

dc_250_11

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

NADPH-OXIDÁZ ÉS PEROXIDÁZ ENZIMEK VIZSGÁLATA
EMLŐS SEJTEKBEN

GEISZT MIKLÓS

SEMMELWEIS EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET

BUDAPEST
2011

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr Thomas Letonak, aki amerikai tanulmányutam alatt bevezetett a molekuláris biológia világába, ami meghatározónak bizonyult az értekezés gerincét képező munkákban és későbbi pályafutásomban is. Köszönöm Dr Ligeti Erzsébetnek, hogy a laborjába hívott dolgozni, felkeltette érdeklődésemet a tudományos kutatás iránt és segített elindulni a kutatói pályán. Köszönöm Dr Fonyó Attilának, Dr Spät Andrásnak és Dr Hunyady Lászlónak, hogy intézetvezetőként támogatták a munkámat. Köszönet Dr Kapus Andrásnak szellemes ötleteiért és magával ragadó lelkesedéséért.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Donkó Ágnesnek, Dr Enyedi Balázsnak, Orient Annának és Dr Péterfi Zalának, hogy csatlakoztak a munkacsoportomhoz és együtt vághattunk neki a reaktív oxigén származékok gyakran frusztrálóan rejtelmes világának további megismerésének. Köszönöm Molnár Beátának és Szosznyák Tündének a megbízható és áldozatos asszisztensi munkájukat.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet valamennyi munkatársának azért a sok segítségért, amit a munkám folyamán kaptam tőlük.

Végül köszönet családomnak, feleségemnek, szüleimnek és gyermekeimnek a szeretetükért és folyamatos támogatásukért.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	8
2. Tudományterületi háttér	9
2.1 Reaktív oxigén származékok	9
2.2 Reaktív oxigén származékok termelése és lebontása	10
2.3 NADPH oxidáz (Nox) enzimek családja	11
2.3.1 A Nox2 (gp91 ^{phox}) fehérje	13
2.3.2 A Nox1 fehérje	16
2.3.3 A Nox3 fehérje	16
2.3.4 A Nox4 fehérje	17
2.3.5 A Nox5 fehérje	17
2.3.6 Duox fehérjék	17
2.4 A peroxidáz enzimekről általában	18
2.4.1 Állati peroxidáz enzimek	18
3. Célkitűzések	20
4. Kísérleti megközelítés	21
5. Eredmények és megbeszélés	
5.1 A fagocita NADPH oxidáz szabályozásának vizsgálata	24
5.1.1 Különböző kalcium források szerepe a fagocita oxidáz aktiválásában	24
5.1.2 Rac-GAP fehérjék vizsgálata fagocita sejtekben	27
5.2 Nox enzimek eddig ismeretlen izoformáinak azonosítása és jellemzése	30
5.2.1 A NADPH oxidáz 1 (Nox1) működésének vizsgálata	30
5.2.2 A NADPH oxidáz 4 (Nox4) enzim azonosítása	39
5.2.3 Duox enzimek vizsgálata	43
5.2.3.1 A Duox enzimek kimutatása különböző nyálkahártya felszíneken	43

dc_250_11

5.2.3.2 A Duox1 funkciójának vizsgálata húgyhólyag epithel sejtekben	48
5.3 Peroxidáz enzimek vizsgálata	55
5.3.1 Peroxidáz enzimek ECM-képző működésének vizsgálata	55
6. Az értekezésben ismertetett új tudományos eredmények összefoglalása	64
7. Az eredmények gyakorlati jelentősége	66
8. Irodalomjegyzék	67
9. Saját közlemények	75
9.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	75
9.2 Az értekezés témájával kapcsolatos egyéb közlemények	77
10. (függelék) Az értekezés alapjául szolgáló három legfontosabb közlemény	

Rövidítések jegyzéke

Caco2: humán epitheliális kolorektális adenokarcinóma sejtek

CF: cisztás fibrózis

CFTR: cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor

CGD: krónikus granulomatózis betegség

COS-7: immortalizált afrikai zöld majom vese sejt vonal

C-terminális: karboxi-terminális

DNS: dezoxiribonukleinsav

DPI: difenil-jodónium

Duox: kettős oxidáz (dual oxidase)

ECM: extracelluláris mátrix

EF-hand: kalcium-kötő motívum

EGTA: etilén-glikol-tetraacetát

EPO: eozinofil peroxidáz

ER: endoplazmatikus retikulum

Ero1: endoplazmás retikulum oxidoreduktáz

EST: expressed sequence tag

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

fMLP: N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanin

FN: fibronectin

G418: Geneticin antibiotikum

GAP: GTPase activating protein

GDP: guanozin-difoszfát

GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor

GFP: zöld fluoreszcens fehérje

GTP: guanozin-trifoszfát

HIF: Hipoxia-indukált Faktor

HOCl: hipoklórossav

HRP: tormaperoxidáz

HT29: humán bél epitheliális sejtek

IFN γ : interferon-gamma

LPO: laktoperoxidáz

LPS: lipopoliszacharid, endotoxin

LRR: leucin-gazdag ismétlődő szakasz

MPO: mieloperoxidáz

mRNS: hírvivő RNS

dc_250_11

NADPH: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NHBE: humán bronchiális epithel sejtek
NIH-3T3: egér embrionális fibroblaszt sejtvonala
NO: nitrogén-monoxid
Nox: NADPH-oxidáz
Noxa1: Nox aktivátor 1
Noxo1: Nox szabályozó 1
N-terminális: amino-terminális
 $O_2^{\cdot-}$: szuperoxid
 $OSCN^-$: hipotiocianát
 $p40^{phox}$: a fagocita oxidáz 40 kD tömegű komponense
 $p47^{phox}$: a fagocita oxidáz 47 kD tömegű komponense
 $p67^{phox}$: a fagocita oxidáz 67 kD tömegű komponense
PB1: Phox és Bem1 domén
PDI: protein diszulfid izomeráz
PKC: protein-kináz C
PMA: forbol-mirisztoil-acetát
PR: prolin-gazdag régió
PX: Phox homológia domén
PXD/VPO1: peroxidáz
QPCR: kvantitatív PCR
RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends
RENOX: vese-oxidáz (renal oxidase, Nox4)
RhoGDI: Rho GDP-disszociáció inhibitor
RLU: relatív fényesség (relative light unit)
RNS: ribonukleinsav
ROS: reaktív oxigén származékok
 SCN^- : tiocianát-ion
SDS: nátrium dodecil-szulfát
Sf9: Spodoptera frugiperda rovar bélhámsejt
SH3: Src homológia 3 domén
siRNS: kis interferáló RNS
SMA: simaizom aktin
SOD: szuperoxid-dizmutáz
TG: thapsigargin
TGF- β 1: transzformáló növekedési faktor- β 1
TPO: tireoperoxidáz

dc_250_11

TRP: tetratrikopeptid régió

TRPV4: tranziens receptor potenciál vanilloid 4 csatorna

Udx1: tengeri sün Duox1

VPO1/PXDN: vaszkuláris peroxidáz (peroxidazin)

1. Bevezetés

Amikor reaktív oxigén származékokról vagy szabadgyökökről hallunk, akkor gyakran a molekulák előnytelen tulajdonságai kerülnek előtérbe és joggal érezzük, hogy célszerű elkerülni a találkozást ezekkel a vegyületekkel. A reaktív oxigén származékok rövidítésének hangzása, a ROS, szintén nem éppen előnyös tulajdonságokat sejtet. A reaktív oxigén származékokról korábban valóban azt gondolták, hogy kizárólag káros hatásokkal rendelkeznek és ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy ROS elleni védekezés mechanizmusait korábban írták le, mint a szabályozott ROS termelés jelenségét. Az elmúlt néhány évtized kutatásai azonban egyértelműen kimutatták, hogy ezeknek a molekuláknak számos fontos, fiziológias funkciója is van. Régóta ismert, hogy a ROS termelése életfontosságú a kórokozókkal folytatott küzdelemben. Az utóbbi évek kutatásai megerősítették, hogy a ROS nem csak az immunvédekezésben fontos, hanem számos más biológiai működésben is jelentős szerepet játszik, mint például a hormonszintézis, megtermékenyítés, idegrendszeri működések, oxigénérzékelés és vazoreguláció. A fiziológias ROS termelés megváltozása immunhiányos állapotot, hipotireózist, vagy szív- és érrendszeri megbetegedéseket okozhat. Az élő szervezetekben a ROS-nak számos forrása lehet, melyek közül egyik legismertebb a mitokondrium, ahol a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) a sejtlégzés melléktermékeként keletkezik. A ROS szabályozott termelése, azonban elsősorban a NADPH oxidáz (Nox) enzimek működéséhez köthető, amelyek a legtöbb többsejtű szervezetben megtalálhatók és elsődleges termékük a szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$).

A szuperoxidból képződő hidrogén peroxid (H_2O_2) felhasználásában a peroxidáz enzimek játszanak kiemelkedő szerepet. A peroxidázok a H_2O_2 -ot olyan változatos célokra tudják felhasználni, mint az immunvédekezés, hormonszintézis vagy az extracelluláris mátrix módosítása. Számos példát ismerünk a Nox enzimek és peroxidázok szoros együttműködésére, azonban a két enzimcsalád közötti kapcsolat számos részlete még nincs tisztázva.

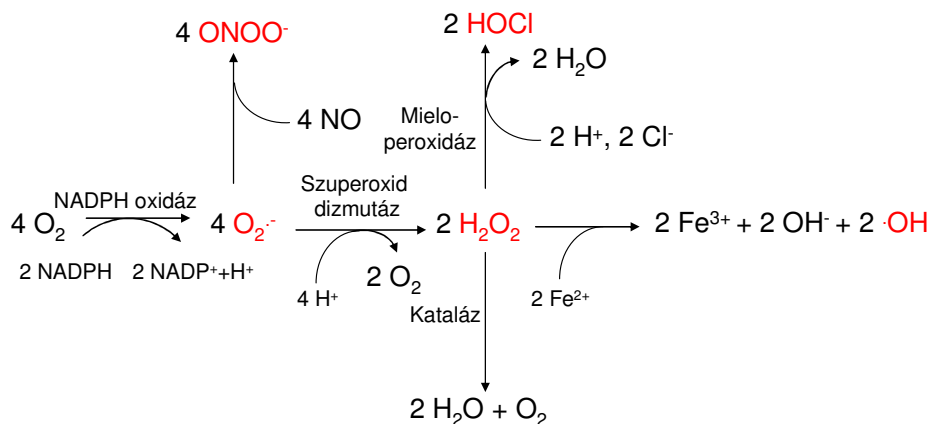
Az MTA doktori értekezésem főszereplői a reaktív oxigén származékok; az elmúlt bő tíz évben kísérleteim a ROS képződésének és hatásainak vizsgálatára irányultak. E munka legfontosabb eredményeit foglalja össze az értekezés.

2. Tudományterületi háttér

2.1 Reaktív oxigén származék (ROS)

A reaktív oxigén származékok (ROS) olyan oxigénből kialakuló molekulák, amelyek igen hatékonyan reagálnak az élő szervezetek különböző alkotóelemeivel (1). Az oxigénből kialakuló legfontosabb reaktív oxigén származékok a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a hidroxil-gyök ($\cdot OH$), a szinglet oxigén (1O_2), valamint az ózon (O_3). Ezen molekulákat gyakran emlegetik szabadgyökként is, azonban csak a szuperoxid és a hidroxil-gyök tekinthető szabadgyököknek, ugyanis ezek a molekulák tartalmaznak párosítatlan elektront a külső elektronhéjukon (1;2). A reaktív oxigén származékok nitrogén monoxiddal reagálva reaktív nitrogén származékokat képezhetnek. Ezek közül legfontosabb a peroxinitrit ($ONOO^-$), amely a szuperoxidból és a nitrogén monoxidból képződik.

A ROS szintézisének kiindulási molekulája legtöbbször a szuperoxid anion, amely a molekuláris oxigénből alakul ki egy elektron felvételével. A molekula kiemelkedő reakcióképességét a párosítatlan elektron jelenléte magyarázza. A szuperoxidból az 1. ábrán bemutatott módon alakulnak ki a további reaktív oxigén és nitrogén származékok.



1. ábra Reaktív oxigén és nitrogén származékok képződése és metabolizmusa

A legfontosabb reaktív oxigén származékokat piros színnel jelöltem. $O_2^{\cdot-}$: szuperoxid; $ONOO^-$: peroxinitrit; H_2O_2 : hidrogén peroxid; $HOCl$: hipoklórossav; $\cdot OH$: hidroxil gyök

Fontos azonban megjegyezni, hogy vannak olyan ROS-termelő mechanizmusok, amelyek közvetlenül H_2O_2 szintézisét eredményezik (pl. glükóz oxidáció). A ROS fontos tulajdonsága, hogy igen hevesen lép reakcióba a szervezet különböző alkotóelemeivel, amit gyakran azok szerkezet- és funkcióváltozása követ. Régebben azt gondolták, hogy a különböző molekulák ROS-al történő reakciója mindenképpen az adott molekula

károsodásához, funkcióvesztéséhez vezet. Mára azonban egyértelművé vált, hogy a módosulás gyakran fiziológiás folyamat része, ami sokszor reverzibilis. A szabályozott fehérjemódosítás különösen a H_2O_2 -re jellemző, amelynek jelátviteli folyamatokban játszott szerepe mára egyértelművé vált (3-5).

2.2 A ROS termelése és lebontása emlős sejtekben

Élő szervezetekben a ROS-nak több forrása is ismert. Jelenleg a mitokondriumokat tartjuk a legjelentősebb ROS forrásnak, ahol a ROS a sejtlegzés „melléktermékeként” termelődik (6). A mitokondriumok ROS termelésére vonatkozó adatok elsősorban izolált mitokondriumokkal végzett kísérletekből származnak és jelenleg nem világos, hogy a sejten belül milyen körülmények között és milyen mennyiségben termelnek ROS-t a mitokondriumok. A mitokondriumokban első lépésben szuperoxid képződik, ami a mátrixban a SOD2 enzim hatására alakul hidrogén peroxiddá. Több kísérleti adat is arra utal, hogy a mitokondriumok ROS termelése elsősorban olyan állapotokban nő meg amikor gátlódik a légzési lánc működése. Megfigyelték például, hogy az I. és a III. komplex gátlószerei hatékonyan fokozzák az izolált mitokondriumok ROS termelését (7;8). A mitokondriumokban képződő H_2O_2 a citoszólba juthat, ahol jelátviteli molekulaként működhet (9).

Az endoplazmás retikulum (ER) lumenében szintén nagy mennyiségben keletkezik H_2O_2 . Ebben a sejtalkotóban az oxidatív fehérjeérés folyamán keletkezik H_2O_2 , ami elsősorban az Ero1 oxidoreduktáz enzim terméke (10-12). A szekretoros fehérjék diszulfid hídjainak kialakítását a protein diszulfid izomeráz enzim (PDI) végzi, amely a folyamat közben redukálódik. A PDI oxidálásáért elsősorban az Ero1 felelős és végső elektron akceptor pedig az oxigén, ami H_2O_2 képződését eredményezi. Az oxidatív fehérjeérés Ero1 genetikai hiányában is végbemegy, ami további oxidoreduktáz enzimek szerepére utal a folyamatban (13). Érdekes módon az endoplazmás retikulum lumenének H_2O_2 termelése igen jól szigetelt, ugyanis a sejtalkotó citoplazmatikus felszínén már nem érzékelhető az oxidatív környezet (12). Azt is megfigyeltük, hogy az ER Ca^{2+} -tartalmának csökkenése a luminális H_2O_2 koncentráció csökkenéséhez vezet (12).

A sejtekben ROS keletkezéséhez vezethet még számos más enzim működése (pl. lipoxigenáz, citokróm P450 enzimek), azonban ezek tárgyalása kimerítené az értekezés kereteit (14). Fontos megjegyezni, hogy a fent említett példákban a ROS termelését nem tekintjük a folyamatban résztvevő enzimek elsődleges funkciójának.

A ROS szintjét nemcsak a keletkezésük, hanem lebontásuk sebessége is szabályozza. A ROS lebontását katalizáló mechanizmusokat hamarabb fedezték fel, mint a célzott ROS termelés enzimeit (15). A szuperoxid anionok átalakítását hidrogén peroxiddá a SOD enzimek katalizálják (1. ábra). A SOD enzimeknek három izoformája ismert: a SOD1 a

citoszólban, a SOD2 a mitokondriumok mátrixában, a SOD3 pedig extracellulárisan található. A mitokondriális SOD2 életfontosságú enzim, hiányában súlyos oxidatív stressz alakul ki, ami néhány napon belül a SOD2 hiányos állatok halálához vezet (16). A SOD1 hiánya számos betegség kialakulását felgyorsítja, a SOD3 genetikus hiánya pedig fokozza a hiperoxiával szembeni érzékenységet (17). A H_2O_2 lebontásában fontos szerepet játszik a kataláz enzim, amely vízzé és oxigénné alakítja a H_2O_2 -t. A peroxiredoxinok szintén fontosak a H_2O_2 inaktiválásában. A peroxiredoxinok cisztein oldallánc módosulásán keresztül katalizálják a H_2O_2 lebontását (3). A ROS inaktiválásában nemcsak enzim-katalizált mechanizmusok fontosak, hanem a különböző antioxidáns hatású kismolekulák is.

2.3 A NADPH oxidáz (Nox) enzimek családja

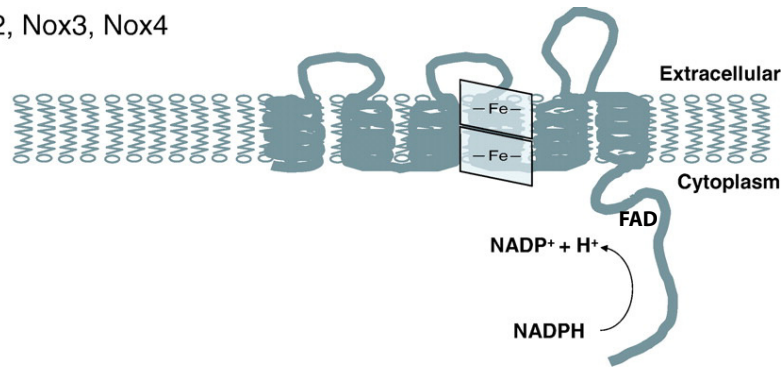
A sejtekben zajló szabályozott ROS termelésért a NADPH oxidáz (Nox) enzimek felelősek. A Nox enzimek szinte minden többsejtű élőlényben előfordulnak, ami bizonyítja, hogy a ROS szabályozott termelése általános jelenség az élővilágban.

Emlős sejtekben a szabályozott ROS termelésre az első példa a fagocita sejtek ún. oxidatív robbanása (respiratory burst) volt, amelyért a fagocitákban kifejeződő NADPH-oxidáz felelős. Az oxidatív robbanás az a jelenség, melynek során a fagocitáló fehérvérsejtek oxigénfogyasztása jelentősen fokozódik (18). Kezdetben úgy gondolták, hogy ennek magyarázata a kórokozók bekebelezéséhez szükséges „extra” energia termelése volt, azonban a fokozott oxigénfogyasztás érzéketlennek bizonyult a mitokondriális légzés gátlószereire (19). Később derült fény arra, hogy az extra oxigénfogyasztás szuperoxid termelésére fordítódik és a folyamat kulcsfontosságú a kórokozók elpusztításában (20-22). Az elmúlt tíz évben különféle szövetekben több, a fagocita oxidázzal homológ enzimet fedeztek fel, melyeket ma a NADPH-oxidázok Nox enzimsaládjaként ismerünk (23-26). Az enzimsaládnak emlősökben összesen hét tagja van: a Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 és Nox5 fehérjék, valamint a Duox1 és a Duox2. A Nox fehérjék működésük során elektront transzportálnak a NADPH-ról a molekuláris oxigénre, ami szuperoxid anion képződését eredményezi. A NADPH-oxidázok által katalizált reakció tehát a következő:

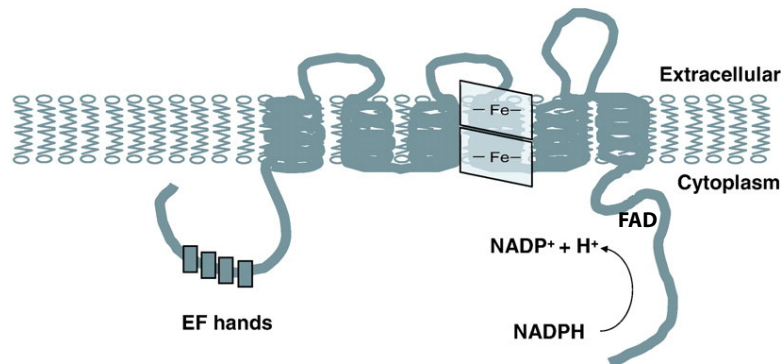


A Nox1-5 fehérjékre jellemző, hogy hat transzmembrán régióval rendelkeznek és a fehérjék N- illetve C-terminális vége is az intracelluláris tér felé néz (2. ábra).

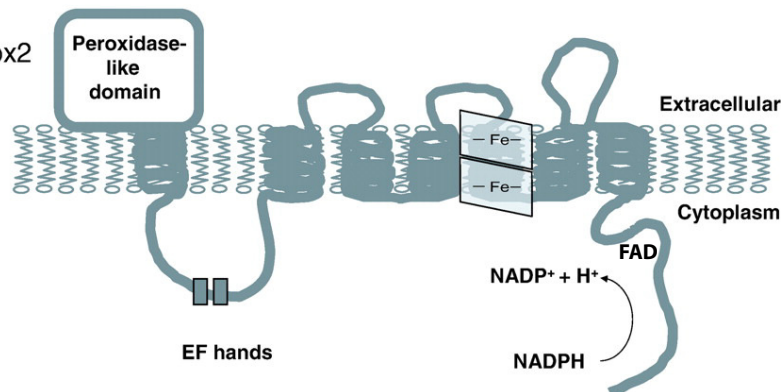
Nox1, Nox2, Nox3, Nox4



Nox5



Duox1, Duox2



2. ábra A Nox fehérjecsalád tagjai és főbb szerkezeti tulajdonságai

A Nox1-5 fehérjék és a Duox fehérjék NADPH oxidáz része hat transzmembrán régióval rendelkezik. A Nox1-5 fehérjékben a két hem csoport a harmadik és ötödik transzmembrán régióhoz kötődik, míg a Duoxok esetében a negyedik és hatodik transzmembrán szakasz köti a hemet. A NADPH és FAD kötésért a fehérjék intracellulárisan elhelyezkedő, C-terminális régiója a felelős. A Nox5 és Duox fehérjék EF-hand motívumokat is tartalmaznak. A Duox1 és Duox2 fehérjék tartalmaznak még egy extracellulárisan elhelyezkedő peroxidáz-homológ domént, amit egy transzmembrán szakasz kapcsol az EF-hand motívumokat tartalmazó hurokhoz.

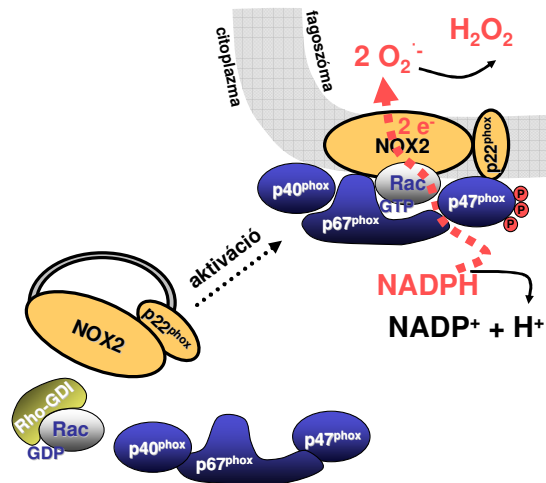
A Nox fehérjék két hem csoportot tartalmaznak, amelyeket a harmadik és ötödik transzmembrán régióban található konzervatív helyzetű hisztidinek koordinálnak (2. ábra). A fehérje NADPH és FAD kötéséért a C-terminális régióban elhelyezkedő, konzervált

aminosavak felelősek. A szuperoxid anion létrehozó elektron tehát a NADPH-ról a FAD-on és két hem csoporton keresztül jut a molekuláris oxigénre (27). A Duox fehérjék szintén tartalmazzák az előbb részletezett szerkezeti elemeket, azonban ezeken kívül rendelkeznek még egy, az extracelluláris tér felé néző peroxidáz-homológ doménnel is. A Duox peroxidáz doménhez kapcsolódó transzmembrán szakaszát és NADPH oxidáz részt egy intracelluláris fehérjehurok kapcsolja össze, ami Ca^{2+} -kötő, EF-hand motívumokat tartalmaz. A Nox5 szintén tartalmaz N-terminálisan elhelyezkedő EF-hand motívumokat. Mivel a Duox fehérjék tartalmazzák egy „extra” transzmembrán domént, ezért a Duoxok esetében a negyedik és hatodik transzmembrán régió köti a hemet.

A Nox enzimek működése során a NADPH oxidáció következtében növekszik az enzim környezetében a H^+ -koncentráció. A proton eltávolító mechanizmusokat neutrofil granulociták esetében tanulmányozták a legrészletesebben (28). Ezekben a sejtekben elsősorban egy feszültség aktiválta proton csatorna a Hv1, valamint a Na^+ - H^+ csere felelős a protonok eltávolításáért.

