

Aus dem Institut für kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
im Biomedizinischen Zentrum München
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Interims-Direktor: Prof. Dr. Markus Sperandio



Peroxynitrit-Produktion als Folge eines
endothelzellspezifischen
Thioredoxin Reduktase 2 Knockouts

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Christoph Elias Nuernbergk

aus

Eitorf

Jahr

2022

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. vet. Heike Beck

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Ries

PD Dr. med. K. Lackermair

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2022

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	3
2. Abbildungsverzeichnis	5
3. Abkürzungsverzeichnis	5
4. Einleitung	7
4.1. Stickstoffmonoxid	7
4.1.1. Synthese und Regulation von NO•	7
4.1.2. Vaskuläre Funktionen von NO•	8
4.1.3. Elimination von NO•	9
4.2. Peroxynitrit und reaktive Stickstoffspezies	10
4.3. Antioxidative Systeme	11
4.3.1. Nicht-enzymatische Systeme	11
4.3.2. Enzymatische Systeme	12
4.3.2.1. Superoxiddismutase	12
4.3.2.2. Katalase	12
4.3.2.3. Glutathionperoxidase	12
4.3.3. Thioredoxinsystem	12
4.3.3.1. Thioredoxine	12
4.3.3.2. Thioredoxin-Reduktasen	13
4.3.3.2.1. Antioxidative Funktionen der Thioredoxin-Reduktasen	13
4.3.3.2.2. Erkenntnisse zur Funktion von TrxR2 durch Überexpressions- und knockout-Studien	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	16
5. Material & Methoden	18
5.1. Material	18
5.1.1. Antikörper	18
5.1.1.1. Antikörper für Immunhistochemie	18
5.1.1.2. Antikörper für Immunoblotting	18
5.1.2. Chemikalien	19
5.1.3. Enzyme	19
5.1.4. Puffer	20
5.1.5. Primer	20
5.2. Methoden	21
5.2.1. Generierung der induzierbaren endothelzell-spezifischen Trxrd2-Knockout-Maus	21
5.2.2. Genotypisierung	22
5.2.2.1. DNS-Extraktion	22
5.2.2.2. Polymerasekettenreaktion	22
5.2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	23
5.2.3. Isolierung von Mesenterialarterien und Lungengewebe	23
5.2.4. FID-Experimente an Femoralarterien	23
5.2.5. Isolierung von adulten Trxrd2 ^{IECKO} -Zellen	25
5.2.5.1. Zellkultur	25

Inhaltsverzeichnis	4
5.2.6. <i>In vitro</i> Nachweis von Peroxynitrit in Trxrd2 ^{ieCKO} -Zellen	26
5.2.7. <i>Ex vivo</i> Nachweis von Peroxynitrit in Mesenterialarterien	26
5.2.8. Mitochondriale Lokalisation von Peroxynitrit	27
5.2.9. Proteinbiochemie	28
5.2.9.1. Proteinlysatherstellung	29
5.2.9.2. Immunoblot	30
5.2.10. Statistische Analyse	31
6. Ergebnisse	32
6.1. Genotypisierung der Trxrd2 ^{ieCKO} -Mäuse	32
6.2. Erhöhte Peroxynitritspiegel in pulmonalen Trxrd2 ^{ieCKO} -Endothelzellen	32
6.3. Erhöhte Peroxynitritspiegel in Mesenterialarterien und Einfluss von Stickstoffmonoxid	33
6.4. Mitochondriale Lokalisation des Peroxynitritsignals	34
6.5. Evaluierung der endothelialen Funktion mittels FID	35
6.6. Expressionslevel von Trx2, Grx2, Prx3 und Prx5	36
7. Diskussion	38
7.1. Limitationen des Cre/loxP-Mausmodells	39
7.2. Isolation von Arterien und Endothelzellen	40
7.3. Multiphotonenmikroskopie und Immunfluoreszenz	41
7.4. Westernblots von Redoxproteinen	42
7.5. Nachweis von Peroxynitrit in Endothelzellen und Mesenterialarterien	43
7.6. Implikation der mitochondrialen Peroxynitritlokalisierung	45
7.7. Flussinduzierte Dilatation	46
7.8. Einfluss eines TrxR2-Knockouts auf andere antioxidative Systeme	48
7.9. Fazit	50
8. Zusammenfassung	52
9. Literaturverzeichnis	53
10. Affidavit	77
11. Danksagung	78
12. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Funktionsweise des Thioredoxin-Systems	13
Abbildung 2: Homodimerer Aufbau der Thioredoxin-Reduktase	14
Abbildung 3: Cre-vermittelte konditionale Trxr2 Deletion.....	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung des FID-Versuchsaufbaus.....	25
Abbildung 5: Genotypisierung der Cre/loxP-Knockout Mäuse	32
Abbildung 6: Erhöhte Peroxynitritspiegel in pulmonalen ECs von Trxrd2 ^{IECKO} Mäusen	32
Abbildung 7: Ex vitro Nachweis von Peroxynitrit in Mesenterialarterien	33
Abbildung 8: Mitochondriale Peroxynitritlokalisierung mittels MitoPY1	34
Abbildung 9: EC-Färbungen mit MitoPY1 und MitoID-Red	35
Abbildung 10: Messung der flussinduzierten Dilatation an Femoralarterien.....	35
Abbildung 11: Westernblots für Redoxproteine.....	36
Abbildung 12: Konfiguration von Peroxiredoxin 3	36
Abbildung 13: Analyse des hyperoxidierten Peroxiredoxins	37
Abbildung 14: Konfiguration des Glutaredoxin 2.....	37
Abbildung 15: Mechanismus der Peroxiredoxinhyperoxidation	50

3. Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ASK1	Apoptosesignal Kinase
ATP.....	Adenosintriphosphat
BH4.....	Tetrahydrobiopterin
cGMP.....	zyklisches Guanosinmonophosphat
CK.....	Cytokeratin
COX.....	Cyclooxygenase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
eEPCs	embryonic endothelial progenitor cells
eNOS.....	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FI-B.....	Fluoreszinboronat
FID.....	Flussinduzierte Dilatation
FMN.....	Flavinmononukleotid
GPx.....	Glutathionperoxidase
Grx.....	Glutaredoxin
HEK	Human embryonic Kidney
HO	Häm-Oxidase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
MPM	Multiphotonenmikroskopie
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
nNOS.....	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase

NO•	Stickstoffmonoxid
ONOO•	Peroxynitrit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostacyclin
Prx	Peroxiredoxin
RNR	Ribonukleotidreduktase
RNS	Reaktive Nitrogenspezies
ROS	reaktive Oxygenspezies
R-SNO	S-Nitrosothiol
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sGC	Soluble guanylate cyclase
SOD	Superoxiddismutase
tPA	tissue Plasminogenaktivator
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
TxA ₂	Thromboxan
TZ	Thrombozyten
VSMC	Vascular smooth muscle cells

4. Einleitung

4.1. Stickstoffmonoxid

Seit der Identifizierung von Stickstoffmonoxid (NO•) als wichtiger kardiovaskulärer Regulator und dem damit einhergehenden Nobelpreis 1998 ist NO• ein Kernthema der physiologischen und kardiovaskulären Forschung.¹ Anfangs vor allem als Schadstoff gesehen, entwickelt sich mittlerweile ein versatiles Bild der unterschiedlichen Funktionen.

4.1.1. Synthese und Regulation von NO•

NO• wird durch NO•-Synthasen (EC 1.14.13.30) gebildet. Es existieren drei unterschiedliche Isoformen. Man unterscheidet die neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und die induzierbare NOS (iNOS).² Alle Isoformen üben unterschiedliche Funktionen aus und werden von verschiedenen Genen codiert: So codiert NOS1 für die nNOS, NOS2 für die iNOS und NOS3 für die eNOS. Die Gene liegen auf unterschiedlichen Chromosomen.³⁻⁶

•NO-Synthasen besitzen eine homodimere Struktur, werden aber als Monomere produziert. Fehlende Dimerisierung oder eine Substratdepletion führen zu einem Zustand, der Entkopplung genannt wird – die NOS produziert dann Superoxidradikale ($O_2^{\bullet-}$) anstelle von Stickstoffmonoxid.^{7, 8} NOS-Monomere bestehen aus einer carboxy-terminalen Reduktasekomponente, die Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) enthält und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) bindet. Weiterhin enthalten sie eine amino-terminale Oxygenasekomponente, die eine prosthetische Häm-Gruppe und ein Calmodulin-Bindungselement enthält.^{9, 10} Essentiell ist auch der Kofaktor 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH4), der eine Dimerisierung erst ermöglicht.¹¹ Fehlt dieser oder ist er oxidiert, entsteht ebenfalls eine Entkopplung und schädliches $O_2^{\bullet-}$ wird produziert.^{12, 13}

Eine funktionsfähige NOS nutzt L-Arginin, molekularen Sauerstoff und NADPH als Substrate. Elektronen werden von NADPH via FAD und FMN in der Reduktasedomäne zur Hämgruppe in der Oxygenasedomäne übertragen. Dort wird der Sauerstoff aktiviert und L-Arginin zu L-Citrullin und NO• oxidiert.¹⁴ Die NO-Produktion wird multiplex und strikt reguliert. nNOS und eNOS werden via Calcium/Calmodulin (Ca^{2+}/CaM) reguliert. Eine CaM-bindende Domäne befindet sich zwischen Oxygenase und Reduktase: Strömt eine gewisse Menge an Ca^{2+} in die Zelle und wird es von CaM gebunden, bindet CaM an die NOS und ermöglicht einen Elektronenfluss von FMN zur Hämgruppe.^{9, 15} Während für die nNOS supraphysiologische Ca^{2+} -Konzentrationen benötigt werden, wird die iNOS bereits bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert.^{16, 17} Die eNOS

kann schon bei basalen Calciumspiegeln bzw. calciumunabhängig aktiviert werden. So kann beispielsweise der durch den Blutfluss verursachte Scherstress die Phosphokinase A aktivieren und via Phosphorylierung von Serin615 oder Serin1177 die Calciumsensitivität erhöhen.^{18, 19} Weitere Regulatoren sind asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und Arginase, die die Substratzufuhr steuert.^{20, 21} Auch S-Glutathionylierung spielt eine wichtige Rolle.²²

4.1.2. Vaskuläre Funktionen von NO•

Stickstoffmonoxid besitzt, abhängig von der jeweils produzierenden NOS (und damit der NO•-produzierenden Zelle), ein umfangreiches Funktionsspektrum. Diverse physiologische und pathophysiologische Vorgänge werden via NO• reguliert. Darüber hinaus können epigenetische Prozesse gesteuert werden, um eine endotheliale Genexpression zu regulieren.²³ Auch bei der Therapie zahlreicher Erkrankungen, wie beispielsweise Angina pectoris oder akuter Hypertension, wird NO• eingesetzt, sodass auch eine hohe klinische Signifikanz besteht.^{24, 25} Im Folgenden werden einige für Gefäße wichtige Funktionen von NO• erörtert, da der Hauptfokus dieser Arbeit auf dem vaskulären endothelialen Kompartiment liegt.

Eine der wesentlichsten Aufgaben von vaskulärem NO• ist die Aufrechterhaltung der vaskulären Relaxation und der damit einhergehenden Regulation des vaskulären Tonus mittels Einfluss auf die vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC). Nach der Produktion in vaskulären Endothelzellen diffundiert NO• in die benachbarten VSMC.²⁶ Dort wird parakrin nach Bindung an die lösliche Guanylatzyklase (sGC) die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) gefördert.²⁷ cGMP wiederum aktiviert die Proteinkinase G, die zahlreiche Ziele phosphoryliert, wie z.B. Calcium-Kanäle mit großem Leitwert (BKCa) oder auch Phospholamban^{28, 29}. Hierdurch wird eine Reduzierung der intrazellulären Calciumkonzentration vermittelt, sodass der für die Kontraktion wichtige Ca²⁺/Calmodulin-Komplex nicht die Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (MLCK) aktivieren kann. Als Folge dessen wird die regulatorische Leichtkette von Myosin nicht phosphoryliert und die Myosin-ATPase kann keine Kontraktion vermitteln.^{30, 31} Für die Relaxation ist die Myosin-Leicht-Ketten Phosphatase (MLCP) von großer Bedeutung. Diese dephosphoryliert die regulatorische Leichtkette, sodass keine Kontraktion zustande kommt.³² •NO selber kann über die Disinhibition der MLCP-inhibierenden Proteine CPI-17 und MYPT1 die MLCP aktivieren und bewirkt so eine Relaxation der vaskulären Muskulatur.^{33, 34}

Eine weitere wichtige Funktion von NO• zur Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität besteht durch die Inhibition der Thrombozytenaktivierung. Üblicherweise zirkulieren Thrombozyten (TZ) in einem inaktiven Stadium, das durch die Trias Prostazyklin, CD39/ecto-ADPase und NO• bewahrt wird.^{35, 36, 37}

Da die thrombozytäre Funktion vor allem über eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration ausgeübt wird, vermittelt NO• über ähnliche Mechanismen wie in den VSMC eine Erniedrigung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Darüber hinaus kann NO• die Leukozytenadhäsion am Endothel beeinflussen, indem es mit den für die Adhäsion bedeutenden Leukozytenoberflächenproteinen CD11 und CD18 interferiert oder deren Expression in Leukozyten supprimiert.^{38, 39} Ergänzend werden bei Mangel an NO• endotheliale Zelladhäsionsmoleküle, z.B. P-Selektin, hochreguliert.⁴⁰ Somit kann bei ausreichender NO•-Produktion die endotheliale Leukozytenadhäsion und -transendotheliale Migration verhindert werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass NO• eine zentrale Rolle in der Prävention atherosklerotischer Prozesse innehat. Eine verminderte NO• Bioverfügbarkeit ist als ein erstes Zeichen der endothelialen Dysfunktion zu werten.⁴¹ Neben der o.g. Inhibition von transendothelialer Immunzellmigration und Thrombozytenaggregation haben weitere Faktoren, wie z.B. die Hemmung der VSMC Proliferation, eine Bedeutung für die Entstehung der Atherosklerose.⁴²

Neben den vaskulären und antiatherosklerotischen Funktionen ist NO• an einer großen Zahl weiterer physiologischer Prozesse beteiligt. Hierzu gehören wichtige Aufgaben bei der Immunantwort⁴³ oder auch im zentralen Nervensystem.⁴⁴ Dies demonstriert die essenzielle Rolle von Stickstoffmonoxid im menschlichen Organismus.

4.1.3. Elimination von NO•

Die Art und die Rate der Elimination von NO• sind abhängig von dessen Konzentration, dem umliegenden Gewebe und der umliegenden Konzentration anderer bioreaktiver Moleküle.⁴⁵

Unter physiologischen Bedingungen ist das Hämoglobin der zirkulierenden Erythrozyten eines der wichtigsten Elemente in der Regulation der Bioverfügbarkeit von NO•.⁴⁶ Das NO• diffundiert, einem steilen Konzentrationsgradienten folgend, in Richtung des Blutstroms. Basierend auf der dann vorliegenden NO•-Konzentration und dem vorherrschenden Oxygenierungsgrad des Hämoglobins wird entweder Nitrat gebildet und das Hämoglobin wird oxidiert ($\text{HbFe}^{2+} \Rightarrow \text{HbFe}^{3+}$) oder das NO• wird kovalent als S-Nitrosothiol (R-SNO) an das Hämoglobin gebunden (S-Nitrosylierung).⁴⁷ Hierbei wird die NO•-Bioverfügbarkeit nicht limitiert, sondern konserviert, denn das Hämoglobin kann das NO• unter spezifischen Bedingungen (z.B. Hypoxie) an anderer Stelle wieder freigeben.⁴⁸

NO• kann neben Hämoglobin auch mit diversen anderen Metallzentren reagieren. Hierzu gehören z.B. die bereits genannte sGC oder auch die

Cyclooxygenase. Häufig kommt es nach der Bindung zu einer Änderung der sekundären Proteinstruktur und einer damit einhergehenden Änderung der Proteinfunktion.⁴⁹

Des Weiteren kann NO•, neben Hämoglobin, an spezifische Cystein-Reste einer großen Zahl weiterer Proteine als R-SNO gebunden werden. Hierdurch kann eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse gesteuert werden. S-Nitrosylierung von v.a. Cystein-Resten stellt somit einen wichtigen Mechanismus der NO-vermittelten Signaltransduktion dar.⁵⁰

Unter aeroben Bedingungen kann NO in Verbindung mit molekularem Sauerstoff das Produkt Stickstoffdioxid bilden (NO₂•).⁵¹ Die Reaktion läuft unter physiologischen Bedingungen aufgrund der niedrigen Spiegel von NO• und O₂, die auch im Fließgleichgewicht stehen, langsam ab. NO₂• ist aufgrund eines freien Elektrons ein Radikal, demnach wird es nach seiner Produktion durch Radikalfänger wie Ascorbat, Thiole oder auch α-Tocopherol eliminiert.⁵² Ist dies aufgrund von verbrauchten Radikalfängern nicht möglich, entstehen zahlreiche oxidierte Produkte.⁵¹

Abschließend lässt sich festhalten, dass NO• vorwiegend nicht enzymatisch und vor allem durch Reaktionen mit anderen Biomolekülen abgebaut wird. Neben den physiologischen Effekten besitzt NO• aber auch schädliche Effekte. Diese werden vornehmlich von Peroxynitrit verursacht.

4.2. Peroxynitrit und reaktive Stickstoffspezies

Schon 1992 zeigte sich, dass Makrophagen unter Zuhilfenahme von Superoxidanion (O₂•⁻) und NO• tumorizide und antimikrobielle Aktivität besitzen. Diese Aktivität wird durch Peroxynitrit (ONOO⁻) vermittelt, welches eine deutlich stärkere oxidative Wirkung besitzt als NO•.⁵³ ONOO⁻ entsteht, wenn NO• mit Superoxidanion reagiert. Diese Reaktion ist diffusionskontrolliert und erfolgt spontan.⁵⁴

Das Superoxidanion (oder Superoxidradikal) entsteht durch die Übertragung von einem Elektron auf molekularen Sauerstoff. Im Menschen erfolgt dies akzidentiell in der Atmungskette, in der Elektronen anstatt auf den nächsten Komplex auf molekularen Sauerstoff übertragen werden.⁵⁵ O₂•⁻ wird darüber hinaus als antimikrobieller Wirkstoff durch die NADPH-Oxidase in Makrophagen produziert.⁵⁶ Somit wird O₂•⁻ im physiologischen Milieu dauerhaft und ubiquitär gebildet. Kommt es zu einer Entkopplung der Atmungskette, der eNOS oder einem inflammatorischen Stimulus, kann die O₂•⁻-Produktion um ein Vielfaches steigen.^{57, 58, 59} Um oxidativen Schäden vorzubeugen und eine Wirkung als Signalmolekül zu gewährleisten, reguliert die Superoxiddismutase (SOD) die O₂•⁻-Konzentration präzise.⁶⁰

Peroxynitrit ist ein potenziell zytotoxisches Oxidans, das mit diversen Biomolekülen reagiert. Eine wichtige Reaktion ist die nukleophile Addition von im physiologischen Milieu hochkonzentriert vorliegenden Kohlenstoffdioxid. Es entsteht das instabile Nitroso-peroxy-carboxylat (ONOOCO_2^-), welches rasch homolytisch in Carbonat (CO_3^{2-}) und Nitrat (NO_3^-) gespalten wird. Beide gebildeten Radikale können weitere oxidative Prozesse initiieren.⁶¹

Peroxynitrit selbst kann unterschiedliche Substrate oxidieren. Hierzu gehören DNS, Thiolreste, oder auch Lipide.^{62, 63, 64} Ferner ist die Nitrierung von Proteintyrosinresten ein elementarer und gut untersuchter Reaktionsmechanismus. Dieser wird von Radikalen ausgelöst, die beim Peroxynitritzerfall entstehen.⁶⁵ Durch Peroxynitrit hervorgerufene Modifikationen können so Proteinfunktionen oder die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen.^{66, 67} Sie spielen somit auch eine wichtige Rolle bei der zellulären Signaltransduktion.⁶⁸ ONOO^- und die beim Zerfall entstehenden Radikale werden reaktive Stickstoffspezies (RNS) genannt. Von diesen evozierte chemische Modifikationen werden in ihrer Gesamtheit als nitrosativer Stress bezeichnet.⁶⁹ Kann dieser nicht durch die antioxidativen Systeme kontrolliert werden, können Zellen durch Apoptose zugrunde gehen und die Entwicklung zahlreicher pathophysiologischen Zustände und Erkrankungen wird begünstigt.

70, 71

4.3. Antioxidative Systeme

Unabhängig davon, ob es sich um Veränderungen handelt, die durch nitrosativen oder oxidativen Stress verursacht werden, ist eine akkurate Regulation beider Variablen von elementarer Bedeutung. Nur so können oxidative Schäden vermieden und eine exakte Signaltransduktion sichergestellt werden. Man differenziert zwischen endogenen, also vom Organismus gebildeten, und exogenen, dem Organismus hinzugefügten, Antioxidantien. Weiterhin unterscheidet man zwischen nicht-enzymatischen und enzymatischen Antioxidantien.

4.3.1. Nicht-enzymatische Systeme

Nicht-enzymatische Antioxidantien sind primär, aber nicht ausschließlich, Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht. Ihre Aufgabe besteht darin, die Bildung von Radikalen zu verhindern oder bereits gebildete Radikale zu neutralisieren.⁷² Nicht-enzymatische Antioxidantien liegen sowohl extra- als auch intrazellulär vor. Zu dieser Spezies von Antioxidantien gehören unter anderem Vitamine wie α -Tocopherol (Vit. E)⁷³ oder Ascorbinsäure (Vit. C)⁷⁴, Carotenoide⁷⁵, metallbindende Proteine⁷², Coenzym Q10⁷⁶, Harnsäure⁷⁷ und Glutathion.⁷⁸ Letzteres ist ein Tripeptid⁷⁹, wird ubiquitär exprimiert und hat neben seinen

antioxidativen Eigenschaften auch eine regulatorische Rolle bei Prozessen wie Zellteilung und Apoptose.^{80, 81} Zudem ist Glutathion bei der Peroxynitritelimination beteiligt.⁸² Oxidiertes Glutathion wird durch die Glutathion Reduktase unter NADPH-Verbrauch wieder reduziert.⁸³

4.3.2. Enzymatische Systeme

Zu den wichtigen antioxidativen Enzymen gehören unter anderem die SOD, Katalase, Glutathion-Peroxidasen (GPx), Häm-Oxidase (HO) und das Thioredoxin-System.

