

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Toxikologie
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper**

**Die Rolle der durch NADPH-Oxidasen produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)
in der Pathophysiologie von Hypertonie und Alterung.**

Inaugural – Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christian Makiol

aus Bad Blankenburg

Würzburg, Oktober 2014

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Anna Tcholpon Djuzenova

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 2015

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Oxidativer Stress und die Pathophysiologie im Menschen	1
1.1.1	Die Auswirkungen von oxidativem Stress auf den Körper	1
1.1.2	Oxidativer Stress im Alterungsprozess.....	4
1.1.3	Hypertonie und oxidativer Stress.....	5
1.2	Superfamilie der NADPH-Oxidase und die Produktion von ROS	8
1.3	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und die Aktivierung der NADPH-Oxidase	12
1.4	Sirtuin1, Hitzeschockprotein70 und ihre Bedeutungen in Bezug auf oxidativen Stress und den Alterungsprozess	17
1.4.1	Sirtuin1 im Zusammenhang mit oxidativem Stress und Alterung.....	17
1.4.2	Hitzeschockprotein70 und oxidativer Stress.....	17
1.5	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Chemikalien	20
2.1.2	Marker.....	22
2.1.3	Kits.....	23
2.1.4	Antikörper	23
2.1.5	Verbrauchsmaterial/ Material	24
2.1.6	Geräte.....	25
2.1.7	Puffer und Lösungen.....	27
2.1.7.1	Western Blot	27
2.1.7.2	Gewebsfärbung	30
2.2	Tiermodelle	31
2.2.1	P47-Knockout-Mausmodell.....	31
2.2.2	Ren2-Knock-in-Rattenmodell.....	32
2.3	Methoden	34
2.3.1	Pulverisieren von tierischem Gewebe.....	34
2.3.2	Isolierung von Proteinen aus pulverisierten tierischem Gewebe.....	35

2.3.3	Bradford Assay	35
2.3.4	Western Blot	35
2.3.5	Immunohistochemiefärbung auf Paraffinschnitten.....	37
2.3.6	DHE-Färbung auf Gefrierschnitten	39
2.3.7	Auswertung der Färbungen.....	40
2.3.8	Statistische Auswertung.....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Ergebnisse aus dem p47-Knockout-Tiermodell.....	42
3.1.1	Konzentration von ROS in Niere und Herz	42
3.1.2	DNA-Doppelstrangbrüche in Niere und Herz	45
3.1.3	Expression von Sirtuin1 im Gehirn und der Niere	48
3.1.4	Expression von Hsp70 in der Niere	49
3.2	Ergebnisse aus dem ren2-Tiermodell.....	50
3.2.1	Blutdruckwerte, Körpergewicht, Organratio und Nierenfunktionsparameter	50
3.2.2	Konzentration von ROS in der Niere und im Herz.....	51
3.2.3	DNA-Doppelstrangbrüche in Niere und Herz	56
4	Diskussion	61
4.1	Entstehung und Auswirkung von ROS im Alterungsprozess.....	61
4.2	Auswirkung von Bluthochdruck auf die ROS-Produktion und auf DNA- Schäden	64
5	Zusammenfassung	68
5.1	Zusammenfassung	68
5.2	Summary.....	70
6	Literaturverzeichnis, Abbildungsverzeichnis und Abkürzungsverzeichnis. 72	
6.1	Literaturverzeichnis	72
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	82
6.3	Abkürzungsverzeichnis	84

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Oxidativer Stress und die Pathophysiologie im Menschen

1.1.1 Die Auswirkungen von oxidativem Stress auf den Körper

Bei oxidativem Stress handelt es sich um ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien. Nehmen die Oxidantien, also die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), gegenüber den Antioxidantien in einem System zu, wird der Überschuss von Oxidantien als oxidativer Stress bezeichnet (Klaunig and Kamendulis, 2004).

Die reaktiven Sauerstoffspezies bilden eine große Gruppe von unterschiedlichen Radikalen, z.B. die instabilen Superoxidanionen und Hydroxyl-Radikale, sowie das stabilere Wasserstoffperoxid (Finkel and Holbrook, 2000). Im Körper können diese auf verschiedene Weise entstehen. Zum einen gibt es endogene Systeme die ROS produzieren können, zum anderen gibt es exogene Quellen die ROS im Körper entstehen lassen. Zu den endogenen Systemen gehören die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase, Cytochrom P450, Peroxisomen, Lipooxygenasen und die Cytochrom-c-Reduktase in Mitochondrien. Inflammatorische Zytokine können ebenfalls die Konzentration von ROS erhöhen. Zu den exogenen Quellen gehören unter anderem UV-Strahlung, ionisierende Strahlung und Zytostatika (Finkel and Holbrook, 2000).

Auch die Antioxidantien können in verschiedene Gruppen unterteilt werden. So gibt es zum einen enzymatische Systeme, wie die Superoxiddismutase, die Glutathionperoxidase und die Katalase, welche Sauerstoffradikale neutralisieren (siehe Abb. 01). Zum anderen gibt es aber auch nicht-enzymatische Stoffe, welche Radikale binden bzw. umwandeln können. Dazu gehören Vitamin E und C, β -Carotin und Glutathion (Klaunig and Kamendulis, 2004).

Folgen des oxidativen Stresses sind molekulare Veränderungen von Lipiden, Proteinen und der DNA (Finkel and Holbrook, 2000). So können ROS sämtliche Aminosäuren direkt oxidieren und dadurch Protein-Protein-Verbindungen erzeugen, welche deren Funktionen beeinträchtigen (Stadtman, 2006). Solche Oxidierungen

können aber auch zur Proteinspaltung führen (Finkel and Holbrook, 2000). Des Weiteren können ROS zur Lipidperoxidation führen und somit biologische Membranen schädigen. Bei der Lipidperoxidation kann Malondialdehyd entstehen, welches wiederum zu DNA-Schäden führen kann (Klaunig and Kamendulis, 2004). ROS können aber auch direkt DNA-Schäden erzeugen. So können Sauerstoffradikale zu DNA-Einzelstrangbrüchen und Zuckerveränderungen führen. Sind zufällig zwei solcher Einzelstrangbrüche nah beieinander gelegen oder die Topoisomerase bindet an die gegenüberliegende Stelle eines Einzelstrangbruches, dann kann ein DNA-Doppelstrangbruch entstehen (Sedelnikova et al., 2010). An der Stelle des Doppelstrangbruches werden H2AX-Histone phosphoryliert und es entsteht γ H2AX, welches an den Reparaturvorgängen beteiligt ist (Bohgaki et al., 2010; Sedelnikova et al., 2010).

ROS können auch als second Messenger wirken und verschiedene Signaltransduktionswege z.B. von Kinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren beeinflussen und so unter anderem in Alterungsprozesse und in die Apoptose eingreifen (Hekimi et al., 2011) (siehe Abb. 02).

Durch die zahlreichen Veränderungen, die reaktive Sauerstoffradikale auf zellulärer Ebene verursachen, haben sie eine Bedeutung bei vielen Krankheitsprozessen. So spielen sie unter anderem eine Rolle bei der Alterung, in der Entstehung von Karzinomen und bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, bei neurologischen Erkrankungen wie beim Morbus Alzheimer und beim Morbus Parkinson sowie bei kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose, bei der Hypertonie oder beim Herzinfarkt (Valko et al., 2007) (siehe Abb. 03).

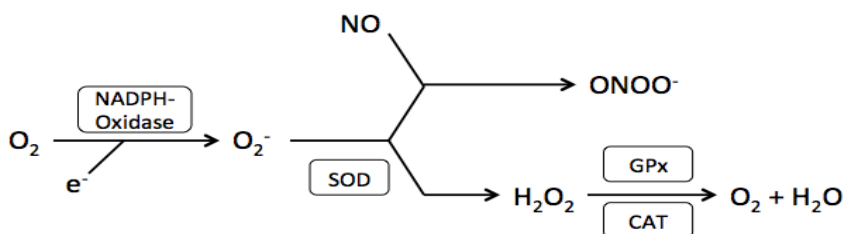


Abb. 01: ROS-Gleichgewicht

O_2 : Sauerstoff, e^- : Elektron; O_2^- : Superoxidationion, NO : Stickstoffmonoxid, $ONOO^-$: Peroxynitrit, H_2O_2 : Wasserstoffperoxid, H_2O : Wasser, SOD: Superoxid-Dismutase, GPx: Glutathionperoxidase, CAT: Katalase (modifiziert nach Lambeth, 2004; Wells et al., 2009).

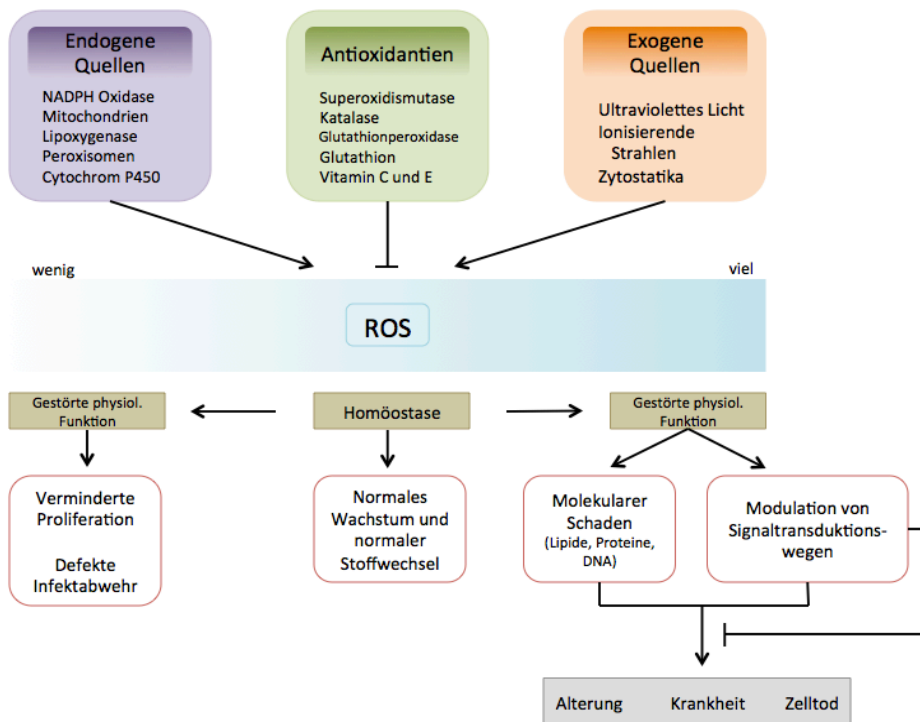


Abb. 02: Quellen und zelluläre Auswirkung von ROS

Endogene und exogene Quellen der ROS-Entstehung im Gleichgewicht mit Antioxidantien und deren Auswirkung auf die Homöostase im menschlichen Körper. ROS: reaktive Sauerstoffspezies (modifiziert nach Finkel und Holbrook, 2000 und Hekimi et al., 2011).



Abb. 03: Oxidativer Stress und Krankheiten im Menschen

KHK: koronare Herzkrankheit (modifiziert nach Aruoma et al., 2006).

1.1.2 Oxidativer Stress im Alterungsprozess

Seit Jahren nimmt die Alterung der Weltbevölkerung immer weiter zu. So waren im Jahr 2009 473 Millionen Menschen auf der Welt über 60 Jahre alt, 2050 werden es 1,6 Milliarden Menschen weltweit sein (United Nations. Dept. of Economic and Social Affairs. Population Division., 2010). Im Jahr 2000 war jeder zehnte Mensch über 60 Jahre und jeder vierzehnte über 65 Jahre alt, 2050 wird jeder fünfte über 60 Jahre und jeder sechste über 65 Jahre alt sein (United Nations. Dept. of Economic and Social Affairs. Population Division., 2002).

Bernard Strehler definierte 1977 Alterung als universell, intrinsisch, progressiv und gesundheitsschädigend. Das heißt, dass der Alterungsprozess in allen Individuen vorkommt, nicht von extrinsischen Faktoren abhängig und während des gesamten Lebens progredient ist. Es werden nur solche Phänomene als Alterung bezeichnet, die für das Individuum als schlecht gelten (Strehler, 1977).

Auf molekularer Ebene kommt es im Alterungsprozess zur Akkumulation und Schädigung von Makromolekülen. Solche Schäden können unterschiedliche Ursachen haben. Beispielsweise können sie zum einen durch ROS und freie Radikale entstehen oder durch spontane Fehler bei biochemischen Prozessen bedingt sein. Bis jetzt wurden mehr als 300 Theorien über den Alterungsprozess veröffentlicht, jedoch kann keine Theorie die Komplexität der Alterung erklären (Rattan, 2006). Eine der bedeutendsten und meist studiertesten Theorien ist die Freie-Radikal-Theorie-der-Alterung. Dabei spielt die Oxidation von Proteinen, die Lipidperoxidation und die DNA-Schädigung durch ROS in Zellen eine entscheidende Rolle im Alterungsprozess (Vina et al., 2007). Die Schädigung der mitochondrialen DNA durch freie Sauerstoffradikale hat dabei ebenfalls eine zentrale Bedeutung im Alterungsprozess (Kelly, 2011).

Eine Alterungshypothese nimmt an, dass ROS-unabhängige Zellschäden zur Produktion von ROS führen, die über Signaltransduktionswege eine Stressantwort aktivieren, die den altersabhängigen Schaden verhindern soll. Im Laufe des Alterungsprozesses kommt es schließlich zum Überschreiten einer bestimmten Schwelle, an der die ROS-Produktion gesteigert wird und die reaktiven Sauerstoffspezies dann direkt an dem altersabhängigen Zellschaden beteiligt sind (Hekimi et al., 2011) (siehe Abb. 04).

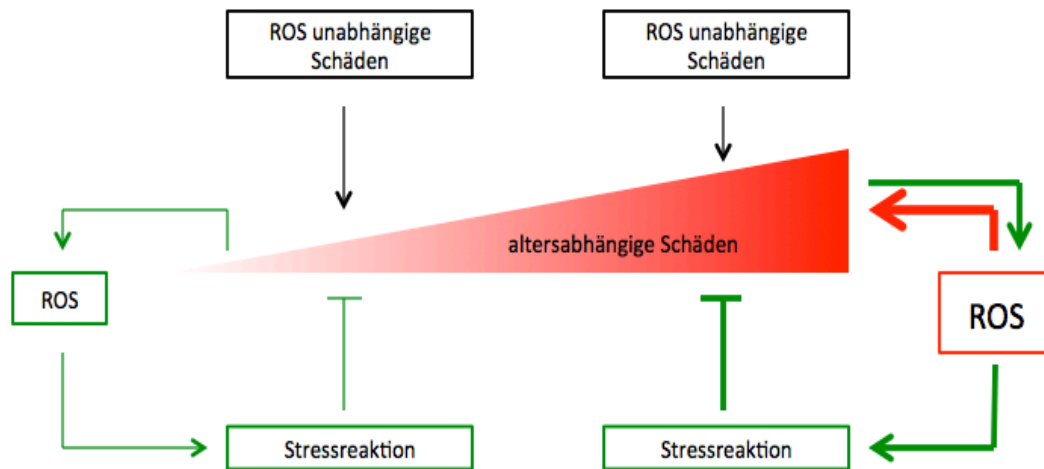


Abb. 04: Alterungshypothese durch ROS

ROS-unabhängige Zellschäden führen zur Produktion von ROS, welche durch eine Stressreaktion altersbedingte Zellschäden verhindern. Nach Überschreiten einer bestimmten Schwelle tragen die reaktiven Sauerstoffspezies allerdings direkt zu alterungsbedingten Schäden bei. ROS: reaktive Sauerstoffspezies (modifiziert nach Hekimi et al., 2011).

1.1.3 Hypertonie und oxidativer Stress

Physiologisch werden bei jeder Herzaktion ca. 70ml Blut in das Gefäßsystem gepumpt. Der Druck im Gefäßsystem, also der Blutdruck, ist dabei vom kardialen Auswurf und vom Gefäßwiderstand abhängig. Aufgrund des episodischen Auswurfs entstehen zwei unterschiedliche Arten von Drücken in den Gefäßen und im Herz. Der höchste Wert (systolischer Wert) wird beim Auswurf des Blutes aus dem Herz erreicht und der niedrigste Wert (diastolischer Wert) nach dem Auswurf des Blutes aus dem Herz. Der Blutdruck kann dabei durch verschiedene Faktoren reguliert werden. So können Barorezeptoren im Ventrikel akute Änderungen des Blutdrucks erfassen. Das im Gehirn und im Herz gebildete Natriuretische Peptid kann in diesen Organen den Blutdruck erhöhen. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System kann das Blutvolumen in den Gefäßen und den Gefäßtonus beeinflussen. Das Kinin-Kallikrein-System kann ebenfalls den Gefäßtonus und die renale Salzausscheidung verändern. Das adrenerge System ist in der Lage die Herzfrequenz, die kardiale

Kontraktilität und den Gefäßtonus zu regulieren und die Blutgefäße können selbst Faktoren bilden, die ihren Gefäßtonus und somit den Blutdruck ändern, wie den Vasodilatator Stickstoffmonoxid und den Vasokonstriktor Endothelin (Lifton et al., 2001).

Hypertonie ist definiert als eine Erhöhung des systolischen Blutdruckwertes über 140mmHg und/ oder des diastolischen Wertes über 90mmHg (Chobanian, 2003). In Industrieländern leiden etwa 25% der Erwachsenen an Bluthochdruck (Burt et al., 1995). Dabei ist die Hypertonie ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, Herzinfarkte, Schlaganfälle, vaskuläre Demenzen, chronische Nierenerkrankungen und Retinopathien (Chobanian, 2003).

Oxidativer Stress und Hypertonie können sich gegenseitig beeinflussen. So kann oxidativer Stress Hypertonie auslösen und Hypertonie kann die ROS-Produktion erhöhen. Bei der Hypertonie kommt es in der Niere zu einer Infiltration von Immunzellen und dadurch zur Aktivierung der NADPH-Oxidase, welche die Produktion von ROS steigert. Es entsteht oxidativer Stress, welcher unter anderem durch eine Erhöhung von Hitzeschockproteinen die Infiltration von Abwehrzellen begünstigt. Es kommt zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems in Makrophagen und damit zu einem Anstieg von intrarenalem Angiotensin II. Angiotensin II steigert die Produktion von Adhäsionsmolekülen und des nukleären Faktors kappa B (NFκB), erhöht die Membranpermeabilität und begünstigt somit ebenfalls die Infiltration mit Abwehrzellen. Angiotensin II führt zu einer Vasokonstriktion der Gefäße und begünstigt somit den oxidativen Stress. Des Weiteren kann Angiotensin II auch direkt die NADPH-Oxidase aktivieren (siehe Abb. 05 und Abb. 09) (Paravicini and Touyz, 2008; Vaziri and Rodríguez-Iturbe, 2006).

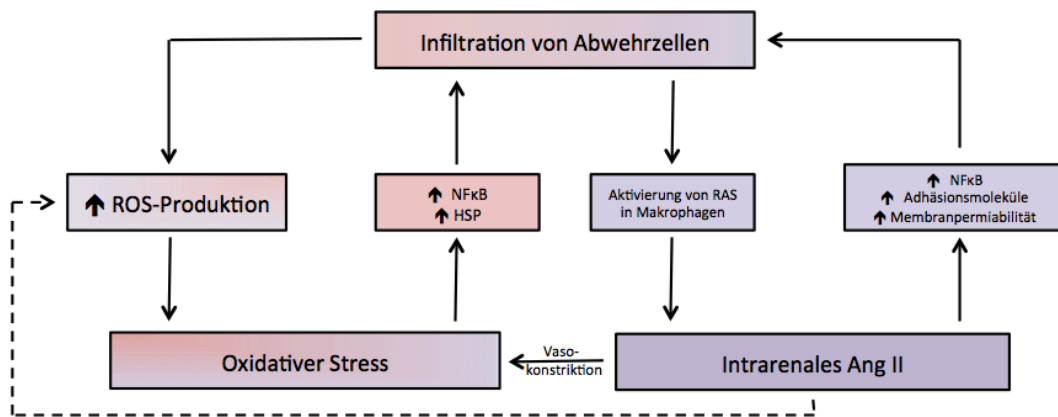


Abb. 05: Hypertonie und ROS-Produktion in der Niere

ROS: reaktive Sauerstoffspezies, NFκB: nukleärer Faktor kappa B, HSP: Hitzeschockprotein, RAS: Renin-Angiotensin-System, AngII: Angiotensin II (modifiziert nach Vaziri and Rodriguez-Iturbe, 2006).

ROS können ebenso die Hypertonie begünstigen. Dabei bewirken ROS in der Niere, im Gehirn und im kardiovaskulärem System den Abbau von Tetrahydrobiopterin, die Hemmung der Dimethylarginin-dimethylaminohydrolase und der Stickstoffmonoxid-Synthase. Dadurch kommt es zu einer geringeren Produktion von Stickstoffmonoxid. ROS können NO auch direkt inaktivieren ($\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$). Durch das so entstandene Defizit an Stickstoffmonoxid tritt eine Gefäßwandverdickung von Arterien auf. Des Weiteren kommt es zur Natrium und Wasser Retention in der Niere, zur Aktivierung des Sympathikus und zu einer verminderten Vasodilatation der Gefäße. Das alles verursacht die Entstehung einer Hypertonie. ROS können außerdem Arachidonsäure peroxidieren und somit Isoprostan bilden, welches vasokonstriktorisch, proinflammatorisch und antinatriuretisch wirkt und so ebenfalls eine Hypertonie begünstigt (siehe Abb. 06) (Paravicini and Touyz, 2008; Vaziri and Rodríguez-Iturbe, 2006).

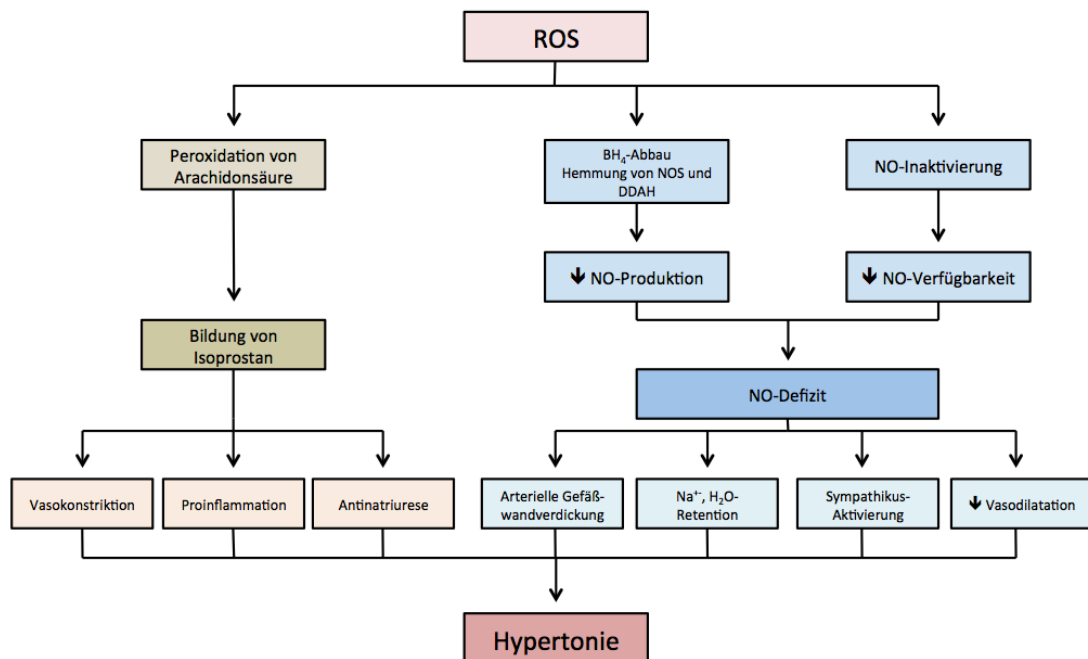


Abb. 06: Einfluss von ROS auf die Entstehung von Hypertonie

ROS: reaktive Sauerstoffspezies, BH₄: Tetrahydrobiopterin, NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase, DDAH: Dimethylarginin-dimethylaminohydrolase, NO: Stickstoffmonoxid (modifiziert nach Vaziri and Rodriguez-Iturbe, 2006).

1.2 Superfamilie der NADPH-Oxidase und die Produktion von ROS

Die NADPH-Oxidase ist ein Transmembranenzym und lässt sich in sieben strukturell ähnliche Untergruppen einteilen NOX1 bis 5, DUOX1 und 2 (Lambeth, 2004; Touyz et al., 2011). Ihre Hauptaufgabe ist es reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren. Dies machen sie, indem sie Elektronen über biologische Membranen transportieren. Die NOX2 benötigt dafür die Cofaktoren Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Flavinadenindinukleotid (FAD) (Touyz et al., 2011). Die Elektronen werden durch Sauerstoffmoleküle aufgenommen und es entstehen Superoxidanionen (O₂⁻). Die Superoxidanionen können mit Wasser reagieren und es bilden sich Hydroperoxyl-Radikale (HO₂[·]). Diese können wiederum mit Elektronen und Wasserstoffionen zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) reagieren. Wasserstoffperoxid kann durch die erneute Aufnahme eines Elektrons zu einem Hydroxidion und einem Hydroxyl-Radikal (OH[·]) zerfallen. Superoxidanionen, Hydroperoxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale gehören alle zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (Klaunig and Kamendulis, 2004).

