt, wodurch eine Energieübertragung nicht mehr stattfinden kann. Der Reporter-Farbstoff emittiert nun das Licht seiner spezifischen Wellenlänge, die entsprechend proportional zu der entstandenen PCR-Produktmenge ist. Während der gesamten PCR wird die Fluoreszenz-Emission R_n detektiert und auf den internen Standard ROX normalisiert, bezeichnet mit ΔR_n .

3.6.12 Bestimmung des Genotyps durch allelische Diskriminierung

Die Bestimmung von Polymorphismen mittels Real-Time PCR erfolgt durch Detektion von Fluoreszenzsignalen zwischen 500 nm und 660 nm in einer Endpunktmessung. Dazu werden dem PCR-Mastermix Sonden mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung (FAM und VIC) für jedes Allel zugesetzt. Wenn das entsprechende Allel als Template vorhanden ist, werden im Verlauf der PCR die TaqMan[®]-Sonden durch die 5'-Nuklease-Aktivität der

AmpliTaq[®] Gold-DNA Polymerase spezifisch gespalten. Da die Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann man schließlich über die quantitativen Anteile der gemessenen Emissionen eine Aussage über das Vorkommen der Allele treffen. Die Verwendung eines TaqMan[®]-minor-groove-binder (MGB) führt zu einer Erhöhung des Schmelzpunktes der Sonde. Dies ermöglicht eine präzisere Bestimmung von SNPs durch den Einsatz kürzerer Sonden.

Für die Durchführung eines TaqMan[®]-Assays wurde zunächst ein Mastermix mit allen nötigen Komponenten hergestellt. Dazu wurden der TaqMan[®]-Mix (dNTPs, AmpliTaq[®] Gold-DNA Polymerase, MgCl₂, Puffer und ROX-Standard), ein für jeden SNP spezifischer Sonden- und Primer-Mix und a. bidest. zusammengegeben.

Tabelle 3.16 Standardansatz (5 µl) zur Allelischen Diskriminierung (Applied Biosystems, Darmstadt)

	(µl)
TaqMan [®] Mix (2 ×)	2,5
Sonden & Primer Mix (20 ×)	0,25
ddH ₂ O	1,25
DNA (10 ng/µl)	1,0

Tabelle 3.17 Real-Time PCR-Bedingungen

Phase	Temperatur	Zeit	40 Zyklen
	50 °C	2 min	
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	92 °C	15 s	
Annealing & Elongation	60 °C	1 min	

Tabelle 3.18 Verwendete Taqman[®] Assays zur Genotypisierung (Applied Biosystems, Darmstadt)

Gen	SNP	Assay ID
CYBA	rs4673	C_2038_20
	rs1049255	C_7516913_10
NCF2	rs789192	C_1896672_10
	rs10911363	C_1897369_10
NCF4	rs1883112	C_11521119_10
	rs4820258	C_28028145_10
	rs909484	C_8956867_1
RAC2	rs13058338	C_11744093_10
	rs11089831	C_2493917_1

Je 4 µl Mastermix wurden in die Wells einer 384-Well Mikrotiterplatte gegeben und mit je 1 µl DNA-Probe (10 ng/µl) versetzt. Zusätzlich wurden bei jeder Bestimmung drei Wasserproben mitgeführt. Nach Beschickung der Wells wurde die Platte mit optisch klarer Klebefolie fest verschlossen. Die PCR wurde sowohl im TaqMan[®]-Gerät als auch in herkömmlichen Thermocyclern durchgeführt. Nach erfolgter PCR wurde die Fluoreszenz der freigesetzten Marker im Taqman-Gerät[®] mit einem Argonlaser angeregt und die Emission zwischen 500 und 600 nm mit einer Kamera aufgenommen. Zur Auswertung wurde die Software SDS verwendet.

3.6.13 Genotypisierung der DNA-Proben durch Primerextension (SNaPshot[™])

Die Primerextensions-Methode eignet sich zur Bestimmung mehrerer genetischer Polymorphismen in einer Reaktion. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verlängerung unterschiedlich langer spezifischer Primer, deren Position auf dem Template genau eine Base vor dem jeweiligen SNP endet. Durch den Einbau von ddNTPs, die an ihrem 3'-Ende keine freie Hydroxylgruppe tragen, wird eine Strangverlängerung um nur eine Base gewährleistet. Je nach Allel wird eines der vier möglichen ddNTPs eingebaut, welche mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Guanin blau, Adenin grün, Cytosin schwarz, Thymin rot). Durch diese Markierung und auf Grund ihrer Größe können die so verlängerten Primer im Sequenzierer differenziert werden.

Die zu analysierenden DNA-Abschnitte wurden zunächst in einer Multiplex-PCR (3.6.8) vermehrt. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Zugabe der Exonuclease *ExoI* und der Phosphatase *SAP* (*shrimp alkaline phosphatase*) enzymatisch aufgereinigt, um restliche Primer abzubauen und freie Oligonukleotide zu dephosphorylieren.

Tabelle 3.19 SAP-Puffer (10 ×), pH 8

Tris	200 mM
MgCl ₂	100 mM

Tabelle 3.20 Reaktionsansatz zur enzymatischen Aufreinigung von PCR-Produkten

	µl
SAP-Puffer (10 ×)	0,87
SAP [1 U/µl]	0,26
ExoI [10 U/µl]	1,88
PCR-Produkt	6,0

Je 3 μl der Enzymlösung wurden in die Wells einer 384-Well-Platte verteilt und dazu je 6 μl PCR-Produkte gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80 °C für 15 min, da sonst in der nachfolgenden Reaktion die zur Detektion des Polymorphismus verwendeten Primer auch abgebaut würden. Der Reaktionsansatz für die SNaPshot™-Reaktion (Primer-Extension) enthielt den SNaPshot™-Mastermix (Firma ABI), eine Primermischung (für jeden Polymorphismus einen Primer) und DNA-Template. Je 3 μl des Reaktionsansatzes wurden in die Wells einer 384-Well-Platte verteilt. Nach Zugabe von je 2 μl des aufgereinigten PCR-Produktes wurde die Reaktion in einem 384er-Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 3.21 Reaktionsansatz (5 μl) für die SNaPshot™-Reaktion

	μl
SNaPshot™-Mastermix	0,6
Primermix	0,5
ddH ₂ O	1,9
Aufgereinigtes PCR-Produkt	2,0

Tabelle 3.22 SNaPshot™-Reaktions-Bedingungen

Phase	Temperatur	Zeit	26 Zyklen
Denaturierung	96 °C	10 s	
Annealing	50 °C	5 s	
Elongation	60 °C	30 s	

Nach der SNaPshot™-Reaktion erfolgte erneut eine Aufreinigung der Produkte mit SAP zur Dephosphorylierung der restlichen ddNTPs, da diese in der darauf folgenden Analyse im Sequenzierer Störsignale verursachen können. Die SNaPshot™-Produkte wurden mit je 1 μl einer Mischung aus SAP (0,5 μl) und SAP-Puffer (0,5 μl) versetzt und für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Für die nachfolgende Auftrennung der markierten Primer im Sequenzierer wurden pro Probe 0,1 μl des Längenstandards Genescan™-LIZ® 120 in 9,9 μl Formamid (HiDi) verdünnt. Je 10 μl dieser Mischung wurden in die Wells einer Sequenzierplatte verteilt und mit je 1 μl der aufgereinigten SNaPshot™-Reaktionsprodukte versetzt. Zur Denaturierung der DNA wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt. Formamid hat die Eigenschaft, die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu unterdrücken. In Kombination mit einer sofortigen Lagerung der Proben auf Eis wird so eine Renaturierung zu doppelsträngiger DNA unterbunden. Die Proben wurden anschließend im Sequenzierer analysiert und mit der Software GeneMapper ausgewertet.

Tabelle 3.23 Primer für die Amplifikation der Fragmente zur SNaPshot®-Analyse. Das Primerpaar zur Amplifikation des Fragments, welches den SNP rs9932581 enthält, ist aus der Publikation von Moreno et al., 2007 entnommen.

Gen	SNP	PCR Vorwärts-Primer (5'→3')	PCR Rückwärts-Primer (5'→3')	(bp)	
CYBA	rs3736112	GCTGCCGCAGGTGTGAGAACA	GTGCAGGTGAGCGCTGAGAAGAAG	185	
	rs4673	TGGTAAAGGGCCCGAACAGCTTC	CAACCCTTTGGTGTCTGTGGGTAAAC	210	
	rs8854	ACCGAGGCTCTGCCAGTTCTCA	CAGGGCCTCAAATCCTGGATGAC	346	
	rs9932581	GGAAACCACCAAGTGCCTCGGATGG	TCTGCACCCTGATGTACCAAGGAC	664	
	rs16966671	"	"	"	
	-675A>T	"	"	"	
	rs13306296	"	"	"	
	rs3180279	GACCACGGGATTCCTACTGGCTTTTAC	CATGCTTTCTGGTGAGGGTCTGTAACTTG	402	
	rs1049254	CCCGGGATTTCTGTGTCTGCT	CGCAGATCGGAGGCACCATCAA	383	
	rs1049255	"	"	"	
	rs2254073	ACACCCACCAGCGCTCCATCT	GCGAAGGCCAGCTTCTGTGGATAG	586	
	CYBB	rs7059081	ACTTGGGGAAGTCTGACCCTTATCTG	AATGGAGGGAGTGAGGCTAATGGTACTG	328
rs4422908		"	"	"	
rs5917471		GTGCCAGAGGTACTGGATTTGATTCTTAAC	AGAACCAAGGAGACAAGGCAATTCTAGTG	600	
rs12848910		CAGGCACTCTGAAACCAGGTGATT	AGTATGGCTTGTACTGAAGTATGGCTTCTA	250	
rs4827298		TGTCCTCACCTTTGCTATTCTTTCTAGTG	GCTGCAAAAAGTCCACAAATTCACAC	116	
rs6610669		GGCCATTACAATTGAGGACTAGATTTTCAG	GGCATAGTCACAGGTAAGCCTGAGTTACTC	248	
rs34097325		GTGCCAGAGGTACTGGATTTGATTCTTAAC	AGAACCAAGGAGACAAGGCAATTCTAGTG	600	
rs35773320		TTATGGGTGCCCATCTCACTCTG	GCGGCTGGAATGGAATCAATCTCAG	766	
rs5964146		TGAGGGAATAAAAGCCATCACTTTGAC	GTTGGGTGCTCTTAGGAAAATGACCTAAC	876	
NCF2		rs12096702	GGACCATGCCTTTTCATTCTAGGAT	GGCTAGAAAAGTCTTGGCAGTCAGATT	309
		rs2333682	CTGGGCCTTGATTTCCACACCCTTGTTA	TTTGCAGGAAATTTGGTCCCCTCTGAACT	570
		rs789191	TGCCTTGCCCTCCCCAGTGAGAGCTT	GTTGCGGGCTTGGTGTTTGAGCAGT	126
	rs3845466	ACACCTGCACCCAGGACAATGGAAT	CTCCATAGCAAAGCCTTCTTCTGCTGAC	152	
	rs2274064	AATCCCACCTACCGTCGCCTTGCCCTA	AGAACCCACGGACAGCACACAGAGT	408	
	rs789181	ACCCTTCCCACCCCTAATTGTGATC	GCACCAGTGCCTTAATGTCTGATCTAGATG	968	
	rs789180	"	"	"	
	rs1883113	AGCTTCCCCTGAGTGAGCTCAGA	CGCAATCTGTCATCCGCTCTCATC	306	
NCF4	rs9607388	GGAGGGCCTTAATTTAGGGTGTGTGG	CCCATCACCTGTGCTCAGGATAAAG	282	
	rs10854694	"	"	"	
	rs4821544	GCCTGGGGCTGGAAGTAGAACCTG	GCAGCACTGGGGACAAGAAGATCAAG	113	
	rs741998	"	"	"	
	rs746713	"	"	"	
	rs3788524	GAGGTGAGGTTGCTTCAGGCATTG	AACAGGCTGACTCTGAGTTCACACTCTC	526	

Gen	SNP	PCR Vorwärts-Primer (5'→3')	PCR Rückwärts-Primer (5'→3')	(bp)
	rs6000462	AATGCCAAGTCCTCGGCTGTGTG	CCCTGTGGACACCTAGCATTCAGAAGCTG	745
	rs8137602	"	"	"
	rs5756379	GAAATCTTGGTGGCCGGCAAT	CCGTTTCCCCTACAATGTGTAGCTTATG	706
	rs5750326	GAAATCTTGGTGGCCGGCAAT	CCGTTTCCCCTACAATGTGTAGCTTATG	706
RAC2	rs2213430	CAAAGCCTTGGGCTGCTCCTCTGTAG	TGCCTGCCAGCAGCCACATCTTAG	120
	rs2239775	AGTGCTGCCTTCTTGGCTGGACTG	GGCTGGACCCTGAAGTCTCCACTTTAAC	448
	rs2284038	CCAACCCCCAGCAAACCTACCATC	CCCCAAATCTCTGGCACCTGAGATTAAG	75
	rs5756573	GGAGAGGTGGAGCAGGAGGGAACAGAA	TGCTCCTTTGCTGCCACTCCTCCTCTT	475
	rs9607433	GCCCAGAATGTCCTTCCCACCTTA	TCCAGGCAAAGTAGTCACCTGAGAGAG	268
	rs1476002	"	"	"
	rs6572	TCAACCAGCCCCTGCCATTTCTTA	CAGAAGGCAGAGCCCAGAGCTAAACAAG	262
	rs9798725	"	"	"

Tabelle 3.24 SNaPshot®-Primer. PP = Primerpool. Die Primer wurden für die SNaPshot®-Reaktion auf die sechs Primerpools A-F verteilt. Ein Primerpool entspricht einer simultanen Reaktion, in der die Genotypausprägungen der entsprechenden Polymorphismen bestimmt wurden.

Gen	SNP	SNaPshot-Primer (5'→3')	PP	
CYBA	rs3736112	(GACT) ₇ AGAGGCTGAGGGCAGAGC	D	
	rs4673	CACCACGGCGGTCATGT	F	
	rs8854	GGAGCTAGGGAGCGGATGT	E	
	rs9932581	(CTGA) ₅ CTCCATGGGGAATAAACCCAGCATT	B	
	rs16966671	(GACT) ₇ TCTGAGTGACCCTGGCACCT	B	
	-675A>T	(TGAC) ₉ TCGTACAGTCCGGCCTGGGT	C	
	rs13306296	(TGAC) ₈ TGCTCTGGGCTGGCACAGGC	C	
	rs3180279	TGACTGGTGAGGGTCTGTAACTTGGC	E	
	rs1049254	(GACT) ₅ GCGAGGAGGAGGCTGCGG	A	
	rs1049255	CCCGGACCTGCCCTCCC	A	
	rs2254073	(GACT) ₃ GCCCACTTGACAGGTGAGAACC	A	
	CYBB	rs7059081	(CTGA) ₆ CTATTGGCTGGTTCACATTTCT	A
		rs4422908	(GACT) ₇ CTGTTGGGTGGTTCAGAATAT	A
		rs5917471	(ACTG) ₈ CCAGCAATTAGGCATTCA	D
rs12848910		(GACT) ₅ AGTATGGCTTCTACTGAATGCA	A	
rs4827298		GCTGCAAAAAGTCCACAAATTCACAC	F	
rs6610669		AGGACTAGATTTTCAGTGAGTGAAGACCT	F	
rs34097325		TGACTGCTCCTAAAGACTCAATCAAGTTATAAGAT	F	
rs35773320		(TGAC) ₃ TTGAAGACATTGAAAAACACTTTCTATAATG	F	
rs5964146		(TGAC) ₄ TCTTTCTCTGTCTCTCTCTGTCTCTCT	F	
NCF2		rs12096702	(TGAC) ₆ TACTCAATACATGATGAAGGGAT	C
	rs2333682	(TGAC) ₅ TCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAG	C	
	rs789191	(CTGA) ₃ CTAGTGAGAGCTTCTGCCTCACCT	C	
	rs3845466	(ACTG) ₂ ACTCACTGCAGCATCCCAAAGATG	C	
	rs2274064	(TGAC) ₄ TGTCTCTCATTTGGTTCGAAACAGC	C	
	rs789181	(GACT) ₄ CTGCCAGT (A) ₅ TCAGACAACCTTAGGTAT	E	

Gen	SNP	SNaPshot-Primer (5'→3')	PP	
NCF4	rs789180	CTCGTTGTTCAATTTCTTTGACCCTTC	D	
	rs1883113	(GACT) ₈ AATCTGTCATCCGCTCTCATCA	E	
	rs9607388	(TGAC) ₃ TCATGAGCATAGGCCTTGGG	B	
	rs10854694	(TGAC) ₄ TAGGCAGGGCAAGGACTCTG	B	
	rs4821544	CCGCACGCAAACCTCGAA	D	
	rs741998	(GACT) ₅ AGGTGAGACATCCAAAGATGGG	D	
	rs746713	(CTGA) ₄ CTACCCGGAGACATAAGTACTTCTCC	E	
	rs3788524	ACCTGCCTGGATCTCCAGG	B	
	rs6000462	(CTGA) ₇ CTAGTCCTCGGCTGTGTGATGA	E	
	rs8137602	(ACTG) ₉ TGCCCTTAGAACAATTTCCAGA	E	
	rs5756379	(TGAC) ₄ TAGGACTACAGTCATCCCTGAGGA	B	
	rs5750326	(GACT) ₈ TGGTTTCACCCCTTACTTTT	B	
	RAC2	rs2213430	(CTGA) ₄ CTCCCTTCCAGCTAGAACATGC	E
		rs2239775	(CTGA) ₃ CTCGGGTGTGAGAACACAGACA	E
rs2284038		(CTGA) ₄ CTTCAGCCCAGAAGCTCTCTCC	D	
rs5756573		TGACTGCCCATTCCTGTTGCTCCGT	A	
rs9607433		(CTGA) ₁₀ CTAGTGAAATGGGGCTGGAAGC	A	
rs1476002		(GACT) ₉ CCATATGTTCTCACCAACCTGG	A	
rs6572		(CTGA) ₈ CTAGCTCAGGATCCTGTGAGTG	A	
rs9798725		TGACTGACTCAAGCCTCGATGACATCATTGAAT	D	

3.6.14 Genotypisierung der DNA-Proben durch PCR-RFLP

Die Methode des PCR-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (PCR-RFLP) kann angewendet werden, wenn der zu untersuchende SNP zu einer Veränderung einer bereits existierenden oder künstlich eingeführten Restriktionsendonukleasen-Schnittstelle führt. Die Region der genomischen DNA, in welcher der SNP lokalisiert ist, wird zunächst mittels PCR (3.6.7) amplifiziert und das PCR-Produkt anschließend mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten. Je nach vorliegendem Allel kann die Schnittstelle durch das Enzym erkannt werden oder nicht. Dies führt zur Entstehung von spezifischen DNA-Stücken, die dann über Agarose-Gelelektrophorese (3.6.9) aufgetrennt werden können und schließlich Auskunft über den vorliegenden Genotyp geben.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei SNPs, die im CYBA-Gen lokalisiert sind, über PCR-RFLP bestimmt.

Tabelle 3.25 Primer zur Analyse der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP)

SNP	PCR Vorwärts-Primer (5'→3')	PCR Rückwärts-Primer (5'→3')	Restriktionsenzym
rs9932581	ACCTGAGCCAATGTGGGGTTTGA GG	TGCCACGGCGCTTCTGCTGA GAC	<i>RsaI</i>
rs4673	GTGGTCAGCAGGGCAGCAAA	CAGAGCCAGGGACCCGAATT	<i>BbvI</i>

Um DNA an definierten Stellen zu spalten, werden Restriktionsendonukleasen vom Typ II benutzt. Diese Enzyme übernehmen in Bakterien die Zerstörung und den Abbau artfremder DNA (Restriktion). Sie ermöglichen die Spaltung langer DNA-Moleküle in definierte kürzere Fragmente und stellen damit ein wichtiges Werkzeug in der Molekularbiologie dar.

Das Endvolumen der Ansätze lag bei 20 µl. Sie enthielten neben der DNA das jeweilige Restriktionsenzym (*RsaI* oder *BbvI*) und den für das Enzym spezifisch abgestimmten Reaktionspuffer.

Tabelle 3.26 Standardreaktionsansatz für Restriktionsverdau (20 µl)

	(µl)
Restriktionspuffer (10 ×)	12,5
Restriktionsenzym (2 U/µl)	2,0
ddH ₂ O	0,5
PCR-Produkt	5,0

Zu 15 µl Master-Mix wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt gegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6.15 Ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Zur Einführung einer Punktmutation in ein bestehendes Plasmidkonstrukt wurde nach Weiner et al., 1994, zunächst eine PCR mit der Plasmid-DNA durchgeführt. Dazu wurden die *Proofreading*-Polymerase „KOD HotStart Polymerase“ und zwei zueinander komplementäre Primer verwendet, die jeweils die gewünschte Punktmutation enthielten. Anschließend wurde eine PCR mit niedriger Zyklenzahl durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit je 2 µl des Restriktionsenzym *DpnI* über Nacht bei 37 °C verdaut. Bei *DpnI* handelt es sich um ein Enzym, welches spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA zerschneidet. Da bakterielle Plasmid-DNA methyliert ist, wurde somit die in den Ansätzen enthaltene Template-DNA abgebaut, und nur die neu synthetisierten Plasmide blieben erhalten. Nach Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.6.9) und anschließender Mikrodialyse (3.6.4) wurde das PCR-Produkt direkt zur Transformation (3.10.3) eingesetzt.

Tabelle 3.27 PCR-Reaktionsansatz (50 μ l) zur *site-directed mutagenesis*

	(μ l)
PCR-Puffer (10 \times)	5
dNTPs (2 mM)	5
MgSO ₄ (25 mM)	2
Q-Solution (5 \times) (optional)	10
Vorwärts-Primer (10 μ M)	1,3
Rückwärts-Primer (10 μ M)	1,3
Plasmid-DNA (50 ng/ μ l)	1
KOD HotStart Polymerase (1 U/ μ l)	1
ddH ₂ O	23,4

Tabelle 3.28 PCR-Bedingungen zur *site-directed mutagenesis*

Phase	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95 °C	3 min	19 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Anlagerung	65 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2:30 min	

Tabelle 3.29 Primer zur ortsspezifischen Mutagenese CYBA640A>G

Vorwärts-Primer (5'-3')	GGACCTGCCCTCCCGCCAGGTGCACCCAC
Rückwärts-Primer (5'-3')	GTGGGTGCACCTGGCGGGAGGGCAGGTCC

3.6.16 Sequenzanalyse

Die Überprüfung der ortsspezifischen Mutagenese (3.6.15) erfolgte durch Sequenzierung, modifiziert nach der Methode von Sanger (Sanger and Coulson, 1975). Zunächst wurde eine Sequenzierungs-PCR unter Verwendung des BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Kit enthält neben herkömmlichen dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate) auch spezifisch fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Didesoxynukleotidtriphosphate). Durch den zufälligen Einbau der ddNTPs in den DNA-Strang kommt es auf Grund der fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Abbruch der Strangverlängerung, wodurch unterschiedlich lange, markierte DNA-Stücke entstehen. Die Reaktionen wurden in 384-Well-Platten angesetzt.

Tabelle 3.30 Reaktionsansatz (5 µl) für die Sequenzierungs-PCR

	µl
ddH ₂ O	2,25
DMSO	0,25
Primer	0,5
BigDye®	1
Plasmid-DNA	1

Tabelle 3.31 PCR-Bedingungen der Sequenzierungs-PCR

Phase	Temperatur	Zeit	19 Zyklen
Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Anlagerung	65 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2:30 min	

Tabelle 3.32 Primer zur Sequenzierung von CYBA 640A>G

5' -CTGGGGACAGAAGCACATGACCGCCGTG-3'

Im Anschluss an die Sequenzierungs-Reaktion wurden die Produkte durch Sephadex-Filtration von Salzen und überschüssigen ddNTPs gereinigt. Dazu wurden Wells einer Lochplatte (MultiScreen® Column Loader, Millipore) mit Sephadex-Pulver (G50 superfine, Amersham) befüllt und durch Invertieren in eine 96-Well-Filterplatte (Plattenfiltrationssystem MAHVN 550, Multiscreen) gegeben. Nach Zugabe von 300 µl ddH₂O ließ man das Sephadex über 3 h quellen. Zur Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit wurde diese Platte anschließend bei 1800 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Zugabe weiterer 150 µl ddH₂O und nochmaliger Zentrifugation wurden die Sequenzierungs-PCR-Produkte in 30 µl ddH₂O aufgenommen und auf die gequollene Sephadex-Säule pipettiert. Während der darauf folgenden Zentrifugation (1800 rpm für 5 min) wurden die gereinigten Produkte in einer Mikrotiterplatte aufgefangen und anschließend im Kapillarsequenzierer 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) aufgetrennt. Beim Durchlaufen der Kapillaren (Länge: 50 cm, gefüllt mit Polymer 7, Applied Biosystems) wurden die PCR-Fragmente durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt und die Signale detektiert. Durch die Abfolge der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte in der Elektrophorese ließ sich schließlich die Sequenz ableiten. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit der Software *Sequencing Analysis* Version 5.2 (Applied Biosystems) und darauf mit dem Programm *Staden Package* Version 4.0 (<http://staden.sourceforge.net>).

3.7 RNA-Analytik

3.7.1 Isolierung von RNA

Vor der Zellernte wurden die Zellen (max. 5×10^6) zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 350 μ l RLT-Puffer (Bestandteil der RNeasy Kits) versetzt. Dieser Puffer enthielt Detergenzien zur Zelllyse und 2- β -Mercaptoethanol (10 μ l/ml) zur Denaturierung von Proteinen und Inhibition von RNasen. Die Proben wurden wahlweise entweder zügig weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert. Die Isolierung von RNA aus Zellkulturen wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Bei Verwendung transformierter Zellen mit erhöhtem DNA-Gehalt wurde zur Eliminierung der DNA der RNeasy Plus Kit (Qiagen) ebenfalls nach Angaben des Herstellers verwendet. Alternativ zu den herkömmlichen Arbeitsschritten bestand außerdem die Möglichkeit, die Proben von einem Robotor (Qiagen) bearbeiten zu lassen. Die RNA wurde in einem Endvolumen von 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert.

Die Isolierung von RNA aus humanen Blutproben wurde unter Verwendung des PAXgene Blood RNA Kits (Qiagen) nach Protokoll durchgeführt. Wie bereits unter (3.1) beschrieben, wurde das Blut direkt in spezielle PAXgene-Röhrchen abgenommen, so dass die RNA sofort durch ein stabilisierendes Reagenz geschützt wurde.

Das Prinzip des PAXgene Blood RNA Kits basiert auf der Silikamembran-Technologie. Die Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze führt zu Zelllyse, der Inaktivierung von RNasen und der Bindung von dehydrierter negativ geladener RNA an eine Silikamembran. Die Membran wird mehrmals gewaschen, um Salze und Proteinreste zu entfernen und anschließend getrocknet, um Alkoholreste zu entfernen. Abschließend wird die RNA mit RNase-freiem Wasser von der Membran eluiert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration und der Qualität erfolgte photometrisch (3.6.5).

3.7.2 Handhabung und Aufbewahrung von RNA

RNA-Proben wurden während aller Arbeitsschritte auf Eis gelagert, um sie vor einem Abbau durch RNasen zu schützen. Zusätzlich wurden Handschuhe, Arbeitsflächen und weitere Arbeitsmaterialien mit einer Lösung zur Entfernung von RNasen (RNase-Zap) eingesprüht. Außerdem wurden ausschließlich RNase-freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

3.7.3 cDNA-Synthese

Im Rahmen dieser Dissertation wurde für die Genexpressionsmessung grundsätzlich eine zweischrittige Methode angewandt, d. h. die Synthese der cDNA und die Real Time-PCR waren zeitlich voneinander getrennt.

Die Adaption der PCR-Technologie auf die Amplifikation von RNA ist ein vergleichsweise sensitives Verfahren zur Quantifizierung von RNA-Molekülen. Für die Verwendung üblicher PCR-Methoden ist es jedoch notwendig, die RNA in DNA umzuschreiben, da RNA kein geeignetes Template für Taq-Polymerasen darstellt. Mit Hilfe von Reversen Transkriptasen, ursprünglich retrovirale RNA-abhängige DNA-Polymerasen, kann RNA in so genannte komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Zur cDNA-Synthese wurde pro Probe 1 µg RNA eingesetzt. Zunächst wurde die RNA mit 0,1 units der kurzen dN6 *random*-Primer versetzt. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus Hexanukleotiden unterschiedlicher Sequenz. Sie binden zufällig an die RNA und führen damit zu einem Pool von cDNAs unterschiedlicher Länge, die anschließend mit sequenzspezifischen Primern weiter amplifiziert werden können. Der Ansatz wurde mit RNase-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 18,5 µl ergänzt und zur Denaturierung der RNA für 10 min bei 72 °C inkubiert. Zur Anlagerung der Primer wurden die Proben anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 11,5 µl des RT-Mastermix (Tabelle 3.33)

Tabelle 3.33 Reaktions-Mastermix zur cDNA-Synthese

	μl
RT Puffer (5 \times)	6,00
DTT (0,1 M)	3,50
dNTPs in RNase-freiem H ₂ O (10 mM)	1,00
RNase-Inhibitor (30 U/ μl)	1,00
SuperScript II (200 U/ μl)	0,25

Der Ansatz wurde für 1 h bei 42 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend mit ddH₂O auf 10 ng/ μl eingestellt und bei -20 °C gelagert. Im optimalen Fall wird der gesamte RNA-Pool mit 100 %iger Effizienz in cDNA transkribiert. Dies ist aber für gewöhnlich nicht der Fall. Daher müssen, um unterschiedliche Proben für ein Zielgen vergleichen zu können, Referenzgene gemessen werden.

3.7.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Technik der quantitativen Real-Time PCR ermöglicht, die Amplifikation eines spezifischen PCR-Produktes während der Reaktion zu verfolgen (*real time*). Dies geschieht unter Verwendung fluoreszierender Sonden oder interkalierender Farbstoffe wie SYBR[®]Green, deren Signale durch das TaqMan-Gerät ABI PRISM[®] 7900HT aufgezeichnet werden können. Die Durchführung einer Real-Time PCR mit cDNA kann somit indirekt Auskunft über den ursprünglichen mRNA-Gehalt einer Probe geben. Die Fluoreszenzsignale werden logarithmisch gegen die Zyklenzahl aufgetragen. In der exponentiellen Phase dieser Kurven gilt, dass der Anstieg des Signals proportional zur Kopienzahl des Targets ist. Wegen der logarithmischen Skalierung des Fluoreszenzsignals entspricht der Kurvenverlauf in diesem Bereich einer Geraden. In diesem Bereich wird der Schwellenwert (*threshold*) festgelegt. Der Zyklus, in dem dieser Schwellenwert erreicht wird, wird als *threshold cycle* (Ct) bezeichnet und ist von der Menge des Ausgangsmaterials abhängig. Das Vorhandensein großer Mengen an cDNA eines bestimmten Gens bewirkt einen schnellen Zuwachs des PCR-Produktes: Ct wird früh erreicht. Wenig Ausgangsmaterial verzögert das Erreichen der exponentiellen Phase, d. h. der Ct-Wert ist größer. Damit ist der Ct-Wert umgekehrt proportional zum Logarithmus der Kopienzahl zu Beginn der PCR. Durch Real-Time PCR kann somit die Genexpression unterschiedlicher Proben miteinander verglichen werden. Bei der Auswahl der Primer

sollte darauf geachtet werden, dass mindestens ein Primer eine Exon-Exon-Grenze überspannt. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass bei der PCR nur cDNA und keine genomische DNA amplifiziert wird. Die Detektion der Fluoreszenz genspezifischer Sonden basiert auf dem gleichen Prinzip wie die allelische Diskriminierung (3.6.12) und stellt dadurch ein effizientes Nachweisverfahren dar. SYBR[®]Green ist ein interkalierender Stoff, d. h. er lagert sich unspezifisch in jede doppelsträngige DNA ein. Um die Spezifität dieses Verfahrens zu überprüfen, muss daher über das Erstellen einer Schmelzkurve und einer Agarose-Gelelektrophorese (3.6.9) sichergestellt werden, dass während der PCR nur ein PCR-Produkt amplifiziert wurde.

Tabelle 3.34 Reaktionsansatz (15 µl) einer Real-Time PCR, genspezifische Sonden (Applied Biosystems, Darmstadt)

	(µl)
Eurogentec qPCR Mix (2 ×)	9,0
ABI Sonden & Primer Mix (20 ×)	0,9
ddH ₂ O	5,1
cDNA (10 ng/µl)	3,0

Tabelle 3.35 Real-Time PCR-Bedingungen

Phase	Temperatur	Zeit	40 Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing & Elongation	60 °C	1 min	

Tabelle 3.36 Verwendete Genexpressions Assays (Applied Biosystems, Darmstadt)

Gen	Assay ID
CYBA	Hs00164370_m1
NCF4	Hs00241129_m1
RAC2	Hs00427439

Tabelle 3.37 Ansatz (10 µl) einer Real-Time PCR, SYBR[®]-Green

	(µl)
USB Mastermix (2 ×)	5
Vorwärts-Primer (100 µM)	0,02
Rückwärts-Primer (100 µM)	0,02
ddH ₂ O	1,96
cDNA (10 ng/µl)	3,0

Tabelle 3.38 Real-Time PCR-Bedingungen, SYBR[®]-Green

Phase	Temperatur	Zeit	40 Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2	
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing	60 °C	20 s	
Elongation	72 °C	40 s	

Tabelle 3.39 Verwendete Primer zur Real-Time PCR, SYBR[®]-Green

Gen	PCR Vorwärts-Primer (5'-3')	PCR Rückwärts-Primer (5'-3')
CYBA	CGCTGGCGTCCGGCCTGATCCTCA	ACGCACAGCCGCCAGTAGGTAGAT
GAPDH	CCCTTCATTGACCTCAACTACAT	ACGATACCAAAGTTGTCATGGAT
HPRT1	TGACACTGGCAAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
NOX4	CATTTACCCTCACAATGTGTCCA	GCAGAGGCTGACCTCATAGTT

Tabelle 3.40 Reaktionsansatz (10 µl) einer Real-Time PCR, SYBR-Green (QuantiTect[®] Primer Assays, Qiagen)

	(µl)
USB Mastermix (2 ×)	4,2
QuantiTect [®] Primer Assay	0,8
cDNA (10 ng/µl)	5,0

Tabelle 3.41 Real-Time PCR-Bedingungen, SYBR-Green (QuantiTect[®] Primer Assays, Qiagen)

Phase	Temperatur	Zeit	40 Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5	
Denaturierung	95 °C	10 s	
Annealing & Elongation	60 °C	30 s	

Tabelle 3.42 Verwendete QuantiTect[®] Primer Assays (200) für die mRNA Expression (Qiagen)

	Bestellnr.
Hs_NCF1_1_SG	QT01004815
Hs_NCF2_1_SG	QT00089341
Hs_NCF4_1_SG	QT00077847
Hs_CYBA_1_SG	QT00082481
Hs_CYBB_1_SG	QT00029533
Hs_RAC2_1_SG	QT00086212

3.7.5 Relative Quantifizierung der Real-Time PCR

Die Transkriptmenge des Zielgens einer Probe wurde relativ quantifiziert, d. h. sie wurde mit der Expression einer Kontrollprobe oder im Fall der Probandenstudien auf den kleinsten Ct-Wert der jeweiligen Messserie bezogen. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde an den gleichen Proben die Genexpression eines Referenzgens gemessen. Ausgewählt wurden dazu so genannte Housekeeping-Gene (TBP, HPRT1, GAPDH). Alle Proben wurden in doppelter Ausführung gemessen und anschließend der Mittelwert aus den beiden Ct-Werten gebildet. Danach wurden zunächst die Mittelwerte des Referenzgens von denen des Zielgens abgezogen (ΔCt). Voraussetzung war, dass die Amplifikations-effizienz der Normalisierungsgene denen der Zielgene entsprach und dass auch ein ähnliches Expressionsniveau vorlag. Im Anschluss daran wurden die ΔCt -Werte der Proben von denen der Kontrollproben abgezogen ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Unter der Annahme einer Verdopplung pro Zyklus lassen sich die relativen Transkriptzahlen wie folgt berechnen:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}.$$

3.7.6 Untersuchung der CYBA-Transkriptstabilität

Die Untersuchung der Transkriptstabilität wurde an LCL-Zellkulturen vorgenommen, die homozygote Träger des SNPs CYBA 640A>G waren (AA, n = 7; GG, n = 10). Dazu wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät (2×10^6 Zellen/Well) und mit dem Transkriptions-Hemmstoff Actinomycin D (Endkonzentration: 1 $\mu\text{g/ml}$) versetzt. Die Bildung neuer mRNA wurde dadurch unterbunden, so dass die Stabilität der vorhandenen CYBA-Transkripte über 24 h erfasst werden konnte. Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1,5 h, 3 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Actinomycin D-Zugabe) Zellen zur RNA-Asservierung in RLT-Puffer (Qiagen) aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgte unter Verwendung des Qiagen-Roboters (3.7.1). Um möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde die cDNA-Synthese (3.7.3) aller Proben in einem Durchgang vorgenommen. Anschließend erfolgte die Messung der CYBA-Genexpression durch quantitative Real-Time PCR (3.7.4). Zur Auswertung wurden die Ergebnisse der 12 und 24 h-Zeitpunkte jeweils durch den Mittelwert aus den 0 und 6 h Zeitpunkten geteilt. Die Halbwertszeit der CYBA mRNA wurde über die Abnahme der Transkriptmenge in den ersten 12 h nach der Zugabe von Actinomycin D berechnet.