4.3.2.1. Superoxiddismutase

Die drei Isoenzyme der SOD-Familie (EC 1.15.1.1) gehören zu den bedeutsamsten antioxidativen Enzymen in der Zelle. Die verschiedenen Isoenzyme werden von verschiedenen Genen codiert. Sie katalysieren die Reaktion von zwei Superoxidradikalen ($O_2^{\bullet-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2).⁶⁰ Die SOD benötigt ein Metall (Eisen (Fe), Mangan (Mn) oder Kupfer/Zink (Cu/Zn)) als Kofaktor und in Abhängigkeit dessen erfolgt die Einteilung in Isoformen.⁸⁴

4.3.2.2. Katalase

Die Katalase (CAT, EC 1.11.1.6) wird auch ubiquitär exprimiert, allerdings variiert die Aktivität zelltypabhängig. Intrazellulär ist sie vor allem in den Peroxisomen lokalisiert. Die Katalase ist ein tetrameres Enzym. Jedes Monomer enthält ein Häm-Molekül und ein NADPH.⁸⁵ Die Katalase detoxifiziert H_2O_2 zu Wasser und molekularem Sauerstoff und vollendet somit den Abbau von Superoxid. Katalase schützt die Zellen vor übermäßigen H_2O_2 -Konzentrationen und bewahrt so beispielsweise auch die Erythrozytenstruktur.⁸⁶

4.3.2.3. Glutathionperoxidase

Die Glutathionperoxidasen (GPx, EC 1.11.1.9) tragen in ihrem katalytischen Zentrum ein L-Selenocystein, welches essentiell für die katalytische Aktivität der Enzyme ist.⁸⁷ Sie katalysieren die Glutathion-abhängige Reaktion von Wasserstoffperoxid und radikalinduzierten Lipidperoxiden in ihre entsprechenden Alkohole und Wasser.^{87, 88} Sie sind wichtige antioxidative Enzyme, da eine Einschränkung der Aktivität oder ein Verlust der Funktion oxidative Modifikationen begünstigt und somit u.a. die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen gefördert wird.⁸⁸

4.3.3. Thioredoxinsystem

4.3.3.1. Thioredoxine

Thioredoxine sind ubiquitär exprimierte, etwa 12 kDa kleine Proteine, die Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen mittels einer hochkonservierten -Cys-Gly-Pro-Cys-Domäne katalysieren und selbst oxidiert bzw. reduziert werden. Es sind 3 verschiedene Isoformen bekannt. Trx1 wird zytosolisch exprimiert, Trx2 mitochondrial und Sptrx in Spermatozoen.^{89, 90}

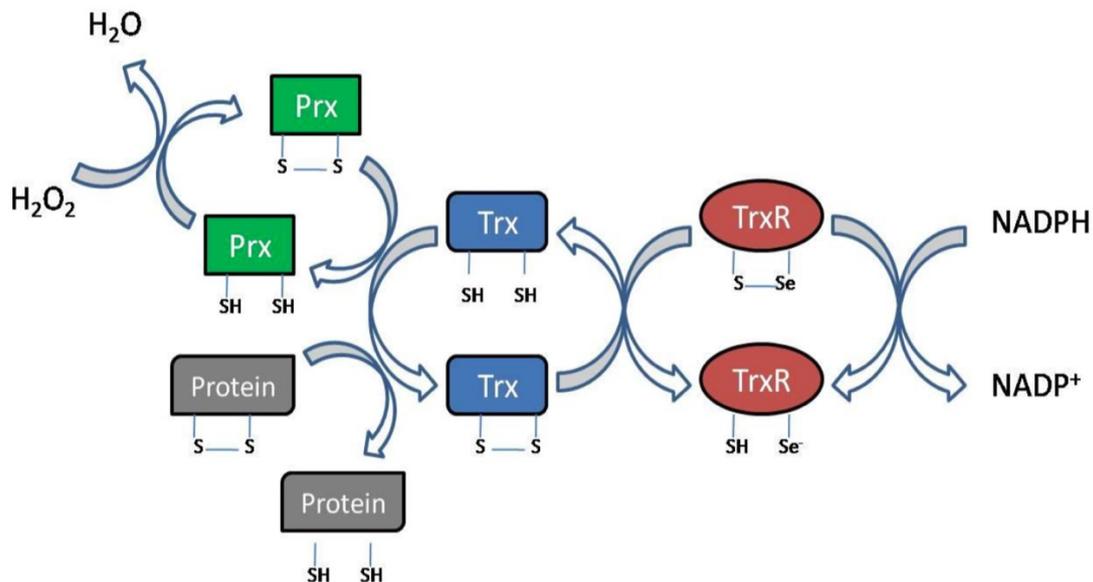


Abbildung 1: Schematische Funktionsweise des Thioredoxin-Systems

Reduziertes Thioredoxin (Trx-SH-SH, blau) kann durch beispielsweise H_2O_2 oxidierte Proteine oder Peroxiredoxine (Prx) reduzieren, während es selbst oxidiert wird. Oxidiertes Trx wird mittels TrxR (rot) unter NADPH-Verbrauch wieder reduziert.⁹¹

Thioredoxine vermitteln einen großen Teil ihrer antioxidativen Wirkung über die Reduktion von Peroxiredoxinen.⁹² Somit leisten sie einen wichtigen Beitrag, um das zelluläre Redox-Gleichgewicht beizubehalten und ein physiologisches Milieu zu gewährleisten (vgl. Abb. 1). Darüber hinaus sind Thioredoxine bei der Regulation von Transkriptionsfaktoren wie z.B. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NFkB) beteiligt und beeinflussen so die Genexpression.⁹³ Weiterhin sind Thioredoxine Teil von vielen Signaltransduktionswegen. So kann Thioredoxin beispielsweise an die Apoptosesignal Kinase 1 (ASK1) gebunden werden und den Zelltod inhibieren.⁹⁴ Um seine umfangreichen Funktionen ausüben zu können, müssen die Thioredoxine in einen reduzierten Zustand verbracht werden. Hierfür ist die Thioredoxin-Reduktase notwendig.⁹⁵

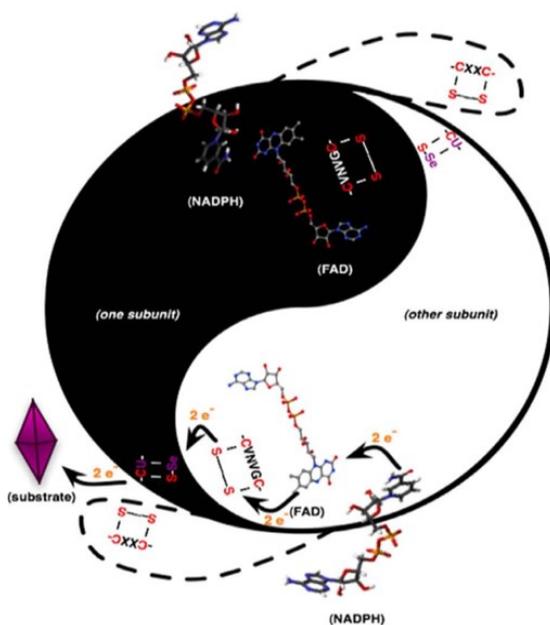
4.3.3.2. Thioredoxin-Reduktasen

4.3.3.2.1. Antioxidative Funktionen der Thioredoxin-Reduktasen

Thioredoxinreduktasen (TrxR) sind eine Gruppe an Oxidoreduktasen, die die Aminosäure Selen für eine suffiziente Funktion benötigen.⁹⁶ TrxR besitzen einen homodimeren Aufbau und eine konservierte -Gly-Cys-Sec-Gly-COOH-Domäne,

die das katalytische Zentrum darstellt.⁹⁷ Analog zu Trx existieren drei Isoformen der TrxR. TrxR1 wird primär zytosolisch⁹⁸, TrxR2 mitochondrial⁹⁹ und TGR in Spermatozoen exprimiert.¹⁰⁰ Neben dem Hauptsubstrat Thioredoxin können aufgrund der gut zugänglichen aktiven Domäne weitere Substrate wie die Proteindisulfidisomerase¹⁰¹ oder niedermolekulare Antioxidantien wie Vitamin C¹⁰² reduziert werden. Neben den antioxidativen Eigenschaften von TrxR bestehen weitere wichtige Funktionen. In Abbildung 2 ist der Aufbau der Trxr2 schematisch dargestellt.

Um die spezifischen Aufgaben der einzelnen TrxRs genauer zu charakterisieren wurden verschiedene Maus- und Zellmodelle entwickelt, beispielsweise durch Gen-Knockout¹⁰³⁻¹⁰⁵ bzw. mittels Über- oder reduzierter Expression isolierter Isoenzyme.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die TrxR2, zu der im



anderen Untereinheit (schwarz) reduziert. Hierbei entsteht ein Selenothiol auf Grundlage dessen diverse Substrate reduziert werden können.¹⁰⁹

Gegensatz zur TrxR1 weniger Daten vorliegen (155 vs 621 Treffer auf Pubmed zum Zeitpunkt des Verfassens).

Abbildung 2: Homodimerer Aufbau der Thioredoxin-Reduktase

Anfangs wird ein enzymfixiertes FAD mittels NADPH reduziert. Anschließend werden die Elektronen auf das N-terminale -CGVNVC-Motiv der einen Untereinheit (weiß) mit subsequenter Bildung eines Dithiols übertragen. Danach wird die c-terminale Gly-Cys-Sec-Gly-COOH Sequenz der

4.3.3.2.2. Erkenntnisse zur Funktion von TrxR2 durch Überexpressions- und knockout-Studien

Bereits seit einigen Jahren existieren verschiedene Zell- und Mausmodellssysteme mit alternierender TrxR2-Aktivität. So konnten Alvarde et al. bereits 2004 zeigen, dass eine forcierte Überexpression von TrxR2 in HEK293-Zellen (Human embryonic kidney) zu einer verminderten Zellproliferation und zu einer vermehrten Expression der epithelialen Marker CK18, CK-Cam5.2 und BerEP4 führte. Dies könnte an der verminderten Verfügbarkeit von H₂O₂ liegen, das auch unter anderem als interzelluläres Signalmolekül für Proliferation dient.^{110, 111} Übereinstimmende Ergebnisse konnten auch Patenaude et al. 2004 zeigen. Hier wurden murine Neuro2A-Zellen (Neuroblastom-Zellen) mit TrxR2-Überexpression analysiert. Weiterhin wurde beobachtet, dass keine erhöhte

Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli wie Diamid, Rotenon oder Menadion vorliegt. Um auszuschließen, dass nicht Trx2 der limitierende Faktor der verminderten Resistenz ist, wurde in TrxR2 überexprimierenden Zellen Trx2 überexprimiert. Auch hier zeigte sich keine erhöhte Resistenz gegenüber zytotoxischen Agenzien. Ursächlich hierfür könnte sein, dass in diesem Modell nicht das TrxR2/Trx2/Prx3-System den limitierenden Faktor für die Inhibition der Apoptose darstellte.¹¹⁰

Dem gegenüber stehen die 2017 publizierten Erkenntnisse von Pickering et al. Hier konnte die TrxR2-Aktivität in Fibroblasten und anderen Zellarten mit der Lebensdauer von Vögeln, Nagern und Primaten positiv korreliert werden. Ebenso konnte durch eine forcierte TrxR2-Überexpression die Lebensdauer von Fruchtfliegen verlängert werden.¹¹² Da Daten aus Zellmodellen aufgrund diverser Limitationen nicht immer vollumfänglich auf ganze Organismen übertragen werden können, wurden auch verschiedene Mausmodelle mit alternierender TrxR2-Aktivität entwickelt.

2003 erstellten Nonn et al. das erste TrxR2-Knockout Mausmodell. Hier wurde die TrxR2-Transkription mittels retroviralem Gentrapping inhibiert. Homozygote Tiere (TrxR2^{-/-}) verstarben bereits im Embryonalstadium 10,5 Tage post conceptionem. Die Zellen konnten mit Anti-Caspase 3 Antikörpern angefärbt werden, was einen apoptotischen Zustand impliziert.¹¹³ Ebenso zeigte sich ein fehlender Neuralrohrverschluss, eine regelrechte ZNS-Entwicklung war somit nicht möglich. Da die Mitochondrien zwischen Tag 10 und 12 beginnen, ihre Energie mittels oxidativer Phosphorylierung zu generieren, führt vermutlich die fehlende Aktivität der TrxR2 zur Apoptose. Heterozygote Phänotypen zeigten einen normalen Phänotyp.¹⁰⁵

Die Arbeitsgruppe um Conrad et al. generierten ein Mausmodell mit einer homozygoten TrxR2-Deletion (Trxrd2^{-/-}) und untersuchten insbesondere die kardiale Entwicklung. Diese Mäuse sind nicht lebensfähig. Embryos verstarben zwischen Embryonaltag 12,5 und 13,5. Sie zeigen Anomalien in der Herzentwicklung. Ebenso war die Hämatopoese eingeschränkt. An diesem Modell konnte so die wichtige Funktion von TrxR2 für eine regelrechte Entwicklung von Herz und fetaler Blutbildung demonstriert werden. Um die Funktion von TrxR2 auf die kardiale Entwicklung besser analysieren zu können und um dem prägestationellen Versterben entgegen zu wirken, wurde mittels einer MLC2a-Cre transgenen Mauslinie ein kardiomyozytenspezifischer Knockout untersucht.¹¹⁴ ¹⁰³ Hier zeigten Trxrd2^{-/-}-Mäuse Symptome einer dilatativen Herzinsuffizienz wie generalisierte Ödeme, atriale Wandausdünnung oder eine Stauungsleber. Kardiomyozyten hatten ausgeprägte Veränderungen in ihrer Zellstruktur. Diese Mäuse verstarben kurz nach der Geburt. Dies zeigte,

dass TrxR2 nicht nur für die Hämatopoese wichtig ist, sondern auch für eine regelrechte kardiale Entwicklung.¹⁰³

Um den Einfluss der TrxR2-Defizienz auf Kardiomyozyten ohne die Limitation des perinatalen Versterbens weiter zu untersuchen, entwickelten Kiermayer et al. ein induzierbares kardiomyozytenspezifisches TrxR2-Knockout-Modell. Hier wurde der Knockout erst ab der 6. Lebenswoche induziert. Diese Mäuse zeigten unter anderem eine mitochondriale und myokardiale Degeneration. Ebenso konnte eine erhöhte autophagische Aktivität nachgewiesen werden. Signifikant erhöhte ROS-Level konnten zwar nicht nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich vermehrt oxidiertes Glutathion, das als Ersatzsystem für die Balance der ROS-Level dienen könnte. Somit konnte demonstriert werden, dass TrxR2 nicht nur für eine suffiziente kardiale Entwicklung wichtig ist, sondern auch für die Aufrechterhaltung der myokardialen Funktion in adulten Mäusen.¹⁰⁴

Neben der Myokardfunktion ist die Gefäßfunktion essentiell für ein funktionierendes kardiovaskuläres System. Um den Einfluss der TrxR2 auf die für die vaskuläre Funktion wichtigen Endothelzellen zu untersuchen, hat unsere Arbeitsgruppe eine Tamoxifen-induzierbare, endothelzellspezifische TrxR2 Knockoutmaus ($\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$) entwickelt. Obwohl diese Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen und eine normale Lebenserwartung haben, konnte eine eingeschränkte Nierenfunktion, einhergehend mit einer Sklerose der Glomeruli, Mikrothromben und einer glomerulären sowie tubulointerstitiellen Infiltration von Immunzellen, beobachtet werden. Ebenso hatten $\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$ -Mäuse eine beeinträchtigte Angio- und Arteriogenese nach Femoralarterienligation. Letztlich konnten in isolierten sogenannten early endothelial progenitor cells (eEPCs) erhöhte ROS-Level gemessen werden und ein positiveres mitochondriales Membranpotential bestand. Die Verringerung dieses Potentials spricht für eine eingeschränkte mitochondriale Funktion. Der Verlust der endothelialen TrxR2 geht also mit einem proinflammatorischen und prothrombotischen endothelialen Phänotyp einher. Ferner bestand eine mitochondriale Dysfunktion.¹¹⁵

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Fokus dieser Arbeit steht die Thioredoxinreduktase 2. Unsere Arbeitsgruppe konnte mit einer Tamoxifen-induzierbaren, endothelzellspezifischen TrxR2 Knockoutmaus ($\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$) bereits wesentliche Erkenntnisse gewinnen. Obwohl die Mäuse ohne gravierenden Phänotyp sind, konnten eine arterielle Hypertonie und eine verminderte Nierenfunktion, einhergehend mit einer Sklerose der Glomeruli, Mikrothromben und einer glomerulären sowie tubulointerstitiellen Infiltration von Immunzellen, beobachtet werden. Ebenso hatten $\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$ -Mäuse eine beeinträchtigte Angio- und Arteriogenese nach

Femoralarterienligation. Letztlich konnten in isolierten sogenannten early endothelial progenitor cells (eEPCs) erhöhte ROS-Level gemessen werden.¹¹⁵ Diese Sauerstoffradikale könnten mitverursachend für die erbrachten Befunde sein. Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Welche Radikale sind für die Alterationen der Gefäßfunktion von Trxrd2^{iECKO}-Mäusen verantwortlich?
- Können diese Radikale auf bestimmte Zellkompartimente zurückgeführt werden?
- Übernimmt ein anderes antioxidatives System die Rolle des TrxR2/Trx2-Systems?

Teile dieser Arbeit sind unter dem Titel „The mitochondrial thioredoxin reductase system (TrxR2) in vascular endothelium controls peroxynitrite levels and tissue integrity“ im Journal „*Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*“ veröffentlicht worden.

5. Material & Methoden

5.1. Material

5.1.1. Antikörper

5.1.1.1. Antikörper für Immunhistochemie

Bezeichnung	Hersteller
CD31-AlexaFluor 647 (A#14716)	Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
Ratte Anti-Maus CD31 (BM 4068)	Acris Antikörper GmbH, Herford, D
Schaf Anti-Ratte IgG (No.130-048-501)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

5.1.1.2. Antikörper für Immunoblotting

Primärer Antikörper	Hersteller/Nummer	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Actin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen D, A2066	1:1000	IRDye® 800CW Ziege anti-Kaninchen IgG	LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA,	1/10000
			oder		
			IRDye® 680RD Ziege anti-Kaninchen IgG	Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-Konjugat	Dianova, Hamburg, D
Actin	Santa Cruz, Heidelberg, D, sc-47778	1:1000	IRDye® 680RD Ziege anti-Maus IgG	LI-COR	1/10000
			IRDye® 800CW Ziege anti-Maus		
Grx2	ab85267, abcam, Cambridge, GB	1/100	IRDye® 680RD Ziege anti-Kaninchen IgG	LI-COR	1/10000
			Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-Konjugat	Dianova	1/5000
Prx3	ab73349, abcam	1/500	IRDye® 680RD Ziege anti-Kaninchen IgG	LI-COR	1/10000
			Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-Konjugat	Dianova	1/5000
Prx5	#17724-1-AP, Proteintech, Rosemont, IL, USA	1/600	IRDye® 680RD Ziege anti-Kaninchen IgG	LI-COR	1/10000
			Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-Konjugat	Dianova	1/5000
Trx2	AF3254, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	1/1000	IRDye 800 CW Esel anti-Ziege IgG	LI-COR	1/10000
			Esel anti-Ziege IgG, HRP-Konjugat	Dianova	1/5000
TrxR2	Eigenproduktion	unverdünnt	IRDye® 800CW Ziege anti-Ratte IgG	LI-COR	1/10000
			Ziege anti-Ratte IgG, HRP-Konjugat	Dianova	1/5000

5.1.2. Chemikalien

Chemikalie	Unternehmen	Katalognummer
Acetylcholin-chlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	A1086
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	B0126
BSO	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	B2515
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A1391
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Heidelberg, D	7029.1
DMEM High Glucose (4,5g/l)	Invitrogen, Karlsruhe, D	11965084
dNTP-Lösung	GE-Healthcare, Freiburg, D	10084724
EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, D	AM9260G
EGTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A0878
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH, Heidelberg, D	6755.1
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D	100983
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	F2442
Gel Red	Biotrend, Köln, D	41003
Glucose	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A1422
Glycerol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	G5516
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, D	25030149
HCL	Merck KGaA, Darmstadt, D	109057
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe, D	15630-080
4-Hydroxy-Tamoxifen	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	T5648
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A2939
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A0830
Maiskeimöl	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	C8267
Methanol	Carl Roth GmbH, Heidelberg, D	8388
MEM Nicht-essenzielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe, D	11140050
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe, D	21985023
Mito-ID Red detection kit	Enzo Life Science GmbH, Lörrach, D	51007
MitoPY1	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	SML0734
N ^ω -nitro-L-arginin, LNA	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	N5501
Natriumdesoxycholsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	SAFS30970
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A2942
Natriumdesoxycholsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	AFS30970
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A1047
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	L3771
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	P2256
N-ethylmaleimid	Fisher-Scientific GmbH, Schwerte, D	23030
Norepinehprin (Arterenol ®)	Sanovi-Aventis, Frankfurt, D	PZN: 03870227
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, D	15140122
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Heidelberg, D	A156.1
Spermin-NONOate	Cayman Chemicals, MI, USA	No. 82150
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A1086
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D	T8787
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A4974
U46619	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, D	1932

5.1.3. Enzyme

Enzyme	Unternehmen	EC-Nummer
Kollagenase A	Roche Diagnostics, Mannheim, D	EC 3.4.24.3
Proteinase K	Roche Applied Science, Mannheim, D	EC 3.4.21.14

Taq DNS-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, D	EC 2.7.7.7
Protease/Phosphatase Cocktail (100X)	New England Biolabs Ltd., Whitby, Kanada	

5.1.4. Puffer

MOPS-Puffer

NaCl	145 mM	Pyruvat	2 mM
KCl	4,7 mM	EDTA	0,2 mM
NaH ₂ PO ₄	1,2mM	Glucose	5 mM
MOPS	3 mM	pH	7,4

Schwanzspitzen-Lysepuffer

EDTA, pH 8,0	10 mM
Tris-HCL, pH 7,6	10 mM
SDS	0,5%
NaCl	10 mM
Proteinase K	15 µl/ml

TE-Puffer

EDTA, pH 8,0	0,5 M
Tris-HCL, pH 7,6	1 M

50x TAE-Puffer

Tris-HCL, pH 7,6	2 M
EDTA, pH 8,0	50mM
Essigsäure	1M

5.1.5. Primer

Oligonukleotide	Sequenzen
TR2-Del_for	5'-CACGACCAAGTGACAGCAATGCTG-3'
TR2_DeI_rev	5'-CAGGCTCCTGTAGGCCATTAAGGTGC-3'
TR2_Flox_for	5'-CAGGTCACCTAGGCTGTAGAGTTTGC-3'
TR2_Flox_rev	5'-TTCACGGTGGCGGATAGGGATGC-3'
CRE 1	5'-GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA-3'
CRE 2	5'-GTGGCAGATGGCGCGCAACACCAATT-3'

Alle DNS-Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Dtl.) bezogen.

Die DNS-Fragmente ergaben nach der Agarose-Gelelektrophorese eine Größe von 133 bp für Trxr2 Wildtyp, 181 bp für das geflochte Trxr2 und 400 bp für die Cre-Rekombinase.

5.2. Methoden

5.2.1. Generierung der induzierbaren endothelzell-spezifischen Trxrd2-Knockout-Maus

Mithilfe des Cre-loxP-Systems können Mäuse mit zellspezifischen Gendelektionen erstellt werden. Cre-Rekombinase, ein Protein der Bakteriophage P1, bindet eine 34 Basenpaar lange loxP-Erkennungssequenz und kann dann ortsspezifische Rekombinationen ausführen. Von loxP beidseits flankierte DNS-Sequenzen werden von der Cre-Rekombinase exzidiert.¹¹⁶ Um einen induzierbaren Knockout zu generieren, kann die Cre-Rekombinase mit einem mutierten Östrogenrezeptor verknüpft werden (CreER).¹¹⁷ Erst nach Aktivierung dieses Rezeptors mittels Tamoxifen transloziert Cre in den Nucleus und deletiert die gewünschte Sequenz.

Das Trxrd2-Gen besteht aus 18 Exons, 17 Introns und umfasst 53 kB. Die Exons 15-18 codieren für die SeCys-Sequenz, die einen wesentlichen Teils des aktiven Zentrums darstellt.¹¹⁸ Ein Verlust dieser Sequenz geht mit einem funktionslosen Enzym einher.¹¹⁹ Dieser Umstand wurde verwendet, um den induzierbaren Knockout zu generieren (Abb.3)¹²⁰.

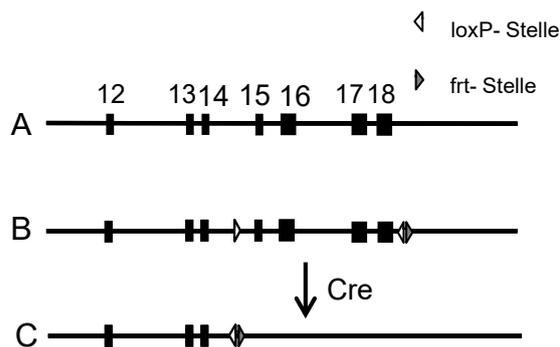


Abbildung 3: Cre-vermittelte konditionale Trxrd2 Deletion

Die 3' Region einschließlich der Exons 15-18 (A) werden mittels loxP flankiert (B). Nach der tamoxifeninduzierten Cre-Rekombination werden die flankierten Exons deletiert. (C)

Für diese Arbeit wurden Mäuse, die eine loxP-flankierte Thiothredoxin-Reduktase 2 exprimieren ($Trxrd2^{lox/lox}$), mit Mäusen, die CreER unter der Kontrolle des VE-Cadherin-Promotors exprimieren ($Cdh5(PAC)-CreERT2$)¹²¹, verpaart, um letztlich $Trxrd2^{lox/lox} Cdh6(PAC)-CreERT2$ Mäuse zu erhalten.¹¹⁵ Die $Cdh5(PAC)-CreERT2$ -Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ralf Adams, MPI Münster, zur Verfügung gestellt. Mit dem Cdh5 Promotor kann eine auf das Endothel beschränkte Rekombination sichergestellt werden.¹²²

Die Induktion des Knockouts erfolgte frühestens ab Lebenswoche 8 durch die tägliche intraperitoneale Injektion von 100µl Tamoxifen (10mg/ml in Maiskeimöl gelöst) über 5 Tage. Gewinnung von Gewebe erfolgte zwischen 4 Monaten und 10 Monaten. Homozygote Knockout-Tiere ($Trxrd2^{lox/lox} Cdh5(PAC)-CreERT2$) werden im folgenden $Trxrd2^{iECKO}$ genannt. Mäuse der Kontrollgruppe, die auch mit Tamoxifen behandelt worden sind, werden $Trxrd2^{iECWT}$ genannt und hatten folgende Genotypen: $Trxrd2^{lox/lox}$, $Trxrd2^{lox/wt}$, $Trxrd2^{lox/wt} Cdh5(PAC)-CreERT2$ und

Trxrd2^{wt/wt} Cdh5(PAC)-CreERT2. Mäuse wurden unter Standardbedingungen mit Nahrung (ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum gehalten. Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 55.2-1-54-2532-173-2014).