Die NOX1 besteht aus den Proteinen Nox1, NOXO1 (Homolog zu p47^{phox}), NOXA1 (Homolog zu p67^{phox}) und p22^{phox} (Touyz et al., 2011). Exprimiert wird die NOX1 in Kolonepithelzellen, im Magen, Uterus, Prostata (Bánfi et al., 2000) sowie in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC). Die Expression des Enzyms wird durch Angiotensin II, Aldosteron, epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), thrombozytären Wachstumsfaktor (PDGF) und Scherspannung von Zellen hochreguliert. EGF und PDGF sind Wachstumsfaktoren, welche bei der Zellproliferation beteiligt sind. Die NOX1 ist in der Lage kontinuierlich eine geringe Konzentration von Superoxiden zu produzieren und ist an der Migration und Proliferation von VSMC's beteiligt (Touyz et al., 2011). Im Kolon dient sie auch zur Abwehr von Bakterien (Krause, 2004). NOX1 ist möglicherweise an der akuten Form von Angiotensin II-abhängigen Bluthochdruck beteiligt (Touyz et al., 2011). Sie spielt eine Rolle bei der Atherosklerose, beim Diabetes mellitus, beim Apoplex und bei der Hypercholesterinämie (Rivera et al., 2010).

Die NOX2 besteht aus den membrangebundenen Proteinen gp91^{phox} und p22^{phox}, sowie aus den im Zytoplasma befindlichen Proteinen p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} und Rac. Im C-terminalen Ende von gp91^{phox} befinden sich die Bindungsstellen für NADPH und FAD (Nauseef, 2008). Entscheidend für die Aktivierung der NOX2 ist das zytoplasmatische Protein p47^{phox}. Zur Aktivierung wird es phosphoryliert und bildet zusammen mit p67^{phox} einen Komplex, welcher daraufhin an die membrangebundenen Proteine gp91^{phox} und p22^{phox} bindet (Taura et al., 2009; Vignais, 2002). P47^{phox} besteht aus einer phox-homologen (PX)-Domäne, aus zwei scr-homologen-3 (SH3)-Domänen, aus einer autoinhibitorischen Region (AIR) und einer Prolin-reichen Region (PRR) (Groemping and Rittinger, 2005). Im unphosphorylierten Zustand binden die SH3-Domänen an der AIR und inaktivieren p47^{phox} (Groemping et al., 2003). Im phosphorylierten Zustand lösen sich die SH3-Domänen von der AIR und können an die Prolin-reiche Region des membrangebundenen Proteins p22^{phox} binden (Groemping et al., 2003). Dadurch kommt es zur Aktivierung der NOX2 (siehe Abb. 07). Die Phosphorylierung von p47^{phox} kann durch unterschiedliche Proteinkinasen (El-Benna et al., 2009), z.B. durch die Proteinkinase C (Fontayne et al., 2002) erfolgen. Die Proteinkinase C ist in der Lage, die Aminosäure Serin an den Stellen 303 bis 379 zu phosphorylieren (El-

Benna et al., 1994; El-Benna et al., 1996). Rac und $p40^{\text{phox}}$ können die Aktivierung der NOX2 ebenfalls beeinflussen, so kann $p40^{\text{phox}}$ die Funktion der NOX2 sowohl aktivieren als auch inhibieren (Lopes et al., 2004) (siehe Abb. 08).

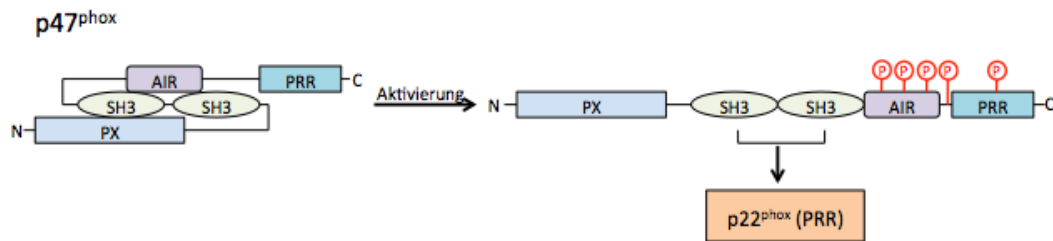


Abb. 07: Phosphorylierung und Aktivierung von $p47^{\text{phox}}$

Durch Phosphorylierung löst sich die Bindung zwischen SH3 und AIR in $p47^{\text{phox}}$ und die SH3 Domänen können an $p22^{\text{phox}}$ binden. PX: phox-homologe-Domäne, SH3: scr-homologe-3-Domäne, AIR: autoinhibitorische Region, PRR: Prolin-reiche Region (modifiziert nach El-Benna et al., 2009).

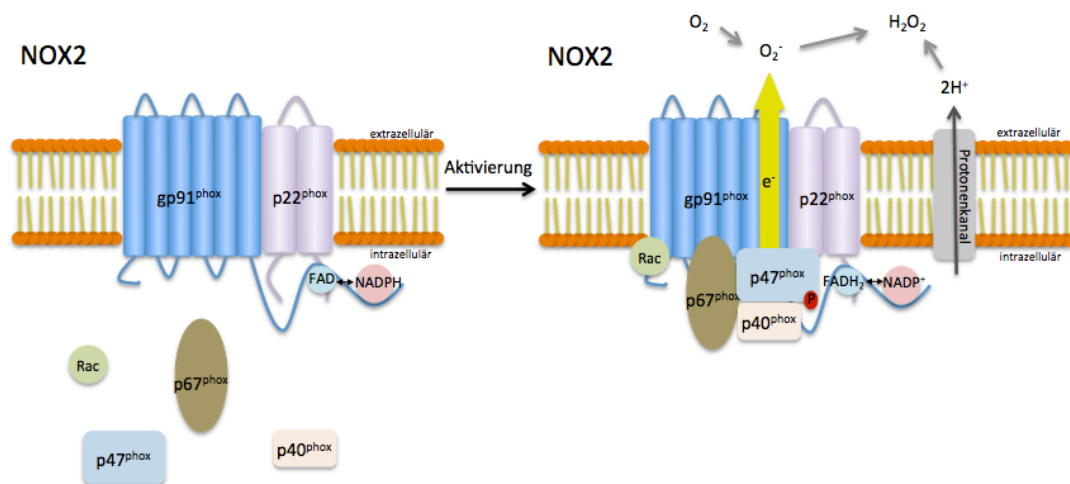


Abb. 08: Aktivierung der NOX2

Nach Phosphorylierung von $p47^{\text{phox}}$ bildet es mit $p67^{\text{phox}}$ und $p40^{\text{phox}}$ einen Komplex und bindet an $p22^{\text{phox}}$ und $gp91^{\text{phox}}$. Rac bindet ebenfalls an $gp91^{\text{phox}}$ und es kommt zur Aktivierung der NOX2 mit Elektronentransfer. Rac: Ras-ähnliches C3 Botulinum-Toxin-Substrat, NADP: Nicotinamidadeninukleotidphosphat, FAD: Flavinadeninukleotid (modifiziert nach Touyz et al., 2011 und Nauseef, 2008).

Die Aktivierung der NOX2 wird in den Zellen durch verschiedene Mechanismen reguliert, dabei sind Zelldehnung, Konzentration von Angiotensin II und Chemokine von Bedeutung. Exprimiert wird die NOX2 in Phagozyten, endothelialen und

vaskulären glatten Muskelzellen, in kardialen, renalen und neuronalen Zellen (Touyz et al., 2011). Die Hauptfunktion der NOX2 ist somit die Abwehr von Mikroorganismen durch Sauerstoffradikale (Krause, 2004), sowie die Regulierung von endothelialen Funktionen und die Beeinflussung des Stickstoffmonoxid (NO)-Signalweges. Bei Mutationen von NOX2 kann es zum Krankheitsbild der septischen Granulomatose kommen. Außerdem ist die NOX2 an der Entstehung von Bluthochdruck und Atherosklerose beteiligt (Touyz et al., 2011).

Die NOX3 wird im Innenohr exprimiert (Touyz et al., 2011), über die Funktion ist bisher wenig bekannt.

Die NOX4 besteht aus den Untereinheiten Nox4, p22^{phox} und TKS4/5. Sie wird hauptsächlich in der Niere exprimiert, darüber hinaus wird sie auch in vaskulären Zellen, Fibroblasten, Osteoklasten und Adipozyten exprimiert (Touyz et al., 2011). Anders als die NOX2 ist die NOX4 dauerhaft aktiviert (Wu et al., 2010). Die ROS-Produktion kann jedoch durch Angiotensin II, Glucose, TNF α und Wachstumsfaktoren gesteigert werden (Schroder, 2010). Die NOX4 ist in den Zellen unter anderem an der Migration und dem Wachstum von VSMCs beteiligt sowie bei der Angiogenese. Des Weiteren hat sie eine kardioprotektive Funktion. Pathophysiologisch ist die NOX4 bei Bluthochdruck, Atherosklerose, Zellsenescence und bei der Alterung von Bedeutung (Touyz et al., 2011).

Die NOX5 besitzt an ihrem N-terminalen Ende eine Calmodulin-ähnliche Domäne und somit vier Kalzium-Bindungsstellen. Exprimiert wird sie im Hoden, in der Milz, in der Niere und in vaskulären Zellen (Touyz et al., 2011). Sie wird unter anderem durch Thrombin, PDGF, Endothelin I und Angiotensin II aktiviert (Montezano et al., 2010). Die NOX5 ist beteiligt bei der Endothelzellproliferation, der Zellmigration und der Angiogenese (Touyz et al., 2011), darüber hinaus spielt sie eine Rolle bei der Atherosklerose (Schulz and Munzel, 2008).

Die DUOX1/2 sind bei der Schilddrüsenhormonsynthese von Bedeutung (Touyz et al., 2011).

Schlussendlich können zwei sichere Hauptaufgaben der NADPH-Oxidasen unterschieden werden, zum einen die Abwehrfunktion (NOX1 und NOX2) zum anderen die Mitbeteiligung bei biosynthetischen Prozessen (DUOX1/2 und NOX3).

Es ist wahrscheinlich, dass alle NOX-Enzyme an der Signaltransduktion beteiligt sind (Krause, 2004).

1.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und die Aktivierung der NADPH-Oxidase

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des kardiovaskulären Systems. Angiotensin II ist dabei das Hauptmolekül dieses Systems. Es wirkt in allen Organen, einschließlich dem Herz, den Gefäßen, den Nieren und dem Gehirn. Bei akuter Stimulation reguliert es vor allem den Salz-Wasser-Haushalt, die Vasokonstriktion von Gefäßen sowie den Blutdruck. Bei der chronischen Stimulation dagegen fördert es unter anderem die Hyperplasie und Hypertrophie von vaskulären glatten Muskelzellen, sowie die Hypertrophie und die Remodellierung des Herzens (Mehta and Griendling, 2007).

Am Anfang des Systems steht die Bildung von Prorenin/Renin in den juxtaglomerulären Zellen des Juxtaglomerulären Apparates der Niere. Stimuliert wird die Bildung durch Abfallen des Perfusionsdruckes in den afferenten Ateriolen, durch Änderung der NaCl-Konzentration in den Zellen der Macula Densa sowie durch β 1-adrenerge Stimulation. Das ganze System kann durch die negative Rückkopplung von Angiotensin II gehemmt werden (Atlas, 2001). Renin bindet zum einen an den Prorenin/Renin-Rezeptor und erhöht über die Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinasen Kollagen, Fibronectin und den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β (Pool, 2001), zum anderen spaltet es Angiotensinogen, welches kontinuierlich in der Leber synthetisiert wird, zu Angiotensin I (AngI). Das physiologisch inaktive Angiotensin I wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) zu Angiotensin II (AngII) gespalten. ACE ist ein Enzym welches bevorzugt in den endothelialen Zellen der Lunge vorkommt. Neben der Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II ist es auch in der Lage Bradykinin und Kallidin in inaktive Metaboliten zu spalten (siehe Abb. 09).

Für Angiotensin II sind bisher vier G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren bekannt, AT1 bis AT4. Der Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1 (AT1) ist für die meisten physiologischen und pathologischen Effekte von Angiotensin II verantwortlich

(Atlas, 2001). Im kardiovaskulären System führt die Aktivierung des AT1-Rezeptors durch Angiotensin II zur Vasokonstriktion von Gefäßen, zu einer Erhöhung des Blutdrucks und der Herzkontraktilität, sowie zur Hypertrophie von Gefäßwänden und vom Herz. In der Niere führt die Aktivierung zur tubulären Reabsorption von Natrium, außerdem wird die Renin-Synthese gehemmt. In der Nebenniere stimuliert es die Bildung von Aldosteron (Carey, 2003). Im zentralen Nervensystem ist es unter anderem für die zentrale Blutdruckregulation verantwortlich (Paul et al., 2006). Des Weiteren werden über den AT1-Rezeptor Zellwachstum, Zellproliferation, inflammatorische Reaktionen und oxidativer Stress vermittelt (Ferrario, 2006). So kann Angiotensin II die NADPH-Oxidase direkt aktivieren, sowie spezifische Untereinheiten der NADPH-Oxidase hochregulieren (Garrido and Griendling, 2009). In VSMCs stimuliert Angiotensin II über Phospholipase C die Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung von p47^{phox} und damit die Aktivierung der NADPH-Oxidase (Karathanassis et al., 2002). Auch im Herz und in der Niere kommt es durch Stimulation von Angiotensin II zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit zu DNA-Schäden (Brand et al., 2013).

Die durch NADPH-Oxidase produzierten reaktiven Sauerstoffspezies sind von Bedeutung bei der durch Angiotensin II vermittelten Kontraktion von VSMCs. Bei der hypertrophen Wirkung von Angiotensin II ist die NOX1 in VSMCs ebenso wie die NOX4 in mesangialen Zellen beteiligt. Angiotensin II hat durch Aktivierung des AT1-Rezeptors und der daraus resultierenden Aktivierung der NADPH-Oxidase eine DNA-schädigende Wirkung. Nach der Bindung von Angiotensin II am AT1-Rezeptor kommt es zur Aktivierung von G α -q/11 und dadurch zur Aktivierung der Phospholipase C. Die Phospholipase C produziert dann Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), welches aus dem endoplasmatischen Retikulum Kalzium freisetzen kann. Durch das Kalzium kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C, diese ist in der Lage p47^{phox} zu phosphorylieren. Nach Aktivierung der NADPH-Oxidase kommt es zur Bildung von ROS, welche DNA-Schäden hervorrufen können (Fazeli et al., 2012). Die NADPH-Oxidase kann auch durch Aldosteron aktiviert werden. Durch Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor ist Aldosteron in der Lage die Proteinkinase C zu aktivieren und somit die Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung von p47^{phox} zu stimulieren (Queisser et al., 2010) (siehe Abb. 10).

Auch im Gehirn ist die NADPH-Oxidase an der Wirkung von Angiotensin II beteiligt, dabei kommt es zur Erhöhung des Blutdrucks sowie zur Steigerung des Durstgefühls (Garrido and Griendling, 2009).

So weisen transgene Tiere, welche zwei Renin-Gene besitzen, einen höheren Blutdruck auf als Tiere mit nur einem Renin-Gen (Moriguchi et al., 1994; Mullins et al., 1990).

Der AT₂-Rezeptor ist überwiegend in der embryonalen Entwicklung exprimiert. Beim Erwachsenen vermittelt er die Vasodilatation von Gefäßen, hat antiproliferative und apoptotische Effekte in VSMCs und hemmt das Zellwachstum und die Remodellierung im Herz (Carey, 2003).

Der AT₄-Rezeptor setzt Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) bei Aktivierung frei (Atlas, 2001). Die Funktion vom AT₃-Rezeptor ist bisher ungeklärt (Stanton, 2003).

Mittels Aminopeptidase A kann aus Angiotensin II Angiotensin III (AngIII) gespalten werden und aus Angiotensin III kann mittels Aminopeptidase N Angiotensin IV (AngIV) gespalten werden. Die höchste Konzentration der Aminopeptidasen ist dabei im Gehirn und in der Niere. Angiotensin III spielt eine bedeutende Rolle bei der Blutdruckregulation im ZNS. Angiotensin IV erhöht im Gehirn den Bluthochdruck zusammen mit Angiotensin II über AT₁-Rezeptoren (Reudelhuber, 2005).

Durch Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (ACE2) oder Carboxipeptidase kann aus Angiotensin II Ang-(1-7) abgespalten werden, welches über den Mas-Rezeptor zur Vasodilatation von Gefäßen, zur Natriurese, Antiproliferation und zur Protektion des Herzens führt (Stanton, 2003). Durch ACE wird Ang-(1-7) inaktiviert (Atlas, 2001).

Neben dem klassischen systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System gibt es auch lokale Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systeme, welche in der Niere, im Herz und im Gehirn gefunden wurden (Carey and Siragy, 2003; MacKenzie et al., 2002). Im Vergleich zur Plasma-Konzentration von Angiotensin II sind diese lokalen Systeme für deutlich höhere Konzentrationen von Angiotensin II in den Organen verantwortlich (Agarwal et al., 2004).

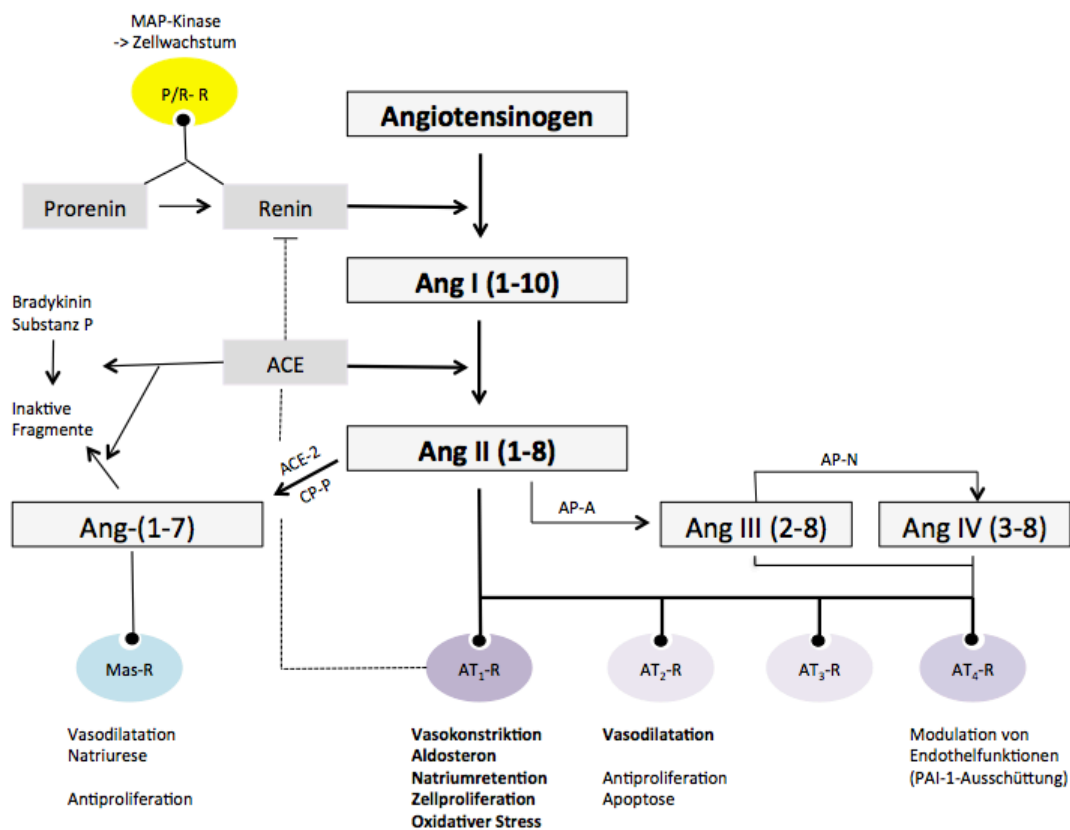


Abb. 09: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Angiotensinogen wird durch Renin zu Angiotensin I gespalten. Angiotensin I wird durch ACE zu Angiotensin II gespalten. Angiotensin II kann an 4 verschiedenen Rezeptoren binden und somit verschiedene Funktionen (z.B.: Vasokonstriktion von Gefäßen, Erhöhung der Aldosteron-Ausschüttung, Renin-Ausschüttung in der Niere hemmen und Aktivierung der NOX4) ausführen. Angiotensin II kann zu Ang-(1-7), Angiotensin III oder Angiotensin IV gespalten werden, die diese Funktionen unterstützen bzw. ihnen entgegenwirken. P/R-R: Prorenin/Renin-Rezeptor, Ang: Angiotensin, ACE: Angiotensin-konvertierende Enzym, AngII: Angiotensin II, ACE2: Angiotensin-konvertierende Enzym 2, CP-P: Carboxypeptidase P, AP-A: Aminopeptidase A, AP-N: Aminopeptidase N, AT-R: Angiotensin- Rezeptor Subtyp, Mas-R: Mas-Rezeptor, PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, MAP: Mitogen-aktiviertes Protein (modifiziert nach Atlas, 2007).

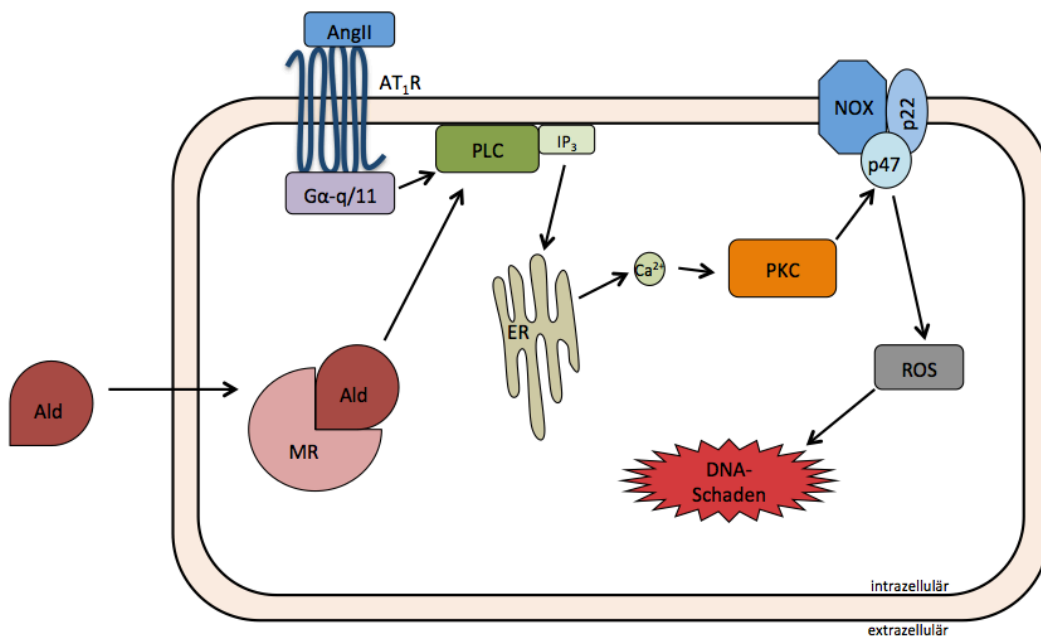


Abb. 10: Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Angiotensin II und Aldosteron

Nach der Bindung von Angiotensin II am AT1-Rezeptor kommt es zur Aktivierung von $G\alpha-q/11$ und dadurch zur Aktivierung der Phospholipase C. Aldosteron kann nach der Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor ebenfalls die Phospholipase C aktivieren. Die Phospholipase C produziert dann IP_3 , welches aus dem endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} freisetzen kann. Durch das Kalzium kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C, dieses ist in der Lage $p47^{phox}$ zu phosphorylieren. Nach Aktivierung der NADPH-Oxidase kommt es zur Bildung von ROS, welche DNA-Schäden hervorrufen können. Ald: Aldosteron, MR: Mineralokortikoidrezeptor, AngII: Angiotensin II, AT1-R: Angiotensin Rezeptor Typ 1, $G\alpha-q/11$: Guaninnukleotid-bindendes Protein q Polypeptid alpha 11, PLC: Phospholipase C, IP_3 : Inositol-1,4,5-triphosphat, ER: endoplasmatisches Retikulum, PKC: Proteinkinase C, ROS: reaktive Sauerstoffspezies (modifiziert nach Queisser, et al., 2010 und Fazeli et al., 2012).