3.7.7 Untersuchung der allelspezifischen Expression des CYBA-Gens (allelic expression imbalance) in Abhängigkeit von CYBA 640A>G

Die allelspezifische Expression des CYBA-Gens in Abhängigkeit von dem SNP CYBA 640A>G wurde in 32 heterozygoten LCL-Zelllinien untersucht. Dazu wurden zu gleichen Zeitpunkten Proben zur Isolierung von RNA und genomischer DNA (gDNA) entnommen. Da sich der CYBA 640A>G SNP in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des CYBA-Gens befindet, wurden zur cDNA-Synthese (3.7.3) oligo dT (T₂₃VN) Primer anstatt der random Primer verwendet. Auf diese Weise wurden ausschließlich 3'-UTRs in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Vermehrung dieser CYBA-Region sowohl in den gDNA- als auch in den cDNA-Proben durch eine PCR. Der Rückwärts-Primer enthielt eine degenerierte Sequenz, da sich in dieser Region ein weiterer SNP (rs7195830) befand. Auf diese Weise konnten beide Allele erkannt werden.

Tabelle 3.43 Verwendete PCR-Primer zur Bestimmung der allelic expression imbalance

Vorwärts-Primer (5'-3')	CGCAGATCGGAGGCACCATCAA
Rückwärts-Primer (5'-3')	TCCCGGCTTCGCTGC(A/G)TTTATTG

Das amplifizierte Fragment, welches den CYBA 640A>G SNP enthielt, hatte eine Länge von 228 bp. Restliche Primer und überschüssige dNTPs wurden durch einen anschließenden Verdau der PCR-Produkte mit 2,5 U SAP und 2 U *ExoI* entfernt (1 h, 37 °C). Die Quantifizierung der Allele des CYBA 640A>G SNPs erfolgte über die Primerextensions-Methode (3.6.13). Die Bedingungen der SNaPshot[®]-Reaktion entsprachen denen zur Genotypisierung. Zur Quantifizierung der allelspezifischen CYBA-Expression wurde zunächst mit der Software GeneMapper version 3.7 (ABI) für jedes SNaPshot[®]-Signal die *area under the curve* (AUC) berechnet. Für jede Probe wurde anschließend das Verhältnis A-Allel/G-Allel sowohl in der gDNA als auch in der cDNA berechnet. Der Quotient der cDNA wurde dann durch den Quotienten der gDNA geteilt und als Logarithmus zur Basis 2 dargestellt.

Tabelle 3.44 Reaktionsansatz (15 µl) zur Bestimmung der allelspezifischen CYBA-Expression

	(µl)
PCR-Puffer (10×)	1,6
dNTPs (2 mM)	1,6
MgSO ₄ (25 mM)	0,64
Q-Solution (5×) (optional)	3,2
Vorwärts-Primer (10 µM)	0,64
Rückwärts-Primer (10 µM)	0,64
Genomische DNA	1
KOD HotStart Polymerase (1 U/µl)	0,5
ddH ₂ O	6,18

Tabelle 3.45 PCR-Bedingungen zur Bestimmung der allelspezifischen CYBA-Expression:

Phase	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	94 °C	2 min	35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	15 s	
Anlagerung	59 °C	30 s	
Elongation	72 °C	40 s	

3.8 Proteinbiochemische Methoden

3.8.1 Isolierung von Gesamtprotein

Die Zellen wurden zunächst abzentrifugiert (900 × g, 3 min) und das Zellpellet in 400 µl kaltem (+4 °C) RIPA-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zunächst durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff vorbehandelt. Ein vollständiger Zellaufschluss erfolgte dann durch Sonifikation (Mikrospitze 3; Intervall 0,5; Leistung 50 Watt). Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.46 RIPA Puffer

TRIS-HCl	50 mM
Nonylphenylethylenglycol	1 % (v/v)
Na-deoxycholate	0,25 % (v/v)
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
PMSF (erst kurz vor Gebrauch zugeben)	1 mM

3.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Smith et al., 1985, mit dem BCA-Protein Assay (BCA = *bicinchoninic acid*). Diese Methode zeichnet sich durch seine hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit gegenüber ionischen und nichtionischen Detergenzien aus. In alkalischer Umgebung und Anwesenheit von Cu^{2+} kommt es zur Ausbildung eines farbigen Komplexes zwischen dem Kupfer und den Peptidbindungen der Proteine. Dabei erfolgt eine Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ . Letzteres bildet dann mit zwei BCA-Molekülen einen stabilen roten Farbkomplex aus, der bei 562 nm gemessen werden kann. Zur Messung wurden alle Proben 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt. Zur Erstellung einer Proteinstandardreihe wurde eine BSA-Lösung mit RIPA-Puffer auf folgende Konzentrationen verdünnt: 1, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 mg/ml. Als Nullwert wurde reiner RIPA-Puffer verwendet. Jeweils 10 μl Probe wurden in einer klaren Mikrotiterplatte mit 200 μl frisch angesetzter BCA-Lösung versetzt und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte im Tecan Ultra bei 570 nm. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand der BSA-Eichgerade ermittelt.

Tabelle 3.47 BCA-Lösung für eine Probe

	(μl)
Bicinchoninic Acid	200
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (4 %)	4

3.8.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine mittels Elektrophorese in Polyacrylamidgelen der Größe nach auftrennen (Laemmli, 1970). Über die Acrylamidkonzentration und den Anteil der Quervernetzer Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin (TEMED) lässt sich die Porengröße der inerten Gelmatrix beeinflussen. Bei dem im Proben- und Gelpuffer enthaltenen *sodium dodecyl sulfate* (SDS) handelt es sich um ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladungen von Proteinen so effizient überdeckt, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Tertiär- und Sekundärstrukturen werden durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Bei der so genannten diskontinuierlichen Gelelektrophorese durchlaufen die Proben ein dem Trenngel vorgeschaltetes Sammelgel, welches durch langsamen Einlauf der Proben aus den Taschen und des Stapeleffekts einer Aggregation der Proteine entgegenwirkt, diese vorsortiert und konzentriert. Bei der Elektrophorese im Trenngel erhält man über einen bestimmten

Bereich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen. Die Größe der Proteine lässt sich durch Abgleich mit einem mitgeführten Proteinstandard ermitteln.

3.8.4 Herstellung der Polyacrylamidgele

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zunächst wurden alle Komponenten des Trenngels bis auf APS und TEMED zusammengegeben und mit der Wasserstrahlpumpe für 15 min entgast. Im Anschluss daran wurden die beiden fehlenden Komponenten dazugegeben, vorsichtig gemischt und das Gel zügig zwischen die Glasplatten gegossen. Um eine gerade, blasenfreie Gelkante zu gewährleisten, wurde das Gel mit H₂O überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel auf die gleiche Art und Weise vorbereitet. Nach vollständigem Entfernen des Wassers wurde das Sammelgel anschließend auf das Trenngel gegossen und ein Taschenkamm zwischen die Glasplatten gesteckt. Falls das Gel nicht sofort verwendet wurde, wurde es in nassen Zellstoff eingeschlagen und im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 3.48 Zusammensetzung eines SDS-Gels, Angaben in μl

	14 % Trenngel	4 % Sammelgel
ddH ₂ O	1930	1630
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1250	
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)		630
10 % (w/v) SDS	50	30
40 % (w/v) Acrylamid (Mix 37:5:1)	1750	250
10 % APS	25	12,5
TEMED	2,5	2,5

Die Lösungen wurden bei +4 °C gelagert

3.8.5 SDS-PAGE

Tabelle 3.49 Probenpuffer (4×)

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	6,6 ml
Glycerin	7,5 ml
10 % (w/v) SDS	12,0 ml
2 % (w/v) Bromphenolblau	0,5 ml

ad 25 ml ddH₂O; in Aliquots zu 100 μl bei -20 °C lagern

Tabelle 3.50 Elektrophoresepuffer, pH 8,4, 10fach

Tris-HCl	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Zunächst wurde das Gel vertikal in die Elektrophoresekammer „Mighty Small II“ eingespannt. Anschließend wurde die Kammer mit Laufpuffer gefüllt, das Gel mit Puffer überschichtet und für ca. 10 min ein Strom von 12 mA angelegt. In der Zwischenzeit wurden die Proteinproben mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Dabei bewirkt das im Puffer enthaltene SDS das Aufspalten der Wasserstoffbrücken. Die Proben wurden anschließend für mindestens 15 s auf Eis gelagert und kurz abzentrifugiert. Von jeder Probe wurden 10 µg Protein auf das Gel geladen. Zur späteren Identifizierung der Proteinbanden wurden in eine Geltasche 6 µl eines sichtbaren Proteinlängenstandards (SeeBlue[®] Plus2 Prestained Standard, Invitrogen) gefüllt. Eine Anfärbung des Markers mit Ponceau-S nach dem Blot war daher nicht nötig. Danach wurde die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 12 mA/Gel gestartet. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 25 mA/Gel erhöht.

3.8.6 Semidry-Transfer auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Nach der Auftrennung der Proben durch SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen durch ein modifiziertes Semidry-Verfahren nach Kyhse-Andersen, 1984.

Zunächst wurden die Membranen (Porendurchmesser 0,45 µm, Millipore) für 10 s in Methanol aktiviert, anschließend zweimal mit Wasser gespült und danach für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Außerdem wurden sechs dicke und zwei dünne Filterpapiere (Whatman[®] Schleicher und Schuell Nr. 2668 und Nr. 2CHR) mit Transferpuffer getränkt und das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt. Nachdem die Elektroden (Edelstahlkathode, Glas/Graphitanode) der Transferkammer mit Ethanol gesäubert worden waren, wurde der Blot entsprechend der Laufrichtung der Proteine von der Kathode zur Anode wie folgt vorbereitet: Zuerst wurden auf der Kathode drei dicke Filterpapiere platziert, darauf ein dünnes Filterpapier, anschließend folgte das Polyacrylamidgel, darauf die vorbehandelte PVDF-Membran, danach ein dünnes und abschließend drei dicke Filterpapiere. Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen wurden durch vorsichtiges Walzen mit einer 25-ml-Pipette

entfernt und die Transferkammer geschlossen. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 (45 mA/Gel).

3.8.7 Färbung des Polyacrylamidgels mit Coomassie

Tabelle 3.51 Färbelösung

Coomassie [®] Brilliant Blue R 250	1 % (w/v)
Methanol	5 % (v/v)
Essigsäure	7 %

Zur Überprüfung von Effizienz und Gleichmäßigkeit des Proteintransfers (3.8.6) auf die PVDF-Membran wurden die Polyacrylamidgele nach der Prozedur mit Coomassie-Lösung angefärbt. Die Gele wurden anschließend mit Wasser wieder entfärbt.

3.8.8 Immunchemischer Nachweis der Proteine GAPDH und p22^{phox}

Tabelle 3.52 Blockierungspuffer für GAPDH und p22^{phox}

GAPDH		p22 ^{phox}	
Tris	25 mM	Tris	25 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
Tween	0,05 %	Magermilchpulver	2 %
Magermilchpulver	5 %		

Tabelle 3.53 Puffer zur primären Antikörperbehandlung (GAPDH und p22^{phox})

GAPDH		p22 ^{phox}	
Tris	25 mM	Tris	25 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
Tween	0,05 %	Magermilchpulver	0,5 %
Magermilchpulver	0,5 %		

Tabelle 3.54 Waschpuffer (pH 7,5) für GAPDH und p22^{phox}

GAPDH		p22 ^{phox}	
Tris	25 mM	Tris	25 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
		Tween	0,1 %

Tabelle 3.55 Puffer zur sekundären Antikörperbehandlung für GAPDH und p22^{phox}

Tris	25 mM
NaCl	150 mM
Magermilchpulver	0,5 %

Nach erfolgtem Proteintransfer wurden die PVDF-Membranen zerschnitten und zur Absättigung überschüssiger Bindungskapazitäten getrennt auf einem Kippeschüttler für eine Stunde bei RT in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde das Membranstück, welches die GAPDH-Proteine enthielt, für eine Stunde bei +4 °C in Puffer inkubiert, der einen primären GAPDH-Antikörper (1:2500) enthielt. Entsprechend wurde das andere Membranstück mit einem primären p22^{phox}-Antikörper (1:200) versetzt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Membranen wurden im Anschluss jeweils 3 × 5 min in entsprechendem Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Horseradish-Peroxidase-gekoppelten Antikörper (goat-anti-rabbit IgG, 1:500) für eine Stunde bei RT. Beide Membranstücke wurden anschließend 3 × 5 min in p22^{phox}-Waschpuffer gewaschen und kurz auf Filterpapier getrocknet.

3.8.9 Peroxidase-Nachweis über „Enhanced Chemiluminescence“

Die „Enhanced Chemiluminescence“ stellt eine empfindliche Methode dar, mit der die Reaktion der an den sekundären Antikörper gekoppelten Horseradish-Peroxidase nachgewiesen werden kann. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol durch H₂O₂, wodurch Licht emittiert wird. Die PVDF-Membranen wurden für 5 min mit einem Gemisch aus je 1 ml Luminol- und H₂O₂-Lösung des SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrat Kits (Pierce) unter ständigem Schwenken inkubiert. Die Membranen wurden anschließend getrocknet, in Klarsichtfolie eingeschlagen und in einer Fotokassette fixiert. Die Chemilumineszenz der Immunkomplexe wurde anschließend durch die Belichtung eines ECL-Films dokumentiert. Je nach Lichtintensität wurde der Film einige Sekunden bis Stunden belichtet. Anschließend wurde der Film entwickelt und fixiert. Die

fertigen Bilder wurden eingescannt und mit Hilfe der Software Quantity One Vers. 4.2.1 von BioRad quantifiziert.

3.9 Zellkultur

3.9.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung von Zelllinien erfolgte ausschließlich unter Verwendung steriler Lösungen und Verbrauchsmaterialien. Kulturmedien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Zellkulturen wurden in einem Inkubator unter idealen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂, wassergesättigte Atmosphäre) gelagert. Zur Kultivierung wurden Kulturflaschen mit einer Oberfläche von 25 oder 75 cm² verwendet. Alle Arbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt.

3.9.2 LCL-Zellen

Die Kultivierung der Suspensionszellen erfolgte in RPMI-Medium (10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin).

3.9.3 HEK293-Zellen

HEK293-Zellen sind schwach adhärent wachsende Zellen, die mittels Pipette von der Oberfläche abgespült werden konnten. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium (10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin).

3.9.4 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind adhärent wachsende Zellen. Zum Ablösen von der Oberfläche wurden die Zellen einer 75 cm²-Kulturflasche mit 5 ml TrypLE™ Express für ca. 3 min im Inkubator gelagert. Durch anschließendes Klopfen der Flaschen mit der flachen Hand wurden die Zellen weitgehend abgelöst. Restliche Zellen wurden mittels Pipette von der Oberfläche abgespült. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium, dem 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS zugesetzt wurden.

3.9.5 MCF7-Zellen

Die Kulturbedingungen der adhärent wachsenden MCF7-Zellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Kultur der HeLa-Zellen

3.9.6 Kryokonservierung und Auftauen von Zellkulturen

Tabelle 3.56 Einfriermedium

FCS	90 %
DMSO	10 %

Zur Kryokonservierung der Zelllinien wurden Kulturen einer frühen Passage verwendet. Die konfluent gewachsenen Zellen einer 75-cm²-Flasche wurden zunächst resuspendiert und abzentrifugiert (900 × g, 3 min). Anschließend wurde das Pellet in 8 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in vier Kryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden anschließend für 1 h auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben für 1-10 Tage bei -80 °C gelagert, bevor sie schließlich in flüssigen Stickstoff überführt wurden (-170 °C).

Die Kryokulturen wurden nach Bedarf aufgetaut. Dazu wurde der Inhalt eines Röhrchens schnell erwärmt und in 30 ml Kulturmedium überführt, um das DMSO möglichst hoch zu verdünnen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer 25-cm²-Flasche im Inkubator gelagert. Je nach Wachstum wurden die Zellen in den darauf folgenden Tagen in eine 75-cm²-Flasche überführt.

3.9.7 Transfektion

Zur Transfektion wurden die HEK-Zellen mit einer Dichte von $0,45 \times 10^6$ Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät. Nach zwei Tagen erfolgte die Transfektion unter Verwendung von FUGENE 6 Transfektionsreagenz. Pro Well wurden 100 µl DMEM ohne Zusätze mit 6 µl FUGENE-Reagenz gemischt und für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte jeweils die Zugabe von 2 µg Plasmid-DNA mit anschließender Inkubation von 15 min. In der Zwischenzeit wurden die Zellen je mit 2 ml DMEM (10 % FCS) gewaschen, um die Antibiotika zu entfernen. Jedes Well wurde anschließend mit 1,9 ml DMEM (10 % FCS) befüllt und je 100 µl der Transfektionsansätze dazugegeben. Nach einem Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM (10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin). Die Funktionsmessungen erfolgten zwei Tage nach der Transfektion.

3.10 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.10.1 Anzucht von *E. coli*

Tabelle 3.57 Kulturmedien, Mengenangaben in g pro Liter

	LB-Medium	LB-Agar-Platten
Trypton	10	10
Hefeextrakt	5	5
NaCl	5	5
Agar	-	14

Zur Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur wurde LB-Medium verwendet. Die in Tabelle 3.57 aufgeführten Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser aufgelöst und anschließend autoklaviert. Das Medium wurde anschließend bei +4 °C gelagert. Zur Selektion wurde dem Medium das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml beigemischt. Kleinvolumige Kulturen (5 ml) wurden in 15-ml-Röhrchen (Deckel nur leicht angeschraubt), 100-ml-Kulturen in 500-ml-Flaschen auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde flüssiges LB-Medium vor der Sterilisation mit 15 g Agar pro Liter versetzt. Nach der Sterilisation wurde das Antibiotikum zugegeben und die noch warme Lösung in Petrischalen gegossen. Nach Verfestigung des Agars wurden die Platten ebenfalls bei +4 °C gelagert. Zur Selektion einzelner Klone wurden entweder Transformationsansätze mittels eines Drigalski-Spatels auf Agarplatten ausgestrichen oder mit einer Impföse ein Verdünnungsausstrich einer Bakterienkultur angefertigt.

3.10.2 Einfrieren von Bakterien

Zur Herstellung von Kryokulturen wurden 600 µl einer Über-Nacht-Kultur mit 600 µl 50 %igem Glycerin versetzt und unverzüglich bei -80 °C eingefroren.

3.10.3 Transformation durch Elektroporation

Zur Transformation von Plasmiden durch Elektroporation wurden 50 µl elektrokompente *E. coli* (Top 10) langsam auf Eis aufgetaut und in einer gekühlten Elektroporationsküvette mit 0,2 µl dialysierter (3.6.4) Plasmid-DNA versetzt. Anschließend erfolgte die Elektroporation im Elektroporator (2500 V, 25 µF, 200 Ω). Nach Zugabe von 800 µl vorgewärmtem LB-Medium wurde die Küvette gut verschlossen und geschüttelt. Die Zellsuspension wurde zunächst für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden drei Agar-

platten (Ampicillin) mit je 50, 100 oder 200 μ l der Platte beimpft und über Nacht bei 37 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden einzelne Klone selektiert und später nach Mini-präparation (3.6.2) analysiert.

3.11 Bioinformatik

3.11.1 Auswahl der zu analysierenden Genvarianten

Unter Berücksichtigung aktueller Datenbankeinträge sollte über eine genetische Kopplungsanalyse ein Satz an Genvarianten der NAD(P)H-Oxidase ermittelt werden, welcher die bis heute bekannte genetische Variabilität in den Untereinheiten erfasst. Unnötige Redundanzen durch stark miteinander gekoppelte SNPs (genauer gesagt: in hohem Kopplungsungleichgewicht, engl. linkage disequilibrium, LD) sollten vermieden werden, da diese ähnliche genetische Information beinhalten. Dazu wurden die Daten aus dem HapMap-Projekt (<http://www.hapmap.org/index.html.en>) verwendet und mit der Software HaploView analysiert (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). Mit einem in dieser Software enthaltenen Algorithmus wurden die *tagging* SNPs ermittelt. Als Kriterium wurde ein r^2 -Wert von 0,5 (das entspricht dem Bestimmtheitsmaß des Pearson-Korrelationskoeffizienten r) für das paarweise LD zweier SNPs festgelegt. In Betracht kamen alle SNPs mit einer Häufigkeit des selteneren Allels von mindestens 3 %. Ergänzt wurde diese Auswahl durch Genvarianten, die bereits in der Literatur beschrieben wurden (siehe Tabelle 3.58).

Tabelle 3.58 Literaturquellen zu ausgewählten Genpolymorphismen

Polymorphismus	Literatur
CYBA -930A>G	Moreno et al., 2003
CYBA -852C>G	Doi et al., 2005
CYBA -675A>T	Moreno et al., 2007
CYBA 242C>T	Inoue et al., 1998
CYBA 640A>G	de Boer et al., 1992
CYBB rs7059081	Tarazona-Santos et al., 2008
NCF2 rs789181	Olsson et al., 2007
NCF4 rs1883112	Wojnowski et al., 2005
NCF4 rs4821544	Rioux et al., 2007
RAC2 7508T>A	Wojnowski et al., 2005
RAC2 rs1476002	Olsson et al., 2007

3.11.2 Haplotypen

Neben der Information der einzelnen SNPs war auch die allelische Kombination mehrerer Varianten von Interesse, welche durch ein relevantes LD miteinander gekoppelt sind. Solche Kombinationen aus den jeweiligen Allelausprägungen mehrerer SNPs nennt man Haplotypen. Diese wurden nicht experimentell bestimmt, sondern mathematisch mit dem Programm PHASE (Version 2.1) nach Stephens et al., 2001, berechnet. Zur weiteren Analyse wurden nur die Haplotypen verwendet, die mit einer Sicherheit von 95 % bestimmt werden konnten. Jedem Individuum wurden dann zwei Haplotypen, so genannte Diplotypen, zugeordnet.

3.11.3 Primerdesign

Das Design von Primern (PCR, SNaPshot[®]) erfolgte mit Hilfe der Software OLIGO (<http://www.oligo.net>) und dem Programm Clone Manager Suite (Scientific & Educational Software, USA). Synthetisiert wurden die Primer von den Firmen IBA (Göttingen) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

3.12 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der erhobenen Daten (Genotypen, funktionelle und klinische Phänotypen) wurde die Software SPSS (Version 12.0) verwendet. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme SPSS, Excel, Sigma Plot (Version 9.0) und Corel Draw (Version 13.0) verwendet.

3.12.1 Deskriptive Statistik

Die deskriptive Statistik dient zur Beschreibung der Verteilung und Variabilität einer Messgröße. Typische Kenngrößen der deskriptiven Statistik sind Mittelwert, Median, Varianz, Standardabweichung und Standardfehler.

Kann eine Verteilung durch einen mathematischen Parameter (z. B. bei Vorliegen einer Normalverteilung) beschrieben werden, handelt es sich um eine parametrische Verteilung. Ist diese Voraussetzung nicht gegeben, ist die Verteilung nicht-parametrisch. Die Prüfung der Normalverteilung erfolgte unter Verwendung des Shapiro-Wilk-Tests. Eine Normalverteilung wurde angenommen, wenn dieser Test ein Signifikanzniveau von $P > 0,05$ zeigte.

Mit einer Normalverteilung vereinbare Daten wurden in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Die entsprechende Illustration nicht-parametrischer Größen erfolgte mittels Boxplots.

3.12.2 Analytische Statistik

Die analytische Statistik prüft, ob Zusammenhänge zwischen Messparametern und Einflussfaktoren statistisch signifikant sind. Der p -Wert, auch als Irrtumswahrscheinlichkeit bezeichnet, gibt dabei an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein beobachteter Unterschied zwischen zwei oder mehreren Gruppen zufällig ist. Oder anders ausgedrückt: Mit welcher Wahrscheinlichkeit kann die Nullhypothese, dass kein relevanter Unterschied besteht, verworfen werden? In analoger Weise kann auch für die Korrelation von stetigen Messgrößen ein Signifikanzniveau bestimmt werden. Nachfolgend sind die eingesetzten Testverfahren beschrieben.

Unabhängige diskrete Einflussfaktoren und abhängige stetige Messgröße bei unabhängiger Stichprobe

Stetige Messgrößen waren z. B. die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase oder Genexpressionsmessungen. Faktoren, deren Einfluss darauf geprüft wurde, waren die analysierten SNPs mit ihren jeweiligen Genotypausprägungen.

Nicht-parametrische Testverfahren setzen nur ordinal skalierte Messdaten voraus, eine parametrische Verteilung wie die Normalverteilung ist dafür nicht erforderlich. Beim Vergleich von Genotypgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt, bei mehreren Gruppen der Jonkheere-Terpstra-Trendtest, welcher einen Trend zwischen Gruppen berücksichtigt (der Effekt eines heterozygoten Trägerstatus sollte zwischen den beiden homozygoten liegen). Diese Art von Tests war hier grundsätzlich anwendbar, die statistische Power ist jedoch geringer als bei parametrischen Tests.

Entsprach die Verteilung aller zu vergleichenden Gruppen einer Normalverteilung (gemäß Shapiro-Wilk-Test, Q-Q-Plots und Häufigkeitsdiagrammen), konnten parametrische Verfahren eingesetzt werden. Zur Anwendung kamen die lineare Regressionsanalyse und die einfaktorielle ANOVA mit einer Zielvariablen und einer unabhängigen Variablen. Es wurde getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als innerhalb einer Gruppe. Ergab die ANOVA ein statistisch signifikantes Ergebnis, wurde mittels des post-

hoc-Tests nach Bonferroni untersucht, welche Ausprägungen der unabhängigen Variablen sich signifikant unterscheiden.

Stetige Messgrößen bei abhängigen Stichproben

Diese Art der statistischen Testung wurde z. B. bei unterschiedlichen Behandlungen der Zellen eines Probanden oder bei der Analyse der Transkriptstabilität im Zeitverlauf vorgenommen. Bei nicht-parametrischer Verteilung wurde dazu der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben benutzt, bei parametrischer der Student-*t*-Test.

Korrelationsanalyse

Eine mögliche Korrelation von zwei Funktionsparametern wurde bei Normalverteilungen mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten r untersucht. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Zusammenhang über den Spearman-Rank-Korrelationskoeffizienten ρ ausgedrückt.

Verteilung diskreter Parameter

Das Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) ist ein Kriterium für die Richtigkeit einer Genotypisierung. Die beobachteten Genotypverteilungen wurden mit den aus den Allelfrequenzen zu erwartenden verglichen. Die Überprüfung des HWE erfolgte mittels χ^2 -Tests (in EXCEL).

Odds Ratios (OR) werden typischerweise bei Fall-Kontroll- und Kohorten-Studien bestimmt. In einer Vierfeldertafel wird der Zusammenhang zwischen zwei dichotomen Variablen dargestellt, z. B. krank/gesund in Abhängigkeit einer genetischen Konstellation. Dabei drücken Odds für einen bestimmten Genotyp das Verhältnis zwischen krank und gesund aus. Mit dem OR wird das Verhältnis zweier Odds (hier für die beiden Ausprägungen des dichotomen Genotyps) zueinander beschrieben. Ein Wert grösser als 1 beschreibt ein Risiko für ein Ereignis, ein Wert kleiner als 1 beschreibt einen Schutz vor einem Ereignis. Im Allgemeinen wird eine statistische Signifikanz nur dann angenommen, wenn der 95 %-Vertrauensbereich die 1 nicht einschließt.

Verwandt mit dem Odds Ratio ist das relative Risiko (RR), das ebenfalls auf dem Vergleich von zwei dichotomen Variablen beruht. Zunächst wird für eine Genotypausprägung die Wahrscheinlichkeit für ein Ereignis (z. B. für eine Nebenwirkung)

dargestellt und dann für den anderen Genotyp. Das RR errechnet sich als Quotient dieser beiden Wahrscheinlichkeiten. Bei seltenen Ereignissen ist das RR dem OR vorzuziehen.

Überlebenszeitanalysen

Zur statistischen Analyse der Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit einer diskreten Variablen (hier Genotypen) wurde der log-rank-Test angewendet. Dieser Test berücksichtigt eine ordinale Anordnung der unabhängigen Variablen, d. h. bei der Analyse von Genotypen wird der Effekt des heterozygoten Status als zwischen den beiden homozygoten liegend angenommen.

Problem des Multiplen Testens

Bei der üblicherweise verwendeten formalen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ steigt mit der Zahl der Tests die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Befunde an. Die strengste Korrektur ist die nach Bonferroni, bei welcher der zu unterschreitende p -Wert durch die Zahl der Tests dividiert wird. Da die Effektstärke eines funktionalen SNPs in der Regel sehr moderat ist, wäre bei einer die gesamte genetische Variabilität der NAD(P)H-Oxidase charakterisierenden Genotypisierung von ca. 50 SNPs eine sehr große Fallzahl zum Erreichen dieses Signifikanzniveaus nötig. Diese strenge Betrachtung ist insbesondere bei explorativem Vorgehen angebracht. Eine in dieser Arbeit gewählte Alternative bestand in der Durchführung einer Validierungsstudie. Eine auf diese Weise generierte Hypothese für eine mögliche Funktionalität eines SNPs sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden, für welche dann wieder das Standard-Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen werden durfte.

4 Ergebnisse

Der Ausgangspunkt dieser Dissertation war eine Assoziation von drei Einzelnukleotidpolymorphismen in Untereinheiten der phagozytären NAD(P)H-Oxidase mit der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität (Wojnowski et al., 2005). Ziel meiner Arbeit war eine umfassende Darstellung der Bedeutung genetischer Polymorphismen der NAD(P)H-Oxidase im Hinblick auf Genexpression und Enzymaktivität sowie für Ansprechen und Nebenwirkungen bei einer Doxorubicin-haltigen Chemotherapie. Der Funktionalität eines auf diese Weise als bedeutsam identifizierten Polymorphismus sollte durch molekular- und zellbiologische Untersuchungen weiter nachgegangen werden.

Zunächst wurden Messungen der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und der Genexpression durchgeführt. Diese funktionellen Messungen wurden in Bezug auf die drei genannten und zwei weitere häufig in der Literatur untersuchte CYBA-SNPs auf Assoziationen getestet. Anschließend erfolgte eine Ausweitung der Genotypisierung auf einen minimal repräsentativen Satz an SNPs (so genannte *tagging* SNPs) in den NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten auf Basis aktueller Einträge in der HapMap-Datenbank. Zusätzlich wurden weitere NAD(P)H-Oxidase-Polymorphismen berücksichtigt, für die während der Zeit meiner Promotion eine funktionelle Bedeutung in der Literatur beschrieben wurde. Alle Genvarianten wurden anschließend auf einen Zusammenhang mit der Enzymaktivität und der Genexpression geprüft. Weiterhin erfolgten Assoziationsanalysen dieser Polymorphismen mit der klinischen Nebenwirkung der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie sowie des therapeutischen Ansprechens einer CHO(E)P-Therapie bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen. Außerdem wurde ein unabhängiges Kollektiv von Patienten mit nicht-Doxorubicin-verursachter Kardiomyopathie auf Zusammenhänge mit Genpolymorphismen der NAD(P)H-Oxidase überprüft. Zur Klärung des Einflusses von NAD(P)H-Oxidase-Genvarianten auf Doxorubicin-induzierte Apoptose wurde eine weitere Studie mit Leukozyten gesunder Probanden durchgeführt. Abschließend erfolgte eine vertiefende molekularbiologische Analyse einer funktionell und klinisch relevanten CYBA-Genvariante.

4.1 Auswahl der SNPs und Genotypisierung der Proben

Die Untersuchung der Effekte von Einzelnukleotidpolymorphismen bezog sich auf die Gene der fünf NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22^{phox} (CYBA), gp91^{phox} (CYBB), p40^{phox} (NCF4), p67^{phox} (NCF2) und Rac2 (RAC2). Ausgewählt wurden 53 Varianten, die

in unterschiedlichen Genabschnitten lokalisiert sind: 13 in Promotorregionen, fünf in Exonen (davon zwei in 3'UTR), sechs in flankierenden 3' Regionen und 29 Varianten in Intronbereichen. Als Quelle für die in Betracht kommenden Polymorphismen dienten sowohl Datenbankeinträge (HapMap und SNP500Cancer) als auch Literaturberichte. Dabei wurde auf eine hohe Genotypisierungseffizienz geachtet. Zum einen sollten unnötige Redundanzen vermieden werden. Andererseits sollte die Auswahl die genetische Variabilität in den betrachteten Genen komplett erfassen (*tagging* SNPs). Folglich wurden alle SNPs berücksichtigt, bei welchen das seltenere Allel eine Frequenz von mindestens 3 % hat und welche nicht durch einen anderen SNP bereits erfasst sind (d. h. paarweises Kopplungsungleichgewicht mit $r^2 < 0,5$). In Tabelle 4.1 sind die ausgewählten SNPs nach Genen geordnet aufgelistet. Die Häufigkeit und die Verteilung der Genotypen ist jeweils exemplarisch für die Ergebnisse der Probandenstudie zur Untersuchung der Enzymaktivität dargestellt (n = 125). Eine Charakterisierung des NCF1-Gens, welches die Untereinheit p47^{phox} codiert, war wegen des Vorhandenseins von zwei Pseudogenen nicht durchführbar. Insgesamt konnten über 98 % aller Genotypen erfolgreich bestimmt werden. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Genotypisierungen wurden zur Kontrolle an jeweils 10 % der Proben bestätigt, teilweise auch unter Anwendung verschiedener Genotypisierungsverfahren. Die Analyse der Häufigkeitsverteilung ergab, dass für alle Polymorphismen das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt war. Die Verteilung der X-chromosomal vererbten CYBB-Varianten wurde dazu nur an Frauen überprüft. Für alle Genotypen galt $p > 0,4$, getestet mit dem χ^2 -Test als Vergleich zwischen der beobachteten und der erwarteten Genotyp-Verteilung.