5.2.2. Genotypisierung

5.2.2.1. DNS-Extraktion

Der Genotyp der für die Versuche verwendeten Mäuse wurde mittels DNS-Extraktion aus Ohrbiopsien, PCR und Elektrophorese ermittelt. Allen Tieren wurden nach der Tötung zusätzlich etwa 5mm Schwanzspitze entfernt, um den Genotyp nochmals zu verifizieren. Die Gewebeproben wurden über Nacht in 500 µl Lyse-Puffer mit Proteinase K in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, D) bei 55°C und 700 U/min inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Temperatur für 1 Stunde auf 86°C erhöht, um die Proteinase K zu inaktivieren. Anschließend wurden dem Homogenat, um weitere Proteindenaturierung zu fördern und Ribonukleasen zu inhibieren, 500µL Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol zugefügt. Nach Vortexen und Zentrifugation (14.000 U/min, 6 Minuten) wurde die obere wässrige Phase in ein Eppendorf-Gefäß mit 2,5 Volumen 100% Ethanol und 5M NaCl überführt, manuell geschüttelt und zentrifugiert (15.000 U/min, 10 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das gewonnene Pellet zweimalig in 70% Ethanol gewaschen und bei 55°C im Thermomixer getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in TE-Puffer gelöst und bei -20°C bis zur PCR gelagert.

5.2.2.2. Polymerasekettenreaktion

Polymerasekettenreaktionen wurden entweder in einem Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Hamburg, D) oder in einem PTC-100 Thermocycler (MJ Research Inc., St. Bruno, Canada) mittels der unten aufgeführten Parameter durchgeführt. Einzelne Schritte wurden im Hinblick auf die Primer und Proben angepasst. Primer wurden digital ausgearbeitet (Primer3, v.0.4.0) und, falls möglich, mittels elektronischer PCR verifiziert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Für die PCR Amplifikation wurde Proben-cDNS zu einem Mastermix, bestehend aus Primerpaar, PCR-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, D), DMSO, dNTPs und Taq Polymerase gegeben und mit H2O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Die PCR wurde nach untenstehendem Protokoll durchgeführt.

PCR Protokoll	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	3 min	94°C	

Denaturierung	1 min	94°C	
Primerhybridisierung	1 min	55-65°C abh. von Primer	30-35
Elongation	1 min	72°C	
Finale Elongation	7 min	72°C	

5.2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Um die Größe der amplifizierten DNS-Fragmente zu bestimmen, werden sie mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Größe des Produktes wird mithilfe einer Leiter mit DNS-Produkten bekannter Größe (Page Ruler™ Proteinstandard), die parallel aufgetrennt wird, bestimmt. Das PCR-Produkt wurde mit Ladepuffer (Coral Load Buffer, Qiagen) versetzt und in einem 1% Agarosegel (1x TAE-Puffer und Gel Red (0,04 µl/ml) bei 150 Volt/500mA (Phero-Stab 0310, Biotec-Fischer, Reiskirchen, D) aufgetrennt. Anschließend wurde die Fluoreszenz an einem Gel Doc 1000 (Bio-Rad, München, D) dokumentiert.

5.2.3. Isolierung von Mesenterialarterien und Lungengewebe

Nachdem die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet wurden, erfolgte die Fixation in Rückenlage und Bauch- bzw. Brusthöhle wurden unter mikroskopischer Sicht (M205A, Leica Microsystems, Wetzlar, D.) eröffnet. Um anschließend Mesenterialarterien zu gewinnen, wurde nach abdomineller Spülung mit vorgewärmtem MOPS-Puffer das Rektum scharf abgesetzt (Fine Science Tools, Heidelberg) und das gesamte Mesenterium entlang des Mast-, Dick-, Dünn- und Zwölffingerdarms bis zum Magen präpariert. Nach Durchtrennung der A. mesenterica superior wurden die Mesenterialarkaden in eine mit MOPS-gefüllte Petrischale überführt und dort mit Pins fixiert. Anschließend wurde das umgebende Fettgewebe und die begleitenden Venen disseziert. Arterien mit einem äußeren Durchmesser von 250-350 µm und einer Länge von 10-15mm wurden abgesetzt und mit dünnen Pins auf einer Silikonoberfläche fixiert. Die Gefäße wurden in Longitudinalrichtung mit der Endothelseite nach oben eröffnet, um Zugang zu den Endothelzellen zu erhalten. Zudem wurden beide Lungenflügel stumpf aus der thorakalen Kavität gelöst, am Hilus abgesetzt und in MOPS-Puffer bei 4° bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

5.2.4. FID-Experimente an Femoralarterien

Zur Untersuchung der endothelialen Funktion eignet sich die Messung der Fluss-induzierten Dilatation (FID).¹²³ Das hier verwendete Protokoll wurde bereits

publiziert.¹²⁴ Nachdem die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet wurden, erfolgte unter mikroskopischer Sicht die Entfernung der Haut der Oberschenkelinnenseite und der Adduktormuskel wurde unter Erhalt der Gefäße seziiert. Während der gesamten Präparationsdauer wurde das Eingriffsgebiet mit 4° kaltem MOPS-Puffer überspült. Anschließend wurden etwa 500µm lange Stücke der A. femoralis ohne Abgänge von angrenzendem Nerv- und Bindegewebe sowie von der benachbarten V. femoralis befreit. Die isolierten Femoralarterienanteile wurden dann in einem temperatur-reguliertem (37°C) MOPS-Puffer-Bad mittels Glasmikropipetten (Science Products, Hofheim, D) und chirurgischem Nahtmaterial (Ethylon 11-0, Johnson & Johnson, New Brunswick, USA) kanüliert und auf ihre ursprüngliche Länge gedehnt. Die Mikropipetten wurden in Manipulatoren (WPI, Berlin, D) eingespannt, um eine genauere Adjustierung zu ermöglichen. Beide Enden der der Mikropipetten wurden über Drei-Wege-Hähne (B.Braun, Melsungen, D) und Heidelberger Verlängerungen (B.Braun, Melsungen, D) mit höhenverstellbaren Reservoirs (Injekt® Solo 20ml, B.Braun, Melsungen, D) verbunden. (Abb.4) Dieser Versuchsaufbau wurde auf ein invertierbares Mikroskop (Diaphot 300, Nikon, Düsseldorf, D) gestellt und das Gefäß unter 20-facher Vergrößerung (D-APO 20 UV-Linse, Olympus, Hamburg) mittels einer digitalen Kamera (WAT-902B, Watec, Newburgh, USA) dargestellt. Innere und äußere vaskuläre Durchmesser wurden permanent mit einer Gefäßanalysesoftware überwacht (Blood Vessel Analyser 300, Hasotec, Rostock, D).

Vor Beginn der FID-Versuche wurden die Gefäße mit dem Katecholamin Noradrenalin (1µM) und dem biogenen Amin Acetylcholin (30 & 300 nM) getestet, um eine während der Präparation entstandene mechanische Schädigung der Gefäße auszuschließen. Gefäße, die nach Zugabe von Noradrenalin eine Konstriktion von mindestens 60% des Ausgangsdurchmessers erreichten und nach Zugabe von Acetylcholin auf mindestens 90% des Ausgangsdurchmessers dilatieren wurden in die Versuche eingeschlossen. Mit dem Katecholamin Norepinephrin wurde bei beidseitig geöffneten 3-Wege-Hähnen eine stabile Konstriktion herbeigeführt. Um die flussinduzierte Dilatation zu untersuchen wurde die Höhe des proximalen Reservoirs verändert, um einen Druckgradienten (0-30 mmHg) herzustellen und dementsprechend eine Veränderung des intraluminalen Flusses zu produzieren. Nach jeweiliger Neueinstellung des Drucks wurde 2 Minuten abgewartet, damit das Gefäß regelrecht dilatieren konnte. Gemessen wurde der prozentuale Gefäßdurchmesser im Vergleich zum Ausgangswert (Abb. 4).

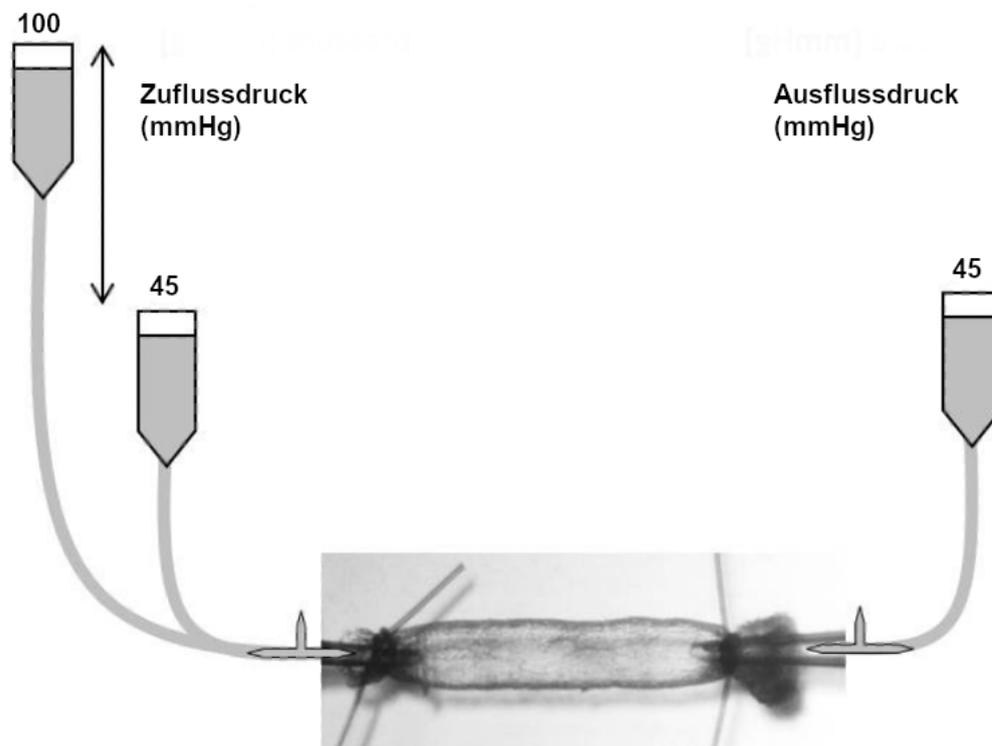


Abbildung 4: Schematische Darstellung des FID-Versuchsaufbaus

Das kanülierte Gefäß ist beidseitig mit einem Reservoir verbunden. Durch Adjustierung der Höhe des proximalen Reservoirs kann ein Druckgradient und damit ein Fluss erzeugt werden.¹²⁵

5.2.5. Isolierung von adulten Trxrd2^{iECKO}-Zellen

Für Zellkulturversuche wurden Endothelzellen von Trxrd2^{iECKO} und Trxrd2^{control} Mäusen isoliert. Hierfür wurden Lungen exzidiert, mechanisch homogenisiert und mit Kollagenase A verarbeitet. Anschließend wurden die Endothelzellen mit einem Ratten Anti-Maus CD31 Antikörper (1:100) und Schaf Anti-Ratte IgG Micro Beads (20µl/10⁷ Zellen) inkubiert und im Anschluss mittels MACS LS Kolumnen (Nr. 130-042-401, Miltenyi Biotec) nach Herstellervorgaben gewonnen. CD31 positive Zellen wurden in folgendem Medium suspendiert:

Endothelzellmedium

DMEM (High Glucose 4,5g/l)	1% Penicillin/Streptomycin	1% L-Glutamin
10% FCS	1% Nicht-essenzielle AS	0,06% β-Mercaptoethanol

5.2.5.1. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich unter einer Sterilwerkbank (Steril Compact VBH 48 C2, Foster Wheeler, Korsika, Italien) durchgeführt. Reagenzien und Instrumente wurden zuvor autoklaviert (Varioklav®) und/oder mit Bacillol (Paul Hartmann AG, Heidenheim, D) desinfiziert. Die verwendeten Zelllinien

wurden in einem Brutschrank (APT.line™ CB210, Binder, Tuttlingen, D) unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂ und 20 % O₂) kultiviert.

5.2.6. *In vitro* Nachweis von Peroxynitrit in Trxrd2^{iECKO}-Zellen

Vor der Durchführung von Versuchen wurden die Zellen in 24-Well-Platten (Falcon, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D) für 3 Tage unter oben genannten Bedingungen kultiviert. Pulmonale ECs wurden für 30 Minuten mit 5 µM Fluorescein-Boronat (FI-B, Verdünnt in HEPES-Puffer), einer fluoreszierenden und hochsensitiven Peroxynitritsonde, inkubiert (AG Radi, Montevideo, Uruguay).¹²⁶ Diese Sonde arbeitet mit einem Boronat/Phenol Schalter und wurde ursprünglich als Sonde für H₂O₂ entwickelt. Durch die Reaktion von FI-B mit Peroxynitrit entsteht ein Molekül mit kovalenten Doppelbindungen, welches farbig erscheint. (Abb. 5)¹²⁷ Nach dreimaligem Waschen mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) und zweistündiger Inkubation mit PBS in einer Wärmekammer wurde die Fluoreszenzintensität gemessen.

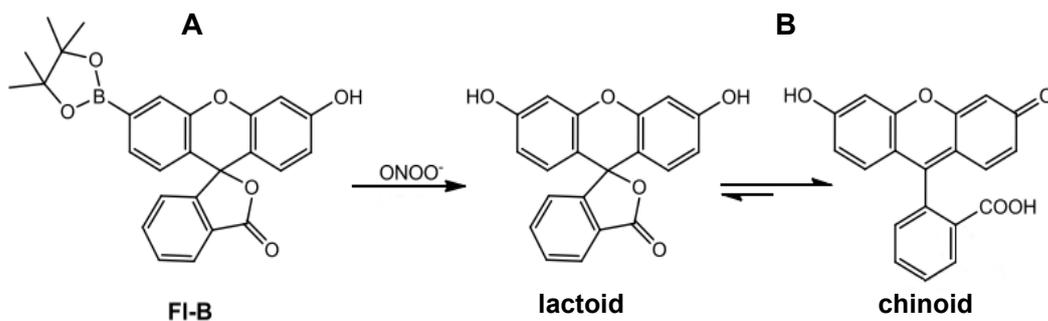


Abbildung 5: Struktur von FI-B und Reaktionsmechanismus mit Peroxynitrit

Der Xanthenfarbstoff Fluorescein ist kovalent mit einem Phenylboronsäure-Pinakolester verbunden (A). Nach Reaktion mit Peroxynitrit entsteht ein Tautomer mit einer lactoiden und einer chioniden Form. (B) Nach Deprotonierung entsteht eine starke Fluoreszenz.¹²⁸

5.2.7. *Ex vivo* Nachweis von Peroxynitrit in Mesenterialarterien

Um eine etwaige Peroxynitritproduktion zu veranschaulichen, wurden die eben beschriebenen Mesenterialarterien mit verschiedenen Lösungen für jeweils 1h inkubiert. Als Kontrolle wurden die Gefäße nur in MOPS inkubiert. Als Negativkontrolle wurde mit MOPS-Puffer und 100 µM LNA (N^ω-nitro-L-arginin) inkubiert. LNA blockiert kompetitiv und unspezifisch Stickstoffmonoxidsynthasen, sodass weniger Peroxynitrit gebildet werden kann.¹²⁹⁻¹³¹ Als Positivkontrolle wurde mit 100 µM Spermin-NONOate (N-(2-Aminoethyl)-N-(2-hydroxy-2-nitrosohydrazino)-1,2-ethylenediamin) in MOPS-Puffer gelöst inkubiert. Diese Substanz setzt kontinuierlich Stickstoffmonoxid frei, sodass vermehrt Peroxynitrit entsteht. Spermin ist ein Polyamin, das die leichtere Handhabung von Stickstoffmonoxid gewährleistet, da wasserlösliche Komplexe gebildet werden.^{132, 133} Anschließend wurde mit 0,45 µM Fluorescein-Boronat (FI-B) und

mit Anti CD31-Alexa Fluor 647 gekoppelten Antikörpern (1:1000) für 15 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit MOPS-Puffer wurden die Arteriensegmente erneut 45 Minuten entweder mit MOPS, mit MOPS und Spermin-NONOate oder mit MOPS und LNA inkubiert und anschließend mit einem Multiphotonenmikroskop (Leica SP8 MP, Wetzlar, Deutschland) untersucht. Gefäße von Trxr2^{IECWT} Tieren wurden ebenso behandelt und als Kontrolle genutzt.

Multiphotonuntersuchungen wurden in der BioImaging Core Facility des Biomedizinischen Zentrums, Planegg-Martinsried unter der Leitung von PD Dr. rer. nat. Steffen Dietzel durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden sogenannte z-stacks (Aufnahmen mit verschiedenen Fokussentfernungen werden digital zu einer endgültig höherauflösenden Aufnahme verarbeitet) mit einer Schrittgröße von 2 µm gewonnen. 150 µm x 150µm Felder wurden, nachdem sie mit Wellenlängen von 800 nm und 1200 nm im Multi-Photonen Modus erregt worden sind, detektiert und mittels Imaris (Version 7.4.0, Bitplane, Zürich, Schweiz) analysiert. Die Fluoreszenz von mindestens 10 einzelnen Endothelzellen pro Gesichtsfeld (anhand von CD31 identifiziert) in 3 verschiedenen Gefäßabschnitten von der angegebenen Versuchstieranzahl wurde mittels ImageJ-Software (Version 1.52i, Gemeinfreie Lizenz) detektiert. Mittlere Grauwerte sind definiert als die Summe der Grauwerte in einem bestimmten Gesichtsfeld geteilt durch die Anzahl an Pixel im gleichen Gesichtsfeld. Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde aus allen Zellen für die verschiedenen Versuche berechnet.

5.2.8. Mitochondriale Lokalisation von Peroxynitrit

Aufgrund der primär mitochondrialen Lokalisation von TrxR2⁹⁹ stellte sich nun die Frage, ob die gemessenen erhöhten Peroxynitritspiegel auch einen mitochondrialen Ursprung haben. Hierfür wurde der Fluoreszenzmarker „mitochondriales peroxy yellow 1“ (MitoPY1, (4-[4-[3-Oxo-6'-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)spiro [isobenzofuran-1(3H),9'- [9H]xanthen]-3'-yl]-1-piperazinyl]butyl]triphenyl-phosphonium iodid)) verwendet. MitoPY1 wurde erstmals 2009 als Marker für mitochondriales Wasserstoffperoxid beschrieben.¹³⁴ Es gibt jedoch auch Erkenntnisse, dass boronat-basierte Sonden rapide mit Peroxynitrit reagieren.^{126, 135, 136} Diese Sonde besteht zum einen aus einer Phosphonium-Gruppe, die als lipophiles Kation die mitochondriale Phospholipid-Doppelmembran überwinden kann und sich aufgrund des Membranpotentials mitochondrial anreichert.¹³⁷ Zum anderen hat MitoPY1 eine Boronatgruppe, die nach Oxidierung durch Peroxide eine veränderte Fluoreszenzemission aufweist. (Abb. 6)

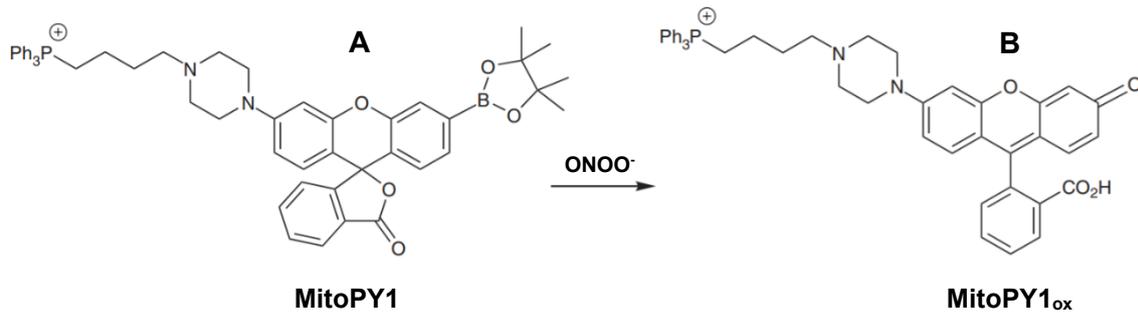


Abbildung 6: Struktur von MitoPY1 und Reaktionsmechanismus mit Peroxynitrit

Zusammensetzung von MitoPY1 mit Phosphoniumgruppe und Fluoresceinboronatgruppe. (A) Nach Oxidation durch Peroxynitrit entstehen kovalente Doppelbindungen und eine veränderte Fluoreszenzemission.¹³⁸ (B) Ph=Phenolgruppe

Hierzu wurden Mesenterialarteriensegmente wie in 7.3.1. beschrieben vorbereitet und anschließend 1h mit MitoPY1 (10 μ M in MOPS-Puffer) inkubiert.

In einem anderen Ansatz wurden die Gefäße nach der MitoPY1 Behandlung mit dem NO-Donor Spermin-NONOate (100 μ M in MOPS-Puffer) für 1h inkubiert. Weiterhin wurden andere Gefäße für 1h mit dem NOS-Blocker LNA (100 μ M in MOPS-Puffer) und anschließend 1h mit MitoPY1 (10 μ M in MOPS-Puffer) inkubiert. Eine Verifizierung der mitochondrialen Lokalisation erfolgte durch die simultane Markierung der Endothelzellen mit dem „Mito-ID Red detection kit“ nach Herstellervorgaben. Mit diesem photostabilen und selektiven Farbstoff können gezielt Mitochondrien angefärbt werden.

Die Gefäße wurden mit einem Multiphotonenmikroskop (Leica SP8) untersucht. Z-stacks (2 μ m Schnitte) einer Größe von 70 μ m x 70 μ m wurden mit einer Exzitationswellenlänge von 800nm im Multiphotonenmodus erfasst und mittels Imaris Software analysiert. Die Fluoreszenz von 15 mitochondrialen Kompartimenten in 3 verschiedenen Gefäßsektionen von 3 verschiedenen Tieren wurde mittels ImageJ erfasst. Für die einzelnen Zellen und die verschiedenen Behandlungen wurden die mittleren Graustufen individuell berechnet.

5.2.9. Proteinbiochemie

Für das Immunoblotting wurden sogenannte eEPCs (embryonic endothelial Progenitor Cells) verwendet. Diese endothelialen Vorläuferzellen wurden aus Embryonen mit einem konstitutiven Knockout an Tag 7,5 gewonnen.¹⁰³ Um Proteine aus Zellen bezüglich ihrer Existenz und ihrer Quantität zu analysieren, müssen sogenannte Western Blots durchgeführt werden. Hierfür wird die SDS-PAGE-Elektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) eingesetzt. Hierfür werden Proteine, nach Denaturierung mit SDS versetzt, um

eine stark negative Ladung zu erhalten und die eigene elektrische Ladung zu überdecken. Die Ladung ist hierbei proportional zur Proteingröße, da SDS kovalent an die Aminosäureketten bindet.¹³⁹

5.2.9.1. Proteinlysatherstellung

Nachdem die Zellen bis zur Konfluenz gewachsen waren, wurden sie zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in RIPA-Puffer auf Eis mittels kontinuierlichem Auf- und Abpipettierens lysiert. Anschließend wurde das Lysat kurz zentrifugiert (15000 U/min, 4 Minuten), um unlösliche Bestandteile zu entfernen.

Um das reduziertes Peroxiredoxin 3 (Prx3) zu untersuchen, ist es wichtig, die reduzierten Cysteine des Prx3 vor einer artifiziellen Oxidation während der Lysatproduktion zu schützen. Hierfür können reduzierte Peroxiredoxine mit N-Ethylmaleimid (NEM) alkyliert werden, um sie im reduzierten Zustand zu erhalten.¹⁴⁰ Die Zellen wurden deshalb mit NEM-Puffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde 5% CHAPS-Detergenz (3-((3-Cholamidopropyl)diethylammonio)-1-propan sulfonat) zur Lyse hinzugefügt. Wie oben beschrieben, wurde 10 Minuten auf Eis mittels kontinuierlichem Auf- und Abpipettierens lysiert. Anschließend wurde das Lysat kurz zentrifugiert (13000 U/min, 10 Minuten, 4°C) und das entstandene Pellet verworfen. Beiden Lysepuffern wurde ein Phosphatase/Protease-Inhibitor-Cocktail kurz vor Gebrauch hinzugefügt. Die nach der Zentrifugation entstandenen Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und entweder bei -20°C eingefroren oder direkt verwendet. Westernblots zum Nachweis von hyperoxidiertem Peroxiredoxin 3 wurden ohne den alkylierenden Schritt durchgeführt. Während der Zelllyse dimerisieren reduzierte Peroxiredoxine ohne die Alkylierung sofort. Dies trifft nicht für hyperoxidiertes Peroxiredoxin zu und somit kann eine Einschätzung der Anteile der hyperoxidierten Peroxiredoxinisoformen erfolgen.¹⁴¹ Mit Antikörpern gegen hyperoxidiertes Peroxiredoxin kann zwar gezeigt werden, ob ebenjenes vorliegt, allerdings kann keine Differenzierung der Isoformen erfolgen.¹⁴⁰ Westernblots für Glutaredoxin 2 wurden mit nicht reduzierenden Puffern durchgeführt.