1.4 Sirtuin1, Hitzeschockprotein70 und ihre Bedeutungen in Bezug auf oxidativen Stress und den Alterungsprozess

1.4.1 Sirtuin1 im Zusammenhang mit oxidativem Stress und Alterung

Sirtuine sind Proteine welche verschiedene Zellfunktionen, wie Genominstandhaltung, Langlebigkeit und Metabolismus regulieren. Bisher sind sieben menschliche Sirtuine bekannt. Sirtuin1 (Sirt1) deacetyliert dabei Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)-abhängig ε-amino-acetylierte Lysinreste von Proteinen (Milne and Denu, 2008). Es wird ubiquitär im Körper synthetisiert und kommt im Zytoplasma und im Zellkern vor. Sirt1 kann die Insulinsekretion in β-Zellen des Pankreas erhöhen, die Fettsäureoxidation in Leber- und Muskelzellen steigern, sowie die Gluconeogenese fördern und die Glycolyse in der Leber hemmen (Schwer and Verdin, 2008). Sirtuin1 kann zu DNA-Doppelstrangbrüchen wandern und dort DNA-Reparaturmechanismen aktivieren und das Genom stabilisieren (Oberdoerffer et al., 2008; Vijg et al., 2008). Sirt1 kann weiterhin die Gabelkopf-Box-Proteine (FOXO) 1, 3a und 4 aktivieren, welche wiederum DNA-Reparaturfaktoren und die mitochondriale Superoxid-Dismutase aktivieren können. Außerdem kann Sirt1 die apoptotischen Eigenschaften von p53 unter oxidativen Stress abschwächen (Baur, 2010). Es kann das Protein Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor gamma Koaktivator 1-alpha (PGC-1α) aktivieren, welches antioxidative Enzyme induzieren kann (Rodgers et al., 2005) und Sirt1 kann NFκB hemmen und somit die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch den Tumornektorsefaktor alpha (TNFα) verhindern (Shen et al., 2009). Diese Mechanismen führen zu einer Reduktion von oxidativen Stress und steigern die DNA-Reparaturmechanismen, z.B. bei DNA-Doppelstrangbrüchen.

1.4.2 Hitzeschockprotein70 und oxidativer Stress

Das Hitzeschockprotein70 (Hsp70) gehört zur Gruppe der Chaperone. Wörtlich genommen ist die Funktion eines Chaperones die einer zellulären Anstandsdame (engl. *chaperone*), Chaperone erleichtern die Proteinfaltung, verhindern Proteinaggregationen und helfen beim Abbau defekter Proteine (Hartl, 1996). Unter

zellulärem Stress, wie Hyperthermie oder oxidativen Stress werden Hitzeschockproteine vermehrt gebildet. Bei oxidativen Stress kommt es zur Oxidation von DNA, Lipiden und Proteinen. Oxidierte und pH-sensitive Proteine können dadurch falsch gefaltet werden (Fehrenbach and Northoff, 2001). Solche Proteine können den Hitzeschockfaktor 1 (HSF-1) aktivieren, wodurch wiederum Hsp70 aktiviert wird (Kiang and Tsokos, 1998). Hsp70 kann solche falsch gefalteten Proteine wieder korrekt falten, bzw. irreversibel geschädigte Proteine zum Proteasom befördern, in dem diese abgebaut werden (El Golli-Bennour and Bacha, 2011).

Des Weiteren ist Hsp70 an der Regulation von Abwehrmechanismen gegen Stress beteiligt, so ist es in Signaltransduktionswegen von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose involviert (Mayer and Bukau, 2005).

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, die Rolle der durch NADPH-Oxidasen produzierten reaktiven Sauerstoffspezies in der Pathophysiologie von Alterung und Bluthochdruck zu untersuchen. Dabei soll der Mechanismus der DNA-Schädigung durch ROS im Alterungsprozess und bei Bluthochdruck erarbeitet werden. Dafür werden zwei Tiermodelle, eines mit einer geringen ROS-Konzentration und eines mit einer hohen ROS-Konzentration, verwendet.

Zum einen soll die Bedeutung von ROS im Alterungsprozess analysiert werden, wofür junge und alte Wildtyp-Tiere miteinander verglichen werden. Zudem sollen gleichaltrige p47-Knockout-Tiere, welche einen Defekt der NOX2 aufweisen, mit jungen Wildtyp-Tieren verglichen werden, um die Rolle der NOX2 in den ROS-Spiegeln der Organe zu ermitteln. Dabei wird die Produktion von ROS, sowie die Entstehung von DNA-Schäden in der Niere und im Herz dieser Tiere untersucht. Des Weiteren wird in diesen Tieren der Einfluss von ROS auf die Expression von Sirtuin1 und Hsp70 im Gehirn und in der Niere untersucht.

Zum anderen soll der Mechanismus von DNA-Schädigung durch ROS bei Hypertonie untersucht werden. Hierfür werden ren2-Tiere, diese weisen ein doppeltes Renin-Gen auf und leiden somit an Hypertonie, und Wildtyp-Tiere miteinander verglichen. Dafür wurden die ren2-Tiere mit verschiedenen Medikamenten wie Ramipril, Apocynin und Tempol behandelt. Dabei soll die Konzentration von ROS und die Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere und im Herz dieser Tiere untersucht werden. Des Weiteren soll der Einfluss von Ramipril, ein ACE-Hemmer, Apocynin, ein NADPH-Oxidase-Hemmer und Tempol, ein Antioxidans, in Bezug auf die ROS-Konzentration und der Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere und im Herz dieser Tiere analysiert werden. Dabei soll die Auswirkung von oxidativen Stress auf DNA-Schäden im Vergleich von ren2-Tieren mit Kontrolltieren, sowie die Auswirkung von oxidativen Stress auf DNA-Schäden bei Bluthochdrucktieren mit unterschiedlicher Intervention untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substrat	Bezugsquelle
Aceton	Roth (Karlsruhe, D)
Ammoniumpersulfat	Bio Rad (München, D)
Avidin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bio Red Protein Assay	Bio Rad (München, D)
Biotin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bovine Serum Albumin	PAA (Pasching, A)
Citronensäure-Monophosphat	AppliChem (Darmstadt, D)
Chloroform	AppliChem (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
4,6-Diamidino-2-Phenylindole	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dihydroethidium	Merck Calbiochem (Darmstadt, D)
Dimethylsulfoxid	Roth (Karlsruhe, D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, D)

Substrat	Bezugsquelle
Ethanol 100%	Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin	Roth (Karlsruhe, D)
Hematoxilin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
HEPES	Roth (Karlsruhe, D)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumaluminiumsulfat	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumjodat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, D)
Mannitol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe, D)
Nonidet P40	AppliChem (Darmstadt, D)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pierce® Protein-Free T20 Blocking Buffer	Thermo Scientific (Waltham, USA)

Substrat	Bezugsquelle
Polyacrylamid	Roth (Karlsruhe, D)
Ponceau S	Roth (Karlsruhe, D)
RotiHistol	Roth (Karlsruhe, D)
RotiLoad1	Roth (Karlsruhe, D)
Saccharose	Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure 1M	Roth (Karlsruhe, D)
SDS	Roth (Karlsruhe, D)
Signal Stain®	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
TEMED	Roth (Karlsruhe, D)
Tris	AppliChem (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D)
Tween20	Roth (Karlsruhe, D)
Wasserstoffperoxid 3%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.2 Marker

Marker	Bezugsquelle
ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175kDa) P7709V	New England Biolabs (Ipswich, USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM0671	Fermentas Life Sciences (Waltham, USA)

2.1.3 Kits

Kit	Bezugsquelle
Halt™ Protease & Phosphatase Signal-Use Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Peroxidase Substrate Kit DAB SK-4100	Vector (Burlingame, USA)
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Vectastain® ABC Kit	Vector (Burlingame, USA)

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
HSP 70 (C92F3A-5)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Donkey anti-goat IgG-R	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Donkey anti mouse IgG-R	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Antikörper	Bezugsquelle
Donkey anti-rabbit IgG-B (SC-2089)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
SIRT1 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

2.1.5 Verbrauchsmaterial/ Material

Material	Bezugsquelle
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare (München, D)
Cellstar® Tubes	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Confocal Matrix	Micro-Tech-Lab (Graz, A)
Deckgläschen	Marienfeld (Lauda-Königshofen, D)
Einmalhandschuhe Latex	Roth (Karlsruhe, D)
Einmalhandschuhe Proline®Nitril/ Einmalhandschuhe Proline®Vinyl	ASID BONZ (Herrenberg, D)
Eukitt Mounting Medium	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ImmEdge™ Pen	Vector (Burlingame, USA)
Insulinspritzen RFF 300015 1ml	BD Plastipak™ (Franklin Lakes, USA)
Mini PROTEAN® System Comb, 10well, 1.0	Bio Rad (München, D)
Mini PROTEAN® System Glass Plates, Short Plates	Bio Rad (München, D)

Material	Bezugsquelle
Mini PROTEAN® System Glass Plates, Spacer Plates with 1.0mm spacers	Bio Rad (München, D)
Menzel-Gläser Superfrost®	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Objektträger	Hecht Assistent (Sondheim/Rhön, D)
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Roti®-PVDF Porengröße 0,45µm	Roth (Karlsruhe, D)
Tissue-Tek®	Sakura Finetek (Staufen, D)
Vectashield® Mounting Medium	Vector (Burlingame, USA)
Whatman® 3MM Chr	Whatman International Ltd.

2.1.6 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Cryostat Leica CM3050s	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
IKA-Combimag Ret	IKA Labortechnik (Staufen, D)
IKA-Wasserbad WA	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Kälteplatte Leica EG1140C	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
Kamera Fluoro Pro MP 5000	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen, D)

Gerät	Bezugsquelle
Microcomputer Electrophoresis Power Supply 500/500	Roth (Karlsruhe, D)
Mikrotom Leica RM2165	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
Mikroskop Eclipse 55i	Nikon (Düsseldorf, D)
Mini PROTEAN® Tetra Cell	Bio Rad (München, D)
Model 1000/500 Power Supply	Roth (Karlsruhe, D)
Paraffinstreckbad Typ 26811	Medax (Kiel, D)
Photometer Evolution 160	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Schüttler KL2	Edmund Bühler (Hechingen, D)
Schüttelwasserbad	Köttermann (Uetze/Hänigsen, D)
Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio Rad (München, D)
Universal 16R Kühlzentrifuge	Hettich (Tuttlingen, D)
Vortexer VF2	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Wärmestrecktisch	Medax (Kiel, D)

2.1.7 Puffer und Lösungen

2.1.7.1 Western Blot

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10% APS	1g APS 10ml VE-Wasser
20% Blotting Puffer	5,8g Tris 2,9g Glycin 3,7ml 10% SDS 200ml Methanol ad 1l VE-Wasser
1% BSA	1g BSA 100ml TBS-T
Homogenisationspuffer	1,82g Mannitol (0,2M) 0,86g Saccharose (50mM) 0,12g HEPES ad 50ml VE-Wasser pH 7,5 -Autoklavieren-
10x Laufpuffer	10g SDS 30,3g Tris 144,2g Glycin ad 1l VE-Wasser pH 8,3
5% Milchpulver	5g Milchpulver 100ml TBS-T

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10x PBS	80g NaCl 2g KCl 5,75g Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O 2g KH ₂ PO ₄ ad 1l VE-Wasser pH 7,4 -Autoklavieren-
PBS- T (0,2%)	1l 1x PBS 2ml Tween20
Ponceaurot- Färbelösung	250mg Ponceau S 45ml VE-Wasser 40ml Methanol 15ml Essigsäure
Ponceaurot- Entfärbelösung	82,5ml VE-Wasser 10ml Essigsäure 7,5ml Methanol
5% Sammelgel	3,8ml Roth-Wasser 0,63ml 1M Sammelgelpuffer 0,5ml 40% 1:29 Polyacrylamid 50µl 10% SDS 25µl 10% APS 10µl TEMED
Sammelgelpuffer 1M	12,11g Tris ad 100ml VE-Wasser pH 6,8 -Autoklavieren-

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10% SDS	5g SDS ad 50ml VE-Wasser
Stripping Puffer	10ml 10% SDS 3,125ml 1M Tris ad 50ml VE-Wasser pH 6,8 345µl Mercaptoethanol
10x TBS	60,5g Tris 90g NaCl ad 1l VE-Wasser pH 7,5 -Autoklavieren-
TBS- T (0,05%)	1l 1x TBS 0,5ml Tween 20
12,5% Trenngel	2,95ml Roth-Wasser 3,75ml 1M Trenngelpuffer 3,15ml 40% 1:29 Polyacrylamid 100µl 10% SDS 50µl 10% APS 5µl TEMED
Trenngelpuffer 1M	36,33g Tris ad 300ml VE-Wasser pH 8,8 -Autoklavieren-

2.1.7.2 Gewebefärbung

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Bisbenzimid-Färbelösung	1ml Bisbenzimidstammlösung 199ml PBS
Bisbenzimid-Stammlösung	20mg Bisbenzimid 20ml DMSO
Blockierlösung	500µl Serum 9,5ml 1x PBS
Citratpuffer	1,05g Citronensäure-Monohydrat ad 500ml VE-Wasser pH 6,0
Hämatoxin-Färbelösung	1g Hämatoxin in 48ml Isopropanol 51,9ml VE-Wasser 50ml Glycerin 1,5g Kaliumaluminiumsulfat 5ml Essigsäure 0,2g Kaliumjodat
1M Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	14,2g Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O 100ml VE-Wasser
1M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	12g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 100ml VE-Wasser
Natriumphosphat-Puffer pH 7,5	80,9 ml 1M Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O 19,1ml 1M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O

2.2 Tiermodelle

2.2.1 P47-Knockout-Mausmodell

Für die Versuche wurde ein Tiermodell mit Mäusen verwendet. Hierfür standen p47-Knockout-Mäuse, alte sowie junge Wildtyp-Mäuse (black-6(BL6)-Mäuse) zur Verfügung. Davon waren sechs Wildtyp-Tiere 57 Wochen, sechs Wildtyp-Tiere 25 Wochen und fünf Knockout-Tiere (phox- Mäuse) 24 Wochen alt (siehe Tabelle 01). Die phox-Knockout-Tiere weisen einen homozygoten Knockout in p47 auf, ein Bestandteil der NOX2. Durch den Knockout kommt es zu einer Inaktivierung der NOX2 und zu einer geringeren Produktion von ROS und damit zu einer geschwächten Abwehr gegenüber Bakterien. Der Knockout in p47 entspricht dem Krankheitsbild der septischen Granulomatose (Jackson et al., 1995; Lambeth, 2004). Von den Tieren wurde jeweils das Gehirn, Herz und Niere untersucht. Die Organe waren entweder gefroren oder in Paraffin eingebettet.

Tier Nr.	Art	Geschlecht	Geburt	Abgang	Genotyp p47
2	WT alt	w	24.05.2009	30.06.2010	+/+
3	WT alt	w	24.05.2009	30.06.2010	+/+
4	WT alt	w	24.05.2009	30.06.2010	+/+
6	WT alt	w	24.05.2009	13.07.2010	+/+
7	WT alt	m	21.05.2009	30.06.2010	+/+
8	WT alt	m	21.05.2009	30.06.2010	+/+
46	KO jung	w	23.03.2010	06.09.2010	-/-
50	KO jung	w	27.03.2010	06.09.2010	-/-
53	KO jung	w	27.03.2010	06.09.2010	-/-
54	KO jung	w	27.03.2010	07.09.2010	-/-
55	KO jung	w	27.03.2010	07.09.2010	-/-
87	WT jung	w	12.03.2010	06.09.2010	+/+
88	WT jung	w	12.03.2010	06.09.2010	+/+
89	WT jung	w	12.03.2010	06.09.2010	+/+

90	WT jung	w	12.03.2010	07.09.2010	+/+
91	WT jung	w	12.03.2010	07.09.2010	+/+
92	WT jung	w	12.03.2010	07.09.2010	+/+

Tabelle 01: Liste der Wildtyp- und p47-Knockout-Tiere

WT: Wildtyp-Tier, KO: Knockout-Tier.

2.2.2 Ren2-Knock-in-Rattenmodell

Für die Versuche wurde ein Tiermodell mit Ratten verwendet. Es handelt sich um TGR(mREN2)27-Ratten (ren2-Ratten), die zu ihrem eigenen Renin-Gen ein zusätzliches Renin-Gen von der Maus aufweisen (Mullins et al., 1990) und um Wildtyp-Crl:CD(Sprague Dawley)-Ratten (SD-Ratten) als Negativkontrolle. Die ren2-Ratten waren von Prof. Dr. Michael Bader aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch zur Verfügung gestellt worden. Ren2-Tiere erkrankten ohne Behandlung an Hypertonie mit Werten bis zu 255mmHg. Die Tiere waren ab der achten Woche mit unterschiedlichen Medikamenten behandelt. Sieben Tiere waren mit Ramipril, einem ACE-Inhibitor, behandelt. Durch die Hemmung des Angiotensin-konvertierende Enzym, welches Angiotensin I in Angiotensin II spaltet, kommt es zu einer geringeren Entstehung von Angiotensin II und darum zu einer verminderten Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Ramipril wird bei Patienten als Antihypertensivum eingesetzt (Frampton and Peters, 1995). Sechs Tiere waren mit Apocynin, einem NADPH-Oxidase-Inhibitor, behandelt. Apocynin hemmt die Transkription von p67^{phox} und p47^{phox} und somit inhibiert es die Aktivierung der NOX2 (Stolk et al., 1994). Sechs Tiere waren mit Tempol, einem Antioxidans behandelt. Tempol ist ein Nitroxid und kann toxische Superoxidanionen, ähnlich wie die Superoxid-Dismutase, in Wasserstoffperoxid verwandeln (Wilcox and Pearlman, 2008). Sechs weitere Tiere waren als Placebo-Kontrollgruppe nur mit Wasser behandelt (siehe Tabelle 02 und 03). Zehn Wochen nach der Geburt war damit begonnen wurden das Körpergewicht und den Blutdruck der Tiere zu bestimmen. In der 12. Woche wurden die Organe der Tiere entnommen,

für die Versuche wurden jeweils das Herz und die Nieren verwendet. Die Organe wurden entweder gefroren oder in Paraffin eingebettet.

Gruppe	Stamm	Intervention	Tierzahl	Bezeichnung
Kontrolle	CrI:CD(SD)	nein	7	SD
Ramipril	ren2	1mg/kg/d Ramipril	7	ACEi
Wasser	ren2	nein	6	Hochdruck
Apocynin	ren2	50mg/kg/d Apocynin	7	Apo
TEMPOL	ren2	3mM Tempol im Trinkwasser	5	Tempol

Tabelle 02: Interventionen und Bezeichnung der ren2- und SD-Ratten

SD: Wildtyp(SD)-Ratten, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten.

Tier Nr.	Intervention	Stamm	Geburt	Abgang
1	SD	CrI:CD(SD)	01.02.2011	29.04.2011
2	ACEi	ren2	05.02.2011	29.04.2011
3	Hochdruck	ren2	05.02.2011	29.04.2011
6	Apo	ren2	05.02.2011	29.04.2011
9	SD	CrI:CD(SD)	01.02.2011	29.04.2011
10	ACEi	ren2	05.02.2011	29.04.2011
11	Hochdruck	ren2	05.02.2011	29.04.2011
14	Apo	ren2	05.02.2011	29.04.2011
17	SD	CrI:CD(SD)	25.04.2011	18.07.2011
18	ACEi	ren2	28.04.2011	18.07.2011
19	Hochdruck	ren2	28.04.2011	18.07.2011
22	Apo	ren2	26.04.2011	18.07.2011
23	Tempol	ren2	26.04.2011	18.07.2011
24	SD	CrI:CD(SD)	25.04.2011	18.07.2011
25	ACEi	ren2	26.04.2011	18.07.2011

26	Hochdruck	ren2	26.04.2011	18.07.2011
29	Apo	ren2	26.04.2011	19.07.2011
30	Tempol	ren2	26.04.2011	19.07.2011
31	SD	CrI:CD(SD)	25.04.2011	19.07.2011
32	ACEi	ren2	26.04.2011	19.07.2011
33	Hochdruck	ren2	26.04.2011	18.07.2011
36	Apo	ren2	26.04.2011	19.07.2011
37	Tempol	ren2	26.04.2011	19.07.2011
38	SD	CrI:CD(SD)	25.04.2011	20.07.2011
39	ACEi	ren2	26.04.2011	20.07.2011
40	Hochdruck	ren2	28.04.2011	20.07.2011
43	Apo	ren2	28.04.2011	20.07.2011
44	Tempol	ren2	28.04.2011	20.07.2011
45	SD	CrI:CD(SD)	25.04.2011	20.07.2011
46	ACEi	ren2	28.04.2011	20.07.2011
50	Apo	ren2	28.04.2011	20.07.2011
51	Tempol	ren2	28.04.2011	20.07.2011

Tabelle 03: Liste der ren2- und SD-Tiere

SD: Wildtyp(SD)-Ratten, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten.

2.3 Methoden

2.3.1 Pulverisieren von tierischem Gewebe

Das Pulverisieren von tierischem Gewebe dient dazu Proteine aus einem Gewebe isolieren zu können. Dafür wurde tierisches Gewebe mit Hilfe von flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mittels eines Mörsers pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde anschließend in Röhrchen tiefgefroren. Der Mörser wurde vor jeder Pulverisierung mit Chloroform gereinigt.

2.3.2 Isolierung von Proteinen aus pulverisierten tierischem Gewebe

Für die Isolierung von Proteinen wurde ein Spatel des gemörserten Gewebes in 200µl Homogenisationspuffer gegeben und mittels Vortexer vermischt. Anschließend wurde das Gewebe mit einer Insulinspritze zehnmal auf- und abgezogen und in einer Zentrifuge 30min bei 4°C und 14000rpm abzentrifugiert. Der Überstand, mit dem darin enthaltenem Protein, wurde aus den Eppis entnommen und bei -20°C eingefroren. Der Rest wurde verworfen.

2.3.3 Bradford Assay

Der Bradford Assay ist eine Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer bestimmten Lösung. Dabei werden Proteinlösungen mit Coomassie Brilliant Blau G-250 gemischt. Binden Proteine an die Coomassie-Lösungen kommt es zu einer Veränderung des Absorptionsmaximums von 465nm auf 595nm, welches photometrisch bestimmt werden kann (Bradford, 1976).

Dafür wurden 14 Standardproben (0µg, 2µg, 4µg, 8µg, 12µg, 16µg und 20µg BSA) hergestellt. Jeweils zweimal wurde hierfür BSA in 800µl VE-Wasser gelöst. Die zu bestimmenden Proteinproben wurden 1:10 verdünnt und je dreimal 5µl der 1:10 Verdünnung in 795µl VE-Wasser und je dreimal 10µl der 1:10 Verdünnung in 790µl VE-Wasser verdünnt. Zu den Standardproben und den Proteinproben wurde zuletzt 200µl der Bradford-Reagenz gegeben, verrührt und anschließend bei 595nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mithilfe von Excel ausgewertet.

2.3.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Bestimmung von spezifischen Proteinen. Dabei werden als erstes Proteine in einer bestimmten Probe mittels einer Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen (geblottet). Das Natriumdodecylsulfat (SDS) negativiert dabei die

Ladungen der Proteine, sodass sie während der Elektrophorese allein nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Nach den Blotten wird die Membran mit einem Antikörper gegen das zu bestimmende Protein inkubiert und danach wird ein sekundärer Antikörper, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist und eine Peroxidaseaktivität besitzt, dazugegeben. Durch eine Chemilumineszenz-Reaktion kann das Protein anschließend beispielsweise mittels eines Films dargestellt werden (Burnette, 1981).

Die Polyacrylamidgele wurden einen Tag zuvor gegossen. Dafür musste zuerst die Apparatur mit Ethanol gereinigt und die Sammelgellösung bis zu einer Höhe von 2/3 hineingefüllt und mit einem 1:1 Isopropanol-Wasser-Gemisch versetzt werden, um eine gerade Kante zu erhalten. Nach Auspolymerisation des Gels konnte das Isopropanol-Wasser-Gemisch abgeschüttet und mit der Sammelgellösung bis zur oberen Kante befüllt und der Kamm hinengesetzt werden. Nach erneuter Auspolymerisation wurden die Gele, damit sie nicht austrockneten, in Frischhaltefolie gewickelt und im Kühlschrank gelagert.

Jede Tasche der Polyacrylamidgele wurde mit 50µg Protein beladen, dafür wurden die entsprechenden Mengen der Proben, deren Proteingehalt zuvor mittels Bradford Assay bestimmt wurde, mit Homogenisationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 15µl aufgefüllt und anschließend mit 5µl RotiLoad versetzt, bei 95°C für 5min gekocht und sofort auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert.

Die Gele konnten in eine Kammer gesetzt werden, welche mit 1x Laufpuffer befüllt wurde. Eventuell entstandene Luftblasen mussten dabei entfernt werden. Anschließend wurden die Taschen der Gele mit je 5µl des PAGE-Ruler und je 20µl der Proben befüllt, leere Taschen wurden mit 20µl Homogenisationspuffer befüllt. Die Elektrophorese wurde zuerst bei einer Spannung von 100V durchgeführt, bis die Proben in das Sammelgel gelaufen waren. Danach konnte die Spannung auf 200V erhöht werden. Die SDS-Page wurde bei 4°C durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde ein Semi-dry Blot durchgeführt, dazu wurden 8x10cm große Whatman®-Papier mit Blotting Puffer benetzt. Eine 9x7cm große PVDF-Membran wurde kurz in Methanol getaucht und dann 10min in Blotting Puffer gelegt. Die Polyacrylamidgele wurden ebenfalls 10min in Blotting Puffer gelegt. Dann wurden drei Whatman®-Papiere aufeinander in die Blottingmaschine

gelegt, darauf die PVDF-Membran, darauf das Gel und zum Schluss nochmals drei Whatman®-Papiere. Das Gerät wurde bei einem Gel bei 50mA, bei zwei Gelen bei 101mA 90min laufen gelassen.