Tabelle 4.1 Häufigkeit der ausgewählten Genvarianten in Untereinheiten der phagozytären NAD(P)H-Oxidase, MAF: Minor Allele frequency (bestimmt an der gesamten Gruppe (n=103), Wt: Wildtyp, Var: Variante, UTR: untranslatierte Region, die linke Base des Basenaustauschs definiert jeweils den Wildtyp.

Gen	SNP	Lokalisation	Basenaustausch	MAF	Wt/Wt (%)	Wt/Var (%)	Var/Var (%)	
CYBA	rs3736112	Promotor	C>T	0,19	62,4	36,8	0,8	
	rs8854	Promotor	G>A	0,10	80,8	17,6	1,6	
	rs9932581	Promotor	G>A	0,43	34,4	45,6	20	
	rs16966671	Promotor	G>C	0,40	33,1	54,0	12,9	
	no rs	Promotor	A>T	0,10	81,5	16,9	1,6	
	rs13306296	Promotor	G>A	0,35	39,5	50,8	9,7	
	rs4673	Exon 4 His72Tyr	C>T	0,37	38,4	49,6	12	
	rs3180279	Intron 5	G>C	0,49	27,2	48,0	24,8	
	rs1049254	Exon 6	C>T	0,35	44,7	39,8	15,4	
	rs1049255	Exon 6	A>G	0,48	25,6	52	22,4	
	rs2254073	3' Region	G>A	0,25	58,9	33,1	8,1	
	CYBB	rs7059081	Intron 2	C>G	0,09	89,5	3,2	7,3
		rs4422908	Intron 2	G>T	0,14	84,7	3,2	12,1
rs4827298		Intron 4	C>T	0,19	77,4	6,5	16,1	
rs5917471		Intron 4	C>T	0,38	57,6	8,0	34,4	
rs34097325		Intron 4	A>G	0,06	94,3	0	5,7	
rs6610669		Intron 5	C>T	0,14	84,7	3,2	12,1	
rs35574346		Intron 6	G>A	0,14	84,7	3,2	12,1	
rs35773320		Intron 10	A>G	0,14	84,6	3,3	12,2	
rs12848910		Intron 11	T>C	0,08	91,9	0,8	7,3	
NCF2		rs12096702	Promotor	A>G	0,06	87,9	11,3	0,8
		rs2333682	Promotor	A>G	0,07	87,1	12,1	0,8
	rs789192	Intron 1	A>G	0,47	25,0	56,5	18,5	
	rs789191	Intron 2	G>A	0,04	91,9	8,1	0	
	rs3845466	Intron 2	C>T	0,08	84,7	13,7	1,6	
	rs10911363	Intron 2	G>T	0,25	53,7	42,3	4,1	
	rs2274064	Exon 5	T>C	0,45	29,0	51,6	19,4	
	rs789181	Intron 14	A>G	0,10	80,8	19,2	0	
	rs789180	Intron 14	T>A	0,11	80,0	17,6	2,4	
	NCF4	rs1883113	Promotor	C>G	0,08	84,0	16,0	0
rs4820258		Promotor	T>C	0,13	75,8	22,6	1,6	
rs9607388		Promotor	G>T	0,21	62,9	32,3	4,8	
rs10854694		Promotor	G>A	0,43	29,0	55,6	15,3	
rs1883112		Promotor	G>A	0,45	26,4	57,6	16,0	
rs4821544		Intron 1	T>C	0,35	39,0	52,8	8,1	
rs741998		Intron 1	G>A	0,11	78,9	20,3	0,8	
rs746713		Intron 1	T>C	0,32	47,2	40,8	12,0	

Gen	SNP	Lokalisation	Basenaustausch	MAF	Wt/Wt (%)	Wt/Var (%)	Var/Var (%)
	rs909484	Intron 2	G>A	0,15	71,2	27,2	1,6
	rs3788524	Intron 7	A>G	0,15	71,5	26,0	2,4
	rs6000462	3' Region	G>A	0,06	88,8	11,2	0
	rs8137602	3' Region	G>C	0,13	73,6	26,4	0
	rs5756379	3' Region	T>C	0,34	42,7	46,0	11,3
	rs5750326	3' Region	T>G	0,49	25,0	51,6	23,4
RAC2	rs2213430	Intron 1	C>T	0,42	32,0	51,2	16,8
	rs2239775	Intron 1	G>T	0,16	69,6	28,8	1,6
	rs2284038	Intron 2	A>G	0,40	42,4	35,2	22,4
	rs5756573	Intron 2	C>T	0,16	71,0	26,6	2,4
	rs13058338	Intron 2	T>A	0,31	51,2	35,2	13,6
	rs9607433	Intron 2	G>A	0,08	83,1	16,9	0
	rs1476002	Intron 2	C>T	0,12	77,4	21,8	0,8
	rs11089831	Intron 5	G>A	0,09	84,0	14,3	1,7
	rs6572	Exon 7 3'UTR	C>G	0,43	34,7	44,4	21,0
	rs9798725	3' Region	C>A	0,32	48,8	39,2	12,0

4.2 Probandenstudien zur Untersuchung der Effekte von SNPs der NAD(P)H-Oxidase auf die Enzymaktivität und die Genexpression

4.2.1 NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in humanen Granulozyten

Die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde in zwei voneinander unabhängigen Probandenstudien untersucht. Die exploratorische Studie umfasste 81 Probanden, in die Bestätigungsstudie wurden 51 Probanden eingeschlossen. Zur Untersuchung der intra- und der interindividuellen Variabilität in der exploratorischen Studie wurde die Aktivität von 54 gesunden Personen jeweils an zwei unterschiedlichen Tagen gemessen. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte an isolierten Granulozyten, die entweder durch die Zugabe des Phorbolsters PMA oder durch Zugabe von opsoniertem Zymosan A stimuliert wurden. Die gebildeten Sauerstoffradikale wurden mittels L-012-vermittelter Lumineszenzsignale detektiert. Als Maß für die Enzymaktivität wurde sowohl die maximale ROS-Bildungsrate (v_{\max}) als auch der integrierte Anteil reaktiver Sauerstoffspezies über einen Zeitraum von 60 min (AUC_{60}) analysiert. Beide Analyseparameter zeigten unter Anwendung des Spearman-Rank-Korrelationskoeffizienten ρ eine hohe Korrelation ($\rho = 0,93$ mit PMA; $\rho = 0,95$ mit Zymosan A). Ebenso bestand ein enger Zusammenhang zwischen den beiden eingesetzten Stimuli PMA und Zymosan ($\rho = 0,76$ für v_{\max} ; $\rho = 0,80$ für AUC_{60}).

Die Durchführung der zweiten Probandenstudie diente zur Verifizierung der beobachteten Genotyp-Phänotyp-Assoziationen der exploratorischen Studie. Auf Grund der engen Beziehung zwischen Zymosan A und PMA wurde nur noch der Phorbol-ester PMA zur Stimulation der NAD(P)H-Oxidase eingesetzt. Um die Spezifität der Messergebnisse weiter zu erhöhen, wurden parallel Ansätze mit dem Flavin-Enzym-Inhibitor Diphenylen-Iodonium-Chlorid (DPI) mitgeführt. Auf diese Weise konnten spezifisch die durch Flavin-haltige Enzyme generierten Anteile der reaktiven Sauerstoffspezies bestimmt werden.

Die Genotypisierung der Probanden erfolgte jeweils abschließend nach kompletter Erfassung der Enzymaktivitäten.

4.2.2 Korrelationen zwischen NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und Einzelnukleotid-polymorphismen

Zur statistischen Analyse der Zusammenhänge zwischen genetischen Polymorphismen und der Enzymaktivität wurde der nicht-parametrische Jonkheere-Terpstra Trendtest angewandt. Dieses Testverfahren berücksichtigt einen möglicherweise vorliegenden Alleldosis-Effekt. Die Auswertung der exploratorischen Studie zeigte, dass die inter-individuelle Variabilität in der ROS-Produktion in PMA-stimulierten Zellen zu 38 % durch den Einfluss genetischer Faktoren erklärt werden konnte. Unter Verwendung des relativ unspezifisch wirksamen Zymosan A betrug der Anteil nur 22 %. Alle folgenden Ergebnisse beziehen sich auf Untersuchungen an PMA-stimulierten Granulozyten. Wie der Abbildung 4-1 zu entnehmen ist, ergab sich in der exploratorischen Studie eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Enzymaktivität der NAD(P)H-Oxidase und dem Polymorphismus rs34097325, der im Intron 4 des CYBB-Gens lokalisiert ist ($p = 0,02$). Weitere Assoziationen mit der Enzymaktivität zeigten Polymorphismen im CYBA-Gen: die Variante rs3180279 im Intron 5 ($p = 0,05$) und die Variante rs1049255 in der 3'-untranslatierten Region ($p = 0,05$).

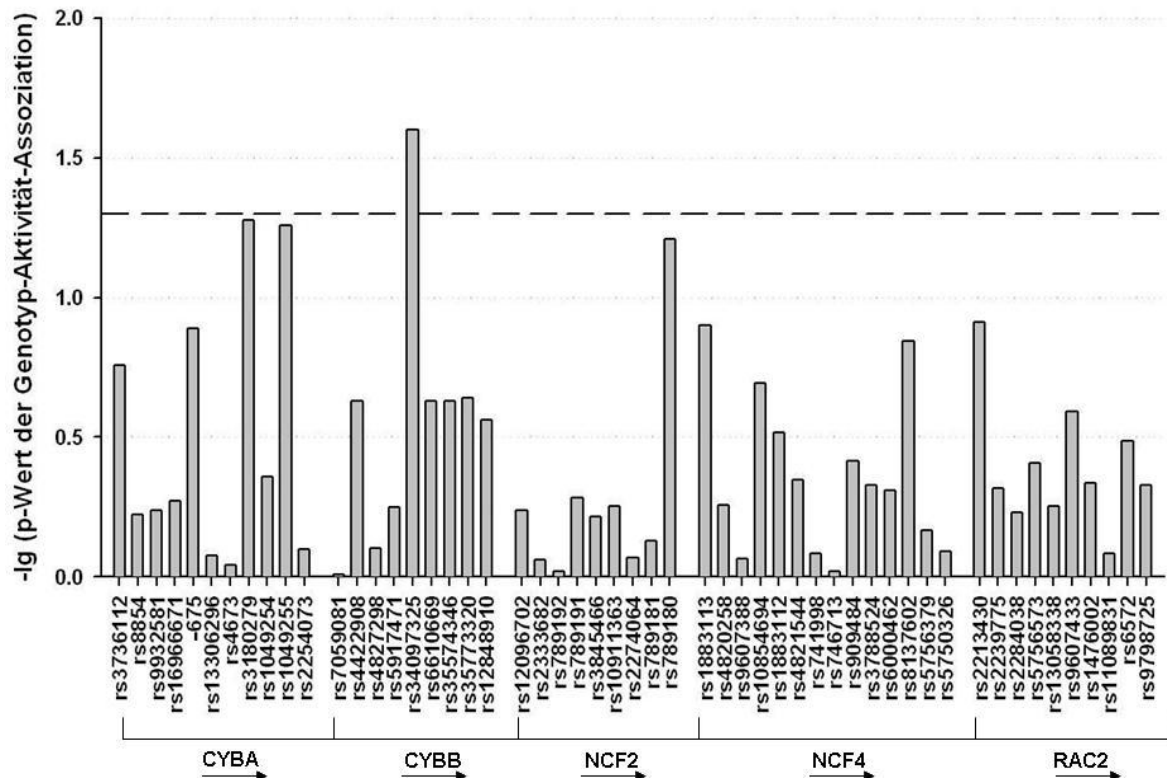


Abbildung 4-1 Assoziationen zwischen der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität PMA-stimulierter Granulozyten und Genpolymorphismen, beobachtet in der exploratorischen Probandenstudie (n=81). Die Korrelationen wurden mittels des Jonckheere-Terpstra-Trendtests ermittelt. Dargestellt sind die Beziehungen zwischen maximaler Enzymaktivität und Genpolymorphismen als negative dekadische Logarithmen der p-Werte. Die gestrichelte Linie bei einem Wert von 1,3 kennzeichnet die statistische Signifikanz von $p = 0,05$. Für jedes der fünf Gene sind die Polymorphismen in 5'-3'-Richtung angeordnet.

Die Analyse der Daten der Bestätigungsstudie ergab, dass die Ergebnisse der exploratorischen Studie nur teilweise reproduziert werden konnten. Es handelte sich dabei um die bereits erwähnten CYBA-Polymorphismen rs3180279 und rs1049255, die wiederholt mit der Enzymaktivität assoziiert waren. Beide SNPs zeigten in der unabhängigen zweiten Probandenstudie statistisch signifikante Assoziationen: Für rs318027 gilt $p = 0,048$ und für rs1049255 ist $p = 0,044$. Zusätzlich dazu ergaben sich Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität und der CYBA-Variante rs1049254 ($p = 0,023$), die im Exon 6 des Gens lokalisiert ist, dem Promotor-SNP rs9607388 ($p = 0,013$) des NCF4-Gens und dem Polymorphismus rs2239775 im Intron 1 des RAC2-Gens ($p = 0,035$). Eine vollständige Übersicht über die Ergebnisse der Bestätigungsstudie ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Die parallel mitgeführten Ansätze mit dem Flavinzym-Inhibitor DPI bestätigten die gefundenen Ergebnisse.

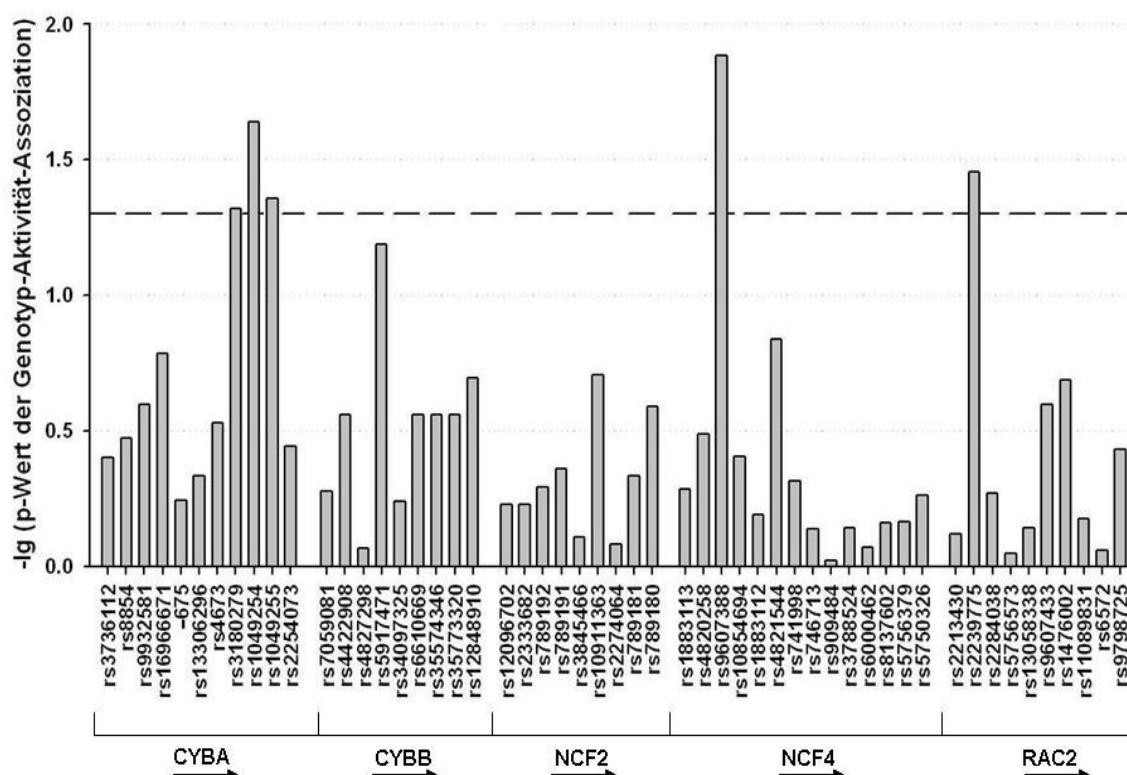


Abbildung 4-2 Assoziationen zwischen der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität PMA-stimulierter Granulozyten und Genpolymorphismen, beobachtet in der Bestätigungsstudie (n=51). Die Darstellungsweise entspricht Abbildung 4-1.

In einer abschließenden kombinierten Analyse wurden die Ergebnisse beider Studienteile vereint. Dabei wurden sieben Probanden, die jeweils an beiden Studien teilgenommen hatten, nur einmal berücksichtigt. Wiederum waren die zwei CYBA-Polymorphismen rs3180279 und rs1049255 statistisch signifikant mit der Enzymaktivität der NAD(P)H-Oxidase assoziiert (rs3180279: $p = 0,009$, rs1049255: $p = 0,006$). Die übrigen SNPs, für die sich in den getrennten Auswertungen Assoziationen ergeben hatten, waren in der Gesamtbetrachtung nicht mehr auffällig. Stattdessen war zu beobachten, dass die Promotorvariante rs1883113 des NCF4-Gens statistisch signifikant mit der Enzymaktivität assoziiert war. Die Untersuchung dieses SNPs beruhte allerdings nur auf zwei Gruppen (homozygoter Wildtyp, heterozygoter Genotyp), da der homozygote Genotyp des Varianten-Allels zu selten war. Eine Übersicht über die Ergebnisse der kombinierten Analyse sind in Abbildung 4-3 dargestellt.

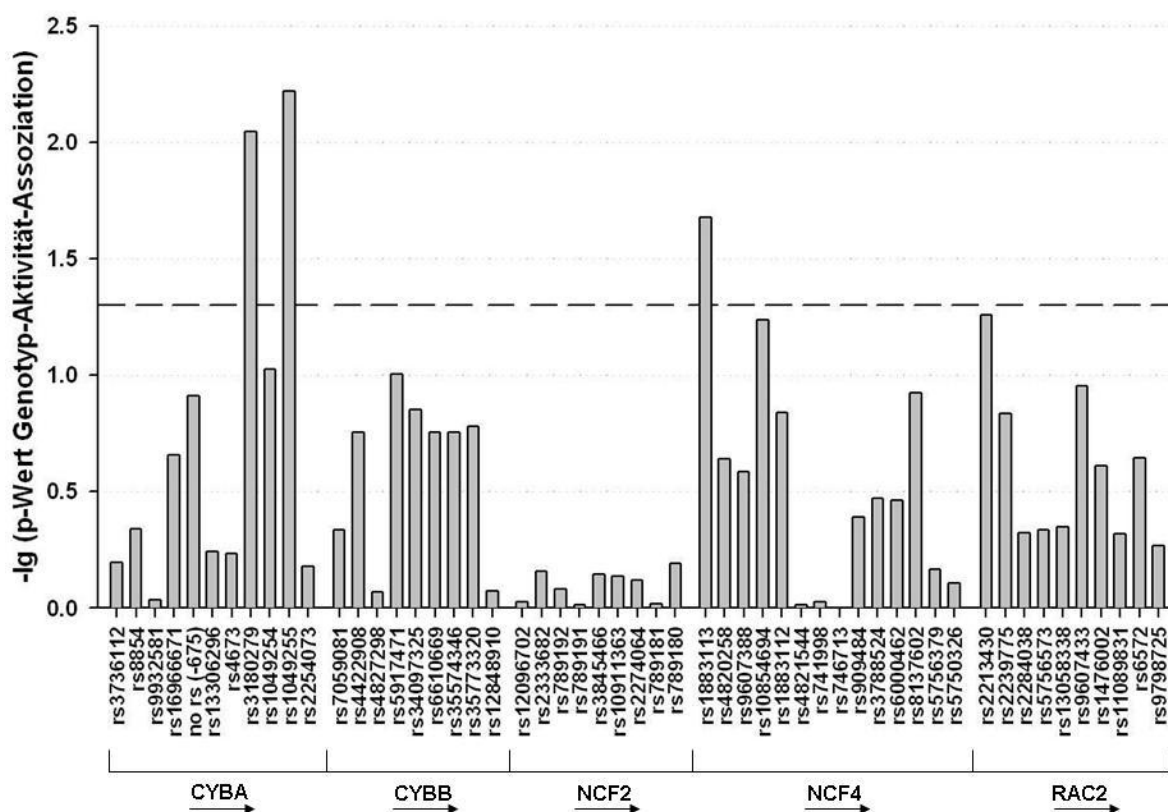


Abbildung 4-3 Assoziationen zwischen der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität PMA-stimulierter Granulozyten und Genpolymorphismen in der kombinierten Analyse der exploratorischen und der bestätigenden Probandenstudie (n=125). Die Darstellungsweise entspricht Abbildung 4-1.

Der Einzelnukleotid-Polymorphismus rs1049255, welcher in der Gesamtbetrachtung die stärkste Assoziation mit der Enzymaktivität zeigte, ist in der 3'-untranslatierten Region des CYBA-Gens lokalisiert. Es handelt sich um einen A>G-Austausch, der in der Literatur als CYBA 640A>G beschrieben ist. Wie in Abbildung 4-4 illustriert, waren sowohl in der exploratorischen als auch in der bestätigenden Studie vergleichbare Genotyp-spezifische Effekte zu beobachten: Träger des GG-Genotyps hatten im Vergleich zu den homozygoten Trägern des A-Allels eine um 28 % verminderte Enzymaktivität. Die zu beobachtenden Effekte in der Gruppe der heterozygoten Probanden lagen in ihrer Ausprägung zwischen denen der beiden homozygoten Gruppen.

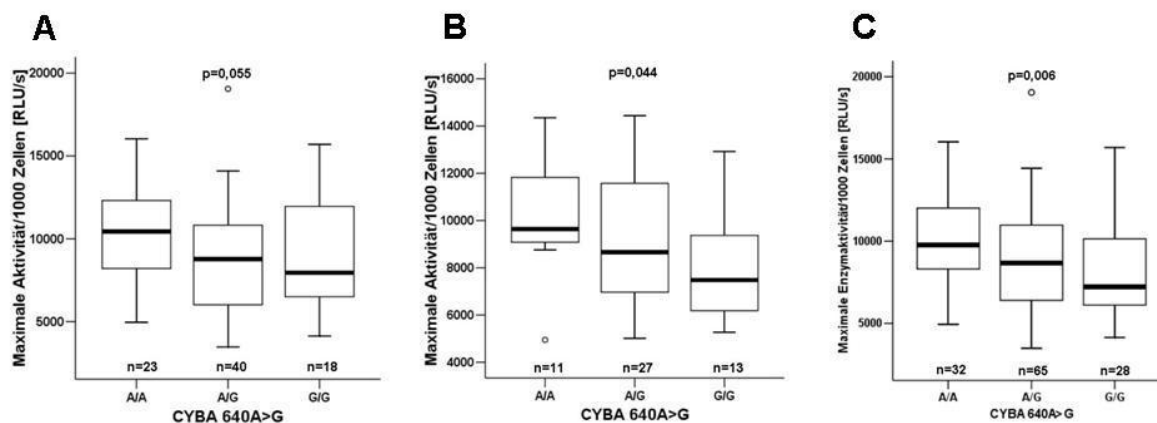


Abbildung 4-4 Detaillierte Darstellung der Abhängigkeit der maximalen Enzymaktivität von der Genotypkonfiguration des CYBA 640A>G-Polymorphismus bei Betrachtung der (A) exploratorischen Studie (n=81), (B) der Bestätigungsstudie (n=51), (C) der Gesamtgruppe (n=125, wobei sieben Personen, die in beiden Studien teilgenommen haben, nur einmal gezählt wurden). Gemessen wurde die Aktivität PMA-stimulierter Granulozyten über einen Zeitraum von 60 min in relativen Lichteinheiten (RLU). Angegeben sind die Lichtsignale pro Sekunde in Bezug auf 1000 Granulozyten.

4.2.3 Genetische Kopplung und Haplotypanalyse der CYBA-SNPs

Die umfassende Genotyp-Phänotyp-Analyse ergab einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität und den Einzelnukleotid-Polymorphismen rs3180279 und rs1049255 des CYBA-Gens. Es sollte geklärt werden, ob die beobachteten Effekte eventuell auf das Vorliegen einer bestimmten Allelkombination mehrerer gekoppelt vererbter SNPs (d. h. eines Haplotyps) zurückzuführen sind.

Zunächst wurde eine Analyse des genetischen Kopplungsungleichgewichts (*linkage disequilibrium, LD*) der Region des CYBA-Gens durchgeführt. Als Basis dienten die Einträge aus der Datenbank des internationalen HapMap-Projekts. Dabei handelt es sich um Einträge, die sich auf die genetische Analyse von 59 Probanden kaukasischer Herkunft beziehen. Mehrere in der Literatur als funktionell diskutierte CYBA-Polymorphismen sind jedoch darin nicht enthalten. Diese wurden daher an DNA-Proben derjenigen Personen bestimmt, auf welchen die HapMap-Daten beruhen. Dazu wurde DNA aus lymphoblastoiden (LCL-) Zellkulturen der 59 Personen isoliert, welche über das Corriell Institute for Medical Research, Camden, New Jersey, bezogen wurden. Mit Hilfe des Programms Haploview wurde die genetische Kopplung innerhalb des CYBA-Gens graphisch illustriert. Das LD für den paarweisen Vergleich biallelischer SNPs wurde durch den Parameter r^2 (das Bestimmtheitsmaß) beschrieben. Dies ist in Abbildung 4-5 als LD-Plot veranschaulicht.

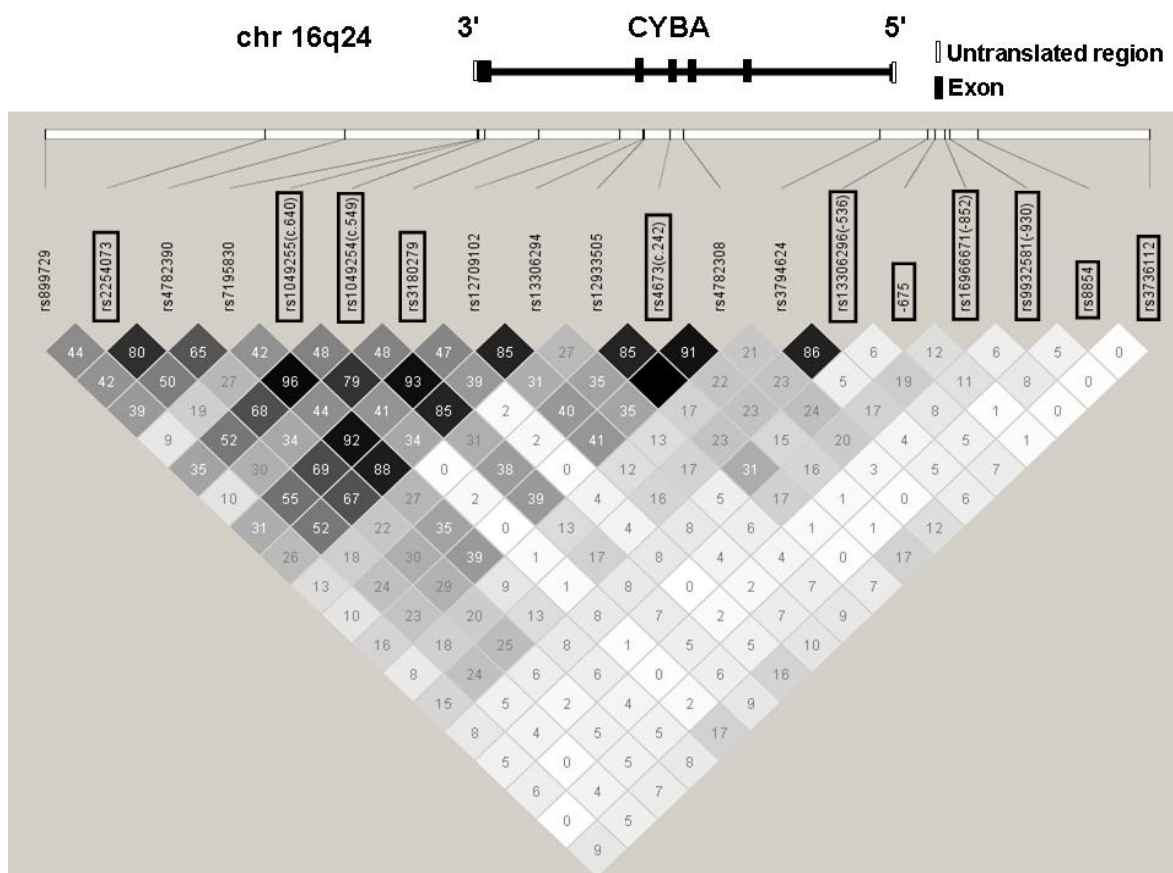


Abbildung 4-5 Darstellung der genomischen Lokalisation und des Kopplungsungleichgewichts (LD) zwischen Einzelnukleotidpolymorphismen in der genomischen Region des CYBA-Gens. Im oberen Abschnitt ist die Lokalisation der Polymorphismen relativ zum Genbereich dargestellt. Die eingerahmten Varianten wurden in der vorliegenden Arbeit genotypisiert und funktionell analysiert. Die Informationen zu den übrigen SNPs wurden der HapMap-Datenbank entnommen. Die unterschiedlich schattierten Rauten veranschaulichen das LD der 19 Polymorphismen. Mit zunehmendem LD wechselt die der Grauwert von Weiß nach Schwarz. Die Einträge in den Rauten geben den paarweisen r^2 -Wert in Prozent an; ein schwarzes Feld ohne Zahl zeigt einen r^2 -Wert von 100 % an.

In der 3'-Region des CYBA-Gens zeigte sich ein Bereich mit einem hohen LD. Dieser LD-Block erstreckte sich über die Region zwischen den zwei Polymorphismen rs13306294 und rs2254073. Innerhalb dieses Abschnitts befanden sich ebenfalls die beiden Varianten rs3180279 und rs1049255, die in ähnlicher Weise mit der Enzymaktivität assoziiert waren. Mit einem r^2 -Wert von 0,79 wiesen diese beiden SNPs ein relativ hohes LD auf.

Eine anschließende Haplotypanalyse sollte klären, ob definierte Allelkombinationen von Polymorphismen einen stärkeren funktionellen Effekt aufweisen als die einzelnen SNPs. Dazu wurden die Haplotypen unter Verwendung der PHASE-Software berechnet und anschließend jedem Individuum zwei Haplotypen (ein so genannter Diplotyp) zugeordnet. Auf Grund des hohen LDs wurden für diese Analyse die vier SNPs rs2254073, rs1049255

(CYBA 640A>G), rs1049254 und rs3180279 berücksichtigt. Alle Haplotypen mit einer Häufigkeit von mindestens 1 %, die aus diesen SNPs gebildet werden konnten, sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt.

Tabelle 4.2 Zusammensetzung der häufigen Haplotypen mit mindestens 1% Allelfrequenz (H1-H4) aus den vier SNPs in der 3'-Region des CYBA-Gens. Die Frequenzangaben beziehen sich auf eine Hochrechnung für die Gesamtbevölkerung, für welche die untersuchte Stichprobe von 125 Personen kaukasischer Abstammung repräsentativ ist. An dieser Stichprobe wurde auch die Enzymaktivität gemessen. Abweichungen vom häufigsten Haplotyp (H1) sind grau unterlegt.

Haplotyp	rs2254073	rs1049255	rs1049254	rs3180279	Frequenz [%]
H1	G	A	C	G	50,2
H2	A	G	T	C	22,5
H3	G	G	C	C	12,5
H4	G	G	T	C	11,3

Die Haplotypen H1-H4 wurden anschließend in Bezug auf eine Assoziation mit der Enzymaktivität getestet. Die zunächst durchgeführte Varianzanalyse unter Anwendung der ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Haplotypen ($p = 0,005$). Der anschließende *post hoc*-Test nach Bonferroni ergab einen p-Wert von 0,004 für einen signifikanten Unterschied zwischen H1 und H4. Dabei ging der häufigste Haplotyp H1 (Frequenz: 50,2 %) mit einer erhöhten NAD(P)H-Oxidase-Aktivität einher. Die Stärke dieser Assoziation war vergleichbar mit der des Einzelnukleotid-Polymorphismus 640A>G.

4.2.4 Genetische Kopplung und Haplotypenanalyse der CYBB-SNPs

Bereits bei der Auswahl der Polymorphismen zeigte sich, dass im CYBB-Gen ein extrem hohes Kopplungsungleichgewicht vorliegt (Abbildung 4-6). Die meisten Varianten in der Region des CYBB-Gens bilden einen außergewöhnlich großen LD-Block, der einen Sequenzbereich von etwa 150 kb umfasst (Abbildung 4-6, kleines Bild).

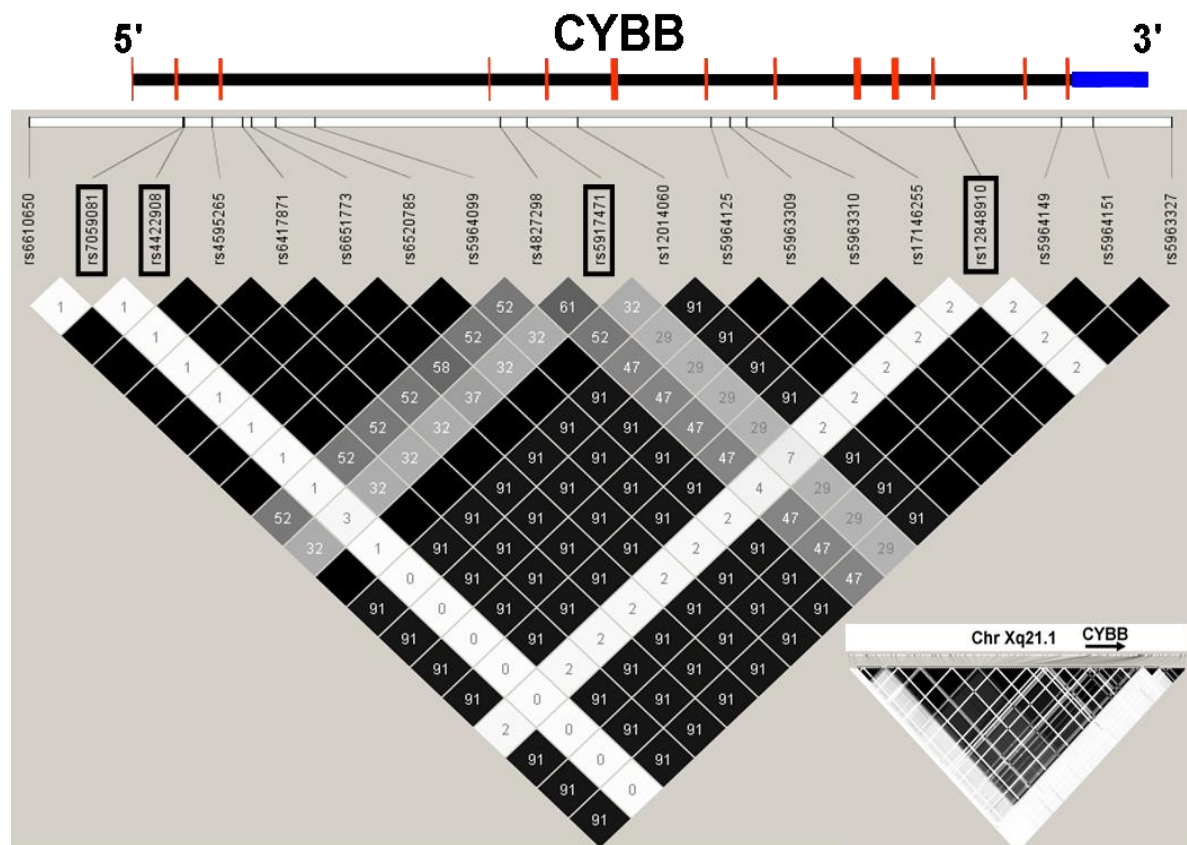


Abbildung 4-6 Darstellung der genomischen Lokalisation und des Kopplungsungleichgewichts zwischen Einzelnukleotidpolymorphismen im CYBB-Gen. Im oberen Abschnitt ist die Lokalisation der Polymorphismen innerhalb des Gens dargestellt. Die vier eingerahmten Varianten wurden in der vorliegenden Arbeit analysiert. Die Informationen zu den übrigen SNPs wurden der HapMap-Datenbank entnommen. Der untere Abschnitt veranschaulicht das Kopplungsungleichgewicht der 19 Polymorphismen. Die Rauten geben die paarweise bestimmten r^2 -Werte an. Die Schattierungen entsprechen der in Abbildung 4-5. Das kleine Bild rechts unten zeigt einen Ausschnitt von 200 kb des X-Chromosoms (Xq21.1) mit einem großen LD-Block über 150 kb, in dem das CYBB-Gen enthalten ist.