RIPA-Puffer	NEM-Puffer
50 mM NaCl	40 mM HEPES
1% Triton X-100	50 mM NaCl
0.5% Natriumdesoxycholat	1 mM EDTA
0.1% SDS	1 mM EGTA
50 mM Tris	100 mM NEM
pH 8	pH 7.4

5.2.9.2. Immunoblot

Gleiche Proteinmengen (20µg) wurden mit nicht-reduzierendem Ladepuffer versetzt. Anschließend wurde die Lösung für 5 Minuten bei 95°C und 900 U/min gekocht, um die maximale Entfaltung der Proteine zu erreichen. Die Ladepuffer und eine suffiziente Referenzproteingrößenleiter (Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder, LI-COR, Lincoln, NB, USA) wurden anschließend in einem 4-15% Gradientengel geladen und im Laufpuffer versenkt. Im Anschluss erfolgte die Elektrophorese bei 25mA, 300V und Raumtemperatur (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad, München, D). Aufgrund der standardisierten Banden des Proteinmarkers konnte eine Bestimmung der aufgespaltenen Proteine anhand ihrer Größe erfolgen. Als Kontrolle wurde Actin verwendet.

Nicht reduzierender Ladepuffer		Laufpuffer	
62.5 mM	Tris	25 mM	Tris
10%	Glycerol	192 mM	Glycerol
2%	SDS	0,1%	SDS
0.025%	Bromphenolblau	pH 8.3	
pH 6.8			

TBST ₂₀ (Tris-buffered Saline with Tween20)		Transferpuffer	
50 mM	Tris	25 mM	Tris
150 mM	NaCL	192 mM	Glycerol
0,05%	Tween 20	10%	Methanol
pH 8.0			

Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden von den Trenngelen auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (Immunoblot®, Bio-Rad, München, D) mittels Trans-Blot® Turbo Transfer™ System (Bio-Rad, München, D) transferiert. Hierzu wurden die Gele zwischen zwei in Transferpuffer getränkten Filtern und in der Kassette in das System eingebracht. Um Proteine immunologisch zu erfassen, wurde zunächst eine Blockierung unspezifischer Bindestellen mit 5 % Milchpulver und 1 % BSA in TBST für 1h durchgeführt. Darauffolgend wurde mit Primärantikörpern, gelöst in 5% Milchpulver und 1 % BSA in TBST, für 18h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST₂₀ wurde mit Sekundärantikörpern, in 5% Milchpulver in TBST₂₀ gelöst, für eine Stunde inkubiert. Die Chemolumineszenzintensität wurde mit dem Odyssey® Imaging System (LI-COR, Lincoln, NB, USA) erfasst und mit der Software Image Studio lite (LI-COR, Lincoln, NB, USA) ausgewertet. Die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle unter 7.1.1.2 aufgeführt. Es wurden Thioredoxin 2, Thioredoxin-Reduktase 2, Glutaredoxin 2 und Peroxiredoxin 3/5 untersucht.

5.2.10. Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mittels SigmaPlot© 13.0 Software (Jandel GmbH, Erkrath, D) durchgeführt. Experimentell erhobene Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Die statistischen Tests und n-Zahlen sind in den Abbildungsbeschriftungen enthalten. Als statistisch signifikant wurden p-Werte angesehen, die kleiner als 0,05 (*), 0,01(**) bzw. 0,001 (***) waren.

6. Ergebnisse

6.1. Genotypisierung der $\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$ -Mäuse

Aus Ohrbiopsien und geclippten Schwanzspitzen gewonnene DNS Lysate wurden mittels PCR und Gelelektrophorese auf spezifische Banden untersucht. Hierbei zeigten sich die verschiedenen Genotypen. Eine Tamoxifen-induzierbare $\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$ -Maus mit geflochten Allelen und dem Vorhandensein der cre-Rekombinase ist durch das Bandenmuster ganz rechts (Abb. 5) charakterisiert. Alle anderen Genotypen wurden als Kontrolltiere in Versuchen verwendet.

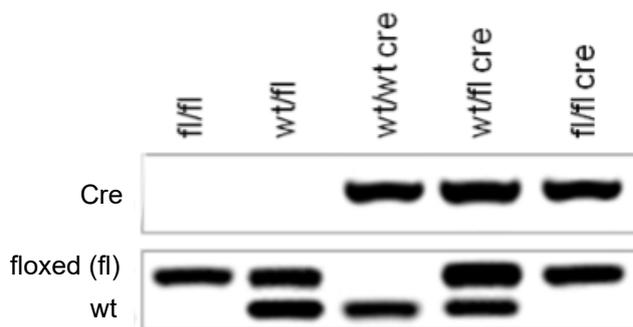


Abbildung 5: Genotypisierung der Mäuse

Abhängig davon, ob ein oder 2 geflochte Allele oder ein oder 2 wildtyp - Allele vorliegen, ergeben sich unterschiedliche Banden. Auch bei Vorhandensein der Cre-Rekombinase ergibt sich eine spezifische Bande.

6.2. Erhöhte Peroxynitritspiegel in pulmonalen $\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$ -Endothelzellen

Um die bereits in eEPCs gemessenen erhöhten ROS-Level genauer einzuordnen¹²⁵, und um zu testen, ob die beobachteten phänotypischen Veränderungen auf erhöhte Peroxynitritspiegel zurückzuführen sind, wurden von $\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$ und $\text{Trxrd2}^{\text{iECWT}}$ Mäusen pulmonale Endothelzellen isoliert.¹¹⁵ Anschließend wurde mit der fluoreszierenden Sonde Fluoreszein-Boronat (Fl-B) gefärbt, die Peroxynitrit spezifisch nachweist.^{126, 142} In ECs von $\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$ Mäusen zeigten sich im Vergleich zu ECs von $\text{Trxrd2}^{\text{iECWT}}$ Mäusen signifikant erhöhte Peroxynitritspiegel.

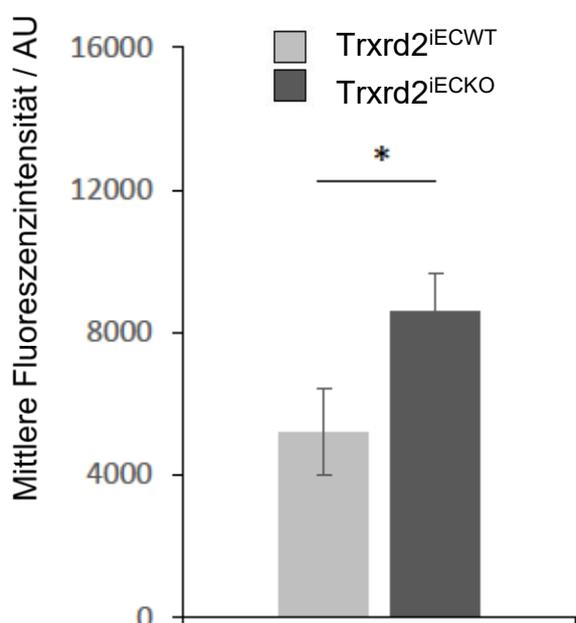


Abbildung 6: Erhöhte Peroxynitritspiegel in pulmonalen ECs von $\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$ Mäusen

Vermehrte Peroxynitritproduktion zeigte sich anhand einer erhöhten Fluoreszenz mittels Fl-B (Inkubation: 30min, 5 μ M) in von $\text{Trxrd2}^{\text{iECKO}}$ Mäusen isolierten pulmonalen Endothelzellen im Vergleich zu Zellen von $\text{Trxrd2}^{\text{iECWT}}$ -Mäusen (n= 8 Tiere, Mann-Whitney-U-Test) AU = willkürliche Einheit.

6.3. Erhöhte Peroxynitritspiegel in Mesenterialarterien und Einfluss von Stickstoffmonoxid

Als nächstes wurden Versuche *ex vivo* an isolierten mesenterialen Arteriensegmenten durchgeführt. Hierzu wurden Segmente longitudinal aufgeschnitten und mittels FI-B Sonde untersucht. Bereits unter basalen Bedingungen zeigten Arterien von $\text{Trxr}2^{\text{iECKO}}$ Mäusen im Vergleich zu Gefäßen von $\text{Trxr}2^{\text{iECWT}}$ Mäusen eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität. (WT: $26,2 \pm 0,5$ vs. KO: $65,6 \pm 0,8$ mittlere Grauwerte) Um zu untersuchen, ob die gemessenen Peroxynitritspiegel von Stickstoffmonoxid abhängig sind, wurden die Gefäße mit dem NOS-Inhibitor LNA (N-nitro-L-arginin) inkubiert. Hierbei konnte an den $\text{Trxr}2^{\text{iECKO}}$ -Mausgefäßen eine signifikante Fluoreszenzreduktion gemessen werden (KO: $65,6 \pm 0,8$ vs. KO+LNA: $25,6 \pm 0,7$ mittlere Grauwerte). Weiterhin konnten nach Inkubation mit LNA und darauffolgender Behandlung mit dem NO-Donator Spermin-NONOate ($100 \mu\text{M}$, $t_{1/2} = 230 \text{ min}$ bei 25°C und $\text{pH}7,4$ $\text{NO-flux} \approx 0.4 \mu\text{M}/\text{min}$ ¹⁴³) sowohl in $\text{TrxR}2^{\text{iECKO}}$ -Arterien als auch $\text{Trxr}2^{\text{iECWT}}$ -Arterien eine erneute Verstärkung des Fluoreszenzsignals gezeigt werden (KO+LNA+NONOate: $72,9 \pm 1,2$; WT: $26,2 \pm 0,5$ vs. WT+NONOate: $55 \pm 1,7$ Mittlere Grauwerte) (Abb. 7)

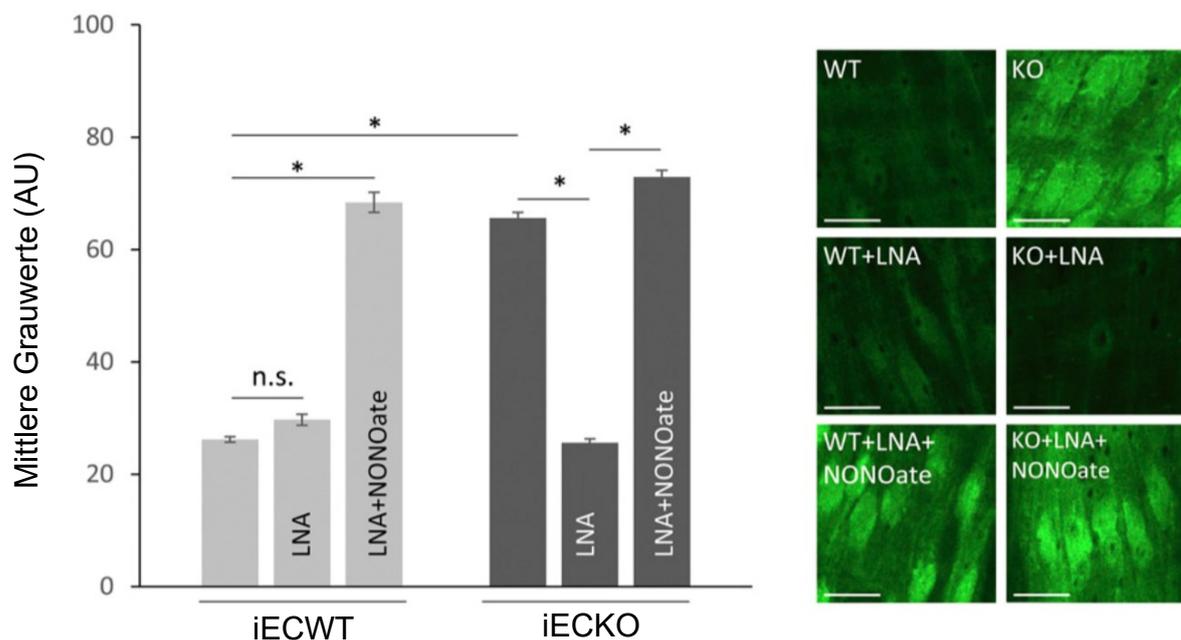


Abbildung 7: Ex vitro Nachweis von Peroxynitrit in Mesenterialarterien

Die Peroxynitritbestimmung mittels FI-B Sonde ($0,45 \mu\text{M}$, 15 min) zeigt signifikant erhöhte Signalintensität in Mesenterialarterien, die aus $\text{TrxR}2^{\text{iECKO}}$ -Mäusen isoliert wurden. ($n = 8$ Tiere pro Gruppe). Inkubation von $\text{TrxR}2^{\text{iECKO}}$ Mausgefäßen mit dem eNOS Inhibitor LNA resultierte in einer signifikant verringerten Signalintensität. ($n = 6$ Tiere pro Gruppe) Die gemeinsame Applikation von LNA und dem NO-Donor Spermin-NONOate erhöhte die Peroxynitritspiegel wieder auf das Ausgangslevel ($n = 3$ Tiere). Rangvarianzanalyse mit paarweisen Vergleichen. Bilder auf der rechten Seite zeigen die beobachteten Fluoreszenzen im Endothel mit unterschiedlichen Interventionen. au = Willkürliche Einheit. (Skala: $20 \mu\text{m}$.)

6.4. Mitochondriale Lokalisation des Peroxynitritsignals

Nachdem gezeigt wurde, dass $\text{TrxR2}^{\text{IECKO}}$ -Endothelzellen vermehrt Peroxynitrit bilden, wurde nun MitoPY1 verwendet, um eine etwaige mitochondriale Lokalisation nachzuweisen. Bereits unter Basalbedingungen zeigten Gefäße von $\text{TrxR2}^{\text{IECKO}}$ -Mäusen im Vergleich zu Gefäßen von TrxR2^{WT} -Mäusen eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität. Anhand des Färbemusters ließ sich auch eine mitochondriale Lokalisation bestätigen. Anschließend wurde LNA (N-nitro-L-arginin) hinzugegeben. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verringerung des Fluoreszenzsignals in Gefäßen von $\text{TrxR2}^{\text{IECKO}}$ -Mäusen. Als Positivkontrolle wurde Spermin-NONOate zu Gefäßen von TrxR2^{WT} -Mäusen gegeben. Daraufhin ließ sich eine signifikant höhere Fluoreszenz nachweisen. (Abb. 8)

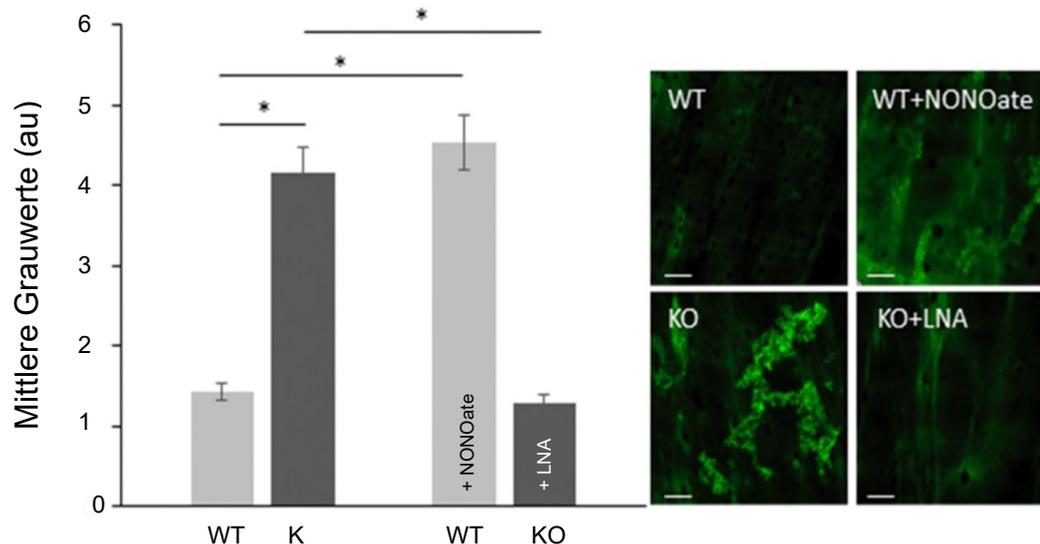


Abbildung 8: Mitochondriale Peroxynitritlokalisierung mittels MitoPY1

Bereits unter basalen Bedingungen zeigten Gefäße von $\text{Trxrd2}^{\text{IECKO}}$ -Mäusen eine höhere MitoPY1-Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Gefäßen von $\text{Trxrd2}^{\text{WT}}$ -Mäusen. ($n = 3$ Tiere pro Gruppe). Nach Behandlung mit dem eNOS-Inhibitor LNA zeigte sich bei $\text{Trxrd2}^{\text{IECKO}}$ -Mausgefäßen eine signifikante Reduktion der Fluoreszenz. Mittels NONOate konnte wiederum eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz von $\text{Trxrd2}^{\text{WT}}$ -Mausgefäßen erreicht werden. ($n = 3$ Tiere pro Gruppe) Rangvarianzanalyse mit paarweisen Vergleichen. Bilder auf der rechten Seite zeigen MitoPY1-Färbungen mit verschiedenen Interventionen. (au= willkürliche Einheit)

Um die mitochondriale Lokalisation zu verifizieren, wurden außerdem Färbungen mit dem MitolD-Red Detektions-Kit und MitoPY1 an adulten $\text{Trxd2}^{\text{iECKO/WT}}$ -Zellen angefertigt. Hierbei zeigte sich eine Kolokalisation. (Abb. 9)

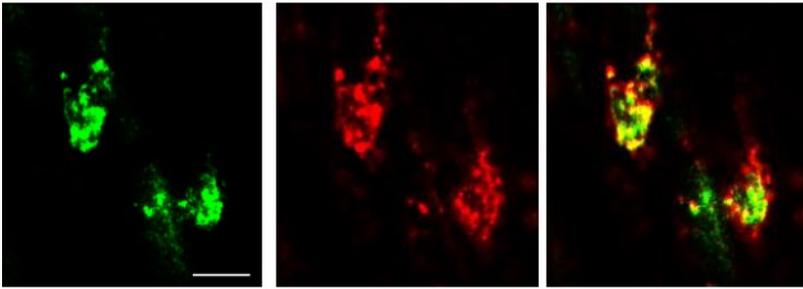


Abbildung 9: EC-Färbungen mit MitoPY1 und MitolD-Red

Mitochondrien in Endothelzellen, die mit MitoPY1 gefärbt worden sind, erscheinen Grün (Links). Färbungen mit MitolD-Red erscheinen in Rot (Mitte). Kolokalisation der beiden Marker erscheint in Gelb (Rechts). Skala: 10 μm

6.5. Evaluierung der endothelialen Funktion mittels FID

Um die endotheliale Funktion zu überprüfen, wurde die flussinduzierte Dilatation an Femoralarterien von $\text{Trxd2}^{\text{iECKO}}$ -Mäusen und Trxd2^{WT} -Mäusen verglichen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. (Abb. 10)

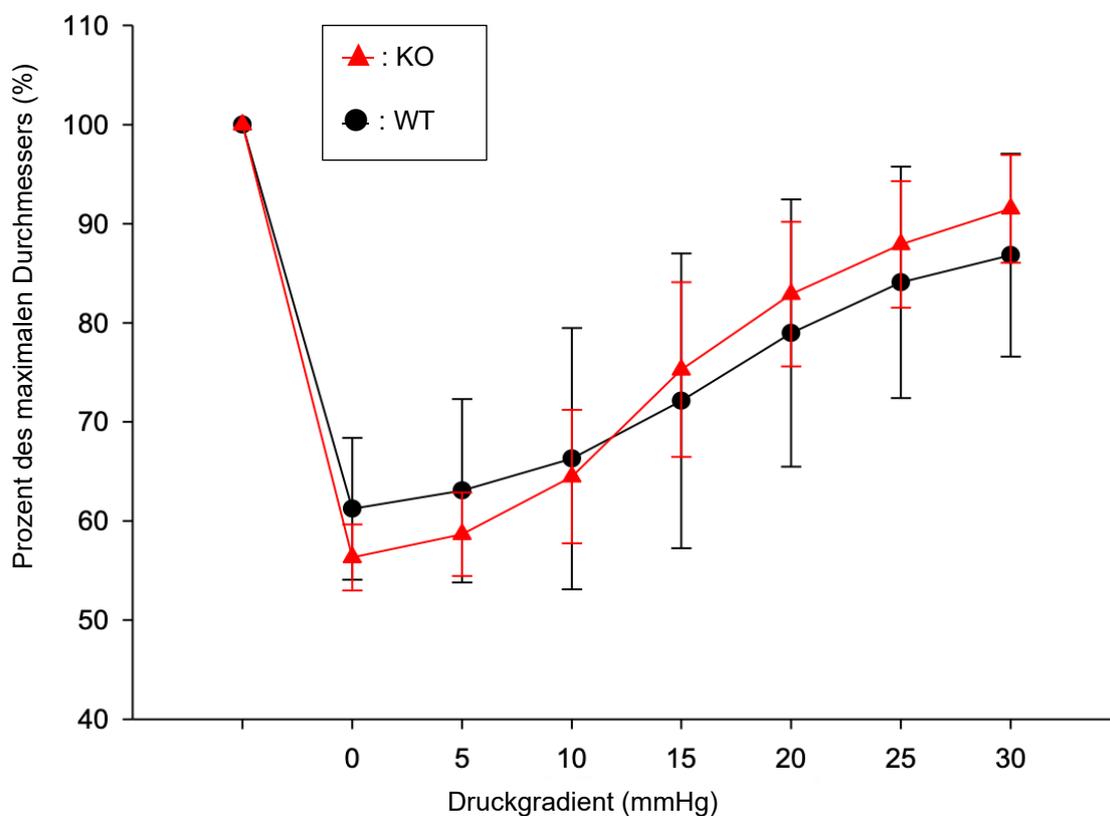


Abbildung 10: Messung der flussinduzierten Dilatation an Femoralarterien

Die Dilatationskapazität in Abhängigkeit des Flusses von Femoralarterien aus $\text{Trxd2}^{\text{iECKO}}$ -Mäusen im Vergleich zu Arterien aus Trxd2^{WT} -Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Mittelwerte mit Standardabweichung ($\text{Trxd2}^{\text{iECKO}}$: n = 10 von 5 Mäusen, Trxd2^{WT} : n = 11 von 4 Mäusen)

6.6. Expressionslevel von Trx2, Grx2, Prx3 und Prx5



Die antioxidativen Proteine Peroxiredoxin 3 und 5 sind wichtig für eine suffiziente Elimination von Peroxynitrit.^{144, 145} Die für diese Reaktion benötigten Elektronen werden zum Teil von Thioredoxin 2 und Glutaredoxin 2 bereitgestellt.¹⁴⁶ Deshalb wurden die Expressionslevel dieser Proteine in embryonalen endothelialen Progenitorzellen (eEPC) mit homozygotem *Trxd2*-Knockout (*Trxd2*^{-/-}) mittels Westernblot untersucht. In einem reduzierenden Milieu zeigten *Trxd2*^{-/-} eEPCs eine vermehrte Expression von Grx2 im Vergleich zu *Trxd2*^{+/+}-eEPCs. (Densitometrische Pixelanalyse: 6.9 +/- 2.3 höhere Expression (n = 4 Blots)) Expressionslevel für Trx2, Prx3 und Prx5 unterschieden sich nicht. (Abb. 11)

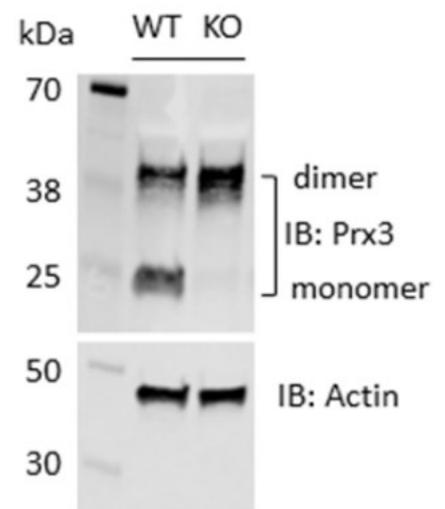
Abbildung 11: Westernblots für Redoxproteine

Westernblots für TrxR2, Grx2, Trx2, Prx3 und Prx5 aus *Trxd2*^{-/-} (KO) und *Trxd2*^{+/+} (WT) eEPCs. Ein signifikanter Expressionsunterschied zeigte sich nur für Grx2. Actin wurde als Kontrolle verwendet.

Neben dem Expressionslevel einzelner Proteine ist auch der Grad ihrer Oxidation von Interesse. So wurde vor dem Hintergrund, dass Prx3 unter oxidativem Stress dimerisiert, das Verhältnis von monomerem (= nicht oxidiertem) und dimerem (= oxidiertem) Prx3 untersucht.⁹² Hier konnte nach Alkylierung mit N-ethylmaleimid, um eine artifizielle Oxidation während der Verarbeitung zu verhindern, nachgewiesen werden, dass in *Trxd2*^{-/-} eEPCs Prx3 vornehmlich in der dimeren Form vorliegt. (Abb. 12)

Abbildung 12: Konfiguration von Peroxiredoxin 3

Mittels Westernblot unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass in *Trxd2*^{-/-} eEPCs Peroxiredoxin kaum in der monomeren Form vorliegt, während in *Trxd2*^{+/+} eEPCs beide Isoformen vorliegen. Aktin wurde als Kontrolle verwendet.