2.3.1 A Nox2 (gp91^{phox}) fehérje

A Nox enzimek közül a Nox2 működéséről és szabályozásáról tudunk a legtöbbet, ugyanis a Nox2 volt az enzimes család elsőként felfedezett tagja (29;30). A protein korábbi, gp91^{phox} elnevezése arra utal, hogy a fagocita oxidáz (phox) glikoprotein komponenséről van szó, amely 91 kD tömegű. A Nox2 fehérje egy több komponensből álló enzim komplex, a fagocita oxidáz nélkülözhetetlen alkotóeleme, ahol az elektrontranszfer végső lépéseit katalizálja. A Nox2 egy másik fehérjével, a p22^{phox}-al alkotja a citokróm b₅₅₈ komplexet (31). A p22^{phox} két transzmembrán régiót tartalmaz és a Nox2-höz hasonlóan, szintén glikozilált fehérje (32). A citokróm b₅₅₈ komplex neutrofil granulocitákban a szekretoros vezikulumok és szekunder granulumok membránjában található nagyobb mennyiségben. A citokróm b₅₅₈ önmagában nem alkalmas elektrontranszportra; működéséhez több olyan fehérjére is szükség van, amelyek a sejtek citoszóljában helyezkednek el és az enzim aktiválódása során helyeződnek át a fagoszóma- vagy plazmamembránba. A citoszólikus alkotórészek azonosításában nagy szerepe volt annak felfedezésének, hogy a NADPH oxidáz sejtmentes, fagocita membránt és citoszólt tartalmazó rendszerben is aktiválható (33). Az enzimkomplex aktiválódásához elengedhetetlen a citoszólikus p47^{phox}, p67^{phox} és a Rac fehérjék jelenléte és az oxidáz működésének szabályozásában részt vesz még a p40^{phox} fehérje is (34;35) (3. ábra).



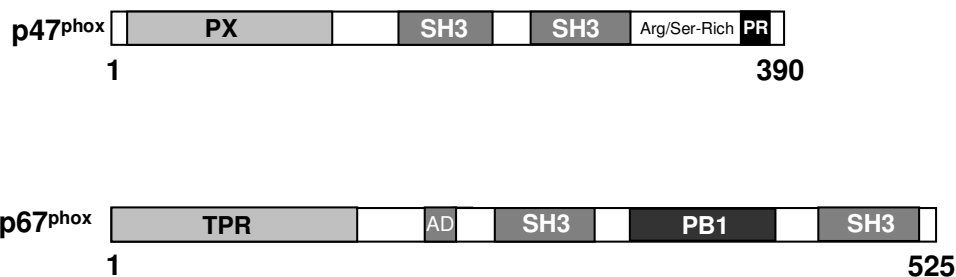
3. ábra A fagocita oxidáz aktiválódása

A granulum membránban található Nox2-p22^{phox} komplex, a citokróm b₅₅₈ a fagoszóma membránban alakítja ki az aktív enzimkomplexet a fagocita oxidáz citoszólikus komponenseivel. A fagocita oxidáz citoszólikus komponensei a p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} és a Rac fehérjék. (Enyedi Balázs rajza)

A jelenleg ismert ROS-termelő rendszerek közül a fagocita oxidáz „molekuláris anatómiájáról” tudunk a legtöbbet. Több mint két évtized kutatásainak eredménye, hogy részletesen ismerjük a citoszólikus komponensek szerkezeti sajátosságait és a fehérjék között kialakuló kapcsolatokat (35;36). Sajnos a Nox2 és p22^{phox} fehérjéket még nem sikerült kristályosítani, ezért a citokróm b₅₅₈ komplex pontos térszerkezete jelenleg ismeretlen.

A p47^{phox} fehérje tartalmaz egy N-terminális PX domént, amit két SH3 domén és egy polibázikus, autoinhibíciós régió (AIR) követ (4. ábra). A fehérje C-terminális végén található egy prolin-gazdag régió (PR) is. A p47^{phox} nyugvó sejtekben a p67^{phox} és p40^{phox} fehérjékkel komplexben található (37). A p47^{phox} térszerkezetére jellemző, hogy nyugvó sejtekben a két SH3 domén intramolekuláris interakcióba kerül az autoinhibíciós régióval, ezért az SH3 domének nem tudnak más fehérjéhez kapcsolódni (38). A fagocita oxidáz aktiválódása során az AIR meghatározott helyzetű szerinjei foszforilálódnak és ennek hatására az SH3 domének szabaddá válnak és azok kapcsolódni képesek a p22^{phox} C-terminális részén található prolin-gazdag régióval (39;40). A membránba áthelyeződő p47^{phox} PX doménje valószínűleg membrán foszfoinozitidekkel létesít kapcsolatot. A p67^{phox} fehérje, amelyet az oxidáz aktivátorának is szoktak nevezni, tartalmaz négy N-terminális tetratrikopeptid régiót (TPR), egy konzervált helyzetű aktivációs domént, egy prolin-gazdag régiót és két SH3 domént amelyek egy PB1-domént fognak közre (4. ábra). A p67^{phox} a C-terminális SH3 doménjén keresztül kapcsolódik a p47^{phox} PR-hez (40;41). A fehérje aktivációs doménje (AD, 201-210 aminosavak) szerepet játszik a Nox2-höz történő kapcsolódásban (42). A p67^{phox}

további fontos interakciói a Rac kis G fehérjéhez történő kapcsolódás ami az N-terminális TPR-eken keresztül történik, és a p40^{phox} fehérjével történő interakció, ami a PB1 régión keresztül jön létre (26). Az aktiváció fontos lépése a Rac fehérje kötődése a p67^{phox}-hoz, ami valószínűleg lehetővé teszi, hogy az aktivációs domén interakcióba kerüljön a Nox2-p22^{phox} komplexel. A Rac fehérje nyugalomban a RhoGDI fehérjéhez kapcsolódik (43). Aktivációkor a p47^{phox} és p67^{phox} fehérjéktől függetlenül kerül a membránba, ahol a GTP-kötő forma kötődik a p67^{phox}-hoz (44). A p40^{phox} fehérje nem esszenciális komponense az oxidáznak, azonban fontos szerepet játszik a p47^{phox} és p67^{phox} fagoszómához történő targetálásában (45;46).



4. ábra A p47^{phox} és p67^{phox} fehérjék doménszerkezete

A fehérjék doménszerkezetének részletes leírását lásd a szövegben.

A fagocita oxidáz aktivációja számos receptor, például az fMLP receptor, komplement receptorok vagy Fc receptor felől jöhet létre (34). Az aktiválódás kulcs mozzanata a p47^{phox} foszforilációja, ami az előzőleg részletezett mechanizmusokon keresztül vezet a komplex kialakulásához.

Felmerül a kérdés, hogy miért ilyen összetett a fagocita oxidáz összeépülése és szabályozódása? Ez valószínűleg azért fontos, mert a fagocita sejtek szuperoxidtermelésének szigorúan szabályozottnak kell lennie és csak akkor szabad aktiválnia, ha a sejtek kórokozókka találkoznak. A neutrofil granulociták szuperoxidtermelését gyakran szokták kétélű kardhoz hasonlítani, ugyanis a kórokozók ellen irányuló szuperoxidtermelés mellékhatásaként a szervezet saját szövetei is károsodhatnak. Különböző autoimmun gyulladásos megbetegedések kialakulásában szerepe van a neutrofil granulociták kórosan aktiválódó szuperoxidtermelésének. A fagocita oxidáz működésének genetikai hiánya egy súlyos immunelégtelenség, a krónikus granulomatózis (chronic granulomatous disease, CGD) kialakulásához vezet (47;48). A CGD patomechanizmusának kutatása több évtizeden keresztül szorosan összefonódott a fagocita oxidáz működésének

feltérképezésével. A betegségben szenvedők kiszolgáltatottak olyan kórokozókkal (baktériumokkal és gombákkal) szemben, amelyek elpusztítása normális immunitású egyén számára nem okoz problémát. A CGD kialakulásának leggyakoribb oka a Nox2 fehérje hiánya vagy zavart működése, de a p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} és p40^{phox} fehérjék hiánya vagy működészavara is CGD kialakulását eredményezi (47;49). A Rac2 fehérje mutációja is súlyos fagocita funkciózavart okoz, de az inkább a leukocita adhézis deficiencia betegséghez hasonló állapotot eredményez (50).

2.3.2 A Nox1 fehérje

A Nox1 volt a Nox2 elsőként azonosított homológja (51). A Nox1 56 %-os azonosságot mutat a Nox2-vel, és tartalmazza a Nox fehérjékre jellemző, korábban már tárgyalt szerkezeti elemeket. A Nox1 legnagyobb mértékben a vastagbél epithel sejteiben expresszálódik, de kisebb mennyiségben megtalálható az ér simaizomban, az uterusban és a prosztatában is (51). A Nox1 elsőként feltételezett funkciója a sejtprolifерáció serkentése volt, azonban később kiderült, hogy a fehérjének nincs ilyen aktivitása és az eredeti megfigyelés valószínűleg kísérleti műtermék volt (23). A Nox1 fehérje funkciója jelenleg ismeretlen. Nox1-hiányos egérmodellel végzett kísérletekben az találták, hogy a Nox1-nek szerepe van az angiotensin II infúzió hatására létrejövő magas vérnyomás kialakulásában (52;53). Ennek magyarázata lehet, hogy a Nox1-hiányos érfal simaizomsejtek angiotensin II-vel szembeni válaszkészsége jelentősen csökkent. A Nox1 fehérje működésének szabályozásáról és a fehérje interakcióiról az „Eredmények és megbeszélés” fejezetben fogok részletesen írni.

2.3.3 A Nox3 fehérje

A Nox3 fehérje 58 %-os azonosságot mutat a Nox2-vel (54). A Nox3 mRNS legnagyobb mennyiségben a belső fülben expresszálódik és más felnőtt szövetben nem található meg (55;56). Erre a nem mindennapi expressziós helyszínre egy olyan egértörzs genetikai analízise során derült fény, amely súlyos egyensúlyzavarral küzd (*het* törzs) (55). Az egértörzs vizsgálata kiderítette, hogy az egyensúlyzavar hátterében az áll, hogy az állatok belső füléből hiányoznak a normális érzékeléshez elengedhetetlen apró kövecskék, az otoconiumok (55). A törzs részletes genetikai analízise megerősítette, hogy a *nox3* gén mutációja okozza az otoconiumok hiányát. Jelenleg nem világos, hogy a Nox aktivitás kiesése miért vezet ehhez a defektushoz. Elképzelhető, hogy a Nox3 eredetű ROS-nak, fehérjék keresztkötésén keresztül, szerepe lehet annak a szerves magnak a kialakulásában,

amin később a kalcium kristályok precipitálódnak. A Nox3 szintén komplexet alkot a $p22^{\text{phox}}$ -al és a NOXO1 fehérje is szabályozza működését (57). E fehérjék genetikus hiánya szintén egyensúlyzavar kialakulását eredményezi (58;59).

2.3.4 A Nox4 fehérje

A Nox4 azonosítása fontos részét képezi munkámnak ezért a Nox4-ről az „Eredmények és megbeszélés” fejezetben fogok részletesen írni.

2.3.5 A Nox5 fehérje

A Nox5 fehérjét először Cheng és mtsai azonosították, mint egy 565 aminosavból álló fehérjét, amely 27%-os azonosságot mutat a Nox2-vel (54). Később Bánfi és mtsai több *nox5* génterméket is kimutattak, amelyek több mint 700 aminosavól állnak ($\text{Nox5}\alpha$, β , γ és δ izoformák) (60). Jelenleg úgy tűnik, hogy a hosszabb izoformák jelentik a fehérje gyakrabban előforduló formáit. A hosszabb Nox5 izoformák tartalmazzák a Nox fehérjékre általában jellemző konzervált szerkezeti elemeket, azonban ezeken kívül rendelkeznek még egy hosszabb N-terminális szakasszal is, amely négy Ca^{2+} -kötő EF hand motívumot hordoz. A Nox5 mRNS a herében és a lépben expresszálódik nagyobb mennyiségben, valamint megtalálható embrionális szövetekben is (54;60). Érdekes módon az egér és a patkány genom nem tartalmaz *nox5* gént. A Nox5-öt expresszáló sejtek kalcium szignál hatására szuperoxidot termelnek. Valószínű, hogy az enzim szabályozásában a kalcium ionok játsszák a legfontosabb szerepet (61). A Nox5 funkciója jelenleg ismeretlen. Bár fehérje szinten még nem bizonyított egyértelműen, valószínű, hogy a herében megfigyelt expresszió a spermiumokhoz köthető. Ez azért nagyon érdekes, mert a H_2O_2 fontos szerepet játszik alacsonyabb rendű élőlények (pl. tengeri sün) petesejtjeinek megtermékenyítésében.

2.3.6 A Duox1 és Duox2 fehérjék

A Duox fehérjéket eredetileg mint tiroid oxidázokat írták le, ugyanis először a pajzsmirigyben azonosították őket (62;63). A Duox elnevezést Edens és mtsai ajánlották, akik a fehérje szerkezeti tulajdonságai alapján adták a „kettős oxidáz” (Dual oxidase) nevet (64). A Duox fehérjék ugyanis a NADPH oxidáz részen kívül tartalmazznak még egy peroxidáz-szerű domént is ami nagyfokú homológiát mutat más állati peroxidáz enzimekkel. A peroxidáz és NADPH oxidáz részeket egy intracelluláris hurok köti össze, ami két Ca^{2+} -kötő EF-hand motívumot tartalmaz (2. ábra). Ennek a szerkezeti sajátosságnak köszönhetően a Duox fehérjék aktivitását az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szabályozza. A

Duox fehérjék sejten belüli irányításában és aktivitásuk szabályozásában fontos szerepet játszanak a Duox aktivátorok (Duoxa1 és Duoxa2) amelyek komplexet képeznek a Duox fehérjékkel (65). A Duox enzimek rendkívül ősi fehérjék, amelyek már a *Caenorhabditis elegans* fonálféregben is megtalálhatók, ahol szerepet játszanak az állat kültakarójának stabilizálásában (64). A tengeri sün petesejt megtermékenyítése folyamán pedig a tengeri sün Duox (Udx1) által termelt H_2O_2 felelős a fertilizációs burok megerősítéséért (66). A Duox által termelt H_2O_2 extracelluláris mátrixot stabilizáló hatása mindkét esetben úgy jön létre, hogy peroxidáz enzimek, H_2O_2 felhasználásával, ditirozín kereszthidak képzésével összekapcsolnak fehérjéket. Az emberi genom két Duox fehérjét (Duox1 és Duox2) kódol amelyek nagy mértékben (83 %-ban) hasonlóak egymáshoz. A Duox2 fehérje genetikai hiánya emberben és egérben egyaránt súlyos pajzsmirigy elégtelenséghez vezet (67;68). Ez a betegség igazolja azokat a korábbi elképzeléseket miszerint a Duox által termelt H_2O_2 felelős a hormonszintézishez esszenciális jodid ionok oxidációjáért. Az emlős Duox fehérjék nemcsak a pajzsmirigyben, hanem számos más szervben is megtalálhatók. A Duox fehérjék pajzsmirigyen kívüli expressziójáról és lehetséges funkcióiról az értekezés „Eredmények és megbeszélés” fejezetében írok részletesebben.

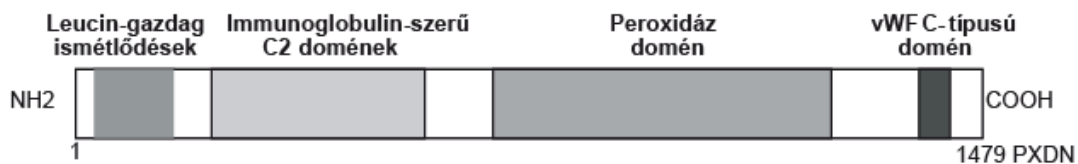
2.4 A peroxidáz enzimekről általában

A H_2O_2 élő szervezetekben kialakuló hatásai gyakran peroxidáz enzimek közvetítésével jönnek létre. A peroxidáz enzimsalád tagjai egyaránt megtalálhatók prokariótákban, gombákban, növényekben és állatokban (69). A hem-kötő peroxidázoknak két szupercsaládja létezik. Az egyik szupercsaládba a gomba, növényi és bakteriális peroxidázok tartoznak. A másik, az állati peroxidázok szupercsaládja, amelynek tagjai az evolúció folyamán az előbb említett enzimektől függetlenül alakultak ki és váltak hasonló enzimatis funkcióval rendelkező fehérjékké (69-71). Az állati peroxidázok hemet kötő fehérjék, amelyek különböző szubsztrátok oxidálását katalizálják H_2O_2 jelenlétében. Az állati peroxidázok molekulaszervezete nagymértékben konzervált az élővilágban, a peroxidázok által katalizált reakció pedig számos biokémiai illetve élettani folyamatban alapvető jelentőségű.

2.4.1 Állati peroxidáz enzimek

Az állati peroxidázok közé tartozik a mieloperoxidáz (MPO), laktoperoxidáz (LPO), eozinofil peroxidáz (EPO), tireoperoxidáz (TPO) és a peroxidazin (PXDN) (71). Az állati peroxidázok közül az MPO működését és térszerkezetét tanulmányozták a legrészletesebben. Az MPO a neutrofil granulociták terméke, amely hipó képzésén keresztül

vesz részt a baktériumok és gombák elpusztításában (72). Az enzim által katalizált reakció az 1. ábrán látható. Az EPO az eozinofil granulociták granulumaiban található, és az MPO-hoz hasonlóan a kórokozók, azon belül is a különböző paraziták elpusztításában játszik szerepet (73). Az LPO különböző exokrin szekrétumokban, tejben, nyálban és könnyben található nagy mennyiségben és a nyálkahártyákhoz kötődő immunitás fontos szereplője (74). Az eddig ismert peroxidázoktól eltérően a TPO nem immunvédekező folyamatokban, hanem hormonszintézisben szerepel. A TPO-nak elengedhetetlenül fontos szerepe van a pajzsmirigyhormonok szintézisében, ahol a Duox2 által termelt H_2O_2 felhasználásával katalizálja a jodid ionok oxidációját. Az eddig tárgyalt állati peroxidázok közös sajátossága, hogy halid ionok (klorid, jodid) vagy tiocianát oxidációját katalizálják. A peroxidázokról ismert továbbá, hogy igen hatékonyan képeznek ditirozint (64), azonban magasabb rendű élőlényekben ennek az aktivitásnak a jelentősége ismeretlen. A peroxidazin (PXDN) egyedi struktúrával rendelkezik a peroxidázok között, ugyanis peroxidáz doménje mellett az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéire jellemző doméneket is tartalmaz. Először *Drosophila melanogaster*-ben azonosították (75), ahol az állat számos fejlődési szakaszában kimutatták a fehérjét, ám a funkcióját nem sikerült azonosítani. Humán homológját, mint egy melanómához asszociált gén termékét írták le először, valamint EB1 vastagbélrák sejtvonalból is kimutatták az expresszióját (76;77). A fehérje N-terminális végén szekretoros szignál szekvencia található, ezeket hat leucin-gazdag ismétlődő szakasz (LRR) és négy immunoglobulin C2 domén követi (4. ábra).



4. ábra A peroxidazin (PXDN) szerkezete

A humán PXDN 1479 aminosavból áll. N-terminális végén található 6 db LRR, majd négy immunoglobulin C2 domén, ezt követi a peroxidáz domén, majd a C-terminális végén egy von Willebrand faktor C-típusú domén.

A fehérje peroxidáz doménje 42 %-os hasonlóságot mutat a MPO-hoz, a C-terminális végén pedig egy von Willebrand faktor C-típusú domén található. A közelmúltban publikált adatok szerint *C. elegans*-ban a PXDN szerepet játszik az embrionális fejlődés során az izom-epidermis kapcsolat kialakulásában, valamint a bazális membránok szerveződésében (78). Ezen kívül azt is kimutatták, hogy PXDN hiányában felgyorsul az axon regeneráció ami arra utalhat, hogy *C. elegans*-ban az extracelluláris mátrix gátló szerepet játszhat a folyamatban.

3. Célkitűzések

1. A fagocita oxidáz aktiválódásának végső lépéseiről már meglehetősen sokat tudunk, azonban az enzimkomplex összeállásához vezető jelátviteli útvonalak kevésbé ismertek. A plazmamembrán receptorokon keresztül ható és az oxidázt aktiváló stimulusokra jellemző, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedését hozzák létre. Nem volt világos azonban, hogy a Ca^{2+} -szignálnak milyen szerepe van a szuperoxidtermelés elindításában. Munkánkban ezért célul tűztük ki annak megismerését, hogy a neutrofil granulocitákban kialakuló Ca^{2+} -szignálnak milyen szerepe van a NADPH oxidáz aktivációjában.

2. A bevezetőben említettem, hogy a Rac kis G fehérje aktivációja elengedhetelen az aktív enzimkomplex összeállásához. A Rac nukleotid-kötő állapotának módosítása tehát a szuperoxidtermelés szabályozásának lehetőségét jelenti. A Rac GTP-áz aktivitást GTP-áz aktiváló fehérjék modulálják, azonban a neutrofil granulocitákban található Rac-GAP fehérjéről nagyon keveset tudtunk. Ezért célul tűztük ki a neutrofil granulocitákban található Rac-GAP aktivitású fehérjék jellemzését.

3. Régóta ismert volt, hogy ROS termelésre nemcsak a fagocita sejtek, hanem számos más sejtfeleség is képes. A nem-fagocita sejtek ROS termelésének enzimatis háttére azonban ismeretlen volt. Munkánkban célul tűztük olyan, korábban ismeretlen enzimek azonosítását és jellemzését, amelyek képesek ROS előállítására.

4. A Nox enzimek gyakran működnek együtt peroxidáz enzimekkel, ahol a peroxidázok felhasználják a Nox fehérjék által termelt szuperoxidból kialakuló H_2O_2 -t. Az állati peroxidázok közül a laktoperoxidáz és a peroxidazin enzimek vizsgálatát tűztük ki célul. Azért esett erre a két enzimre a választásunk, ugyanis az esetükben felmerült annak a lehetősége, hogy szerepük lehet az extracelluláris mátrix oxidatív módosításában.

4. Kísérleti megközelítés

Ebben a fejezetben szeretném összefoglalni, hogy milyen kísérleti technikák felhasználásával próbáltuk megvalósítani az előző fejezetben vázolt célokat. A kísérletekben felhasznált reagensek, oldatok valamint a kísérleti módszerek részletes ismertetését az egyes publikációk tartalmazzák.

ROS termelés mérése: A szuperoxidtermelést fotometriás úton a ferricitokróm c festék szuperoxid dizmutáz (SOD) érzékeny redukciója alapján mértük. Ez a módszer elsősorban a fagocita oxidáz aktivitásának vizsgálatára alkalmas, mert az nagy mennyiségben termel szuperoxidot. A szuperoxidtermelést érzékenyebb, kemilumineszcens módszerrel is mértük a Diogenes nevű reagens felhasználásával. H_2O_2 termelés mérésére az Amplex Red technikát használtuk, ahol a torma peroxidáz H_2O_2 jelenlétében fluoreszcens terméké oxidálja az Amplex Red reagenst.

Intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése: Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció méréséhez a Fura-2 Ca^{2+} -érzékeny fluoreszcens festéket használtuk. A sejteket a festék acetoxi metil észter formájával töltöttük fel és a fluoreszcenciát sejtszuszpenzióban mértük Deltascan fluoreszcens spektrofotométerrel.

Poliklonális antitestek előállítása: A poliklonális antitestek előállításához szükséges antigéneket GST fúziós fehérje formájában állítottuk elő *E. coli* baktériumokban és affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk meg a sejtek lizátumából. Az immunizálás során standard immunizálási protokollt alkalmaztunk. A célfehérjére specifikus antitesteket GST-vel kimerített szérumból, affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk meg. A szérumot és a tisztított antitestet Western blot kísérletekben teszteltük.

A GTP-áz és Rac-GAP aktivitás mérése: A Rac GTP-áz aktivitását nitrocellulóz filterhez való kötődés segítségével mértük. A Rac1 fehérjét $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ -vel töltöttük, majd a reakcióelegyből meghatározott időpontokban mintákat véve meghatároztuk a mosások után filteren maradó, Rac fehérjéhez kötődő aktivitást. A membránpreparátum Rac-GAP aktivitását az előbbiekben leírt módszerrel mértük úgy, hogy a reakcióelegyet membránpreparátummal egészítettük ki. A neutrofil granulociták citoszólikus és membrán frakcióinak Rac-GAP hatású fehérjeit overlay technikával vizsgáltuk. A citoszólikus és membrán frakció, valamint patkány agy fehérjeit SDS-gélelektroforézissel elválasztottuk és nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránkötött fehérjeiket albuminos oldattal inkubálva

renaturáltuk, majd [γ - 32 P]GTP-t kötő Rac1 fehérjével inkubáltuk. Az eredeti membránra egy második membránt helyeztünk, majd többszöri mosás után röntgenfilm segítségével detektáltuk a második, ráétegzett membránhoz kötődő radioaktivitást. Ez az aktivitás a Rac1 nukleotid-kötő állapotát tükrözte.

mRNS detektálási technikák: Az mRNS expressziót Northern blot, kvantitatív PCR (QPCR) és *in situ* hibridizáció technikákkal vizsgáltuk. Patkány szövetekből vagy transzfektált sejtekből RNS-t preparáltunk, agaróz formaldehid gélen szétválasztottuk, majd az RNS-t nylon-membránra blottoltuk. Több Northern blot kísérletben előre elkészített membránt használtunk. A radioaktívan jelzett szondák szintézisének lehetőség szerint a cDNS 3', le nem fordított régióját használtuk, ami csökkentette a keresztreakciók lehetőségét. A Nox4 mRNS detektálásánál a Nox4 cDNS teljes kódoló régióját használtuk templátnak. A kvantitatív PCR kísérletekhez RNS-t preparáltunk, majd cDNS-t szintetizáltunk. A QPCR reakciót Roche Lightcycler 1.5 készüléken, LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green reagens felhasználásával végeztük. A genomiális DNS felerősítését elkerülendő, olyan primereket használtunk, amelyek hosszabb intron szakaszokkal elválasztott exonokra illeszkedtek. A QPCR kísérletek kiértékelésére Lightcycler Software 4.05 programot használtunk. Belső kontrollként a GAPDH gén expressziós szintjét mértük. Az *in situ* hibridizációs kísérletekhez felhasznált cDNS-eket olyan plazmidokba klónoztuk, amelyek alkalmasak voltak szenz és antiszenz szondák szintézisére (pl. pBluescript). A [35 S]UTP-vel jelzett szondák szintézisének T7, T3 vagy SP6 polimerázok segítségével végeztük. Az *in situ* hibridizációs kísérletek részletes protokollja a <http://intramural.nimh.nih.gov/lcmr/snge/Protocols/ISHH/ISHH.html> címen található.