Anschließend wurden die Membranen 10min mit einer Ponceaurot-Lösung gefärbt und danach 5min mit einem Entfärber entfärbt und kurz in PBS gewaschen, um die Proteinverteilung zu sehen. Die Proteinverteilung auf der Membran wurde durch kopieren dokumentiert.

Die Membranen wurden dann entweder in 5%iger Milchpulverlösung oder in 1%igem BSA über Nacht bei 4°C bzw. in Blocking Buffer für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

Danach wurden die Membranen kurz in TBS-T gewaschen und mit dem ersten Antikörper, welcher in 5%iger Milchpulverlösung oder 1%igem BSA oder TBS-T verdünnt wurde, bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Membranen 3x 10min in TBS-T gewaschen und mit dem zweiten Antikörper, welcher in 5%iger Milchpulverlösung oder 1%igem BSA oder TBS-T verdünnt wurde, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen nochmals 3x 10 min in TBS-T gewaschen.

Anschließend wurden Luminol Reagentien A und B 1:1 gemischt und die Membran damit einmassiert. In der Dunkelkammer konnte dann ein Film damit belichtet werden.

Danach konnten die Membranen in Stripping Puffer für 30min in einem 50°C heißem Wasserbad geschüttelt werden und danach nochmals mit einem anderen Antikörper inkubiert werden.

2.3.5 Immunohistochemiefärbung auf Paraffinschnitten

Die Avidin-Biotin-Immunohistochemiefärbung ist ein Verfahren zur Darstellung von bestimmten Antigenen auf Gewebeschnitten. Dabei wird mit einem primären Antikörper das zu bestimmende Antigen markiert. Ein sekundärer biotinilierter Antikörper bindet an den primären Antikörper. Anschließend wird ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex dazugegeben. Durch eine Farbreaktion, beispielsweise

mittels Diaminobenzidin kann das Präparat lichtmikroskopisch ausgewertet werden (Hsu et al., 1981; Key, 2009) (siehe Abb. 11).

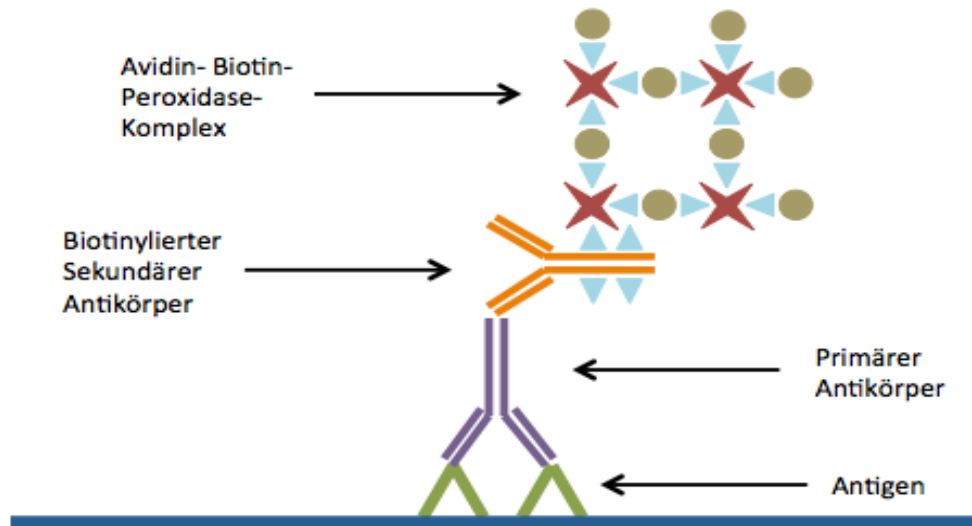


Abb. 11: Avidin-Biotin-Färbung
(modifiziert nach Key, 2009).

Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und getrocknet. Anschließend wurden die Paraffinblöcke in 2µm dicke Paraffinschnitte geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Die 2µm dicken Paraffinschnitte wurden 60min bei 60°C erwärmt. Danach wurden sie entparaffiniert, dazu wurden sie je 3x 4min in Roti-Histol, 3x 2min in 100%iges Ethanol und 1x 2min in 70%iges Ethanol getaucht. Danach konnten sie 3x 2min mit PBS gewaschen und anschließend im heißen Citratpuffer in der Mikrowelle für 15min gekocht werden. Anschließend wurden die Objektträger 30min im Citratpuffer stehen gelassen um abzukühlen. Die Schnitte wurden nochmals 2x 5min mit PBS gewaschen, mit einem Fettstift umrandet und mit 100µl Blockierlösung 60min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer geblockt und danach nochmals 3x 3min mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden dann mit 3%igem Wasserstoffperoxid 15min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur behandelt um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren und danach nochmals 3x 3min in PBS gewaschen. Anschließend wurde 15min mit 0,001%iger Avidinlösung in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert, um endogene Biotine zu blocken und danach 2x 5min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden für 15min mit 0,001%iger

Biotinlösung in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert, um endogene Avidine zu blocken und danach nochmals 2x 5min in PBS gewaschen. Dann wurde 100µl des Primärantikörpers in Signal Stain® 1:200 verdünnt auf die Proben gegeben und bei 4°C über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3x 5min mit PBS gewaschen und anschließend 100µl des Sekundärantikörpers in PBS 1:200 verdünnt, auf die Schnitte gegeben und bei Raumtemperatur 45min in einer Feuchtkammer inkubiert. Danach wurden sie 3x 5min in PBS gewaschen und anschließend 30min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer mit ABC-Reagenz inkubiert und wiederum 2x 5min gewaschen und 4min mit DAB-Reagenz gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte zehnmal in eine Küvette mit Leitungswasser getaucht, darauf zehnmal in eine zweite Küvette mit Leitungswasser und danach für 5min in einer dritten Küvette mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Schnitte für 2min mit Hämatoxilin gegengefärbt und für 5min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zum Entwässern wurden die Schnitte für 1x 1min in 70%iges Ethanol, 4x 2min in 100%iges Ethanol, 1x 2min in Roti-Histol und 2x 3min in Roti-Histol getaucht. Am Schluss wurden sie mit Eukitt eingedeckt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

2.3.6 DHE-Färbung auf Gefrierschnitten

Die Dihydroethidium (Hydroethidin)-Färbung ist eine spezifische Methode zur Bestimmung von Superoxidionen. Superoxidionen können DHE zu Ethidium oxidieren (Georgiou et al., 2008) (siehe Abb. 12). Das so entstandene Ethidium kann fluoreszieren (Benov et al., 1998; Tarpey and Fridovich, 2001).

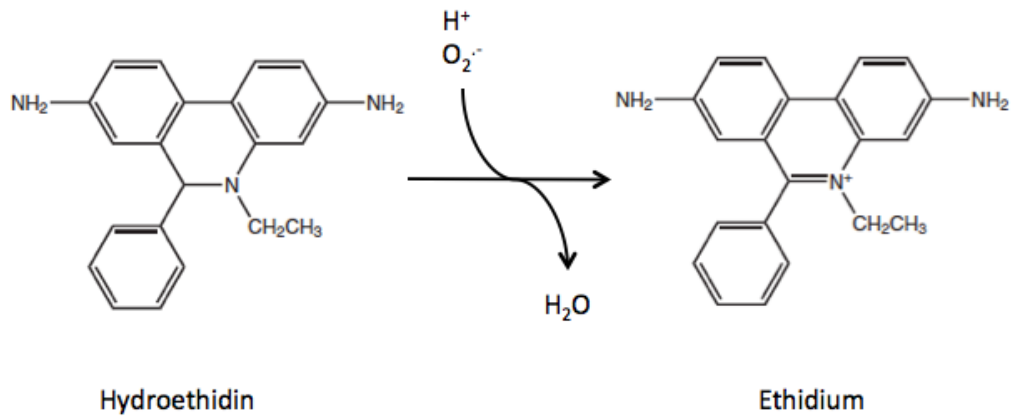


Abb. 12: Reaktion von Dihydroethidium mit Superoxidionen

H^+ : Wasserstoffion, O_2^- : Superoxidion, H_2O : Wasser (modifiziert nach Georgiou et al., 2008).

Das Gewebe wurde in Tissue-Tek® eingebettet und bei -80°C gefroren. Anschließend wurden die Gewebeproben in $14\mu\text{m}$ bzw. $5\mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte geschnitten, auf Objektträgern fixiert und sofort bei -80°C eingefroren. Die DHE-Stammlösung wurde 1:5000 mit Millipore-Wasser verdünnt. Die $14\mu\text{m}$ bzw. $5\mu\text{m}$ dicken Gefrierschnitte wurden entweder direkt oder am nächsten Tag aufgetaut und 20min mit $200\mu\text{l}$ der DHE-Lösung behandelt, mit einem Objektglas eingedeckt und danach sofort unter dem Mikroskop ausgewertet.

2.3.7 Auswertung der Färbungen

Die DHE-Färbung wurde mit CellProfiler2.0 (Broad Institute, Cambridge, United Kingdom) ausgewertet.

Bei der Immunohistochemiefärbung wurde die Gesamtzellzahl der Schnitte mit CellProfiler2.0 (Broad Institute, Cambridge, United Kingdom) bestimmt und die positiven Zellen per Hand ausgezählt.

2.3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Excel 2011 Version 14.0 (Microsoft, Redmond, Vereinigte Staaten) vorgenommen.

Die Signifikanz wurde mithilfe von Statistica 8 (StatSoft (Europe) GmbH, Hamburg, Germany) berechnet. Dazu wurde für die einzelnen Gruppen der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse aus dem p47-Knockout-Tiermodell

3.1.1 Konzentration von ROS in Niere und Herz

Zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde eine Dihydroethidium (DHE)-Färbung in den p47-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen in der Niere und im Herz durchgeführt.

In der Niere kann kein signifikanter Unterschied zwischen den jungen Wildtyp- und Knockout-Mäusen festgestellt werden. Es lässt sich ein nicht signifikanter Unterschied beobachten, nämlich dass die Knockout-Tiere einen 25% geringeren Mittelwert in der ROS-Konzentration gegenüber gleichaltrigen Wildtyp-Tieren haben. Alte Wildtyp-Tiere zeigen einen 16% geringeren Mittelwert im Vergleich zu jungen Wildtyp-Tieren, der aufgrund der interindividuellen Unterschiede nicht signifikant ist (siehe Abb. 13 und Abb. 14).

Im Herz zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen jungen Wildtyp- und Knockout-Tieren. Es lässt sich jedoch ein 14% geringerer Mittelwert bei jungen Wildtyp-Tieren gegenüber gleichaltrigen p47-Knockout-Tieren zeigen, welcher aufgrund interindividueller Variationen keinen signifikanten Effekt ergibt. Junge Wildtyp-Tiere zeigen lediglich einen 7% geringeren Mittelwert der ROS-Konzentration im Vergleich zu alten Wildtyp-Mäusen, welcher auch hier wegen interindividuellen Unterschieden nicht signifikant ist (siehe Abb. 15 und Abb. 16).

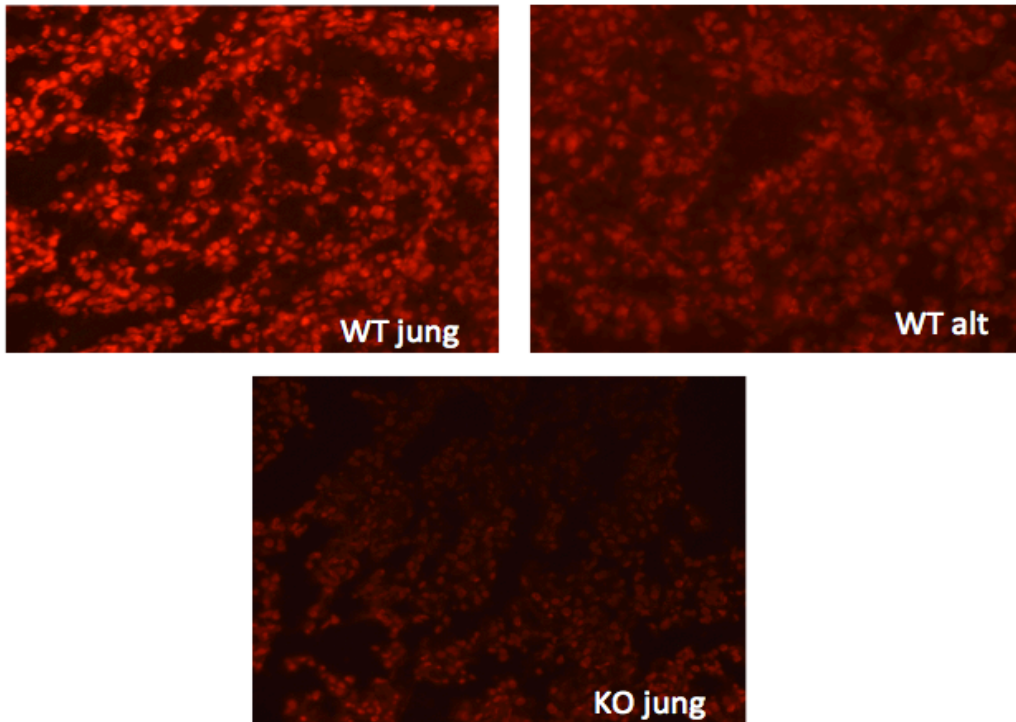


Abb. 13: Färbung von Schnitten der Niere mit DHE zur Detektion von Superoxidionen in phox- und Wildtyp-Mäusen

WT jung: junge Wildtyp-Mäuse, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse, KO jung: p47-Knockout-Mäuse.

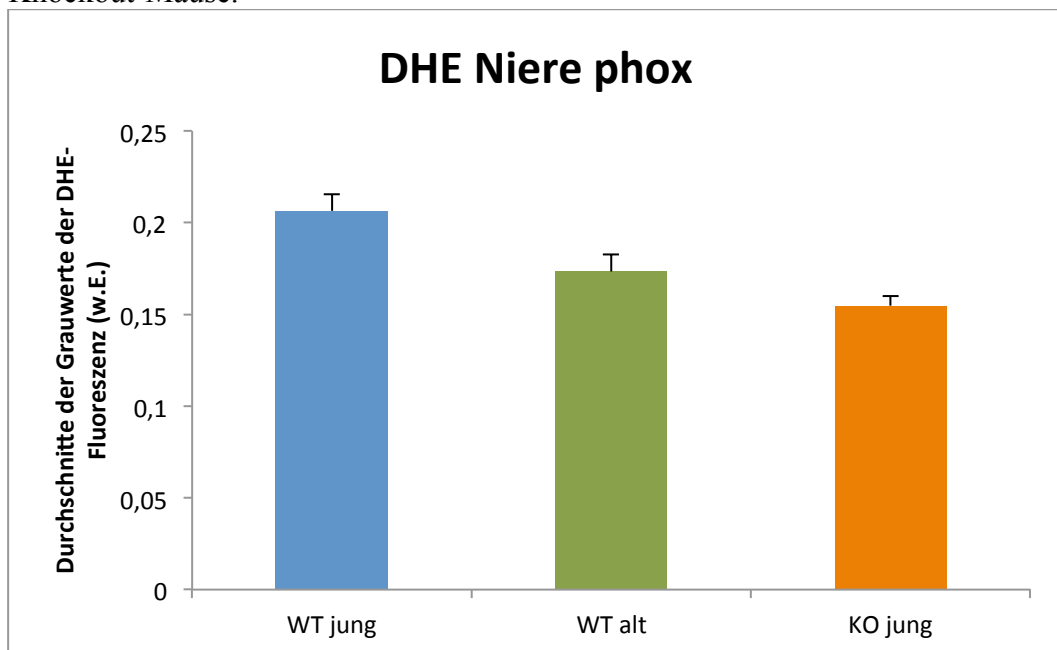


Abb. 14: Durchschnitte der Grauwerte der DHE-Fluoreszenz (w.E.) in der Niere von phox- und Wildtyp-Mäusen

Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. DHE: Dihydroethidium, WT jung: junge Wildtyp-Mäuse n=6, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse n=6, KO jung: p47-Knockout-Mäuse n=5.

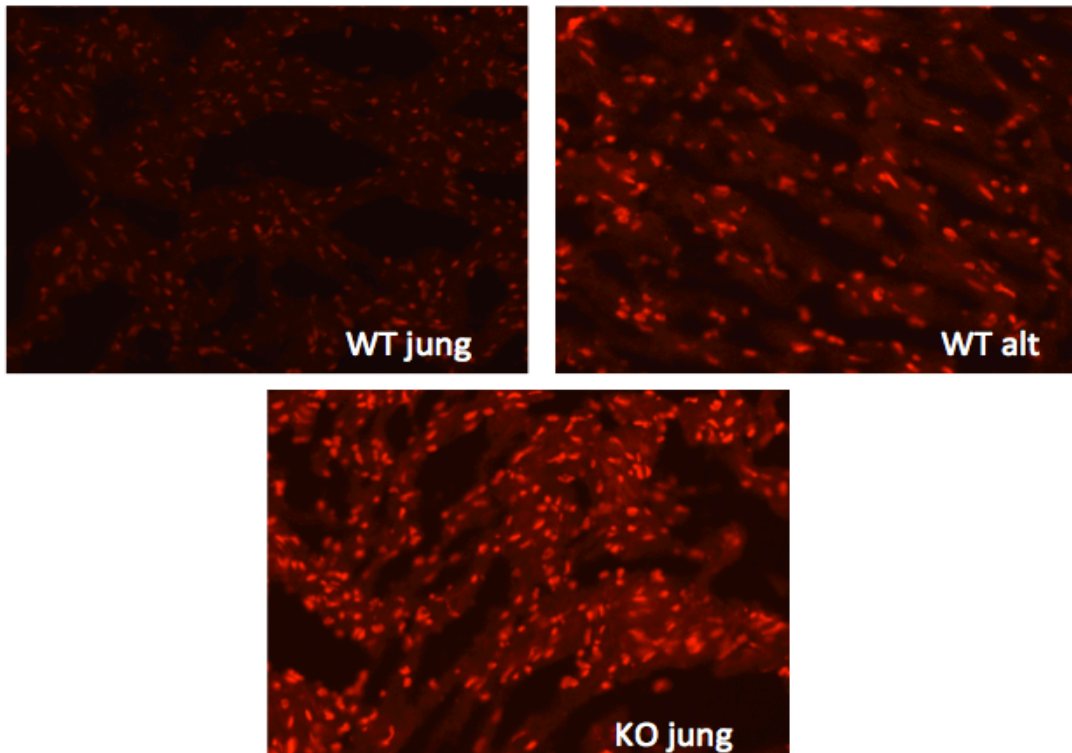


Abb. 15: Färbung von Schnitten des Herzens mit DHE zur Detektion von Superoxidionen in phox- und Wildtyp-Mäusen

WT jung: junge Wildtyp-Mäuse, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse, KO jung: p47-Knockout-Mäuse.

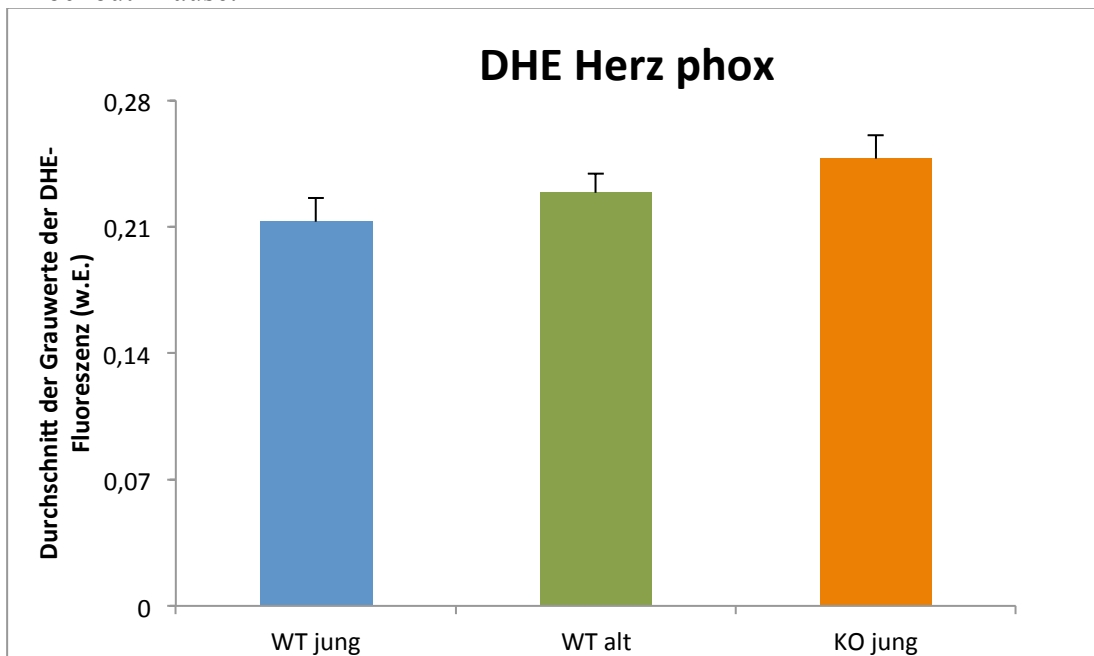


Abb. 16: Durchschnitt der Grauwerte der DHE-Fluoreszenz (w.E.) im Herz von phox- und Wildtyp-Mäusen

Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. DHE: Dihydroethidium, WT jung: junge Wildtyp-Mäuse n=6, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse n=6, KO jung: p47-Knockout-Mäuse n=5.

3.1.2 DNA-Doppelstrangbrüche in Niere und Herz

Zur Bestimmung der DNA-Doppelstrangbrüche wurde eine Immunhistochemiefärbung gegen γ H2AX durchgeführt. Hierfür wurden ebenfalls die p47-Knockout-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen, sowohl im Herz als auch in der Niere verglichen.

In der Niere kann dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den jungen Wildtyp-Mäusen und den jungen Knockout-Mäusen festgestellt werden, dabei weisen Knockout-Tiere weniger DNA-Doppelstrangbrüche als Wildtyp-Tiere auf. Ein Unterschied zwischen den jungen und alten Wildtyp-Mäusen kann ebenfalls gezeigt werden, dieser ist jedoch nicht signifikant. Hier haben junge Tiere einen 36% geringeren Mittelwert an DNA-Doppelstrangbrüchen als alte Wildtyp-Tiere (siehe Abb. 17 und Abb. 18).

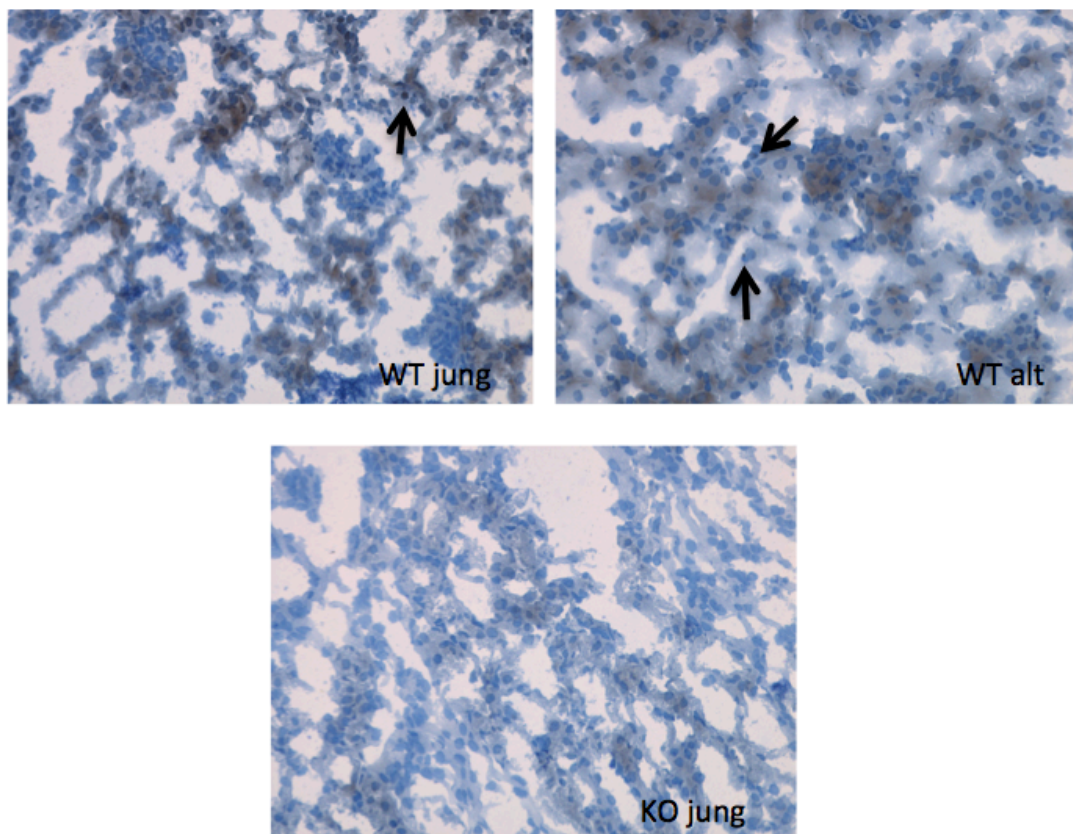


Abb. 17: Anti- γ H2A.X-Gewebefärbungen in der Niere von p47- und Wildtyp-Mäusen

Die Pfeile markieren positive Kerne. WT jung: junge Wildtyp-Mäuse, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse, KO jung: p47-Knockout-Mäuse.