Liegen besonders hohe Spiegel von Peroxiden vor, kann es zu einer Hyperoxidierung von Peroxiredoxinen unter Bildung von Sulfon- oder Sulfinsäuren kommen.¹⁴⁷ Die Analyse der Hyperoxidation mit einem Anti-Prx-

SO₃-Antikörper zeigte vermehrt Prx in einem hyperoxidierten Status. (Abb. 13A) Mit diesem Ansatz lässt sich jedoch nicht bestimmen, welche Isoform des Prx hyperoxidiert vorliegt. Hierfür wurden die Zellen ohne NEM lysiert, sodass reduzierte Prx dimerisierten und nur das hyperoxidierte Prx als Monomer verblieb. Es konnte somit gezeigt werden, dass in *Trxrd2*^{-/-} eEPCs Prx3 vermehrt als Monomer, also in der hyperoxidierten Form, vorliegt. (Abb. 13B)

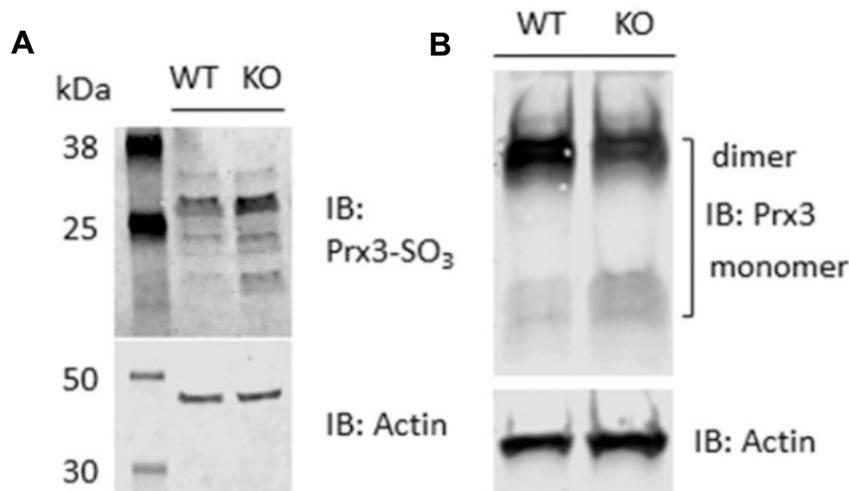


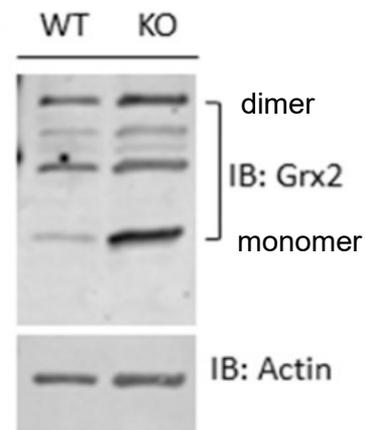
Abbildung 13: Analyse des hyperoxidierten Peroxiredoxins

Mittels eines Antikörpers gegen hyperoxidiertes Prx (Prx3-SO₃) konnte gezeigt werden, dass in *TrxR2*^{-/-} eEPCs Prx vermehrt in der hyperoxidierten Form vorliegt. (A) Da hyperoxidiertes Prx3 nicht dimerisieren kann, konnte man in *TrxR2*^{-/-} eEPCs vermehrt monomeres Prx3 nachweisen. (B) Aktin wurde als Kontrolle verwendet.

Abschließend wurde untersucht, ob Grx2 als inaktive holo-Form oder als aktivierte apo-Form vorliegt. Unter Ruhebedingungen und hohen Gluthationspiegeln bildet Grx2 ein 2Fe-2S-Cluster und ist inaktiv. Wenn es zu oxidativem Stress kommt, zerfällt dieses Cluster und Grx2 wird in die aktive Form überführt.¹⁴⁸ Es konnte demonstriert werden, dass in *Trxrd2*^{-/-} eEPCs sowohl die monomere als auch die dimere Form verstärkt exprimiert werden. Insbesondere die monomere, also aktive Form, wurde im Vergleich zu *Trxrd2*^{+/+} eEPCs vermehrt exprimiert. (Abb. 14)

Abbildung 14: Konfiguration des Glutaredoxin 2

Trxrd2^{-/-} eEPCs zeigten in Blots mit nicht reduzierenden Puffern generell eine erhöhte Expression von Grx2. Insbesondere die monomere Form wurde verstärkt exprimiert. Aktin wurde als Kontrolle verwendet.



7. Diskussion

Radikale Sauerstoffspezies müssen aufgrund ihrer Funktion als Signalmolekül und Oxidationsmittel akkurat reguliert werden. Ist diese Regulation gestört, kann es zum Zelluntergang kommen und die Entstehung von Erkrankungen wie Krebs oder Atherosklerose wird begünstigt.^{149, 150} Andererseits dürfen auch nicht alle Radikale eliminiert werden, da sie häufig auch als Trigger für physiologische Zellfunktionen wie Proliferation und Differenzierung dienen.^{151, 152} Für die Kontrolle der ROS-Level sind diverse Systeme verantwortlich.¹⁵³ Hierzu gehört unter anderem das Thioredoxin/Thioredoxinreduktasen-System. Dieses aus mehreren Isoformen bestehende Enzymsystem kann unter NADPH-Verbrauch verschiedene Radikale reduzieren.⁹⁰ Während über die Funktionen des zytosolischen Thioredoxin-1 bereits viel Literatur existiert, wurden über die Aufgaben des mitochondrialen Thioredoxin-2 und der assoziierten Thioredoxinreduktase-2 noch nicht viele Erkenntnisse gewonnen. Dennoch ist gerade diese Isoform von großem Interesse, da Mitochondrien häufig Entstehungsort von ROS sind.^{154, 155}

Um einzelne Gen- bzw. Proteinfunktionen genauer *in vivo* zu charakterisieren, bieten sich Knockout-Mausmodelle an. Mit dem ersten Modell schafften Gu et al. bereits 1994 ein versatiles Werkzeug, um zelluläre und molekulare Interaktionen zu verstehen.¹⁵⁶ Hierfür werden einzelne Genabschnitte deaktiviert, um die Expression des entsprechenden Proteins zu verhindern.^{117, 157} Conrad et al. lieferten mittels eines Thioredoxinreduktase-2 Knockouts erste wichtige Erkenntnisse zur Funktion dieses Enzyms. So zeigten Mäuse mit einem ubiquitären TrxR2-KO eine defizitäre Hämatopoese, kardiale Abnormalitäten und einen frühen embryonalen Tod.¹⁰³

Da dieses Modell aufgrund der embryonalen Letalität keine längerfristige Beobachtungsdauer zulässt, generierte unsere Arbeitsgruppe ein induzierbares, auf das Endothel beschränktes, Trxrd2-Maus-Knockoutmodell. So kann eine etwaige endotheliale Pathologie genauer untersucht werden. Weiterhin sind endotheliale Prozesse von Interesse, da volkswirtschaftlich und gesellschaftlich relevante Erkrankungen mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen.^{158, 159} Hierfür wurden die von Conrad et al. generierten Mäuse mit induzierbaren endothelzell-spezifischen knockout Mäusen (Tg(Cdh5-cre/ERT2)1Rha) verpaart.¹²¹ So konnte ein Modell entwickelt werden, bei dem die TrxR2 mittels Tamoxifengabe endothelzellspezifisch ausgeschaltet werden konnte. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe von Kirsch et al. zeigten, dass diese Mäuse nur über eine eingeschränkte Arterio- und Angiogenese verfügen. Ebenso zeigte sich, dass die flussinduzierte Dilatation in Arterien, die einer temporären Ligation ausgesetzt waren, im Vergleich zu Kontrollgefäßen reduziert war. In

endothelialen Vorläuferzellen (eEPCs) zeigten sich erhöhte ROS-Level erhöht und ein verändertes mitochondriales Potential.¹¹⁵

Mit der hier vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, auf welchen Grundlagen die beobachteten Auffälligkeiten beruhen. So konnte gezeigt werden, dass es sich bei den erhöhten ROS-Spiegeln u.a. um Peroxynitrit handelt. Die erhöhten Peroxynitritlevel konnten sowohl in TrxR2-KO-Endothelzellen *in vitro* als auch in Mesenterialarterien *ex vivo* beobachtet werden. Weiterhin konnte ein mitochondrialer Ursprung der erhöhten Peroxynitritlevel festgestellt werden. Letztlich wurden auch variable Expressionslevel und Alterationen des oxidativen Status verschiedener antioxidativer Proteine nachgewiesen.

7.1. Limitationen des Cre/loxP-Mausmodells

Während das Cre/loxP-System ein wichtiges Werkzeug in der modernen Forschung geworden ist, hat dieses Modell auch einige Limitationen und Probleme. So kann es beispielsweise vorkommen, dass sich die Cre-Rekombinasevermittelte Deletion von loxP-flankierten Genabschnitten zwischen einzelnen Tieren unterscheiden kann. Dies kann sowohl bei zelltypspezifischen als auch gewebespezifischen Deletionen auftreten. Zum Teil ursächlich hierfür ist die Expression von unbekanntem („pseudo“) loxP-Sequenzen, wie sie vereinzelt im Säuger genom vorliegen.^{160, 161} Mittels bioinformatischer Analyse konnte die Frequenz dieser loxP-Loci auf 1.2 pro Megabasenpaar geschätzt werden.¹⁶² Diese können auch als Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase dienen. Ebenso kann es sein, dass der verwendete Promotor unbekannterweise auch in anderen Zelltypen exprimiert wird und auch dort geflochte Allele deletiert werden.¹⁶³ Weiterhin kann die Cre-Rekombinase über das Zielgewebe hinaus exprimiert werden und so durch unerwünschte Effekte die Interpretation der Daten verzerren.^{164 165}

Eine weitere signifikante Einschränkung des Cre/loxP-Modells ist die Toxizität der Cre-Rekombinase gegenüber Cre-exprimierenden Zellen. *In vitro* Daten zeigten, dass die Expression der Cre-Rekombinase die Proliferation von Säugerzellen einschränken kann. Ebenso können aberrante DNS-Rekombinationen und chromosomale Defekte auftreten.¹⁶⁶ Weiterhin existieren Daten zu zellspezifischer Cre-Toxizität, beispielsweise in Neuronen, Kardiomyozyten und Tumorzellen. Der Mechanismus der Cre-Toxizität beruht hauptsächlich auf unspezifischer Interaktion zwischen der Cre-Rekombinase und der DNS.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Ebenso sind die schädlichen Effekte der Cre-Rekombinase abhängig vom Ausmaß der Expression sowie vom exprimierenden Zelltyp. Auffällig ist, dass die beschriebenen Beobachtungen vor allem bei langer und hochdosierter Cre-Wirkung auftraten. Um ebenjene Effekte zu vermindern oder

auszuschalten, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse nur über einen kurzen Zeitraum mit Tamoxifen behandelt, um als Folge eine zeitlich limitierte Cre-Wirkung herbeizuführen. Ebenso wurden Mäuse mit Cre-Rekombinase, aber ohne geflochtenen TrxR2-Locus als Kontrolltiere verwendet, um eine bessere Abschätzung der Cre-Toxizität zu ermöglichen.

7.2. Isolation von Arterien und Endothelzellen

Die Isolation von murinen Femoral -und Mesenterialarterien ist ein wertvolles Werkzeug, um die Physiologie dieser Gefäße besser zu untersuchen.^{170, 171} Da diese Gefäße einen sehr geringen Durchmesser (100-250 μM) aufweisen, ist eine sorgfältige Präparation notwendig. Probleme entstehen beispielsweise durch zu grobe Dissektion, hierbei entstehen Vasospasmen oder die sensiblen Endothelzellen werden beschädigt. Ebenso kann eine zu lange Präparationsdauer zu einer eingeschränkten vaskulären Integrität und dementsprechend verzerrten Ergebnissen führen. Deshalb benötigt der Präparator eine sorgfältige Ausbildung und genug Übung, um suffiziente Ergebnisse zu erzielen. Weiterhin ist es notwendig, dass die während der Präparation verwendeten Puffer frisch zubereitet sind, um ein optimales Milieu zu gewährleisten. Ebenso sollte der Puffer regelmäßig gewechselt werden, um beispielsweise bei der Isolation von Mesenterialarterien die Entfernung von Fäces und Fettgewebe zu ermöglichen. Ist man den genannten Problemen beigekommen, bietet die Isolation von Arterien hervorragende Möglichkeiten, Gefäßkontraktion¹⁷², Calcium-Spiegel¹⁷³ oder wie in dieser Arbeit, die Peroxynitritproduktion zu untersuchen.

Neben der Isolation von Arterien wurden im vorliegende Projekt auch Endothelzellen der murinen Lunge isoliert. Hierfür wurden in der Vergangenheit häufig Organe oder Gewebe mit Puffern, die Verdauungsenzyme wie z.B. Kollagenase enthalten, versetzt. Um das gewonnenen Lysat aufzureinigen, waren aufwendige und zeitintensive Methoden nötig und häufig war die Ausbeute gering.^{174, 175} Ebenso stellt das Überwuchern der kultivierten Zellen – beispielsweise durch Fibroblasten – ein Problem dar. Als Lösung hierfür bieten sich bspw. immortalisierte Zelllinien an, die im Vergleich zu normalen Endothelzellen allerdings häufig andere Eigenschaften aufweisen und tumorerzeugend sind.^{176, 177} In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine bereits 1997 entwickelte Methode verwendet.¹⁷⁸ Hierfür werden sogenannte Dynabeads®, superparamagnetische kugelförmige Polymerpartikel, an die ein Antikörper gekoppelt ist, mit dem Gewebehomogenisat versetzt. Anschließend können die an den Antikörper und damit an die Dynabeads® gekoppelten Zellen mittels magnetischer Säulen isoliert werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Zellen einer deutlich geringeren mechanischen Belastung

ausgesetzt sind. Dadurch wird die Lyserate während der Bearbeitung verringert. Ebenso behalten auf diese Weise isolierte Zellen ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften bei.¹⁷⁹ Nachteilig ist dennoch, dass durch diese Methode die dreidimensionale Zellstruktur verloren geht und somit Zellinteraktionen mit angrenzenden Zellen entfallen und Funktionen durch die Monokultur verloren gehen.¹⁸⁰

7.3. Multiphotonenmikroskopie und Immunfluoreszenz

Seit der Erfindung des Mikroskops gab es immer weitere Bestrebungen, Auflösung und Vergrößerung zu verbessern. Heutzutage ist die Lasermikroskopie Mittel der Wahl für viele biomedizinische Anwendungen. Bei der konventionellen Lasermikroskopie absorbiert der Fluorophor ein von einem Laser generiertes Photon. Dadurch werden Elektronen in einen anderen Energiezustand versetzt. Wenn das Energieniveau dieses Elektrons wieder in seinen Ausgangszustand fällt, wird wiederum ein Photon frei. Die in dieser Arbeit verwendete Technik der Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie wurde bereits 1990 von Webb et al. entwickelt.¹⁸¹ Diese Methode, auch Multiphotonenmikroskopie (MPM) genannt, basiert auf der Anregung des Fluorophors mittels zwei niedrigenergetischer Photonen. Zwar ist die Energie jedes einzelnen Photons nicht hoch genug, um Elektronen anzuregen, jedoch ist die kombinierte Energie ausreichend, um Fluoreszenz zu stimulieren.¹⁸² In einem MPM kann die Wahrscheinlichkeit der Erregung weiter gesteigert werden, wenn der Laserstrahl durch ein Objektiv hoher numerischer Apertur sehr stark fokussiert wird. Weil weiterhin der Photonenflux mit der vierten Potenz, ausgehend vom Fokus, abnimmt, ist die Fluoreszenz bei der MPM auf ein Subfemtolitervolumen beschränkt. Eine Bildgebung erfolgt dann mittels Rasterabtastung der einzelnen Punkte und wird elektronisch verarbeitet.

Das MPM vereint im Vergleich zur konventionellen Lasermikroskopie einige Vorteile. Zum einen können die beim MPM verwendeten Exzitationswellenlängen, tiefrot und nahe an infrarot, Gewebe besser durchdringen. Diese verbesserte Eindringtiefe wird durch verminderte Streuung und reduzierte Absorption durch endogene Chromophore möglich gemacht. Somit wird eine bessere Darstellung tieferer Schichten dickeren Gewebes möglich.^{183, 184} Weiterhin ist die Hintergrundfluoreszenz sehr gering, da gestreute Photonen nicht genügend Energie haben, um selbst Elektronen anzuregen und damit eine Fluoreszenz zu erzeugen.¹⁸⁵ Ein weiterer wichtige Vorteil der MPM ist die nur sehr geringe Photobleichung. Dies beschreibt den permanenten Verlust der Fluoreszenz eines Fluorophors durch kontinuierliche Bestrahlung mit der Anregungswellenlänge aufgrund von photochemischer Zerstörung. Bei der MPM

wird nur jeweils ein sehr kleines Volumen angeregt, sodass die Photobleichung sehr gering ausfällt.¹⁸⁶

Für den Nachweis von Peroxynitrit wurden in dieser Arbeit die Chemikalien FI-B und MitoPY1 verwendet. Problematisch hierbei ist, dass diese Sonden neben ONOO⁻ auch andere Peroxide wie Wasserstoffperoxid nachweisen.^{126, 134} Um ein etwaiges Signal durch H₂O₂ oder andere Peroxide nachzuweisen, wurden die Gefäße mit LNA behandelt. Dieses Vorgehen verhindert die Produktion von Peroxynitrit und so konnte im Umkehrschluss gezeigt werden, dass vor allem Peroxynitrit produziert wird. Weiterhin ist der Fluoreszenzanteil der FI-B Sonde, der für die Färbung sorgt, nach der Abspaltung des Boronanteils stark pH-abhängig, sodass bei ungünstigen pH-Werten die fluoreszierende Eigenschaft inaktiviert werden kann.¹⁸⁷ Um diesem Effekt vorzubeugen, wurden alle Experimente unter pH-kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Ferner stellt die Quantifizierung der Peroxidkonzentrationen ein Hindernis dar. Die gemessene Fluoreszenz korreliert zwar in etwa mit der Konzentration, allerdings können mit den hier angewandten Methoden keine exakten Spiegel bestimmt werden, da die gemessenen Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit der zellulären Aufnahme und Distribution fluktuieren.^{138, 188, 189} Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die verwendeten Sonden nicht ungeeingeschränkt für eine Quantifizierung der Peroxynitritkonzentration verwendet werden können. Allerdings können verschiedene Interventionen hervorragend anhand der Fluoreszenzintensität miteinander verglichen und so aussagekräftige Daten bezüglich der Produktion von Peroxynitrit generiert werden.

7.4. Westernblots von Redoxproteinen

Der Nachweis von Proteinen im reduzierten oder oxidierten Zustand ist ein wichtiges Werkzeug für die Analyse von oxidativem Stress und zur Charakterisierung von interzellulärer Kommunikation. Ein großer Teil der durch ROS/RNS bedingten Effekte wird über die reversible Oxidation von Thiolresten vermittelt.^{190, 191} Während sich der Westernblot generell eignet, um Proteine nachzuweisen, muss dieser zur Bestimmung des oxidativen Status von Cysteinresten modifiziert werden. Ein Hindernis, dass bei der Bestimmung des Thiolredoxstatus von Peroxiredoxinen auftreten kann, ist eine artifizielle Oxidation während der Probenverarbeitung. Ebenso muss die Reduktion von Prx durch Trx verhindert werden, um eine adäquate Darstellung der Thiolkonfiguration zu ermöglichen. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit eine Alkylierung mit N-ethylmaleimid eingesetzt. Diese von Gitler et al. entwickelte Methode fixiert Thiolgruppen im reduzierten Zustand mittels Alkylgruppentransfer. Im Gegensatz zur Carboxymethylierung mit Iodacetamid ist diese Methode pH-unabhängig. Ebenso werden intrazelluläre Thiole, die als

Multiproteinaggregat vorliegen, nicht modifiziert.¹⁹² Dies war für unsere Fragestellung hilfreich, da oxidiertes Peroxiredoxin in dimeren Aggregaten vorliegt und so eine Abschätzung bezüglich des Grades der Oxidation ermittelt werden konnte.¹⁹³

7.5. Nachweis von Peroxynitrit in Endothelzellen und Mesenterialarterien

Peroxynitrit gehört zu den radikalen Stickstoffspezies und ist ein potentes Oxidans. Ebenso können durch Peroxynitrit verschiedene Substrate nitriert werden. Es wird durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Superoxid gebildet.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Peroxynitrit spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes^{197, 198}, koronarer Herzerkrankung^{54, 199, 200} und Nierenversagen.²⁰¹⁻²⁰³ Aufgrund seiner schädigenden Wirkung als starkes Oxidans, aber auch aufgrund seiner Funktion als wichtiges Signalmolekül, muss eine präzise Kontrolle der Konzentrationen erfolgen. Eine wichtige Aufgabe in diesem Kontrollprozess erfüllen die Peroxiredoxine. Diese Gruppe von Thiolproteinen hat die Fähigkeit, Peroxynitrit zu reduzieren.²⁰⁴⁻²⁰⁷ Für diese Aufgabe wird zudem das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System benötigt. Diese Proteinfunktionseinheit stellt für das Peroxiredoxinsystem reduzierende Äquivalente bereit.^{90, 146, 204} In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Knockout der endothelzellspezifischen mitochondrialen Thioredoxinreduktase (TrxR2) eine vermehrte Peroxynitritproduktion sowohl in isolierten Zellen (Abb. 6) als auch in isolierten Arterien (Abb. 7) zur Folge hat. Ebenso konnte die überwiegende Peroxynitritproduktion dem Hauptkompartiment der TrxR2 zugewiesen werden – dem Mitochondrium. (Abb. 8/9)

Kirsch et al. zeigten 2016, dass Trxrd2^{IECKO}-Mäuse eine endotheliale Dysfunktion aufweisen. Ebenso zeigte sich, dass sowohl Arterio- als auch Angiogenese eingeschränkt sind.¹¹⁵ Hierfür könnte das in dieser Arbeit nachgewiesene Peroxynitrit mitverantwortlich sein. Einen wichtigen Teil zur Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität stellt das Prostaglandin/Thromboxan-System dar. Ebenso ist die Bildung von Prostaglandinen und ein suffizienter Arachidonsäurestoffwechsel ungemein wichtig für die proangiogenen Eigenschaften von Endothelzellen.²⁰⁸ Mittels der Cyclooxygenasen, COX-1 und COX-2, wird Prostaglandin H₂ (PGH₂) aus Arachidonsäure produziert und anschließend enzymatisch von einer PGI-Synthase in Gefäßen u.a. zu Prostacyclin (PGI₂) umgewandelt. In Thrombozyten bildet die Thromboxan A₂-Synthase aus PGH₂ Thromboxan (TxA₂).^{209, 210} Prostacyclin trägt einen wesentlichen Teil zur Vasodilatation bei, u.a. auch in einem hypoxischen Milieu.²¹¹ Liegen nun hohe Peroxynitritspiegel vor, kann es via Nitrierung zu einer

Inaktivierung der PGI-Synthase kommen und dementsprechend zu einer verminderten Produktion von Prostacyclin.²¹²

Neben dem Arachidonsäurestoffwechsel spielt auch die Produktion von Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle beim Erhalt der endothelialen Funktion. Eine fehlende NO•-Bildung führt zu einer endothelialen Dysfunktion und zu einer Störung der vaskulären Homöostase.²¹³ Bei zu hohen Peroxynitritspiegeln kann die Funktion der Stickstoffmonoxidsynthase eingeschränkt werden. Dies wird über verschiedene Mechanismen vermittelt. Zum einen wird ein wichtiger Kofaktor der eNOS, Tetrahydrobiopterin, von Peroxynitrit oxidiert.^{12, 214} Durch diesen Prozess wird die eNOS entkoppelt und somit wird weniger NO• und mehr ROS (vornehmlich O₂•⁻) gebildet.¹³ Dies führt zu einem „circulus vitiosus“, denn mithilfe des entstehenden Superoxidanions kann wiederum mehr Peroxynitrit gebildet werden. Zum anderen besitzt die eNOS ein Zinkthiolat-Cluster, das als katalytisches Schlüsselzentrum gilt.⁷ Dieses Zentrum kann von Peroxynitrit oxidiert werden. Dadurch kommt es zu einer Freisetzung des Zinkatoms und ebenfalls zu einer Entkopplung.^{13, 24, 215} Neben den von Peroxynitrit verursachten oxidativen Schäden, kann es auch zu einer Reihe von Veränderungen durch Nitrierungen kommen, die das Endothel schädigen und für eine endotheliale Dysfunktion sorgen. Die Superoxiddismutase ist ein wichtiges Enzym für die Detoxifikation von O₂•⁻. Fehlt die SOD oder ist sie mutiert, kann es zu einer ganzen Reihe an Pathologien kommen. So zeigen beispielsweise homozygote SOD-Knockoutmäuse eine eingeschränkte endothelvermittelte Dilatation.²¹⁶ Der Einfluss von Peroxynitrit auf die SOD ist mittlerweile gut untersucht worden. So zeigte sich, dass bei hohen Peroxynitritspiegeln der Tyrosinrest 34 nitriert wird.²¹⁷⁻²¹⁹ Als Folge verändert sich sowohl der Zugang und die Bindung des Substrats O₂•⁻ an das aktive Zentrum als auch die Sekundärstruktur der SOD.²²⁰ Fällt demnach die SOD aus, wird vermindert O₂•⁻ abgebaut und es kann wiederum mehr Peroxynitrit entstehen.