A korábban ismeretlen Nox homológok és szabályozó fehérjék klónozásának menete: A korábban ismeretlen szekvenciákat a Génbank EST (Expressed Sequences Tags) adatbázisában történt homológia kutatás segítségével azonosítottam. Az EST adatbázis használatának előnye volt, hogy ez az adatbázis cDNS szekvenciákat tartalmaz és a genom szekvenáló projektek befejezése előtt ez volt a genom expresszálandó részét legjobban reprezentáló adatbázis. Homológ szekvenciák azonosítása után elemeztük a homológia fokát és az adott mRNS expressziós mintázatát. A klónozást általában olyan sejtvonalból vagy szövetből végeztük, amely az expressziós vizsgálatok eredménye alapján nagy mennyiségben tartalmazta az adott mRNS-t. A Nox4 klónozásakor a teljes hosszúságú cDNS-t 3' és 5' RACE reakció segítségével klónoztuk meg.

Fehérje detektálási technikák: A fehérjéket sejtizátumból specifikus antitestek felhasználásával, Western blot technika segítségével mutattuk ki. Ha nem rendelkezünk az

adott fehérjére specifikus antitesttel, akkor epitóppal jeleztük a fehérjét és az epitópot felismerő antitestet használtunk a kísérleteinkben. A fehérjék sejten, illetve szöveten belüli elhelyezkedését immuncitokémia, illetve immunhisztokémia segítségével vizsgáltuk. Az intracelluláris lokalizációját konfokális mikroszkópia segítségével határoztuk meg. A konfokális képeket LSM510 konfokális mikroszkóppal készítettük.

Heterológ expressziós technikák: Fehérjék heterológ expressziójára legtöbb esetben a pcDNA3.1 emlős expressziós vektort alkalmaztuk. A plazmidok transzfekcióját Geneporter, Eugene vagy Lipofectamine 2000 transzfekciós reagensek segítségével végeztük el. A tranziens expressziós kísérletekben a transzfekció után 24-48 órával vizsgáltuk a sejteket. A Nox4-et stabilan expresszáló sejtek létrehozásánál Geneticinnel végeztük a szelekciót és a sejtek kihígítása után rezisztens klónokat izoláltunk. Az izolált klónokat kiterjesztettük és a Nox4 expresszióját RT-PCR illetve Northern blot technikák segítségével ellenőriztük.

Génexpressziót gátló (knock-down) kísérletek: Ezekben a kísérletekben antiszenz oligonukleotidok vagy siRNS-ek segítségével gátoltuk a génexpressziót. A Duox1 expresszió gátlására léguti epithel sejtekben foszfotioát antiszenz oligonukleotidokat alkalmaztunk, amelyeket Oligofectamine transzfekciós reagens segítségével juttattunk a sejtekbe. A siRNS technikát alkalmazó kísérleteinkben Stealth siRNS-t alkalmaztunk, amit RNAiMAX transzfekciós reagens segítségével juttattunk a sejtekbe. Az siRNS-es kísérletekben a génexpresszió gátlásának hatékonyságát Western blot segítségével ellenőriztük.

Állatkísérletek: A vese fibrotikus elváltozását BALB/c egérben az egyik oldali ureter lekötésével indukáltuk. A beavatkozás 5-7 nap alatt a vese fibrotikus elváltozását váltja ki. A Lexicon Genetics cégtől vásárolt Duox1 knock-out egerekben retrovirális gén-csapda módszerrel szakították meg a Duox1 gént. Az egereket több generáción keresztül visszakeresztettük C57BL/6 genetikai háttérre. Az egerek genotipizálásához farokból izoláltunk DNS-t és PCR segítségével határoztuk meg az állatok genotípusát. Az *in vivo* cisztometriás kísérletekhez nőstény egereket használtunk. Polietilén kanült vezetünk az állatok húgyhólyagjába és a vizelet eltávolítása után PBS-el töltöttük fel a hólyagot. Az intraluminális nyomást nyomás transducer segítségével mértük.

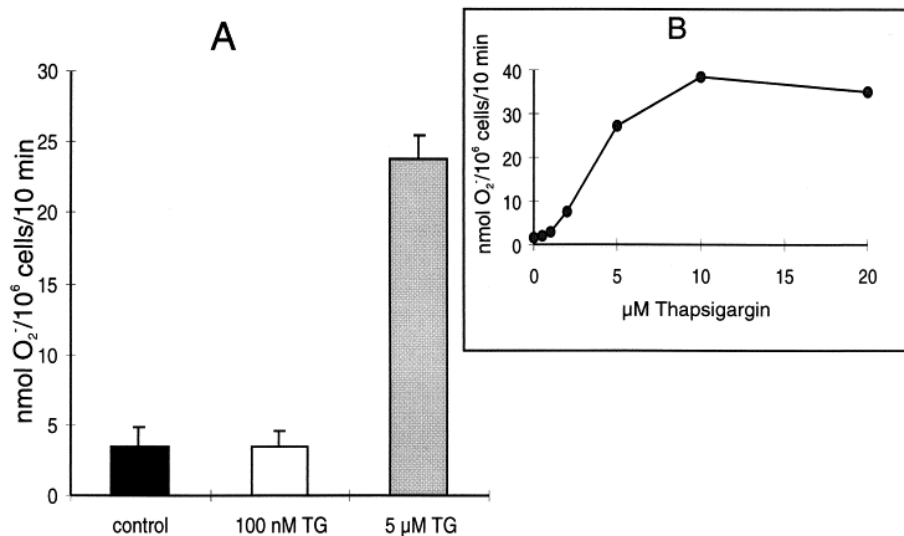
Statisztikai analízis: Az adatok átlag $\pm$ szórás vagy átlag $\pm$ standard hiba formájában kerültek feltüntetésre. Más esetekben olyan reprezentatív kísérleti eredményt mutattunk be, amit több hasonló eredményű kísérletből választottunk ki.

5. Eredmények és megbeszélés

5.1 A fagocita NADPH oxidáz szabályozásának vizsgálata

5.1.1 Különböző kalcium források szerepe a fagocita oxidáz aktiválásában

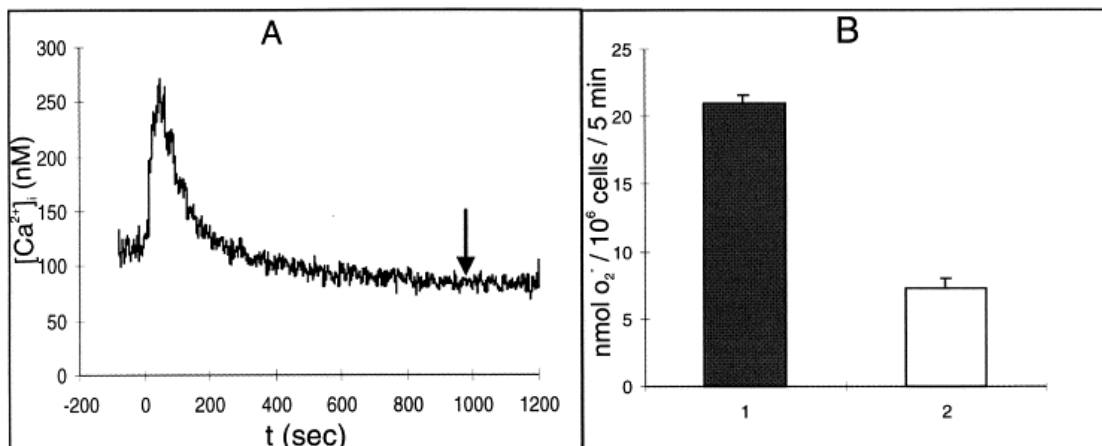
A NADPH oxidázt aktiváló, receptoron keresztül ható stimulusok a sejtek intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjának emelkedését okozzák. Nem volt világos azonban, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedése önmagában elegendő-e az oxidáz aktiválódásához, valamint az sem, hogy mennyire fontos a kialakuló szignál a receptoron keresztül ható stimulusok esetében. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció és a szuperoxid-termelés közötti kapcsolatot korábban elsősorban kalcium ionofórok segítségével vizsgálták, amelyek hatásmechanizmusa nem tekinthető fiziológiásnak. Mi kísérleteinkben a thapsigargin (TG) nevű anyagot alkalmaztuk, ami az endoplazmás retikulum Ca^{2+} -ATP-áz enzimének hatékony gátlószere (79). Ez a gátlás a belső raktárak ürülését váltja ki, ami a kapacitatív Ca^{2+} beáramlás aktiválódásához vezet (80). A TG gyakran alkalmazott vegyület a kapacitatív Ca^{2+} influxot vizsgáló kísérletekben. A raktárürüléssel indukált, kapacitatív Ca^{2+} beáramlás mechanizmusa sokáig ismeretlen volt. A közelmúltban publikált adatok szerint az ER STIM1 fehérjéje érzékeli a Ca^{2+} -raktárak teltségi állapotát és raktárürüléskor aktiválja az Ora1 Ca^{2+} csatornát (81). Kísérleteinkben először a TG hatását vizsgáltuk neutrofil granulociták szuperoxidtermelésére (5. ábra).



5. ábra A TG hatása humán neutrofil granulociták O_2^- termelésére

A TG jelenlétében, illetve hiányában termelt szuperoxid mennyiségét a SOD-érzékeny citokróm c redukció alapján határoztuk meg 10 perc után. Az ábra A része négy különböző neutrofil preparátumon végzett 12 mérés átlagát $\pm$ SD mutatja, a B rész pedig négy különböző neutrofil preparátumon elvégzett hasonló eredményű kísérlethől kiválasztott reprezentatív eredmény.

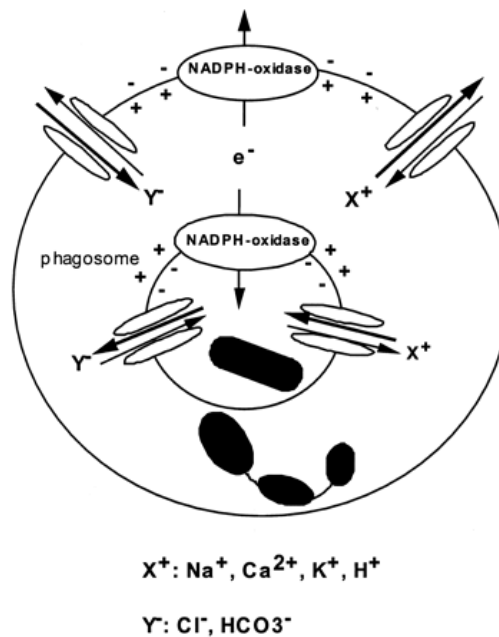
Megállapítottuk, hogy a TG a nM-os koncentráció tartományban nem stimulál szuperoxid termelést. Mérhető szuperoxid termelés 1 μM felett jelent meg és a fél-maximális stimuláló hatás 3.5 μM -nál volt. Ez az eredmény összhangban volt Kano és mtsai kísérleteivel, akik korábban leírták a μM -os koncentrációban alkalmazott TG szuperoxidtermelést stimuláló hatását (82). Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a TG nM-os koncentráció tartományban már maximális Ca^{2+} -szignált vált ki, ezért valószínű volt, hogy a magasabb TG koncentrációknál megfigyelt stimuláló hatás nem a Ca^{2+} -szignál következménye (83). Ezt a feltevést megerősítették azok a kísérleteink, ahol a mikromólos koncentrációban alkalmazott TG a sejtek Ca^{2+} -raktárainak depléciója után is stimulálta a szuperoxidtermelést. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy az fMLP-vel stimulált szuperoxid válasznak mennyiben feltétele az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedése. Először, a külső térből való Ca^{2+} -beáramlást akadályoztuk meg és megvizsgáltuk, hogy ilyen körülmények hogyan változik a sejtek szuperoxidtermelése. Ca^{2+} -mentes közegben csökken az fMLP-vel kiváltott Ca^{2+} -szignál amplitúdója és nem alakul ki a szignál fenntartott fázisa. Ilyen körülmények között azonban nem csökkent az fMLP-vel indukált szuperoxidtermelés. Hasonlóképpen hatástalan volt az a beavatkozás amikor TG és fMLP együttes alkalmazásával megakadályoztuk a raktárak újratöltődését és a kapacitív Ca^{2+} -influx stimulálásával magasabb Ca^{2+} -szintet alakítottunk ki a szignál fenntartott fázisában. Azt is megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van az fMLP-vel kiváltott szuperoxidtermelésre a belső Ca^{2+} -raktárak teljes depléciója. A sejteket Ca^{2+} -mentes közegben, TG jelenlétében 15 percig inkubálva a Ca^{2+} -raktárak teljes kiürülését hoztuk létre (6. ábra).



6. ábra A belső Ca^{2+} -raktárak depléciójának hatása az fMLP-vel kiváltott O_2^- termelésére A. Fura-2-vel töltött sejteket, Ca^{2+} -mentes médiumban $t=0$ időpontban 100 nM TG-al stimuláltunk, majd a nyíllal jelzett időpontban 1 μM fMLP-t adtunk a sejtekhez. Reprezentatív görbe, három azonos eredményű kísérletből. B. A sejteket Ca^{2+} -mentes médiumban 15 percig kezeltük TG-al, majd 5 percig stimuláltuk 1 μM fMLP-vel. Az ábra három párhuzamos mérés átlagát $\pm\text{SD}$ mutatja, Reprezentatív kísérlet hat különböző neutrofil preparátumon végzett, hasonló eredményű kísérletből.

Az fMLP ilyen körülmények között nem hozott létre Ca^{2+} -szignált és az fMLP-vel kiváltott szuperoxidtermelés jelentősen csökkent. Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a fiziológiához közel álló úton létrejövő Ca^{2+} -szignál nem elégséges a szuperoxidtermelés aktiválódásához. A receptoron keresztül ható fMLP szuperoxidtermelést kiváltó hatásának ugyan nem feltétele a Ca^{2+} -szignál kialakulása, azonban a maximális szuperoxid válasz csak emelkedett Ca^{2+} -koncentráció mellett jön létre.

A neutrofil granulociták ionforgalma és a NADPH oxidáz aktivitása között érdekes kölcsönhatás van. PhD munkám során végzett kísérletekben kimutattuk, hogy a NADPH oxidáz aktiválódása gátolja a kapacitatív úton létrejövő Ca^{2+} -beáramlást és ennek magyarázata a NADPH oxidáz elektrogén működése. A fagocita sejtek NADPH oxidáz enzime ugyanis egy elektron transzportját katalizálja az intracelluláris NADPH-ról az extracelluláris O_2 -re és ez a plazmamembrán, vagy fagocitózis esetén a fagoszóma membrán depolarizációjához vezet. A NADPH oxidáz elektrogén működését figyelembe véve egyértelműnek tűnik, hogy az fMLP-vel kiváltott oxidáz aktiválódás közben megfigyelhető Ca^{2+} -szignál szinte teljes egészében a belső raktárból történő Ca^{2+} felszabadulás eredménye.



7. ábra A fagocita oxidáz elektrogén működése befolyásolja a neutrofil granulociták ionforgalmát

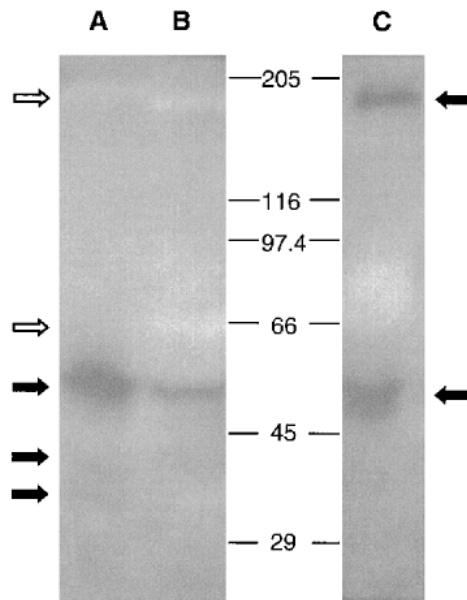
A plazmamembránban vagy a fagoszóma membránjában működő NADPH oxidáz depolarizálja a membránt és ez a membránpotenciál változás befolyásolja a különböző kationok (X^+) és anionok (Y^-) mozgását.

Az oxidáz elektrogén működésének hatása valószínűleg nem korlátozódik a sejtek Ca^{2+} -forgalmára. Egy hipotézis közleményünkben fogalmaztuk meg azt az elképzelést, hogy a fagoszóma membránban összeálló enzimkomplex működése nemcsak a Ca^{2+} -forgalomra van hatással, hanem más ionok mozgását is befolyásolhatja (7. ábra). Ez azt jelenti, hogy az oxidáz működése befolyásolhatja a fagoszóma ionösszetételét. Munkánkban azt is felvetettük, hogy az oxidáz működésének kiesése nemcsak azért vezethet a CGD kialakulásához, mert hiányoznak az antibakteriális hatású reaktív oxigén származékok, hanem azért is, mert a kieső elektrogén aktivitás miatt megváltozik a beteg sejtek fagoszómáinak ionösszetétele. Az NADPH oxidáz enzim elektrogén, ROS-független antibakteriális aktivitását Reeves és mtsai-nak kísérletei (84), valamint saját kísérleteink is igazolták (85).

5.1.2 Rac-GAP fehérjék vizsgálata fagocita sejtekben

A Rac fehérje a kismólsúlyú GTP-kötő fehérjék családjába tartozik. A Rac-nak a Rho és Cdc42 fehérjékkel együtt fontos szerepe van a citoszkeleton működésének szabályozásában (86), azonban a fehérjét elsőként a fagocita NADPH-oxidáz komplex komponenseként azonosították (43). A GTP-kötő fehérjék többi családtagjához hasonlóan a Rac is GTP-kötött formában aktív és a GTP hidrolízise juttatja a GDP-t kötő, inaktív formába. A Rac GTP-áz aktivitásának szabályozása a NADPH-oxidáz szabályozásának lehetőségét jelenti. A Rac GTP-kötését, vagyis az aktív állapot kialakulását, a nukleotid kicserélődést serkentő faktorok (Guanine nucleotide Exchange Factors, GEFs) serkentik. A GTP hidrolízis sebességét GTP-áz aktiváló fehérjék (GTPase Activating Proteins, GAPs) gyorsítják fel és ezzel fokozzák a Rac inaktivációjának sebességét. Mára a Rac-GEF és Rac-GAP fehérjék családjának számos tagját sikerült azonosítani, azonban munkám kezdetekor még nagyon keveset tudtunk ezekről a fehérjékről. Munkánk célja a neutrofil granulocitákban található Rac-GAP fehérjék jellemzése volt. A neutrofil granulocitákból preparált sejtfrakciók vizsgálata során megállapítottuk, hogy a membránfrakció ötször nagyobb Rac-GAP aktivitással rendelkezik mint a citoszolikus frakció. Azt is kimutattuk, hogy a membránhoz kötődő GAP fehérjék jóval hatásosabban fokozzák az Sf9 sejtekből preparált Rac1 GTP hidrolízisének sebességét, mint az *E. coli*-ből preparált Rac-ét. Ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy az Sf9 sejtekben a Rac1 posztranszlációs módosításon megy keresztül, amelynek során prenilálódik és ez elősegíti a membránokhoz való kötődését. Azt is kimutattuk, hogy ha az oxidázt sejtmentes, csak a NADPH oxidáz komponenseit tartalmazó rendszerben aktiváltuk, akkor külsőleg hozzáadott Rac-GAP fehérjék csökkentették a termelt szuperoxid mennyiségét. Ismert GAP hatású fehérjék expresszióját Western blot technikával vizsgálva megállapítottuk, hogy a Bcr és a p190Rho-GAP fehérjék a granulocitákból preparált

citoszólus frakcióban találhatók. Ezek a fehérjék tehát valószínűleg nem tehetők felelőssé a membrán GAP aktivitásáért. További GAP fehérjék azonosítására egy renaturációs, „overlay” eljárást alkalmaztunk (87). Ezzel a technikával sikerült kimutatnunk, hogy a renaturálható, domináns GAP aktivitás a membránban és a citoszólban egyaránt 50 kD körül jelentkezik (8. ábra).



8. ábra Rac-GAP aktivitás detektálása neutrofil granulocitákból preparált membrán és citoszólus frakciókban és patkány agy kivonatban

Neutrofil granulocitákból preparált membrán (A) citoszól (B) frakció, valamint patkány agy fehérjéit (C) SDS-gélelektroforézissel elválasztottuk és nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membrán-kötött fehérjéket renaturáltuk, majd izotóppal gamma helyzetben jelzett GTP-t kötő Rac1 fehérjével inkubáltuk. Az eredeti membránra másodikat helyeztünk, majd többszöri mosás után röntgenfilm segítségével detektáltuk a membránhoz kötődő radioaktivitást. Ez az aktivitás a Rac1 nukleotid-kötő állapotát tükrözi. Az inverz képen a GTP-áz aktivitás növekedése sötét csíkként, csökkenése világos csíkként jelenik meg.

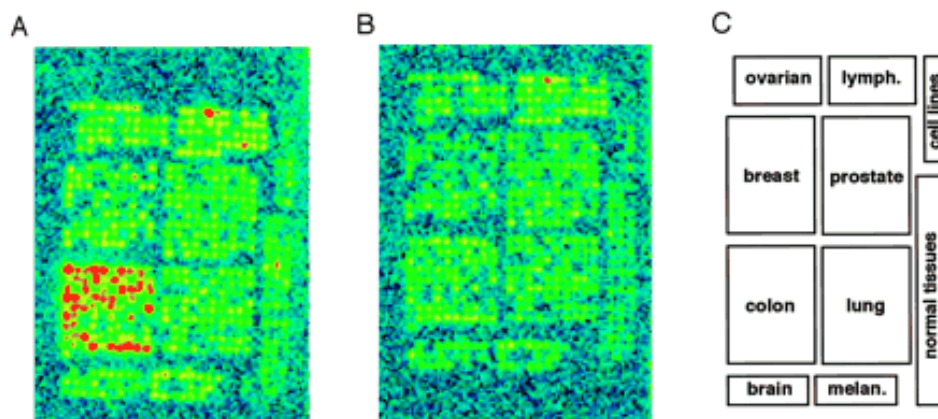
Ez a mólsúly pontosan megfelel a p50RhoGAP fehérje tömegének, ezért Western blot technikával vizsgáltuk a p50RhoGAP jelenlétét neutrofil granulociták membrán- és citoszól frakciójában. Azt találtuk, hogy a p50RhoGAP fehérje mindkét frakcióban megtalálható és megoszlása összhangban van az overlay technikával detektált GAP aktivitásával. Annak vizsgálatára, hogy az overlay és Western blot technikával detektált fehérjék azonosak-e, immundepletáltuk a membrán p50RhoGAP tartalmát és az így nyert preparátumot overlay technika segítségével vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az immundepletált preparátum p50RhoGAP tartalma és renaturálható GAP aktivitása egyaránt csökkent, ami bizonyítja, hogy az overlay technikával azonosított aktivitásért a p50RhoGAP volt felelős. Érdekes módon a p50RhoGAP immundeplációja nem befolyásolta a membrán teljes GAP aktivitását. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a membránban van olyan „domináns” GAP ami nem renaturálható, de mellette a p50RhoGAP fehérje GAP aktivitása

nem érvényesül. Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a membránban található p50RhoGAP valamilyen okból nem fér hozzá a Rac-hoz. Lehetséges, hogy a p50RhoGAP más fehérjével található komplexben, ami gátolja az aktivitását, viszont ez a komplex szétválik az overlay kísérletekben alkalmazott mintaelőkészítés folyamán. Érdekes módon a p50RhoGAP-ot eredetileg úgy azonosították, hogy a fehérje 28 kD tömegű fragmentjét pucolták vérlemezkéből, illetve lépből (88;89). Elképzelhető, hogy a teljes hosszúságú p50RhoGAP tisztítása éppen azért nem sikerült, mert az komplexben van más fehérjével, vagy fehérjékkel. A génbankban kutatható expressziós adatok alapján a p50RhoGAP fehérje nem tekinthető granulocita-specifikus GAP-nak, hiszen számos sejtben, szövetben megtalálható. Későbbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a p50RhoGAP a korai és reciklizáló endoszómális kompartmentben található és kapcsolatot teremthet a Rho- és Rab GTP-ázok között (90). Valószínű tehát, hogy neutrofil granulocitákban is elsősorban a membránforgalom szabályozásában vesz részt.