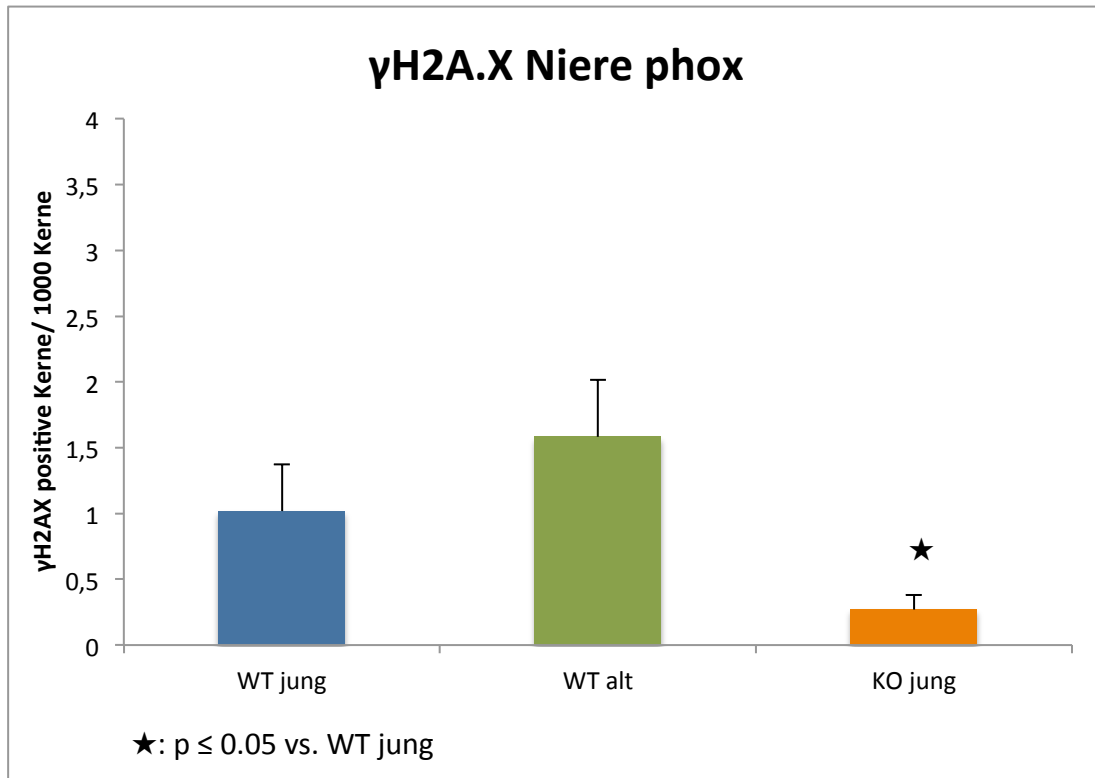


Abb. 18: DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere von phox- und Wildtyp-Mäusen

Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. WT jung: junge Wildtyp-Mäuse n=6, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse n=6, KO jung: p47-Knockout-Mäuse n=5.

★ $p \leq 0.05$ vs. WT jung.

Im Herz kann ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den jungen Wildtyp-Mäusen und den jungen Knockout-Mäusen gezeigt werden. Hier weisen p47-Knockout-Tiere eine geringere Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen auf als gleichaltrige Wildtyp-Tiere. Eine nicht signifikante Tendenz zeigt sich auch zwischen jungen und alten Wildtyp-Tieren, dabei besitzen junge Wildtyp-Tiere weniger DNA-Doppelstrangbrüche als alte Wildtyp-Tiere (siehe Abb. 19 und Abb. 20).

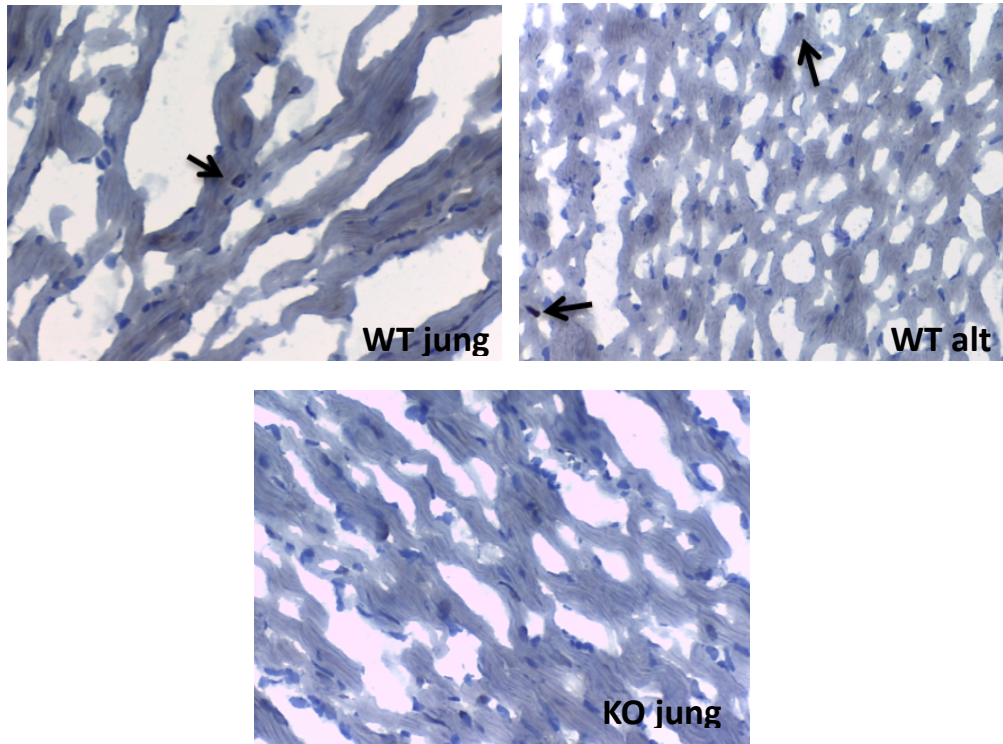


Abb. 19: Anti- γ H2A.X-Gewebefärbungen im Herz von *phox*- und Wildtyp-Mäusen

Die Pfeile markieren positive Kerne. WT jung: junge Wildtyp-Mäuse, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse, KO jung: p47-Knockout-Mäuse.

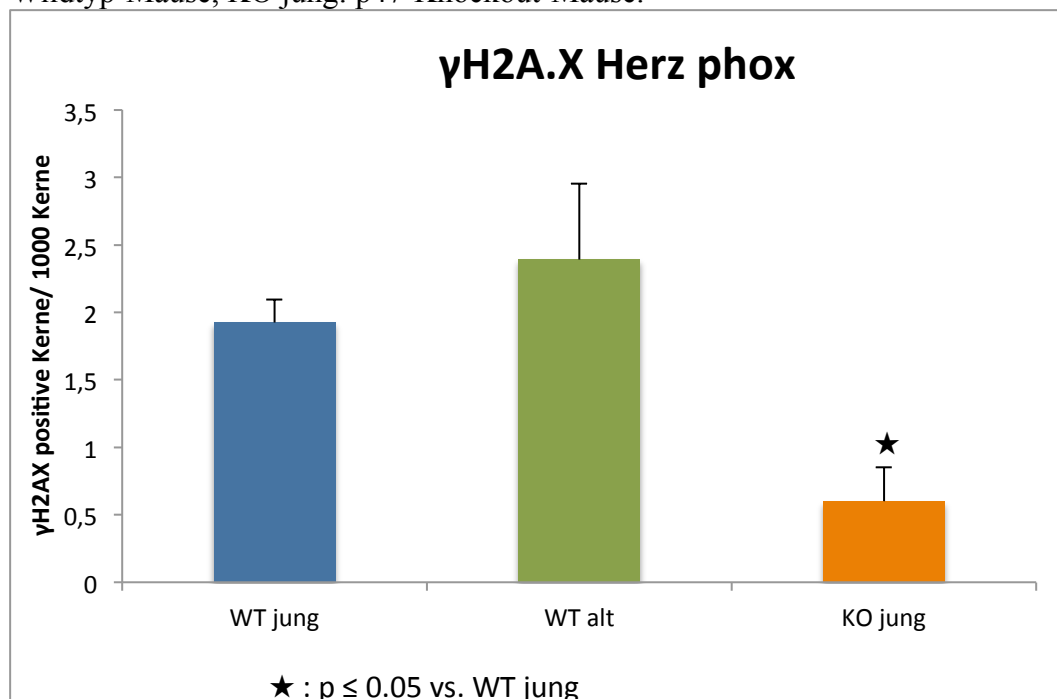


Abb. 20: DNA-Doppelstrangbrüche im Herz von *phox*- und Wildtyp-Mäusen

Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. WT jung: junge Wildtyp-Mäuse $n=6$, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse $n=6$, KO jung: p47-Knockout-Mäuse $n=5$.

★ $p \leq 0.05$ vs. WT jung.

3.1.3 Expression von Sirtuin1 im Gehirn und der Niere

Zur Bestimmung der Sirtuin1-Expression wurde die Methode des Western Blots verwendet. Dafür wurde die 75kDa große Form des Sirtuin1 bestimmt (Dvir-Ginzberg et al., 2011).

In dem durchgeführten Western Blot im Gehirn kann kein Unterschied in der Konzentration von Sirtuin1 zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Nur interindividuelle Unterschiede sind zu erkennen (siehe Abb. 21).

Auch in der Niere kann kein Unterschied in der Konzentration von Sirtuin1 gezeigt werden. Hier sind ebenfalls nur interindividuelle Unterschiede zu sehen (siehe Abb. 22).

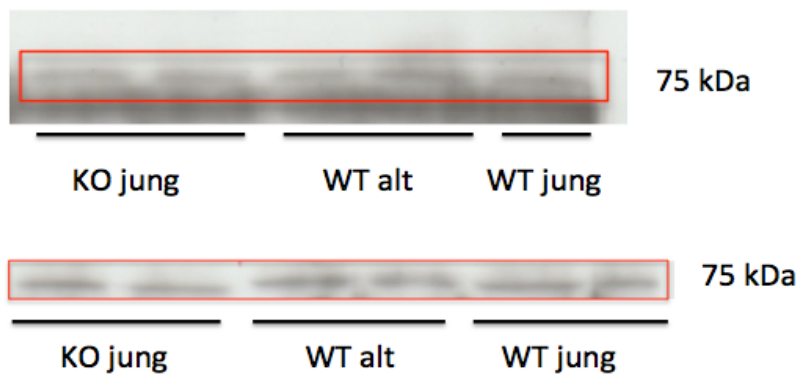


Abb. 21: Expression von Sirtuin1 im Gehirn von phox- und Wildtyp-Mäusen
WT jung: junge Wildtyp-Mäuse, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse, KO jung: p47-Knockout-Mäuse.

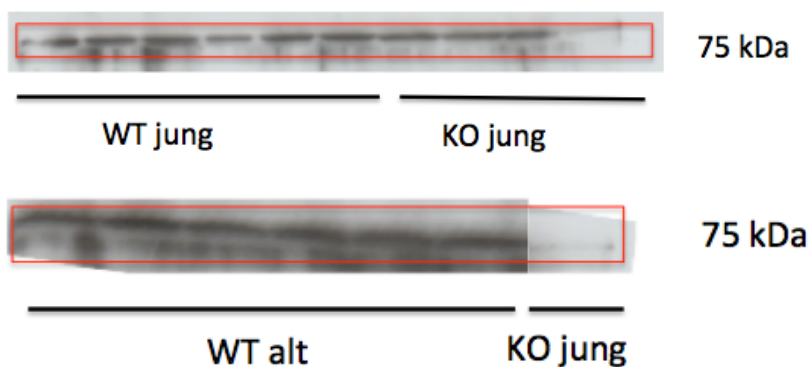


Abb. 22: Expression von Sirtuin1 in der Niere von phox- und Wildtyp-Mäusen
WT jung: junge Wildtyp-Mäuse, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse, KO jung: p47-Knockout-Mäuse.

3.1.4 Expression von Hsp70 in der Niere

Zur Expressionsbestimmung von Hsp70 in der Niere wurde ebenfalls die Methode des Western Blots verwendet.

Dabei kann kein Unterschied in der Konzentration vom Hsp70 im Gewebe der Niere zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren oder zwischen alten und jungen Tieren gezeigt werden (siehe Abb. 23).

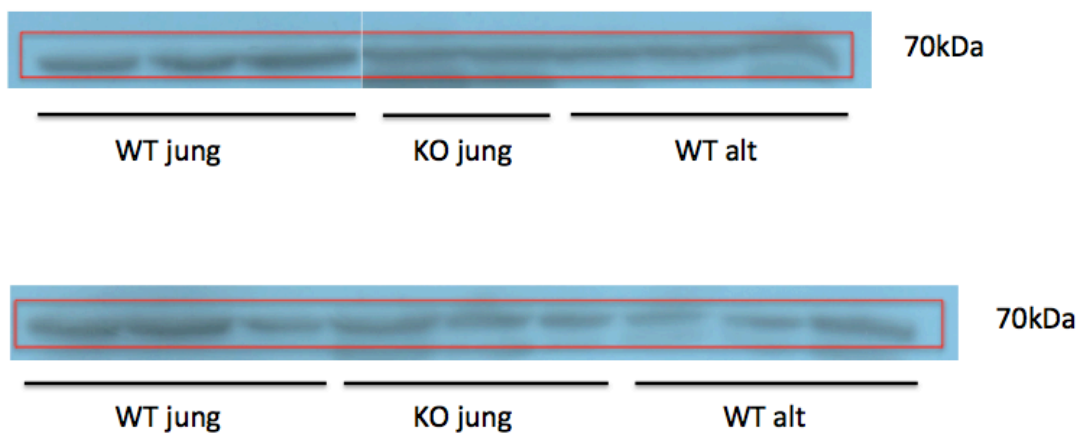


Abb. 23: Expression von Hsp70 in der Niere von phox- und Wildtyp-Mäusen
WT jung: junge Wildtyp-Mäuse, WT alt: alte Wildtyp-Mäuse, KO jung: p47-Knockout-Mäuse.

3.2 Ergebnisse aus dem ren2-Tiermodell

3.2.1 Blutdruckwerte, Körpergewicht, Organratio und Nierenfunktionsparameter

Bei den Tieren handelt es sich um Wildtyp(SD)-Ratten (SD) und ren2-Ratten, welche mit unterschiedlichen Medikamenten behandelt waren. Die ren2-Ratten waren mit Ramipril (ACEi), Apocynin (Apo), Tempol (Tempol) oder ausschließlich mit Wasser (Hochdruck) behandelt. Bei den Tieren war jeweils der Blutdruck, das Körpergewicht, das Gewicht von Herz und Niere, das Urinvolumen und das Kreatinin bestimmt. Diese Daten waren im Rahmen der Doktorarbeit von Simone Schierling erhoben worden (siehe Tabelle 04).

	SD	Hoch- druck	ACEi	Apo	Tempol
Blutdruck [mmHg]	129 ± 3	255 ± 9 ^a	120 ± 3	178 ± 16 ^{a,2}	199 ± 15 ^a
Körpergewicht [g]	445 ± 8 ^{a,1}	205 ± 12	260 ± 8	202 ± 14	179 ± 8 ^c
Ratio linke Niere/ Körpergewicht [‰]	3,5 ± 0,1 ^{c,1}	5,9 ± 0,3 ^c	4,7 ± 0,2	5,4 ± 0,1	5,9 ± 0,4 ^c
Ratio Herz/ Körpergewicht [‰]	4,0 ± 0,1 ¹	5,9 ± 0,4 ^b	4,5 ± 0,2	5,8 ± 0,3 ^b	5,9 ± 0,2 ^c
Urinvolumen [ml]	19,2 ± 2	33 ± 2	24,2 ± 2	14 ± 2 ¹	14 ± 3 ¹
Kreatinin [mg/ml]	92 ± 4 ¹	20 ± 2	36 ± 4	46 ± 2	45 ± 4
Albumin/Kreatinin [mg/g]	0,3 ± 0,1	290 ± 60	1,1 ± 0,4	135 ± 9	n.a.

Tabelle 04: Blutdruck, Körpergewicht, Organratio und Nierenfunktionsparameter der ren2- und SD-Ratten

SD: Wildtyp(SD)-Ratten, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten.

^ap<0,001, ^bp<0,01, ^cp≤0,05 vs. Rami; ¹p<0,001, ²p≤0,05 vs. Hochdruck.

(Die Daten waren im Rahmen der Doktorarbeit von Simone Schierling erhoben worden).

3.2.2 Konzentration von ROS in der Niere und im Herz

Zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde eine Dihydroethidium (DHE)-Färbung in den ren2- und Wildtyp-Ratten in der Niere und im Herz durchgeführt.

In der Niere kann dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden. Es kann beobachtet werden, dass ren2-Ratten, welche nur mit Wasser behandelt wurden, tendenziell eine höhere Konzentration an ROS haben als die anderen Gruppen. So haben Wildtyp-Tiere und ren2-Tiere, welche mit Ramipril, Apocynin oder Tempol behandelt wurden, einen um etwa 28% geringeren Mittelwert in der ROS-Konzentration im Vergleich zu Hochdruck-Tieren. Auch dieser ist aufgrund interindividueller Unterschiede nicht signifikant. Die SD-, ACEi-, Apo- und Tempol-Gruppen sind dagegen in der ROS-Konzentration annähernd gleich (siehe Abb. 24 und Abb. 25).

Im Herz kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden. Es zeigt sich aber, dass Wildtyp-Tiere und Tiere aus der mit Apocynin behandelten Gruppe einen um 25% geringeren Mittelwert in der ROS-Konzentration aufweisen als Tiere aus der mit Ramipril behandelten Gruppe, welcher aufgrund von interindividuellen Unterschieden nicht signifikant ist. Tiere aus der Hochdruck- und Tempol-Gruppe haben einen um 14% geringeren Mittelwert in der Konzentration von ROS als Tiere aus der mit Ramipril behandelten Gruppe, welcher jedoch ebenfalls nicht signifikant ist (siehe Abb. 26 und Abb. 27).

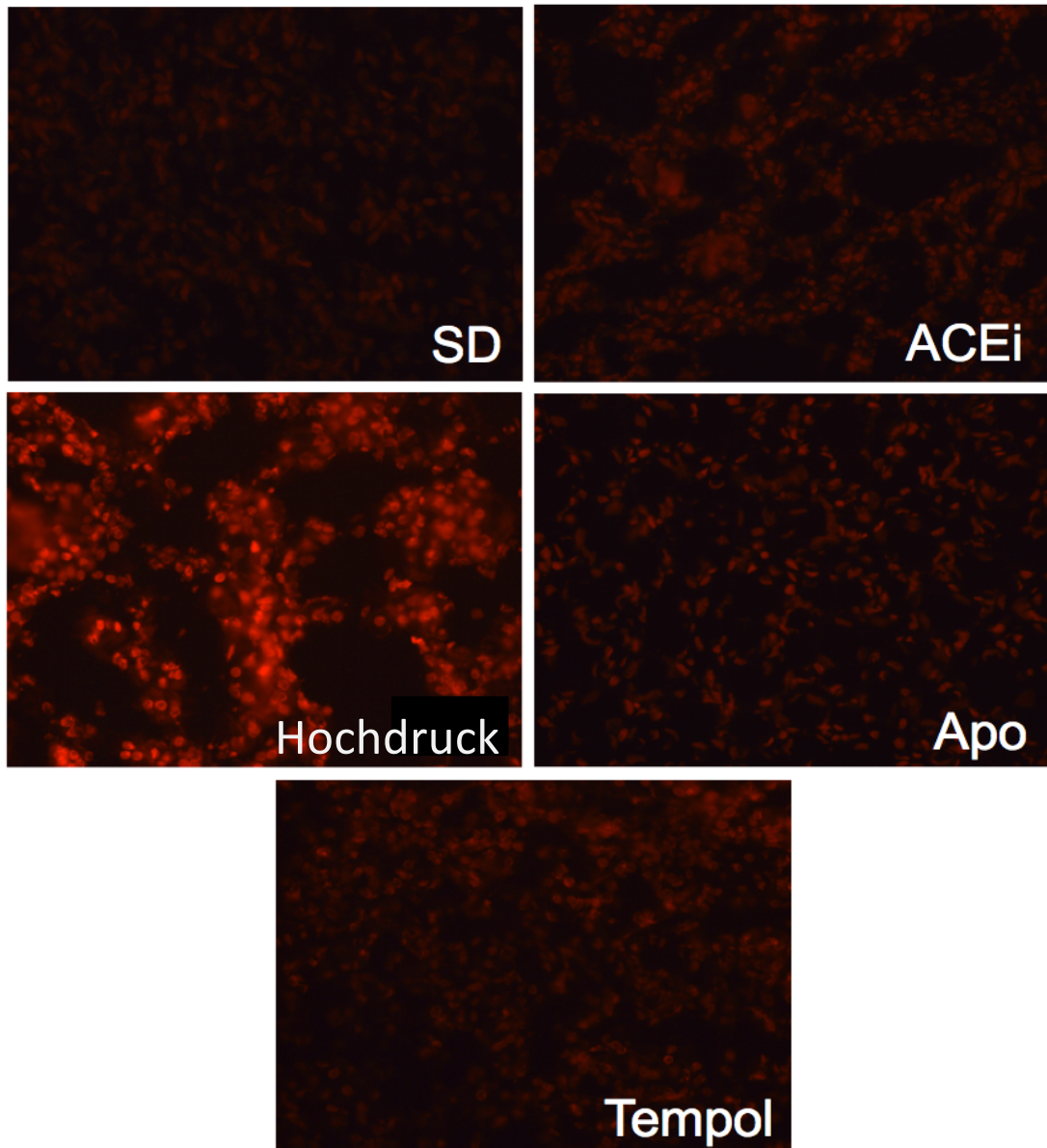


Abb. 24: Färbungen von Schnitten der Niere mit DHE zur Detektion von Superoxidionen in ren2- und SD-Ratten

SD: Wildtyp(SD)-Ratten, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten.

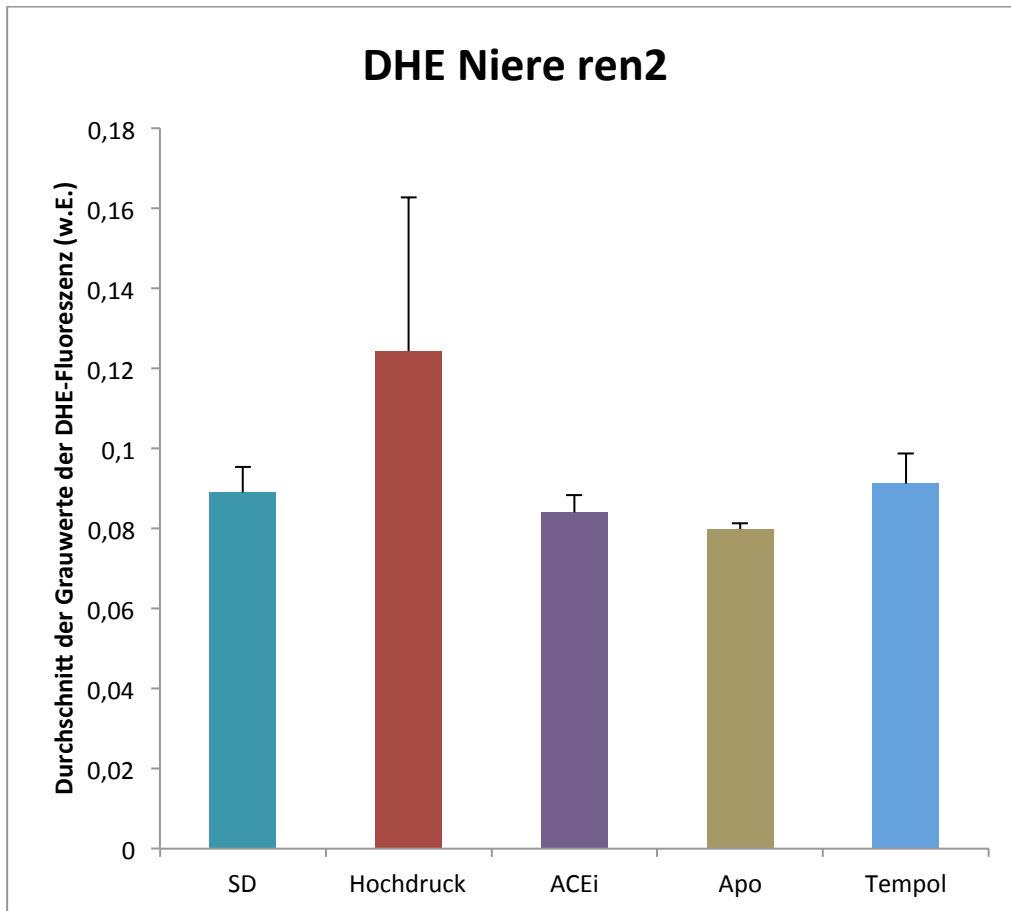


Abb. 25: Durchschnitt der Grauwerte der DHE-Fluoreszenz (w.E.) in der Niere von ren2- und SD-Ratten

Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. SD: Wildtyp(SD)-Ratten n=7, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten n=6, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten n=7, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten n=7, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten n=5.