Die in HapMap annotierte Variabilität des gesamten Gens konnte durch die Bestimmung von vier Einzelnukleotidpolymorphismen als *tagging* SNPs komplett erfasst werden (eingerahmt in Abbildung 4-6, r^2 -Grenze von 0,5). Eine Kopplungsanalyse basierend auf den Daten der 125 Studienteilnehmer ergab, dass die restlichen fünf Varianten komplett durch die vier Polymorphismen rs7059081, rs4422908, rs5917471 und rs12848910 abgedeckt sind (bei r^2 von mindestens 0,5, siehe Abbildung 4-7). Aus diesem Grund

konnte auf eine Bestimmung dieser fünf Genvarianten an den DNA-Proben der 59 HapMap-Probanden verzichtet werden.

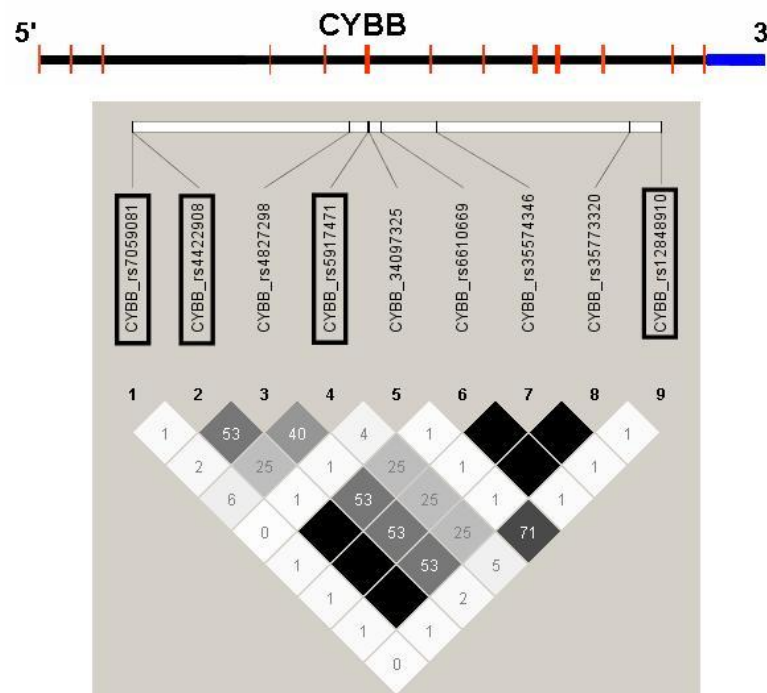


Abbildung 4-7 Darstellung der genomischen Lokalisation und Kopplung zwischen Einzelnukleotidpolymorphismen im CYBB-Gen bestimmt an 125 Probanden. Im oberen Abschnitt ist die Lokalisation der SNPs innerhalb des Gens dargestellt. Der untere Abschnitt veranschaulicht das Kopplungsungleichgewicht der 9 Polymorphismen.

Wie bereits unter 4.2.2 beschrieben, ergab die Analyse der Einzelnukleotidvarianten im CYBB-Gen nur in der exploratorischen Probandenstudie eine statistisch signifikante Assoziation mit der Enzymaktivität der NAD(P)H-Oxidase (rs34097325, Intron 4, 71 %ige Kopplung mit rs12848910). In der Bestätigungsstudie war dies nicht der Fall. Da sich die Variabilität des CYBB-Gens im Wesentlichen auf die vier oben genannten Varianten beschränkte, wurden aus diesen Polymorphismen Haplotypen mit der PHASE-Software berechnet. Die fünf häufigsten Allelkombinationen sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3 CYBB-Haplotypen. Zur Beschreibung siehe Tabelle 4.2. Abweichungen vom häufigsten Haplotyp (H1) sind grau markiert.

Haplotyp	rs7059081	rs4422908	rs5917471	rs12848910	Frequenz [%]
H1	C	G	C	T	44.2
H2	C	G	T	T	24.8
H3	C	T	T	T	13.6
H4	G	G	C	T	9.1
H5	C	G	C	C	8.3

Nach Anwendung der einfaktoriellen ANOVA wurde mittels *post-hoc*-Test gezeigt, dass die Haplotypen H1 und H3 in Bezug auf die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität signifikant unterschiedlich waren ($p = 0,072$). Wie in Tabelle 4.3 veranschaulicht, unterschied sich H3 von H1 nur durch die Polymorphismen rs4422908 und rs5917471. Im Vergleich mit der kombinierten Gruppe der Haplotypen H2-H5 wiesen Personen, die mindestens ein H1-Allel trugen, eine um 14 % erniedrigte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies auf ($p = 0,01$, Abbildung 4-8 A). Eine geschlechtsspezifische Analyse ergab, dass dieser Effekt bei Männern, die auf Grund der Lokalisation des CYBB-Gens auf dem X-Chromosom maximal ein Allel aufweisen konnten, nicht so stark ausgeprägt war ($p = 0,09$, Abbildung 4-8 B). Das Tragen eines H1-Allels führte in dieser Gruppe insgesamt zu einer 12,5 %igen Reduktion der reaktiven Sauerstoffverbindungen. In der Untergruppe der Frauen hingegen, die durch zwei X-Chromosomen auch homozygote Träger des H1-Allels sein konnten, war ein Unterschied in der ROS-Produktion um 33 % zu beobachten ($p = 0,04$, Abbildung 4-8 C).

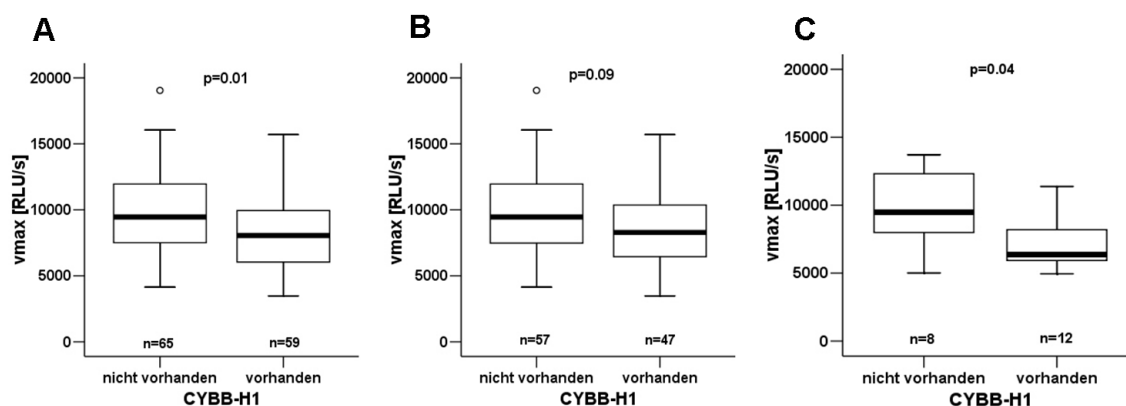


Abbildung 4-8 Effekte des CYBB-Haplotyps H1 auf die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in PMA-stimulierten Granulozyten unter Berücksichtigung (A) der gesamten Studiengruppe, (B) nur der Männer oder (C) nur der Frauen. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den Mann-Whitney-U-Test.

4.2.5 Einfluss genetischer Einzelnukleotidpolymorphismen auf die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten

Die Beeinflussung der Genexpression durch Einzelnukleotidpolymorphismen wurde zunächst auf Transkriptebene untersucht. Im Rahmen der exploratorischen Probandenstudie wurde RNA aus Gesamtblut von 59 Personen isoliert. Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde die Expression der Gene CYBA, CYBB, NCF2, NCF4 und RAC2 durch qRT-PCR bestimmt. Die Messungen wurden auf die Referenzgene GAPDH und HPRT1 normalisiert. Im Anschluss erfolgte eine statistische Analyse der Zusammenhänge zwischen Genexpression und genetischen Varianten unter Anwendung des Jonckheere-Terpstra-Trendtests. Einen Überblick über die Ergebnisse gibt die Abbildung 4-9.

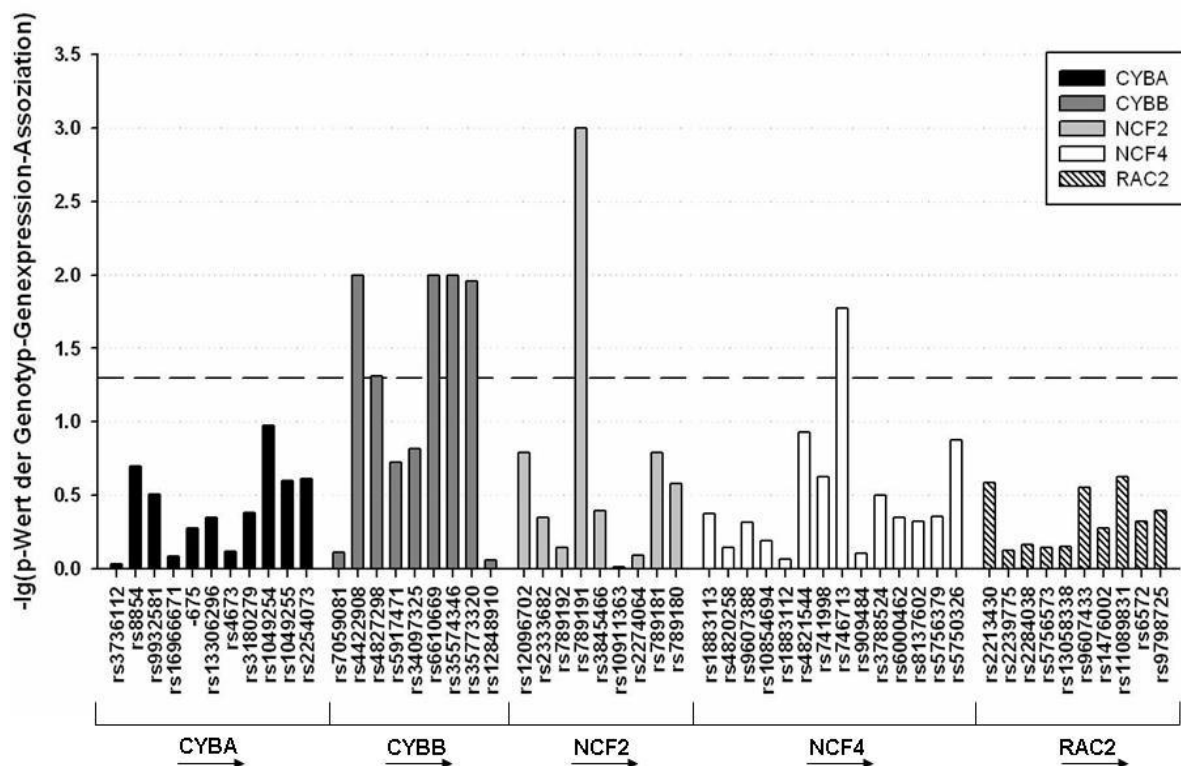


Abbildung 4-9 Abhängigkeit der Genexpression auf Transkriptebene von Genvarianten. Die Messungen basieren auf RNA-Proben, die aus Gesamtblut von 59 Probanden der exploratorischen Studie gewonnen wurden.

Fünf stark gekoppelte Intronvarianten im CYBB-Gen führten zu einer signifikant erhöhten Expression von CYBB. Außerdem zeigten zwei weitere SNPs Assoziationen mit der Genexpression der zugehörigen Gene: der Polymorphismus rs789191 im Intron 2 des NCF2-Gens und rs746713 im Intron 1 des NCF4-Gens.

Bei Gesamtblut handelt es sich um ein sehr heterogenes Zellgemisch. Aus diesem Grund wurden zum Vergleich Messungen an isolierten PBMCs durchgeführt. Diese Proben

stammten von 103 gesunden Personen, die an einer Studie zu Doxorubicin-induzierter Apoptose teilgenommen hatten. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte wiederum mit den Referenzgenen GAPDH und HPRT1. Wie der Abbildung 4-10 zu entnehmen ist, ergaben sich in PBMCs im Vergleich zu Gesamtblut abweichende Ergebnisse. Im CYBA-Gen hatten zwei Varianten einen Einfluss auf die CYBA-Genexpression: die Promotorvariante rs13306296 ($p = 0,007$) und der CYBA 640A>G-Polymorphismus rs1043255 ($p = 0,02$), der bereits im Zusammenhang mit der Enzymaktivität aufgefallen war. Im Gen NCF2 schien die Variante rs789191 ($p = 0,02$) die Genexpression zu beeinflussen, die bereits in Gesamtblut Assoziationen gezeigt hatte. Eine Betrachtung der Boxplots ergab jedoch, dass die Allele in beiden Studien jeweils entgegengesetzte Effekte auf die NCF2-Expression hervorriefen. Im NCF4-Gen waren vier Polymorphismen signifikant assoziiert: rs9607388 im Promotorbereich ($p = 0,005$), die Intron 1-Variante rs4821544 ($p = 0,03$), im Intron 7 der SNP rs3788524 ($p = 0,0004$) und rs5756379 in der flankierenden 3'-Region des NCF4-Gens ($p = 0,01$). Keiner dieser NCF4-SNPs fand sich signifikant mit der Genexpression in Gesamtblut assoziiert (siehe Abbildung 4-9).

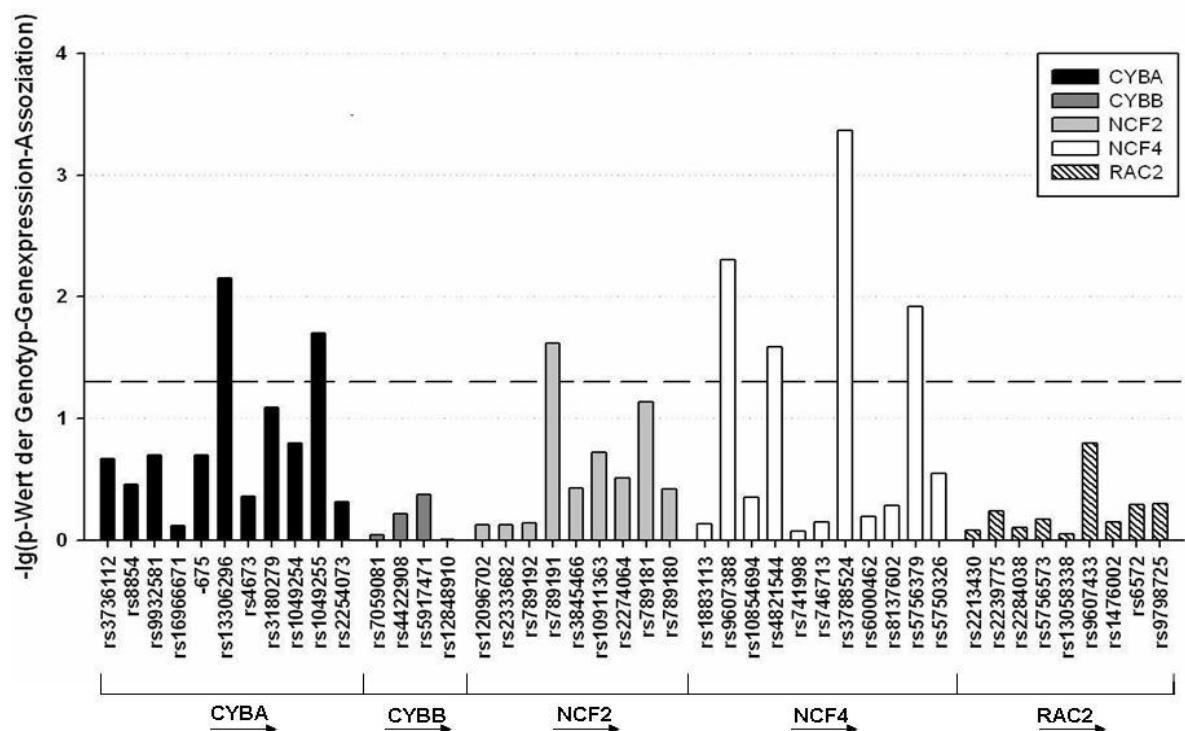


Abbildung 4-10 Abhängigkeit der Genexpression auf Transkriptebeve von Genvarianten. Die Messungen basieren auf RNA-Proben von PBMCs einer unabhängigen Studie mit 103 gesunden Personen.

Im nächsten Schritt erfolgte eine fokussierte Betrachtung des CYBA 640A>G Polymorphismus, welcher wie bereits unter 4.2.2 erwähnt mit der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität assoziiert war. Die Analyse der allelspezifischen Effekte zeigte, dass das Vorhandensein des G-Allels in PBMCs mit einer verminderten CYBA-Genexpression einherging ($p = 0,02$) (Abbildung 4-11 B). In Gesamtblut war diese Beobachtung zwar nicht statistisch signifikant ($p = 0,25$, Abbildung 4-11 A), homozygote GG-Träger wiesen jedoch im Median eine geringere CYBA-Expression auf.

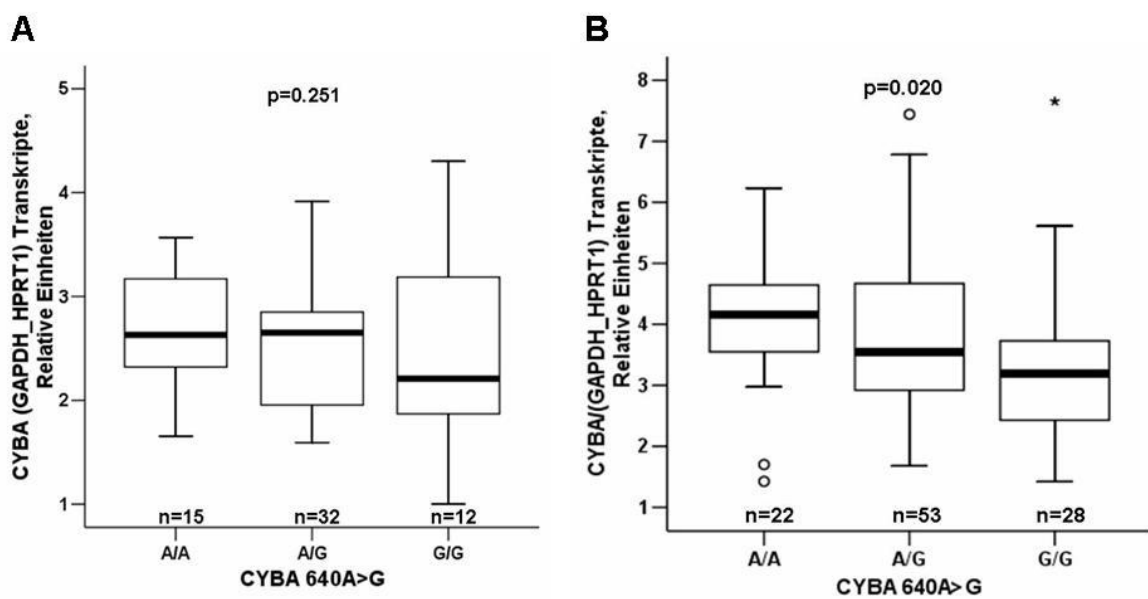


Abbildung 4-11 Beeinflussung der CYBA-Genexpression durch den SNP CYBA 640A>G, beobachtet in Gesamtblut (A) und in PBMCs (B). Die genannten p-Werte wurden mit dem Jonckheere-Terpstra-Test ermittelt. Die auf das gewichtete Mittel aus GAPDH und HPRT1 normierten Expressionsdaten sind in relativen Einheiten bezogen auf den kleinsten Wert der Messreihe ausgedrückt.

4.2.6 Einfluss der Haplotypen des CYBA- und des CYBB-Gens auf die Genexpression

Die Analyse der unter 4.2.3 beschriebenen CYBA-Haplotypen ergab für den Haplotyp H1, welcher mit einer erhöhten Aktivität einherging, auch eine tendenziell höhere Genexpression in Abhängigkeit der Zahl der H1-Allele ($p = 0,08$ nach Jonckheere-Terpstra-Trendtest). Dieser Zusammenhang war statistisch jedoch etwas schwächer ausgeprägt als bei Betrachtung des Einzelpolymorphismus CYBA 640A>G.

Die normierte CYBB-Expression war nach 24stündiger *ex-vivo*-Inkubation von PBMCs gegenüber der in Gesamtblut deutlich und spezifisch erhöht (für die anderen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten wurde dies nicht beobachtet). Unter der Annahme, dass in Zellkultur eine massive Induktion von CYBB stattfindet, erschienen diese Proben für eine Analyse mit den Genotypen als ungeeignet. Demzufolge soll hier nur die CYBB-Expression in Gesamtblut in Verbindung mit Haplotypen dargestellt werden.

Die Analyse der in Tabelle 4.3 aufgeführten Haplotypen des CYBB-Gens mittels ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Genexpression ($p = 0,02$). Gemäß des *post-hoc*-Tests nach Bonferroni fanden sich in Gegenwart des H3-Haplotyps signifikant mehr CYBB-Transkripte als bei H1 ($p = 0,007$).

4.2.7 Expression der p22^{phox}-Untereinheit in humanen Granulozyten

Der SNP CYBA 640A>G fiel sowohl in der Betrachtung der Enzymaktivität als auch der CYBA-Transkriptmenge auf. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich die beobachteten allelspezifischen Effekte in Bezug auf die CYBA-mRNA ebenfalls auf die Proteinexpression auswirkten. Benutzt wurden dazu Granulozytenproben, die in der exploratorischen Probandenstudie zur späteren Proteinanalyse asserviert worden waren. Es wurden jeweils elf Proben des AA-, bzw. GG-Genotyps und neun Proben mit heterozygotem Genotyp ausgewählt. Nach erfolgreicher Proteinisolierung wurde ein Westernblot durchgeführt. Zur Normalisierung wurde das Referenzprotein GAPDH ausgewählt. Wie in Abbildung 4-12 B dargestellt, war in den Proben der Personen, die homozygot das G-Allel trugen, statistisch signifikant weniger p22^{phox}-Protein enthalten ($p = 0,004$).

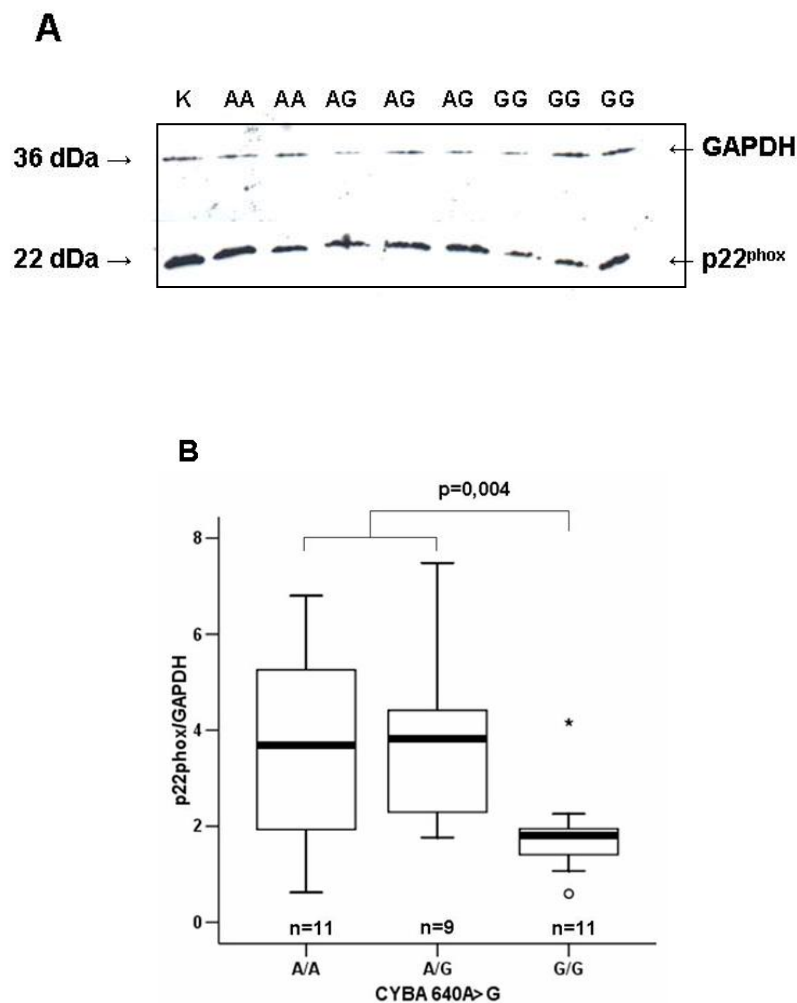


Abbildung 4-12 Effekte des CYBA 640A>G Polymorphismus auf die Proteinexpression von p22^{phox} in isolierten Granulozyten, exemplarisch dargestellt für acht Proben (A); p22^{phox}-Proteinmenge in Abhängigkeit vom CYBA 640A>G Genotyp (B). Die p22^{phox}-Proteinmenge wurde jeweils auf das Referenzprotein GAPDH bezogen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

4.3 NAD(P)H-Oxidase-SNPs und therapeutisches Ansprechen einer CHO(E)P-Chemotherapie

4.3.1 Patientendaten und Chemotherapie

Bei der so genannten NHLB-Studie handelte es sich um eine multizentrische randomisierte Phase-III-Studie, die zwischen 1993 und 2000 durch die Deutsche Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (DSHNHL) durchgeführt wurde. Bundesweit wurden Patientendaten aus 162 Krankenhäusern gesammelt. Es wurden insgesamt 1399 Patienten einbezogen, die an aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen (hauptsächlich B-Zell-Lymphomen) erkrankt waren. Diese Studie war vierarmig angelegt. Basis der Therapie war der geläufige Standard einer Chemotherapie nach dem CHOP-Schema, welches sich aus folgenden zytostatisch wirksamen Substanzen zusammensetzte: Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison. Primäres Ziel war die Evaluierung, ob im Vergleich zur CHOP-Standardtherapie mit einer Zyklusdauer von 21 Tagen eine Intensivierung auf ein 14-Tage-Intervall sowie die Hinzunahme von Etoposid (CHO(E)P) einen Vorteil für die Patienten bringen.

Tabelle 4.4 Die CHO(E)P-Behandlung erfolgte in herkömmlichen dreiwöchigen oder intensivierten zweiwöchigen Intervallen

Zytostatikum	Dosis	Tag der Verabreichung
Cyclophosphamid	750 mg/m ² i.v.	1
Doxorubicin	50 mg/m ² i.v.	1
Vincristin	2 mg i.v.	1
Prednison	100 mg/Tag <i>per os</i>	1-5
Etoposid	100 mg/m ²	1+3

Die Charakteristika dieser Studienpatienten sind in Tabelle 4.5 zusammengestellt. Alle Patienten hatten in pharmakogenetische Analysen eingewilligt. Aus dem Gesamtkollektiv von 1399 Patienten lag DNA von insgesamt 881 Personen vor. Genotypisiert wurden Varianten in Kandidaten-Genen, die möglicherweise mit Wirkung und Nebenwirkungen der Chemotherapie in Zusammenhang stehen. Zur Analyse eines Einflusses von Genvarianten auf das therapeutische Ansprechen wurde die Gesamtstudie in eine exploratorische und eine bestätigende Gruppe unterteilt.

Tabelle 4.5 Charakteristika der Patienten, die in die exploratorische oder bestätigende Studie eingeschlossen wurden im Vergleich zur Gesamtgruppe der NHLB-Patienten. LDH: Lactatdehydrogenase, ECOG: Skala zur Beurteilung des Leistungsstatus eines Patienten benannt nach der Eastern Cooperative Oncology Group, B-Symptome: Begleitsymptome (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust).

	NHL-B	Exploratorische Studie	Bestätigende Studie	Exploratorische + bestätigende Studie
	n = 1399	n = 401	n = 481	n = 881
Geschlecht				
Männer	56.40 %	57.61 %	53.33 %	55.33 %
Frauen	43.60 %	42.39 %	46.67 %	44.67 %
Alter				
≤ 60 Jahre	50.75 %	33.67 %	63.12 %	49.66 %
>60 Jahre	49.25 %	66.33 %	36.88 %	50.34 %
LDH				
Normal	77.41 %	69.33 %	83.12 %	76.87 %
Erhöht	22.59 %	30.67 %	16.88 %	23.13 %
ECOG-Skala				
≤ 1	88.35 %	85.79 %	91.04 %	88.66 %
>1	11.65 %	14.21 %	8.96 %	11.34 %
Stadium				
I oder II	59.47 %	56.61 %	63.75 %	60.54 %
III oder IV	40.53 %	43.39 %	36.25 %	39.46 %
Metastasen				
Nein	50.11 %	46.88 %	83.75 %	49.32 %
Ja	49.89 %	53.12 %	16.25 %	50.68 %
mehr als eine	19.73 %	23.94 %	16.25 %	19.73 %
Befall des Knochenmarks	8.43 %	10.47 %	8.12 %	9.18 %
B-Symptome	28.73 %	31.92 %	26.25 %	28.80 %
Behandlungsart				
CHOP 14 Tage	24.59 %	26.68 %	23.12 %	24.83 %
CHO(E)P 14 Tage	24.73 %	25.44 %	25.42 %	25.40 %
CHOP 21 Tage	25.30 %	21.20 %	28.33 %	25.06 %
CHO(E)P 21 Tage	25.38 %	26.68 %	23.12 %	24.72 %

Es zeigte sich, dass ein Teil der Patienten ($n = 87$) während bzw. nach der Chemotherapie eine akute oder chronisch verlaufende Herzinsuffizienz entwickelte, die vermutlich auf das kardiotoxische Doxorubicin zurückzuführen war. Die Charakteristika dieser Patienten und einer im Verhältnis von 1:4 nach Alter und Geschlecht gematchten Kontrollgruppe sind in Tabelle 4.6 zusammengestellt. Diese Herzinsuffizienz-Patienten und die zugehörigen Kontrollen entsprechen im Wesentlichen der oben genannten exploratorischen Studiengruppe.

Tabelle 4.6 Charakteristika von Patienten der NHLB-Studie. Dargestellt sind die Patientengruppen, die unter bzw. nach Chemotherapie eine Herzinsuffizienz entwickelten, und eine gematchte Kontrollgruppe.

	Herzinsuffizienz			Kontrollen (n=363)
	Chronisch (n=43)	Akut (n=44)	Chronisch + Akut (n=87)	
Geschlecht [♂/♀]	27/16	23/21	50/37	212/151
Alter [Jahre]	62,7±7,9	61,2±13,2	62,0±10,9	61,3±11,0
Gewicht [kg]	74,2±13,8	74,1±15,5	74,2±14,6	74,9±13,7
Dox-Dosis [mg]	515	500	504	540
Behandlungsarm				
CHOP-14	10	12	22	103
CHO(E)P-14	8	13	21	93
CHOP-21	11	8	19	76
CHO(E)P-21	14	11	25	91

4.3.2 Einfluss von Genpolymorphismen der NAD(P)H-Oxidase auf das therapeutische Ansprechen von Patienten nach CHO(E)P-Behandlung

Zunächst wurden die Daten von insgesamt 401 Patienten des exploratorischen Teils der NHLB-Studie zur Auswertung berücksichtigt. Dabei handelte es sich um die Personen, die in Tabelle 4.5 aufgeführt sind. Als Maß für das therapeutische Ansprechen wurden sowohl das *event-free survival* als auch das *overall survival* der Patienten betrachtet. Der Parameter *event-free survival* wurde definiert als der Zeitraum zwischen Therapiebeginn und einer erneuten Verschlechterung des Gesundheitszustands bzw. der Entwicklung eines Rezidivs oder dem Tod des Patienten auf Grund der Leukämie. Das sogenannte *overall survival* wurde definiert als die Zeitspanne zwischen Therapiebeginn und Tod des Patienten durch Ursachen jeglicher Art.

Nach erfolgreicher Bestimmung von 28 Genvarianten der NAD(P)H-Oxidase wurden Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der Genotypkonfigurationen erstellt. Die sta-

tistische Assoziationsanalyse erfolgte mit dem Log-Rank-Test, welcher auch Alleldosis-effekte berücksichtigt. Dabei zeigte nur der CYBA 640A>G Polymorphismus eine Assoziation mit den klinischen Parametern (*event-free survival* ptrend < 0,001, overall survival ptrend = 0,02, siehe Abbildung 4-13). Personen mit 640GG-Genotyp sprachen dabei am schlechtesten, diejenigen mit 640AA am besten auf die verabreichte Chemotherapie an. Träger des GG-Genotyps hatten auch die kürzeste Lebenserwartung nach CHO(E)P-Therapie, Patienten mit zwei A-Allelen überlebten am längsten ($p = 0,02$). Unter Berücksichtigung der IPI-Faktoren, des Verabreichungsintervalls der Zytostatikatherapie, der Zugabe von Etoposid und eventueller Strahlentherapie wurde eine multivariate Cox-Analyse durchgeführt. Die Analyse ergab für das *event-free survival* ein Risk Ratio von 2,0 (95 % Konfidenzintervall 1,34-2,99) und für das overall survival ein Risk Ratio von 1,81 (95 % Konfidenzintervall 1,14-2,88), wenn die Patienten den GG-Genotyp trugen verglichen mit AA- und AG-Trägerstatus.

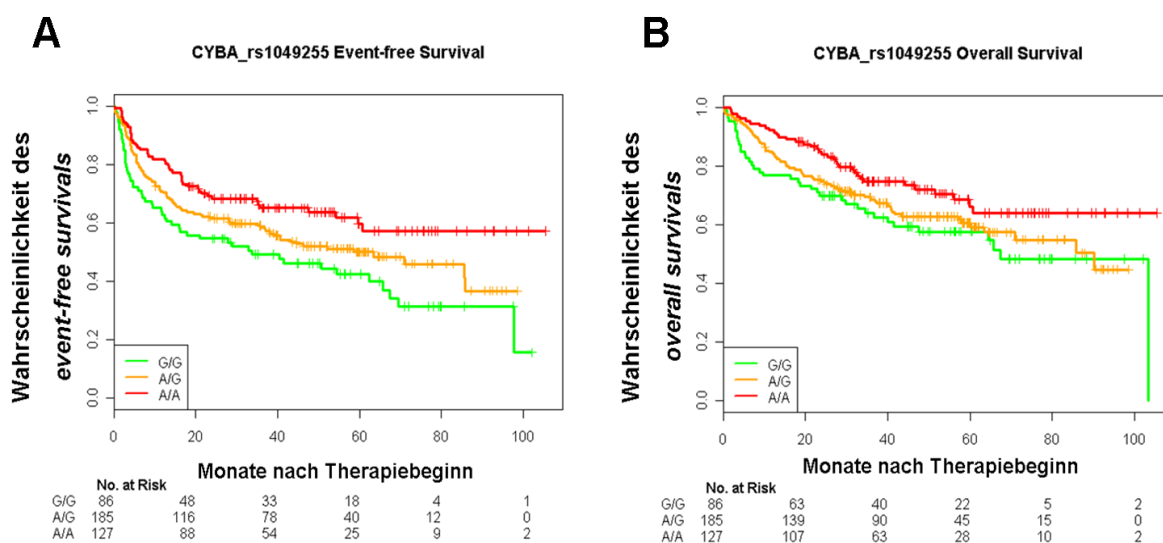


Abbildung 4-13 Effekte des CYBA 640A>G Polymorphismus auf klinische Phänotypen der NHLB-Studie. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Analyse der exploratorischen Studie ($n = 401$, davon 3 nicht auswertbar). Die Kaplan-Meier-Plots illustrieren den Einfluss des SNPs auf das *event-free survival* (A) und das *overall survival* (B). Die Tabellen unter den Diagrammen geben Auskunft über die Zahl der überlebenden Patienten zu den betrachteten Zeitpunkten gruppiert nach den CYBA 640A>G-Genotypen.