5.2 Nox enzimek korábban ismeretlen izoformáinak azonosítása és jellemzése

5.2.1 A NADPH oxidáz 1 (Nox1) működésének vizsgálata

A Nox1 enzimet eredetileg, mint sejtosztódást stimuláló NADPH oxidázt írták le, amely a vastagbélben expresszálódik nagy mennyiségben (51). A *nox1* gén termékeként leírtak még egy proton csatornát kódoló variánst is (NOH-1S) (91), azonban erről a termékről kimutattuk, hogy a klónozási folyamat műtermékeként jött létre (92). A Nox1-et azonosító kutatók azt gondolták, hogy a fehérje azért található nagy mennyiségben a vastagbélben, mert szerepet játszik az ott megfigyelhető intenzív sejtosztódásban. Saját kísérleti eredményeink nem támasztották alá a Nox1 mitogenezist serkentő szerepét. Humán szövet-chip technológia segítségével megvizsgáltuk 600 különböző tumor-minta Nox1 expresszióját. A Nox1 expresszió detektálására *in situ* hibridizációt használtunk. Megállapítottuk, hogy a Nox1 kizárólag a vastagbélből származó tumorokban expresszálódik (9. ábra).

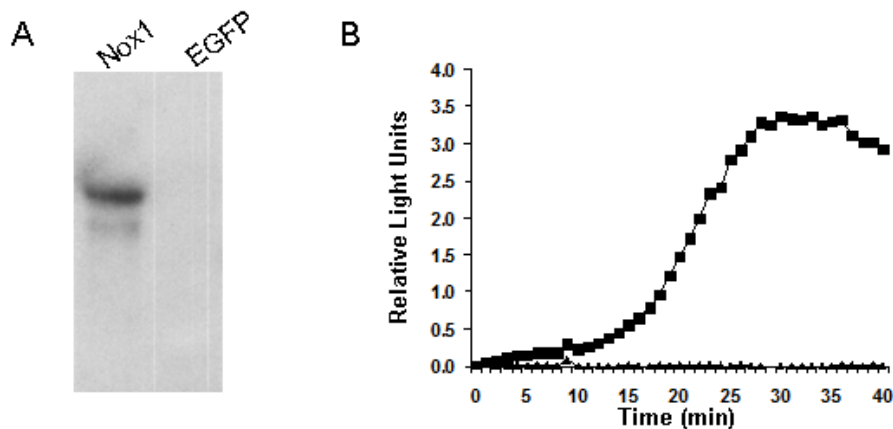


9. ábra A Nox1 mRNS detektálása humán tumor mintákban *in situ* hibridizációval

A. Radioaktívan jelzett Nox1 antiszenz szondával inkubált humán tumor szövet chip phosphorimage képe. B. Radioaktívan jelzett Nox1 szenz (kontroll) szondával inkubált humán tumor szövet-chip phosphorimage képe. C. Tumor minták elhelyezkedése a szövet chip tárgylemezen

Megvizsgáltuk a Nox1-et jól, vagy kevésbé jól expresszáló tumorok szövettani képét és azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy a Nox1 elsősorban a jól differenciált daganatokban expresszálódik. A colonból származó tumormintákban tehát nem a fokozott sejtosztódással, hanem a tumor eredetével függ össze a magas Nox1 expresszió. Azt is megállapítottuk, hogy humán colon tumor sejtvonalak *in vitro* differenciálódása folyamán növekszik a Nox1 expresszió, míg a sejtek proliferációja csökken. További kísérleteinkben olyan „knock-down” sejtvonalat állítottunk elő, amelyben antiszenz-technika felhasználásával jelentősen gátoltuk a Nox1 expresszióját. Érdekes módon ezeknek a sejtvonalaknak a proliferációja egyáltalán nem csökkent. Kísérleteink szerint tehát a Nox1 elsősorban a

differentiált colon epithel sejtek terméke és nem játszik szerepet a sejtosztódás szabályozásában. A tudományos háttér ismertetésekor már említettem, hogy a Nox1 jelentős homológiát mutat a Nox2 fehérjével. A Nox2-re szintén jellemző, hogy a granulocita sejtvonalak differenciálódása folyamán nő az expressziója (93). A Nox1 és Nox2 közötti hasonlóság alapján felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon a Nox1 képes lehet-e együttműködni a fagocita oxidáz citoszolikus alegységeivel, a $p67^{\text{phox}}$ -al és a $p47^{\text{phox}}$ -al. Ezt a lehetőséget egy olyan granulocita sejtvonalban (PLB-985) vizsgáltuk, ahol a Nox2 génjét homológ rekombináció segítségével előzőleg megszakították (94). A génkiütött sejtek a Nox2 hiányában nem tudnak szuperoxidot termelni és így a krónikus granulomatózis betegség (CGD) sejtmodelljének tekinthetők (94). Mivel a vérsejt vonalak általában igen nehezen transzfektálhatók, ezért a PLB-985 sejtekbe retrovírusok segítségével vittük be a Nox1-et kódoló cDNS-t (10. ábra).



10. ábra A retrovirális Nox1 expresszió visszaállítja a Nox2-hiányos PLB-985 sejtek szuperoxidtermelését.

A. Nox1 mRNA expresszió vizsgálata Northern blot technikával Nox1-el transzdukált PLB-985 sejtekben és kontroll, EGFP-vel transzdukált sejtekben B. PMA-stimulált szuperoxidtermelés Nox1-el transzdukált sejtekben (négyzetek) és kontroll, EGFP-vel transzdukált sejtekben (háromszögek).

Megállapítottuk, hogy a Nox1-et expresszáló CGD-s sejtek újra képesek szuperoxidot termelni, vagyis a Nox1 együttműködik a fagocita oxidáz citoszolikus komponenseivel. További kísérleteinkben azt is kimutattuk, hogy ha CGD-s hemopoetikus sejtekben (CD34+ őssejtek) expresszáljuk a Nox1-et, akkor az őssejtekből *in vitro* differenciálódó granulociták is képesek szuperoxidot termelni.

A Nox1 fehérje Nox2-t pótló működésének nagy lehet a jelentősége, hiszen a CGD leggyakoribb formáját ennek a fehérjének a genetikus hiánya idézi elő. Ha a Nox1 expresszióját sikerülne növelni CGD-s betegek granulocitáiban, akkor ez valószínűleg fokozná a beteg sejtek baktérium-ellenes aktivitását.

dc_250_11

A fagocita oxidáz citoszolikus komponensei nem expresszálódnak a vastagbélben, vagyis ezek a fehérjék nem lehetnek a Nox1 természetes fehérje partnerei. Ezért a p47^{phox} és a p67^{phox} fehérje szekvenciáját felhasználva, homológokat kerestünk a génbank EST adatbázisában. Sikerült is elsőként azonosítanunk két fehérjét, amelyeket a molekulasúlyuk alapján p41-nek illetve p51-nek neveztünk el. Később a p41 fehérje a NOXO1 (Nox organizer 1), a p51 fehérje pedig a NOXA1 (Nox activator 1) elnevezést kapta. A NOXO1 a p47^{phox}-al 46 %-os hasonlóságot mutat, azonban az általános hasonlóságnál még fontosabb, hogy a fehérje ugyanazt a konzervált doménszerkezetet tartalmazza, mint fagocita megfelelője (11. ábra).

[illegible]

B

NOXO1 1 370

p47^{phox} 1 390

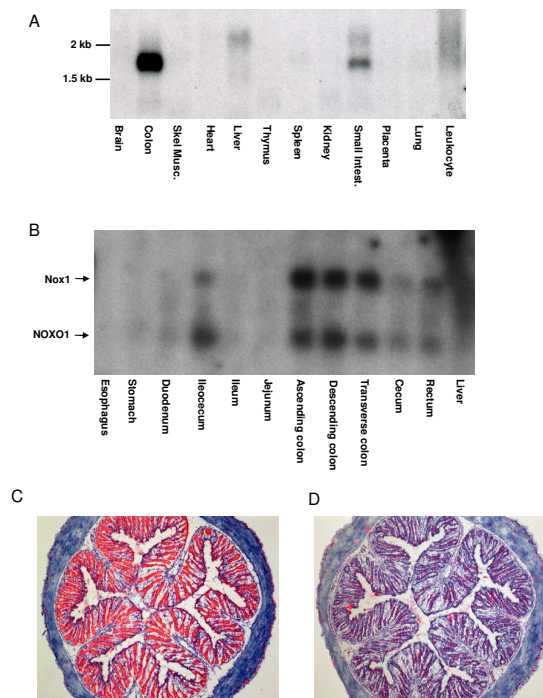
11. ábra A NOXO1 és p47^{phox} fehérjék közötti hasonlóság és a fehérjék doménszerkezete

A. A NOXO1 és p47^{phox} közötti hasonlóság aminosav szinten. A : szimbólum az azonosságot a . szimbólum a hasonlóságot jelzi. A pontokkal aláhúzott rész a fehérje PX doménjét jelzi, a szaggatott vonallal aláhúzott rész az SH3 domént jelöli. A bekeretezett rész a prolin-gazdag régióknak felel meg. B. A NOXO1 és p47^{phox} fehérjék doménszerkezete. Mindkét fehérje tartalmaz egy N-terminálisan elhelyezkedő PX domént, két SH3 domént valamint egy C-terminális prolin-gazdag régiót. A p47^{phox} fehérjében megfigyelhető polibázikus régió a NOXO1-ben hiányzik.

dc_250_11

A fehérje tartalmaz egy N-terminálisan elhelyezkedő phox homology (PX) domént, ami a foszfatidililinozitol származékokhoz kötődik nagy affinitással. A NOXO1 tartalmaz még két SH3 domént, valamint egy C-terminálisan elhelyezkedő prolin-gazdag szekvencia motívumot, ami SH3 doménekhez tud kapcsolódni. A jelentős hasonlóság mellett, azonban több érdekes különbség is van a két fehérje között. A p47^{phox}-ban van egy C-terminális polibázikus régió, ami több foszforilálható szerin maradékot tartalmaz. Ehhez hasonló szakasz a NOXO1-ben nem ismerhető fel. További érdekes különbség, hogy a p47^{phox} PX doménje tartalmaz egy PXXP motívumot, ami korábbi adatok szerint intramolekuláris interakcióba kerülhet a fehérje második SH3 doménjével (95). A NOXO1 PX doménjében nem található meg ez a motívum.

A NOXO1 expresszióját Northern blot és *in situ* hibridizáció segítségével tanulmányoztuk és megállapítottuk, hogy a fehérjét kódoló mRNS elsősorban a colonban expresszálódik és expressziós mintázata rendkívül hasonló a Nox1-éhez (12. ábra)



12. ábra A NOXO1 mRNS expressziós mintázatának vizsgálata

A. NOXO1 mRNS detektálása humán szövetekből származó mRNS mintákból, Northern blot technikával. B. Nox1 és NOXO1 mRNS kimutatása humán gasztrointesztinális mRNS panelen, Northern blot technikával. C. Nox1 mRNS detektálása radioaktívan jelzett antiszensz szondával egér colon metszeten *in situ* hibridizációval. A Giemsa festett metszeten a hibridizációs szignál piros színben tűnik fel. D. Kontroll (szenz) szondával jelzett metszet képe.

In situ hibridizációs kísérletekben a colon epithel sejtekben detektáltuk a NOXO1 mRNS-t (12. ábra).

dc_250_11

A fagocita p67^{phox} fehérje colonban expresszáldó homológja a NOXA1, amelynek humán és egér változatát egyaránt megklónoztuk (13. ábra).

A

```

mNOXA1 MSSLGDDQIRDWHRGVLAVAREDDWSALCFSDVREPLARMYFNRCVHLMAGDPEAALRA
:: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
mp67phox MS-LAEAIRLWNEGVLAADKKDWKGALEAFSEVQDPHSRICFNIGCVNTILENLQAAEQA

FDQAVTKDTCMAVGFLQGVANFQLQRFQEAVSDFQLALQLRDNDAVIDYTQLGLNFKLQ
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
FTKSINRDKHSAVAFQRMGLYYRMEKYDLAKDLKEALTQLRGNQLIDYKILQLQFKLF

ANEVLYNMAAQCQAGLWTKAANTLVEAISKWPEGAQDILDIAMDKVQKQVPLQLQVVK
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
ACEVLYNIALMHAKKEWKKAEEQLALATNMKSEPRHKSIDKAMESIWKQLFEPVVIPV

GEVFQPPRRYLKHLEPMDFLGKAKVVASVIPDDH-----NAQPQQRSA-----
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
GRLFRPNERQVQLAKKDYLGKATVVASVVHQDNFSGFAPLQPSAEPPPRPKTPEIFRA

-EHAGHQ-----PSSSTCKRVL-----STGGHTSPGLY-----
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LEGEAHRVLFVFPETPEELQVMPGNIVFLKKGSDNWATVMFNGQKGLVPCNYLEPVEL

-----DSLLASGRPGPGPSEVSSG-----SEGAATKDPESL-----VTVTVQCH
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
RIHPQSQPQEDTSPESDIPPP-PNSSPPGRLQLSPGHKQKEPKELKLSVPMPLYMLKVHYK

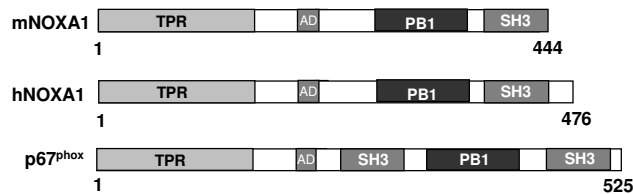
FTVPLKVPRGTGLSSFQTLAQLLHQQTGTGQLSYKAPGEERSWIPISTEESLQSIWRNV
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
YTVVMTRELGLPYQLRNMVSKKLALSPEHTKLSYRR--RDSHELLLLSEESMKDAGQV

PVGPGGLQLQC-----QGVWGRPVLY-----QVVAQYNYRAQRPED
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
K--NYCLTLWCEHTVGDQGLIDEPIQRENSDASKQTTEPQPKGTQVVAIFSIEAAQPED

LDFHQDQTVTVLCEVDEANLEGHRCVGVIFPKCFVVPAGAYVEAMLVLGPQPDQD 444
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LEFVEGDVILVLSHVNEEWLEGECKGKVGIFPKAFV--EGCAAKNLEGI--PR---EV 525

```

B



13. ábra A NOXA1 és p67^{phox} fehérjék közötti hasonlóság és a fehérjék doménszerkezete

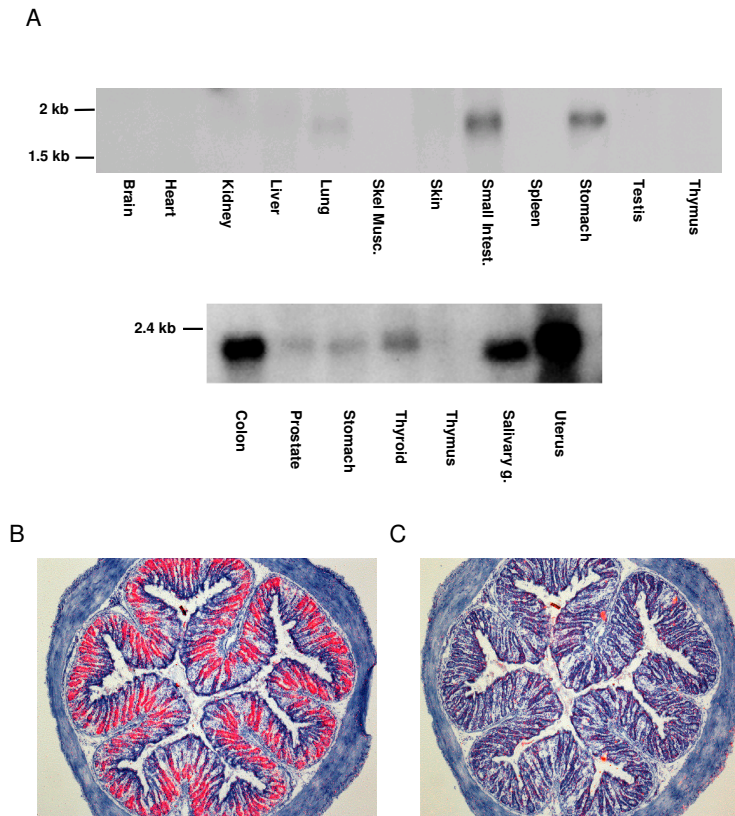
A. Az egér NOXA1 és p67^{phox} közötti hasonlóság aminosav szinten. A : szimbólum az azonosságot a . szimbólum a hasonlóságot jelzi. A folyamatos vonallal aláhúzott rész a TPR motívumoknak felel meg, a szaggatott vonallal aláhúzott szakasz az SH3 domént jelzi. A bekeretezett rész az aktivációs doménnek felel meg. B. A humán NOXA1, egér NOXA1 és p47^{phox} fehérjék doménszerkezete. Mindegyik fehérje tartalmaz egy N-terminálisan elhelyezkedő TPR régiót, a PB1 domént, valamint egy C-terminális SH3 domént. További fontos szekvencia motívum az aktivációs domén (AD), amely mindhárom fehérjében megtalálható és helyzete is konzervált. A NOXA1 kisebb fehérje mint a p67^{phox} és nem tartalmazza a p67^{phox}-ra jellemző, belső SH3 domént.

A humán p67^{phox} és a NOXA1 közötti homológia 56 %-os és a két fehérje doménszerkezete között is nagy a hasonlóság. Mindkét fehérjére jellemző az N-terminálisan elhelyezkedő négy TPR motívum, amely felelős a Rac kötésért, a PB1 domén, valamint a C-terminális SH3 domén. A p67^{phox} fehérjében található egy centrálisan elhelyezkedő SH3 domén is, ami a NOXA1 fehérjéből hiányzik. A p67^{phox} és NOXA1 fehérjék egyaránt tartalmaznak egy konzervált, húsz aminosavból álló szakaszt, az ún. aktivációs domént, amelynek aminosavsorrendje és fehérjén belüli helyzete is nagymértékben konzervált. Erről

dc_250_11

a szakaszcól korábban kimutatták, hogy fontos szerepet játszik a fagocita oxidáz aktiválódásában.

NOXA1 szintén megtalálható a colonban, igaz más szervben is detektáltuk az mRNS-t (14. ábra), ami arra utal, hogy a NOXA1 esetleg más Nox fehérjével is képes az együttműködésre.



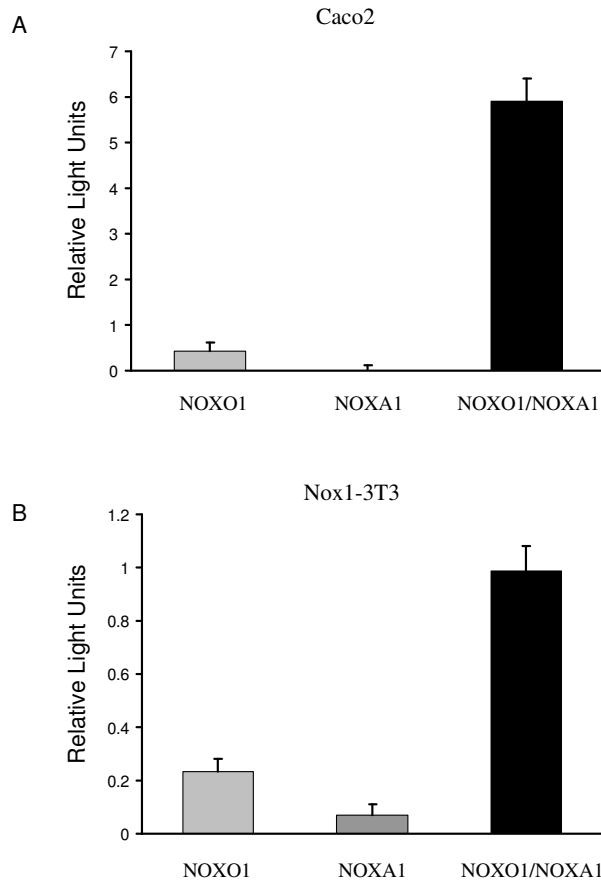
14. ábra A NOXA1 mRNS expressziós mintázatának vizsgálata

A. NOXA1 mRNS detektálása Northern blot technikával egér szövetekből származó mRNS mintákból. B. NOXA1 mRNS detektálása radioaktívan jelzett antiszenz szondával egér colon metszeten *in situ* hibridizációval. A Giemsa festett metszeten a hibridizációs szignál piros színben tűnik fel. C. Kontroll (szenz) szondával jelzett metszet képe.

Az *in situ* hibridizációs kísérletekben azt találtuk, hogy a NOXO1-hez hasonlóan a NOXA1-et kódoló mRNS is a colon epithel sejteiben található (14. ábra).

A NOXO1 és NOXA1 jelenléte colon epithel sejtekben még nem bizonyítja, hogy azok valóban interakcióba kerülnek a Nox1-el. Ezt a lehetőséget úgy vizsgáltuk, hogy a fehérjéket ko-expresszáltuk különböző sejtvonalakban és megvizsgáltuk a sejtek szuperoxid-termelését. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy csak akkor van értelmes szuperoxid-termelés, ha valamennyi fehérje (Nox1, NOXO1, NOXA1) együtt van jelen a transzfektált sejtekben (15. ábra).

dc_250_11

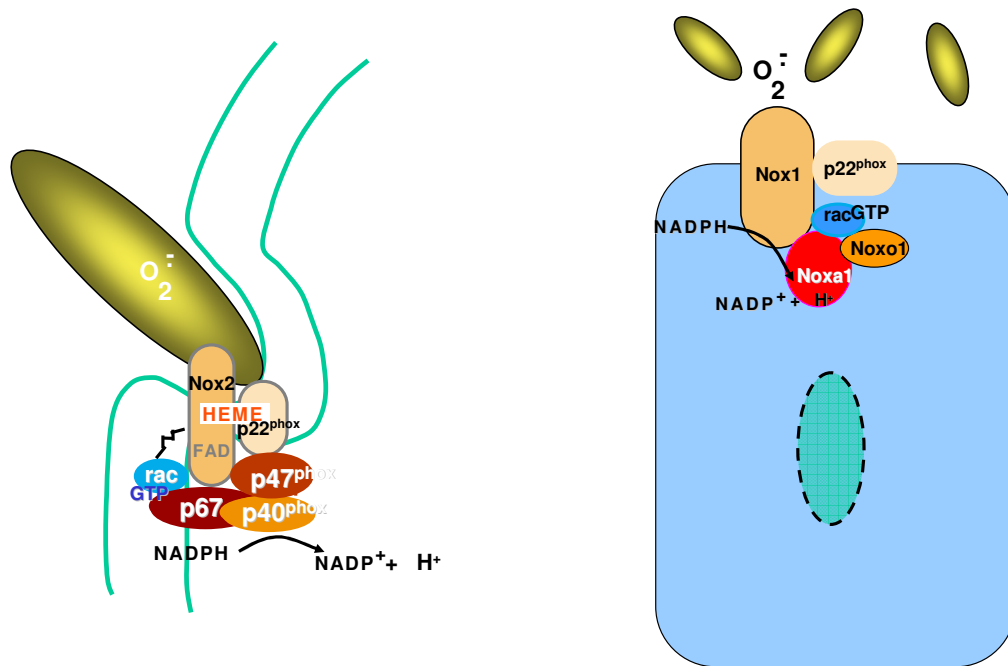


15. ábra NOXO1 és NOXA1 fehérjék együttes expressziójának hatása a Nox1-mediálta szuperoxidtermelésre

A. NOXO1 és NOXA1 fehérjék hatása Caco2 sejtek szuperoxidtermelésére. A Caco2 sejtek endogén Nox1 expresszióval rendelkeznek. B. A NOXO1 és NOXA1 fehérjék hatása Nox1-et expresszáló 3T3 sejtek szuperoxidtermelésére.

Ezekkel a kísérletekkel sikerült bizonyítanunk, hogy a NOXO1 és a NOXA1 valóban együttműködik a Nox1-el. Tőlünk részben függetlenül, hasonló eredményre jutott két másik munkacsoport is (96;97). A fagocita oxidáz és a vastagbélben expresszáldó enzimkomplex közötti nagyfokú homológia arra késztetett bennünket, hogy megvizsgáljuk az esetleges további hasonlóságot a két rendszer között. Korábban már említettem, hogy a Rac kis molekulásúlyú GTP-kötő fehérje része a fagocita oxidáz komplexnek, azonban a colon oxidáz működésében játszott esetleges szerepe ismeretlen volt. További kísérleteinkben több különböző megközelítést is alkalmaztunk a Rac esetleges szerepének vizsgálatára és kimutattuk, hogy a Rac1 fehérje a NOXA1 fehérjén keresztül szerepet játszik a Nox1 szabályozásában (98). Egy japán munkacsoport további hasonlóságot mutatott ki a fagocita és colon oxidázok között, ugyanis azt találták, hogy a Nox1 fehérje a Nox2-höz hasonlóan komplexet alkot a p22^{phox} fehérjével (97).