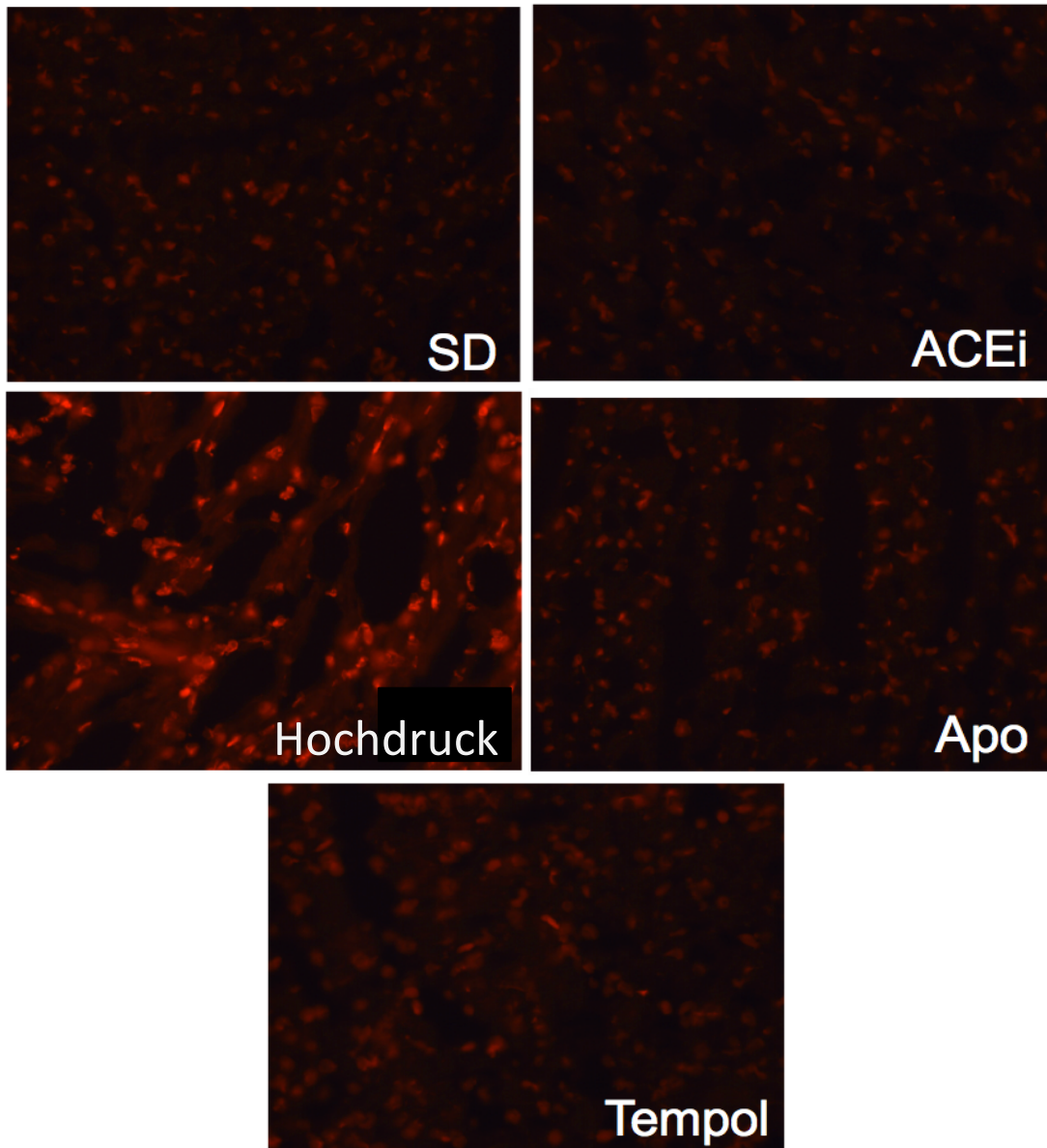


Abb. 26: Färbungen von Schnitten des Herzens mit DHE zur Detektion von Superoxidionen in ren2- und SD-Ratten

SD: Wildtyp(SD)-Ratten, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten.

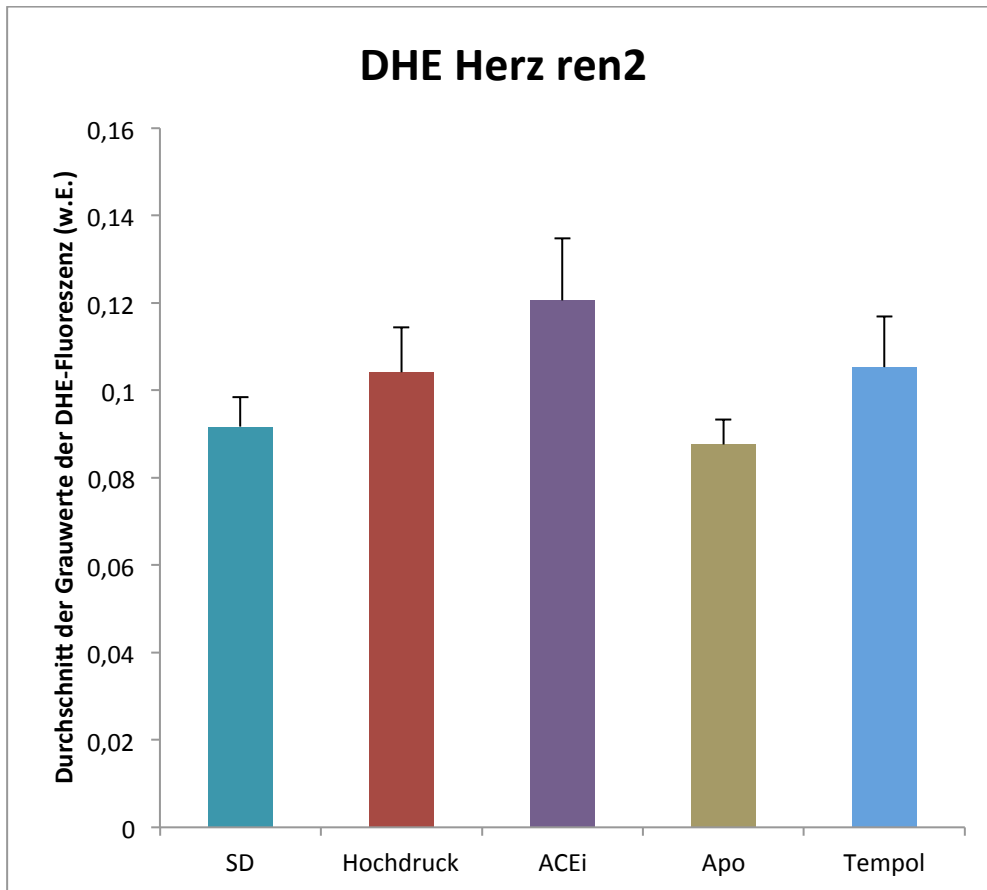


Abb. 27: Durchschnitt der Grauwerte der DHE-Fluoreszenz (w.E.) im Herz von ren2- und SD-Ratten

Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. SD: Wildtyp(SD)-Ratten n=7, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten n=6, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten n=7, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten n=7, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten n=5.

3.2.3 DNA-Doppelstrangbrüche in Niere und Herz

Zur Bestimmung der DNA-Doppelstrangbrüche wurde eine Immunhistochemiefärbung gegen γ H2AX in den ren2- und Wildtyp-Ratten im Herz und in der Niere durchgeführt.

In der Niere kann ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Apocynin und den mit Wasser behandelten ren2-Ratten gezeigt werden. Des Weiteren ist ein Unterschied zwischen den Wildtyp-Ratten und den mit Wasser behandelten ren2-Ratten zu beobachten. Dabei zeigen Wildtyp-Tiere einen um 79% geringeren Mittelwert von DNA-Doppelstrangbrüchen im Vergleich zur Hochdruck-Gruppe, dieser ist jedoch nicht signifikant. Das Gleiche zeigt sich bei dem Vergleich von Tieren aus der mit Tempol behandelten Gruppe mit Tieren aus der Hochdruck-Gruppe, erstere haben einen um 83% geringeren Mittelwert, welcher nicht signifikant ist. Auch die Tiere der ACEi-Gruppe haben mit einem um 73% geringeren Mittelwert weniger DNA-Doppelstrangbrüche als die Tiere der Hochdruck-Gruppe, dieser ist ebenfalls nicht signifikant. Darüber hinaus kann ein um 53% geringerer Mittelwert von DNA-Doppelstrangbrüchen bei Tieren der Apocynin-Gruppe im Vergleich mit Tieren der ACEi-Gruppe festgestellt werden. Dies lässt sich auch für die Tiere der Tempol-Gruppe zeigen, welche ein 47% geringeren Mittelwert haben. Diese sind aufgrund von interindividuellen Unterschieden jedoch nicht signifikant. Zwischen Wildtyp-Tieren und Tieren aus der ACEi-Gruppe sowie zwischen Tieren aus der Apocynin- und Tempol-Gruppe zeigten sich kaum Unterschiede in der Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche (siehe Abb. 28 und Abb. 29).

Im Herz kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden. Es kann jedoch beobachtet werden, dass die Tiere der Hochdruck-Gruppe die höchste Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen haben. Bei Tieren der Tempol-Gruppe kann die niedrigste Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen festgestellt werden, sie zeigen einen um 84% geringeren Mittelwert als Tiere der Hochdruck-Gruppe, einen um 79% geringeren Mittelwert als Tiere der ACEi-Gruppe und einen um 69% geringeren Mittelwert als Wildtyp-Tiere, welche aufgrund interindividueller

Varianten aber keine signifikanten Effekte ergeben. Die Tiere der mit Apocynin behandelten Gruppe haben einen 40% geringeren Mittelwert von DNA-Doppelstrangbrüchen als Tiere der Hochdruck-Gruppe, dieser ist nicht signifikant. Die Tiere der ACEi- und Apo-Gruppe weisen eine annähernd gleiche Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen auf (siehe Abb. 30 und Abb. 31).

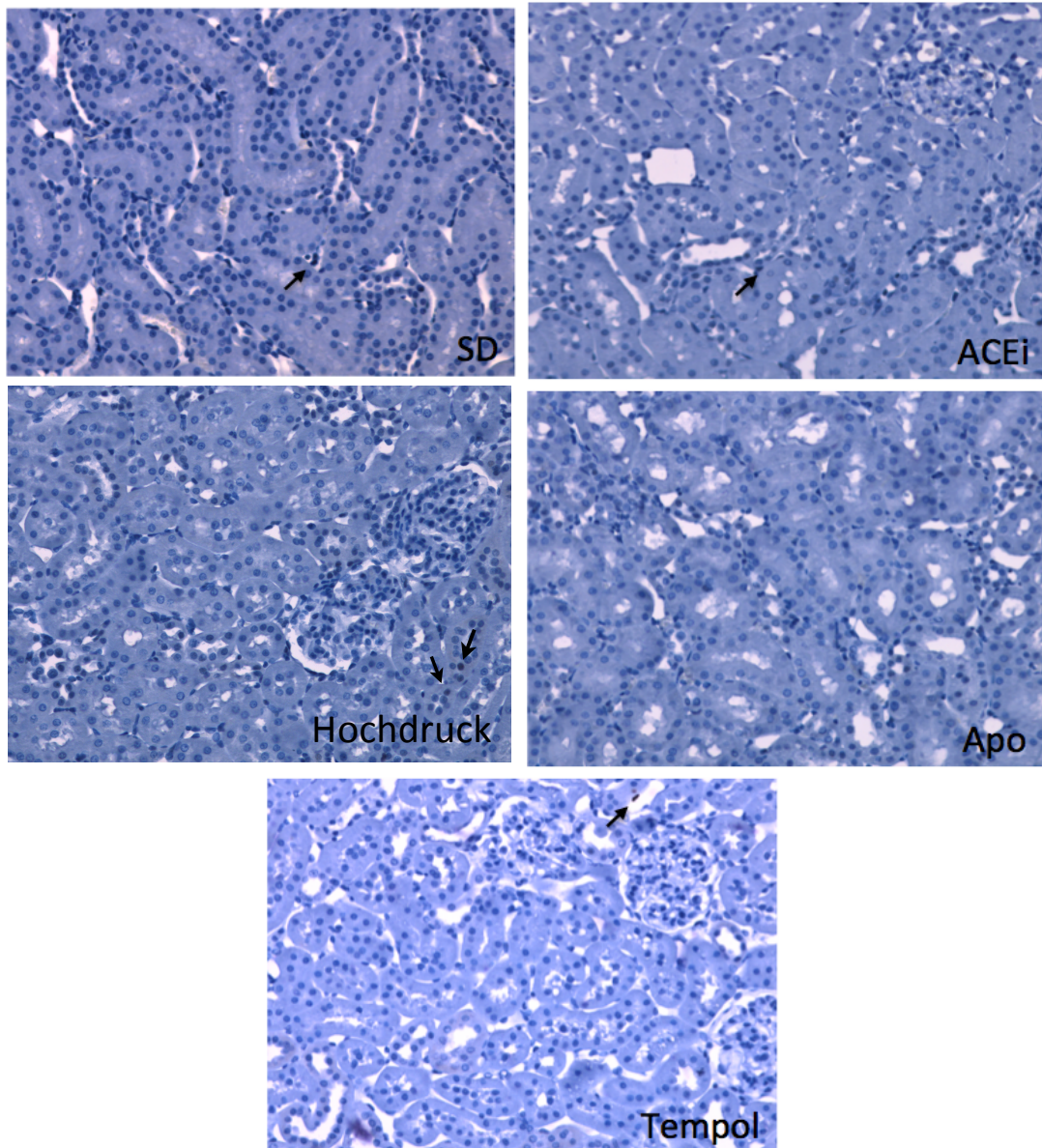


Abb. 28: Anti- γ H2A.X-Gewebefärbungen in der Niere von ren2- und SD-Ratten
Die Pfeile markieren positive Kerne. SD: Wildtyp(SD)-Ratten, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten.

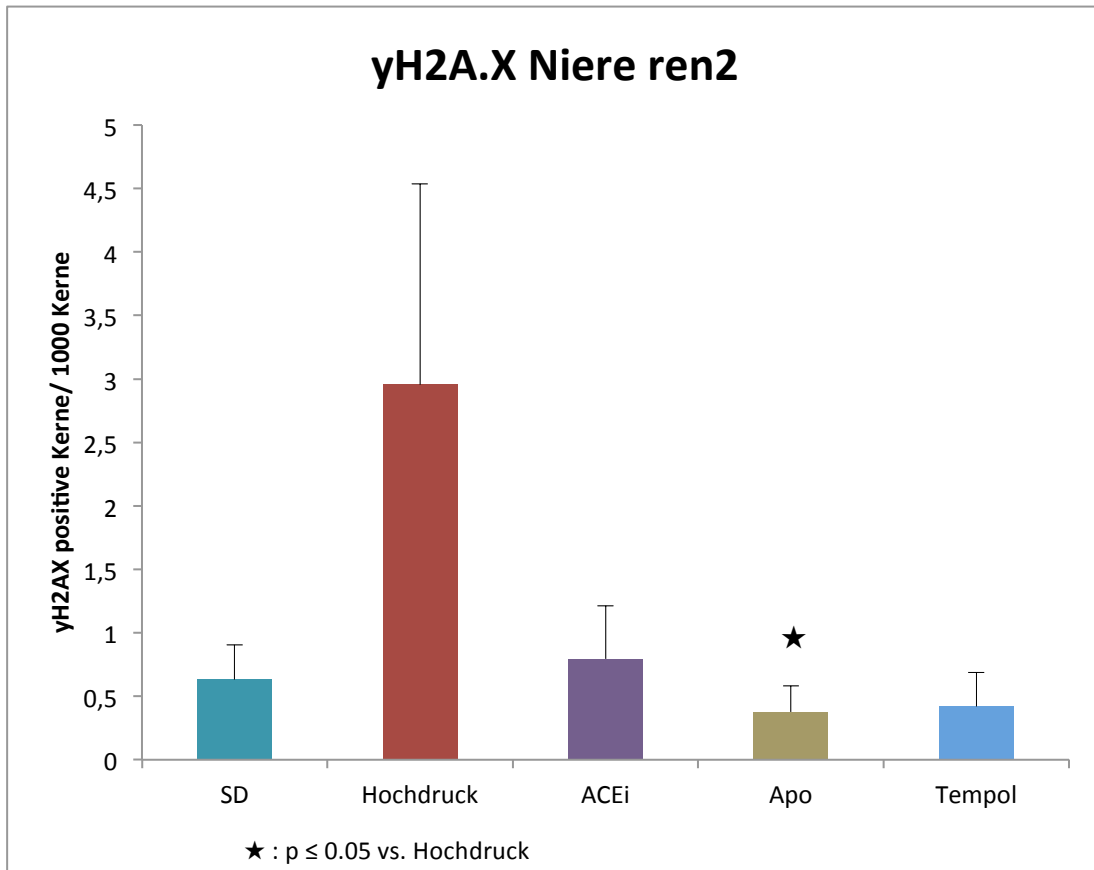


Abb. 29: DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere von ren2- und SD-Ratten
 Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. SD: Wildtyp(SD)-Ratten n=7, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten n=6, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten n=7, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten n=7, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten n=5.
 ★ $p \leq 0.05$ vs. Hochdruck.

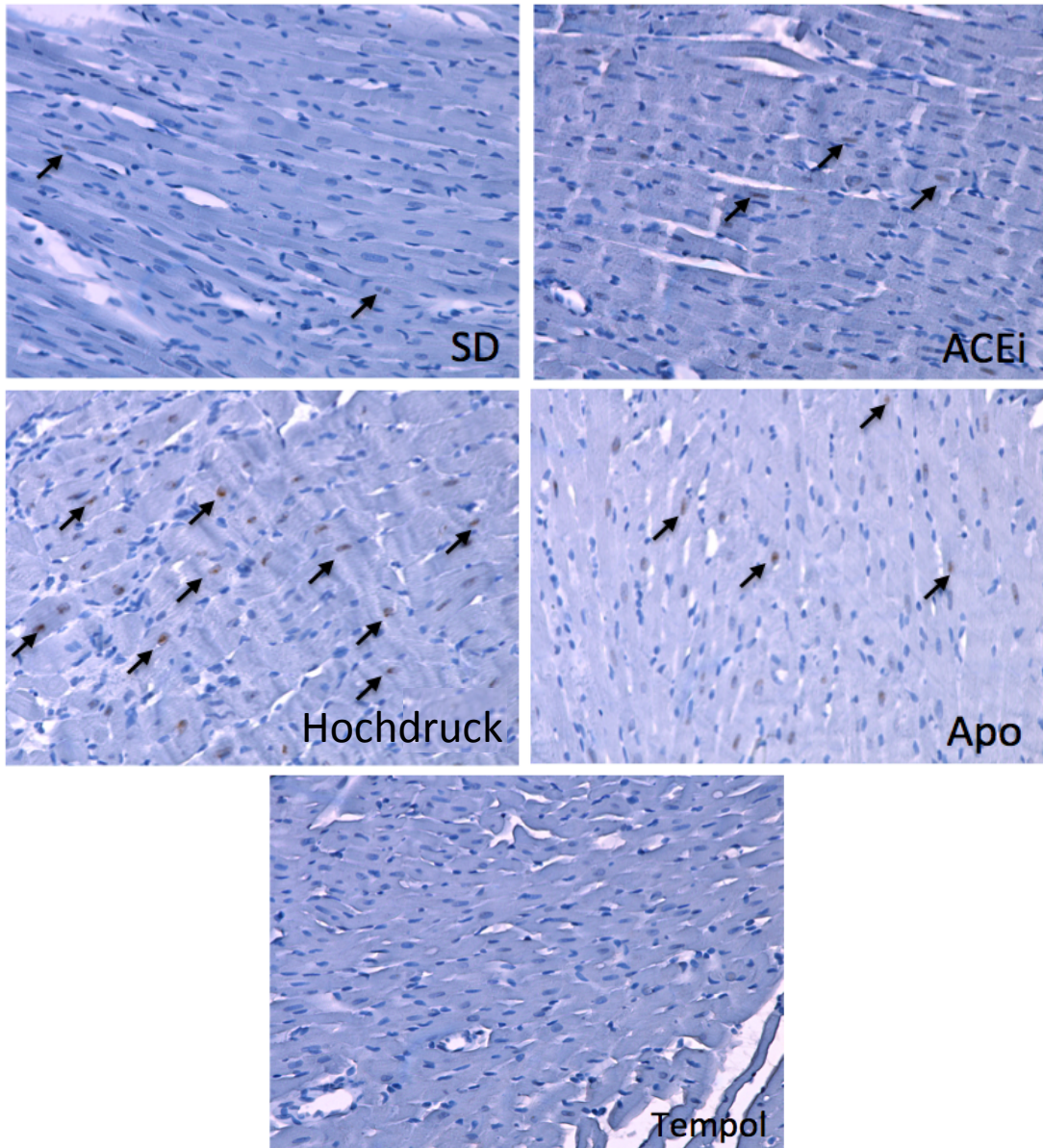


Abb. 30: Anti- γ H2A.X-Gewebefärbungen im Herz von ren2- und SD-Ratten
 Die Pfeile markieren positive Kerne. SD: Wildtyp(SD)-Ratten, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten.

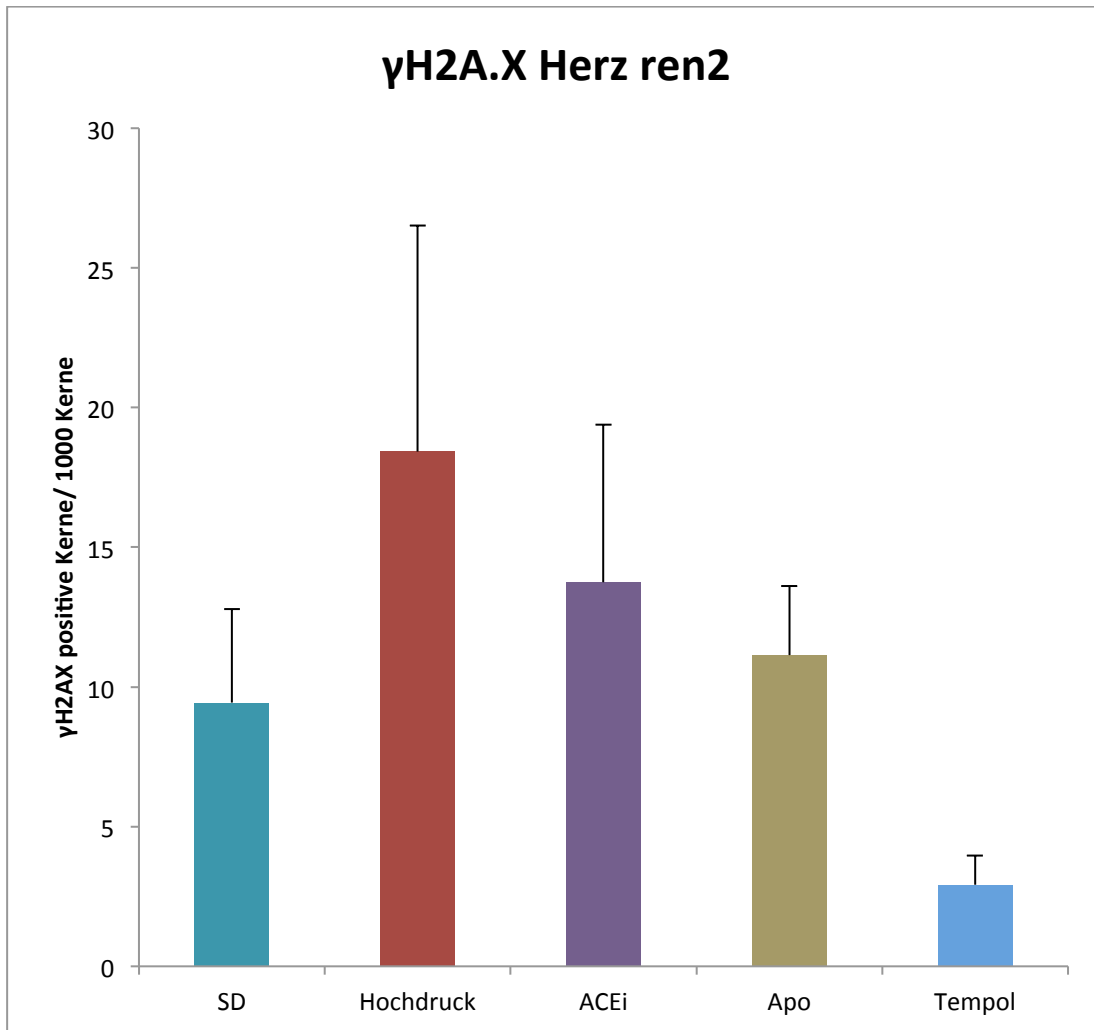


Abb. 31: DNA-Doppelstrangbrüche im Herz von ren2- und SD-Ratten

Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. SD: Wildtyp(SD)-Ratten n=7, Hochdruck: Wasser behandelte ren2-Ratten n=6, ACEi: Ramipril behandelte ren2-Ratten n=7, Apo: Apocynin behandelte ren2-Ratten n=7, Tempol: Tempol behandelte ren2-Ratten n=5.