Die dargestellten Ergebnisse wurden anschließend zur Bestätigung an einer weiteren Patientengruppe überprüft ($n = 477$). Es handelte es sich dabei um die Patienten des Bestätigungskollektivs der NHLB-Studie (siehe Tabelle 4.5). Nach Abklärung der üblichen Risikofaktoren vor Therapiebeginn war diesen jedoch eine bessere Prognose gestellt worden als den Patienten der exploratorischen Studiengruppe. Die Analyse des CYBA 640A>G-Polymorphismus ergab nach dem Log-Rank-Test mit einem p-Wert von 0,4

keinen Zusammenhang mit dem *overall survival*. Für das *event-free survival* konnte mit diesem Test hier ebenfalls keine signifikante Assoziation mit diesem SNP festgestellt werden ($p = 0,09$). Der Test der homozygoten GG-Träger gegen die zusammengefasste Gruppe der heterozygoten und homozygoten AA-Träger ergab jedoch eine signifikante Assoziation mit dem *event-free survival* ($p = 0,02$). Wie bereits in der exploratorischen Studie beobachtet, zeigten Patienten, die homozygot das G-Allel trugen, ein schlechteres Ansprechen auf eine CHO(E)P-Therapie (Abbildung 4-14 A).

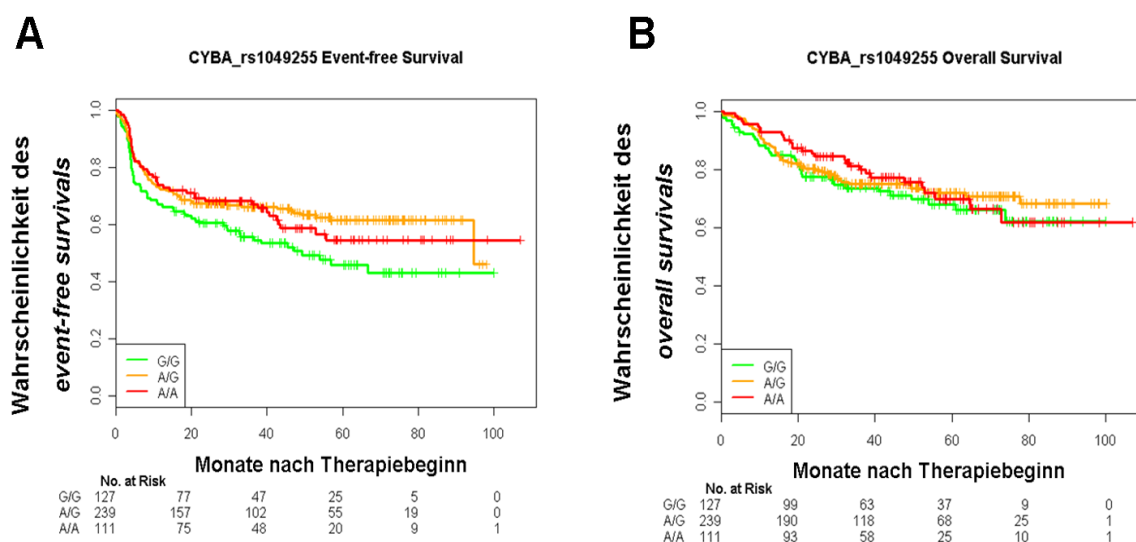


Abbildung 4-14 Effekte des CYBA 640A>G Polymorphismus in der Bestätigungsstudie ($n = 477$). Zur Darstellungweise siehe Abbildung 4-13.

In einer anschließenden kombinierten Analyse beider Studienteile waren sowohl der Parameter *overall survival* ($p = 0,035$) als auch das *event-free survival* ($p = <0,001$) nach Log-Rank-Test signifikant mit dem CYBA 640A>G-Polymorphismus assoziiert. Das schlechteste Ansprechen und die kürzeste Lebenserwartung hatten Patienten, die homozygot das G-Allel trugen (Abbildung 4-15).

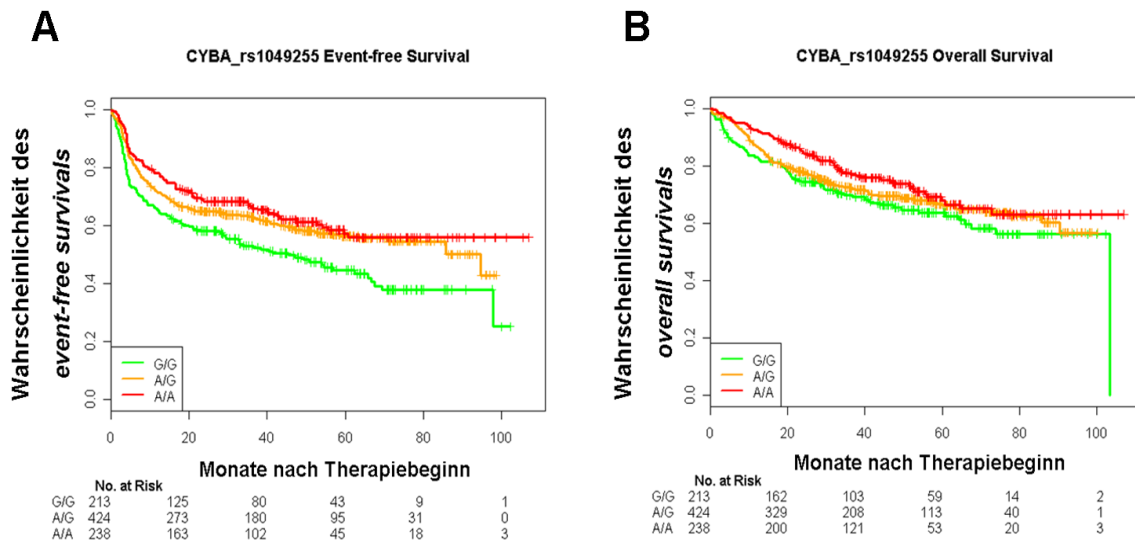


Abbildung 4-15 Effekte des CYBA 640A>G Polymorphismus in der Gesamtanalyse (n = 875). Zur Beschreibung siehe Abbildung 4-13.

4.4 Einfluss von Genpolymorphismen der NAD(P)H-Oxidase auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz

Wie bereits unter 4.3.1 beschrieben entwickelten einige Patienten der NHLB-Studie durch die Behandlung nach dem CHO(E)P-Schema eine Herzinsuffizienz. Zunächst wurde der Einfluss der 28 Genvarianten der NAD(P)H-Oxidase auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Patientenkollektiv der NHLB-Studie untersucht. Zum Vergleich wurden dieselben Genvarianten zusätzlich an DNA-Proben von Personen, die entweder an einer hypertrophen oder dilatativen Kardiomyopathie erkrankt waren, genotypisiert. Abbildung 4-16 veranschaulicht die Ergebnisse der statistischen Analyse beider Patientengruppen. Hierbei wurde ein modifizierter χ^2 -Test verwendet, welchem die Annahme einer linearen Abhängigkeit von den Ausprägungen einer unabhängigen Variablen zu Grunde liegt. Bei einem biallelischen SNP bedeutet dies, dass zwei Varianten-Allele den doppelten Effekt verglichen mit einem haben sollten. Der klassische χ^2 -Test nach Pearson zum Vergleich von zwei Gruppen wurde dann verwendet, wenn mit dem oben genannten Test keine gute Modellanpassung möglich war, d. h. wenn der Effekt eines Allels über den des anderen dominant war. Demzufolge wurde dann der heterozygote Trägerstatus entweder mit dem homozygoten Trägertyp des Wildtyp- bzw. des Varianten-Allels kombiniert.

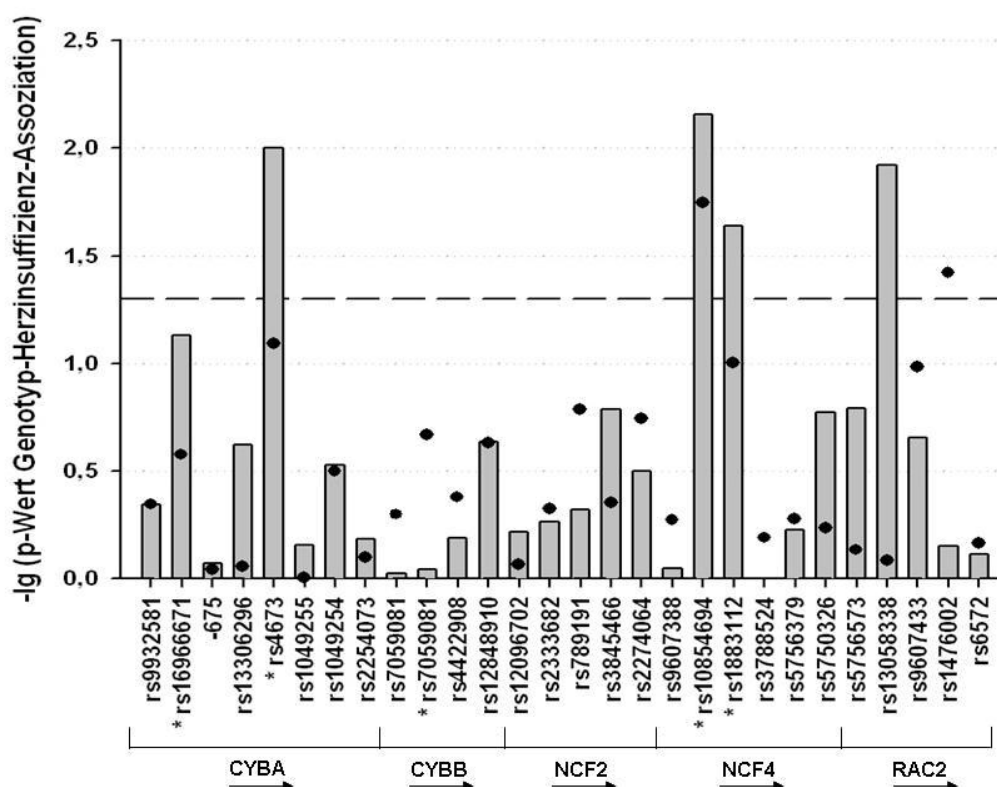


Abbildung 4-16 Vergleichende Darstellung der Genotyp-Herzinsuffizienz-Assoziationen in Abhängigkeit von SNPs der NAD(P)H-Oxidase. Die Ergebnisse basieren zum einen auf der Analyse von Daten der NHLB-Studie (Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität, Kombination aus akuter und chronischer Form, als Balken dargestellt) und zum anderen auf einer unabhängigen Patientengruppe mit nicht-Doxorubicin-induzierter Kardiomyopathie (dilatative und hypertroph-obstruktive Formen, Kreise). Als Maß für die Stärke der Assoziation ist der negative dekadische Logarithmus des p-Werts gemäß eines modifizierten χ^2 -Tests angegeben, welcher eine lineare Abhängigkeit von der Anzahl eines Allels berücksichtigt. Bei den mit Sternchen gekennzeichneten SNPs wurde der klassische χ^2 -Test nach Pearson verwendet. Die gestrichelte Linie entspricht einem p-Wert von 0,05.

Vier Genpolymorphismen waren mit der Entwicklung einer Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität bei den NHLB-Patienten assoziiert. Es handelte sich dabei um die SNPs rs4673 in CYBA (CC *versus* CT + TT, $p = 0,01$) und rs13058338 im Intron 2 des RAC2-Gens (linear in Abhängigkeit von der Zahl des Varianten-Allels A, $p = 0,01$). Mit einem höheren Risiko für eine Kardiotoxizität waren auch die zwei Promotor-Polymorphismen des NCF4-Gens verbunden: rs10854694 (GG+GA *versus* AA, $p = 0,007$) und rs1883112 (GG + GA *versus* AA, $p = 0,02$).

Bei Patienten, die an einer nicht durch Doxorubicin verursachten Kardiomyopathie erkrankt waren, ergaben sich Zusammenhänge mit den SNPs rs1476002 in der Intron 2-Region von RAC2 (linear in Abhängigkeit der Zahl des Varianten-Allels T, $p = 0,038$) und rs10854694 (GG + GA *versus* AA, $p = 0,018$) im NCF4-Promotor.

Die Darstellung der Effektstärke erfolgte im nächsten Schritt jeweils durch die Berechnung des Relativen Risikos (RR) für die Träger der Varianten-Allele. Die Betrachtung des CYBA 242C>T-Polymorphismus ergab, dass für Träger des T-Allels ein leicht erhöhtes Risiko bestand, unter Doxorubicin-Therapie eine akute (RR = 1,28) oder chronische (RR = 1,27) Kardiotoxizität zu entwickeln. Die Analyse der zweiten Probandengruppe zeigte einen ähnlichen Zusammenhang mit der Entstehung einer hypertrophen Kardiomyopathie (RR = 1,28, Abbildung 4-17).

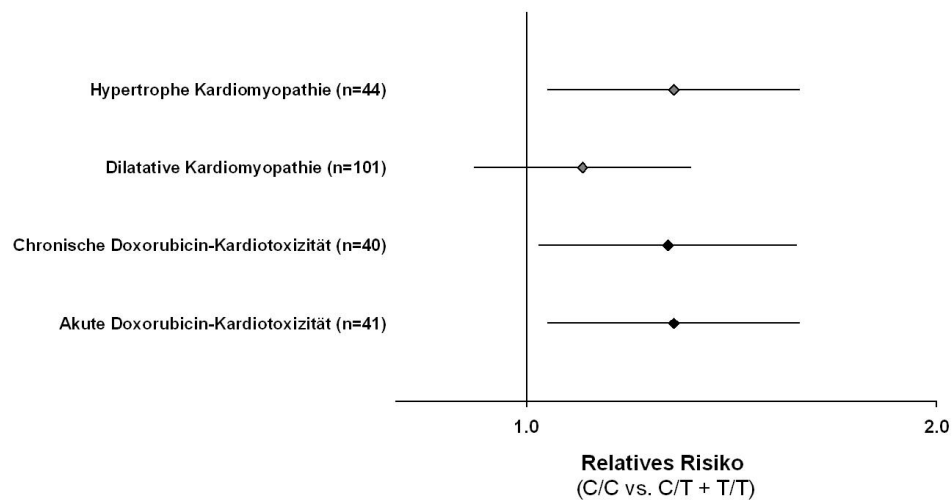


Abbildung 4-17 Darstellung des Relativen Risikos in Bezug auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch die Variante des Polymorphismus CYBA 242C>T (rs4673). Die Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizitäten beziehen sich auf Patienten der NHLB-Studie.

Homozygote Variantenträger des SNPs rs10854694, der in der Promotorregion des NCF4-Gens lokalisiert ist, zeigten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer chronischen Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität (RR = 2,40). In ähnlicher Weise bestand für diesen Genotyp ein erhöhtes Risiko für eine hypertrophe Kardiomyopathie (RR = 1,87, Abbildung 4-18).

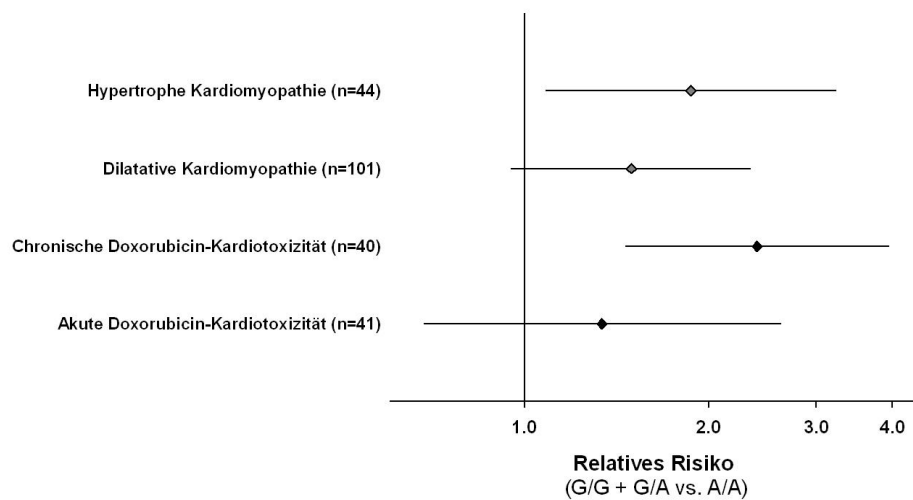


Abbildung 4-18 Darstellung des Relativen Risikos in Bezug auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch die Variante des NCF4-Polymorphismus rs10854694. Darstellung analog zu Abbildung 4-17.

Der SNP rs10854694 steht mit einem $r^2 = 0,94$ in einem extrem hohen LD mit der benachbarten Promotorvariante rs1883112. Dieser war ebenfalls mit einer chronischen Doxorubicin-Kardiotoxizität assoziiert (RR = 1,99, Abbildung 4-19).

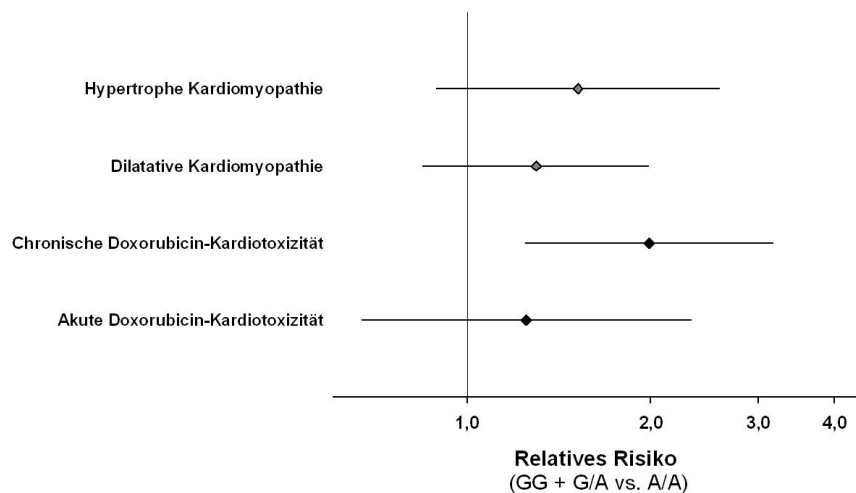


Abbildung 4-19 Darstellung des Relativen Risikos in Bezug auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch die Variante des NCF4-Polymorphismus rs1883112. Analoge Darstellung wie in Abbildung 4-17.

Ein weiterer SNP, welcher Zusammenhänge mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz zeigte, war eine Intron 2-Variante des RAC2-Gens (rs1476002). Die homozygoten und heterozygoten Variantenträger hatten im Vergleich zu den homozygoten Wildtypträgern

ein leicht erhöhtes Risiko, an einer hypertrophen Kardiomyopathie zu erkranken (RR = 1,62, Abbildung 4-20).

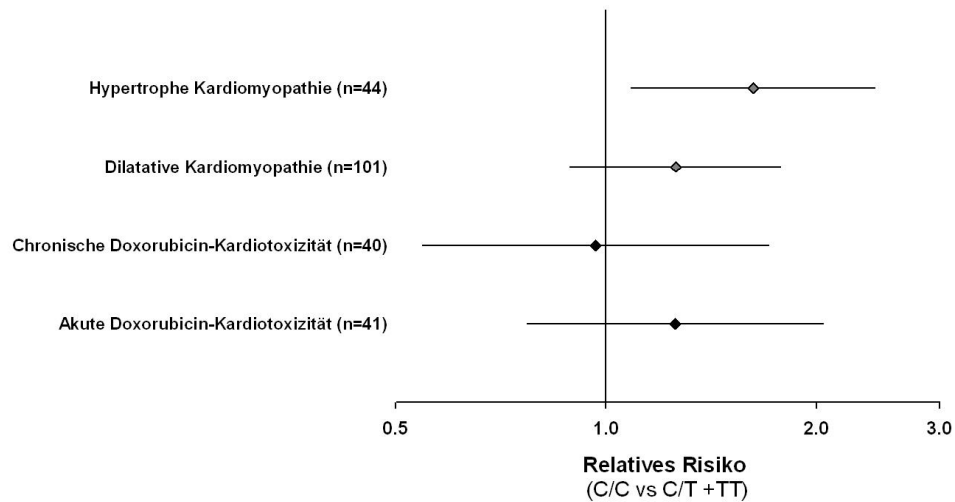


Abbildung 4-20 Darstellung des Relativen Risikos in Bezug auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch die Variante des RAC2-Polymorphismus rs1476002. Analoge Darstellung wie in Abbildung 4-17.

Ebenfalls im Intron 2 ist der RAC2-SNP rs13058338 lokalisiert. Die Träger des Variantenallels zeigten ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer akuten Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität (RR = 1,57). Die untersuchten chronischen Kardiomyopathie-Formen waren davon nicht beeinflusst.

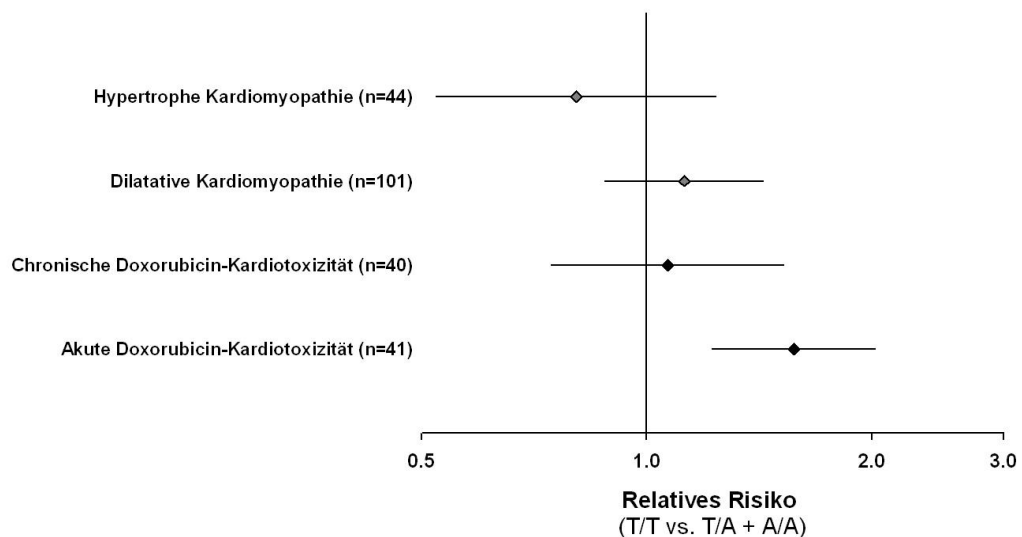


Abbildung 4-21 Darstellung des Relativen Risikos in Bezug auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch die Variante des RAC2-Polymorphismus rs13058338. Zur Darstellungsweise siehe Abbildung 4-17.

4.5 Probandenstudie zur Untersuchung des Einflusses genetischer Varianten der NAD(P)H-Oxidase auf Doxorubicin-Effekte in humanen PBMCs

Die Ergebnisse in Abschnitt 4.4 zeigen, dass Genpolymorphismen in der NAD(P)H-Oxidase möglicherweise einen Einfluss auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz haben können. Daher sollte nachfolgend der Aspekt der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität eingehender untersucht werden. Um zu testen, ob sich Doxorubicin in Abhängigkeit von genetischen Polymorphismen auf die Apoptose von Zellen auswirkt, wurde eine Probandenstudie durchgeführt, in der die Apoptose von PBMCs von 141 gesunden Teilnehmern gemessen wurde.

Aus Blutproben von 141 Probanden wurden die PBMCs isoliert und anschließend mit fünf verschiedenen Doxorubicin-Konzentrationen inkubiert. Nach 48 h erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Apoptose. Die Auftragung der Apoptose gegen die Doxorubicinkonzentration zeigte, dass die Doxorubicin-Effekte in Anlehnung an die Michaelis-Menten-Gleichung der Enzymkinetik evaluiert werden konnten. Als Analyseparameter für die statistische Auswertung wurden sowohl der maximale Doxorubicin-Effekt hinsichtlich der Apoptoseinduktion (E_{\max}) als auch diejenige Doxorubicin-Konzentration (E_{50}) ermittelt, bei welcher der halbmaximale Effekt auftrat. Diese beiden Parameter wurden für die Zellen eines jeden Probanden mit dem Modul SOLVER in EXCEL ermittelt.

Nach Erfassung der funktionellen Daten wurde die DNA der Probanden auf die Polymorphismen der NAD(P)H-Oxidase genotypisiert. In Abbildung 4-22 sind die Ergebnisse graphisch veranschaulicht. Zwei Genvarianten waren statistisch signifikant mit dem E_{50} -Wert assoziiert: der Intron 4-Polymorphismus rs5917471 des CYBB-Gens ($p = 0,03$) und der SNP rs8137602, welcher in der flankierenden 3'-Region des NCF4-Gens lokalisiert ist ($p = 0,005$). Den maximalen Doxorubicin-Effekt beeinflusste nur rs1476002 im Intron 2 von RAC2 ($p = 0,003$).

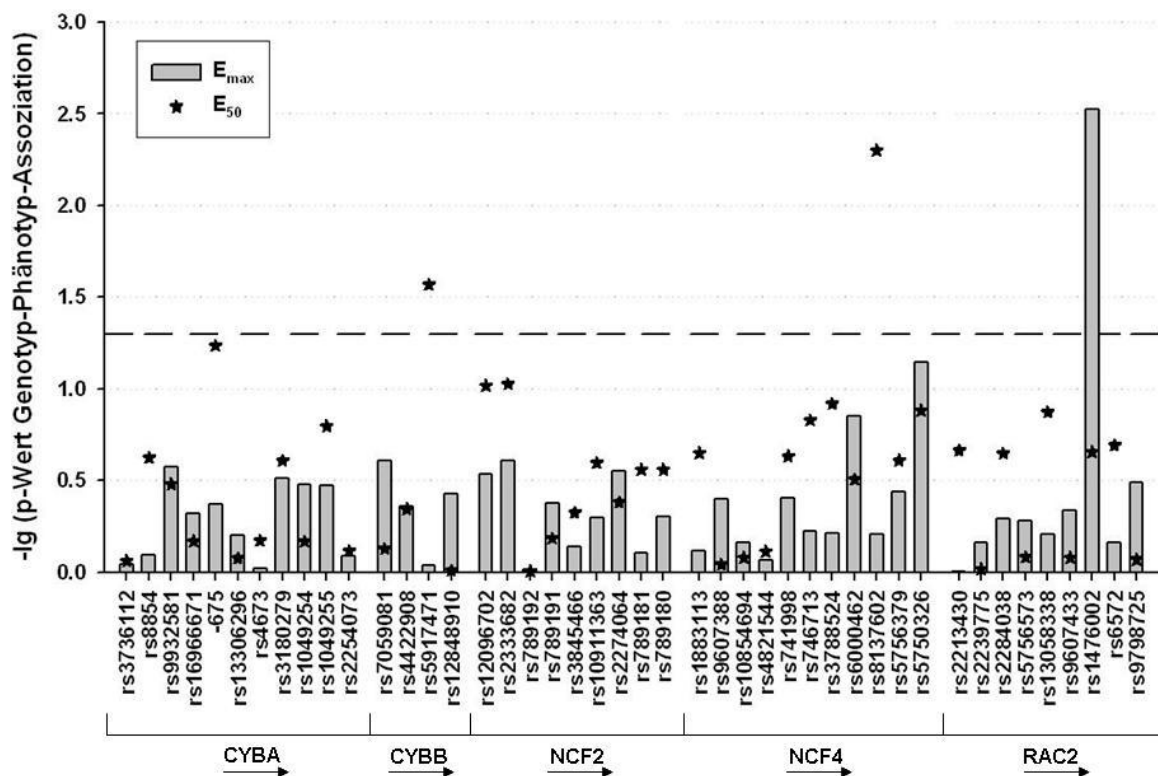


Abbildung 4-22 Assoziation von Genpolymorphismen der NAD(P)H-Oxidase und Doxorubicin-induzierter Apoptose gemessen in isolierten PBMCs. Die Korrelationen wurden mittels des Jonckheere-Terpstra-Trendtests ermittelt. Dargestellt sind die Beziehungen zwischen der maximalen Apoptose bzw. dem E_{50} -Wert und den Genpolymorphismen als negative dekadische Logarithmen der p-Werte. Die gestrichelte Linie bei einem Wert von 1,3 kennzeichnet die statistische Signifikanz von $p = 0,05$. Für jedes der fünf Gene sind die Polymorphismen in 5'-3'-Richtung angeordnet.

Nachfolgend wurden diejenigen SNPs mit einem p-Wert $< 0,05$ eingehender analysiert. Für den Polymorphismus NCF4 rs8137602 erfolgte eine Zusammenfassung der heterozygoten Probanden mit dem einen homozygoten Variantenträger. Unter der Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests zeigte das Vorliegen des C-Allels eine signifikant erhöhte Empfindlichkeit auf Doxorubicin ($p = 0,006$, Abbildung 4-23 A). Die Analyse des Polymorphismus CYBB rs5917471 ergab, dass homozygote Variantenträger eine höhere Empfindlichkeit für Doxorubicin zeigten ($p = 0,01$, Abbildung 4-23 B).

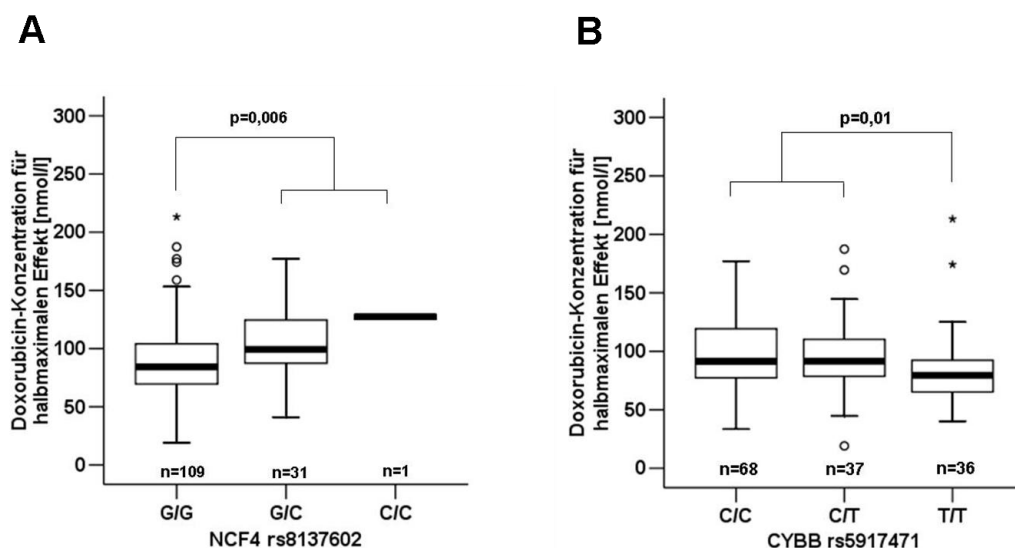


Abbildung 4-23 Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit von PBMCs gegenüber Doxorubicin (E_{50} -Wert) und Genpolymorphismen der NAD(P)H-Oxidase. Illustriert sind die Effekte der SNPs NCF4 rs8137602 (A) und CYBB rs5917471 (B). Die statistische Testung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Das Varianten-Allel des RAC2-Polymorphismus rs1476002 führte bei mit Doxorubicin behandelten PBMCs zu einer insgesamt erhöhten Apoptose. Wie in Abbildung 4-24 dargestellt, war dieser Unterschied unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests formal statistisch signifikant ab einer Doxorubicin-Konzentration von 100 nmol/l.

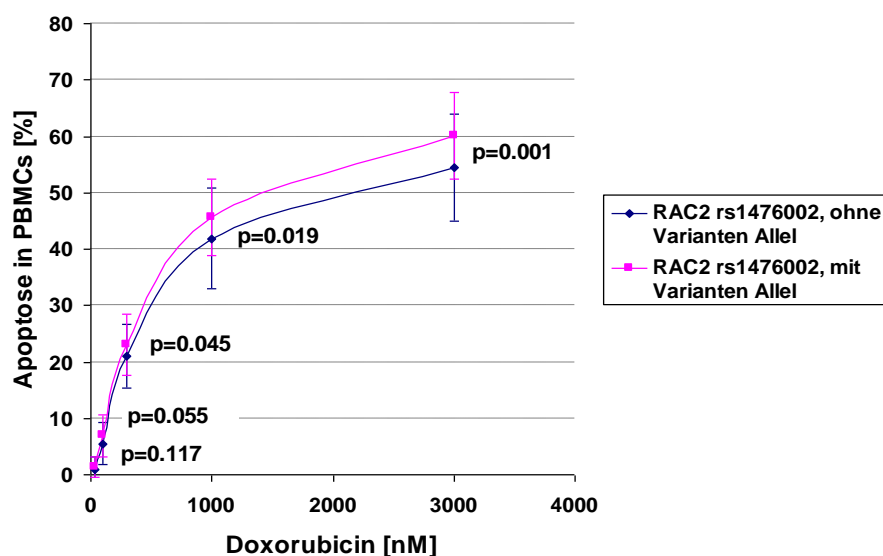


Abbildung 4-24 Beeinflussung der Doxorubicin-induzierten Apoptose in PBMCs in Abhängigkeit vom RAC2-Polymorphismus rs1476002, gemessen nach 48 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank unter fünf verschiedenen Doxorubicin-Konzentrationen. Die Messungen erfolgten durchflusszytometrisch mittels Annexin-Markierung. Die Kurven beziehen sich auf Probanden ohne ($n = 106$) und mit Varianten-Allel ($n = 35$). Für beide Genotypgruppen sind für jede eingesetzte Doxorubicin-Konzentration die Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Für den CYBA 640A>G-Polymorphismus, welcher im Hinblick auf Expression und Enzymaktivität Effekte gezeigt hatte, ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Genotyp-Phänotyp-Analyse. In der visuellen Darstellung mittels Boxplot (Abbildung 4-25) scheint das G-Varianten-Allel tendenziell zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Doxorubicin zu führen.

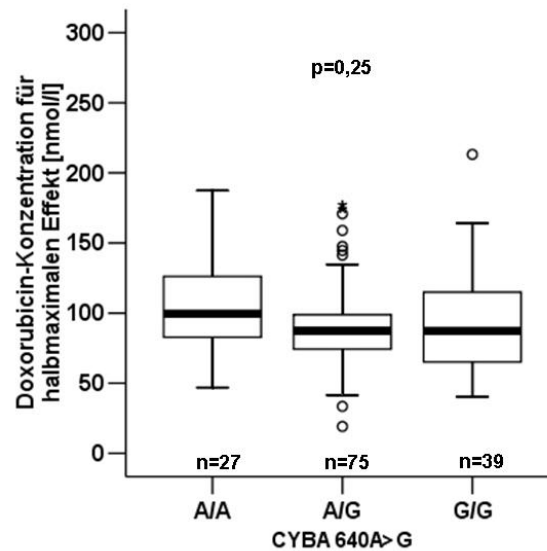


Abbildung 4-25 Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit von PBMCs gegenüber Doxorubicin (E_{50} -Wert) und dem Genpolymorphismus CYBA 640A>G. Die statistische Analyse wurde mit dem Jonckheere-Terpstra-Trendtest durchgeführt.