Saját kísérleti eredményeink és az irodalmi adatok szerint tehát a colon epithel sejteiben működik egy szuperoxid-termelő enzimrendszer, a colon oxidáz, amely nagyon hasonló a fagocita sejtek NADPH-oxidáz enzimkomplexéhez (16. ábra).



16. ábra A fagocita oxidáz és a colon oxidáz működése

Mindkét enzimkomplex membrán és citoszolikus alkotóelemeiből áll össze. A p22^{phox} és Rac fehérjék mindkét oxidáz működésében szerepet játszanak. A Nox2 (gp91^{phox}) colon homológja a Nox1, a p47^{phox}-é a NOXO1, a p67^{phox}-hasonló fehérje pedig a NOXA1. A p40^{phox} esetleges szerepe a colon oxidáz működésében jelenleg nem ismert.

A hasonlóság mellett azonban fontos különbség is van a két enzimkomplex között, amit leginkább a p47^{phox} és a NOXO1 közötti eltérés magyaráz. Korábban már említettem, hogy a p47^{phox} nyugvó sejtekben olyan zárt konformációban található ahol az SH3 domének ráhajolnak az autoinhibíciós, polibázikus régióra. Ez a konformáció a polibázikus régióban történő foszforiláció hatására megváltozik, a fehérje kinyílik és így kapcsolódni tud a p22^{phox}-hoz. A NOXO1 fehérje viszont valószínűleg eleve nyitott állapotban található, mivel a fehérjéből hiányzik a foszforilációs helyeket tartalmazó polibázikus régió, és a PX domén sem tartalmazza azt a PXXP motívumot, ami intramolekuláris kapcsolatot létesítene az SH3 doménnel. Ezt a konformációt valószínűsíti az is, hogy a Nox1-et, NOXO1-et és NOXA1-et expresszáló sejtek stimulus hiányában is jelentős szuperoxidtermelést mutatnak és PKC-aktivátor PMA nem fokozza a komplex aktivitását. Dutta és Rittinger kísérletei némileg módosították a fehérje szekvenciákból kikövetkeztethető interakciók képét, ugyanis azt

találták, hogy valószínűleg a NOXO1 fehérje sincs teljesen nyitott állapotban. Az SH3 domének utáni C-terminális szakasz PR-je kapcsolatba lép az SH3 doménekkel, ami csökkent azok affinitását a p22^{phox} PR-jéhez (99). Azt azonban ők is megerősítették, hogy az intramolekuláris interakció ellenére a NOXO1 konstitutív módon képes kapcsolódni a p22^{phox}-hoz.

A colon oxidáz funkciója jelenleg ismeretlen. Elképzelhető, hogy az enzimkomplex funkciója, a fagocita oxidázhoz hasonlóan, a baktériumokkal szembeni védekezés lehet. Ez a vastagbélben különösen fontos, hiszen ha az itt normálisan jelen levő baktériumok átjutnának a colon falán annak súlyos, szeptikus következményei lennének. Az is nyilvánvaló, hogy a vastagbélben nem lehet cél a teljes baktérium flóra elpusztítása, ami kifejezetten káros lenne a gazdaszervezet számára. Egy lokális „reaktív oxigén gát” viszont hatásosan gátolhatja, hogy a colonban hasznos, de a véráramban veszélyes baktériumok áthatoljanak a hámon. E lehetséges védekező funkció szempontjából különösen érdekes az a megfigyelésünk miszerint a Nox1 expressziót fokozza a gyulladásos folyamatok szervezésében fontos szerepet játszó citokin, a gamma-interferon (100). A bakteriális eredetű LPS és a flagellin szintén fokozzák a Nox1 expresszióját (101;102).

5.2.2 A NADPH oxidáz 4 (Nox4) enzim azonosítása

A jelenleg Nox4-ként ismert fehérjét azonosítása után először Renox-nak neveztük el, mivel igen magas expressziót mutat a vesében. A Nox4 fehérjét kódoló mRNS egy töredékét a Génbank EST (expressed sequence tags) adatbázisában azonosítottam. A szekvencia információ birtokában, RACE reakció segítségével klónoztam meg a teljes Nox4 cDNS-t. A Nox4 aminosav sorrendje nagyfokú, 57 %-os homológiát mutat a Nox2 szekvenciájával (17. ábra).

```

H. Nox4      MAVSWRSWLANEGVRLCLFIWLSMNVLLFWKTFLLYNQGPEYHYLHQLGLGLCLSR  58
M. Nox4      MAVSWRSWLANEGVRLCLFIWLSMNVLLFWKTFLLYNQGPEYHYLHQLGLGLCLSR  58
Consensus    W NEG+   +++WL +NV LF + +Y+ GP+Y Y ++LG L L+R
M. gp91phox MCNVAWNEGLSEFVILVWLCINVFLEINYYKVYDDGPKNYTRKLLGSALALR  54

ASASVLNLNCSLILLPMCRITLLAYLRGSQKVPSSRRTRRLLDKSRTHITCGVTICIFSGVHVAHL- 124
ASASVLNLNCSLILLPMCRITVLAAYLRGSQKVPSSRRTRRLLDKSKTLHITCGVTICIFSGVHVAHL- 124
A A+ LN NC LILL+CR +L++LRGS S R RR LD++ T H I + + +H AHL
APAACINFCMILLPVCRNLLSFLRGSSACCSTRIRQLDRNLTFHKQVAMMALHTAHTIAHLF 121

-----VNAL-----NFSV-----NYSDFVELNAARYDEDEPRKILF---TTVPGLTGVCMVVVL 171
-----VNAL-----NFSV-----NYSDFLELNAARYQNEDEPRKILF---TTIPGLTGVCMVVVL 171
VNA +S+ N +E++ LN AR + ++P L+ T + G+TG+ + + L
NVEWCVNARVGISDRYSIALSDIGDNEEY--LNFAREKIKNPEGGLYVAVTRLAGITGIVITLCI 186

FLMITASTYAIRVSNYDIFWYTHNLFFVFMILLTHVSGGLLKQYQTNLDTHPPGCISLNRTSSQNIS 238
FLMITASTYAIRVSNYDIFWYTHNLFFVFMILLTHVSGGLLKQYQTNVDTHPPGCISLNQTSQNMS 238
L++T+ST IR S ++FWYTH+LF +P++ L +H + +++ QT SL + N+
LITSTSTKTIIRSYFVFWYTHHLFVIFFIGLAIHGAERIVRGQT-----AESLEE---HNLD 242

L-PEYFSEHFHEPPEFGFSKPAEFTQHKFKVICMEEPRQANFPQTWLWISGPLCLYCAERLYRIR 304
I-PDYVSEHFHGSGLPRGFSKLEDYQKTLVKICLKEEPKQAHFPQTWIIWISGPLCLYCAERLYRCIR 304
+ + + E + K + K C PKG + P TW WI GP+ LY ERL R R
ICADKIEE-----WGK-----IKEC-PVFKGAGNPPMTWKWIVGPMFLYLCERLVRFWR 290

SNKPVTTIISVISHPSDVMEIRMVKENFKARPGQYITLHCPSVSALENHPFTLTMCPETETKATFGVHL 371
SNKPVTTIISVINHPSDVMEIRMIKENFKARPGQYIILHCPSVSALENHPFTLTMCPETETKATFGVHF 371
S + V I V+ HP +EL+M K+ FK GQYI + CP VS LE HPFTL P E F +H
SQQKVITKVVTHPFKTIELQGGKKGFMEVGQYIFVKCPKVSKEWHPFTLSAPEED--FFSIHI 355

KIVGDWTERFRDLLPPSSQDSEILPFIQSRNPKLYIDGPFSPFEESLNVEVSLCVAGIGVTPF 438
KVVDGWTFRDRLDLLPPSSQDSEILPFIHSRNPPLYIDGPFSPFEESLNVEVSLCVAGIGVTPF 438
++VGDWTE L D + F + PK+ +DGPF+ E+ +YEV + V IGVTPF
RIVGDWTEG---LFNACGDKQ--EFQDAWKLPKIAVDGPFGTASEDVFSYEVVMLVAGIGVTPF 416

ASILNTLLDDWKPY-----KLRLRYFIWVCRDIQSFRWFADLLCMLHNKFWQENRPDYVNIQLYL 498
ASILNTLLDDWKPY-----KLRLRYFIWVCRDIQSFWFADLLCVLHNKFWQENRPDYVNIQLYL 498
ASIL ++ W Y KL+++YF W+CRD +F+WFDLL +L + + N +++ +YL
ASILKSV--WYKYCDNATSLKKIYFYWLCRDTHAFWFADLLQLETTQMERNNANFLSYNIYL 480

SQTGDIQK-----IIGEKYHALNSRLFIGRPRWKLLFDEIAKYNRGKTVGVFCGPNL 552
SQTGDIQK-----IIGEKYHTLSRLFIGRPRWKLLFDEIAKNRGKTVGVFCGPNL 552
+ D Q I G K TL GRP W F IA + T+GVF CGP ++
TGWDESQANHFVHHDEEKDVTGLKQKTL-----YGRPNWDNEFKTIASEHPNTTIGVFLCGPEAL 542

SKTL--HKLSNQNS--YGTRFEYNKESFS 578
SKTL--HSLSNRNS--YGTFEYNKESFS 578
++TL ++SN+ G F +NKE+F
AETLSKQSISSNESGPRGVHFIENKFN 570

```

17. ábra A humán és az egér Nox4, valamint az egér Nox2 (gp91^{phox}) aminosavsorrendjének összehasonlítása

A Nox4 tartalmazza mindazokat a konzervált szerkezeti elemeket amelyek szükségesek a NADPH oxidáz aktivitáshoz. A fehérje transzmembrán régióit sötét háttérrel, a FAD kötésért felelős szekvencia motívumot szürke háttérrel, a NADPH kötésért felelős molekularészleteket pedig bekeretezve jelöltem. A „Consensus” sorban szereplő betűk aminosav azonosságot, a „+” szimbólumok pedig hasonlóságot jelölnek.

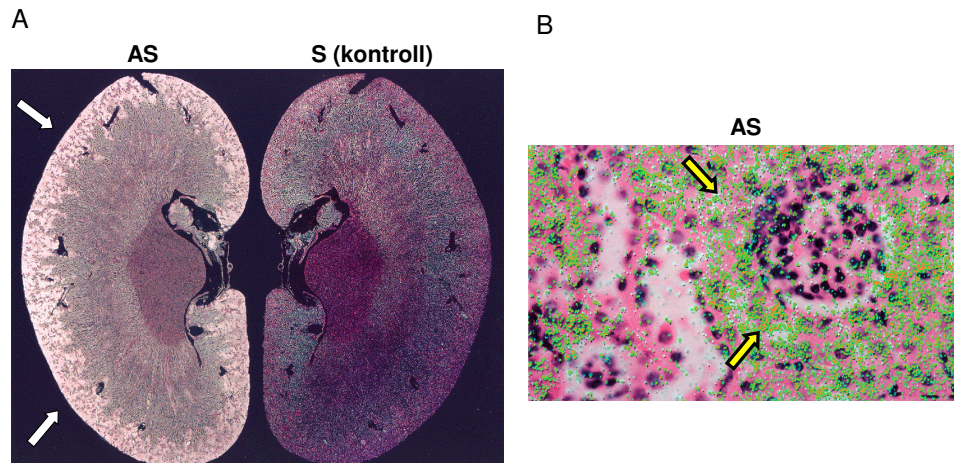
Eredményeim szerint a Nox4 felnőtt szervezetben kizárólag a vesében található (18. ábra), míg az embrionális élet folyamán a májban is megjelenik.



18. ábra A Nox4 mRNS expressziója human szövetekben

A Nox4 mRNS expresszióját Northern blot technikával vizsgáltuk.

In situ hibridizációs technikával sikerült meghatározni, hogy a Nox4, egér vesében a proximális tubulus sejteiben található nagy mennyiségben, de alacsonyabb szinten a vesevelő gyűjtőcsatornáiban is expresszálódik (19. ábra).

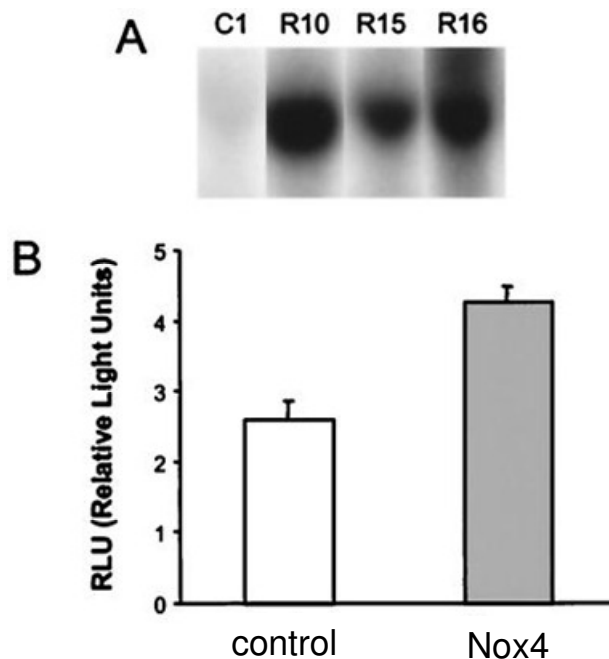


19. ábra Nox4 mRNS expressziójának vizsgálata *in situ* hibridizációval

A. Antiszenz (AS) és szenz (S) szondákkal végzett kísérletekben magas Nox4 expresszió látszik a vesekéregben, míg a velőállományban alacsonyabb expressziós szintet detektáltunk. A sötét látóterés mikroszkópos felvételeken a hibridizációs szignált világos szín jelzi. B. A nagyobb nagyítású képen a hibridizációs szignál a proximális tubulusra lokalizálódik. A H&E festett metszeten zöld szemcsék jelzik a hibridizációs szignált.

Azt is megállapítottuk, hogy az egér vese gyűjtőcsatornáiból kialakított MIMCD3 (Mouse Inner Medullary Collecting Duct) sejtvonal sejtei szintén expresszálják a Nox4-et. A Nox4 fehérjét kifejeztük NIH 3T3 sejtekben, (amelyek normálisan nem tartalmazzák a

fehérjét) és megfigyeltük, hogy a sejtek szuperoxidtermelése jelentősen fokozódott (20. ábra).



20. ábra Nox4 expresszió hatása NIH 3T3 sejtek szuperoxidtermelésére

A. Nox4 expresszió detektálása Nox4-et stabilan expresszáló NIH 3T3 sejtvonalakban (R10, R15, R16) és kontroll sejtekben (C1). B. Nox4-et stabilan expresszáló és kontroll sejtek szuperoxidtermelése.

A Nox4 tehát a fagociták NADPH-oxidáz enziméhez hasonló aktivitást mutatott, a termelt szuperoxid mennyisége azonban jóval alacsonyabb volt a neutrofil granulociták által termelnél. Érdekes módon a Nox4-et expresszáló sejtek proliferációja jelentősen lecsökkent és a sejtek az öregedés (cellular senescence) jeleit mutatták; jelentősen megnagyobbodtak, többszörös nyúlványokat növesztettek és sokmagvú sejtek is kialakultak. A sejtöregedést létrehozó hatást valószínűleg nem tekinthetjük a Nox4 fiziológiás funkciójának, hanem inkább egy heterológ expressziós rendszerben megfigyelhető "mellékhatásnak", ami valószínűleg a sejtek által termelt szuperoxid toxicitásának tulajdonítható. A Nox4-et később, tőlünk függetlenül, három másik kutatócsoport is azonosította (54;103;104). A Nox4 szabályozásáról viszonylag keveset tudunk. A Nox1, Nox2 és Nox3 fehérjékhez hasonlóan a Nox4 is komplexet alkot a p22^{phox}-al (105;106). A fagocita és a colon oxidáz citoszolikus komponenseihez hasonló, Nox4-el együttműködő fehérjéket viszont nem ismerünk. A Poldip2 nevű fehérjéről kimutatták, hogy az a p22^{phox}-hoz kötődve fokozza a Nox4 aktivitását (107). A Nox4 szabályozása valószínűleg elsősorban transzkripció szintű. A TGF-beta például több különböző sejtben is jelentősen fokozza a Nox4 expresszióját, és a kezelés

után 12-24 órával a sejtek H_2O_2 termelése jelentősen és tartósan fokozódik (108;109). A Nox4 funkciója jelenleg ismeretlen. A Nox4 hiányos egerek életképesek és nem mutatnak nyilvánvaló betegség tüneteket (Péterfi és mtsai., nem publikált adat). A Nox4 fehérje enzimaktivitása, valamint az a tény, hogy a vesében nagy mennyiségben található, felveti egy izgalmas funkció lehetőségét. Régóta ismert, hogy a vörösvértestek termelődését szabályozó eritropoetin a vesében termelődik és szintézisének legfontosabb szabályozója a vér oxigéntartalma. A folyamat vesén belüli elhelyezkedése jelenleg még nem világos. Bizonyos kísérleti adatok a proximális tubulus sejtjeit jelölik meg az oxigén-érzékelés és az eritropoetin szintézis helyszínéként (110), míg más adatok szerint a peritubuláris térben található fibroblaszt-szerű sejtekben zajlik a folyamat (111). Izgalmas kérdés, hogy vajon a Nox4 szerepet játszik-e az eritropoetin termelés szabályozásában?

A vese oxigén-érzékelésének egyik modellje szerint a jelátvitel szempontjából "semleges" oxigén molekula az oxigén koncentrációjával arányosan reaktív oxigénné alakul és úgy fejt ki az eritropoetin gén expresszióját szabályozó hatását (112). Ugyan az oxigénérzékelésben kulcsszerepet játszó HIF (Hypoxia Inducible Factor) szabályozásában jelenleg elsősorban a prolin hidroxiláz enzimeket tartjuk fontosnak (113), több közelmúltban publikált eredmény is arra utal, hogy a Nox4-nek szerepe lehet az oxigénérzékelésben, a HIF-2 α szint szabályozásán keresztül (114;115). Azt azonban jelenleg nem tudjuk, hogy ez a kapcsolat az eritropoetint termelő sejtekben is megvalósul-e.

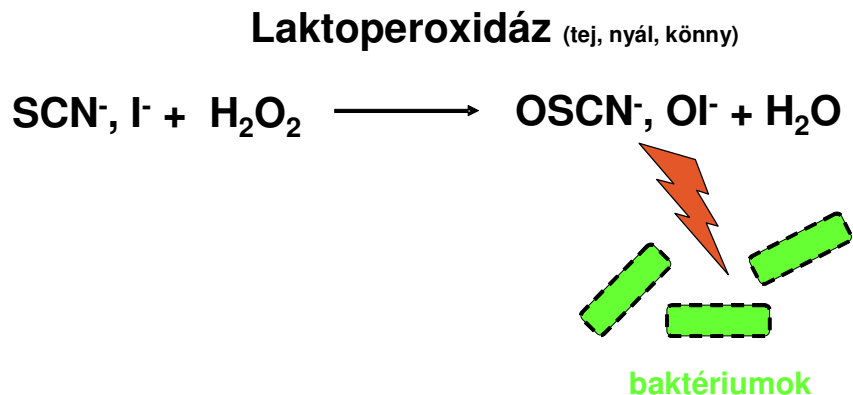
Egy másik izgalmas lehetőség, hogy a Nox4, a fagocita sejtekben található homológjához hasonlóan, védekező funkciót lát el azáltal, hogy reaktív oxigén metabolitokat juttat a tubulusokon áthaladó szűrletbe és ezzel mintegy fertőtleníti azt. Tény hogy a vizeletben kimutatható a H_2O_2 , amely szuperoxid anionokból képződik. Lehetséges, hogy a vizelet H_2O_2 tartalmának szerepe van a húgyutak sterilitásának fenntartásában.

A Nox4 nemcsak a vesében hanem számos más szövetben, sejtben is megtalálható. Az endotél sejtek is expresszálják a Nox4-et (116;117) és lehetséges, hogy az enzim a kapilláris sűrűség szabályozásán keresztül hatással van a szövetek vérellátására (58). Egy másik izgalmas expressziós helyszín a differenciálódó miofibroblaszt, amely TGF-beta hatására Nox4-függő módon H_2O_2 -t termel. Két munkacsoport is leírta, hogy a termelt H_2O_2 -nak fontos szerepe van a miofibroblasztok differenciálódásában, amit a simaizom aktin expressziójának fokozódása és extracelluláris mátrix fehérjék szintézise jellemez (108;118). A miofibroblasztok fontos szerepet játszanak a sebgyógyulásban és főszereplői a szervfibrozis folyamatának is. A Nox4 expresszió siRNS technikával történő gátlása egérben csökkentette a bleomycinnel indukált tüdőfibrozis súlyosságát, ami felveti annak a lehetőséget, hogy a Nox4 gyógyszeres gátlása emberben is antifibrotikus hatású lehet (118). Egy, a Nox4-et és Nox1-et gátló gyógyszerjelöltet a közeljövőben fognak kipróbálni a diabéteszes vesekárosodás gyógyításában (forrás: www.genkyotex.com).

5.2.3 Duox enzimek vizsgálata

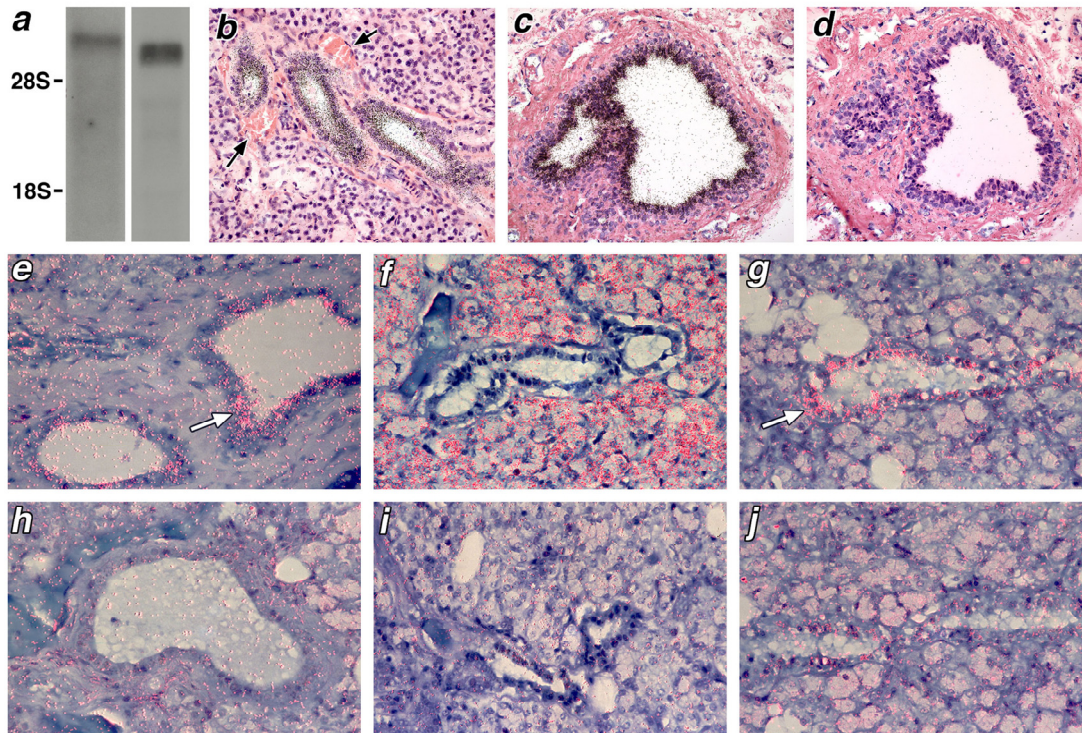
5.2.3.1 A Duox enzimek kimutatása különböző nyálkahártya felszíneken

A bevezetőben már említettem, hogy a Duox2 biztosítja a pajzsmirigy hormonok szintézisében felhasznált jodid ionok oxidálásához szükséges hidrogén peroxidot. A jodid ionok oxidálását a pajzsmirigyben a TPO enzim végzi. Közel negyven éve ismert, hogy a nyálban, tejben, könnyben található egy enzim, a laktoperoxidáz (LPO) amelynek kórokozó ellenes hatása van (119). Az enzim működése nagyon hasonló a pajzsmirigyben található TPO működéséhez, ugyanis az LPO hidrogén peroxid (H_2O_2) jelenlétében oxidálja a jodid ionokat, ami reaktív jódvegyületek képződését eredményezi (21. ábra). Ennél fontosabb azonban, hogy a LPO a tiocianát (SCN^-) iont is képes oxidálni és hipotiocianáttá alakítani (21. ábra).

**21. ábra A laktoperoxidáz (LPO) enzim működése**

Az LPO H_2O_2 felhasználásával oxidálja az exokrin szekréciókban található jodid és tiocianát ionokat. A reakcióban különböző mértékben oxidált, antibakteriális termékek képződnek, amelyek közül legfontosabb a hipotiocianát ($OSCN^-$).

Ez azért lényeges, mert a tiocianát jóval nagyobb koncentrációban található az említett szekréciókban, mint a jodid (a nyálban például elérheti a több száz mikromólos koncentrációt). Munkánk előtt azonban ismeretlen volt, hogy honnan származik a H_2O_2 a LPO által katalizált reakcióhoz. Pajzsmirigyben a TPO számára a Duox NADPH oxidáz enzimek termelik a H_2O_2 -t. A TPO és az LPO által katalizált reakciók közötti hasonlóság alapján felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon lehetséges-e, hogy Duox enzimek termelik a H_2O_2 -t az LPO számára is. Először Northern blot technika segítségével vizsgáltuk a Duox enzimek expresszióját, humán- és patkány nyálmirigyben (22. ábra).