Kirsch et. al. zeigten zudem, dass Trxrd2^{iECKO}-Mäuse vermehrt Thromben in Arterien der Skelettmuskulatur sowie in den glomerulären Kapillaren bilden.¹¹⁵ Auch diese Beobachtung kann man erhöhten Peroxynitritleveln erklärt werden. Tatsächlich ist Peroxynitrit in der Lage, trotz der kurzen Halbwertszeit von etwa 10-20ms, zelluläre Membranen mittels Diffusion zu überwinden.²²¹⁻²²³ Zum Einen kann die bereits diskutierte, eingeschränkte Produktion von Prostacyclin eine Thrombusentstehung begünstigen²²⁴, denn PGI₂ hat anti-thrombotische Eigenschaften. Zum Anderen können auch direkt von Peroxynitrit vermittelte Effekte auf Thrombozyten oder Gerinnungsfaktoren für den prothrombotischen Phänotyp verantwortlich sein. Das Entstehen eines Thrombus ist das Ergebnis zweier Mechanismen: die Aktivierung von Thrombozyten und die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren. Faktor XI kann beispielsweise durch Peroxynitrit aktiviert

werden und damit eine prothrombogene Situation herbeiführen.²²⁵ Gleiches gilt für Plasmin.²²⁶ Andererseits gibt es auch Hinweise auf eine Inaktivierung von Fibrinogen durch Peroxynitrit. Hierdurch würde die Blutgerinnung eher enthemmt werden und eine Thrombusentstehung verhindert.²²⁷ Weiterhin wurde eine peroxynitritvermittelte Inaktivierung von tissue-Plasmin Activator (tPA) in humanem Plasma demonstriert.²²⁸ Eine Verminderung der Konzentration des für die Fibrinolyse wichtigen Enzyms geht mit arterieller Plaquerbildung und einer vermehrten Suszeptibilität gegenüber ischämischen Ereignissen einher.^{229, 230} Auch bezüglich der thrombozytären Funktion im Zusammenhang mit Peroxynitrit bestehen divergierende Erkenntnisse: einerseits wird von einer über die Inhibition der thrombozytären mitochondrialen Atmungskette vermittelten Verringerung der Thrombenretraktion berichtet. Die Thrombenretraktion bezeichnet die Rückbildung von frisch gebildeten Thrombozytenaggregaten. Hierdurch entstehen größere und auch instabilere Thromben.²³¹ Andererseits wird von einer Inhibition der Thrombozyten berichtet.^{232, 233} Der Einfluss von Peroxynitrit auf die Blutgerinnung und damit einhergehend auf die von Kirsch et al. beobachtete Thrombenbildung bleibt daher nicht abschließend geklärt. Eine Ursache kann im komplexen Zusammenspiel der einzelnen Hämostasekomponenten liegen. Ebenso ist der Einfluss von Peroxynitrit auf die einzelnen Teile der Blutgerinnung abhängig von den lokalen hämatologischen Gegebenheiten, z.B. dem Vorhandensein von Radikalfängern oder der Verfügbarkeit von Puffersystemen. Weiterhin ist es möglich, dass die beobachtete Thrombenbildung nicht durch direkte Effekte von Peroxynitrit auf Hämostasekomponenten verursacht wird, sondern durch die Schädigung der Endothelzellen durch eine mitochondriale Dysfunktion.²³⁴ (Vgl. 9.6.)

7.6. Implikation der mitochondrialen Peroxynitritlokalisation

Mitochondrien sind membrangebundene Zellorganellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Neben der Aufgabe der Energiegewinnung sind sie verantwortlich für die Regulation der Apoptose. Die mitochondriale DNS (mtDNS) ist essenziell für die mitochondriale Proteinbiosynthese. Sind Schäden dieses Organells zu groß, gehen Zellen – orchestriert durch die Mitochondrien – in die Apoptose.^{235, 236} In der hier vorliegenden Arbeit wurde die mitochondriale Isoform der Thioredoxinreduktase konditionell deletiert. Passend dazu konnten wir eine Peroxynitritproduktion in den Mitochondrien nachweisen. Dies kann gravierende Folgen für die Zellgesundheit haben.

Mitochondrien verfügen über eine Atmungskette (Komplexe I-V). Hier werden, vereinfacht dargestellt, Elektronen über verschiedene membranständige Proteine transferiert, um anhand des mitochondrialen Membranpotentials ATP zu generieren.^{55, 237} Neben der intramitochondrialen Produktion von Peroxynitrit

durch die Generation von Superoxidradikalen kann Peroxynitrit auch von außen in die Mitochondrien diffundieren. Dort können sowohl chemische Modifikationen erfolgen als auch sekundäre Radikale über die Reaktion mit Kohlenstoffdioxid gebildet werden.²³⁸ Peroxynitrit ist in der Lage, die Komplexe I, II und V zu inaktivieren.²³⁹⁻²⁴⁶ So gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass der Komplex I als Folge einer Peroxynitritexposition an substantziellen Tyrosinresten nitriert werden kann.^{247, 248} Ebenso zeigten sich Tryptophan- und Methioninreste oxidiert. Als Folge dessen nimmt die katalytische Aktivität ab, gemessen an der Rate des Sauerstoffverbrauchs.²⁴⁸ Unklar verbleibt bisher, wie genau diese Modifikationen Komplex I inhibieren. Möglich wäre, dass die komplexe Proteinstruktur – Komplex I besteht aus 45 Untereinheiten – verloren geht.²⁴⁹ Komplex II verliert seine Funktion vermutlich durch die Oxidation eines für die Funktion unabdingbaren Thiols.^{250, 251} Ferner wird auch Komplex V durch Peroxynitrit inaktiviert.^{240, 242, 252} Peroxynitrit verursacht seine Wirkung also am ehesten über die Modifikation einzelner Komplexe und nicht über die Beeinträchtigung der Membranintegrität. Hierbei wären alle Komplexe betroffen.²³⁹ Durch die Inhibition der Atmungskette wird dann die ordnungsgemäße Elektronenübertragung gestört, der transmembranöse Protonenfluss unterbrochen und die ATP-Synthese inhibiert. Es entsteht eine sogenannte mitochondriale Dysfunktion.^{253, 254} Dass zu hohe Peroxynitritspiegel mit einer mitochondrialen Dysfunktion und darauffolgender Apoptose via Cytochrom C-Freisetzung und Aktivierung der Caspasen 2, 3, 8 und 9 vergesellschaftet sind, konnte bereits gezeigt werden.^{255, 256} Die hier dargelegten Folgen von Peroxynitrit für die mitochondriale Integrität sind gravierend und können zur Apoptose führen. Ein früher Marker für die Apoptose ist die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials.²⁵⁷ Passend hierzu konnten Kirsch et al. in Trxr2 knockout-eEPCs im Vergleich zu Kontrollzellen ein positiveres Membranpotential messen.¹¹⁵

7.7. Flussinduzierte Dilatation

Die FID stellt ein solides Verfahren zur Evaluation der vaskulären Funktion dar.²⁵⁸ Im Regelfall werden durch den Stimulus Scherstress vasodilatierende Substanzen, vornehmlich •NO und Prostaglandine, freigesetzt.^{1, 259, 260} Weiterhin wird so in der Gefäßwand ein Genexpressionsprofil aufrechterhalten, welches anti-inflammatorisch und anti-thrombogen wirkt.^{261, 262} An Gefäßstellen, in denen turbulente Strömung vorherrscht und in denen damit die Schubspannung vermindert ist, kommt es hingegen zur Expression pro-inflammatorischer und thrombogener Gene. Diese Stellen sind auch Prädilektionsstellen für eine sich im Alter entwickelnde Arteriosklerose²⁶³ (beispielsweise im Bereich der Karotisbifurkation). Besteht eine endotheliale Dysfunktion zum Beispiel im

Rahmen von pathologischen Zuständen wie Hypertension oder Diabetes, kommt es zu einer Einschränkung der flussinduzierten Vasodilatation.²⁵⁸ Peroxynitrit ist ebenfalls in der Lage, eine endotheliale Dysfunktion zu begünstigen und stellt damit ein Agens dar, dass die flussinduzierte Vasodilatation einschränken kann. So kann Peroxynitrit die Bioverfügbarkeit von •NO reduzieren und die PGI₂-Synthese nitrieren und inhibieren.²⁶⁴ Weiterhin kann durch Peroxynitrit Tetrahydrobiopterin oxidiert werden. Durch die Abwesenheit dieses Kofaktors in reduzierter Form wird die eNOS entkoppelt und es kann keine •NO -Synthese erfolgen. Stattdessen wird Superoxid gebildet.²⁶⁵ Im hier verwendeten Mausmodell konnte vermehrt Peroxynitrit nachgewiesen werden. Deshalb wurde die flussinduzierte Dilatation verwendet, um einen etwaigen Einfluss von Peroxynitrit auf die Gefäßmechanik zu untersuchen. Überraschenderweise zeigte sich im Vergleich zu Gefäßen von TrxR2^{iECWT}-Mäusen kein Unterschied in der FID mit Gefäßen von TrxR2^{iECKO}-Mäusen. Als Ursache dieser Beobachtung kommen mehrere Faktoren in Betracht. Die Peroxynitritproduktion in diesem Mausmodell wurde primär ins mitochondriale Kompartiment lokalisiert. Um jedoch zytosolische Enzyme zu beeinflussen, muss Peroxynitrit die mitochondriale Doppelmembran überwinden. Die Halbwertszeit von Peroxynitrit wird auf etwa 10 ms geschätzt, jedoch ist die Halbwertszeit von intramitochondrial gebildetem Peroxynitrit mit etwa 3-5ms deutlich kürzer aufgrund der hohen Verfügbarkeit von Metalloproteinen, Thiolen und CO₂. Trotzdem wäre eine mitochondriale Peroxynitritleckage möglich, da auch mit dieser verkürzten Halbwertszeit eine Diffusion über 3-4 µm möglich wäre und Mitochondrien mit etwa 2-3 µm ein wenig kleiner sind.^{238, 254} Andere Autoren postulieren jedoch, dass diese Halbwertszeit zu kurz sei, um eine Diffusion ins Zytosol zu ermöglichen²⁶⁶ Bekannt ist, dass Peroxynitrit, das überwiegend intramitochondrial gebildet wird, dort neben den oben genannten Reaktionspartnern mit zahlreichen weiteren mitochondrialen Komponenten reagieren kann. (Vgl. 9.6) Ebenso ist es denkbar, dass Peroxynitrit, welches durch beide mitochondrialen Membranen diffundiert ist, von den zytosolischen antioxidativen Systemen abgefangen wird. Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. de Wit (Lübeck) *in vivo* demonstrieren, dass die Vasodilatation von Cremasterarteriolen, die mit den Substanzen Acetylcholin oder dem NO-Donor Natriumnitroprussid behandelt wurden, in TrxR2^{iECKO}-Mäusen signifikant schlechter ist.²⁶⁷ Unklar verblieb jedoch auch hier, ob der beobachtete Effekt aufgrund von oxidativen Schäden an zytosolischen Proteinen oder aufgrund der mit hohen Peroxynitritspiegeln einhergehenden mitochondrialen Dysfunktion aufgetreten ist. Aus klinischen Untersuchungen ergaben sich weitere Hinweise, dass eine eingeschränkte flussinduzierte Vasodilatation zumindest mit Peroxynitrit einhergeht. Die

eingeschränkte FID wurde jedoch bei Patienten mit Hyperhomocysteinämie und Diabetes mellitus gemessen, sodass die eingeschränkte Vasodilatation sicherlich ein multifaktorielles Geschehen darstellt und nicht allein auf Peroxynitrit zurückzuführen ist.^{268, 269}

7.8. Einfluss eines TrxR2-Knockouts auf andere antioxidative Systeme

Bisher konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der endothelialen TrxR2 massive Effekte auf Gefäße und Mitochondrien hat. Um eine Kompensation durch andere antioxidative Proteine zu untersuchen, wurden Westernblots aus eEPCs für Trx2, Grx2, Prx3 und Prx5 durchgeführt. Nachdem in der vorliegenden Arbeit vermehrt Peroxynitrit als Folge eines endothelialen TrxR2-Knockouts gemessen werden konnte, sich jedoch nur ein moderater Phänotyp zeigte, stellte sich die Frage, ob andere oxidative Systeme Funktionen des Trx/TrxR-Systems übernehmen. Peroxiredoxine sind eine ubiquitär exprimierte Klasse von cysteinabhängigen Peroxidasen, die für die Regulation von Peroxidspiegeln wichtig sind.^{191, 270} Peroxiredoxin 3 (Prx3), die mitochondriale Isoform von Prx, ist in der Lage, durch Peroxynitrit gebildete Dithiole zu reduzieren.²⁷¹ Bemerkenswert ist, dass Prx3 sowohl von Trx2 als auch von Grx2 Elektronen zur Reduktion von Substraten erhält.¹⁴⁶ Glutaredoxine wurden initial als Elektronendonatoren für Ribonukleotidreduktasen (RNRs) identifiziert.^{272, 273} Mittlerweile sind viele weitere Funktionen bekannt, unter anderem haben Grxs eine wichtige Rolle bei der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern.²⁷⁴ Eine andere wichtige Aufgabe ist die Verteidigung gegen oxidativen und nitrosativen Stress. So kann Grx Disulfide mittels NADPH und Gluthationreduktase reduzieren.^{275, 276} Tatsächlich zeigte sich Grx2 in Trxr2-/- eEPCs generell vermehrt exprimiert. (Abb. 11) Weiterhin zeigte sich auch das aktive, monomere Grx2 verstärkt exprimiert. (Abb. 14) Ungeachtet dessen lag Prx3 vermehrt in der oxidierten, dimeren Form vor. (Abb. 12)

Andere Arbeitsgruppen demonstrierten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Grx2-Expression und oxidativem Stress. So konnte gezeigt werden, dass Grx2-Knockout Mauslinsenepithelzellen anfälliger gegenüber oxidativem Stress sind.²⁷⁷ Ebenso waren HLE-B3-Zellen mit einer Grx2-Überexpression resistenter gegenüber H₂O₂-induziertem oxidativen Stress. Als protektiver Mechanismus wurde die Protektion des mitochondrialen Komplex I postuliert, der auch durch Peroxynitrit inaktiviert werden kann.^{247, 248, 278} Anhand dieser Beobachtungen ist davon auszugehen, dass das Grx-System den Ausfall der Trxr2 zu einem gewissen Grad kompensieren kann, jedoch nicht ausreichend, um Prx3 auf basalen Leveln zu halten. Prx5, ebenfalls eine Peroxynitritreduktase mit teilweiser mitochondrialer Lokalisation, konnte nicht

vermehrt exprimiert nachgewiesen werden.¹⁴⁴ Andere Autoren berichteten von einer Prx5-Hochregulation unter mitochondrialer Dysfunktion, allerdings wurden hier K562-Leukämiezellen untersucht, die andere zelluläre Eigenschaften aufweisen.²⁷⁹ Dies könnte daran liegen, dass Prx5 nicht exklusiv mitochondrial exprimiert wird, sondern auch in Peroxisomen und im Zytosol vorkommt.²⁸⁰ Ebenso ist erwähnenswert, dass die Disulfide, die bei der Oxidation von Prx5 entstehen, nur durch Thioredoxine reduziert werden können und nicht durch Grx oder Gluthation.^{144, 280-282} Da es wenig reduziertes mitochondriales Trx2 gibt, kann demnach auch Prx5 nicht reduziert werden und stellt vermutlich kein suffizientes alternatives antioxidatives System dar.

Mittels spezifischer Antikörper wurde ergänzend der Grad der Hyperoxidierung von Prx3 untersucht. Während des katalytischen Zyklus von Prx modifizieren Oxidantien, wie beispielsweise Peroxynitrit, die Thiolgruppe und es entsteht eine Sulfensäure (Prx-SOH). Eukaryotische Peroxiredoxine haben spezielle, C-terminale Struktur motive (GGLG und YF), die eine Disulfidentstehung verhindern.^{283, 284} Normalerweise würde Prx an dieser Stelle mittels Trx wieder reduziert werden.²⁸⁵ Liegen nun sehr hohe Peroxidkonzentrationen vor oder ist der Trx-Pool oxidiert, kann nun ein weiteres Peroxid Prx weiter oxidieren. So entsteht aus der Sulfensäure eine Sulfinsäure (Prx-SO₂H)^{286, 287} Hyperoxidiertes Prx ist nicht mehr in der Lage, Peroxide zu reduzieren. Diese Reaktion ist jedoch reversibel.^{286, 288} Das hierfür verantwortliche Enzym ist Sulfiredoxin. Diese Peroxiredoxinreduktase kann mittels ATP und Elektronen von Gluthation oder Thioredoxin Peroxiredoxin wiederherstellen.²⁸⁹ (Vgl. Abb. 15) Hyperoxidiertes Peroxiredoxin hat mehrere Funktionen. Eine wichtige Funktion ist, dass durch die Hyperoxidierung Thioredoxin als reduzierendes Substrat geschont werden kann und somit in Situationen mit hohem oxidativem Stress wichtigere Substrate reduziert werden können. Zellen zeigten so ein besseres Überleben bei hohen Peroxidleveln^{290, 291} Weiterhin haben hyperoxidierte Peroxiredoxine eine wichtige Funktion als Chaperone: so werden Proteine bezeichnet, die andere Proteine daran hindern, zu aggregieren und sich falsch zu falten.²⁹² Im Falle einer Hyperoxidierung können Peroxiredoxine weiter aggregieren und können somit als Chaperone agieren^{293, 294} Letztlich stellen hyperoxidierte Peroxiredoxine sehr genaue Peroxid-Messfühler dar, die Zellen auf eine Störung im Redoxsystem hinweisen können. So wird beispielsweise der Zellreplikationszyklus von Maus C10 Lungenepithelzellen bei hohen Konzentrationen von hyperoxidiertem Prx unterbrochen.²⁹⁵

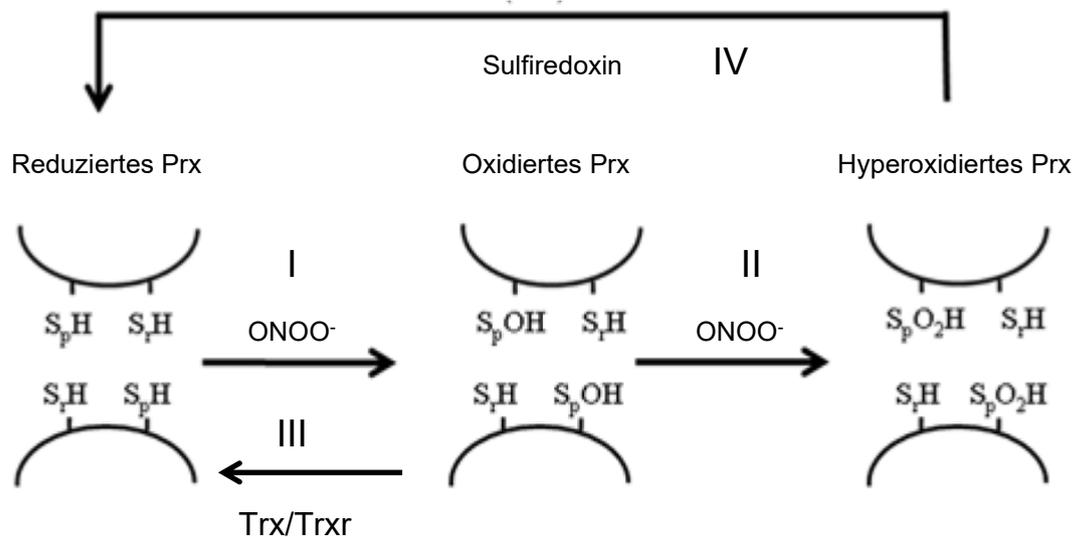


Abbildung 15: Mechanismus der Peroxiredoxinhyperoxidation

I: Reduzierte (peroxidatische) Cysteinreste (S_pH) von Peroxiredoxin (hier jeweils zwei Moleküle) reagieren mit Peroxynitrit und bilden eine Sulfensäure (S_pOH). II: Weitere Oxidation der Sulfensäure führt zu Bildung einer Sulfinsäure. III: Überführen von oxidiertem Prx in den Ausgangszustand mittels Trx/Trxr-System. IV: Sulfiredoxin kann hyperoxidiertes Prx wieder reduzieren.²⁹⁶

In dieser Arbeit konnte in TrxR2 Knockout-eEPCs sowohl vermehrt oxidiertes Prx3 als auch vermehrt hyperoxidiertes Prx3 gemessen werden. (Abb.12/13) Ursächlich hierfür ist die Abwesenheit von reduziertem Trx2 aufgrund der deletierten TrxR2. Normalerweise kann Prx3 auch von Grx2 reduziert werden.¹⁴⁶ Im vorliegenden Fall kann jedoch davon ausgegangen werden, dass so hohe Peroxynitritspiegel vorliegen, dass das Grx2-System trotz vermehrter Expression übersättigt ist und keine suffiziente Reduktion von Prx3 gewährleisten kann. Somit werden die schädlichen Effekte von Peroxynitrit nur mäßig abgemindert und der beobachtete Phänotyp kann auftreten. Weiterhin zeigen die vorliegenden Daten, wie essenziell das Trx2/TrxR2-System für die Eliminierung von Peroxynitrit ist.

7.9. Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde ein endothelzellspezifischer Thioredoxinreduktase 2 Knockout im Mausmodell untersucht. TrxR2 ist ein wichtiges Enzym zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Redoxhomöostase.²⁹⁷ Der Fokus dieser Arbeit lag auf der genaueren Charakterisierung der Funktion der endothelialen Thioredoxinreduktase 2. Weiterhin war die mechanistische Aufschlüsselung des beobachteten Phänotyps von Interesse. Anhand der vorliegenden Daten konnte demonstriert werden, wie wichtig das Trx2/TrxR2-System für die Eliminierung von Peroxynitrit ist. Durch den Knockout von TrxR2 konnte vermehrt Peroxynitrit sowohl *in vitro* in eEPCs als auch *ex vivo* in isolierten

Mesenterialarterien und Lungenendothelzellen gemessen werden. Weiterhin konnte die Produktion größtenteils in die Mitochondrien lokalisiert werden. Ferner konnte ebenso gezeigt werden, dass andere mitochondriale Redoxproteine wie Grx2 und Prx3 vermehrt exprimiert wurden bzw. in oxidiert Form vorlagen. Dessen ungeachtet zeigte sich die endotheliale Funktion, die mittels flussinduzierter Dilatation abgeschätzt wurde, zumindest in Femoralarterien nicht eingeschränkt. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern erste Anhaltspunkte, inwiefern der beobachtete Phänotyp zustande kommt, jedoch lassen sich die Beobachtungen im Mausmodell nicht vollständig mit den vorliegenden Daten erklären.

Abschließend muss erwähnt werden, dass sich die hier gewonnenen Erkenntnisse nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen lassen: eine homozygote TXNRD2-Mutation führt beim Menschen zu einem anderen Phänotyp. Hierbei entsteht eine familiäre Glucocorticoiddefizienz. Hier wurde jedoch ein sehr kleines konsanguines Patientenkollektiv untersucht und es liegen keine mechanistischen Erkenntnisse vor.²⁹⁸ Für die vollständige Charakterisierung der Aufgaben und Funktionen der humanen TrxR2 wird weitere Forschung benötigt werden. Das Trxrd2^{iECKO}-Mausmodell lieferte hierzu jedoch bereits wegweisende Grundlagen.

8. Zusammenfassung

Das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System (Trx/TrxR) ist ein wichtiger Regulator des Redox-Gleichgewichts, sowie ein Taktgeber der zellulären und genetischen Antwort auf oxidativen Stress. Die mitochondrialen Isoformen, Trx2 und TrxR2 steuern diese Prozesse im Mitochondrium, einem Zellorganell, in dem aufgrund der oxidativen Phosphorylierung besonders viele Radikale entstehen, sodass eine präzise Regulation unabdingbar ist.

Von unserer Arbeitsgruppe wurde eine induzierbare, endothelzellspezifische TrxR2-Knockoutmaus entwickelt, um die Rolle der TrxR2 besser zu verstehen. Diese Maus zeigt einen prothrombotischen, proinflammatorischen Phänotyp, sowie eine endotheliale Dysfunktion. Weiterhin zeigten TrxR2-depletierte endotheliale Progenitorzellen eine vermehrte Radikalbildung. Ziel dieser Arbeit war es, den beobachteten Phänotyp mechanistisch aufzuschlüsseln.