4 Diskussion

4.1 Entstehung und Auswirkung von ROS im Alterungsprozess

Reaktive Sauerstoffspezies können in Zellen zu DNA-Schäden führen und so kann es in diesen Zellen zu Mutationen der DNA kommen. Solche DNA-Mutationen spielen eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Krankheiten, beispielsweise bilden sie einen entscheidenden Schritt in der Karzinogenese. In vielen Tumoren, unter anderem in Bronchialkarzinomen (Inoue et al., 1998), in Nierenzellkarzinomen (Okamoto et al., 1994) und in kolorektalen Karzinomen (Oliva et al., 1997) kann eine vermehrte Anzahl an oxidativen DNA-Schäden nachgewiesen werden. Aber nicht nur in der Entstehung von Karzinomen, sondern auch in vielen anderen Erkrankungen können oxidative DNA-Schäden gefunden werden. So konnte für neurologische Erkrankungen, wie den Morbus Parkinson (Alam et al., 1997), den Morbus Alzheimer (Lezza et al., 1999) und die Multiple Sklerose (Vladimirova et al., 1998), für immunologische Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (Bashir et al., 1993), für endokrinologische Erkrankungen, wie dem Diabetes mellitus Typ 2 (Rehman et al., 1999) sowie für kardiovaskuläre Erkrankungen (Collins et al., 1998) ein erhöhtes Level an oxidativem Stress festgestellt werden (Cooke et al., 2003). Die durch ROS entstehenden DNA-Schäden sind auch im Alterungsprozess von Bedeutung (Muller et al., 2007).

Für die Untersuchung der durch NADPH-Oxidasen produzierten ROS im Alterungsprozess wurden ein p47-Knockout-Mausmodell sowie junge und alte Wildtyp-Mäuse verwendet. Der Knockout von p47^{phox} führt in den Mäusen zu einer Inaktivierung der NOX2. Untersucht wurden in diesem Tiermodell die unterschiedlichen Konzentrationen von ROS sowie die Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere und im Herz. Des Weiteren wurden die Proteinexpression von Sirtuin1 und Hsp70 in der Niere und im Gehirn analysiert.

Bei der Bestimmung der Superoxidionenkonzentration mittels der Dihydroethidium-Färbung kann gezeigt werden, dass ein Knockout von p47 und damit die Inaktivierung der NOX2 eine geringere Produktion von Sauerstoffradikalen im

Vergleich mit Wildtyp-Tieren in der Niere zur Folge hat. Im Zusammenhang damit wurde bereits zuvor berichtet, dass die ROS-Konzentration in neutrophilen Lymphozyten von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu p47-Knockout-Mäusen erhöht war (He et al., 2005). Beim Vergleich zwischen jungen und alten Wildtyp-Tieren kann kein Unterschied in der ROS-Konzentration in der Niere beobachtet werden. Somit kann gezeigt werden, dass die NOX2 bei der Entstehung von ROS in der Niere beteiligt ist, allerdings ergaben sich keine Befunde hinsichtlich der Rolle der NOX2 in der Alterung.

Im Herz zeigt sich eine leicht geringere Konzentration von ROS in Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu Knockout-Tieren. In mikrovaskulären Endothelzellen ist gezeigt, dass in p47-Knockout-Zellen p40^{phox} und p67^{phox} im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöht sind. Diese Veränderung, die als Adaptation oder Gegenregulation zum p47-Verlust gesehen werden kann, bewirkte dort letztlich eine Erhöhung der NADPH-abhängigen ROS-Produktion in p47-Knockout-Zellen (Fan et al., 2009). Dies könnte die Ursache für die hier beobachtete erhöhte ROS-Konzentration im Herz von p47-Knockout-Tieren sein. Ebenfalls keinen Unterschied in der ROS-Konzentration kann zwischen jungen und alten Wildtyp-Mäusen im Herz beobachtet werden. Dies könnte dadurch begründet sein, dass andere Quellen der ROS-Produktion, andere Isoformen der NADPH-Oxidase, Lipoxigenasen, Mitochondrien oder exogene Quellen, infrage kommen. Im Gegensatz dazu wurde herausgefunden, dass in zerebralen Gefäßen von alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen ein höheres mRNA-Level von NOX2 und p47^{phox} zu finden ist (Pena Silva et al., 2012). So konnte im Gehirn bereits gezeigt werden, dass alte Mäuse eine höhere Konzentration an ROS im Vergleich zu jungen Mäusen aufweisen und, dass ein NOX2-Knockout eine Erniedrigung der ROS-Konzentration bewirkt (Park et al., 2007).

Für die Auswirkung der durch ROS bedingten DNA-Schäden in p47-Knockout- und Wildtyp-Tieren wurde eine γ H2AX-Färbung in der Niere und im Herz durchgeführt. Die immunohistochemische Färbung von γ H2AX ist eine Methode zur Markierung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Bei der Entstehung von Doppelstrangbrüchen kommt es zur spezifischen Phosphorylierung von Serin 139 im H2AX-Histon und es entsteht γ H2AX (Rogakou et al., 1999). Solche Strangbrüche sind Schäden im Genom der Zelle und können, wenn sie nicht richtig repariert werden, zum Zelltod

oder zu Mutationen führen (Bonner et al., 2008). Des Weiteren spielt γ H2AX im Zellzyklus und bei der Apoptose eine Rolle (Huang et al., 2005; Solier and Pommier, 2009). Bei einem DNA-Schaden ist γ H2AX daran beteiligt, dass in einer Zelle DNA-Reparaturmechanismen oder die Apoptose eingeleitet wird (Cook et al., 2009; Fernandez-Capetillo et al., 2004; Paull et al., 2000; Stucki et al., 2005). Bei der γ H2AX-Färbung zeigt sich, dass p47-Knockout-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine geringere Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen im Herz und in der Niere aufweisen. So kann festgestellt werden, dass höchstwahrscheinlich die durch NOX2 produzierten ROS in der Niere und im Herz zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen. Ebenso kann im Herz und der Niere gezeigt werden, dass alte Tiere im Vergleich zu jungen Tieren vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche besitzen. Daraus ergibt sich, dass es im Alter zu einem erhöhten DNA-Schaden im Herz und in der Niere kommt. In der Niere kann daraus geschlossen werden, dass die durch NOX2 gebildeten ROS zu einem DNA-Schaden in den Zellen führen und dass dieser DNA-Schaden mit dem Alter der Tiere zunimmt. Ein Knockout von p47^{phox} in der NOX2 bewirkt dabei eine niedrigere Konzentration von ROS und daraus folgend eine geringere Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen. Wie in der Niere führt ein Knockout von p47^{phox} zu einem geringeren DNA-Schaden im Herz. Mit dem Alter der Tiere nimmt dieser DNA-Schaden zu. So konnte zuvor gezeigt werden, dass DNA-Doppelstrangbrüche in der Leber, im Hoden, in der Niere, in der Lunge und im Gehirn von alten Mäusen gegenüber jungen Mäusen vermehrt auftreten (Sedelnikova et al., 2004).

In der Expression von Sirtuin1 kann in der Niere und im Gehirn mittels Western Blot kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen beobachtet werden. Somit kann kein Zusammenhang zwischen ROS und der Expression von Sirtuin1 hergestellt werden. Für die Expression von Sirtuin1 durch oxidativen Stress konnten bislang unterschiedliche Ergebnisse beobachtet werden, beispielsweise kam es zu einer erhöhten Expression von Sirt1 unter oxidativen Stress in proximalen Tubuluszellen (Hasegawa et al., 2008). Ähnliches wurde bei Affen für das Herz gezeigt, dabei kam es zu einer erhöhten Expression von Sirt1 unter oxidativen Stress. Bei alten Affen nahm die Expression von Sirt1 gegenüber jungen Affen im Herz zu (Alcendor et al.,

2007). Im Gegensatz dazu kam es in Ratten unter oxidativen Stress zu einer Abnahme von Sirt1 im Hippocampus und im zerebralem Cortex (Wu et al., 2006). In der Expression von Hsp70 kann in der Niere auch kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen nachgewiesen werden. Somit kann auch hier kein Zusammenhang zwischen der ROS-Konzentration und der Expression von Hsp70 hergestellt werden. Zuvor wurde gezeigt, dass es bei einer Erhöhung der ROS-Konzentration zu einer Erhöhung von Hsp70 in Fibroblastenzellen kommt (Banerjee Mustafi et al., 2009) und, dass alte Ratten in der Leber weniger Hsp70 exprimierten als junge Ratten (Zhang et al., 2006).

Im Alterungsprozess entstehen im Herz und in der Niere vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche. Die durch NADPH-Oxidasen produzierten ROS sind daran entscheidend in der Niere beteiligt. Im Herz besteht dabei kein Zusammenhang mit der eigentlichen ROS-Konzentration. Es bleibt zu klären, warum die Erhöhung der ROS-Konzentration nicht zu einer Erhöhung der DNA-Doppelstrangbrüche führt.

4.2 Auswirkung von Bluthochdruck auf die ROS-Produktion und auf DNA-Schäden

Im Jahr 2000 waren 26,4% der Weltbevölkerung an Hypertonie erkrankt, das entspricht 972 Millionen Menschen. Im Jahr 2025 soll die Zahl auf 29,2% steigen, dies entspricht 1,56 Milliarden Menschen weltweit (Kearney et al., 2005). Dabei ist die Hypertonie eine der wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie beispielsweise für den Herzinfarkt (Anderson et al., 1991; Yusuf et al., 2004). Aber auch in der Entstehung von Karzinomen, insbesondere des Nierenzellkarzinoms, spielt die Hypertonie eine entscheidende Rolle (Grossman et al., 2002). Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere der Herzinfarkt, sind weltweit die häufigsten Erkrankungen (Murray et al., 2012) und bilden auch die Gruppe der häufigsten Todesursachen (Mathers et al., 2009). Zur Therapie der Hypertonie werden aktuell Beta-Blocker, Thiazid-Diuretika, Calcium-Kanal-Blocker, ACE-Inhibitoren und Angiotensin-Rezeptor-Blocker empfohlen (James et al., 2014). Aufgrund des Zusammenhangs zwischen oxidativen Stress und

Hypertonie sind aber auch neue klinische Therapien mit Antioxidantien denkbar (Gonzalez et al., 2014).

Für die Untersuchung der Auswirkung von Bluthochdruck auf die ROS-Produktion und DNA-Schäden wurden ren2- und Wildtyp(SD)-Tiere verwendet. Durch das doppelte Renin-Gen leiden ren2-Tiere an Hypertonie. Die ren2-Tiere wurden dabei mit verschiedenen Medikamenten behandelt. So erhielt eine Gruppe nur Wasser (Hochdruck-Gruppe), eine Gruppe Ramipril, eine Gruppe Apocynin und eine weitere Gruppe Tempol. Bei der Konzentrationsbestimmung von ROS mittels Dihydroethidium-Färbung in der Niere kann gezeigt werden, dass ren2-Tiere die mit Wasser behandelt wurden die höchste Konzentration von ROS aufweisen. Sowohl eine Behandlung mit Ramipril als auch mit Apocynin und Tempol senkt die ROS-Konzentration von ren2-Tieren auf fast das gleiche Level wie bei gesunden Wildtyp-Tieren. Daraus ergibt sich, dass Tiere die an Bluthochdruck erkrankt sind, eine erhöhte ROS-Konzentration in der Niere haben. Eine Blockade von ACE, damit eine Verringerung von AngII, eine Blockade der NADPH-Oxidase und die Gabe eines Radikalfängers, kann die ROS-Konzentration senken. Bei Tieren die an Hypertonie erkrankt sind entsteht durch das erhöhte AngII und die damit verbundene Aktivierung der NADPH-Oxidase eine erhöhte ROS-Konzentration in der Niere.

Im Herz ergaben sich in der ROS-Konzentration keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Dies kann damit zusammenhängen, dass hier möglicherweise auch andere Quellen der ROS-Produktion eine Rolle spielen.

Mögliche DNA-Schäden wurden auch hier mittels einer γ H2AX-Färbung ausgewertet. Dabei zeigt sich in der Niere, dass Tiere mit Bluthochdruck die nur mit Wasser behandelt wurden die höchste Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen aufweisen. Auch hier konnten ACE-Hemmer, NADPH-Oxidase-Hemmer und Radikalfänger die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen auf die Anzahl von gesunden Wildtyp-Tieren senken. Also ist die erhöhte Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere bei Tieren mit Bluthochdruck vermutlich durch das erhöhte AngII und die damit verbundene Aktivierung der NADPH-Oxidase bedingt. Somit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der ROS-Konzentration und den DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere. Nach unserer Hypothese führt Bluthochdruck über einen erhöhten Angiotensin II-Spiegel zu einer vermehrten

Aktivierung der NADPH-Oxidase. Die daraus entstehenden ROS führen in der Niere zu DNA-Schäden.

Im Herz zeigt sich, dass Bluthochdrucktiere die nur mit Wasser behandelt wurden die höchste Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen besitzen. Die Gabe von ACE-Inhibitoren und NADPH-Oxidase-Hemmern kann die DNA-Doppelstrangbrüche auf die Anzahl von gesunden Wildtyp-Tieren senken. Die Gabe eines Radikalfängers verringert die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen dabei am meisten. Daraus ergibt sich, dass ein Teil der DNA-Doppelstrangbrüche im Herz durch AngII und somit durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase und der daraus folgenden Produktion von ROS bedingt ist. Ein anderer Teil kann aber auch durch andere Quellen, wie möglicherweise durch andere Isoformen der NADPH-Oxidase, Lipoxigenasen, Mitochondrien oder exogene Quellen, der ROS-Produktion entstehen. Es wurde bereits zuvor berichtet, dass die ROS-Konzentration und die Anzahl an DNA-Schäden von Tieren mit Hypertonie im Knochen erhöht war (Campagnaro et al., 2013). Ebenso wurde festgestellt, dass DNA-Schäden in Zellen der Niere nach AngII Behandlung erhöht waren (Schupp et al., 2007). Des Weiteren wurde auch beobachtet, dass Zellen der Niere, welche mit AngII behandelt wurden, eine erhöhte Anzahl von γ H2AX-Stellen aufwiesen. Durch die zusätzliche Behandlung solcher AngII-Zellen mit AT₁-Rezeptor-Blockern konnten die γ H2AX-Stellen gesenkt werden (Schmid et al., 2008). Ebenfalls wurde gezeigt, dass die ROS-Konzentration und die Anzahl an DNA-Schäden in Zellen der Niere, welche mit AngII behandelt worden, vermehrt vorkommen und durch die Gabe von Tempol gesenkt werden konnten (Queisser et al., 2010). Ebenfalls wurde zuvor beobachtet, dass Zellen der Niere, welche mit AngII behandelt wurden, eine erhöhte ROS-Konzentration und eine erhöhte Anzahl an DNA-Schäden aufwiesen. Wurden solche Zellen in vitro bei Applikation von Angiotensin II zusätzlich mit einem AT₁-Rezeptor-Blocker, NADPH-Oxidase-Inhibitor oder Tempol behandelt, konnte die ROS-Konzentration und die Anzahl an DNA-Schäden gesenkt werden (Fazeli et al., 2012). Zudem besitzen mit AngII behandelte Mäuse eine erhöhte Konzentration an ROS sowie eine erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen. Wurden solche Mäuse zusätzlich noch mit Tempol behandelt, sank sowohl die Konzentration an ROS, als auch die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche (Brand et al., 2013).

In Tieren mit Bluthochdruck entstehen im Herz und in der Niere vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche. In der Niere sind die durch NADPH-Oxidase produzierten ROS entscheidend an DNA-Schäden beteiligt. Ramipril, Apocynin und Tempol können dabei sowohl die Konzentration von ROS, als auch die DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere auf das Level von gesunden Tieren reduzieren. Im Herz besteht kein direkter Zusammenhang zwischen der ROS- Konzentration und den DNA-Schäden. Dabei bleibt zu klären welcher Mechanismus für die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen im Herz verantwortlich ist. Ramipril und Apocynin können im Herz den DNA-Schaden gegenüber gesunden Tieren leicht reduzieren. Tempol kann die Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen im Herz noch unter die von gesunden Kontrolltieren senken. So stellen die Eigenschaften von Apocynin und Tempol möglicherweise neue Ansätze zur Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung der Hypertonie dar, die in der Lage sind durch Bluthochdruck entstandene DNA-Doppelstrangbrüche zu reduzieren und so Niere und Herz vor DNA-Schäden zu schützen. Dies müsste in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffradikale spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Karzinomen, im Alterungsprozess und bei kardiovaskulären Erkrankungen (Valko et al., 2007). Solche Sauerstoffradikale können unter anderem durch die NADPH-Oxidase gebildet werden (Finkel and Holbrook, 2000).

Ziel der Arbeit war es, die Rolle von ROS im Alterungsprozess und bei Bluthochdruck aufzuzeigen. Dafür wurden zwei Tiermodelle, eines mit einer geringen ROS-Konzentration und eines mit einer hohen ROS-Konzentration, verwendet. Zum einen handelt es sich um ein p47-Knockout-Mausmodell für die geringere ROS-Konzentration, im Vergleich zu alten und jungen Wildtyp-Tieren. Für die Rolle von ROS bei der Alterung wurden junge mit alten Wildtyp-Tieren verglichen. Um die Rolle der NOX2 in den ROS-Spiegeln der Organe zu ermitteln wurden gleichaltrige Wildtyp- mit p47-Knockout-Tieren verglichen. Zum anderen nutzten wir ein ren2-Tiermodell für die hohe ROS-Konzentration. Hierbei handelt es sich um ein Bluthochdruckmodell, in dem der Blutdruck mit Medikamenten normalisiert werden kann. Die Tiere wurden daher mit Ramipril (ACE-Inhibitor), Apocynin (NADPH-Oxidase-Inhibitor) und Tempol (Radikalfänger) behandelt. Als Maß für die ROS-Konzentration wurden die Superoxidionenspiegel mithilfe einer Dihydroethidium-Färbung ermittelt. Die DNA-Doppelstrangbrüche wurden mit einer γ H2AX-Antikörper-Färbung nachgewiesen und die Expression von Sirtuin1 und Hsp70, welche als Anti-Aging Proteine bekannt sind, mittels Western Blot bestimmt. Im p47-Knockout-Tiermodell konnte gezeigt werden, dass in der Niere eine Inaktivierung der NOX2 eine geringere Produktion von Sauerstoffradikalen zur Folge hat. Eine Altersabhängigkeit des ROS-Spiegels in Wildtyp-Tieren konnte nicht signifikant detektiert werden. Die p47-Knockout-Tiere wiesen einen geringeren ROS-Spiegel in der Niere auf, womit der Beitrag von NOX2 zum ROS-Spiegel in diesem Organ belegt werden konnte. Im Herz zeigt sich eine leicht geringere Konzentration von ROS in Wildtyp-Tieren im Vergleich zu Knockout-Tieren. Ein

Zusammenhang zwischen ROS und der Expression von Hsp70 und Sirtuin1 kann dabei nicht festgestellt werden.

Insgesamt konnte in diesem Modell beobachtet werden, dass die durch NOX2 produzierten ROS zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen und dass es im Alter zu einem erhöhten DNA-Schaden im Herz und in der Niere kommt.

Im zweiten Tiermodell, der an Bluthochdruck leidenden ren2-Ratten, konnte herausgefunden werden, dass ren2-Tiere die an Bluthochdruck erkrankt sind eine erhöhte ROS-Konzentration in der Niere aufweisen. Eine Blockade von ACE, eine Blockade der NADPH-Oxidase sowie die Gabe eines Radikalfängers kann die ROS-Konzentration auf die gleiche Konzentration wie bei Wildtyp-Tieren senken. Damit kann gezeigt werden, dass die erhöhte ROS-Konzentration in der Niere bei Bluthochdrucktieren durch das erhöhte AngII und die damit verbundene Aktivierung der NADPH-Oxidase bedingt ist. ACE-Hemmer, NADPH-Oxidase-Hemmer und Radikalfänger können in der Niere die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen auf die Anzahl von gesunden Wildtyp-Tieren senken. Somit stellt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der ROS-Konzentration und den DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere dar.

Im Herz ergaben sich in der ROS-Konzentration keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Es kann aber festgestellt werden, dass Bluthochdrucktiere die höchste Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen besitzen. Die Gabe von ACE-Inhibitoren, NADPH-Oxidase-Hemmern und Tempol kann auch hier die DNA-Doppelstrangbrüche auf die der von gesunden Wildtyp-Tieren senken. Daraus ergibt sich, dass ein Teil der DNA-Doppelstrangbrüche im Herz durch AngII und somit durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase und der daraus folgenden Produktion von ROS bedingt ist, ein anderer Teil aber auch durch andere Quellen der ROS-Produktion entsteht. Apocynin und Tempol stellen durch die Reduktion der DNA-Schäden in Herz und Niere möglicherweise neue Ansätze zur Entwicklung von Therapiemöglichkeiten in der Behandlung der Hypertonie dar.

5.2 Summary

Reactive oxygen species play a major role in the etiology of cancer, in the aging process and cardiovascular diseases (Valko et al., 2007). These oxygen radicals may be formed by the NADPH oxidase enzym complex (Finkel and Holbrook, 2000).

The aim of the study is to analyse the effect of ROS in the aging process and hypertension. Therefore two models were used. Young and old wild-type animals were used and compared with young p47 knockout mice, which have a reduced ROS level. As a model with increased ROS levels the ren2-rat model was applied. Those animals were treated with different drugs such as ramipril (ACE inhibitor), apocynin (NADPH oxidase inhibitor) and tempol (radical scavenger). The superoxide concentration was determined in kidney and heart by using dihydroethidium-staining. The DNA double strand breaks were detected by staining with an γ H2AX antibody and the expression of Sirtuin1 and Hsp70 which are known as anti-aging proteins, were determined by Western Blot.

It could be shown that the inactivation of NOX2 has a lower production of oxygen radicals in the kidney of the p47 knockout mice model. There was a slightly lower concentration of ROS in wild-type animals compared to knockout animals in the heart. No correlation between ROS and the expression of Hsp70 and Sirtuin1 in the kidney and the brain could be shown.

It could be shown that ROS produced by NOX2 leads to DNA double strand breaks and that aging increases DNA damage in the heart and in the kidney.

Ren2-hypertensive animals showed an increased ROS concentration in the kidney. A blockade of ACE, a blockade of NADPH oxidase and the administration of a radical scavenger reduced the ROS concentration to the same level as the concentration in wild-type animals. It has been shown that an increased AngII and the consequent activation of NADPH oxidase increased the concentration of ROS in the kidney in hypertensive animals.

ACE inhibitors, NADPH oxidase inhibitors and free radical scavengers could reduce the levels of DNA double strand breaks in the kidney of hypertensive animals to the levels of double strand breaks in wild-type animals. Presumably there is a direct

correlation between the concentration of ROS and the DNA double strand breaks in the kidney.

No differences between these groups regarding the ROS concentration in the heart were found. Hypertensive animals had the most DNA double strand breaks of all groups in the heart. ACE inhibitors, NADPH oxidase inhibitors and free radical scavengers could reduce the levels of DNA double strand breaks in the heart of hypertensive animals to the levels of double strand breaks in wild-type animals. A part of the DNA double strand breaks in the heart is caused by AngII which activates the NADPH oxidase and therefore the production of ROS, another part of DNA double strand breaks may be the result of other sources of ROS production.

As apocynin and tempol provided protection against major DNA damages in the heart and the kidney they may be regarded as a new approach for the development of treatment of hypertension.

6 Literaturverzeichnis, Abbildungsverzeichnis und Abkürzungsverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis

Agarwal, R., Campbell, R.C., and Warnock, D.G. (2004). Oxidative stress in hypertension and chronic kidney disease: role of angiotensin II. *Seminars in nephrology* 24, 101-114.

Alam, Z.I., Jenner, A., Daniel, S.E., Lees, A.J., Cairns, N., Marsden, C.D., Jenner, P., and Halliwell, B. (1997). Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *Journal of neurochemistry* 69, 1196-1203.