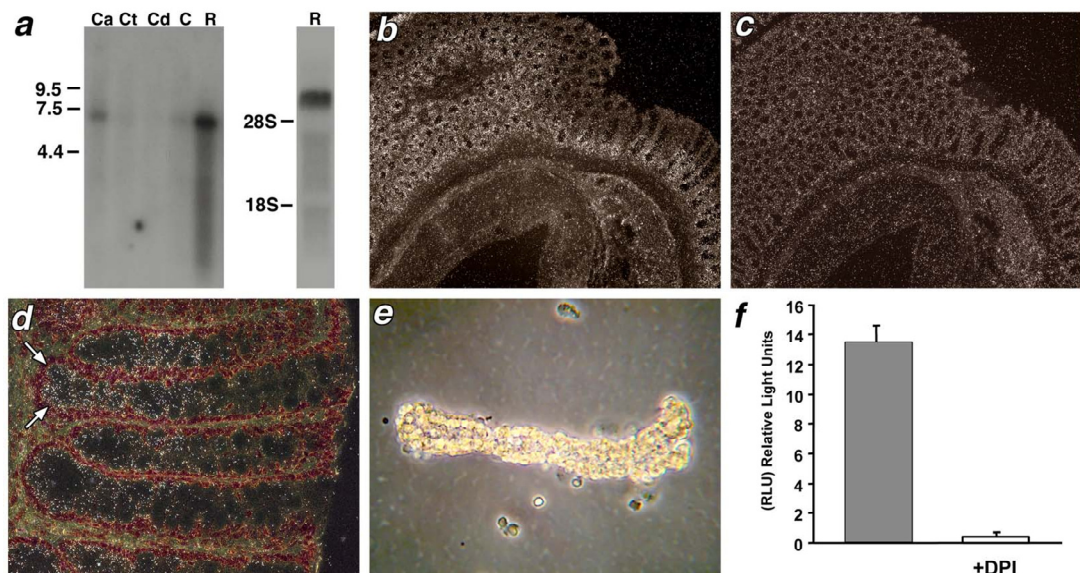
22. ábra Duox2, LPO és NIS mRNS-ek detektálása patkány és humán nyálmirigyben

a. A Duox2 mRNS detektálása humán (bal oldali panel) és patkány (jobb oldali panel) nyálmirigyben
 b-d. A Duox2 mRNS kimutatása patkány nyálmirigyben *in situ* hibridizációval. H&E festés. A nagyobb kivezetőcsövekben (b és c) megfigyelhető sötét szemcsék jelzik az antiszensz szondával létrejövő hibridizációs szignált. A kontroll (szenz) szondával inkubált szövetmintában (d) nem látható hibridizáció. e-j Duox2 (e), LPO (f) és NIS (g) mRNS-ek detektálása humán parotisban. Giemsa festés. Az antiszensz szondákkal kialakuló hibridizációs szignált piros szemcsék jelzik. h-j. Kontroll (szenz) szondákkal inkubált minták képe.

A 22. ábrán látható, hogy humán és patkány nyálmirigyben egyaránt detektáltuk a Duox2 mRNS-t. Ez után arra voltunk kíváncsiak, hogy a nyálmirigyben belül hol található a Duox2. Ezt *in situ* hibridizáció segítségével vizsgáltuk, patkány submandibuláris nyálmirigyében (22. ábra, b-d panelek). Látható, hogy a hibridizációs szignál jól körülhatárolhatóan a kivezetőcsőrendszer végső szakaszán jelenik meg és a szájüreghez futó, fő kivezetőcső is nagy mennyiségben tartalmazza a Duox2-t. A H&E festés mellett jól látszik, hogy a kivezetőcsöveket gazdag kapillárisrendszer veszi körül, ami valószínűleg a H_2O_2 termelés intenzív oxigénigényéhez szükséges. Következő kísérleteinkben emberi nyálmirigyben *in situ* hibridizáció segítségével detektáltuk az LPO, a Duox2 expresszióját, valamint a nátrium-jodid szimporter (NIS) lokalizációját is. Az *in situ* hibridizációs szignál mutatja, hogy a LPO a mirigyvégkamrákban termelődik (22. ábra, f panel), amelyek homogén, intenzív jelölődést mutatnak az LPO-ra. Az előzőekben már említettem, hogy az LPO tiocianátot és jódot oxidál, ezért ezeknek az anionoknak jelentősen fel kell dúsulniuk a nyálban. A jodid ionok nyálba

történő kiválasztását már Claude Bernard is leírta a múlt században, azonban ennek a jelentősége ismeretlen volt. Ez a folyamat ugyanannak a nátrium-jodid szimporternek (NIS) a segítségével történik, amely a pajzsmirigy jódfelvételét is mediálja (120). A 22. ábra g paneljén látható, hogy a NIS a kisebb kivezetőcsövekben expresszálódik. Végül a nagyobb, terminális kivezetőcsövekben található a Duox2, amely a H_2O_2 -ot termeli (22. ábra, e panel). A Duox elhelyezkedése biztosítja, hogy a H_2O_2 a szájüreghez közel képződik nagyobb mennyiségben, ami valószínűleg fontos a hatásosság szempontjából, valamint megelőzheti a mirigyszövet esetleges károsodását is.

További kísérleteinkben a Duox2-t a gasztrointesztinális traktusban is sikerült kimutatnunk, ahol elsősorban a rectum nyálkahártyájának kriptáiban expresszálódik (23. ábra).

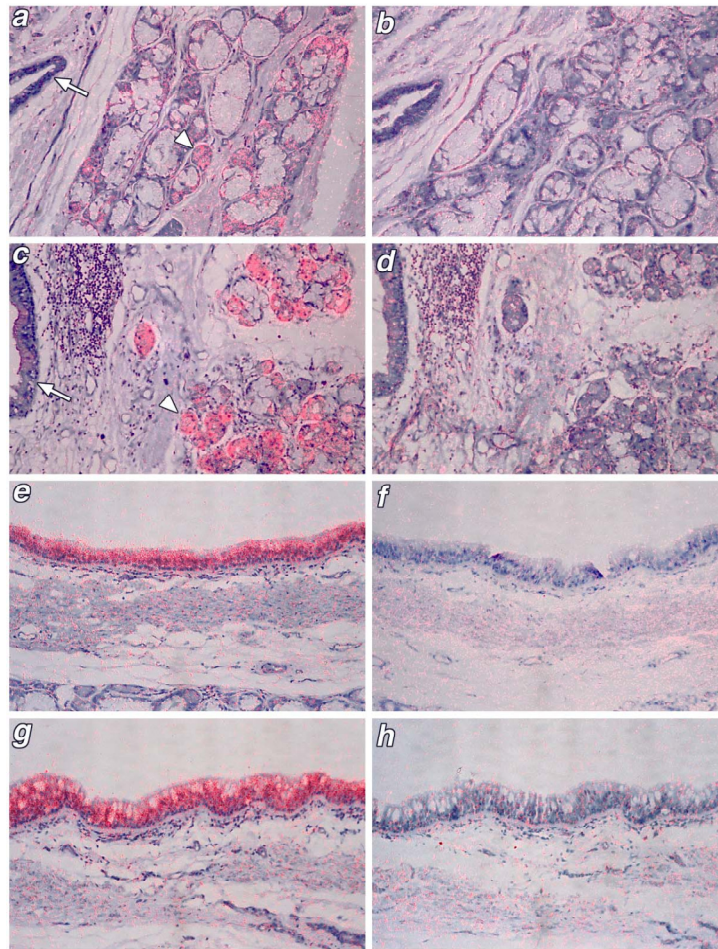


23. ábra Duox2 expresszió vizsgálata gasztrointesztinális szövetekben

a. A Duox2 mRNS kimutatása humán (bal oldali panel) és patkány vastagbélben (jobb oldali panel) Northern blot technikával. A humán gasztrointesztinális mRNS panel a következő vastagbél szakaszokat reprezentálja: Ca - colon ascendens, Ct –colon transversum, Cd – colon descendens, C – cecum, R – rektum. b-d. Duox2 expresszió kimutatása *in situ* hibridizációval patkány rektumban. A sötét látóteres mikroszkópos felvételen fehér szemcsék jelzik a hibridizációs szignált (b, antiszenz szonda; c, kontroll (szenz) szonda; c, antiszenz szonda) e. Izolált rektális kripták fáziskontraszt mikroszkópos felvétele. f. Izolált rektális kripták H_2O_2 termelésének mérése kemilumineszcenciás technikával.

Azt is megfigyeltük, hogy a patkány rektumból preparált kripták H_2O_2 -t termeltek és a folyamat gátlható volt DPI-vel, a Nox enzimek hatásos (bár nem túl specifikus) gátlószerével. Patkány rektumban sikerült kimutatnunk az LPO expressziót is. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a Duox2 és az LPO ebben a szövetben is együttműködhet, aminek a bélflóra integritásának fenntartásában lehet szerepe.

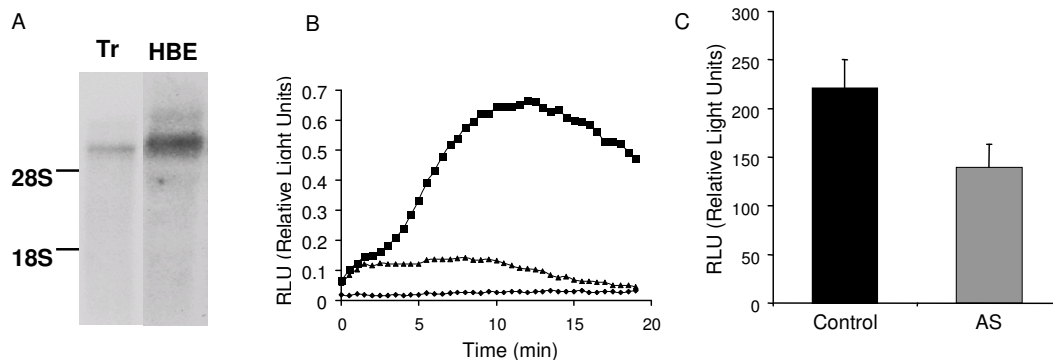
Egy amerikai munkacsoport jelentős LPO mennyiséget talált birka légutak szekrétiójában is, ahol az LPO a szolubilis fehérjék mintegy 1 %-t képezi (121). Azt is kimutatták, hogy a LPO gátlása csökkenti a légutak baktérium-ellenes aktivitását. Azt azonban, hogy hol termelődik az enzim, nem vizsgálták. A 24. ábra mutatja, hogy humán tracheában és a bronchusokban kiterjedt submucosális mirigyrendszer helyezkedik el és a LPO-t kódoló mRNS ezekben a mirigyekben található.



24. ábra LPO és Duox1 mRNS-ek kimutatása humán légutakban

a-d: LPO mRNS kimutatása humán trachea (a,b) és bronchus (c,d) szubmukózáls mirigyeiben. Giemsa festés. Az antiszenz szondákkal (a,c) kialakuló hibridizációs szignált piros szemcsék jelzik. b,d Kontroll (szenz) szondákkal inkubált minták képe. e-h: Duox1 mRNS kimutatása humán trachea (e,f) és bronchus (g,h) epithel sejtjeiben. Giemsa festés. Az antiszenz szondákkal (e,g) kialakuló hibridizációs szignált piros szemcsék jelzik. f,h: Kontroll (szenz) szondákkal inkubált minták képe.

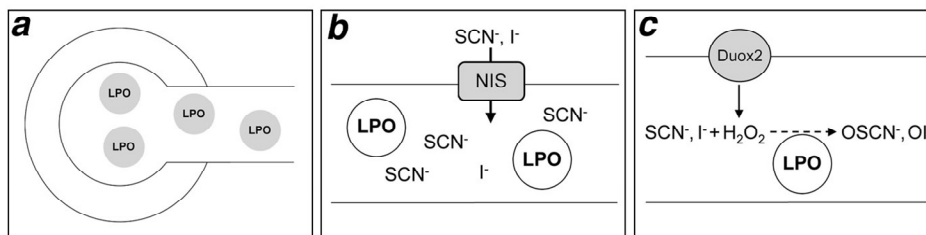
A kiterjedt expresszió arra utal, hogy az emberi légutak is jelentős mennyiségű LPO-t tartalmaznak. A következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy melyik enzim lehet a H_2O_2 forrása a légutakban. Northern blot és *in situ* hibridizációs kísérleteink eredménye alapján ez a Duox1, amely a légutakat borító csillószőrös hengerhámsejtekben expresszálódik (24. ábra, e és g panelek). Azt is megállapítottuk, hogy primer humán bronchiális epithel sejtek expresszálják a Duox1-et és jelentős H_2O_2 -termelésre képesek. A H_2O_2 válasz Duox1-specifikus antiszenz oligonukleotidokkal történő előkezelés után csökken (25. ábra).



25. ábra Duox expresszió és aktivitás kimutatása humán bronchiális epithel (HBE) sejtekben

A. Duox1 mRNS detektálása humán tracheából (Tr) és HBE sejtekből preparált RNS-ből Northern blot technikával. B. HBE sejtek H_2O_2 termelésének mérése kemilumineszcens technikával (négyzet, ionomycinnel stimulált sejtek; háromszög, DPI előkezelés után ionomycinnel stimulált sejtek; gyémánt, nem stimulált sejtek). C: Duox1 antiszenz oligonukleotid hatása HBE sejtek ionomycinnel stimulált H_2O_2 termelésére.

Kísérleteinkben tehát megállapítottuk, hogy a Duox fehérjék számos epithel sejtfeleségben expresszálódnak és valószínűleg a Duox enzimek biztosítják a H_2O_2 -t az LPO által katalizált reakciókhoz. A pajzsmirigyen kívüli Duox expressziót dokumentáló eredményeinket később több munkacsoport is megerősítette (122-124). A Duox-LPO rendszer általunk felállított modelljét a 26. ábra mutatja.



26. ábra A Duox-LPO rendszer modellje (nyálmirigy)

a. Az LPO a mirigyvégkamrákban termelődik. b. A tiocianát ionok bekonzentrálását a NIS végzi, amely nyálmirigyben a kisebb kivezetőcsövekben expresszálódik. c. A nagyobb kivezetőcsövekben található a Duox, amely H_2O_2 -t termelve aktiválja a védekező rendszert.

Úgy gondoljuk, hogy a Duox-LPO rendszernek fontos szerepe lehet a nyálkahártyákhoz kötődő védekezési mechanizmusokban. Moskwa és mtsai később kimutatták, hogy a patkányból izolált bronchiális epithel sejtek Duox2-t expresszálnak és a sejtek LPO és tiocianát jelenlétében jelentős antibakteriális aktivitással rendelkeznek, ami a Duox-LPO rendszer bármelyik komponensének hiánya vagy gátlása esetén megszűnik (125). Hasonló eredményeket publikáltak Conner és mtsai is (126). A Duox-LPO védekező rendszer *in vivo* fontosságát azonban csak genetikailag módosított állatokon lehetne tanulmányozni. Problémát jelenthet azonban, hogy az egérmodellek valószínűleg nem lesznek alkalmasak a Duox fehérjék légutakban játszott szerepének tisztázására. Az egér és a nagy emlős légutak szerkezete ugyanis jelentősen eltér egymástól. A nagyobb emlősök légútjai kiterjedt mirigyrendszerrel rendelkeznek, amelynek fontos szerepe van a légutak felszínének nedvesítésében (24. ábra). Egérben és patkányban ezek a mirigyek hiányoznak. Ennek a különbségnek igen nagy az orvosi jelentősége, ugyanis a cisztás fibrózis (CF) betegség egérmodelljében például nincs komoly tüdő fenotípus, ami az emberi CF betegségben a legsúlyosabb elváltozás. E problémára megoldást jelenthetnek azok a közelmúltban kifejlesztett állatmodellek, ahol nagyobb testű emlősökben, menyétben és birkában szakították meg a CFTR gén működését (127;128). Ezekben a génmódosított állatokban már kialakult a CF-re jellemző tüdőelváltozás. Elképzelhető, hogy a Duox fehérjék légutakban játszott szerepének tisztázása szintén csak hasonló modellek létrehozásával lesz majd lehetséges.

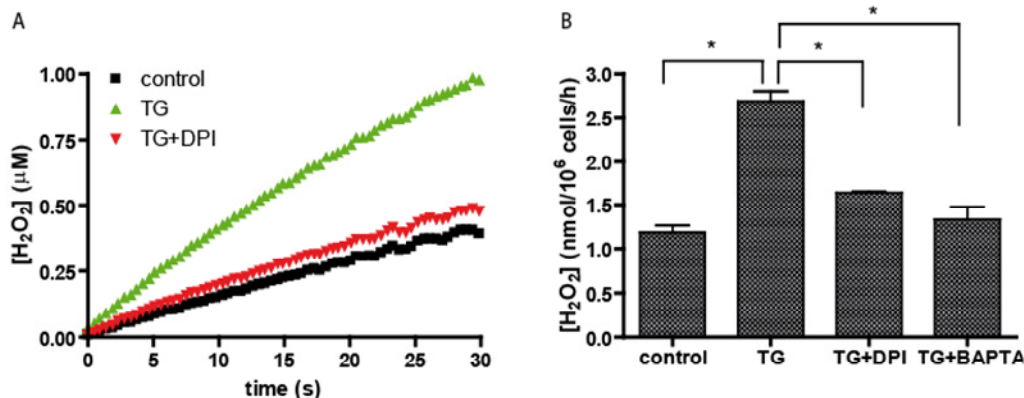
A Duox-LPO rendszer működése több ponton is sérülhet a CF-es betegek tüdejében. A Duox-LPO rendszert leíró cikkünkben elsőként vetettük fel azt a lehetőséget, hogy CFTR hiányában károsodhat a légutakat borító folyadék filmbe irányuló SCN⁻ transzport, ugyanis a CFTR SCN⁻-re is permeábilis. Később két munkacsoport is kimutatta, hogy a CF-es epithel sejtek tiocianát transzportja valóban károsodik (125;126). CF-ben további problémát jelenthet, hogy a betegség folyamán a légutak szubmukózális mirigyei degenerálódnak, ami az LPO termelés jelentős csökkenéséhez vezethet.

Bár emlősök esetén még nincs genetikai bizonyíték a Duox fehérjék immunvédekezésben játszott szerepére, *Drosophilán* végzett génmanipulációs kísérletekben bebizonyították, hogy a Duox szerepet játszik a tápcsatorna immunvédekezésében (129).

5.2.3.2 A Duox1 funkciójának vizsgálata húgyhólyag epithel sejtekben

A Duox enzimek a légutakon kívül még számos más szervben megtalálhatók, az urotél sejtekben azonban még nem mutatták ki a jelenlétüket és működésüket. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a frissen izolált urotél sejtek termelnek-e H₂O₂-t. Korábban már említettem, hogy a Duox enzimek aktivitása kalcium-függő, ezért

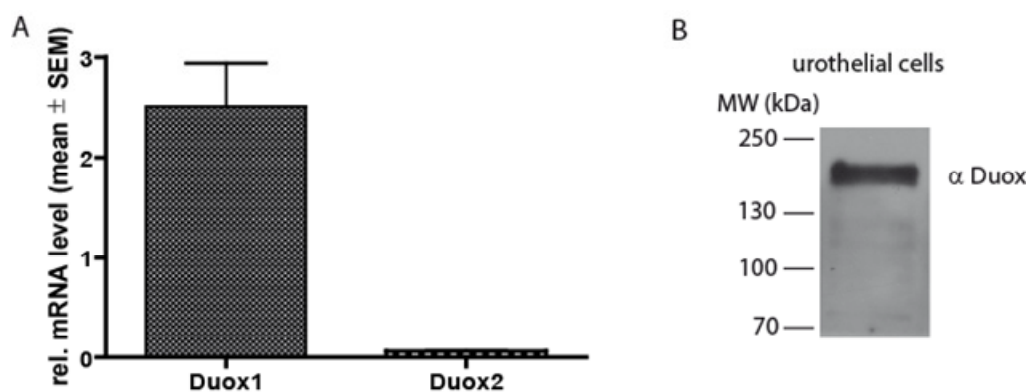
kísérleteinkben a thapsigargin (TG) használtuk stimulusként, amely az ER Ca^{2+} -ATP-áz gátlásával és következményes Ca^{2+} -influx létrehozásával emeli a sejtek Ca^{2+} -koncentrációját. A 27. ábrán látható, hogy a TG fokozta az urotél sejtek H_2O_2 termelését, ami gátolható volt DPI-vel.



27. ábra Primer egér urotél sejtek H_2O_2 -termelésének mérése A. Thapsigargin (TG) stimulálást követően, 30 percen keresztül mértük a sejtek által termelt H_2O_2 -ot. Kontrollként nem stimulált sejteket használtunk. Az ábrán egy reprezentatív mérés eredménye látható három hasonló eredményű kísérletből.

B. TG-al stimulált H_2O_2 termelés gátlása DPI-vel vagy BAPTA-val. Az ábra három független kísérletből származó adatok átlagát $\pm$ SEM mutatja.

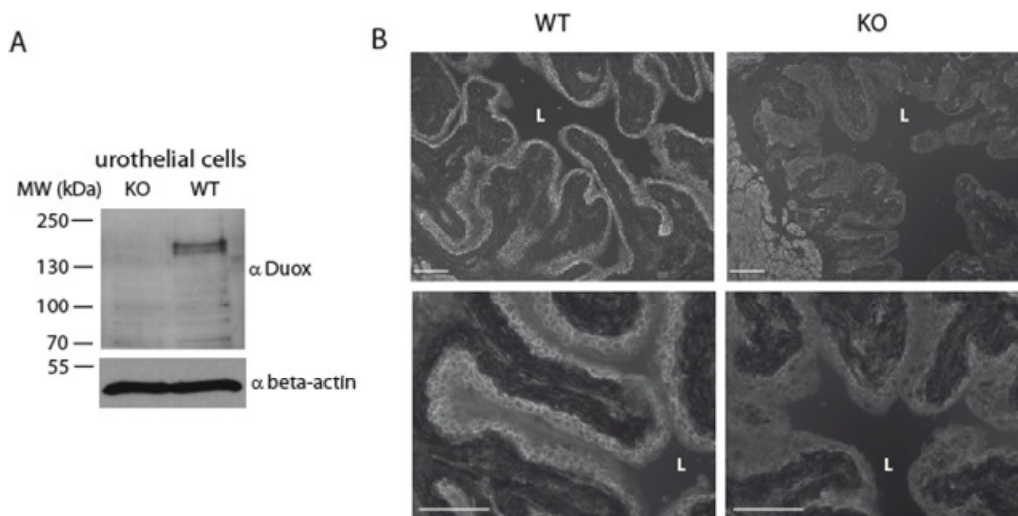
A H_2O_2 termelés Ca^{2+} -függése felvetette annak a lehetőségét, hogy a folyamat hátterében a Duox enzimek aktiválódása áll. A következőkben a Duox enzimek expresszióját vizsgáltuk RNS szinten, QPCR technikával (28. ábra, A panel).



28. ábra Duox expresszió detektálása mRNS és fehérje szinten egér urotéliumban A. Relatív Duox1 és Duox2 mRNS expressziós szintek egér urotéliumban QPCR-el detektálva. B. Duox fehérje kimutatása egér urotéliumban Western blot technikával.

Megállapítottuk, hogy az urotél sejtek Duox1-et expresszálnak nagy mennyiségben, míg a Duox2 szintje jóval alacsonyabb. A Duox expressziót fehérje szinten is sikerült

kimutatnunk (28. ábra, B panel). Annak bizonyítására, hogy valóban a Duox1 felelős a stimulált H_2O_2 termelésért, Duox1 knockout egerekből preparált urotél sejteken végeztünk kísérleteket. A Duox1-hiányos egértörzset a Lexicon Genetics cégtől szereztük be. A Duox1-hiányos egértörzset úgy hozták létre, hogy a Duox1 gént retrovirális vektor segítségével ún. géncsapda (gene trap) módszerrel ütték ki (130). A Duox1 knockout sejtekből urotél sejteket izoláltunk és Western blot segítségével vizsgáltuk a Duox1 jelenlétét.



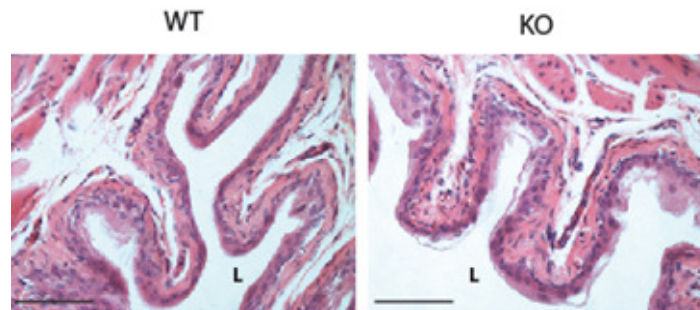
29. ábra Duox fehérje expresszió vizsgálata vad típusú és Duox1 knockout egerekből származó urotéliumban

A. Duox fehérje detektálása Duox1 knockout és vad típusú egerekből származó urotéliumban Western blot technikával. B. Duox immunhisztokémiai detektálása vad típusú (bal oldali panelek) és Duox1 knockout (jobb oldali panelek) egerekből származó húgyhólyag metszeteken.