Mittels einer Fluoreszein-Boronat basierten Sonde, die spezifisch Peroxynitrit misst, konnte *in vitro* an isolierten pulmonalen Endothelzellen, sowie *ex vivo* an Mesenterialarterien, eine gesteigerte Peroxynitritproduktion nachgewiesen werden. Mittels LNA, einem Inhibitor der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase, und Spermin-NONOate, einem •NO-Donor, konnte die •NO-Dependenz der Peroxynitritproduktion nachgewiesen werden. Ferner konnte mit MitoPY1, einem mitochondrialen Farbstoff, die Produktion in die Mitochondrien verortet werden. Mit Westernblotting konnte weiterhin eine vermehrte Expression von Glutaredoxin 2 sowie von hyperoxidiertem Peroxiredoxin 5 nachgewiesen werden.

Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass ein Knockout der endothelialen, mitochondrialen Thioredoxinreduktase, eine vermehrte mitochondriale Peroxynitritproduktion zur Folge hat. Weiterhin zeigte sich die Expression anderer antioxidativer Proteine verändert. Peroxynitrit hat als starkes Oxidans diverse schädliche Effekte. Ferner können durch hohe Peroxynitritspiegel thrombotische und inflammatorische Prozesse begünstigt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis des Phänotyps der Trxrd2^{iECKO}-Maus bei. Zusätzlich können Rückschlüsse auf Zustände, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen, wie beispielsweise Arteriosklerose, gezogen werden und die Rolle der TrxR2 bei der Entstehung derartiger Pathologien.

9. Literaturverzeichnis

1. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1987;84(24):9265-9. doi:10.1073/pnas.84.24.9265
2. Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:339-59. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.339
3. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. Aug 15 1993;268(23):17478-88.
4. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, et al. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem*. Dec 30 1994;269(52):33082-90.
5. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. Mar 4 1994;269(9):6765-72.
6. Marsden PA, Heng HH, Duff CL, Shi XM, Tsui LC, Hall AV. Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics*. Jan 1 1994;19(1):183-5. doi:10.1006/geno.1994.1039
7. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. Apr 4 2006;113(13):1708-14. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532
8. Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, et al. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol*. Sep 2011;210(3):271-84. doi:10.1530/JOE-11-0083
9. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. Jun 15 1993;268(17):12231-4.
10. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:707-36. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.003423
11. Gross SS, Jones CL, Hattori Y, Raman CS. Tetrahydrobiopterin. *Nitric Oxide*. Academic Press; 2000:167-185:chap 10.
12. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 5 1999;263(3):681-4. doi:10.1006/bbrc.1999.1422
13. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for

- uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* Jun 20 2003;278(25):22546-54. doi:10.1074/jbc.M302227200
14. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 4 1998;95(16):9220-5. doi:10.1073/pnas.95.16.9220
15. Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U, Murad F. Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium.* Jun-Jul 1992;13(6-7):427-34. doi:10.1016/0143-4160(92)90055-w
16. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1 1991;88(17):7773-7. doi:10.1073/pnas.88.17.7773
17. Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem.* Aug 27 2004;279(35):36167-70. doi:10.1074/jbc.R400017200
18. Tuma RF, Duran WN, Ley K. *Microcirculation.* Elsevier Science; 2011.
19. Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res.* Apr 6 1998;82(6):686-95. doi:10.1161/01.res.82.6.686
20. De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monit.* Apr 2009;15(4):RA91-101.
21. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Sep 2007;34(9):906-11. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04638.x
22. Chen CA, Wang TY, Varadharaj S, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature.* Dec 23 2010;468(7327):1115-8. doi:10.1038/nature09599
23. Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic Regulation of Vascular Endothelial Gene Expression. *Circulation Research.* 2008;102(8):873-887. doi:doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.171025
24. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* Apr 2012;33(7):829-37, 837a-837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
25. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* Oct 2015;129(2):83-94. doi:10.1016/j.jphs.2015.09.002
26. Malinski T, Taha Z, Grunfeld S, Patton S, Kapturczak M, Tomboulion P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 30 1993;193(3):1076-82. doi:10.1006/bbrc.1993.1735

27. Martin E, Berka V, Tsai AL, Murad F. Soluble Guanylyl Cyclase: The Nitric Oxide Receptor. *Nitric Oxide, Part E*. 2005;478-492. *Methods in Enzymology*.
28. Zhou XB, Arntz C, Kamm S, et al. A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem*. Nov 16 2001;276(46):43239-45. doi:10.1074/jbc.M104202200
29. Raeymaekers L, Hofmann F, Casteels R. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J*. May 15 1988;252(1):269-73. doi:10.1042/bj2520269
30. Johnson LR. *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press; 1987.
31. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. Nov 17 1994;372(6503):231-6. doi:10.1038/372231a0
32. Hartshorne DJ, Ito M, Erdođi F. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*. 1998/05/01 1998;19(4):325. doi:10.1023/A:1005385302064
33. Kitazawa T, Semba S, Huh YH, Kitazawa K, Eto M. Nitric oxide-induced biphasic mechanism of vascular relaxation via dephosphorylation of CPI-17 and MYPT1. *The Journal of Physiology*. 2009;587(14):3587-3603. doi:https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172189
34. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. Dec 2003;27(1-4):201-6. doi:10.1152/advan.00025.2003
35. Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human Arterial and Venous Tissues Generate Prostacyclin (Prostaglandin X), a Potent Inhibitor of Platelet Aggregation. *The Lancet*. 1977;309(8001):18-21. doi:10.1016/s0140-6736(77)91655-5
36. Gayle RB, 3rd, Maliszewski CR, Gimpel SD, et al. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J Clin Invest*. May 1 1998;101(9):1851-9. doi:10.1172/JCI11753
37. Wang GR, Zhu Y, Halushka PV, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 28 1998;95(9):4888-93. doi:10.1073/pnas.95.9.4888
38. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 1 1991;88(11):4651-5. doi:10.1073/pnas.88.11.4651
39. Arndt H, Smith CW, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension*. May 1993;21(5):667-73. doi:10.1161/01.hyp.21.5.667
40. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovascular Research*. 1996;32(4):743-751. doi:10.1016/s0008-6363(96)00073-9

41. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide*. Dec 2006;15(4):265-79. doi:10.1016/j.niox.2006.03.011
42. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*. Nov 1994;267(5 Pt 1):C1405-13. doi:10.1152/ajpcell.1994.267.5.C1405
43. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. Oct 2001;2(10):907-16. doi:10.1038/ni1001-907
44. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*. 2001;64(1):51-68. doi:10.1016/s0301-0082(00)00044-7
45. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*. Apr 2000;28(4 Suppl):N37-52. doi:10.1097/00003246-200004001-00005
46. Gross SS, Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 31 1999;96(18):9967-9. doi:10.1073/pnas.96.18.9967
47. Eich RF, Li T, Lemon DD, et al. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*. Jun 4 1996;35(22):6976-83. doi:10.1021/bi960442g
48. Pawloski JR, Stamler JS. Nitric oxide in RBCs. *Transfusion*. Dec 2002;42(12):1603-9. doi:10.1046/j.1537-2995.2002.00278.x
49. Ford PC, Lorkovic IM. Mechanistic Aspects of the Reactions of Nitric Oxide with Transition-Metal Complexes. *Chemical Reviews*. 2002;102(4):993-1018. doi:10.1021/cr0000271
50. Kovacs I, Lindermayr C. Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Front Plant Sci*. 2013;4:137. doi:10.3389/fpls.2013.00137
51. Kirsch M, Korth HG, Sustmann R, de Groot H. The pathobiochemistry of nitrogen dioxide. *Biol Chem*. Mar-Apr 2002;383(3-4):389-99. doi:10.1515/BC.2002.043
52. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. Nov 1992;59(5):1609-23. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x
53. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. Nov 1 1992;298(2):446-51. doi:10.1016/0003-9861(92)90433-w
54. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. Nov 1996;271(5 Pt 1):C1424-37. doi:10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424

55. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 2010;47:53-67. doi:10.1042/bse0470053
56. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* Jan 15 2002;397(2):342-4. doi:10.1006/abbi.2001.2642
57. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J.* Jan 15 2001;353(Pt 2):411-6. doi:10.1042/0264-6021:3530411
58. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem.* Oct 2 1998;273(40):25804-8. doi:10.1074/jbc.273.40.25804
59. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol.* Nov 1982;60(11):1346-52. doi:10.1139/y82-201
60. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
61. Uppu RM, Squadrito GL, Pryor WA. Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys.* Mar 15 1996;327(2):335-43. doi:10.1006/abbi.1996.0131
62. Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 1999;424(1-2):37-49. doi:10.1016/s0027-5107(99)00006-8
63. Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J.* Feb 15 1997;322 (Pt 1):167-73. doi:10.1042/bj3220167
64. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1991;288(2):481-487. doi:10.1016/0003-9861(91)90224-7
65. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* Jul-Aug 1996;9(5):836-44. doi:10.1021/tx9501445
66. Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* Aug 2000;267(16):4928-44. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01601.x
67. Kroncke KD. Nitrosative stress and transcription. *Biol Chem.* Oct-Nov 2003;384(10-11):1365-77. doi:10.1515/BC.2003.153
68. Liaudet L, Vassalli G, Pacher P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front Biosci (Landmark Ed).* Jan 1 2009;14:4809-14. doi:10.2741/3569

69. Benhar M. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018/11/01/ 2018;127:160-164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.028>
70. Diers AR, Broniowska KA, Hogg N. Nitrosative stress and redox-cycling agents synergize to cause mitochondrial dysfunction and cell death in endothelial cells. *Redox Biol*. 2012;1:1-7. doi:10.1016/j.redox.2012.11.003
71. Aicardo A, Martinez DM, Campolo N, Bartesaghi S, Radi R. Biochemistry of Nitric Oxide and Peroxynitrite: Sources, Targets and Biological Implications. *Biochemistry of Oxidative Stress*. 2016:49-77:chap Chapter 5.
72. Mironczuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*. Mar 2018;63(1):68-78. doi:10.1016/j.advms.2017.05.005
73. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*. Jul 1 2007;43(1):4-15. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024
74. Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM. The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*. 1986;2(2):419-444. doi:10.1016/s8755-9668(86)80021-7
75. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*. 2003;24(6):345-351. doi:10.1016/s0098-2997(03)00030-x
76. Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*. Jun 2007;7 Suppl:S41-50. doi:10.1016/j.mito.2007.02.006
77. Simic MG, Jovanovic SV. Antioxidation mechanisms of uric acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1989;111(15):5778-5782. doi:10.1021/ja00197a042
78. Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2001;10(4):141-152. doi:10.1016/s1382-6689(01)00077-1
79. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*. Nov 1999;27(9-10):922-35. doi:10.1016/s0891-5849(99)00176-8
80. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med*. Feb-Apr 2009;30(1-2):29-41. doi:10.1016/j.mam.2008.08.003
81. Pallardo FV, Markovic J, Garcia JL, Vina J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol Aspects Med*. Feb-Apr 2009;30(1-2):77-85. doi:10.1016/j.mam.2009.01.001
82. Klotz L-O, Sies H. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicology Letters*. 2003;140-141:125-132. doi:10.1016/s0378-4274(02)00511-8

83. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem*. Jul 25 1975;250(14):5475-80.
84. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2019;54(4):287-293. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001
85. Aebi H, Wyss SR, Scherz B, Skvaril F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. Bookchapter. *Eur J Biochem*. Oct 1 1974;48(1):137-45. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03751.x
86. Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*. Oct 2010;1(10):888-97. doi:10.1007/s13238-010-0113-z
87. Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem*. Jun 1 1983;133(1):51-69. doi:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07429.x
88. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. Oct 1 2011;15(7):1957-97. doi:10.1089/ars.2010.3586
89. Miranda-Vizueté A, Ljung J, Damdimopoulos AE, et al. Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J Biol Chem*. Aug 24 2001;276(34):31567-74. doi:10.1074/jbc.M101760200
90. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*. Jan 2014;66:75-87. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036
91. Karlenius TC, Tonissen KF. Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation. *Cancers (Basel)*. Mar 25 2010;2(2):209-32. doi:10.3390/cancers2020209
92. Rhee SG, Kil IS. Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins. *Annu Rev Biochem*. Jun 20 2017;86:749-775. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014431
93. Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 1 1994;91(5):1672-6. doi:10.1073/pnas.91.5.1672
94. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*. May 1 1998;17(9):2596-606. doi:10.1093/emboj/17.9.2596
95. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. Oct 2000;267(20):6102-9. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x

96. Hill KE, McCollum GW, Boeglin ME, Burk RF. Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. May 19 1997;234(2):293-5. doi:10.1006/bbrc.1997.6618
97. Cheng Q, Sandalova T, Lindqvist Y, Arner ES. Crystal structure and catalysis of the selenoprotein thioredoxin reductase 1. *J Biol Chem*. Feb 6 2009;284(6):3998-4008. doi:10.1074/jbc.M807068200
98. Tamura T, Stadtman TC. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 6 1996;93(3):1006-11. doi:10.1073/pnas.93.3.1006
99. Miranda-Vizueté A, Damdimopoulos AE, Pedrajas JR, Gustafsson JA, Spyrou G. Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem*. Apr 1999;261(2):405-12. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00286.x
100. Miranda-Vizueté A, Sadek CM, Jimenez A, Krause WJ, Sutovsky P, Oko R. The mammalian testis-specific thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal*. Feb 2004;6(1):25-40. doi:10.1089/152308604771978327
101. J Lundström AH. Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J Biol Chem*. 1990;Vol. 265, No. 16,(Issue of June 5,):pp. 9114-9120,1.
102. May JM, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J Biol Chem*. Sep 5 1997;272(36):22607-10. doi:10.1074/jbc.272.36.22607
103. Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, et al. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol*. Nov 2004;24(21):9414-23. doi:10.1128/MCB.24.21.9414-9423.2004
104. Kiermayer C, Northrup E, Schrewe A, et al. Heart-Specific Knockout of the Mitochondrial Thioredoxin Reductase (Txnrd2) Induces Metabolic and Contractile Dysfunction in the Aging Myocardium. *J Am Heart Assoc*. Jul 21 2015;4(7)doi:10.1161/JAHA.115.002153
105. Nonn L, Williams RR, Erickson RP, Powis G. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol*. Feb 2003;23(3):916-22. doi:10.1128/MCB.23.3.916-922.2003
106. Nalvarte I, Damdimopoulos AE, Nystom C, et al. Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells. Effect on cell growth and differentiation. *J Biol Chem*. Dec 24 2004;279(52):54510-7. doi:10.1074/jbc.M408494200
107. Sroka J, Antosik A, Czyż J, et al. Overexpression of thioredoxin reductase 1 inhibits migration of HEK-293 cells. *Biology of the Cell*. 2007;99(12):677-687. doi:https://doi.org/10.1042/BC20070024

108. Chang EY, Son SK, Ko HS, Baek SH, Kim JH, Kim JR. Induction of apoptosis by the overexpression of an alternative splicing variant of mitochondrial thioredoxin reductase. *Free Radic Biol Med*. Dec 15 2005;39(12):1666-75. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.008
109. Arner ES. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta*. Jun 2009;1790(6):495-526. doi:10.1016/j.bbagen.2009.01.014
110. Patenaude A, Ven Murthy MR, Mirault ME. Mitochondrial thioredoxin system: effects of TrxR2 overexpression on redox balance, cell growth, and apoptosis. *J Biol Chem*. Jun 25 2004;279(26):27302-14. doi:10.1074/jbc.M402496200
111. Di Marzo N, Chisci E, Giovannoni R. The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells*. Oct 4 2018;7(10)doi:10.3390/cells7100156
112. Pickering AM, Lehr M, Gendron CM, Pletcher SD, Miller RA. Mitochondrial thioredoxin reductase 2 is elevated in long-lived primate as well as rodent species and extends fly mean lifespan. *Aging Cell*. Aug 2017;16(4):683-692. doi:10.1111/acer.12596
113. Woo M, Hakem R, Soengas MS, et al. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev*. Mar 15 1998;12(6):806-19. doi:10.1101/gad.12.6.806
114. Wettschureck N, Rütten H, Zywiets A, et al. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpa11 in cardiomyocytes. *Nat Med*. Nov 2001;7(11):1236-40. doi:10.1038/nm1101-1236
115. Kirsch J, Schneider H, Pagel JI, et al. Endothelial Dysfunction, and A Prothrombotic, Proinflammatory Phenotype Is Caused by Loss of Mitochondrial Thioredoxin Reductase in Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Sep 2016;36(9):1891-9. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307843
116. Hoess RH, Abremski K. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of Molecular Biology*. 1985;181(3):351-362. doi:10.1016/0022-2836(85)90224-4
117. Feil S, Valtcheva N, Feil R. Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol*. 2009;530:343-63. doi:10.1007/978-1-59745-471-1_18
118. Miranda-Vizueté A, Spyrou G. Genomic organization and identification of a novel alternative splicing variant of mouse mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR2) gene. *Mol Cells*. Jun 30 2002;13(3):488-92.
119. Zhong L, Holmgren A. Essential Role of Selenium in the Catalytic Activities of Mammalian Thioredoxin Reductase Revealed by Characterization of Recombinant Enzymes with Selenocysteine Mutations *. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(24):18121-18128. doi:10.1074/jbc.M000690200
120. Singer M. Endothelzell-spezifische Deletion der mitochondrialen

- Thioredoxin Reduktase führt zu renalen Pathologien, vaskulärem Remodelling und Hypertonie. Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU München; 2019.
121. Sorensen I, Adams RH, Gossler A. DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood*. May 28 2009;113(22):5680-8. doi:10.1182/blood-2008-08-174508
122. Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, et al. VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn*. Mar 2006;235(3):759-67. doi:10.1002/dvdy.20643
123. Markos F, Ruane O'Hora T, Noble MI. What is the mechanism of flow-mediated arterial dilatation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Aug 2013;40(8):489-94. doi:10.1111/1440-1681.12120
124. Bolz SS, de Wit C, Pohl U. Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca²⁺ during acetylcholine-induced dilation of microvessels. *Br J Pharmacol*. Sep 1999;128(1):124-34. doi:10.1038/sj.bjp.0702775
125. Kirsch J. Endothelial cell-specific deletion of the mitochondrial thioredoxin reductase impairs vascular remodelling. *Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät*. 2014;doi:10.5282/edoc.18304
126. Rios N, Piacenza L, Trujillo M, et al. Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluorescein-boronate. *Free Radic Biol Med*. Dec 2016;101:284-295. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.033
127. Dickinson BC, Huynh C, Chang CJ. A Palette of Fluorescent Probes with Varying Emission Colors for Imaging Hydrogen Peroxide Signaling in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2010/04/28 2010;132(16):5906-5915. doi:10.1021/ja1014103
128. McHedlov-Petrossyan NO, Cheipesh TA, Shekhovtsov SV, et al. Ionization and tautomerism of methyl fluorescein and related dyes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015/11/05/ 2015;150:151-161. doi:https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.05.037
129. Łuszczki JJ, Jaskólska A, Dworzański W, Zólkowska D. 7-Nitroindazole, but not NG-nitro-L-arginine, enhances the anticonvulsant activity of pregabalin in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. *Pharmacol Rep*. 2011;63(1):169-75. doi:10.1016/s1734-1140(11)70412-1
130. Talarek S, Listos J, Fidecka S. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on benzodiazepine withdrawal in mice and rats. *Pharmacological Reports*. 2011/05/01 2011;63(3):680-689. doi:10.1016/S1734-1140(11)70579-5
131. Kopincová J, Púzserová A, Bernátová I. L-NAME in the cardiovascular system — nitric oxide synthase activator? *Pharmacological Reports*. 2012/05/01 2012;64(3):511-520. doi:10.1016/S1734-1140(12)70846-0

132. Hrabie JA, Klose JR, Wink DA, Keefer LK. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *The Journal of Organic Chemistry*. 1993/03/01 1993;58(6):1472-1476. doi:10.1021/jo00058a030
133. Pfeiffer S, Mayer B. Lack of Tyrosine Nitration by Peroxynitrite Generated at Physiological pH *. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(42):27280-27285. doi:10.1074/jbc.273.42.27280
134. Dickinson BC, Chang CJ. A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living cells. *J Am Chem Soc*. Jul 30 2008;130(30):9638-9. doi:10.1021/ja802355u
135. Sikora A, Zielonka J, Lopez M, Joseph J, Kalyanaraman B. Direct oxidation of boronates by peroxynitrite: mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*. Nov 15 2009;47(10):1401-7. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.006
136. Zielonka J, Sikora A, Joseph J, Kalyanaraman B. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *J Biol Chem*. May 7 2010;285(19):14210-6. doi:10.1074/jbc.M110.110080
137. Murphy MP, Smith RA. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:629-56. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105110
138. Dickinson BC, Lin VS, Chang CJ. Preparation and use of MitoPY1 for imaging hydrogen peroxide in mitochondria of live cells. *Nature Protocols*. 2013/06/01 2013;8(6):1249-1259. doi:10.1038/nprot.2013.064
139. Mesapogu S, Jillepalli CM, Arora DK. Agarose Gel Electrophoresis and Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Methods and Principles. *Analyzing Microbes*. 2013:73-91:chap Chapter 5. *Springer Protocols Handbooks*.
140. Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. Measuring the Redox State of Cellular Peroxiredoxins by Immunoblotting. *Thiol Redox Transitions in Cell Signaling, Part B: Cellular Localization and Signaling*. 2010:51-66. *Methods in Enzymology*.
141. Poynton RA, Hampton MB. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. Feb 2014;1840(2):906-12. doi:10.1016/j.bbagen.2013.08.001
142. Prolo C, Rios N, Piacenza L, Alvarez MN, Radi R. Fluorescence and chemiluminescence approaches for peroxynitrite detection. Research Support, Non-U.S. Gov't
- Review. *Free radical biology & medicine*. Nov 20 2018;128:59-68. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.017
143. Alvarez MN, Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. *Methods in enzymology*. 2002;359:353-66. doi:10.1016/s0076-6879(02)59198-9

144. Dubuisson M, Vander Stricht D, Clippe A, et al. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett*. Jul 30 2004;571(1-3):161-5. doi:10.1016/j.febslet.2004.06.080

145. Zhang H, Go YM, Jones DP. Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. Sep 1 2007;465(1):119-26. doi:10.1016/j.abb.2007.05.001

146. Hanschmann EM, Lonn ME, Schutte LD, et al. Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3. *J Biol Chem*. Dec 24 2010;285(52):40699-705. doi:10.1074/jbc.M110.185827

147. Peskin AV, Dickerhof N, Poynton RA, et al. Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J Biol Chem*. May 17 2013;288(20):14170-14177. doi:10.1074/jbc.M113.460881

148. Lillig CH, Berndt C, Vergnolle O, et al. Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 7 2005;102(23):8168-73. doi:10.1073/pnas.0500735102

149. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*. Jul 2019;25:101084. doi:10.1016/j.redox.2018.101084

150. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. Sep 18 2017;19(11):42. doi:10.1007/s11883-017-0678-6

151. Zhang J, Wang X, Vikash V, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4350965. doi:10.1155/2016/4350965

152. Mittler R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci*. Jan 2017;22(1):11-19. doi:10.1016/j.tplants.2016.08.002

153. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. Mar 15 2010;48(6):749-62. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022

154. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta*. May-Jun 2006;1757(5-6):509-17. doi:10.1016/j.bbabi.2006.04.029

155. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. Jul 2014;94(3):909-50. doi:10.1152/physrev.00026.2013

156. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*. Jul 1 1994;265(5168):103-6. doi:10.1126/science.8016642
157. Austin CP, Batten JF, Bradley A, et al. The knockout mouse project. *Nat Genet*. Sep 2004;36(9):921-4. doi:10.1038/ng0904-921
158. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. Jun 15 2004;109(23 Suppl 1):III27-32. doi:10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8
159. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. Nov 7 2016;37(42):3232-3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334
160. Pugach EK, Richmond PA, Azofeifa JG, Dowell RD, Leinwand LA. Prolonged Cre expression driven by the α -myosin heavy chain promoter can be cardiotoxic. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015/09/01/2015;86:54-61. doi:https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.06.019
161. Thyagarajan B, Guimarães MJ, Groth AC, Calos MP. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene*. 2000/02/22/2000;244(1):47-54. doi:https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00008-1
162. Semprini S, Troup TJ, Kotelevtseva N, et al. Cryptic loxP sites in mammalian genomes: genome-wide distribution and relevance for the efficiency of BAC/PAC recombineering techniques. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(5):1402-1410. doi:10.1093/nar/gkl1108
163. Heffner CS, Herbert Pratt C, Babiuk RP, et al. Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. *Nat Commun*. 2012;3:1218. doi:10.1038/ncomms2186
164. Papathanou M, Dumas S, Pettersson H, Olson L, Wallen-Mackenzie A. Off-Target Effects in Transgenic Mice: Characterization of Dopamine Transporter (DAT)-Cre Transgenic Mouse Lines Exposes Multiple Non-Dopaminergic Neuronal Clusters Available for Selective Targeting within Limbic Neurocircuitry. *eNeuro*. Sep/Oct 2019;6(5)doi:10.1523/ENEURO.0198-19.2019
165. Becher B, Waisman A, Lu LF. Conditional Gene-Targeting in Mice: Problems and Solutions. *Immunity*. May 15 2018;48(5):835-836. doi:10.1016/j.immuni.2018.05.002
166. Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(16):9209-9214. doi:10.1073/pnas.161269798
167. Forni PE, Scuoppo C, Imayoshi I, et al. High Levels of Cre Expression in Neuronal Progenitors Cause Defects in Brain Development Leading to Microencephaly and Hydrocephaly. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(37):9593-9602. doi:10.1523/jneurosci.2815-06.2006