4.6 Molekularbiologische Untersuchungen zu CYBA 640A>G

4.6.1 Untersuchung der allelspezifischen Genexpression des CYBA 640A>G-Polymorphismus

Um zu klären, ob in heterozygoten Zellen eines der beiden CYBA 640A>G-Allele bevorzugt transkribiert wird, wurde die allelspezifische Genexpression dieses SNPs an 32 heterozygoten lymphoblastoiden Zelllinien (LCL-Zellen) untersucht. Von diesen Zelllinien wurden zeitgleich sowohl RNA- als auch DNA-Proben asserviert. Zunächst wurden die RNA-Proben in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgte die Analyse von gDNA und cDNA mittels Primerextensions-Methode. Zur Auswertung wurden jeweils die Peakflächen der Elektropherogramme ausgemessen und im Verhältnis zueinander dargestellt. Der Abbildung 4-26 ist zu entnehmen, dass in der genomischen DNA (gDNA) beide Allele etwa zu gleichen Teilen vorhanden waren. Die gebildeten A/G-Verhältnisse streuen daher um den Wert von 1,05. In der cDNA war der Anteil des A-Allels etwas größer, so dass die Quotienten hier etwa um den Wert 1,3 streuen. Die einzige Ausnahme bildet die Zelllinie NA 12814, welche im Vergleich zur gDNA ein kleineres A/G-Verhältnis in der cDNA aufwies.

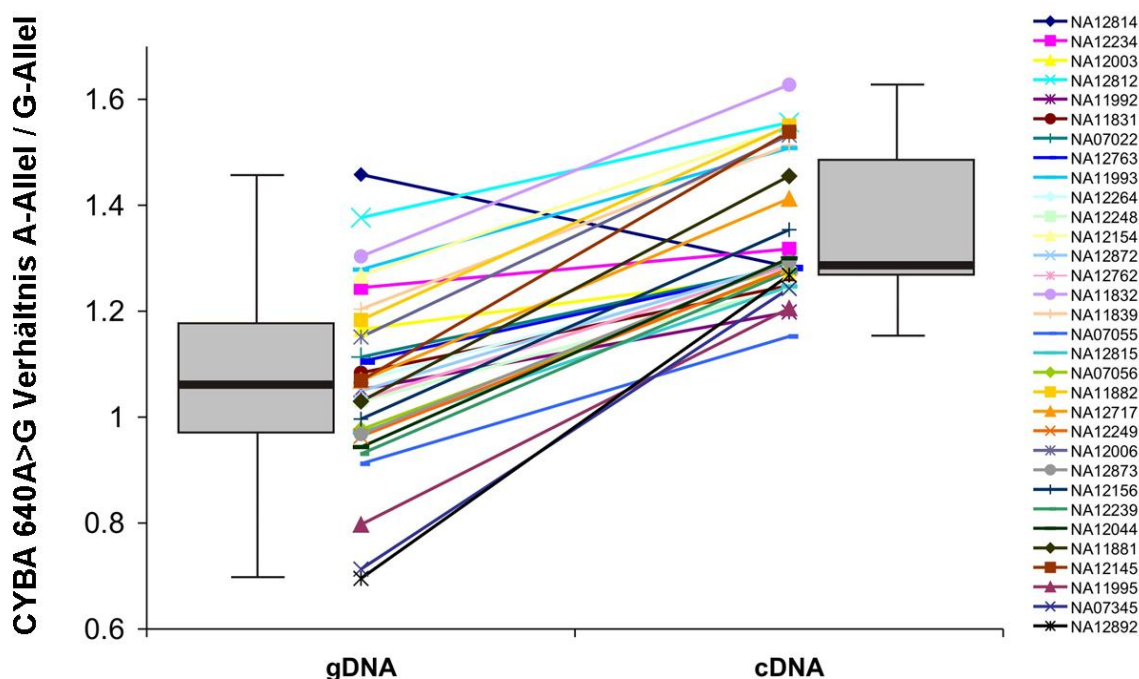


Abbildung 4-26 Vergleichende Darstellung der A/G-Quotienten ermittelt an der gDNA und der cDNA von 32 lymphoblastoiden Zellkulturen. Die A-G-Relationen in der gDNA und der cDNA sind für jede Zelllinie durch eine Linie verbunden.

In Abbildung 4-27 sind dieselben Daten aus Abbildung 4-26 für jede Zelllinie eindimensional als Logarithmus zur Basis 2 aufgetragen: Es wurde der Quotient aus dem A-G-Verhältnis in der cDNA zu demjenigen in der gDNA gebildet. In 31 der 32 untersuchten LCL-Zelllinien war dieser Quotient > 1 , somit der zugehörige binäre Logarithmus > 0 . Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des Wilcoxon-Tests für paarweise verbundene Stichproben ($p = 10^{-6}$).

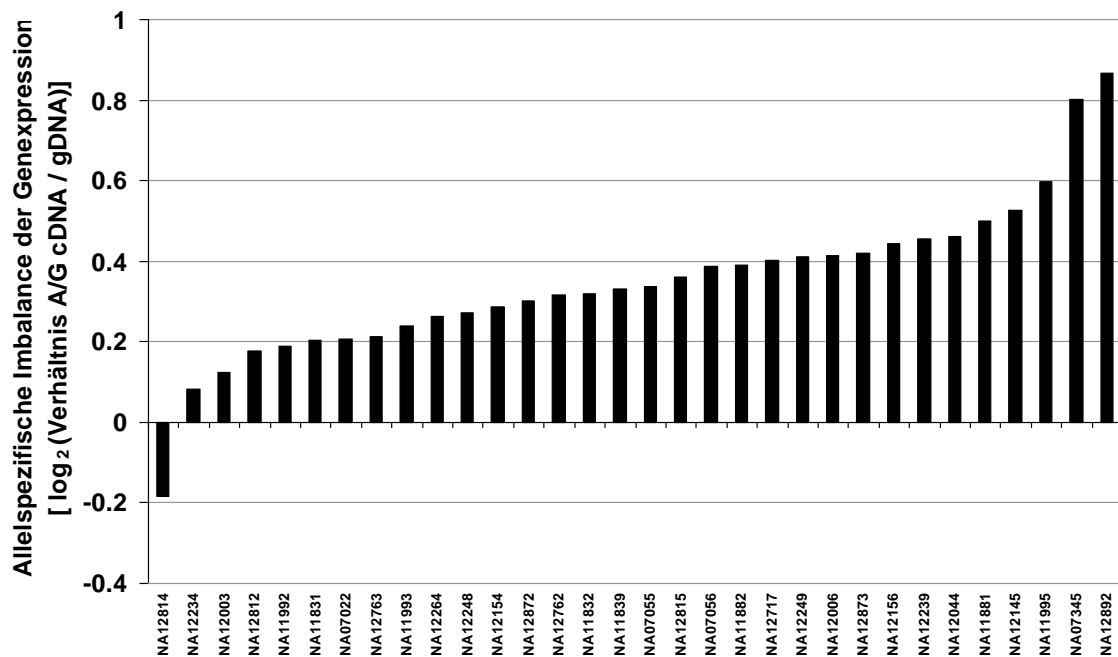


Abbildung 4-27 Allelspezifische Genexpression des CYBA 640A>G-Polymorphismus, gemessen an 32 lymphoblastoiden Zelllinien.

4.6.2 Untersuchung der CYBA-Transkriptstabilität in Abhängigkeit vom CYBA 640A>G-Polymorphismus

Nachfolgend sollte geklärt werden, ob die unter 4.6.1 beobachtete allelspezifische Imbalance der CYBA-Transkripte auf unterschiedliche Transkriptstabilitäten zurückzuführen war. Dazu wurden insgesamt 17 homozygote LCL-Zelllinien mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D behandelt. Sieben der Zelllinien trugen den AA-Genotyp, zehn waren homozygote Träger des G-Allels. Die Auswertung nach dem Mann-Whitney-U-Test ergab, dass bei Vorliegen des GG-Genotyps die CYBA-Genexpression auf Transkriptebene bereits vor der Zugabe von Actinomycin D um 51 % niedriger war (Abbildung 4-28 A, $p = 0,008$). Unter Anwendung des paarweisen Student-t-Tests zeigte sich sowohl 12 h als auch 24 h nach Zugabe von Actinomycin D eine signifikant stärkere Degradation der CYBA-mRNA in den Zellen der GG-Träger (Abbildung 4-28 B,

$p_{12h} = 0,04$, $p_{24h} = 0,03$). Im Mittel betrug die mRNA-Halbwertszeit in den Zellen der AA-Träger 14 h, während diese bei den GG-Trägern nur 6,9 h betrug.

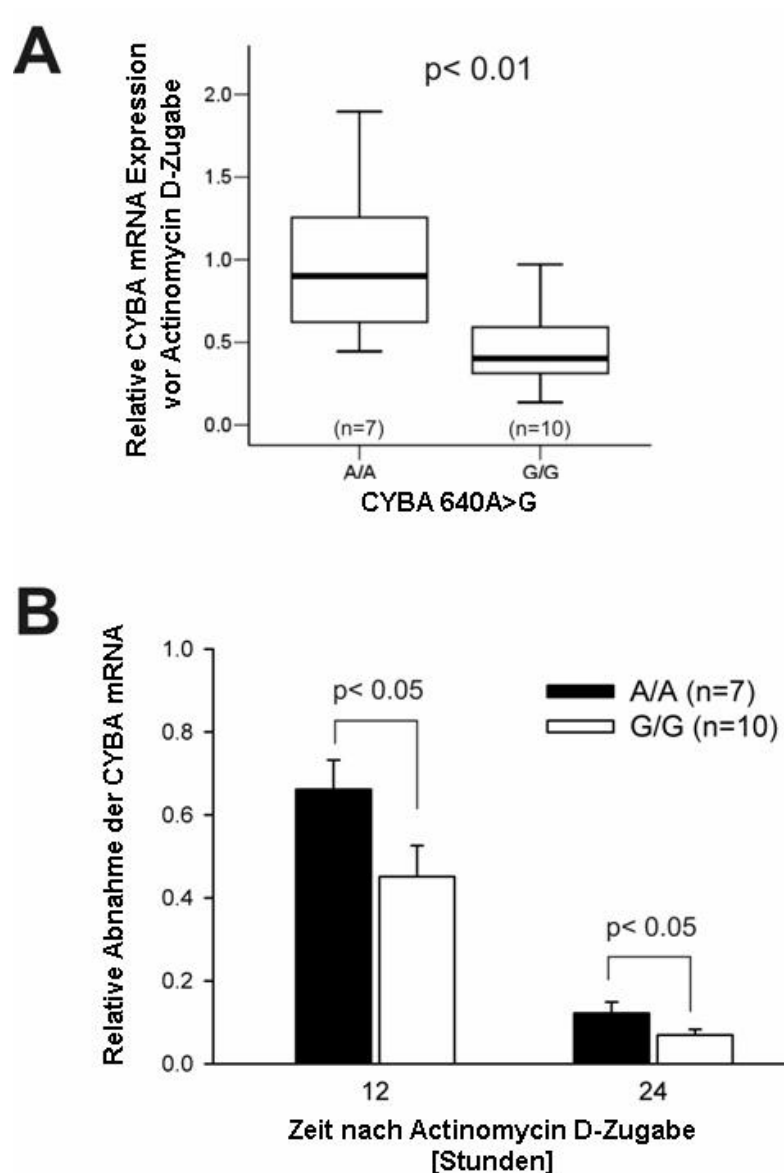


Abbildung 4-28 Effekte des CYBA 640A>G-Polymorphismus auf die Stabilität der mRNA, gemessen an 17 homozygoten LCL-Zelllinien. Dargestellt sind die Unterschiede in den Transkriptmengen vor Zugabe von Actinomycin D (A), wobei die CYBA-Expression in relativen Einheiten bezogen auf den Mittelwert bei A/A-Genotyp angegeben ist. (B) zeigt für beide Genotypgruppen die relative Abnahme der CYBA-Expression 12 bzw. 24 h nach Actinomycin D-Zugabe. Die Inkubationen erfolgten bei 37 °C im Brutschrank.

4.6.3 Untersuchung der allelspezifischen Effekte des CYBA 640A>G-Polymorphismus in transfizierten Zellkulturen

Im nächsten Schritt sollte bei ansonsten identischem genetischem Hintergrund die Untersuchung der allelspezifischen Effekte des CYBA 640A>G-Polymorphismus auf die Enzymaktivität in eukaryotischen Zellkulturen erfolgen. Dazu sollte jeweils eine von den beiden Allelkonfigurationen des CYBA-SNPs in HEK-Zellen nach Transfektion überexprimiert werden. Zunächst mussten dazu CYBA-tragende Plasmide generiert werden, die entweder das A-Allel oder das G-Allel enthielten. Ein Vektor, der das CYBA-Gen enthielt, stand bereits zur Verfügung. Zur Generierung dieses Konstrukts wurde humane CYBA-cDNA zunächst über PCR vermehrt und anschließend unter Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XbaI* in die *multiple cloning site* des Expressionsvektors pcDNA 3.1 eingebracht. Eine Transfektion des Plasmids in HEK-Zellen führte zu einer deutlichen Überexpression der p22^{phox}-Untereinheit (Abbildung 4-29).

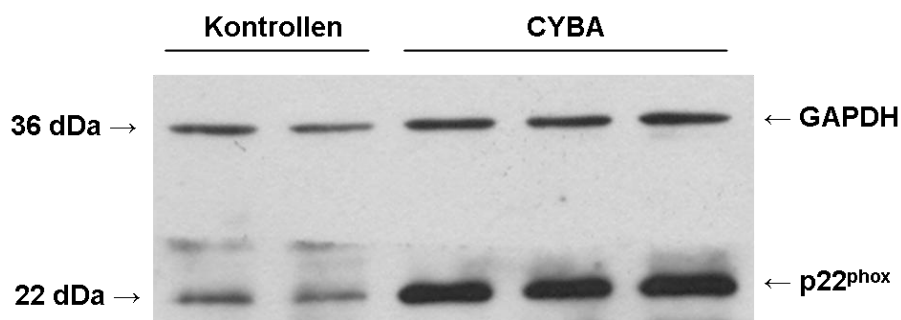


Abbildung 4-29 Westernblot an Proteinproben aus transfizierten HEK-Zellen. Die Transfektion erfolgte sowohl mit leerem Expressionsvektor pcDNA 3.1 (Kontrollen) als auch mit CYBA-tragendem Konstrukt (CYBA). Die Immunfärbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen p22^{phox} und das Referenzprotein GAPDH.

Da die ursprüngliche Plasmidsequenz das A-Allel enthielt, wurde anschließend durch *site-directed mutagenesis* ein Plasmid generiert, welches stattdessen das G-Allel des CYBA 640A>G Polymorphismus trug. Anschließend erfolgte die Transfektion der Plasmide in HEK-Zellen.

Die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase hängt essentiell von der Anwesenheit der katalytischen Untereinheit ab. Aus diesem Grund wurde anschließend versucht, CYBA und CYBB gleichzeitig in die Zellen zu überführen. Aus Zeitgründen wurde dazu ein CYBB-tragender Expressionsvektor kommerziell erworben. Anschließend wurden die Konstrukte in HEK-Zellen transfiziert und nach zwei Tagen die Enzymaktivität gemessen. Zur besseren Vergleichbarkeit mit der Co-Transfektion wurden Zellen, die nur eine der beiden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten erhalten sollten, zusätzlich mit dem Leervektor transfiziert. Wie in Abbildung 4-30 veranschaulicht, zeigten die mit CYBA und CYBB transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle oder den Einzeltransfektionen eine etwas höhere extrazelluläre ROS-Produktion. Insgesamt war die Aktivität aber nur sehr schwach (unter 500 RLU).

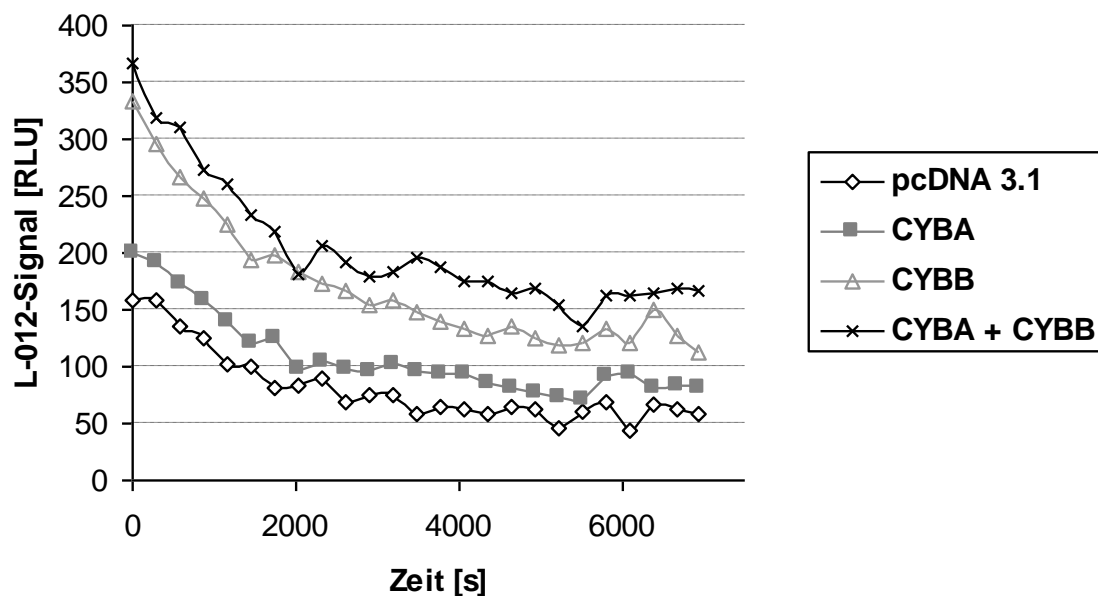


Abbildung 4-30 Messung der extrazellulären ROS von HEK-Zellen nach Transfektion von CYBA und CYBB. Die Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA 3.1, CYBA, CYBB bzw. CYBA und CYBB transfiziert. Der Aktivitätsnachweis erfolgte mit L-012-vermittelter Chemilumineszenz bei 37 °C.

Zur Überprüfung der Transfektionen wurde aus den Zellen der verschiedenen Ansätze RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend die Genexpression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten CYBA und CYBB gemessen. Abbildung 4-31 veranschaulicht, dass die Transfektionen erfolgreich waren und jeweils zu einer erhöhten Transkriptmenge des entsprechenden Gens geführt haben.

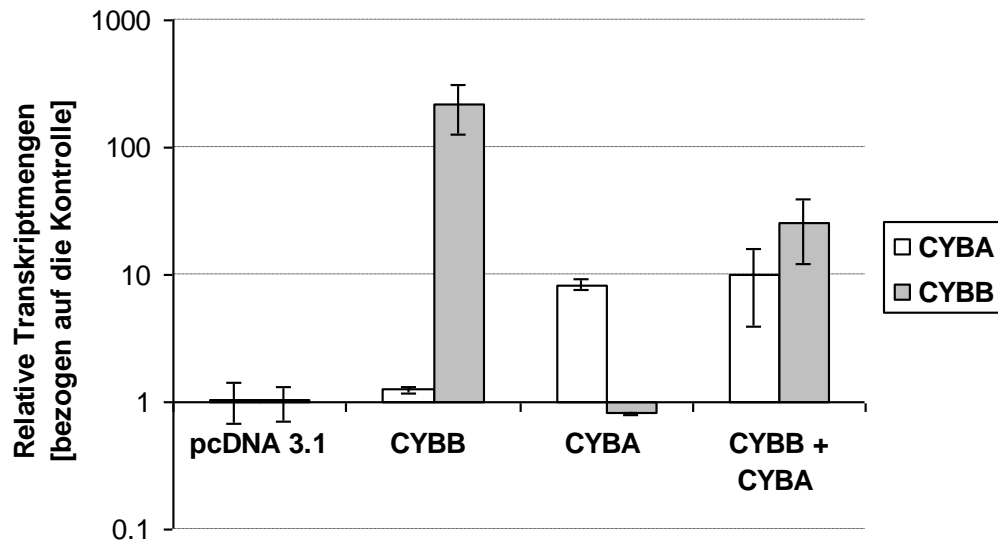


Abbildung 4-31 Darstellung der relativen Genexpression transfizierter HEK-Zellen. Die Zellen wurden entweder mit dem leeren Expressionsvektor, CYBB + leerer Expressionsvektor, CYBA + leerer Expressionsvektor bzw. CYBB + CYBA in Kombination transfiziert. Für alle vier Transfektionsbedingungen wurden die Genexpression für CYBA und CYBB mit qRT-PCR unter Verwendung von SYBR Green gemessen und auf die entsprechenden Messwerte mit dem leeren Expressionsvektor bezogen.

Zur Detektion allelspezifischer Unterschiede der Enzymaktivität empfiehlt sich zum einen die Suche nach einem effizienten Expressionssystem und zum anderen die Anwendung eines empfindlichen Nachweisverfahrens. Da die messbare NOX2-Aktivität transfizierter HEK-Zellen extrem schwach war, wurde daher getestet, ob die Verwendung der Isoform NOX4 eine bessere Alternative zu NOX2 darstellen könnte. Im Zuge dessen erfolgte ebenfalls die Etablierung einer qRT-PCR (Nachweis mit SYBR-Green) für NOX4. Da die NOX4 intrazelluläres Superoxid produziert, war außerdem eine Nachweismethode für intrazelluläre ROS zu finden. Getestet wurden dazu sowohl das fluoreszierende DCFH-DA als auch der photometrische NBT-Assay. Unter Verwendung des relativ unspezifischen DCFH-DA, welches hauptsächlich H_2O_2 nachweist, änderte sich bei den unterschiedlichen Transfektionen die ROS-Produktion nicht. Die Anwendung des NBT-Assays schien hingegen erfolgreich zu sein, allerdings sind hier noch weitere Optimierungen des Verfahrens vorzunehmen. Außerdem wurde getestet, ob die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in anderen Zelllinien (HeLa-Zellen, MCF7-Zellen) stärker ausgeprägt ist als in HEK-Zellen. Vorläufige Untersuchungen haben ergeben, dass HeLa-Zellen eine mögliche Alternative zu den HEK-Zellen darstellen könnten, da sie sowohl extrazellulär (L-012-Lumineszenz) als auch intrazellulär (NBT-Assay) Signale in adäquater Stärke (d. h. deutlich vom Hintergrund abgrenzbar) zeigten.

5 Diskussion

Für die in einer klinischen Studie beschriebenen Assoziationen zwischen drei SNPs der NAD(P)H-Oxidase und der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität (Wojnowski et al., 2005) ließ sich in funktionellen Messungen mit Granulozyten kein statistisch signifikanter Unterschied in der Enzymaktivität feststellen. Ein solcher fand sich stattdessen für den SNP CYBA 640A>G. Dieser funktionelle Befund konnte in einer unabhängigen Validierungsstudie bestätigt werden. Eine umfassende genetische Charakterisierung der NAD(P)H-Oxidase mit insgesamt 53 SNPs ergab, dass CYBA 640A>G am stärksten mit der Enzymaktivität assoziiert war. Personen mit 640GG wiesen dabei die geringste Superoxid-Produktion auf. Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen, die mit CHOP bzw. CHO(E)P therapiert wurden, zeigten einen deutlich schlechteren Verlauf bei Vorliegen des CYBA 640GG-Genotyps. Dies galt für das Gesamtüberleben und insbesondere für das ereignisfreie Überleben (d. h. ohne Progression oder Rezidiv des NHL). In molekularbiologischen Analysen konnte für das weniger aktive G-Allel auch eine geringere Expression auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde dadurch gestützt, dass in heterozygoten Zelllinien ein Ungleichgewicht in der Expression zu Lasten des G-Allels beobachtet wurde. Weiterhin war nach Behandlung mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D die Stabilität der CYBA-Transkripte in Zellen mit GG-Genotyp geringer als bei solchen mit AA. Weiterhin ergaben sich für eine NCF4-Promotorvariante sowohl eine Assoziation mit Doxorubicin-induzierter chronischer Kardiomyopathie als auch mit einer Herzinsuffizienz anderer Ursache in einem Vergleichskollektiv. Außerdem zeigte sich für einen RAC2-SNP ein Zusammenhang mit der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin in PBMCs.

5.1 Funktionalität von Polymorphismen des CYBA-Gens

Genpolymorphismen des p22^{phox}-Proteins wurden im Vergleich zu Varianten anderer Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase sehr häufig untersucht. Da die Nox-Isoformen 1-4 auf p22^{phox} als stabilisierende Untereinheit angewiesen sind, handelt es sich hierbei um ein ausgesprochen wichtiges Protein. Der am meisten untersuchte SNP der NAD(P)H-Oxidase ist der durch Dinauer et al. (1990) identifizierte Polymorphismus CYBA 242C>T. Hierbei handelt es sich um eine Exon 4-Variante, die an Position 72 des p22^{phox}-Proteins den Aminosäureaustausch His → Tyr hervorruft. Da der Aminosäureaustausch in einer potenziellen Häm-Bindestelle lokalisiert ist, könnte er somit direkt die Enzymaktivität beeinflussen. Bislang wurde dieser Polymorphismus mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen in Verbindung gebracht. Allerdings lieferten die Untersuchungen teilweise widersprüchliche Ergebnisse (Zalba et al., 2005). In unseren Untersuchungen an Zellen gesunder Probanden konnten keine Zusammenhänge zwischen Funktionsmessungen und dieser Genvariante identifiziert werden. Jedoch scheint der CYBA 242C>T Polymorphismus die Entstehung einer Herzinsuffizienz zu beeinflussen. Das Tragen des Varianten-Allels bedeutet ein leicht erhöhtes Risiko, an einer akuten oder chronischen Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität zu erkranken (Wojnowski et al., 2005). Meinen Daten zufolge scheint dieses Allel auch unabhängig von Doxorubicin die Entstehung einer hypertrophen Kardiomyopathie zu begünstigen. Bei der Entwicklung unterschiedlicher Formen der Herzinsuffizienz können mehrere Isoformen der NAD(P)H-Oxidase beteiligt sein. Demzufolge könnten sich Varianten im p22^{phox}-Protein kodierenden CYBA-Gen auf unterschiedliche kardiologische Phänotypen auswirken. Auf die Zusammenhänge soll später noch genauer eingegangen werden.

Für die bereits in der Literatur beschriebenen und teilweise als funktionell identifizierten CYBA-Promotor-SNPs CYBA -930A>G (Moreno et al., 2003), CYBA -852G>C, CYBA -675A>T und CYBA -536G>A (Moreno et al., 2007) ergaben sich bei meinen Untersuchungen keine Zusammenhänge mit Funktionsmessungen oder klinischen Phänotypen. Die Effekte der Variante CYBA 640A>G werden in den nachfolgenden Abschnitten ausführlich dargestellt und diskutiert.

5.2 Bedeutung des CYBA-SNPs 640A>G

5.2.1 Genexpression und ROS-Produktion von Granulozyten

Die durchgeführten Untersuchungen auf Aktivitäts- und Expressionsebene ergaben, dass der SNP CYBA 640A>G die Funktion der NAD(P)H-Oxidase beeinflusst. Die Messung der ROS-Produktion in Granulozyten ergab sowohl in der exploratorischen als auch in der bestätigenden Studie eine reduzierte Enzymaktivität durch das Varianten-Allel. Von allen untersuchten 53 Genvarianten zeigte dieser SNP die stärkste Assoziation mit der Aktivität. Die Analyse der CYBA-Genexpression auf Transkriptebene war in Granulozyten nicht durchführbar, da diese ausdifferenzierten Zellen nur sehr wenig RNA enthalten. Sowohl die Abnahme größerer Blutmengen als auch der damit verbundene Arbeitsaufwand waren im Rahmen der durchgeführten Probandenstudie nicht zu leisten. Aus diesem Grund wurden RNA-Proben aus Gesamtblut und isolierten PBMCs untersucht. Das Varianten-Allel des CYBA 640A>G-Polymorphismus ging in beiden Untersuchungsmaterialien mit geringeren CYBA-Transkriptmengen einher. Zur Bestimmung der p22^{phox}-Proteine konnten Granulozytenproben verwendet werden, mit denen auch die funktionellen Messungen durchgeführt wurden. Träger des G-Varianten-Allels hatten passend zu den beobachteten reduzierten CYBA-Transkripten auch geringere Mengen an p22^{phox}-Protein.

Der SNP CYBA 640A>G wurde zum ersten Mal im Jahr 1992 durch de Boer et al., 1992, beschrieben. Trotz mehrerer Untersuchungen konnten bislang keine eindeutigen Aussagen darüber getroffen werden, ob er funktionell relevant ist. Wyche et al., 2004, beobachteten in gesunden Probanden keinen Einfluss von CYBA 640A>G auf die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität von Granulozyten. Untersuchungen von Park et al., 2005, zur Messung von Markern für oxidativen Stress in Probanden lassen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vermuten, dass das G-Varianten-Allel schwächer funktional ist. Im Ausgangszustand wiesen Personen mit A-Allel eine höhere ROS-Produktion auf, nach sportlichem Training fiel diese aber stärker ab als bei Trägern der G-Variante. Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (CAD) führte das G-Allel hingegen in unstimulierten – jedoch nicht in stimulierten – Monozyten und in Blutgefäßhomogenaten zu einer erhöhten NAD(P)H-Oxidase-Aktivität (Macias-Reyes et al., 2008).

5.2.2 Klinische Bedeutung von CYBA 640A>G (rs1049255)

Im Rahmen dieser Dissertation konnte eine Assoziation des G-Allels mit einem schlechteren Ansprechen von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen auf eine Chemotherapie nach dem CHO(E)P-Schema gezeigt werden. Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Entstehung einer Krebserkrankung sowie deren Behandlung ist noch nicht umfassend geklärt. Es zeichnet sich jedoch ab, dass ROS an der Entstehung von Zellentartungen beteiligt sind (Szatrowski and Nathan, 1991; Mates et al., 2008). Andererseits scheinen sie aber auch eine wichtige Rolle in der Zytostatika-Therapie zu spielen, da sie in verschiedene Signalwege eingreifen und die Apoptose von Tumorzellen induzieren können (Ozben, 2007).

Die ersten klinischen Assoziationen der Genvariante CYBA 640A>G wurden für kardiologische Phänotypen beschrieben. Eine Beziehung zu koronarer Herzkrankheit konnte jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden. Während Inoue et al., 1998, und Zafari et al., 2002, keine Zusammenhänge feststellen konnten, konnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko durch das A-Allel (Macias-Reyes et al., 2008) oder das G-Allel (Gardemann et al., 1999) des CYBA 640A>G beobachtet werden. Außerdem bestehen Hinweise, dass das A-Allel die Entstehung von bronchialem Asthma (Izakovicova Holla et al., 2009, Ivanov et al., 2008) und einer Clozapin-induzierten Agranulozytose (Mosyagin et al., 2004) sowie die Entwicklung von Nierenerkrankungen (Doi et al., 2005) begünstigt.

Ein Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen in ROS-assozierten Enzymen und der Entstehung von Non-Hodgkin-Lymphomen ist bisher nur selten untersucht worden. Nach den Analysen von Lan et al., 2007, und Wang et al., 2006, scheint der Polymorphismus CYBA 640A>G jedoch keine Rolle für die Entstehung dieser Erkrankung zu spielen. Ein möglicher Einfluss der CYBA-Variante auf den natürlichen Verlauf der Erkrankung kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um dies zu klären, wäre eine Vergleichsgruppe mit Patienten ohne Chemotherapie nötig; dies ist aber aus ethischen Gründen nicht zu vertreten. Die nahe liegendste Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist, dass CYBA 640A>G die Wirkung der Krebstherapie beeinflussen könnte. Genpolymorphismen, die sowohl den ROS-Haushalt als auch die Wirkung einer Krebstherapie beeinflussen, sind bisher kaum in der Literatur beschrieben worden. Udler et al., 2007, identifizierten zwei Genvarianten der antioxidativen Gluthation-Peroxidase (GPX4), die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert waren. In einer anderen Studie führte eine Genvariante des Scavenger-Enzyms NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase 1

(NQO1) zu mehr reaktiven Sauerstoffspezies (Fagerholm et al., 2008). Dies begünstigte die Progression der Tumorerkrankung, und bei einer Subgruppe mit Anthrazyklin-haltiger Chemotherapie wurde ein schlechteres Ansprechen beobachtet. In diesem Kontext sollte erwähnt werden, dass sich die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies bei soliden Tumoren von der in Lymphomen unterscheiden kann. So beschreiben Ushio-Fukai and Nakamura, 2008, dass erhöhte Mengen an ROS Wachstumsprozesse wie die Angiogenese steuern und dadurch das Wachstum von Tumoren fördern können.

Ein Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen der NAD(P)H-Oxidase und dem therapeutischen Ansprechen einer CHO(E)P-Therapie ist bis jetzt noch nie beschrieben worden. Ob CYBA 640A>G speziell die Wirkung einer bestimmten Substanz des CHO(E)P-Schemas beeinflusst, kann nur vermutet werden. Da nur etwa die Hälfte der Patienten Etoposid erhalten hat, war eine Adjustierung auf diesen Faktor möglich. Es zeigte sich, dass die schlechtere Prognose für das 640G-Allel nicht durch Etoposid beeinflusst wurde. Ähnliches galt auch für die bei einigen Patienten durchgeführte Strahlentherapie. Kurosu et al., 2003, konnten durch *in-vitro*-Untersuchungen an Lymphom-Zellen zeigen, dass Zellen durch eine unkontrollierte Expression von BCL6 gegenüber Etoposid-vermittelter Apoptose resistent wurden. Dies hängt vermutlich mit einer Steigerung der antioxidativen Kapazität der Zelle zusammen, und somit wird die durch verschiedene Zytostatika (Etoposid, Daunorubicin, Vincristin) induzierte ROS-Produktion abgeschwächt. Interessanterweise sind chromosomale Translokationen und somatische Mutationen im 5'-Bereich des BCL6-Gens die häufigsten im Zusammenhang mit B-Non-Hodgkin-Lymphomen beschriebenen genetischen Veränderungen. Dieses Gen spielt offenbar sowohl für die Entstehung dieser Erkrankung als auch für die Therapie mit einigen Zytostatika eine wichtige Rolle. Diese Befunde sind ein weiterer Beleg, dass die Generierung von ROS eine wichtige Wirkkomponente von Zytostatika darstellt.

Die schlechtere Prognose für Patienten, die das G-Allel von CYBA 640A>G trugen, könnte somit Ausdruck einer reduzierten ROS-Produktion im Zusammenhang mit der CHO(E)P-Therapie sein. Nachdem dieser Effekt nicht auf Strahlentherapie und Etoposid zurückzuführen war, ist zu vermuten, dass eine Interaktion von CYB640A>G mit Cyclophosphamid, Doxorubicin oder Vincristin vorlag. Es ist anzunehmen, dass eine Interaktion mit Doxorubicin am wahrscheinlichsten ist. Abgesehen von den interkalierenden Eigenschaften dieses Zytostatikums und der Hemmung von Topoisomerasen (Gewirtz, 1999) konnten gezeigt werden, dass ein wesentlicher Wirkmechanismus des

Doxorubicin in der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies besteht (Doroshov, 1983). Beobachtungen an HL-60-Zellen durch Mizutani et al., 2005, zeigten, dass das Zytostatikum oxidative DNA-Schäden verursacht. Diese resultieren über eine Aktivierung von PARP und der NAD(P)H-Oxidase in einer H₂O₂-induzierten Apoptose. Das Varianten-Allel des CYBA 640A>G-SNPs bewirkte nach meinen Ergebnissen jedoch eher eine leicht gesteigerte Empfindlichkeit für Doxorubicin in PBMCs gesunder Probanden, wenngleich dieser Effekt nicht statistisch signifikant war. Einen möglichen Erklärungsansatz bieten die stark veränderten Stoffwechselfvorgänge und Expressionsmuster entarteter Zellen, deren Effekte in PBMCs gesunder Probanden nicht gemessen werden können. So ist es durchaus möglich, dass Messungen an Lymphomzellen andere Ergebnisse geliefert hätten. Weiterhin sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die p22^{phox}-Untereinheit mit unterschiedlichen Nox-Isoformen interagieren kann. So konnten Piccoli et al., 2007, in hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks beobachten, dass die NAD(P)H-Oxidase Nox1, Nox2 und Nox4 nebeneinander vorliegen und Wachstums- und Differenzierungsprozesse durch ein komplexes Wechselspiel beeinflussen. Da bei aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen hauptsächlich Vorläuferzellen in die Blutbahn gelangen, ist auch denkbar, dass das G-Allel des CYBA 640A>G-SNPs durch die Beeinflussung der Funktion von Nox1 oder Nox4 einen negativen Verlauf der CHOP-Therapie verursacht.