A 29. ábrán látható, hogy a KO sejtekből származó szövetben nem detektálható a Duox1, a vad típusú sejtekben viszont jelen van a fehérje. A kísérletben felhasznált Duox antitest nem tesz különbséget a Duox1 és Duox2 között, ezért ezzel a kísérlettel azt is bizonyítottuk, hogy a Duox1 hiányában nem jön létre a Duox2 kompenzatórikus expresszió növekedése. A Western blot kísérletekben alkalmazott antitest a Duox1 immunhisztokémiai detektálására is alkalmasnak bizonyult (29. ábra).

A bevezetőben már említettem, hogy alacsonyabb rendű állatokban a Duox enzimek szerepet játszanak az extracelluláris mátrix stabilizációjában. A Duox-hiányos *C. elegans* egyedeken például jellegzetes hólyagokat figyeltek meg, amik a kutikula stabilizáció zavarát jelzik (64). Felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon nem tölt-e be hasonló, stabilizáló szerepet az emlős hámban is a Duox1. A kérdést megválaszolandó összehasonlítottuk Duox1 knockout és vad típusú egerek húgyhólyagjainak szövettani képét. A hematoxilin-eozin festett metszeteken jól látszik, hogy a Duox1 hiányában nincs nyilvánvaló morfológiai

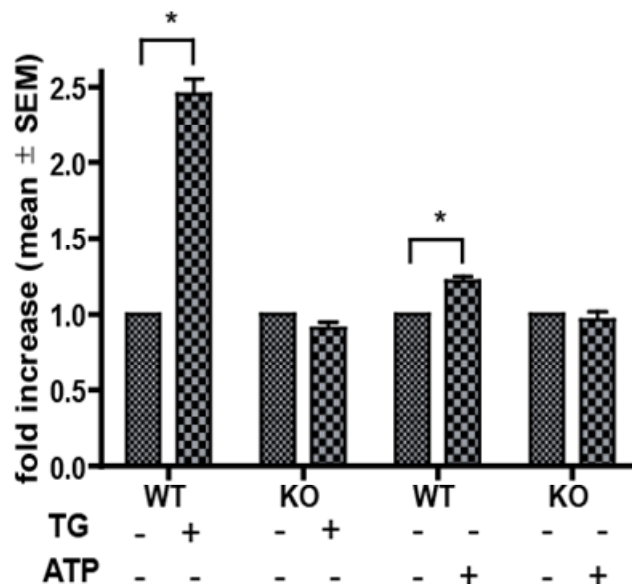
változás, ami arra utal, hogy a Duox1 hiánya nem okoz komoly defektust a hám szerkezetében (30. ábra).



30. ábra Vad típusú (WT) és Duox1 knockout (KO) egérből származó húgyhólyag szövettani képe

A hematoxinilín-eozin festett metszeteken „L” jelöli a húgyhólyag lumenét.

Ezt követően összehasonlítottuk a vad típusú és Duox1 knockout sejtek thapsigarginnal indukált H_2O_2 termelését. Az 31. ábrán látható, hogy a knockout sejtek H_2O_2 termelése – a vad típusú sejtekkel ellentétben - nem fokozódik thapsigargin hatására. A thapsigargin vad típusú és knockout sejtekben hasonló Ca^{2+} -szignált hozott létre, vagyis a knockout sejtek elmaradt H_2O_2 válaszáért egyértelműen a Duox1 hiánya a felelős. A thapsigarginon kívül a receptor agonista ATP is fokozta a vad típusú sejtek H_2O_2 termelését és ez a válasz sem jött létre knockout sejtekben.

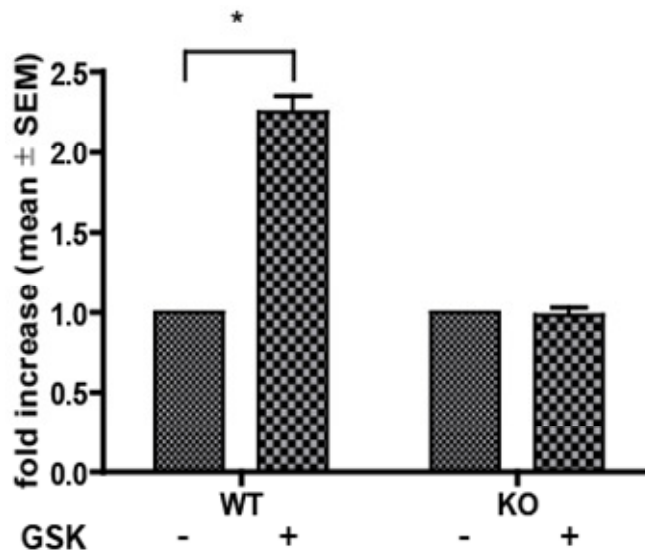


31. ábra H_2O_2 -termelés mérése vad típusú és Duox1 knockout urotél sejteken

A sejteket 200 nM thapsigarginnal vagy 10 μ M ATP-vel stimuláltuk. Az ábrán négy kísérlet átlaga $\pm$ SEM látható.

A Duox1-hiányos egérmodell lehetőséget nyújthat a fehérje funkciójának azonosítására. Természetesen felmerült bennünk a lehetőség, hogy a Duox1 által termelt H_2O_2 esetleg szerepet játszik a húgyhólyagba bejutó kórokozók elpusztításában. Ezt a lehetőséget úgy vizsgáltuk, hogy *E. coli* baktériumokat juttattunk az állatok húgyhólyagjába és 24 óra után vizsgáltuk a túlélő baktériumok számát. A Duox1-hiányos és a kontroll állatok hólyagjából azonos számú baktériumtelep tenyésztett ki, ami a Duox1 antibakteriális hatása ellen szól. Azt is megállapítottuk, hogy vad típusú állatokban a fertőzés nem vezetett a Duox1 expresszió fokozódásához, ami szintén a védekező szerep ellen szól. Megvizsgáltuk azt is, hogy a húgyhólyagban expresszálódik-e a LPO, amely a legtöbb szövetben együttműködik a Duox enzimekkel. Azt találtuk, hogy a hólyagban nem expresszálódik az enzim, míg a kontrollként használt tejmirigyben jelentős mennyiségű LPO-t detektáltunk.

A húgyhólyag működése során jelentős mechanikai stressznek van kitéve. Számos kísérleti adat utal arra, hogy az urotél sejteknek aktív szerepük van a mechanikai hatások érzékelésében és az azokra adott válaszok kialakításában. A mechanikai hatások jelátvitelénél megváltozik a sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja, ami elsősorban a TRPV4 csatornák aktiválódásának következménye (131;132). Felmerült bennünk a lehetőség, hogy a Duox1 mint Ca^{2+} -aktivált enzim esetleg szerepet játszik a mechanotranszdukció folyamatában. A TRPV4 csatornák farmakológias aktiválása (133) növelte a vad típusú urotél sejtek H_2O_2 termelését, míg a knockout sejtek H_2O_2 termelése nem változott (32. ábra).

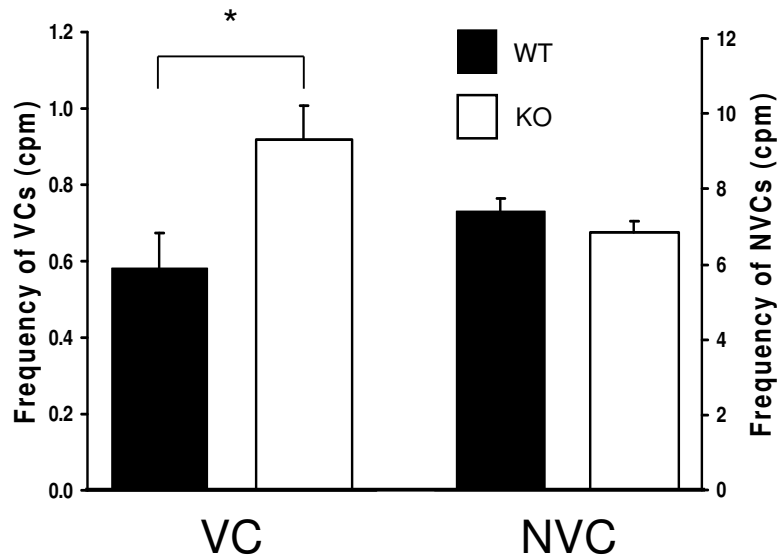


32. ábra A TRPV4 agonista GSK hatása vad típusú és Duox1 knockout urotél sejtek H_2O_2 termelésére

A sejteket 10 nM GSK1016790A TRPV4-agonistával stimuláltuk. Az ábra két kísérlet átlagát mutatja.

A következőkben izolált húgyhólyagon vizsgáltuk a szerv mechanikai stresszre adott válaszait. Benyó Zoltán kutatócsoportjával együttműködve, *in vivo* cisztometriás kísérletekben kimutattuk, hogy a vad típusú és Duox1 knockout állatok ürítő kontrakciói

hasznló térfogatoknál alakultak ki, azonban az ürítő kontrakciók frekvenciája szignifikánsabban magasabb volt a Duox1 knockout állatokban (33. ábra). A nem-ürítő kontrakciók frekvenciájában nem volt különbség a két egértörzs között.



33. ábra Húgyhólyag működés vizsgálata vad típusú és Duox1 knockout egerekben

Az *in vivo* cisztometriás kísérletek eredményeit összefoglaló ábra. Ürítő (VC) és nem-ürítő (NVC) kontrakciók frekvenciája vad típusú (WT) egerek és Duox1 knockout (KO) egerek húgyhólyagjaiban.

Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy a Duox1 szerepet játszik a húgyhólyag mechanotranszdukciójában, azonban jelenleg nem tudjuk megmondani hogy mi lehet a Ca^{2+} -szignál hatására keletkező H_2O_2 pontos szerepe. A H_2O_2 több mechanizmussal is befolyásolhatja az epithel sejtekben, vagy azokkal szomszédos sejtekben zajló jelátviteli folyamatokat. Ismert például, hogy a H_2O_2 gátolja a protein tirozin foszfatáz enzimek aktivitását, ami a tirozin-kináz receptorok jelátvitelének erősítéséhez vezethet (134). A H_2O_2 különböző ioncsatornák működését is befolyásolhatja. Növényekben és *Drosophilában* is leírták azt a jelenséget, hogy a NADPH oxidáz által termelt H_2O_2 , Ca^{2+} -influxot aktivál (135;136). Növények esetében ez a jelátviteli mechanizmus szerepet játszik a gyökércsúcs növekedésében.

A Duox fehérjék vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a Duox fehérjék aktivitása nem korlátozódik a pajzsmirigyre, hiszen számos más epithel sejtben is megtalálhatók. Valószínű, hogy az LPO antibakteriális működését támogatva részei a nyálkahártyákhoz kötődő immunmechanizmusoknak, azonban az urotéliumban expresszáldó Duox1-nek feltehetőleg nincs antibakteriális

dc_250_11

funkciója. Eredményeink arra utalnak, hogy az itt található Duox1 a mechanotranszdukcióban játszhat szerepet. A közeljövőben szeretnénk azonosítani a Duox1 által termelt H_2O_2 célpont fehérjéit és akkor közelebb kerülhetünk a Duox1 hámsejtekben játszott szerepének megismeréséhez.

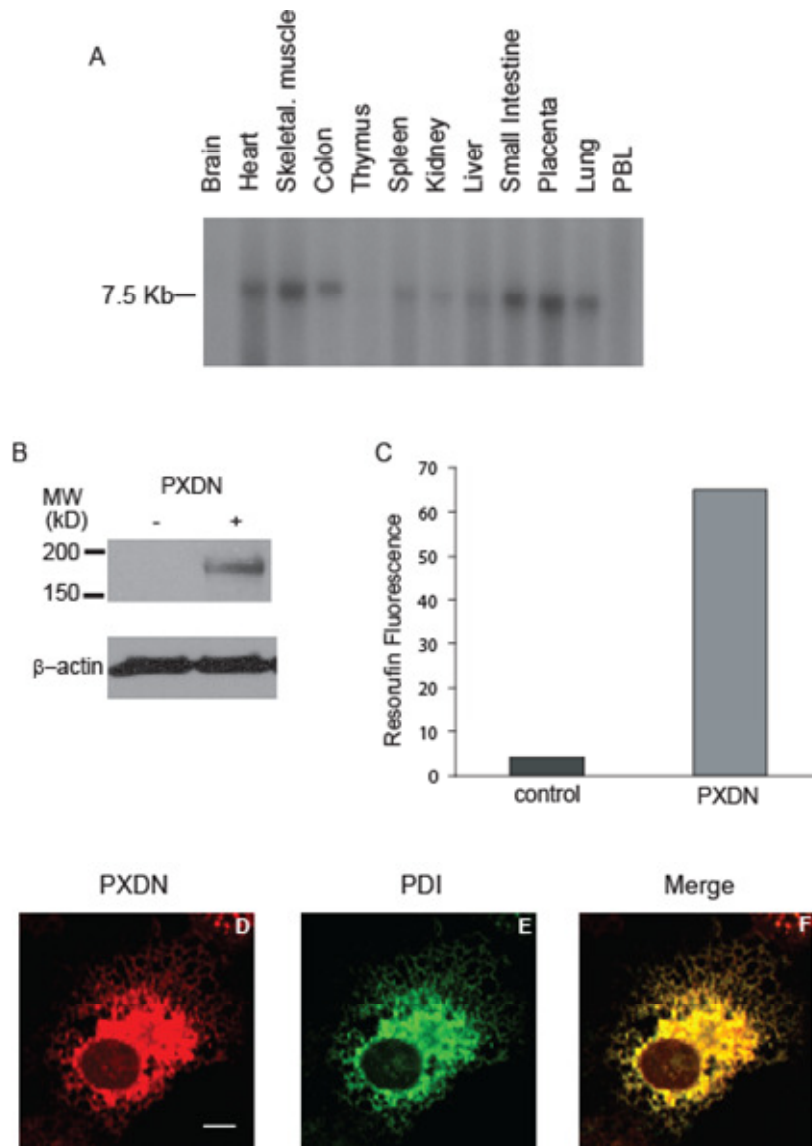
5.3 Peroxidáz enzimek vizsgálata

5.3.1 Peroxidáz enzimek ECM-képző működésének vizsgálata

A ROS és az extracelluláris mátrix kapcsolatában fontos szerepet játszanak a peroxidáz enzimek. Az állati peroxidáz enzimek általános tulajdonsága, hogy képesek ditirozin keresztkötések kialakítására. A bevezetőben már említettem, hogy a ditirozin kereszthidak kialakulásának fontos szerepe van alacsonyabb rendű élőlények extracelluláris állományának módosításában (64;137), azonban emlősökben a ditirozin képzés mechanizmusa és jelentősége még nem tisztázott. Tisztított LPO-val végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy az enzim már igen alacsony H_2O_2 koncentráció mellett is hatékonyan katalizálja a ditirozin képződését (138). Mivel a képződő ditirozin egy fluoreszcens termék, ezért az enzimnek ez az aktivitása felhasználható a H_2O_2 detektálására. Nox4-et expresszáló sejtek H_2O_2 termelését is sikeresen mértük az LPO segítségével. Jelenleg nem tudjuk, hogy a LPO *in vivo* katalizálja-e ditirozin kötések kialakulását - és ezen keresztül fehérjék keresztkötését - de a jövőben mindenképpen szeretnénk megvizsgálni ezt a lehetőséget. Az LPO nagy mennyiségben található tejben, nyálban és bronchiális váladékban ahol a kórokozók elleni védekezésben játszik szerepet. Bár az immunvédekezésben valószínűleg elsősorban az LPO által szintetizált hipotiocianátnak van fontos szerepe, elképzelhető hogy a ditirozin képzés is fontos lehet, ugyanis kórokozó eredetű fehérjék, például toxinok inaktiváláshoz vezethet.

Az állati peroxidázok között a peroxidazin (PXDN) az a fehérje, amely igazán izgalmas lehet az ECM képződés szempontjából. Az enzim emlősökben expresszáldó formájáról azonban minimálisak voltak az ismereteink.

A PXDN expressziós mintázatáról például korábban ellentmondásos adatok jelentek meg. Horikoshi és mtsai azt találták, hogy a PXDN szinte minden általuk vizsgált szövetben expresszáldik (76), míg Mitchell és mtsai szerint a PXDN a melanómás sejtekben található nagyobb mennyiségben (77). Az ellentmondásos expressziós adatokat tisztázandó, Northern blot technikával vizsgáltuk a humán PXDN expressziós mintázatát. Azt találtuk, hogy a PXDN a legtöbb vizsgált szövetben expresszáldik (34. ábra), míg az agyban, a thymusban és leukocitákban nem található meg a PXDN. Bár a PXDN szerkezeti sajátosságai arra utalnak, hogy a fehérje peroxidáz aktivitással rendelkezik, a fehérje enzimaktivitását korábban még senki nem vizsgálta. Az enzimaktivitás mérésekhez COS7 sejtekben expresszáltuk a peroxidazint (34. ábra, B panel) és megvizsgáltuk a sejtekből preparált lizátum peroxidáz aktivitását. A 34. ábra, C panelje mutatja, hogy a PXDN-el transzfektált sejtek jóval nagyobb peroxidáz aktivitást mutattak, mint a kontroll sejtek.

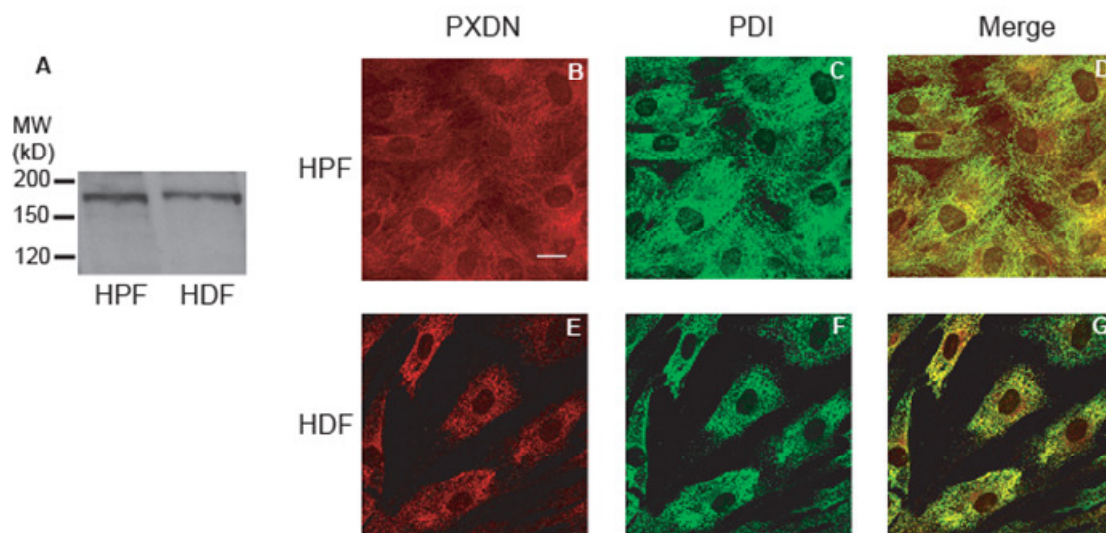


34. ábra A PXDN expressziójának és enzimaktivitásának vizsgálata

A. A PXDN mRNS expressziójának vizsgálata különböző humán szövetekben, Northern blot technikával. B. PXDN fehérje detektálása kontroll (-) és PXDN cDNS-el transzfektált (+) COS-7 sejtekben, Western blot technikával. Kontrollként a β -aktint detektáltuk. C. Peroxidáz aktivitás mérése PXDN-t expresszáló COS-7 sejtekből preparált sejt-lizátumban. A peroxidáz aktivitás mérése Amplex Red technikával történt, a keletkező fluoreszcens anyag a resorufin. D-F. A PXDN lokalizációja PXDN-el transzfektált sejtekben. Konfokális mikroszkóppal készült felvételek. A PXDN-t és az ER marker PDI-t specifikus antitestek segítségével detektáltuk. Az F panel a piros és zöld csatorna egymásra vetített képét ábrázolja. A D panelen látható méretvonal 20 μ m-nek felel meg.

A ditirozin képzés vizsgálatához megpróbáltuk a rekombináns módon előállított fehérjét Sf9 sejtekből megtisztítani, azonban ez nem sikerült. PXDN-ellenes antitestek

segítségével azt is megvizsgáltuk, hogy a PXDN hol található a transzfektált COS-7 sejtekben. A 34. ábra konfokális mikroszkóppal készült felvételein jól látszik, hogy a PXDN az endoplazmás retikulumban helyezkedik el, ahol kolokalizálódik az ER marker protein diszulfid izomerázzal (PDI). A következő kísérleteinkben olyan sejtekben vizsgáltuk a PXDN lokalizációját, ahol endogén módon expresszálódik a fehérje. Western blot kísérletekben azt találtuk, hogy több primer sejt, köztük a tüdő és bőr eredetű primer humán fibroblasztok, valamint HUVEC sejtek is expresszálják a PXDN-t. A fehérje intracelluláris lokalizációját tüdő- és bőr eredetű primer fibroblasztokban vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a heterológ módon expresszált fehérjéhez hasonlóan, az endogén PXDN is az endoplazmás retikulumban található (35. ábra).

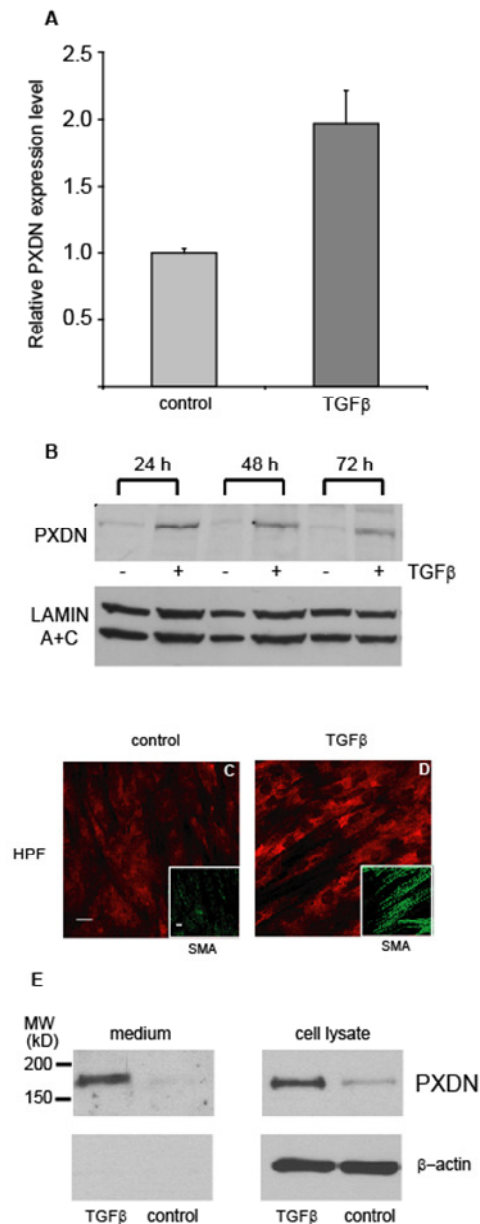


35. ábra A PXDN fehérje kimutatása humán tüdő fibroblasztokban (HPF) és humán bőr fibroblasztokban (HDF)

A. A PXDN fehérje kimutatása HPF és HDF sejtekben Western blot technikával. B-G. A PXDN intracelluláris lokalizációja HPF (B-D) és HDF sejtekben (E-G). A PXDN-t és az ER marker PDI-t antitestek segítségével detektáltuk. Az D és G paneleken a piros és zöld csatorna egymásra vetített képe látható. A B panelen látható méretvonal 20 μ m-nek felel meg

A PXDN doménszerkezete és az N-terminális szekréciós szignál szekvencia jelenléte is arra utal, hogy a fehérje az extracelluláris térbe kerül. A HPF és HDF sejtekben viszont csak intracelluláris festődést figyeltünk meg. Arra gondoltunk, hogy megvizsgáljuk a fehérje elhelyezkedését olyan körülmények között, amikor az ECM szintézise jelentősen fokozódik. Ismert, hogy a fibroblaszt sejtek TGF-beta hatására miofibroblasztokká alakulnak át. A miofibroblaszt differenciálódás folyamán megjelenik a simaizom aktin expresszió és a sejtek intenzív ECM szintézisbe kezdenek (139;140). Ez a folyamat központi eleme a sebgyógyulásnak és kóros aktivációja szerepet játszik a szervfibrozis kialakulásában.

Megvizsgáltuk, hogy a folyamat során hogyan változik a PXDN expressziója és lokalizációja. A 36. ábra mutatja, hogy TGF-beta kezelés hatására már 24 óra múlva is megemelkedik a PXDN expresszió és tartósan emelkedett marad. Az expresszió növekedése a konfokális mikroszkóppal készített felvételeken is jól látható, és a fehérje megjelent a sejtek médiumában is.