Alcendor, R.R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S.F., and Sadoshima, J. (2007). Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 100, 1512-1521.

Anderson, K.M., Wilson, P.W., Odell, P.M., and Kannel, W.B. (1991). An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation* 83, 356-362.

Aruoma, O.I., Neergheen, V.S., Baborun, T., and Jen, L.-S. (2006). Free Radicals, Antioxidants and Diabetes: Embryopathy, Retinopathy, Neuropathy, Nephropathy and Cardiovascular Complications. *Neuroembryology and Aging* 4, 117-137.

Atlas, S.A. (2001). The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *J Manage Care Pharm* 13, 9-20.

Banerjee Mustafi, S., Chakraborty, P.K., Dey, R.S., and Raha, S. (2009). Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt. *Cell stress & chaperones* 14, 579-589.

Bánfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., and Krause, K.-H. (2000). A Mammalian H⁺ Channel Generated Through Alternative Splicing of the NADPH Oxidase Homolog NOH-1. *Science* 287, 138-142.

Bashir, S., Harris, G., Denman, M.A., Blake, D.R., and Winyard, P.G. (1993). Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Annals of the rheumatic diseases* 52, 659-666.

Baur, J. (2010). Sirtuins and Oxidative Stress. *SABiosciences Pathway*, 12-13.

Benov, L., Szejnberg, L., and Fridovich, I. (1998). Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free radical biology & medicine* 25, 826-831.

Bohgaki, T., Bohgaki, M., and Hakem, R. (2010). DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome integrity* 1, 15.

Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., and Pommier, Y. (2008). GammaH2AX and cancer. *Nature reviews Cancer* 8, 957-967.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Brand, S., Amann, K., and Schupp, N. (2013). Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts. *Journal of hypertension* 31, 333-344.

Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* 112, 195-203.

Burt, V.L., Whelton, P., Roccella, E.J., Brown, C., Cutler, J.A., Higgins, M., Horan, M.J., and Labarthe, D. (1995). Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 25, 305-313.

Campagnaro, B.P., Tonini, C.L., Nogueira, B.V., Casarini, D.E., Vasquez, E.C., and Meyrelles, S.S. (2013). DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from Angiotensin-dependent hypertensive mice. *International journal of hypertension* 2013, 305202.

Carey, R.M. (2003). Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. *Endocrine Reviews* 24, 261-271.

Carey, R.M., and Siragy, H.M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24, 261-271.

Chobanian, A.V. (2003). Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42, 1206-1252.

Collins, A.R., Gedik, C.M., Olmedilla, B., Southon, S., and Bellizzi, M. (1998). Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *The*

FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *12*, 1397-1400.

Cook, P.J., Ju, B.G., Telese, F., Wang, X., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* *458*, 591-596.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *17*, 1195-1214.

Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E.J., Booth, R., Gabay, O., and Hall, D.J. (2011). Tumor necrosis factor alpha-mediated cleavage and inactivation of SirT1 in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis and rheumatism* *63*, 2363-2373.

El Golli-Bennour, E., and Bacha, H. (2011). Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: mycotoxins' exploration. *Toxicology* *287*, 1-7.

El-Benna, J., Dang, P.M., Gougerot-Pocidallo, M.A., Marie, J.C., and Braut-Boucher, F. (2009). p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Experimental & molecular medicine* *41*, 217-225.

El-Benna, J., Faust, L.P., and Babior, B.M. (1994). The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *The Journal of biological chemistry* *269*, 23431-23436.

El-Benna, J., Han, J., Park, J.W., Schmid, E., Ulevitch, R.J., and Babior, B.M. (1996). Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys* *334*, 395-400.

Fan, L.M., Teng, L., and Li, J.M. (2009). Knockout of p47 phox uncovers a critical role of p40 phox in reactive oxygen species production in microvascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *29*, 1651-1656.

Fazeli, G., Stopper, H., Schinzel, R., Ni, C.W., Jo, H., and Schupp, N. (2012). Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4. *Mutagenesis* *27*, 673-681.

Fehrenbach, E., and Northoff, H. (2001). Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exercise immunology review* *7*, 66-89.

Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair* *3*, 959-967.

- Ferrario, C.M. (2006). Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 7, 3-14.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Fontayne, A., Dang, P.M., Gougerot-Pocidalo, M.A., and El-Benna, J. (2002). Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 41, 7743-7750.
- Frampton, J.E., and Peters, D.H. (1995). Ramipril. An updated review of its therapeutic use in essential hypertension and heart failure. *Drugs* 49, 440-466.
- Garrido, A.M., and Griendling, K.K. (2009). NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and cellular endocrinology* 302, 148-158.
- Georgiou, C.D., Papapostolou, I., and Grintzalis, K. (2008). Superoxide radical detection in cells, tissues, organisms (animals, plants, insects, microorganisms) and soils. *Nature protocols* 3, 1679-1692.
- Gonzalez, J., Valls, N., Brito, R., and Rodrigo, R. (2014). Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World journal of cardiology* 6, 353-366.
- Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S.J., and Rittinger, K. (2003). Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113, 343-355.
- Groemping, Y., and Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical journal* 386, 401-416.
- Grossman, E., Messerli, F.H., Boyko, V., and Goldbourt, U. (2002). Is there an association between hypertension and cancer mortality? *The American journal of medicine* 112, 479-486.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- Hasegawa, K., Wakino, S., Yoshioka, K., Tatematsu, S., Hara, Y., Minakuchi, H., Washida, N., Tokuyama, H., Hayashi, K., and Itoh, H. (2008). Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochemical and biophysical research communications* 372, 51-56.
- He, L., Dinger, B., Sanders, K., Hoidal, J., Obeso, A., Stensaas, L., Fidone, S., and Gonzalez, C. (2005). Effect of p47phox gene deletion on ROS production and oxygen sensing in mouse carotid body chemoreceptor cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 289, L916-924.

Hekimi, S., Lapointe, J., and Wen, Y. (2011). Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in cell biology* 21, 569-576.

Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 29, 577-580.

Huang, X., Halicka, H.D., Traganos, F., Tanaka, T., Kurose, A., and Darzynkiewicz, Z. (2005). Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell proliferation* 38, 223-243.

Inoue, M., Osaki, T., Noguchi, M., Hirohashi, S., Yasumoto, K., and Kasai, H. (1998). Lung cancer patients have increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in peripheral lung tissue DNA. *Japanese journal of cancer research : Gann* 89, 691-695.

Jackson, S.H., Gallin, J.I., and Holland, S.M. (1995). The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *The Journal of experimental medicine* 182, 751-758.

James, P.A., Oparil, S., Carter, B.L., Cushman, W.C., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J., Lackland, D.T., LeFevre, M.L., MacKenzie, T.D., Ogedegbe, O., *et al.* (2014). 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA : the journal of the American Medical Association* 311, 507-520.

Karathanassis, D., Stahelin, R.V., Bravo, J., Perisci, O., Pacold, C.M., Cho, W., and Williams, R.L. (2002). Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J* 21, 5057-5068.

Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K., and He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet* 365, 217-223.

Kelly, D.P. (2011). Cell biology: Ageing theories unified. *Nature* 470, 342-343.

Key, M. (2009). Immunohistochemistry Staining Methods. *IHC Staining Methodes*, Fifth Edition, 57-60.

Kiang, J.G., and Tsokos, G.C. (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & therapeutics* 80, 183-201.

Klaunig, J.E., and Kamendulis, L.M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology* 44, 239-267.

Krause, K.-H. (2004). Tissue Distribution and Putative Physiological Function of NOX Family NADPH Oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57, 28-29.

- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews Immunology* 4, 181-189.
- Lezza, A.M.S., Mecocci, P., Cormio, A., Flint Beal, M., Cherubini, A., Cantatore, P., Senin, U., and Gadaleta, M.N. (1999). Area-specific differences in OH8dG and mtDNA4977 levels in Alzheimer disease patients and aged controls. *J Anti-Aging Med* 2, 209-215.
- Lifton, R.P., Gharavi, A.G., and Geller, D.S. (2001). Molecular Mechanisms of Human Hypertension. *Cell* 104, 545-556.
- Lopes, L.R., Dagher, M.-C., Gutierrez, A., Young, B., Bouin, A.-P., Fuchs, A., and Babior, B.M. (2004). Phosphorylated p40PHOX as a Negative Regulator of NADPH Oxidase. *Biochemistry* 43, 3723-3730.
- MacKenzie, S.M., Fraser, R., Connell, J.M., and Davies, E. (2002). Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 3, 214-221.
- Mathers, C.D., Boerma, T., and Ma Fat, D. (2009). Global and regional causes of death. *British medical bulletin* 92, 7-32.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 670-684.
- Mehta, P.K., and Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, 82-97.
- Milne, J.C., and Denu, J.M. (2008). The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. *Current opinion in chemical biology* 12, 11-17.
- Montezano, A.C., Burger, D., Paravicini, T.M., Chignalia, A.Z., Yusuf, H., Almasri, M., He, Y., Callera, G.E., He, G., Krause, K.H., *et al.* (2010). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 5 (Nox5) regulation by angiotensin II and endothelin-1 is mediated via calcium/calmodulin-dependent, rac-1-independent pathways in human endothelial cells. *Circ Res* 106, 1363-1373.
- Moriguchi, A., Brosnihan, K.B., Kumagai, H., Ganten, D., and Ferrario, C.M. (1994). Mechanisms of hypertension in transgenic rats expressing the mouse Ren-2 gene. *Am J Physiol* 266, 1273-1279.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free radical biology & medicine* 43, 477-503.
- Mullins, J.J., Peters, J., and Ganten, D. (1990). Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344, 541-545.

Murray, C.J., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A.D., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J.A., Abdalla, S., *et al.* (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* *380*, 2197-2223.

Nauseef, W.M. (2008). Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *The Journal of biological chemistry* *283*, 16961-16965.

Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S.K., Hartlerode, A., Stegmuller, J., Hafner, A., Loerch, P., *et al.* (2008). SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* *135*, 907-918.

Okamoto, K., Toyokuni, S., Uchida, K., Ogawa, O., Takenawa, J., Kakehi, Y., Kinoshita, H., Hattori-Nakakuki, Y., Hiai, H., and Yoshida, O. (1994). Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* *58*, 825-829.

Oliva, M.R., Ripoll, F., Muniz, P., Iradi, A., Trullenque, R., Valls, V., Drehmer, E., and Saez, G.T. (1997). Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Molecular carcinogenesis* *18*, 232-243.

Paravicini, T.M., and Touyz, R.M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care* *31 Suppl 2*, S170-180.

Park, L., Anrather, J., Girouard, H., Zhou, P., and Iadecola, C. (2007). Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* *27*, 1908-1918.

Paul, M., Mehr, A.P., and Kreutz, R. (2006). Physiology of Local Renin-Angiotensin System. *Physiol Rev* *86*, 747-803.

Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current biology : CB* *10*, 886-895.

Pena Silva, R.A., Chu, Y., Miller, J.D., Mitchell, I.J., Penninger, J.M., Faraci, F.M., and Heistad, D.D. (2012). Impact of ACE2 deficiency and oxidative stress on cerebrovascular function with aging. *Stroke; a journal of cerebral circulation* *43*, 3358-3363.

Pool, J.L. (2001). Direct Renin Inhibition: Focus on Aliskiren. *J Manage Care Pharm* *13*, 21-33.

Queisser, N., Fazeli, G., and Schupp, N. (2010). Superoxide anion and hydrogen peroxide-induced signaling and damage in angiotensin II and aldosterone action. *Biological chemistry* *391*, 1265-1279.

- Rattan, S.I. (2006). Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free radical research* 40, 1230-1238.
- Rehman, A., Nourooz-Zadeh, J., Moller, W., Tritschler, H., Pereira, P., and Halliwell, B. (1999). Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS letters* 448, 120-122.
- Reudelhuber, T.L. (2005). The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Current opinion in nephrology and hypertension* 14, 155-159.
- Rivera, J., Sobey, C.G., Walduck, A.K., and Drummond, G.R. (2010). Nox isoforms in vascular pathophysiology: insights from transgenic and knockout mouse models. *Redox Rep* 15, 50-63.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113-118.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology* 146, 905-916.
- Schmid, U., Stopper, H., Schweda, F., Queisser, N., and Schupp, N. (2008). Angiotensin II induces DNA damage in the kidney. *Cancer research* 68, 9239-9246.
- Schroder, K. (2010). Isoform specific functions of Nox protein-derived reactive oxygen species in the vasculature. *Current opinion in pharmacology* 10, 122-126.
- Schulz, E., and Munzel, T. (2008). NOX5, a new "radical" player in human atherosclerosis? *Journal of the American College of Cardiology* 52, 1810-1812.
- Schupp, N., Schmid, U., Rutkowski, P., Lakner, U., Kanase, N., Heidland, A., and Stopper, H. (2007). Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging. *American journal of physiology Renal physiology* 292, F1427-1434.
- Schwer, B., and Verdin, E. (2008). Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell metabolism* 7, 104-112.
- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature cell biology* 6, 168-170.
- Sedelnikova, O.A., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Georgakilas, A.G., and Bonner, W.M. (2010). Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutation research* 704, 152-159.
- Shen, Z., Ajmo, J.M., Rogers, C.Q., Liang, X., Le, L., Murr, M.M., Peng, Y., and You, M. (2009). Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-

induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 296, G1047-1053.

Solier, S., and Pommier, Y. (2009). The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8, 1853-1859.

Stadtman, E.R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free radical research* 40, 1250-1258.

Stanton, A. (2003). Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs* 3, 389-394.

Stolk, J., Hiltermann, T.J., Dijkman, J.H., and Verhoeven, A.J. (1994). Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 11, 95-102.

Strehler, B.L. (1977). *Time, cells, and aging*, 2d edn (New York: Academic Press).

Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.

Tarpey, M.M., and Fridovich, I. (2001). Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 89, 224-236.

Taura, M., Miyano, K., Minakami, R., Kamakura, S., Takeya, R., and Sumimoto, H. (2009). A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47phox plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *The Biochemical journal* 419, 329-338.

Touyz, R.M., Briones, A.M., Sedeek, M., Burger, D., and Montezano, A.C. (2011). NOX Isoforms and reactive Oxygen Species in Vascular Health. *Mol Interv* 11, 27-35.

United Nations. Dept. of Economic and Social Affairs. Population Division. (2002). *World population ageing, 1950-2050* (New York: United Nations).

United Nations. Dept. of Economic and Social Affairs. Population Division. (2010). *World population ageing 2009* (New York, N.Y.: United Nations, Dept. of Economic and Social Affairs, Population Division).

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.

Vaziri, N.D., and Rodríguez-Iturbe, B. (2006). Mechanisms of Disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nature Clinical Practice Nephrology* 2, 582-593.

Vignais, P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59, 1428-1459.

Vijg, J., Maslov, A.Y., and Suh, Y. (2008). Aging: a sirtuin shake-up? *Cell* 135, 797-798.

Vina, J., Borras, C., and Miquel, J. (2007). Theories of ageing. *IUBMB life* 59, 249-254.

Vladimirova, O., O'Connor, J., Cahill, A., Alder, H., Butunoi, C., and Kalman, B. (1998). Oxidative damage to DNA in plaques of MS brains. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 4, 413-418.

Wells, P.G., McCallum, G.P., Chen, C.S., Henderson, J.T., Lee, C.J., Perstin, J., Preston, T.J., Wiley, M.J., and Wong, A.W. (2009). Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 108, 4-18.

Wilcox, C.S., and Pearlman, A. (2008). Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacological reviews* 60, 418-469.

Wu, A., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2006). Oxidative stress modulates Sir2alpha in rat hippocampus and cerebral cortex. *The European journal of neuroscience* 23, 2573-2580.

Wu, R.F., Ma, Z., Liu, Z., and Terada, L.S. (2010). Nox4-Derived H₂O₂ Mediates Endoplasmic Reticulum Signaling through Local Ras Activation. *Molecular and Cellular Biology* 30, 3553-3568.

Yusuf, S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., *et al.* (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet* 364, 937-952.

Zhang, H.J., Doctrow, S.R., Oberley, L.W., and Kregel, K.C. (2006). Chronic antioxidant enzyme mimetic treatment differentially modulates hyperthermia-induced liver HSP70 expression with aging. *J Appl Physiol* 100, 1385-1391.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 01: ROS-Gleichgewicht	2
Abb. 02: Quellen und zelluläre Auswirkung von ROS	3
Abb. 03: Oxidativer Stress und Krankheiten im Menschen	3
Abb. 04: Alterungshypothese durch ROS	5
Abb. 05: Hypertonie und ROS-Produktion in der Niere	7
Abb. 06: Einfluss von ROS auf die Entstehung von Hypertonie	8
Abb. 07: Phosphorylierung und Aktivierung von p47 ^{phox}	10
Abb. 08: Aktivierung der NOX2	10
Abb. 09: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	15
Abb. 10: Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Angiotensin II und Aldosteron	16
Abb. 11: Avidin-Biotin-Färbung	38
Abb. 12: Reaktion von Dihydroethidium mit Superoxidionen	40
Abb. 13: Färbung von Schnitten der Niere mit DHE zur Detektion von Superoxidionen in phox- und Wildtyp-Mäusen	43
Abb. 14: Durchschnitt der Grauwerte der DHE-Fluoreszenz (w.E.) in der Niere von phox- und Wildtyp-Mäusen	43
Abb. 15: Färbung von Schnitten des Herzens mit DHE zur Detektion von Superoxidionen in phox- und Wildtyp-Mäusen	44
Abb. 16: Durchschnitt der Grauwerte der DHE-Fluoreszenz (w.E.) im Herz von phox- und Wildtyp-Mäusen	44
Abb. 17: Anti- γ H2A.X-Gewebefärbungen in der Niere von phox- und Wildtyp-Mäusen	45
Abb. 18: DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere von phox- und Wildtyp-Mäusen	46
Abb. 19: Anti- γ H2A.X-Gewebefärbungen im Herz von phox- und Wildtyp-Mäusen	47
Abb. 20: DNA-Doppelstrangbrüche im Herz von phox- und Wildtyp-Mäusen	47
Abb. 21: Expression von Sirtuin1 im Gehirn von phox- und Wildtyp-Mäusen	48

Abb. 22: Expression von Sirtuin1 in der Niere von phox- und Wildtyp-Mäusen	48
Abb. 23: Expression von Hsp70 in der Niere von phox- und Wildtyp-Mäusen	49
Abb. 24: Färbung von Schnitten der Niere mit DHE zur Detektion von Superoxidionen in ren2- und SD-Ratten	52
Abb. 25: Durchschnitt der Grauwerte der DHE-Fluoreszenz (w.E.) in der Niere von ren2- und SD-Ratten	53
Abb. 26: Färbung von Schnitten der Niere mit DHE zur Detektion von Superoxidionen in ren2- und SD-Ratten	54
Abb. 27: Durchschnitt der Grauwerte der DHE-Fluoreszenz (w.E.) im Herz von ren2- und SD-Ratten	55
Abb. 28: Anti- γ H2A.X-Gewebefärbungen in der Niere von ren2- und SD-Ratten	57
Abb. 29: DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere von ren2- und SD-Ratten	58
Abb. 30: Anti- γ H2A.X-Gewebefärbungen im Herz von ren2- und SD-Ratten	59
Abb. 31: DNA-Doppelstrangbrüche im Herz von ren2- und SD-Ratten	60
Tabelle 01: Liste der Wildtyp- und p47-Knockout-Tiere	32
Tabelle 02: Interventionen und Bezeichnung der ren2- und SD-Ratten	33
Tabelle 03: Liste der ren2- und SD-Tiere	34
Tabelle 04: Blutdruck, Körpergewicht, Organratio und Nierenfunktionsparameter der ren2- und SD-Ratten	50

6.3 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACEi	Angiotensin-konvertierendes Enzym-Inhibitor
AIR	Autoinhibitorische Region
Ald	Aldosteron
AngI-IV	Angiotensin I-IV
AP-A	Aminopeptidase A
Apo	Apocynin
APS	Ammoniumpersulfat
AT1-4 Rezeptor	Angiotensin Rezeptor Typ 1-4
B	Biotin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BL 6	Black 6
BSA	Rinder-Serum-Albumin
bzw	beziehungsweise
C	Celsius
CAT	Katalase
Chron.	chronisch
cm	Zentimeter
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CP-P	Carboxypeptidase P
DAB	Diaminobenzidin
DDAH	Dimethylarginin- dimethylaminohydrolase
DHE	Dihydroethidium
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DUOX 1-2	Dual Oxidase 1-2
e ⁻	Elektron
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
Endot.	endothelial

ER	endoplasmatisches Retikulum
FAD	Flavinadenindinukleotid
FOXO	Gabelkopf-Box-Protein
g	Gramm
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
gp91 ^{phos}	Cytochrome b-245, beta Polypeptid
GPx	Glutathionperoxidase
Gα-q/11	Guaninnukleotid-bindendes Protein q Polypeptid alpha 11
H ⁺	Wasserstoffion
H2AX	Histon 2AX
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1 –piperazinyl)-ethansulfonsäure
HO ₂ ·	Hydroperoxyl-Radiakl
HRP	Meerrettichperoxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
KO	Knockout
l	Liter
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
M	Mol
MAS-R	MAS-Rezeptor
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule

MR	Mineralkortikoidrezeptor		
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure		
n.a.	nicht angegeben		
Na	Natrium		
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat		
NaCl	Natriumchlorid		
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-adinin-dinukleotid		
NADP	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phospha		
NADPH	reduzoertes Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat		
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat		
NFκB	nukleärer Faktor kappa B		
NO	Stickstoffmonoxid		
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase		
NOX 1-4	NADPH Oxidase 1-4		
NOXA	NOX Aktivator		
NOXO1	NOX Organizer 1		
O ₂	Sauerstoff		
O ₂ ⁻	Superoxidanion		
OH [·]	Hydroxyl-Radikal		
ONOO ⁻	Peroxinitrit		
P/R-R	Prorenin/ Renin- Rezeptor		
p22 ^{phox}	Cytochrome b-245 Leichtkette		
p40 ^{phox}	neutrophiler zytosolischer Faktor 4		
p47 ^{phox}	neutrophiler zytosolischer Faktor 1		
p53	Protein 53		
p67 ^{phox}	neutrophiler zytosolischer Faktor 2		
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1		
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung		
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20		
PDGF	thrombozytärer Wachstumsfaktor		
PDI	Protein Disulfid Isomerase		
PGC-1α	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Koaktivator 1-alpha	Rezeptor	gamma

Phox	phagozytische Oxidase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRR	Prolin-reiche Region
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PX	phox-homologe-Domäne
Rac	Ras-ähnliches C3 Botulinum-Toxin-Substrat
ren	Renin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Sprague Dawley
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	scr-homologe-3-Domäne
Sirt1	Sirtuin1
SOD	Superoxid-Dismutase
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1 -oxyl
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor beta
TKS4/5	Tyrosine Kinase Substrate with 4/5 SH3 domains
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
w.E.	willkürliche Einheit
WT	Wildtyp
γ H2AX	phosphoryliertes Histon 2AX
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Helga Stopper bedanken, da sie mir die Möglichkeit gegeben hat in ihrem Labor zu promovieren und mich während der gesamten Zeit unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Nicole Schupp bedanken, dass ich an ihren Projekten mitarbeiten durfte.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Gholamreza Fazeli, der mich die gesamte Arbeit über betreut und unterstützt hat und mir bei allen Fragen tatkräftig zur Seite stand.

Schließlich möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppen AG Stopper und AG Schupp für die angenehme Arbeitsatmosphäre und deren Hilfe danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Makiol
Vorname: Christian

Schulbildung

8/1995 – 7/1999	Grundschule Bad Blankenburg
8/1999 – 5/2007	Friedrich-Fröbel-Gymnasium Bad Blankenburg Leistungskurse: Chemie, Mathematik Seminarfacharbeit: Renaissance alternativer Heilmittel und -methoden
5/2007	Abschluss: Abitur

Zivildienst

6/2007 – 3/2008	Berufsbildungs- und Technologie Zentrum Rudolstadt
-----------------	---

Hochschulstudium

4/2008 – 5/2014	Julius-Maximilians-Universität Würzburg Fach: Humanmedizin
3/2010	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität Würzburg
4/2010 – 9/2012	Begleitstudium Experimentelle Medizin
seit 3/2011	Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg

9/2012	Präsentation über <i>Increased Organ Levels of Angiotensin II in Ren2 Rats Leads to the Formation of Reactive Oxygen Species and DNA Damage</i> (G. Fazeli*, H. Stopper, S. Weissenberger, C. Makiol, A. Heidland, N. Schupp) beim SFRR in London
2/2013 – 1/2014	Praktisches Jahr an der Uniklinik Würzburg in Innere Medizin (Pulmologie, Interdisziplinäres onkologisches Tagestherapiezentrum) Chirurgie (Plastische- und Handchirurgie, Allgemein- und Viszeralchirurgie, Kinderchirurgie, Urologie) Psychiatrie
5/2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität Würzburg Zertifikat Experimentelle Medizin
6/2014	Approbation als Arzt
seit 10/2014	Masterstudium Experimentelle Medizin Masterarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg

Würzburg, den 15. Oktober 2014

Christian Makiol