Zusammenfassend ist hier zu sagen, dass der Erfolg einer Chemotherapie durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren beeinflusst wird, die sich in der Summe gegenseitig verstärken. Einer dieser Faktoren scheint die Bildung von ROS und damit auch die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase zu sein. Für den Moment bleibt festzuhalten, dass eine Genvariante, welche *in-vitro* mit einer geringeren Aktivität einherging, die Prognose von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen unter einer CHO(E)P-Therapie abschwächt. Bislang wird kontrovers diskutiert, ob die Effekte reaktiver Sauerstoffspezies in der Krebsbehandlung ausgenutzt werden sollten, beispielsweise durch die Verordnung spezieller Diäten (Fang et al., 2007, Wang and Yi, 2008). In diesem Zusammenhang bleiben ROS auch weiterhin Gegenstand aktueller Untersuchungen.

5.2.3 Molekulare Erklärungsansätze für CYBA 640A>G (rs1049255)

Das G-Allel des CYBA 640A>G-Polymorphismus ging mit einer geringeren CYBA-Genexpression auf Transkript- und Proteinebene einher und führte weiterhin zu einer reduzierten ROS-Produktion von Granulozyten. Da der SNP in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des CYBA-Gens lokalisiert ist, könnte er sowohl die Translations-effizienz als auch die Transkriptstabilität beeinflussen. Da sich der Effekt des Varianten-Allels sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bemerkbar machte, ist eine Beeinflussung der Translationseffizienz weniger wahrscheinlich. Eine Überprüfung von CYBA-Splice-sites mit Hilfe der Datenbank NetGene2 lieferte keine Anhaltspunkte für die Entstehung allelspezifischer Splicevarianten. Hingegen ergab die Untersuchung der Transkriptstabilität in homozygoten LCL-Zellen, dass das Varianten-Allel zu einer stärkeren Degradation der CYBA-mRNA führt. Das in heterozygoten LCL-Zellen beobachtete Ungleichgewicht der CYBA-Transkripte in Abhängigkeit von 640A>G könnte Folge der unterschiedlichen Stabilität der jeweiligen Transkripte sein. Ein Effekt dieses ca. 8000 bp von der Promotorregion entfernten SNPs auf die Transkription z. B. im Sinne einer Enhancer-Funktion ist aber gegenwärtig nicht völlig auszuschließen.

Die Stabilität von mRNA im Zytoplasma wird durch verschiedene Prozesse beeinflusst. Eine wichtige Rolle spielen dabei spezifische Erkennungssequenzen in der 3'-UTR (*cis-acting elements*), die von stabilisierenden oder destabilisierenden Bindeproteinen (*trans-acting elements*) erkannt werden. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Regulation der Ferritin- und Transferrin-Rezeptor-Expression. Durch die Anlagerung des iron regulatory factors (IRF) an iron response elements (IRE) der 3'-Region wird die mRNA vor dem Abbau durch Endonukleasen geschützt (Rothenberger et al., 1990). Zusätzlich konnte im Verlauf der letzten Jahre gezeigt werden, dass so genannte microRNAs die Stabilität von mRNA regulieren können. Dabei handelt es sich um kurze RNA-Stücke, die an spezielle Erkennungssequenzen der 3'-UTR binden (Bartel, 2004). Nach Lim et al., 2005, führt die Anlagerung der microRNAs zum anschließenden Abbau der Zieltranskripte. Kontext-abhängig können microRNAs destabilisierend oder auch stabilisierend auf die Gen-expression wirken (Xie et al., 2007). Mit Hilfe der Datenbank TargetScan (Grimson et al., 2007) gelang die Identifizierung von microRNAs, die theoretisch in der 3'-untranslatierten Region des CYBA-Gens binden können. Von besonderem Interesse ist die microRNA-663, die sich komplementär an die mRNA-Region anlagert, welche den CYBA 640A>G-Polymorphismus enthält. Der SNP befindet sich an der vierten Position der sieben Basenpaare umfassenden Seed-Sequenz der microRNA und ist damit in einer

wichtigen Erkennungssequenz lokalisiert (Lewis et al., 2003). Eine Analyse der Bindungsenergien (mittels miRanda-Algorithmus, Version 3.0, Enright et al., 2003) ergab, dass das G-Allel zu einer stärkeren Bindung der miR-663 führt. CYBA-mRNA, die das G-Allel trägt, ist somit bevorzugtes Ziel dieser microRNA. Dies könnte eine Erklärung für die stärkere Degradation dieser Transkripte darstellen.

Über die microRNA-663 ist bislang nur wenig bekannt. Zum ersten Mal wurde sie 2006 in kolorektalen Zellen identifiziert (Cummins et al., 2006). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser micro-RNA in Brustkrebszellen durch eine Hypermethylierung des Gens unterdrückt wird (Lehmann et al., 2008). Außerdem war an der leukämischen Zelllinie HL-60 nach Behandlung mit dem second messenger 4-Hydroxynonenal eine gesteigerte Expression von miR-663 (Pizzimenti et al., 2009) zu beobachten. 4-Hydroxynonenal ist ein Aldehyd, das aus der Lipidperoxidation von Zellmembranen entsteht (Esterbauer et al., 1991). Die Expression der microRNA könnte daher eine Antwort auf oxidativen Stress darstellen, indem die Expression ROS-bildender Enzyme unterdrückt wird. Sollten Brustkrebszellen von einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (z. B. zur Förderung der Angiogenese) profitieren, wäre die Unterdrückung der Expression der miR-663 verständlich. Für nicht-solide Tumore könnte hingegen eine Begrenzung der ROS-Produktion von Vorteil sein, wozu z. B. auch die von Pizzimenti et al., 2009, beobachtete vermehrte Expression von miR-663 beitragen könnte. Möglicherweise gilt Ähnliches auch für Lymphome, welche von einem geringeren oxidativen Stress zu profitieren scheinen (Kurosu et al., 2003).

Die Beeinflussung der Bindungseigenschaften von microRNAs durch Einzelnukleotidpolymorphismen ist in der Literatur bereits beschrieben worden. So konnten Mishra et al., 2007, in Zellkulturen zeigen, dass ein SNP in der 3'-UTR der menschlichen Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) die Bindung der microRNA-24 verhindert. Dies resultiert in einer Überexpression des Enzyms und führt interessanterweise zu einer Resistenz gegenüber dem Zytostatikum Methotrexat. In einem anderen Beispiel geben *in-vitro*-Untersuchungen von Sethupathy et al., 2007, eine mögliche Erklärung für die Assoziation eines genetischen Polymorphismus des Angiotensin-Rezeptors 1 (AGTR1) mit Bluthochdruck. Es zeigte sich, dass der SNP in der Seed-Sequenz der microRNA-155 lokalisiert ist und deren Anlagerung an die 3'-UTR der mRNA verhindert. Da die AGTR1-Transkripte nicht abgebaut werden, kommt es in Folge zu einer Überproduktion der Angiotensin-Rezeptoren und der Entstehung eines Bluthochdrucks.

Die allelspezifische Beeinflussung der Bindung einer micro-RNA durch CYBA 640A>G scheint in diesem Kontext eine plausible Erklärung für die beobachteten Unterschiede der CYBA-Transkriptstabilität zu sein. Erste Hinweise auf eine Regulation von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch microRNAs gibt die Arbeit von Shilo et al., 2008, die durch einen Knock-out des Dicer-Enzyms die microRNA-Expression in menschlichen Endothelzellen unterdrückten. Dies resultierte in einem verringerten Abbau des Transkriptionsfaktors, der die Expression von p47^{phox}-Protein supprimierte.

5.3 CYBA-Haplotypen

Neben CYBA 640A>G zeigte noch eine weitere CYBA-Variante (rs3180279) Assoziationen mit der Enzymaktivität. Die Untersuchung des Kopplungsungleichgewichts der beiden SNPs ergab mit einem r^2 -Wert von 0,79 ein hohes LD. Dies erklärt die schwächeren, aber doch ähnlichen Effekte des Polymorphismus rs3180279. Für einen Block in hohem LD, in dem sich auch diese beiden SNPs befinden, wurden Haplotypen aus vier SNPs (rs2254073, rs1049255 = 640A>G, rs1049254 = Ala174V, rs3180279) in Zusammenhang mit der Enzymaktivität analysiert. Auf Aktivitäts- und auf Transkriptebene konnten keine stärkeren Assoziationen als für CYBA 640A>G in Einzelbetrachtung festgestellt werden. Haplotypen mit dem A-Allel dieses SNPs waren mit einer höheren Enzymaktivität und Genexpression verbunden. Ein relevanter Einfluss der anderen drei SNPs außer CYBA 640A>G ist demzufolge eher unwahrscheinlich. Für den SNP im 3'-Bereich des CYBA-Gens (rs2254073) kann dies praktisch ausgeschlossen werden, da sich die signifikant verschiedenen Haplotypen an dieser Position nicht unterschieden. Übrig bleibt noch die Exon 6-Variante (rs1049254), die zu einem konservativen Aminosäureaustausch Alanin zu Valin an Stelle 174 des p22^{phox}-Proteins führt. Als Einzelvariante betrachtet war die Assoziation mit der Enzymaktivität aber deutlich schwächer als bei 640A>G (Abbildung 4-3). Der beobachtete Trend für Ala174Val ist Ausdruck des genetischen LD mit 640A>G. Es spricht daher viel dafür, dass Ala174Val zumindest für die in dieser Dissertation untersuchten Parameter nicht funktional ist. Die Aminosäure 174 befindet sich am carboxyterminalen Ende des p22^{phox}-Proteins, welches frei in das Cytosol ragt und mögliche Bindungsstellen für die cytosolischen Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox} enthält (Dahan et al., 2002). Da die Aminosäure 174 jedoch hinter diesen Bindungsdomänen lokalisiert ist, kann sie wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Proteininteraktionen nehmen. Dieser SNP wurde bereits durch Lee et al., 2006, in einer

klinischen Assoziationsstudie mit Bezug auf die Entstehung von Lungenerkrankungen untersucht. Auch hier war die Genvariante unauffällig.

Es ist deshalb davon auszugehen, dass die beobachteten Effekte der Haplotypen durch die Einzelvariante CYBA 640A>G erklärt werden können.

5.4 Funktionell bedeutsame Polymorphismen des CYBB-Gens

Eine Beschreibung der genetischen Variabilität des CYBB-Gens war durch die Bestimmung von nur vier Genpolymorphismen möglich, da es sich hierbei um einen hochkonservierten Sequenzbereich des X-Chromosoms handelt. Unter den drei großen ethnischen Populationen gilt dies für Kaukasier und Asiaten, während bei Afrikanern hier eine größere genetische Vielfalt vorliegt (Tarazona-Santos et al., 2008). Dies deutet auf eine hohe biologische Relevanz dieses Gens hin, ebenso wie die Tatsache, dass in den kodierenden Regionen von CYBB keine SNPs existieren, die zu Aminosäureaustauschen führen. Mutationen (seltene Varianten, die nicht der Definition eines Polymorphismus entsprechen) des CYBB-Gens sind Hauptursache für die Entstehung einer chronischen Granulomatose (Heyworth et al., 2003). Dabei handelt es sich um eine schwerwiegende Störung der Immunabwehr, die durch einen Funktionsverlust der phagozytären NAD(P)H-Oxidase ausgelöst wird und mit schweren Pilz- und Bakterieninfektionen einhergeht (Stasia and Li, 2008).

Die Analyse der CYBB-Genvarianten konnte keine statistisch signifikanten Assoziationen zwischen SNPs und der Enzymaktivität aufzeigen. Bei Betrachtung der Haplotypen, die aus den vier Polymorphismen rs7059081, rs4422908, rs5917471 und rs12848910 gebildet wurden, ergab sich jedoch ein Zusammenhang: H1 war mit einer erniedrigten und H3 mit einer erhöhten Aktivität der NAD(P)H-Oxidase assoziiert. Unterschiede zwischen den beiden Haplotypen sind auf die zwei Polymorphismen rs4422908 und rs5917471 zurückzuführen. In H3 waren jeweils die Varianten-Allele der SNPs enthalten, welche in den Einzelanalysen ebenfalls zu einer erhöhten ROS-Produktion führten. Da in die exploratorische Gruppe nur männliche Probanden eingeschlossen wurden, konnten hier nur die Effekte eines Allels untersucht werden. Im Gegensatz dazu konnten in der Bestätigungsstudie, an der auch weibliche Probanden teilgenommen hatten, auch Effekte homo- und heterozygoter Allelträger beobachtet werden. Während für den Polymorphismus rs4422908 ein Alleldosis-Effekt festgestellt werden konnte, ergab sich für den

SNP rs5917471 eine erhöhte Enzymaktivität nur für die homozygoten Variantenträger. Insgesamt waren die Effekte der Einzelvarianten hier nicht statistisch signifikant.

Aus der exploratorischen Probandenstudie lag auch RNA aus Gesamtblut vor. Da es sich hier ausschließlich um männliche Personen handelte, konnten nur die Effekte von Allelen eines X-Chromosoms untersucht werden. Interessanterweise bewirkte der H3-Haplotyp neben einer gesteigerten Enzymaktivität ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Genexpression. Bei Betrachtung der vier Einzelvarianten des Haplotyps war nur der SNP rs4422908 statistisch signifikant mit einer gesteigerten Genexpression assoziiert. Dabei führte das Varianten-Allel zu einer erhöhten Genexpression. Das Varianten-Allel des Polymorphismus rs5917471 führte ebenfalls tendenziell zu einer erhöhten CYBB-Genexpression. Durch diese Ergebnisse könnten die beobachteten Effekte auf Enzyzebene erklärt werden: Als Folge der erhöhten Genexpression durch die Varianten-Allele lagen mehr gp91^{phox}-Proteine vor, was in Konsequenz zu einer erhöhten Menge an reaktiven Sauerstoffverbindungen führte.

Möglicherweise beruhen die Effekte des Haplotyps auf beiden als potenziell funktionell identifizierten CYBB-Polymorphismen. Diese könnten sich in ihrer Wirkung verstärken. Interessanterweise führte das homozygote, funktionell stärkere Varianten-Allel des Polymorphismus rs5917471 im Vergleich zum hetero- bzw. homozygoten Wildtyp-Allel zu einer signifikant erhöhten Empfindlichkeit von PBMCs gegenüber dem Zytostatikum Doxorubicin. Dies würde dafür sprechen, dass reaktive Sauerstoffspezies die Wirkung von Doxorubicin verstärken. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen Zusammenhang zwischen CYBB-Genvarianten und der Enzymaktivität bzw. Genexpression hin. Über die Erstellung von Haplotypen gelang die Identifizierung potenziell relevanter SNPs. Ein deutlicherer Effekt wäre vielleicht mit einer größeren Anzahl weiblicher Probanden mit zwei X-Chromosomen zu sehen gewesen. In der Literatur wurden die beiden CYBB-Varianten rs4422908 und rs5917471 bisher kaum beschrieben. Nur der Polymorphismus rs4422908 wurde einmal im Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis untersucht (Olsson et al., 2007). Assoziationen mit dieser Erkrankung konnten allerdings nicht beobachtet werden.

5.5 SNPs in den Untereinheiten NCF1 und NCF2

5.5.1 NCF1

Eine Analyse des NCF1-Gens konnte leider nicht durchgeführt werden. Durch die Existenz von zwei Pseudogenen (NCF1B, NCF1C) war die Generierung sequenzspezifischer Primer mit unseren Möglichkeiten nicht umsetzbar. Eine Sequenzierung des Gens war aus diesem Grund ebenfalls nicht möglich. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass Polymorphismen dieses Gens die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase beeinflussen können. In der Literatur wurden Zusammenhänge zwischen NCF1-SNPs und funktionellen oder klinischen Phänotypen bislang nicht beschrieben. Beim Williams-Beuren-Syndrom liegt eine größere Deletion in Chromosom 7 vor, die häufig auch das NCF1-Gen betrifft (Del Campo et al., 2006). Die daraus resultierende verminderte ROS-Produktion könnte eine Erklärung für das verminderte Risiko dieser Patienten sein, Bluthochdruck zu entwickeln. Analysen des NCF1/Pseudogen-Verhältnisses in einer Fall-Kontroll-Studie von Lee et al., 2006, ergaben keinen Zusammenhang mit einer Entstehung von Lungenerkrankungen.

5.5.2 NCF2

Genvarianten des NCF2-Gens, welches die zytosolische Untereinheit p67^{phox} kodiert, zeigten weder eine Assoziation mit der Enzymaktivität noch mit der NCF2-Genexpression. So war auch der durch Olsson et al., 2007, untersuchte Polymorphismus rs789181, der in der schwedischen Fall-Kontroll-Studie eine Assoziation mit rheumatoider Arthritis gezeigt hatte, in der Analyse unauffällig.

5.6 SNPs in der Untereinheit NCF4

Das Protein p40^{phox}, kodiert durch NCF4, erfüllt die Aufgabe, die zytosolischen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p67^{phox} und p47^{phox} zum membranständigen Flavocytochrom *b₅₅₈* zu transportieren. Da Mutationen des NCF4-Gens nicht zur Entstehung einer chronischen Granulomatose führen, wurde lange Zeit vermutet, dass p40^{phox} nicht essentiell zur Aktivierung des Enzymkomplexes benötigt wird. Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass das Protein die phagozytäre NAD(P)H-Oxidase sowohl aktivieren (Tsunawaki et al., 1996) als auch inhibieren kann (Sathyamoorthy et al., 1997). In einer aktuelleren Arbeit wird vermutet, dass das Protein durch gerichtete Rekrutierung der zytosolischen Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox} gezielt die Enzymaktivität in Endosomen oder an der Plasmamembran steuern kann (Ueyama et al., 2007). Unsere Ergebnisse lassen ebenfalls

vermuten, dass die p40^{phox}-Untereinheit eine wichtige Komponente der phagozytären NAD(P)H-Oxidase ist, deren Einfluss auf die Enzymfunktion nicht unterschätzt werden sollte.

5.6.1 SNP rs1883113

Die Untersuchung der NCF4-Polymorphismen ergab, dass der Promotor-SNP rs1883113 mit $p < 0,05$ mit der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität assoziiert war. Wegen der Seltenheit dieses SNPs waren in der Stichprobe keine homozygoten Varianten-Allelträger enthalten. Auf die Genexpression von NCF4 wirkte sich dieser SNP jedoch nicht aus, weder in Gesamtblut noch in PBMCs. Der fehlende Zusammenhang mit der Expression lässt eine Beziehung des Promotor-SNPs zur Enzymaktivität fragwürdig erscheinen. SNPs in Promotorregionen können die Bindungseffizienz wichtiger regulierender Proteine der Transkriptionsmaschinerie beeinflussen und dadurch die Genexpression beeinträchtigen. Inwiefern dies hier der Fall ist, bleibt zunächst ungeklärt.

5.6.2 SNP rs10854694

Der Polymorphismus rs10854694 ist ebenfalls im Promotorbereich dieses Gens lokalisiert. Es zeigte sich ein Trend ($p = 0,06$) für eine Assoziation mit der Aktivitätsmessung. Auf die Genexpression zeigte dieser SNP jedoch keinen Einfluss.

Interessanterweise weist der SNP rs10854694 ein hohes Kopplungsungleichgewicht mit der durch Wojnowski et al., 2005, beschriebenen Promotorvariante rs1883112 auf ($r^2 = 94$) mit Bezug zu einer chronischen Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität. Im Vergleich zu rs1883112 war die Assoziation von rs10854694 mit einer chronischen Kardiomyopathie unter Doxorubicin-Therapie sogar stärker ausgeprägt. Zudem zeigte sich ein weiterer Zusammenhang mit der Entwicklung einer Doxorubicin-unabhängigen hypertrophen Kardiomyopathie. Diese Ergebnisse lassen rs10854694 als eine klinisch möglicherweise wichtige Variante erscheinen, und auch die Enzymaktivität könnte durch diesen SNP moduliert werden. Auf welchen Mechanismen dies beruht, bleibt noch unklar. Naheliegender wäre eine Veränderung der Promotor-Aktivität. An RNA-Isolaten aus Zellen mit diversem genetischen Hintergrund (Gesamtblut) konnte ein solcher Zusammenhang nicht gesehen werden. Zur weiteren Klärung könnten Reporter-Gen-Assays mit Konstrukten entsprechend den Genotypausprägungen dieser Variante durchgeführt werden. Oxidativer Stress kann – wie bereits erwähnt – sowohl die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen begünstigen (Cave et al., 2006) als auch die zellschädigenden Eigenschaften von Doxorubicin

verstärken (Mordente et al., 2001). Es erscheint daher durchaus plausibel, dass das mit einer erhöhten ROS-Produktion assoziierte Allel von rs10854694 auch ein höheres Risiko für Kardiomyopathien darstellt. Allerdings sind diese Befunde noch mit Zweifeln behaftet, da nicht alle Daten eine eindeutige Hypothese stützen. Es erscheint jedoch gerechtfertigt, diesen interessanten Ergebnissen weiter nachzugehen.

5.6.3 Weitere möglicherweise funktionelle SNPs in NCF4

Der Polymorphismus rs4821544 in Intron 1 von NCF4 zeigte bei den Funktionsmessungen nur eine Assoziation mit der Genexpression in PBMCs. Obwohl das Varianten-Allel zu reduzierten NCF4-Transkriptmengen führte, war keine Veränderung der ROS-Produktion zu beobachten. Nach den Studien von Rioux et al., 2007, ist dieser Polymorphismus mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn assoziiert. Als Erklärung vermuten Rioux et al., 2007, eine mögliche Abschwächung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität. Durch die ineffiziente Immunabwehr können körperfremde Organismen nicht vollständig beseitigt werden und verursachen dadurch einen chronischen Entzündungsprozess. In unserem experimentellen Design ließ sich die Theorie einer verminderten ROS-Bildung in Abhängigkeit von dieser Variante nicht bestätigen. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass die Funktionsmessungen an Zellen gesunder Menschen durchgeführt wurden.

Weitere NCF4-SNPs zeigten zwar in PBMCs einen Effekt auf die Genexpression, nicht aber in Gesamtblut. Ebenso war kein Zusammenhang mit der Enzymaktivität oder klinischen Phänotypen der Herzinsuffizienz zu erkennen. Der Intron 7-Polymorphismus rs3788524, der nach unseren Untersuchungen ebenfalls nur mit der Genexpression assoziiert war, befand sich jedoch im Kopplungsungleichgewicht mit der Intron 4-Variante rs729749. Letztere war in der Fall-Kontroll-Studie von Olsson et al., 2007, statistisch signifikant mit rheumatoider Arthritis assoziiert. Hinweise auf eine Lokalisation dieses SNPs in einer regulatorischen Sequenz konnten allerdings nicht gefunden werden.

Für eine NCF4-Variante in der 3'-Region dieses Gens, rs8137602, ergaben sich Zusammenhänge mit der Doxorubicin-Empfindlichkeit von PBMCs. Das relativ seltene Varianten-Allel des Polymorphismus scheint ein Schutz gegenüber einer Doxorubicin-induzierten Apoptose zu sein. In der statistischen Analyse der Funktionsmessungen zeigte dieser Polymorphismus keine signifikanten Assoziationen, wobei es keine homozygoten Variantenträger gab. Es wurde jedoch ein Trend ($p = 0,1$) für eine gesteigerte ROS-

Produktion in Granulozyten heterozygoter Personen verglichen mit homozygoten Wildtyp-Trägern beobachtet. Dies steht allerdings im Widerspruch zu der Annahme, dass erhöhter oxidativer Stress die Doxorubicin-induzierte Apoptose begünstigt, wie oben bei CYBB-Polymorphismen diskutiert (5.4).

Die Ergebnisse dieser Dissertation lassen den SNP rs10854694 als den medizinisch bedeutsamsten der untersuchten NCF4-Genpolymorphismen erscheinen, zumindest in Bezug auf das Risiko für Kardiomyopathien. Dieser Hypothese sollte in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

5.7 SNPs in der Untereinheit RAC2

Das kleine GTP-bindende Protein Rac2 ist ausschließlich in neutrophilen Granulozyten an der Aktivierung der Nox2 beteiligt (Hordijk, 2006). Obwohl die Proteine Rac1 und Rac2 zu 92 % identisch sind, bindet Rac2 6mal stärker an die p67^{phox}-Untereinheit und ist daher effektiver in der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase. Zur Analyse funktioneller Zusammenhänge wurden zehn SNPs des RAC2-Gens ausgewählt. Von diesen zehn RAC2-Varianten waren vier in der Studie von Olsson et al., 2007, auf Assoziationen mit rheumatoider Arthritis untersucht worden. Dabei war der SNP rs1476002 in Intron 2 mit dem Phänotyp rheumatoide Arthritis assoziiert. In unseren Untersuchungen ergaben sich für diesen Polymorphismus weder Zusammenhänge mit der Enzymaktivität noch mit der Genexpression. Für den von Olsson et al., 2007, berichteten Befund kommen auch andere Effekte von Rac2 unabhängig von der NAD(P)H-Oxidase in Frage, z. B. eine Induktion der Genexpression von Interferon-gamma (Li et al., 2000). Dabei handelt es sich um ein Zytokin, welches bei unkontrollierter Expression die Entstehung von inflammatorischen Autoimmunerkrankungen bewirken kann (Clutter et al., 2009). Außerdem ergaben unsere Analysen Zusammenhänge zwischen dem Varianten-Allel des rs1476002-SNPs und dem Risiko für eine nicht-Doxorubicin-induzierte hypertrophe Kardiomyopathie. In Doxorubicin-exponierten PBMCs bewirkt das Varianten-Allel dieses SNPs eine gesteigerte Apoptose-Rate. Diese Beobachtungen sind höchstwahrscheinlich auf die Zellpopulation der Lymphozyten zurückzuführen, da Monozyten hauptsächlich Rac1-Proteine enthalten (Zhao et al., 2003). In Lymphozyten scheint eher Rac2 eine Rolle zu spielen (Arana et al., 2008).

Im gleichen Intron-Bereich befindet sich außerdem der RAC2-Polymorphismus rs13058338, für dessen Varianten-Allel ein Bezug zur frühen Kardiotoxizität von

Doxorubicin berichtet wurde (Wojnowski et al., 2005). Diese Form ist für sich genommen klinisch meist harmlos, stellt aber eine Risikokonstellation für die schwerwiegende chronische Kardiomyopathie dar.

In nicht-phagozytären Zellen wie beispielsweise Endothel- oder Herzmuskelzellen liegen oftmals mehrere Nox-Isoformen nebeneinander vor, die nur teilweise durch Rac2 aktiviert werden. Außerdem ist die Interaktion von Rac2 nicht auf NAD(P)H-Oxidasen beschränkt (Hordijk, 2006). Daher können die beobachteten Effekte der RAC2-Varianten auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz auch auf Wechselwirkungen mit anderen Nox-Isoformen zurückzuführen oder auch unabhängig von NAD(P)H-Oxidasen sein.

5.8 NAD(P)H-Oxidase und Herzinsuffizienz

Die Entstehung einer Herzinsuffizienz ist ein multifaktoriell bedingter Prozess und entwickelt sich meist im Zeitraum mehrerer Jahre. Häufigste Ursachen für die verminderte Leistungsfähigkeit des Myokards sind die koronare Herzkrankheit und Bluthochdruck, wenngleich auch alle anderen kardialen und einige extrakardiale Erkrankungen zu einer Herzinsuffizienz führen können. In den letzten 20 Jahren wurde beobachtet, dass erhöhter oxidativer Stress sowohl die Entstehung als auch die Ausprägung der meisten Formen der Herzinsuffizienz beeinflusst (Giordano, 1988). Beispielsweise konnte an Kardiomyozyten-Kulturen gezeigt werden, dass intrazelluläre ROS Mechanismen in Gang setzen, die zu einer Hypertrophie der Zellen führen können (Cave et al., 2006). Eine der Hauptquellen für reaktive Sauerstoffspezies sind NAD(P)H-Oxidasen, die sowohl in allen Zelltypen des Herzens als auch den Gefäßmuskelzellen der Blutgefäße vorkommen (Seddon et al., 2007). Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen wurden daher Genpolymorphismen der NAD(P)H-Oxidase schon häufig untersucht. Die Analysen beschränkten sich bisher jedoch hauptsächlich auf Genvarianten der p22^{phox}-Untereinheit (Soccio et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Studien sind teilweise widersprüchlich und lassen bis jetzt keine eindeutige Aussage über die Relevanz der SNPs zu. In diesem Zusammenhang sollte allerdings beachtet werden, dass die Untersuchungen teilweise an unterschiedlichen ethnischen Gruppen durchgeführt wurden. Zwischen diesen kann das LD einer genomischen Region erheblich variieren. Eine Erklärung für die diskrepanten Befunde könnte hier sein, dass nicht die eigentlich funktionelle Variante genotypisiert wurde, sondern eine andere, die sich in variablem LD mit dieser befindet.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass Genvarianten in Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase mögliche Risikofaktoren für die Entstehung einer Herzinsuffizienz darstellen. So konnten insgesamt drei SNPs der Untereinheiten p22^{phox}, p40^{phox} und Rac2 identifiziert werden, die mit der Entstehung einer hypertrophen Kardiomyopathie in Zusammenhang stehen (rs4673, rs10854694 und rs1476002). Expressionsdatenbanken zufolge (<http://genome.brc.mcw.edu>) sind diese drei Proteine im Herz deutlich exprimiert. Während das Varianten-Allel des NCF4-Polymorphismus rs10854694 zu einer gesteigerten Enzymaktivität von Granulozyten führte, verursachten die SNPs CYBA 242C>T und RAC2 rs1476002 keine erhöhte ROS-Produktion. Da p22^{phox} mit den Nox-Isoformen 1-4 interagieren kann, ist es durchaus vorstellbar, dass der Effekt dieses SNPs nur in Verbindung mit einer anderen katalytischen Untereinheit gemessen werden kann. Ebenso kann das Rac2-Protein wie bereits unter 5.7 beschrieben neben der Aktivierung der Nox2 auch andere zelluläre Prozesse steuern. Ohnehin waren die Relativen Risiken (RR) für Assoziationen der beiden SNPs in p22^{phox} und Rac2 mit den kardiologischen Phänotypen nur sehr gering erhöht. Bei der NCF4-Variante rs10854694 hingegen war ein RR von etwa 2,4 bei der Doxorubicin-induzierten Form und von 1,9 bei der hypertroph-obstruktiven Form der Herzinsuffizienz zu verzeichnen. Die molekular-biologischen Hintergründe dieser Befunde sind noch unklar, da sich ein direkter Effekt dieses Promotor-SNPs auf die Genexpression von NCF4 in Gesamtblut und PBMCs nicht nachweisen ließ.

5.9 NAD(P)H-Oxidase und Doxorubicin

Eine Theorie über die Wirkmechanismen des Zytostatikums Doxorubicin besagt, dass durch die Generierung von ROS die Apoptose von Zellen induziert wird (Bellarosa et al., 2001). Eine gesteigerte ROS-Produktion durch NAD(P)H-Oxidasen sollte diese Effekte folglich verstärken.

Eine limitierende Nebenwirkung des Anthrazyklins Doxorubicin ist seine Kardiotoxizität. Die akute Toxizität, die sich während der Therapie hauptsächlich durch Herzrhythmusstörungen bemerkbar macht, ist nur vorübergehend und verschwindet in der Regel zügig nach Abschluss der Therapie. Hingegen äußert sich die chronische Toxizität manchmal erst Monate bis Jahre später in Form einer schweren irreversiblen Herzinsuffizienz, an der die Patienten dann versterben. Die zytostatischen Eigenschaften des Doxorubicins werden durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen. Als eine Hauptursache für den akuten kardiotoxischen Effekt wird die Bildung freier Radikale durch das Doxorubicin

angenommen, die nachfolgend mit einem Eisen-katalysierten Redoxcycling einhergeht (Mordente et al., 2001). Die Defizienz für Katalase macht Kardiomyozyten in besonderer Weise empfindlich gegenüber oxidativem Stress. Somit könnten die Superoxid-generierenden NAD(P)H-Oxidasen den beschriebenen Doxorubicin-Effekt verstärken.

Tatsächlich ergaben unsere Analysen, dass jeweils die Varianten-Allele der SNPs CYBA 242C>T und RAC2 rs13058338 mit der Entstehung einer akuten Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität in Zusammenhang stehen. Wie bereits in den Abschnitten 5.7 und 5.8 erwähnt, müssen diese Effekte nicht zwingend Nox2-spezifisch sein.

Der Entwicklung einer chronischen Doxorubicin-bedingten Kardiotoxizität liegen wahrscheinlich mehrere Mechanismen zu Grunde. Neben der ROS-Produktion beschreiben Olson and Mushlin, 1990, dass der Doxorubicin-Metabolit Doxorubicinol im Herzgewebe zu einer Beeinträchtigung der Kontraktilität bzw. Relaxation des Herzmuskels führt. Weiterhin konnten Peters et al., 1981, an Ratten beobachten, dass sich dieser Metabolit bevorzugt im Herzgewebe anreichert. In menschlichen Kardiomyozyten wird die Reduktion des Doxorubicins zu Doxorubicinol vermutlich durch zytosolische Aldo-Keto-Reduktasen katalysiert (Minotti et al., 2000). Obwohl Doxorubicinol ein redox-inaktives Molekül ist, kann es Enzyme des sarkoplasmatischen Retikulums und mitochondriale Protonenpumpen hemmen, ebenso wie Na⁺/Ca²⁺-Kanäle des Sarkolemms (Boucek et al., 1987, Olson et al., 1988).

Die relativ starke Assoziation von rs10854694 im Promotorbereich von NCF4 mit der chronischen Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität legt die Vermutung nahe, dass das regulatorische Protein p40^{phox} bei der Entwicklung dieser gravierenden Nebenwirkung bedeutsam sein könnte. Die ebenfalls aufgezeigte, wenngleich weniger starke Assoziation mit Herzinsuffizienz ohne Beteiligung von Doxorubicin könnte darauf hinweisen, dass diese Variante einen allgemeinen Risikofaktor darstellt. Die zusätzliche Exposition mit dem erwiesenen kardiotoxischen Doxorubicin könnte diesen Effekt verstärken. Auf welche Weise dies geschieht und wie dem eventuell vorgebeugt werden kann, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Vielleicht wird der Übergang von einer akuten in eine chronische Form der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität vom SNP rs10854694 beeinflusst.

5.10 Ausblick

Die interessantesten Befunde wurden zu den beiden Polymorphismen CYBA 640A>G und NCF4 rs10854694 sowie zu einem Haplotyp in CYBB erhoben. Weitere Untersuchungen sollten sich vorrangig auf eine Bestätigung dieser Ergebnisse und eine Klärung der zu Grunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen konzentrieren.

Die Analyse der CYBB-Genvarianten lieferte Hinweise auf zwei möglicherweise funktionell bedeutsame SNPs. Da das Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, sollte eine Studie mit einer größeren Zahl weiblicher Probanden durchgeführt werden, um auch die Effekte der homozygoten Allele überprüfen zu können.