168. Bersell K, Choudhury S, Mollova M, et al. Moderate and high amounts of tamoxifen in α MHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death. *Disease Models & Mechanisms*. 2013;6(6):1459-1469. doi:10.1242/dmm.010447
169. Li Y, Choi PS, Casey SC, Felsher DW. Activation of Cre Recombinase Alone Can Induce Complete Tumor Regression. *PLOS ONE*. 2014;9(9):e107589. doi:10.1371/journal.pone.0107589
170. Westhoff J, Weismüller K, Koch C, Mann V, Weigand MA, Henrich M. Vasomotion of mice mesenteric arteries during low oxygen levels. *European Journal of Medical Research*. 2018/08/25 2018;23(1):38. doi:10.1186/s40001-018-0335-8
171. Wenceslau CF, McCarthy CG, Earley S, et al. Guidelines for the measurement of vascular function and structure in isolated arteries and veins. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2021/07/01 2021;321(1):H77-H111. doi:10.1152/ajpheart.01021.2020
172. Ko EA, Song MY, Donthamsetty R, Makino A, Yuan JXJ. Tension measurement in isolated rat and mouse pulmonary artery. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2010/09/01/ 2010;7(3):123-130. doi:https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2011.04.001
173. Hakim MA, Behringer EJ. Simultaneous Measurements of Intracellular Calcium and Membrane Potential in Freshly Isolated and Intact Mouse Cerebral Endothelium. *J Vis Exp*. Jan 20 2019;(143)doi:10.3791/58832
174. O'Connell KA, Edidin M. A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells. *The Journal of Immunology*. 1990;144(2):521-525.
175. Sahagun G, Moore SA, Fabry Z, Schelper RL, Hart MN. Purification of murine endothelial cell cultures by flow cytometry using fluorescein-labeled griffonia simplicifolia agglutinin. *Am J Pathol*. Jun 1989;134(6):1227-32.
176. Garlanda C, Parravicini C, Sironi M, et al. Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(15):7291-7295. doi:10.1073/pnas.91.15.7291
177. Loiola RA, Torres TC, Aburaya CM, et al. Generation and characterization of a spontaneously immortalized endothelial cell line from mice microcirculation. *Experimental Cell Research*. 2013/05/01/ 2013;319(8):1102-1110. doi:https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.01.022
178. Dong QG, Bernasconi S, Lostaglio S, et al. A General Strategy for Isolation of Endothelial Cells From Murine Tissues. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17(8):1599-1604. doi:doi:10.1161/01.ATV.17.8.1599

179. Neurauder AA, Bonyhadi M, Lien E, et al. Cell Isolation and Expansion Using Dynabeads®. In: Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B, eds. *Cell Separation: Fundamentals, Analytical and Preparative Methods*. Springer Berlin Heidelberg; 2007:41-73.
180. Adipose Tissue Progenitor Cells Directly Interact with Endothelial Cells to Induce Vascular Network Formation. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16(9):2953-2966. doi:10.1089/ten.tea.2009.0635
181. Denk W, Strickler J, Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990;248(4951):73-76. doi:10.1126/science.2321027
182. Göppert-Mayer M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*. 1931;401(3):273-294. doi:https://doi.org/10.1002/andp.19314010303
183. Oheim M, Beaurepaire E, Chaigneau E, Mertz J, Charpak S. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *J Neurosci Methods*. Oct 15 2001;111(1):29-37. doi:10.1016/s0165-0270(01)00438-1
184. Yaroslavsky AN, Schulze PC, Yaroslavsky IV, Schober R, Ulrich F, Schwarzmaier HJ. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Physics in Medicine and Biology*. 2002/06/06 2002;47(12):2059-2073. doi:10.1088/0031-9155/47/12/305
185. Centonze VE, White JG. Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging. *Biophysical Journal*. 1998/10/01/ 1998;75(4):2015-2024. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77643-X
186. Demchenko AP. Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection. *Methods Appl Fluoresc*. Feb 20 2020;8(2):022001. doi:10.1088/2050-6120/ab7365
187. Lin VS, Dickinson BC, Chang CJ. Boronate-based fluorescent probes: imaging hydrogen peroxide in living systems. *Methods in enzymology*. 2013;526:19-43. doi:10.1016/B978-0-12-405883-5.00002-8
188. Ye S, Hu JJ, Zhao QA, Yang D. Fluorescent probes for in vitro and in vivo quantification of hydrogen peroxide. 10.1039/D0SC04888G. *Chemical Science*. 2020;11(44):11989-11997. doi:10.1039/D0SC04888G
189. Winterbourn CC. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochim Biophys Acta*. Feb 2014;1840(2):730-8. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.004
190. Chiarugi P, Buricchi F. Protein tyrosine phosphorylation and reversible oxidation: two cross-talking posttranslation modifications. *Antioxid Redox Signal*. Jan 2007;9(1):1-24. doi:10.1089/ars.2007.9.1
191. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*. May 2008;4(5):278-86. doi:10.1038/nchembio.85

192. Gitler C, Zarmi B, Kalef E. General method to identify and enrich vicinal thiol proteins present in intact cells in the oxidized, disulfide state. *Anal Biochem*. Oct 1 1997;252(1):48-55. doi:10.1006/abio.1997.2294
193. Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci*. Aug 2015;40(8):435-45. doi:10.1016/j.tibs.2015.05.001
194. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem*. Sep 13 2013;288(37):26464-72. doi:10.1074/jbc.R113.472936
195. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*. May 2010;459(6):923-39. doi:10.1007/s00424-010-0808-2
196. Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Radi R. Peroxynitrite detoxification and its biologic implications. *Antioxid Redox Signal*. Sep 2008;10(9):1607-20. doi:10.1089/ars.2008.2060
197. Pacher P, Szabó C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6(2):136-141. doi:10.1016/j.coph.2006.01.001
198. Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium*. Mar-Apr 2004;11(2):89-97. doi:10.1080/10623320490482619
199. Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovascular Research*. 1999;44(1):47-59. doi:10.1016/s0008-6363(99)00184-4
200. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Postischemic Myocardium. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2001;3(1):11-22. doi:10.1089/152308601750100443
201. Xiao H, Li Y, Qi J, Wang H, Liu K. Peroxynitrite plays a key role in glomerular lesions in diabetic rats. *J Nephrol*. 2009 Nov-Dec 2009;22(6):800-808.
202. Guven A, Uysal B, Akgul O, et al. Scavenging of Peroxynitrite Reduces Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Renal Failure*. 2008/01/01 2008;30(7):747-754. doi:10.1080/08860220802213039
203. Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H. Clinical Evidence of Peroxynitrite Formation in Chronic Renal Failure Patients with Septic Shock. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997/01/01/ 1997;22(5):771-774. doi:https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00401-7
204. Poole LB. The Catalytic Mechanism of Peroxiredoxins. In: Flohé L, Harris JR, eds. *Peroxiredoxin Systems: Structures and Functions*. Springer Netherlands; 2007:61-81.
205. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell

- signaling. *Free Radic Biol Med*. Jun 15 2005;38(12):1543-52.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026
206. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*. Jan 2003;28(1):32-40.
doi:10.1016/s0968-0004(02)00003-8
207. Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L. Peroxiredoxins. *Biol Chem*. Mar-Apr 2002;383(3-4):347-64. doi:10.1515/bc.2002.040
208. He T, Lu T, d'Uscio LV, Lam C-F, Lee H-C, Katusic ZS. Angiogenic function of prostacyclin biosynthesis in human endothelial progenitor cells. *Circulation research*. 2008;103(1):80-88.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176057
209. Pettipher ER. Prostaglandins. In: Delves PJ, ed. *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*. Elsevier; 1998:2024-2027.
210. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1996/01/05/ 1996;1299(1):125-140.
doi:https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00194-8
211. Busse R, Förstermann U, Matsuda H, Pohl U. The role of prostaglandins in the endothelium-mediated vasodilatory response to hypoxia. *Pflügers Archiv*. 1984/05/01 1984;401(1):77-83. doi:10.1007/BF00581536
212. Zou M, Martin C, Ullrich V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem*. Jul 1997;378(7):707-13. doi:10.1515/bchm.1997.378.7.707
213. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*. 2020;36(2):307-321.
doi:10.1016/j.ccc.2019.12.009
214. Patel KB, Stratford MR, Wardman P, Everett SA. Oxidation of tetrahydrobiopterin by biological radicals and scavenging of the trihydrobiopterin radical by ascorbate. *Free Radic Biol Med*. Feb 1 2002;32(3):203-11.
doi:10.1016/s0891-5849(01)00777-8
215. Zou M-H, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):817-826. doi:10.1172/JC114442
216. Cooke C-LM, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovascular Research*. 2003;60(3):635-642.
doi:10.1016/j.cardiores.2003.08.011
217. Quijano C, Hernandez-Saavedra D, Castro L, McCord JM, Freeman BA, Radi R. Reaction of Peroxynitrite with Mn-Superoxide Dismutase: ROLE OF THE METAL CENTER IN DECOMPOSITION KINETICS AND NITRATION *. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(15):11631-11638.
doi:10.1074/jbc.M009429200

218. Surmeli NB, Litterman NK, Miller AF, Groves JT. Peroxynitrite mediates active site tyrosine nitration in manganese superoxide dismutase. Evidence of a role for the carbonate radical anion. *J Am Chem Soc.* Dec 8 2010;132(48):17174-85. doi:10.1021/ja105684w
219. Demicheli V, Moreno DM, Radi R. Human Mn-superoxide dismutase inactivation by peroxynitrite: a paradigm of metal-catalyzed tyrosine nitration in vitro and in vivo. *Metallomics.* May 23 2018;10(5):679-695. doi:10.1039/c7mt00348j
220. Quint P, Reutzel R, Mikulski R, McKenna R, Silverman DN. Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation. *Free Radic Biol Med.* Feb 1 2006;40(3):453-8. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.045
221. Marla SS, Lee J, Groves JT. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 23 1997;94(26):14243-8. doi:10.1073/pnas.94.26.14243
222. Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998;95(7):3566-3571. doi:10.1073/pnas.95.7.3566
223. Ferrer-Sueta G, Radi R. Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals. *ACS Chemical Biology.* 2009/03/20 2009;4(3):161-177. doi:10.1021/cb800279q
224. Weiss HJ, Turitto VT. Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood.* Feb 1979;53(2):244-50.
225. Ponczek MB. The susceptibility of plasma coagulation factor XI to nitration and peroxynitrite action. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2016/10/01/ 2016;91:589-597. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.076
226. Nowak P, Kołodziejczyk J, Wachowicz B. Peroxynitrite and fibrinolytic system: The effect of peroxynitrite on plasmin activity. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2004/12/01 2004;267(1):141-146. doi:10.1023/B:MCBI.0000049370.23457.10
227. Nowak P, Zbikowska HM, Ponczek M, Kołodziejczyk J, Wachowicz B. Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: Functional consequences. *Thrombosis Research.* 2007/01/01/ 2007;121(2):163-174. doi:https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.03.017
228. Nielsen VG, Crow JP, Zhou F, Parks DA. Peroxynitrite Inactivates Tissue Plasminogen Activator. *Anesthesia & Analgesia.* 2004;98(5)
229. Newby DE, McLeod AL, Uren NG, et al. Impaired Coronary Tissue Plasminogen Activator Release Is Associated With Coronary Atherosclerosis and Cigarette Smoking. *Circulation.* 2001;103(15):1936-1941. doi:doi:10.1161/01.CIR.103.15.1936

230. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increase neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature Medicine*. 1998/02/01 1998;4(2):228-231. doi:10.1038/nm0298-228
231. Misztal T, Rusak T, Tomasiak M. Peroxynitrite may affect clot retraction in human blood through the inhibition of platelet mitochondrial energy production. *Thrombosis Research*. 2014/03/01/ 2014;133(3):402-411. doi:https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.12.016
232. Nowak P, Olas B, Bald E, Głowacki R, Wachowicz B. Peroxynitrite-induced changes of thiol groups in human blood platelets. *Platelets*. Sep 2003;14(6):375-9. doi:10.1080/0953710032000141400
233. Nowak P, Wachowicz B. The effects of peroxynitrite on pig platelet lipid peroxidation and the secretory process induced by thrombin. *Cytobios*. 2001;106 Suppl 2:179-87.
234. Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Koziol A, et al. Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep*. Aug 2015;67(4):704-10. doi:10.1016/j.pharep.2015.04.009
235. Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Dec 2012;26(6):711-23. doi:10.1016/j.beem.2012.05.003
236. Calvo SE, Mootha VK. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:25-44. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141720
237. Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, Yang M. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomedical Journal*. 2018/02/01/ 2018;41(1):9-20. doi:https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.12.001
238. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*. Dec 1 2002;33(11):1451-64. doi:10.1016/s0891-5849(02)01111-5
239. Pearce LL, Epperly MW, Greenberger JS, Pitt BR, Peterson J. Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide*. Apr 2001;5(2):128-36. doi:10.1006/niox.2001.0338
240. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. Apr 15 1996;328(2):309-16. doi:10.1006/abbi.1996.0178
241. Szabó C, Salzman AL. Endogenous peroxynitrite is involved in the inhibition of mitochondrial respiration in immuno-stimulated J774.2 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 17 1995;209(2):739-43. doi:10.1006/bbrc.1995.1561

242. Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. Jan 1994;308(1):89-95. doi:10.1006/abbi.1994.1013
243. Borutaite V, Budriunaite A, Brown GC. Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta*. Aug 15 2000;1459(2-3):405-12. doi:10.1016/s0005-2728(00)00178-x
244. Bolaños JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem*. May 1995;64(5):1965-72. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64051965.x
245. Xie YW, Wolin MS. Role of nitric oxide and its interaction with superoxide in the suppression of cardiac muscle mitochondrial respiration. Involvement in response to hypoxia/reoxygenation. *Circulation*. Nov 15 1996;94(10):2580-6. doi:10.1161/01.cir.94.10.2580
246. Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, Moncada S. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J*. Mar 15 1996;314 (Pt 3)(Pt 3):877-80. doi:10.1042/bj3140877
247. Yamamoto T, Maruyama W, Kato Y, et al. Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm (Vienna)*. 2002;109(1):1-13. doi:10.1007/s702-002-8232-1
248. Murray J, Taylor SW, Zhang B, Ghosh SS, Capaldi RA. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem*. Sep 26 2003;278(39):37223-30. doi:10.1074/jbc.M305694200
249. Zhu J, Vinothkumar KR, Hirst J. Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*. 2016/08/01 2016;536(7616):354-358. doi:10.1038/nature19095
250. Hederstedt L, Ohnishi T. Chapter 7 Progress in succinate:quinone oxidoreductase research. In: Ernster L, ed. *New Comprehensive Biochemistry*. Elsevier; 1992:163-198.
251. Rubbo H, Denicola A, Radi R. Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of Trypanosoma cruzi energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch Biochem Biophys*. Jan 1994;308(1):96-102. doi:10.1006/abbi.1994.1014
252. Aulak KS, Miyagi M, Yan L, et al. Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 9 2001;98(21):12056-61. doi:10.1073/pnas.221269198
253. Brand Martin D, Nicholls David G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*. 2011;435(2):297-312. doi:10.1042/bj20110162

254. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: Releasing Power for Life and Unleashing the Machineries of Death. *Cell*. 2003;112(4):481-490. doi:10.1016/S0092-8674(03)00116-8
255. VIRÁG L, SCOTT GS, CUZZOCREA S, MARMER D, SALZMAN AL, SZABÓ C. Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology*. 1998;94(3):345-355. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00534.x
256. Zhuang S, Simon G. Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2000;279(2):C341-C351. doi:10.1152/ajpcell.2000.279.2.C341
257. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003/03/01 2003;8(2):115-128. doi:10.1023/A:1022945107762
258. Kooijman M, Thijssen DHJ, De Groot PCE, et al. Flow-mediated dilatation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans. *The Journal of Physiology*. 2008;586(4):1137-1145. doi:https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.145722
259. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. Sep 21 1995;377(6546):239-42. doi:10.1038/377239a0
260. Kadowitz PJ, Chapnick BM, Feigen LP, Hyman AL, Nelson PK, Spannhake EW. Pulmonary and systemic vasodilator effects of the newly discovered prostaglandin, PGI₂. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. Sep 1978;45(3):408-13. doi:10.1152/jappl.1978.45.3.408
261. Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2007;292(3):H1209-24. doi:10.1152/ajpheart.01047.2006
262. Wasserman SM, Mehraban F, Komuves LG, et al. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiological Genomics*. 2002;12(1):13-23. doi:10.1152/physiolgenomics.00102.2002
263. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiologica*. 2017;219(2):382-408. doi:https://doi.org/10.1111/apha.12725
264. Zou MH. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. Jan 2007;82(1-4):119-27. doi:10.1016/j.prostaglandins.2006.05.005
265. Kohnen SL, Mouithys-Mickalad AA, Deby-Dupont GP, Deby CM, Lamy ML, Noels AF. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite or oxoferryl species occurs by a radical pathway. *Free Radic Res*. Dec 2001;35(6):709-21. doi:10.1080/10715760100301221

266. Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem*. Mar-Apr 2002;383(3-4):401-9. doi:10.1515/BC.2002.044
267. Kameritsch P, Singer M, Nuernbergk C, et al. The mitochondrial thioredoxin reductase system (TrxR2) in vascular endothelium controls peroxynitrite levels and tissue integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 16 2021;118(7)doi:10.1073/pnas.1921828118
268. Ungvari Z, Csiszar A, Bagi Z, Koller A. Impaired Nitric Oxide-Mediated Flow-Induced Coronary Dilation in Hyperhomocysteinemia: Morphological and Functional Evidence for Increased Peroxynitrite Formation. *The American Journal of Pathology*. 2002/07/01/ 2002;161(1):145-153. doi:https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64166-1
269. Cassuto J, Dou H, Czikora I, et al. Peroxynitrite Disrupts Endothelial Caveolae Leading to eNOS Uncoupling and Diminished Flow-Mediated Dilation in Coronary Arterioles of Diabetic Patients. *Diabetes*. 2014;63(4):1381-1393. doi:10.2337/db13-0577
270. Adimora NJ, Jones DP, Kemp ML. A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. *Antioxid Redox Signal*. Sep 15 2010;13(6):731-43. doi:10.1089/ars.2009.2968
271. Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Thomson L, Flohe L, Radi R. Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. *Subcell Biochem*. 2007;44:83-113.
272. Holmgren A. Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 1976;73(7):2275-9. doi:10.1073/pnas.73.7.2275
273. Holmgren A. Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from Escherichia coli. *J Biol Chem*. May 10 1979;254(9):3664-71.
274. Mühlenhoff U, Braymer JJ, Christ S, et al. Glutaredoxins and iron-sulfur protein biogenesis at the interface of redox biology and iron metabolism. *Biol Chem*. Nov 26 2020;401(12):1407-1428. doi:10.1515/hsz-2020-0237
275. Glutaredoxins: Glutathione-Dependent Redox Enzymes with Functions Far Beyond a Simple Thioredoxin Backup System. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2004;6(1):63-74. doi:10.1089/152308604771978354
276. Prinz WA, Åslund F, Holmgren A, Beckwith J. The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm *. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(25):15661-15667. doi:10.1074/jbc.272.25.15661
277. Wu H, Lin L, Giblin F, Ho YS, Lou MF. Glutaredoxin 2 knockout increases sensitivity to oxidative stress in mouse lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. Dec 1 2011;51(11):2108-17. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.011

278. Wu H, Xing K, Lou MF. Glutaredoxin 2 prevents H₂O₂-induced cell apoptosis by protecting complex I activity in the mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. Oct 2010;1797(10):1705-15. doi:10.1016/j.bbabi.2010.06.003
279. Jin L, Xiao C-L, Lu C-H, et al. Transcriptomic and proteomic approach to studying SNX-2112-induced K562 cells apoptosis and anti-leukemia activity in K562-NOD/SCID mice. *FEBS Letters*. 2009;583(12):1859-1866. doi:https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.046
280. Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem*. Jul 7 2000;275(27):20346-54. doi:10.1074/jbc.M001943200
281. Zhou Y, Kok KH, Chun AC, et al. Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. Feb 24 2000;268(3):921-7. doi:10.1006/bbrc.2000.2231
282. Trujillo M, Clippe A, Manta B, et al. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch Biochem Biophys*. Nov 1 2007;467(1):95-106. doi:10.1016/j.abb.2007.08.008
283. Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal*. Aug 1 2011;15(3):795-815. doi:10.1089/ars.2010.3624
284. Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*. Apr 25 2003;300(5619):650-3. doi:10.1126/science.1080405
285. Peroxiredoxin 5: Structure, Mechanism, and Function of the Mammalian Atypical 2-Cys Peroxiredoxin. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;15(3):817-829. doi:10.1089/ars.2010.3584
286. Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, et al. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*. Apr 25 2003;300(5619):653-6. doi:10.1126/science.1080273
287. Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, et al. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J Biol Chem*. May 31 2002;277(22):19396-401. doi:10.1074/jbc.M106585200
288. Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang KS, Chae HZ, Rhee SG. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J Biol Chem*. Nov 28 2003;278(48):47361-4. doi:10.1074/jbc.C300428200
289. Jeong W, Bae SH, Toledano MB, Rhee SG. Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012/08/01/ 2012;53(3):447-456. doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.020

290. Day Alison M, Brown Jonathon D, Taylor Sarah R, Rand Jonathan D, Morgan Brian A, Veal Elizabeth A. Inactivation of a Peroxiredoxin by Hydrogen Peroxide Is Critical for Thioredoxin-Mediated Repair of Oxidized Proteins and Cell Survival. *Molecular Cell*. 2012/02/10/ 2012;45(3):398-408. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.027>
291. Karplus PA, Poole Leslie B. Peroxiredoxins as Molecular Triage Agents, Sacrificing Themselves to Enhance Cell Survival During a Peroxide Attack. *Molecular Cell*. 2012/02/10/ 2012;45(3):275-278. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.012>
292. Fink AL. Chaperone-Mediated Protein Folding. *Physiological Reviews*. 1999;79(2):425-449. doi:10.1152/physrev.1999.79.2.425
293. Jang HH, Lee KO, Chi YH, et al. Two Enzymes in One: Two Yeast Peroxiredoxins Display Oxidative Stress-Dependent Switching from a Peroxidase to a Molecular Chaperone Function. *Cell*. 2004/05/28/ 2004;117(5):625-635. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.002>
294. Moon JC, Hah YS, Kim WY, et al. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *J Biol Chem*. Aug 5 2005;280(31):28775-84. doi:10.1074/jbc.M505362200
295. Phalen TJ, Weirather K, Deming PB, et al. Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery. *Journal of Cell Biology*. 2006;175(5):779-789. doi:10.1083/jcb.200606005
296. Cox AG, Pearson AG, Pullar JM, et al. Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins. *Biochem J*. Jun 12 2009;421(1):51-8. doi:10.1042/bj20090242
297. Mustacich DP, G. Thioredoxin reductase. 2000;
298. Prasad R, Chan LF, Hughes CR, et al. Thioredoxin Reductase 2 (TXNRD2) Mutation Associated With Familial Glucocorticoid Deficiency (FGD). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(8):E1556-E1563. doi:10.1210/jc.2013-3844

10. Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Nuernbergk, Christoph Elias

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Peroxynitrit-Produktion als Folge eines endothelzellspezifischen Thioredoxin Reduktase 2 Knockouts

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 20.12.2022, Christoph Nuernbergk

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Pohl für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, meine Promotion am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin in München anfertigen zu dürfen, bedanken. Seine fachliche Unterstützung und wissenschaftliche Expertise haben wesentlich zum Gelingen des Projekts beigetragen. Ebenfalls gebührt ihm Dank für die Anfertigung des Erstgutachtens.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau PD Dr. Heike Beck für die herausragende Betreuung und das interessante Thema bedanken. Ihr Engagement, von der Grundidee, über die experimentelle Phase, bis hin zur Analyse, war unentbehrlich für die Entstehung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Frau PD Dr. Petra Kameritsch für die fachliche Expertise und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Ein Dankeschön ergeht an Matthias Semisch, Dorothea Gössel und Dora Kiesel für die freundschaftliche Zusammenarbeit in der Gruppe sowie ihre großartige Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Ein weiterer Dank gebührt allen weiteren Mitarbeitern am BMC/Wbex und den kooperierenden Wissenschaftlern, die zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Ein herzlicher Dank steht meinen Eltern für die bedingungslose und uneingeschränkte Unterstützung zu, sowie Susanne, die mir stets unterstützend und kritisch hinterfragend zur Seite stand.