Zur Untersuchung der allelspezifischen Effekte des CYBA 640A>G-Polymorphismus bedarf es einer weiteren Optimierung der Enzymaktivitätsmessungen. Es bleibt außerdem zu untersuchen, ob die HeLa-Zellen ein effizientes Zellsystem zur Untersuchung dieses SNPs darstellen. Abgesehen von der Überprüfung der allelspezifischen ROS-Produktion nach Überexpression des CYBA-Gens sollte experimentell geklärt werden, ob die microRNA miR-663 tatsächlich in der Sequenzumgebung des SNPs bindet. Dazu muss der 3'-Bereich des CYBA-Gens in ein Reporter-Vektorsystem kloniert werden, welches ein Luciferase-Gen enthält. Sofern das Modellsystem die microRNA nicht endogen exprimiert, muss die microRNA künstlich dazugegeben werden. Anhand der Signalstärke des Reporters lässt sich anschließend der allelspezifische Abbau der Zielsequenz nachweisen. Mit diesen Konstrukten sollte auch untersucht werden, ob es allelspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Doxorubicin gibt, und zwar in Bezug auf die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase als auch auf die Induktion von Apoptose. In diesem Zusammenhang könnten auch weitere Zytostatika (insbesondere des CHOP-Schemas) getestet werden.

Die Assoziation des CYBA 640A>G-Varianten-Allels mit einem schlechteren Ansprechen der CHO(E)P-Therapie lässt zwar vermuten, dass der Effekt auf die abgeschwächte Wirkung des Doxorubicins zurückzuführen sein könnte, jedoch besteht an dieser Stelle noch weiterer Klärungsbedarf. Falls sich diese Annahme in weiteren Studien bestätigen ließe, wäre der SNP ein wichtiger Marker zur Beurteilung des Behandlungserfolgs einer CHO(E)P-Chemotherapie. Durch eine Genotypisierung der Patienten könnte somit der Therapieerfolg bereits im Vorfeld abgeschätzt und gegebenenfalls zum Vorteil des Patienten modifiziert werden.

In ähnlicher Weise wäre auch die Identifizierung von Risiko-Allelen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ein großer Fortschritt. Besonders bei durch Medikamente hervorgerufenen Formen wie der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie könnten dadurch schwerste Nebenwirkungen durch alternative Therapien vermieden werden. Die Suche nach Genvarianten, die Einfluss auf die Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität nehmen, identifizierte einen NCF4-Promotor-SNP, der stärkere Assoziationen zeigte als der durch Wojnowski et al. (2005) publizierte NCF4-SNP. Zur Klärung der funktionellen Zusammenhänge sollte die Sequenzumgebung dieses SNPs nach Zielsequenzen für Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Eine Validierung dieses SNPs sollte in aktuell laufenden Studien mit Doxorubicin-haltigen Chemotherapie-Regimen erfolgen.

Im Falle einer erfolgreichen Bestätigung der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothesen für die SNPs CYBA 640A>G und NCF4 rs10854694 könnten die Ergebnisse zur Entwicklung einer individuellen Therapie-Optimierung bei Anwendung des CHO(E)P-Schemas beitragen. Der SNP CYBA 640A>G könnte einen Indikator für den Therapieerfolg darstellen, während der SNP NCF4 rs10854694 das Risiko der Entwicklung einer irreparablen Herzinsuffizienz anzeigen könnte.

6 Zusammenfassung

Die Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität ist eine schwere Nebenwirkung bei der Therapie maligner Tumore und Leukämien. Bis zu 6 % der Patienten entwickeln unter Beachtung der empfohlenen Dosisobergrenze nach der Therapie eine schwere irreversible Herzinsuffizienz. Das variable Auftreten dieser Nebenwirkung lässt vermuten, dass die Entwicklung durch genetische Komponenten beeinflusst wird. Wichtige Wirkungen und Nebenwirkungen des Doxorubicins werden über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt. Daher könnten Varianten in Genen, welche in Zusammenhang mit der Bildung und Detoxifikation von ROS stehen, bei der Therapie mit Doxorubicin eine wichtige Rolle spielen. Für drei Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in Untereinheiten der phagozytären NAD(P)H-Oxidase wurde eine Assoziation mit der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität beschrieben. Das multimere Enzym NAD(P)H-Oxidase produziert Superoxid, welches zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen gehört. Die phagozytäre NAD(P)H-Oxidase setzt sich aus membranständigen (Genname CYBB und CYBA) und zytosolischen Untereinheiten (NCF1, NCF2, NCF4, RAC2) zusammen.

Ausgehend von den in klinischen Studien assoziierten Genvarianten sollte in dieser Dissertation die Bedeutung der genetischen Variabilität der phagozytären NAD(P)H-Oxidase umfassend dargestellt werden. Dies sollte in Bezug zu funktionellen Messungen und zu klinischen Daten von Patienten mit Doxorubicin-haltiger Chemotherapie erfolgen. Biologisch bzw. medizinisch als relevant identifizierte Genvarianten sollten in ihrer molekularen Wirkweise weiter untersucht werden.

Als funktionelle Parameter der phagozytären NAD(P)H-Oxidase wurden sowohl die Enzymaktivität (Phorbol-ester-stimuliert in Granulozyten) gemessen als auch die Genexpression als mRNA (in Gesamtblut und PBMCs) und Protein (in Granulozyten). Dazu wurden eine explorative (n = 81) und eine konfirmatorische Studie (n = 51) mit Leukozyten gesunder Probanden durchgeführt. In einer dritten Probandenstudie (n = 142) wurde die Doxorubicin-induzierte Apoptose in PBMCs gesunder Spender bestimmt. Klinische Daten lagen von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen vor, welche nach dem Doxorubicin-haltigen CHO(E)P-Protokoll therapiert wurden (n = 881). Dabei wurden als relevante Parameter das Gesamtüberleben und das ereignisfreie Überleben sowie als Nebenwirkung die Kardiotoxizität erhoben. Außerdem waren Daten von Herzinsuffizienz-Patienten ohne Doxorubicin-Exposition verfügbar. Die funktionellen und klinischen Daten wurden mit insgesamt 53 SNPs in fünf Untereinheiten der phagozytären NAD(P)H-

Oxidase in Beziehung gesetzt. Diese SNPs wurden so ausgewählt, dass sie repräsentativ für die gesamte genetische Variabilität der betrachteten Untereinheiten waren (so genannte *tagging* SNPs). Für eine als bedeutsam identifizierte Variante in der untranslatierten 3'-Region des CYBA-Gens wurden die molekularbiologischen Effekte vertiefend untersucht: mittels Bestimmung allelabhängiger Transkriptmengen der CYBA-mRNA, durch Analyse allelspezifischer Transkript-Stabilitäten und mit funktionellen Messungen nach gezielter Überexpression eines Allels.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte die funktionelle Bedeutung einer CYBA-Genvariante gezeigt werden. Das G-Allel des SNPs CYBA 640A>G war mit einer statistisch signifikant erniedrigten Enzymaktivität und Genexpression auf Transkript- und Proteinebene assoziiert. Versuche zur Transkriptstabilität an homozygoten LCL-Zelllinien ergaben, dass die Transkripte des Varianten-Allels schneller abgebaut werden. In 31 von 32 heterozygoten Zelllinien waren Transkripte mit dem G-Allel unterrepräsentiert. Bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen und CHO(E)P-Therapie fand sich für den GG-Genotyp eine schlechtere Prognose bezüglich ereignisfreien Überlebens (Risikoverhältnis 1,72; Konfidenzintervall 1,30-2,26; $p < 0,001$) und Gesamtüberleben (1,59, 1,14-2,21; $p = 0,03$) in Relation zum AA-Genotyp.

Für die drei SNPs, welche mit der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität beschrieben wurden und als Basis für diese Dissertation dienten, konnte keine Funktionalität nachgewiesen werden. Durch die umfassendere genetische Feinkartierung konnte jedoch ein SNP in der Promotorregion von NCF4 identifiziert werden, der noch stärker als zuvor beobachtet mit der chronischen Doxorubicin-vermittelten Kardiomyopathie assoziiert war. Diese Genvariante ging auch mit einem erhöhten Risiko für eine nicht durch Doxorubicin vermittelte Herzinsuffizienz einher. Ein SNP im RAC2-Gen und einer in CYBB bewirkten eine erhöhte Doxorubicin-Empfindlichkeit in PBMCs. Letzterer zeigte auch eine tendenziell erhöhte Enzymaktivität.

Mit dieser Dissertation konnte die funktionelle und klinische Bedeutung von SNPs der phagozytären NAD(P)H-Oxidase weiter aufgeklärt werden. Den wichtigsten Befund stellt die auf fünf funktionellen Ebenen und klinisch nachgewiesene Bedeutung des CYBA-SNPs 640A>G dar, demzufolge das G-Allel als hypofunktionell anzusehen ist. Bei weiterer molekularer und klinischer Bestätigung dieses Befundes könnte abhängig von dieser Genvariante zukünftig die Therapie individuell optimiert werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C.G. and Segal, A.W.: Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353 (1991) 668-70.
- Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D. and Sumimoto, H.: Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 4474-9.
- Allen, R.C.: Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* 133 (1986) 449-93.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M.: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 7915-22.
- Arana, E., Vehlou, A., Harwood, N.E., Vigorito, E., Henderson, R., Turner, M., Tybulewicz, V.L. and Batista, F.D.: Activation of the small GTPase Rac2 via the B cell receptor regulates B cell adhesion and immunological-synapse formation. *Immunity* 28 (2008) 88-99.
- Arcamone, F., Franceschi, G., Penco, S. and Selva, A.: Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic. *Tetrahedron Lett* 13 (1969) 1007-10.
- Bartel, D.P.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2004) 281-97.
- Bedard, K. and Krause, K.H.: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87 (2007) 245-313.
- Bellarosa, D., Ciucci, A., Bullo, A., Nardelli, F., Manzini, S., Maggi, C.A. and Goso, C.: Apoptotic events in a human ovarian cancer cell line exposed to anthracyclines. *J Pharmacol Exp Ther* 296 (2001) 276-83.
- Binaschi, M., Bigioni, M., Cipollone, A., Rossi, C., Goso, C., Maggi, C.A., Capranico, G. and Animati, F.: Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 1 (2001) 113-30.
- Boucek, R.J., Jr., Olson, R.D., Brenner, D.E., Ogunbunmi, E.M., Inui, M. and Fleischer, S.: The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. *J Biol Chem* 262 (1987) 15851-6.
- Boveris, A. and Chance, B.: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134 (1973) 707-16.
- Cave, A.C., Brewer, A.C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D.J., Walker, S. and Shah, A.M.: NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 8 (2006) 691-728.
- Clutter, S.D., Wilson, D.C., Marinov, A.D. and Hirsch, R.: Follistatin-like protein 1 promotes arthritis by up-regulating IFN-gamma. *J Immunol* 182 (2009) 234-9.
- Cross, A.R., Erickson, R.W. and Curnutte, J.T.: The mechanism of activation of NADPH oxidase in the cell-free system: the activation process is primarily catalytic and not through the formation of a stoichiometric complex. *Biochem J* 341 (Pt 2) (1999) 251-5.
- Cummins, J.M., He, Y., Leary, R.J., Pagliarini, R., Diaz, L.A., Jr., Sjoblom, T., Barad, O., Bentwich, Z., Szafranska, A.E., Labourier, E., Raymond, C.K., Roberts, B.S., Juhl, H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Velculescu, V.E.: The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 3687-92.
- Dahan, I., Issaeva, I., Gorzalczany, Y., Sigal, N., Hirshberg, M. and Pick, E.: Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559)

- participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". *J Biol Chem* 277 (2002) 8421-32.
- Daiber, A., August, M., Baldus, S., Wendt, M., Oelze, M., Sydow, K., Kleschyov, A.L. and Munzel, T.: Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radic Biol Med* 36 (2004) 101-11.
- de Boer, M., de Klein, A., Hossle, J.P., Seger, R., Corbeel, L., Weening, R.S. and Roos, D.: Cytochrome b558-negative, autosomal recessive chronic granulomatous disease: two new mutations in the cytochrome b558 light chain of the NADPH oxidase (p22-phox). *Am J Hum Genet* 51 (1992) 1127-35.
- de Mendez, I., Homayounpour, N. and Leto, T.L.: Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 2177-85.
- Del Campo, M., Antonell, A., Magano, L.F., Munoz, F.J., Flores, R., Bayes, M. and Perez Jurado, L.A.: Hemizygoty at the NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension. *Am J Hum Genet* 78 (2006) 533-42.
- DeLeo, F.R., Burritt, J.B., Yu, L., Jesaitis, A.J., Dinauer, M.C. and Nauseef, W.M.: Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* 275 (2000) 13986-93.
- Dinauer, M.C., Pierce, E.A., Bruns, G.A., Curnutte, J.T. and Orkin, S.H.: Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 86 (1990) 1729-37.
- Djordjevic, T., Pogrebniak, A., BelAiba, R.S., Bonello, S., Wotzlaw, C., Acker, H., Hess, J. and Gorch, A.: The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 38 (2005) 616-30.
- Doi, K., Noiri, E., Nakao, A., Fujita, T., Kobayashi, S. and Tokunaga, K.: Haplotype analysis of NAD(P)H oxidase p22 phox polymorphisms in end-stage renal disease. *J Hum Genet* 50 (2005) 641-7.
- Doroshov, J.H.: Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res* 43 (1983) 4543-51.
- Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C. and Marks, D.S.: MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 5 (2003) R1.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11 (1991) 81-128.
- Fagerholm, R., Hofstetter, B., Tommiska, J., Aaltonen, K., Vrtel, R., Syrjakoski, K., Kallioniemi, A., Kilpivaara, O., Mannermaa, A., Kosma, V.M., Uusitupa, M., Eskelinen, M., Kataja, V., Aittomaki, K., von Smitten, K., Heikkila, P., Lukas, J., Holli, K., Bartkova, J., Blomqvist, C., Bartek, J. and Nevanlinna, H.: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet* 40 (2008) 844-53.
- Fang, J., Nakamura, H. and Iyer, A.K.: Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target* 15 (2007) 475-86.
- Gardemann, A., Mages, P., Katz, N., Tillmanns, H. and Haberbosch, W.: The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 145 (1999) 315-23.
- Gewirtz, D.A.: A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57 (1999) 727-41.

- Giordano, A.: [Peripheral and central factors responsible for different patterns of heart failure]. *G Ital Cardiol* 18 (1988) 1046-51.
- Gosslau, A. and Rensing, L.: [Oxidative stress, age-dependent [correction of age-related] cell damage and antioxidative mechanisms]. *Z Gerontol Geriatr* 35 (2002) 139-50.
- Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P. and Bartel, D.P.: MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27 (2007) 91-105.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219 (1984) 1-14.
- Harman, D.: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11 (1956) 298-300.
- Heyworth, P.G., Cross, A.R. and Curnutte, J.T.: Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* 15 (2003) 578-84.
- Hidalgo, C., Bull, R., Behrens, M.I. and Donoso, P.: Redox regulation of RyR-mediated Ca²⁺ release in muscle and neurons. *Biol Res* 37 (2004) 539-52.
- Hordijk, P.L.: Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res* 98 (2006) 453-62.
- Hunter, T.: Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100 (2000) 113-27.
- Inoue, N., Kawashima, S., Kanazawa, K., Yamada, S., Akita, H. and Yokoyama, M.: Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation* 97 (1998) 135-7.
- Ivanov, V.P., Solodilova, M.A., Polonikov, A.V., Khoroshaia, I.V., Kozhukhov, M.A. and Panfilov, V.I.: [Association of C242T and A640G polymorphisms in the gene for p22phox subunit of NADPH oxidase with the risk of bronchial asthma: a pilot study]. *Genetika* 44 (2008) 693-701.
- Izakovicova Holla, L., Kankova, K. and Znojil, V.: Haplotype analysis of the NADPH oxidase p22 phox gene in patients with bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 148 (2009) 73-80.
- Jung, O., Schreiber, J.G., Geiger, H., Pedrazzini, T., Busse, R. and Brandes, R.P.: gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 109 (2004) 1795-801.
- Kanai, F., Liu, H., Field, S.J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G.E., Cantley, L.C. and Yaffe, M.B.: The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* 3 (2001) 675-8.
- Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Evans, T., Curnutte, J.T. and Bokoch, G.M.: Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254 (1991) 1512-5.
- Koga, H., Terasawa, H., Nunoi, H., Takeshige, K., Inagaki, F. and Sumimoto, H.: Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 274 (1999) 25051-60.
- Kuribayashi, F., Nunoi, H., Wakamatsu, K., Tsunawaki, S., Sato, K., Ito, T. and Sumimoto, H.: The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *Embo J* 21 (2002) 6312-20.
- Kurosu, T., Fukuda, T., Miki, T. and Miura, O.: BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene* 22 (2003) 4459-68.
- Kyhse-Andersen, J.: Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10 (1984) 203-9.

- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5.
- Lambeth, J.D.: NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 181-9.
- Lan, Q., Zheng, T., Shen, M., Zhang, Y., Wang, S.S., Zahm, S.H., Holford, T.R., Leaderer, B., Boyle, P. and Chanock, S.: Genetic polymorphisms in the oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Hum Genet* 121 (2007) 161-8.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S.C.: Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5 (1992) 227-31.
- Lee, P.L., West, C., Crain, K. and Wang, L.: Genetic polymorphisms and susceptibility to lung disease. *J Negat Results Biomed* 5 (2006) 5.
- Lehmann, U., Hasemeier, B., Christgen, M., Muller, M., Romermann, D., Langer, F. and Kreipe, H.: Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* 214 (2008) 17-24.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Burge, C.B.: Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115 (2003) 787-98.
- Li, A., Segui, J., Heinemann, S.H. and Hoshi, T.: Oxidation regulates cloned neuronal voltage-dependent Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 18 (1998) 6740-7.
- Li, B., Yu, H., Zheng, W., Voll, R., Na, S., Roberts, A.W., Williams, D.A., Davis, R.J., Ghosh, S. and Flavell, R.A.: Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation. *Science* 288 (2000) 2219-22.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M.: Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433 (2005) 769-73.
- Lopes, L.R., Hoyal, C.R., Knaus, U.G. and Babior, B.M.: Activation of the leukocyte NADPH oxidase by protein kinase C in a partially recombinant cell-free system. *J Biol Chem* 274 (1999) 15533-7.
- Macias-Reyes, A., Rodriguez-Esparragon, F., Caballero-Hidalgo, A., Hernandez-Trujillo, Y., Medina, A. and Rodriguez-Perez, J.C.: Insight into the role of CYBA A640G and C242T gene variants and coronary heart disease risk. A case-control study. *Free Radic Res* 42 (2008) 82-92.
- Mates, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J. and Marquez, J.: Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol* 82 (2008) 273-99.
- Minotti, G., Licata, S., Saponiero, A., Menna, P., Calafiore, A.M., Di Giammarco, G., Liberi, G., Animati, F., Cipollone, A., Manzini, S. and Maggi, C.A.: Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite. *Chem Res Toxicol* 13 (2000) 1336-41.
- Mishra, P.J., Humeniuk, R., Mishra, P.J., Longo-Sorbello, G.S., Banerjee, D. and Bertino, J.R.: A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 13513-8.
- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M. and Kawanishi, S.: Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci* 76 (2005) 1439-53.

- Mordente, A., Meucci, E., Martorana, G.E., Giardina, B. and Minotti, G.: Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. *IUBMB Life* 52 (2001) 83-8.
- Moreno, M.U., San Jose, G., Fortuno, A., Beloqui, O., Redon, J., Chaves, F.J., Corella, D., Diez, J. and Zalba, G.: A novel CYBA variant, the -675A/T polymorphism, is associated with essential hypertension. *J Hypertens* 25 (2007) 1620-6.
- Moreno, M.U., San Jose, G., Orbe, J., Paramo, J.A., Beloqui, O., Diez, J. and Zalba, G.: Preliminary characterisation of the promoter of the human p22(phox) gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Lett* 542 (2003) 27-31.
- Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., Albert, A. and Campuzano, S.: Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol Cell* 23 (2006) 631-40.
- Mosyagin, I., Dettling, M., Roots, I., Mueller-Oerlinghausen, B. and Cascorbi, I.: Impact of myeloperoxidase and NADPH-oxidase polymorphisms in drug-induced agranulocytosis. *J Clin Psychopharmacol* 24 (2004) 613-7.
- Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C.H. and Lambeth, J.D.: The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 274 (1999) 22999-3005.
- Olson, R.D. and Mushlin, P.S.: Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *Faseb J* 4 (1990) 3076-86.
- Olson, R.D., Mushlin, P.S., Brenner, D.E., Fleischer, S., Cusack, B.J., Chang, B.K. and Boucek, R.J., Jr.: Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 3585-9.
- Olsson, L.M., Lindqvist, A.K., Kallberg, H., Padyukov, L., Burkhardt, H., Alfredsson, L., Klareskog, L. and Holmdahl, R.: A case-control study of rheumatoid arthritis identifies an associated single nucleotide polymorphism in the NCF4 gene, supporting a role for the NADPH-oxidase complex in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 9 (2007) R98.
- Ozben, T.: Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 96 (2007) 2181-96.
- Park, J.W., Hoyal, C.R., Benna, J.E. and Babior, B.M.: 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* 272 (1997) 11035-43.
- Park, J.Y., Ferrell, R.E., Park, J.J., Hagberg, J.M., Phares, D.A., Jones, J.M. and Brown, M.D.: NADPH oxidase p22phox gene variants are associated with systemic oxidative stress biomarker responses to exercise training. *J Appl Physiol* 99 (2005) 1905-11.
- Peters, J.H., Gordon, G.R., Kashiwase, D. and Acton, E.M.: Tissue distribution of doxorubicin and doxorubicinol in rats receiving multiple doses of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 7 (1981) 65-9.
- Pfreundschuh, M., Trumper, L., Kloess, M., Schmits, R., Feller, A.C., Rube, C., Rudolph, C., Reiser, M., Hossfeld, D.K., Eimermacher, H., Hasenclever, D., Schmitz, N. and Loeffler, M.: Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 104 (2004a) 634-41.
- Pfreundschuh, M., Trumper, L., Kloess, M., Schmits, R., Feller, A.C., Rudolph, C., Reiser, M., Hossfeld, D.K., Metzner, B., Hasenclever, D., Schmitz, N., Glass, B., Rube, C. and Loeffler, M.: Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood* 104 (2004b) 626-33.

- Pfreundschuh, M., Trumper, L., Osterborg, A., Pettengell, R., Trneny, M., Imrie, K., Ma, D., Gill, D., Walewski, J., Zinzani, P.L., Stahel, R., Kvaloy, S., Shpilberg, O., Jaeger, U., Hansen, M., Lehtinen, T., Lopez-Guillermo, A., Corrado, C., Scheliga, A., Milpied, N., Mendila, M., Rashford, M., Kuhnt, E. and Loeffler, M.: CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 7 (2006) 379-91.
- Piccoli, C., D'Aprile, A., Scrima, R., Ripoli, M., Boffoli, D., Tabilio, A. and Capitanio, N.: Role of reactive oxygen species as signal molecules in the pre-commitment phase of adult stem cells. *Ital J Biochem* 56 (2007) 295-301.
- Pizzimenti, S., Ferracin, M., Sabbioni, S., Toaldo, C., Pettazzoni, P., Dianzani, M.U., Negrini, M. and Barrera, G.: MicroRNA expression changes during human leukemic HL-60 cell differentiation induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 46 (2009) 282-8.
- Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., Shugart, Y.Y., Griffiths, A.M., Targan, S.R., Ippoliti, A.F., Bernard, E.J., Mei, L., Nicolae, D.L., Rugeire, M., Schumm, L.P., Steinhardt, A.H., Rotter, J.I., Duerr, R.H., Cho, J.H., Daly, M.J. and Brant, S.R.: Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 39 (2007) 596-604.
- Rook, G.A., Steele, J., Umar, S. and Dockrell, H.M.: A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. *J Immunol Methods* 82 (1985) 161-7.
- Rothemberger, S., Mullner, E.W. and Kuhn, L.C.: The mRNA-binding protein which controls ferritin and transferrin receptor expression is conserved during evolution. *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 1175-9.
- Sanger, F. and Coulson, A.R.: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94 (1975) 441-8.
- Sathyamoorthy, M., de Mendez, I., Adams, A.G. and Leto, T.L.: p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* 272 (1997) 9141-6.
- Seddon, M., Looi, Y.H. and Shah, A.M.: Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93 (2007) 903-7.
- Sethupathy, P., Borel, C., Gagnebin, M., Grant, G.R., Deutsch, S., Elton, T.S., Hatzigeorgiou, A.G. and Antonarakis, S.E.: Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet* 81 (2007) 405-13.
- Shilo, S., Roy, S., Khanna, S. and Sen, C.K.: Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (2008) 471-7.
- Sies, H.: Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215 (1993) 213-9.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1985) 76-85.
- Soccio, M., Toniato, E., Evangelista, V., Carluccio, M. and De Caterina, R.: Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest* 35 (2005) 305-14.

- Stasia, M.J. and Li, X.J.: Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol* 30 (2008) 209-35.
- Steinberg, J.S., Cohen, A.J., Wasserman, A.G., Cohen, P. and Ross, A.M.: Acute arrhythmogenicity of doxorubicin administration. *Cancer* 60 (1987) 1213-8.
- Stephens, M., Smith, N.J. and Donnelly, P.: A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68 (2001) 978-89.
- Sumimoto, H., Kamakura, S. and Ito, T.: Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Sci STKE* 2007 (2007) re6.
- Szatrowski, T.P. and Nathan, C.F.: Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51 (1991) 794-8.
- Tang, X.D., Santarelli, L.C., Heinemann, S.H. and Hoshi, T.: Metabolic regulation of potassium channels. *Annu Rev Physiol* 66 (2004) 131-59.
- Tarazona-Santos, E., Bernig, T., Burdett, L., Magalhaes, W.C., Fabbri, C., Liao, J., Redondo, R.A., Welch, R., Yeager, M. and Chanock, S.J.: CYBB, an NADPH-oxidase gene: restricted diversity in humans and evidence for differential long-term purifying selection on transmembrane and cytosolic domains. *Hum Mutat* 29 (2008) 623-32.
- Tsunawaki, S., Kagara, S., Yoshikawa, K., Yoshida, L.S., Kuratsuji, T. and Namiki, H.: Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox. *J Exp Med* 184 (1996) 893-902.
- Udler, M., Maia, A.T., Cebrian, A., Brown, C., Greenberg, D., Shah, M., Caldas, C., Dunning, A., Easton, D., Ponder, B. and Pharoah, P.: Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol* 25 (2007) 3015-23.
- Ueyama, T., Tatsuno, T., Kawasaki, T., Tsujibe, S., Shirai, Y., Sumimoto, H., Leto, T.L. and Saito, N.: A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox. *Mol Biol Cell* 18 (2007) 441-54.
- Ushio-Fukai, M. and Nakamura, Y.: Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett* 266 (2008) 37-52.
- Vergnaud, S., Paclet, M.H., El Benna, J., Pocard, M.A. and Morel, F.: Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients p67-phox/p40-phox interaction. *Eur J Biochem* 267 (2000) 1059-67.
- Vignais, P.V.: The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59 (2002) 1428-59.
- Wang, G., Anrather, J., Huang, J., Speth, R.C., Pickel, V.M. and Iadecola, C.: NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neurosci* 24 (2004) 5516-24.
- Wang, J. and Yi, J.: Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is a question. *Cancer Biol Ther* 7 (2008).
- Wang, S.S., Davis, S., Cerhan, J.R., Hartge, P., Severson, R.K., Cozen, W., Lan, Q., Welch, R., Chanock, S.J. and Rothman, N.: Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis* 27 (2006) 1828-34.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. and Bauer, J.C.: Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151 (1994) 119-23.
- Wojnowski, L., Kulle, B., Schirmer, M., Schluter, G., Schmidt, A., Rosenberger, A., Vonhof, S., Bickeboller, H., Toliat, M.R., Suk, E.K., Tzvetkov, M., Kruger, A., Seifert, S., Kloess, M., Hahn, H., Loeffler, M., Nurnberg, P., Pfreundschuh, M., Trumper, L., Brockmoller, J. and Hasenfuss, G.: NAD(P)H oxidase and multidrug

- resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 112 (2005) 3754-62.
- Wyche, K.E., Wang, S.S., Griendling, K.K., Dikalov, S.I., Austin, H., Rao, S., Fink, B., Harrison, D.G. and Zafari, A.M.: C242T CYBA polymorphism of the NADPH oxidase is associated with reduced respiratory burst in human neutrophils. *Hypertension* 43 (2004) 1246-51.
- Xie, Z.R., Yang, H.T., Liu, W.C. and Hwang, M.J.: The role of microRNA in the delayed negative feedback regulation of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 358 (2007) 722-6.
- Yuzawa, S., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H. and Inagaki, F.: A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells* 9 (2004) 443-56.
- Zafari, A.M., Davidoff, M.N., Austin, H., Valppu, L., Cotsonis, G., Lassegue, B. and Griendling, K.K.: The A640G and C242T p22(phox) polymorphisms in patients with coronary artery disease. *Antioxid Redox Signal* 4 (2002) 675-80.
- Zalba, G., San Jose, G., Moreno, M.U., Fortuno, A. and Diez, J.: NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22(phox) gene in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 7 (2005) 1327-36.
- Zhan, Y., Virbasius, J.V., Song, X., Pomerleau, D.P. and Zhou, G.W.: The p40phox and p47phox PX domains of NADPH oxidase target cell membranes via direct and indirect recruitment by phosphoinositides. *J Biol Chem* 277 (2002) 4512-8.
- Zhao, X., Carnevale, K.A. and Cathcart, M.K.: Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex. *J Biol Chem* 278 (2003) 40788-92.

8 Anhang

Tabelle 8.1 Übersicht LCL-Zellen.¹ Zellen mit schlechtem Wachstum, die nicht für experimentelle Untersuchungen an Zellkulturen verwendet wurden. ² Diese Zellen stammen von Kindern zweier anderer Zellspender und wurden daher nicht zur Bestimmung des Kopplungsungleichgewichts herangezogen. LD = linkage disequilibrium

Coriell ID Nummer	Genotyp CYBA640A>G	Genotypisierung zur LD-Analyse	Allelische Expressions Imbalance	Transkript Stabilität
GM06985	G/G	Ja	Nein	Ja
GM06993	A/A	Ja	Nein	Ja
GM06994	G/G	Ja	Nein	Nein
GM07000	A/A	Ja	Nein	Nein ¹
GM07022	A/G	Ja	Ja	Nein
GM07034	A/A	Ja	Nein	Ja
GM07055	A/G	Ja	Ja	Nein
GM07056	A/G	Ja	Ja	Nein
GM07345	A/G	Ja	Ja	Nein
GM07357	G/G	Ja	Nein	Nein
GM10854	A/G	Nein ²	Nein	Ja
GM10859	G/G	Nein ²	Nein	Ja
GM11829	G/G	Ja	Nein	Nein
GM11830	G/G	Ja	Nein	Ja
GM11831	A/G	Ja	Ja	Nein
GM11832	A/G	Ja	Ja	Nein
GM11839	A/G	Ja	Ja	Nein
GM11840	G/G	Ja	Nein	Ja
GM11881	A/G	Ja	Ja	Nein
GM11882	A/G	Ja	Ja	Nein
GM11992	A/G	Ja	Ja	Nein
GM11993	A/G	Ja	Ja	Nein
GM11994	G/G	Ja	Nein	Ja
GM11995	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12003	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12004	A/A	Ja	Nein	Ja
GM12005	G/G	Ja	Nein	Nein
GM12006	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12043	A/A	Ja	Nein	Ja
GM12044	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12056	G/G	Ja	Nein	Ja
GM12057	A/A	Ja	Nein	Ja
GM12144	G/G	Ja	Nein	Nein
GM12145	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12146	G/G	Ja	Nein	Ja
GM12154	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12155	G/G	Ja	Nein	Ja
GM12156	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12234	A/G	Ja	Ja	Nein

Coriell ID	Genotyp	Genotypisierung	Allelische	Transkript
GM12239	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12248	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12249	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12264	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12716	A/A	Ja	Nein	Nein ¹
GM12717	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12750	A/A	Ja	Nein	Ja
GM12751	A/A	Ja	Nein	Ja
GM12760	G/G	Ja	Nein	Nein
GM12761	G/G	Ja	Nein	Nein
GM12762	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12763	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12812	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12813	G/G	Ja	Nein	Ja
GM12814	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12815	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12872	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12873	A/G	Ja	Ja	Nein
GM12874	G/G	Ja	Nein	Ja
GM12875	A/G	Ja	Nein	Nein
GM12891	G/G	Ja	Nein	Nein
GM12892	A/G	Ja	Ja	Nein

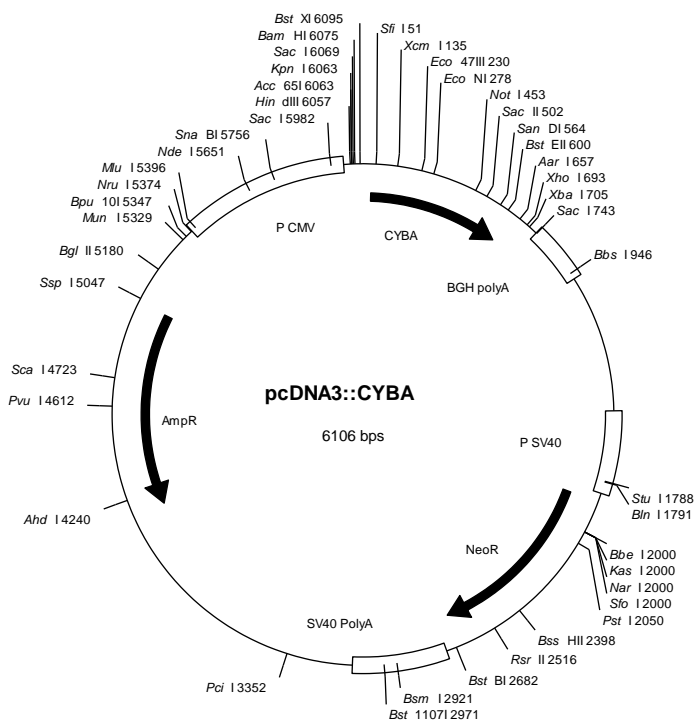


Abbildung 8-1: Expressionsvektor pcDNA3.1 mit CYBA-Insert.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marion Hoffmann
Geburtsdatum: 13. Juli 1976
Geburtsort: Hildesheim

Schule

1983-1987 St. Martinus Grundschule Himmelsthür
1987-1989 Orientierungsstufe Himmelsthür
1989-1997 Gymnasium Himmelsthür
1997 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

1997-1999 Ausbildung zur Staatlich geprüften Biologisch-Technischen Assistentin (BTA), Sabine Blindow-Schulen, Hannover
1999 Staatsexamen

Studium

1999-2005 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
2005 Diplom

Tätigkeiten

2005-2006 Wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Göttingen
2006-2009 Promotionsstipendiatin des Graduiertenkollegs 1034 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)

10 Danksagung

Herrn PD Dr. Kramer danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und zu begutachten. Mein Dank geht ebenso an Herrn Prof. Dr. Hardeland für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Brockmöller möchte ich für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Markus Schirmer für seine kompetente Betreuung und tatkräftige Unterstützung. Die vielen konstruktiven Ideen und Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, ebenso wie die intensive Beratung bei den statistischen Auswertungen. Herrn Dr. Mladen Tzvetkov danke ich für die sehr gute Anleitung der praktischen Arbeiten im Labor und die vielen nützlichen Anregungen, die den Fortgang dieser Arbeit unterstützt haben. Ich möchte mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der gesamten Abteilung Klinische Pharmakologie für ihre freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei den Kollegen der Abteilungen Toxikologie und Molekularen Pharmakologie für die angenehme Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Christoph Schmitz-Salue für seine Unterstützung bei der Etablierung des Westernblots.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Löffler für die Überlassung von Patientendaten der NHL-B-Studie ebenso wie Herrn Prof. Dr. Knöll, der mir freundlicherweise Patienten-DNA zur Verfügung gestellt hat. Den Mitarbeitern der Abteilung Transfusionsmedizin möchte ich für die freundliche Unterstützung bei der Probandenrekrutierung und Blutabnahme danken. Mein Dank gilt ebenfalls allen Stipendiaten und Dozenten des Graduiertenkollegs 1034 für die freundliche Atmosphäre und das interessante wissenschaftliche Ausbildungsprogramm.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung bedanken.

Nicht zuletzt sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.