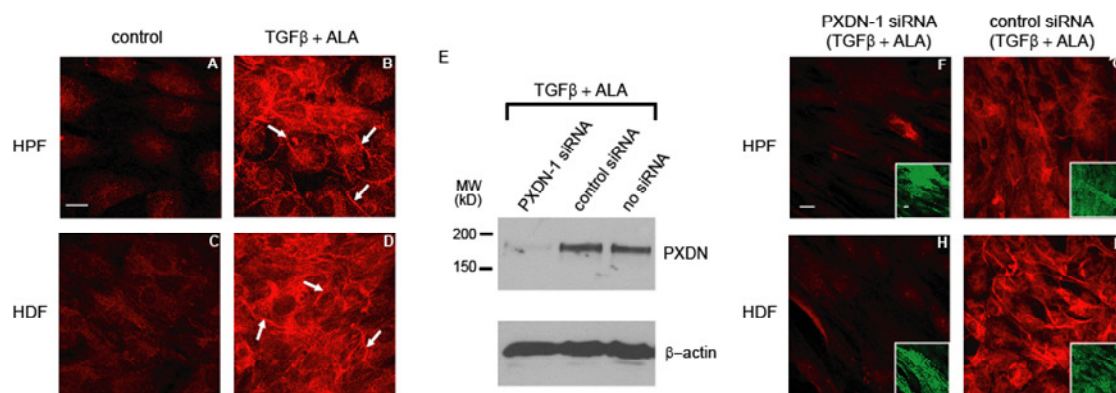


36. ábra TGF-beta hatása a PXDN expressziójára humán tüdő fibroblasztokban

A. 24 órás TGF-beta kezelés hatása a PXDN mRNS expressziójára HPF sejtekben. A relatív expressziós szintet QPCR technikával határoztuk meg. Belső kontrollként a GAPDH expressziót használtuk. B. A PXDN fehérje indukciója TGF-beta-val kezelt HPF sejtekben. A Western blot kísérletekben kontrollként a Lamin A és C fehérjéket detektáltuk. C,D. A TGF-beta-val kiváltott PXDN indukció kimutatása immunfluoreszcenciával. Konfokális mikroszkópos felvételek, a méretvonal 20

μ m-t jelöl. A miofibroblaszt differenciálódás markereként a SMA-t detektáltuk. E. PXDN kimutatása a sejt kultúra médiumból Western blot technikával. A médium sejtmentességét β -aktin detektálásával ellenőriztük.

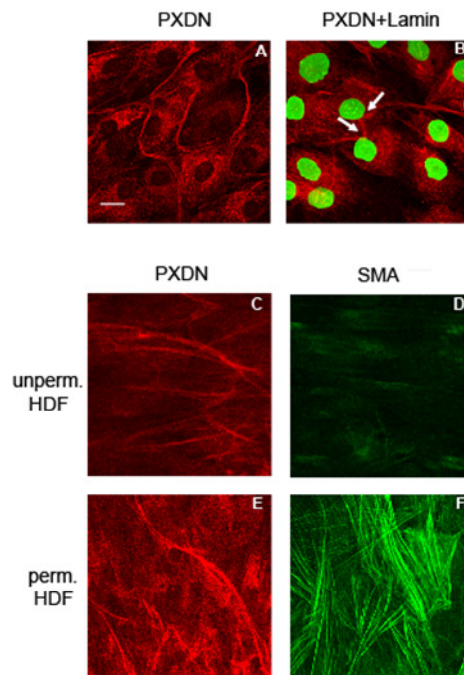
A TGF-beta-val indukált differenciálódás szérumbeset mediumban történik, ezért felmerült bennünk a lehetőség hogy a sejtek esetleg nem jutnak elég hemhez ami fontos lehet a PXDN szintéziséhez és a differenciálódás folyamán fokozottan expresszáldó NOX4 előállításához is. A sejtek médiumát ezért kiegészítettük delta aminolevulonsavval, a hem-szintézis előanyagával. Ez a módosítás érdekes változást okozott a PXDN lokalizációjában.



37. ábra PXDN-t tartalmazó, fonalszerű struktúrák képződése TGF-beta-val kezelt HPF és HDF sejtekben

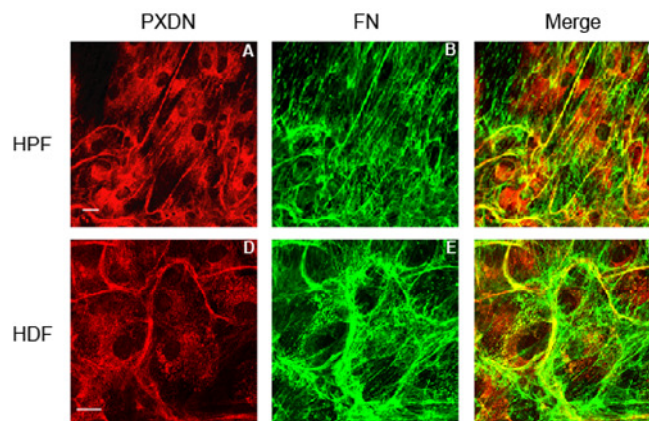
A-D. HPF (A,B) és HDF (C,D) sejteket TGF-beta-val kezeltünk 72 óráig, ALA jelenlétében. A fehér nyilak a kezelés hatására megjelenő fonalszerű struktúrákat jelölik. Konfokális mikroszkópos felvételek, a méretvonal: 20 μ m. E. siRNS kezelés hatása a PXDN expresszióra. A PXDN expresszióját Western blottal vizsgáltuk. Kontrollként β -aktint detektáltunk F-I. siRNS kezelés hatása a TGF-beta-val kiváltott PXDN indukcióra és szekrécióra HPF (F,G) és HDF (H,I) sejtekben. Kontrollként a miofibroblaszt differenciálódás markerét, a SMA-t detektáltuk (F-I, inzertek). Konfokális mikroszkópos felvételek, a méretvonal 20 μ m-t jelöl.

A 37. ábra mutatja, hogy az intracelluláris elhelyezkedés mellett a PXDN jellegzetes fonalszerű struktúrákban is megfigyelhető volt, amik PXDN-specifikus siRNS kezelés hatására eltűntek. A fonalszerű struktúrák gyakran szomszédos sejtek között húzódtak és a sejtmag közelében rögzültek (38. ábra). Ezek a struktúrák a nem permeabilizált sejtek esetén is festődtek PXDN-re, vagyis extracelluláris elhelyezkedésűek voltak (38. ábra). Azt is megvizsgáltuk, hogy az extracelluláris térbe került PXDN kolokalizálódik-e más ECM fehérjével. A 39. ábra mutatja, hogy HPF és HDF sejtekből differenciálódott miofibroblaszt kultúrákban a PXDN részlegesen kolokalizálódott a fibronektin fehérjével. A két fehérje együttes elhelyezkedése elsősorban a vastagabb kötegekben volt megfigyelhető.



38. ábra A PXDN-t tartalmazó fibrillumok jellemzése

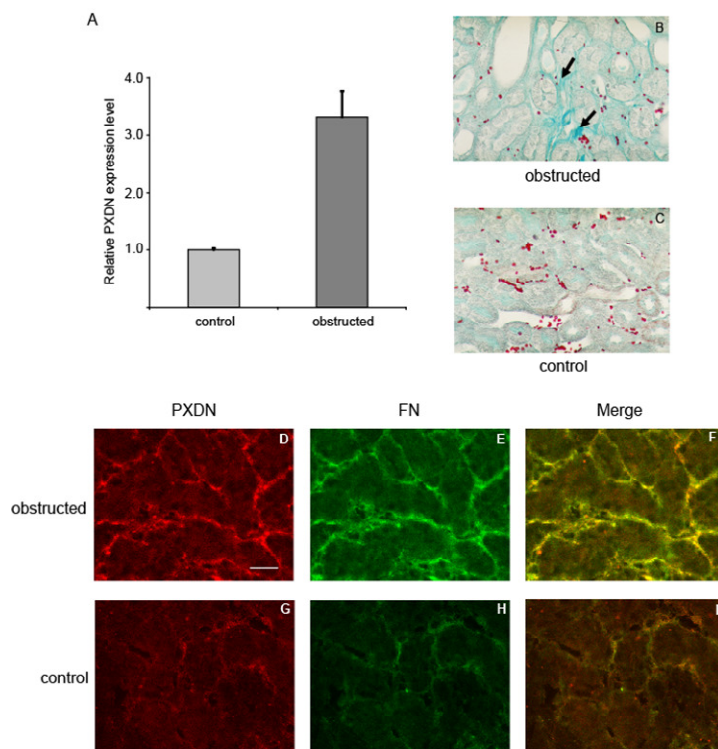
A,B. PXDN fehérje kimutatása immunfluoreszcenciával TGF-beta-val kezelt HDF (A) és HPF (B) sejtekben. A sejtmagokat lamin-ellenes antitesttel festettük meg. Konfokális mikroszkópos felvételek, a méretvonal 20 μm -nek felel meg. C-F. PXDN detektálása immunfluoreszcenciával, nem-permeabilizált (C,D) és permeabilizált (E,F) HDF sejtekben. A permeabilizáció ellenőrzésére SMA festést alkalmaztunk (D,F).



39. ábra A PXDN kolokalizációja fibronektinnel

TGF-beta-val kezelt HPF (A-C) és HDF (D-F) sejtekben immunfluoreszcenciával detektáltuk a PXDN-t (A,D) és FN-t (B,E). Konfokális mikroszkópos felvételek, a méretvonal 20 μm -nek felel meg. A C és F panelek a piros és zöld csatorna egymásra vetített képét ábrázolják.

A bevezetőben már említettem, hogy a PXDN összetett szerkezetű fehérje, amely a peroxidáz domén mellett több, az ECM fehérjéire jellemző szerkezeti elemet tartalmaz. Kiváncsiak voltunk, hogy a fehérje peroxidáz aktivitása mennyire aktív a PXDN szekréciónak és jellegzetes extracelluláris elrendeződése folyamán. Ezt a kérdést úgy vizsgáltuk, hogy összehasonlítottuk kontroll és PXDN siRNS-el kezelt sejtek H_2O_2 termelését. Abból indultunk ki, hogy ha a PXDN peroxidáz aktivitása „fogyasztja” a H_2O_2 -t, akkor különbség fog mutatkozni a detektálható H_2O_2 mennyiségében. A kontroll és siRNS kezelt sejtek H_2O_2 termelésében nem láttunk különbséget, ami arra utal, hogy a PXDN-nek nincs mérhető H_2O_2 felhasználása miofibroblaszt sejtekben. A miofibroblaszt differenciálódás folyamán egyébként a PXDN extracelluláris megjelenése időben nem esik egybe a H_2O_2 termelés maximumával, ami a TGF-beta adása után 24 órával mérhető.



40. ábra A PXDN expressziójának vizsgálata egér vesefibrózis modellben

A. A relatív PXDN expressziós szintet az egyik oldali ureter lekötés után hét nappal határoztuk meg QPCR technikával a fibrotikus és kontroll vesékben. Belső kontrollként a GAPDH expressziót használtuk. B-C. A fibrotikus átalakulás kimutatása Goldner-féle trikróm festéssel. D-I. PXDN és FN kimutatása immunfluoreszcenciával lezárt (D-F) és kontroll (G-I) vesékben. Konfokális mikroszkópos felvételek, a méretvonal 20 μm -t jelöl. Az F és I paneleken a zöld és piros csatornák egymásra vetített képe látható.

Korábban már említettem, hogy a miofibroblasztok kulcsszerepet játszanak a fibrózis kialakulásában. Több kísérleti adat is arra utal, hogy a TGF-beta nemcsak *in vitro*, de *in vivo* körülmények között is meghatározó mediátor ebben a folyamatban. Következő

kísérleteinkben egér vesefibrózis modellben vizsgáltuk, hogy a PXDN expressziója növekszik-e a folyamat során. A fibrózis kialakulását egy oldali ureter lekötéssel indukáltuk, ami már 5-7 nappal a beavatkozás után a fibrózis kialakulásához vezet (141) (40. ábra). A fibrózis kialakulását szövettani vizsgálattal ellenőriztük. A Goldner-féle trikróm festésen jól látszik a peritubuláris térben felszaporodó kötőszövetes állomány. Először QPCR technikával vizsgáltuk a PXDN expresszió változását és megállapítottuk, hogy a fibrotikus vesében jelentősen fokozódik a PXDN mRNS expressziója. A megnövekedett PXDN expressziót immunhisztokémiai vizsgálattal is sikerült kimutatnunk (40. ábra). Azt is megállapítottuk, hogy a PXDN a peritubuláris térben található, ahol kolokalizálódik a fibronektinnel.

A PXDN egy érdekes „hibrid” fehérje, ugyanis a peroxidáz domén mellett több, az ECM fehérjéire jellemző domént is tartalmaz (4. ábra). A PXDN-t először egy *Drosophila* eredetű sejtvonal szekréciós termékeként azonosították és kimutatták, hogy a szekretált PXDN trimer formájában található a sejtek médiumában (75). A PXDN expressziós mintázata alapján feltételezték, hogy a PXDN szerepet játszik az ECM szintézisében az állat egyedfejlődése során. Az emberi PXDN-t először MG50 néven azonosították (77), majd VPO1 (vascular peroxidase 1) néven fedezték fel újra a közelmúltban (142). Ez utóbbi nem túl szerencsés elnevezés, ugyanis a fehérje nemcsak ér-eredetű sejtekben, hanem számos más sejtfeleségben is expresszálódik. A fehérjében található leucin-gazdag ismétlődő szakaszok és az immunglobulin-szerű C2 domének arra utalnak, hogy a PXDN könnyen léphet kapcsolatba más ECM fehérjékkel. A C-terminálisan található vWF C-típusú domén szintén megfigyelhető több olyan ECM fehérjében, amelyek szintén trimert formálnak (143). A *Drosophila* PXDN trimerizációja tehát valószínűleg ezen a doménen keresztül történik. Nelson és mtsai részletesen jellemezték a tisztított *Drosophila* PXDN peroxidáz aktivitását. Megállapították, hogy a fehérje ditirozin szintetizáló aktivitása nagyobb mint a MPO és ovoperoxidáz enzimeké (75). Saját kísérleteinkben sikerült kimutatnunk az emlős PXDN peroxidáz aktivitást, azonban a tisztított fehérje ditirozin-képző aktivitását technikai okok miatt nem tudtuk vizsgálni. Természetesen jelenleg az sem biztos, hogy *in vivo* a ditirozin kereszthidak kialakítása lenne a peroxidáz domén funkciója.

A PXDN fehérje fibroblasztokban és más sejtfeleségekben is az ER-ban található. Izgalmas kérdés, hogy vajon mi lehet a funkciója a fehérjének ebben a sejtalkotóban. Saját kísérleteinkből tudjuk, hogy az ER lumenében magas a H₂O₂ koncentráció, ami támogathatja a fehérje peroxidáz aktivitását (12). Elképzelhető, hogy a PXDN már az ER lumenében kialakíthat ditirozin kereszthidakat más, szekrécióra kerülő fehérjékben.

Kimutattuk, hogy a TGF-beta hatására differenciálódó miofibroblasztok PXDN-t szekretálnak, ami jellegzetes fonalszerű struktúrákba kerül az extracelluláris térben. Ez a korábban ismeretlen ECM-képző mechanizmus fontos lehet az egyedfejlődés folyamán és fibrózis kialakulásában is, amit fokozott ECM képzés jellemez. A PXDN fibrogenézisben

játszott esetleges szerepére utalhat, hogy a PXDN mRNS célpontja a miR-29 mikro-RNS-nek (144). A miR-29-ről pedig kimutatták, hogy központi szerepet játszik a tüdő- máj- és bőr fibrózis kialakulásában.

A közelmúltban Khan és mtsai olyan családokat azonosítottak, ahol egy öröklődő, súlyos szemfejlődési zavar hátterében a *pxdn* gént érintő mutációkat sikerült kimutatni (145). A jövőben szeretnénk létrehozni egy PXDN-hiányos egértözsét, ami lehetőségét nyújtana a PXDN funkciójának *in vivo* vizsgálatára.

6. Az értekezésben ismertetett új tudományos eredmények összefoglalása

1. Kimutattuk, hogy a fiziológiás tartományban létrejövő Ca^{2+} -szignál önmagában nem elégséges a neutrofil granulociták szuperoxidtermelésének aktiválásához. Azt is kimutattuk, hogy a receptor agonista fMLP, Ca^{2+} -szignál hiányában is képes a NADPH-oxidáz aktiválására, azonban a maximális stimuláló hatás csak emelkedett Ca^{2+} -szint mellett jön létre.
2. Saját kísérletes és irodalmi adatok alapján új hipotézist dolgoztunk ki a krónikus granulomatózis betegségben megfigyelhető neutrofil granulocita funkciózavar magyarázatára.
3. Neutrofil granulociták membránban elhelyezkedő Rac-GAP fehérjéit vizsgálva kimutattuk, hogy a sejtek membránjában megtalálható a p50Rho-GAP és ez a fehérje felelős a membrán domináns, renaturálható Rac-GAP aktivitásáért, azonban a natív membránpreparátum Rac-GAP aktivitásában nem játszik szerepet.
4. Kimutattuk, hogy a Nox1 nem rendelkezik mitogén aktivitással és az expressziója fokozódik colon tumor sejtek differenciálódása folyamán. Megállapítottuk, hogy a Nox1 képes együttműködni a fagocita oxidáz citoszolikus komponenseivel.
5. Azonosítottuk a Nox1 colon epithel sejtekben expresszáldó citoszolikus regulátorait, a NOXO1 és NOXA1 fehérjéket. Leírtuk a NOXO1 és NOXA1 mRNS-ek expressziós mintázatát és kimutattuk, hogy a fehérjék hatékonyan támogatják a Nox1 enzim működését.
6. Azonosítottuk a NADPH oxidáz 4 (Nox4) enzimet és kimutattuk, hogy a Nox4 nagy mennyiségben expresszáldik a vesében, ahol a vesetubulusok epithel sejtjeiben található. Felvetettük, hogy a Nox4 szerepet játszhat a vese oxigénérzékelésében.
7. Kimutattuk a Duox fehérjék expresszióját nyálmirigyben, a vastagbélben és a nagyobb légutakban. Megállapítottuk, hogy a légutak epithel sejtjei Duox-függő módon H_2O_2 -ot termelnek. Felállítottuk a Duox-LPO védekező rendszer modelljét.
8. Kimutattuk, hogy a Duox1 expresszáldik urothel sejtekben és megállapítottuk, hogy a Duox1 felelős a sejtek Ca^{2+} -szignál által aktivált H_2O_2 termeléséért. Kimutattuk, hogy a Duox1 szerepet játszik a húgyhólyag fiziológiás nyomás válaszainak kialakításában.

9. Jellemeztük a LPO ditrozinképző aktivitását és megállapítottuk, hogy az enzimnek ez az aktivitása alkalmas sejtek H_2O_2 termelésének mérésére.

10. Kimutattuk, hogy a PXDN fehérje rendelkezik peroxidáz aktivitással és a sejtek endoplazmás retikulumában található. Megállapítottuk, hogy miofibroblaszt differenciálódás során nő a PXDN expressziója és a fehérje szekretálódik az extracelluláris térbe. Megállapítottuk, hogy ez az eddig ismeretlen mátrixképző mechanizmus aktiválódik vesefibrózis kialakulása során.

7. Az eredmények gyakorlati jelentősége

A fagociták ROS termelésének megváltozása fontos szerepet játszik különböző betegségek kialakulásában. Számos kísérleti adat utal arra, hogy fagocita oxidáz elégtelen vagy fokozott működése egyaránt problémát okozhat. Joggal feltételezhetjük tehát, hogy ez a nem-fagocita sejtekben található Nox fehérjék működésére is igaz lehet. Az általunk elsőként azonosított Nox4-ről kimutatták, hogy szerepet játszik a tüdőfibrózis kialakulásában és egy, a Nox4-et és Nox1-et gátló gyógyszerjelöltet a közeljövőben fognak kipróbálni a diabéteszes vesekárosodás gyógyításában (forrás: www.genkyotex.com). A Duox-LPO védekező rendszer azonosításának szintén lehet gyakorlati jelentősége. A dolgozatomban korábban említettem, hogy cisztás fibrózisban csökken a légutak antibakteriális aktivitása. A közeljövőben indul egy olyan készítmény kipróbálása, amely részben ennek a védekező rendszernek a stimulálásán keresztül javítaná a CF-es légutak antibakteriális aktivitását (forrás: www.alaxia-pharma.eu).

8. Irodalomjegyzék

1. Pryor, W. A. (1986) *Annu.Rev.Physiol* **48**, 657-667
2. Halliwell, B. (2011) *Trends Pharmacol.Sci.* **32**, 125-130
3. Rhee, S. G., Chang, T. S., Bae, Y. S., Lee, S. R., and Kang, S. W. (2003) *J.Am.Soc.Nephrol.* **14**, S211-S215
4. Finkel, T. (1999) *J.Leukoc.Biol.* **65**, 337-340
5. Murphy, M. P., Holmgren, A., Larsson, N. G., Halliwell, B., Chang, C. J., Kalyanaraman, B., Rhee, S. G., Thornalley, P. J., Partridge, L., Gems, D., Nystrom, T., Belousov, V., Schumacker, P. T., and Winterbourn, C. C. (2011) *Cell Metab* **13**, 361-366
6. Murphy, M. P. (2009) *Biochem.J.* **417**, 1-13
7. Kowaltowski, A. J., Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (2009) *Free Radic.Biol.Med.* **47**, 333-343
8. Murphy, M. P. (2009) *Biochem.J.* **417**, 1-13
9. Werner, E. and Werb, Z. (2002) *J.Cell Biol.* **158**, 357-368
10. Tu, B. P., Ho-Schleyer, S. C., Travers, K. J., and Weissman, J. S. (2000) *Science* **290**, 1571-1574
11. Tu, B. P. and Weissman, J. S. (2004) *J.Cell Biol.* **164**, 341-346
12. Enyedi, B., Varnai, P., and Geiszt, M. (2010) *Antioxid.Redox.Signal.*
13. Zito, E., Melo, E. P., Yang, Y., Wahlander, A., Neubert, T. A., and Ron, D. (2010) *Mol.Cell* **40**, 787-797
14. Zangar, R. C., Davydov, D. R., and Verma, S. (2004) *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **199**, 316-331
15. Fridovich, I. (1995) *Annu.Rev.Biochem.* **64**, 97-112
16. Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C., and Epstein, C. J. (1995) *Nat.Genet.* **11**, 376-381
17. Folz, R. J., Abushamaa, A. M., and Suliman, H. B. (1999) *J.Clin.Invest* **103**, 1055-1066
18. Baldrige, C. W. and Gerard, R. W. (1932) *American Journal of Physiology -- Legacy Content* **103**, 235-236
19. SBARRA, A. J. and KARNOVSKY, M. L. (1959) *J.Biol.Chem.* **234**, 1355-1362
20. Babior, B. M., Kipnes, R. S., and Curnutte, J. T. (1973) *J.Clin.Invest* **52**, 741-744
21. Baehner, R. L. and Nathan, D. G. (1967) *Science* **155**, 835-836

22. Hohn, D. C. and Lehrer, R. I. (1975) *J.Clin.Invest* **55**, 707-713
23. Lambeth, J. D. (2004) *Nat.Rev.Immunol.* **4**, 181-189
24. Bedard, K. and Krause, K. H. (2007) *Physiol Rev.* **87**, 245-313
25. Geiszt, M. and Leto, T. L. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 51715-51718
26. Sumimoto, H. (2008) *FEBS J.* **275**, 3249-3277
27. Cross, A. R. and Segal, A. W. (2004) *Biochim.Biophys.Acta* **1657**, 1-22
28. DeCoursey, T. E. (2003) *Physiol Rev.* **83**, 475-579
29. Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., Cole, F. S., Curnutte, J. T., and Orkin, S. H. (1986) *Nature* **322**, 32-38
30. Dinauer, M. C., Orkin, S. H., Brown, R., Jesaitis, A. J., and Parkos, C. A. (1987) *Nature* **327**, 717-720
31. Segal, A. W. and Jones, O. T. (1978) *Nature* **276**, 515-517
32. Parkos, C. A., Dinauer, M. C., Walker, L. E., Allen, R. A., Jesaitis, A. J., and Orkin, S. H. (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 3319-3323
33. Bromberg, Y. and Pick, E. (1984) *Cell Immunol.* **88**, 213-221
34. Nauseef, W. M. (2004) *Histochem.Cell Biol.* **122**, 277-291
35. Sumimoto, H., Miyano, K., and Takeya, R. (2005) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **338**, 677-686
36. Groemping, Y. and Rittinger, K. (2005) *Biochem.J.* **386**, 401-416
37. Lapouge, K., Smith, S. J., Groemping, Y., and Rittinger, K. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 10121-10128
38. Groemping, Y. and Rittinger, K. (2005) *Biochem.J.* **386**, 401-416
39. Nauseef, W. M., Volpp, B. D., McCormick, S., Leidal, K. G., and Clark, R. A. (1991) *J.Biol.Chem.* **266**, 5911-5917
40. Leto, T. L., Adams, A. G., and de, M., I (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 10650-10654
41. Sumimoto, H., Kage, Y., Nunoi, H., Sasaki, H., Nose, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Minakami, S., and Takeshige, K. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 5345-5349
42. Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C. H., and Lambeth, J. D. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 22999-23005
43. Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G., and Segal, A. W. (1991) *Nature* **353**, 668-670
44. Heyworth, P. G., Bohl, B. P., Bokoch, G. M., and Curnutte, J. T. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 30749-30752

45. Ellson, C. D., Davidson, K., Ferguson, G. J., O'Connor, R., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T. (2006) *J.Exp.Med.* **203**, 1927-1937
46. Suh, C. I., Stull, N. D., Li, X. J., Tian, W., Price, M. O., Grinstein, S., Yaffe, M. B., Atkinson, S., and Dinauer, M. C. (2006) *J.Exp.Med.* **203**, 1915-1925
47. Segal, B. H., Leto, T. L., Gallin, J. I., Malech, H. L., and Holland, S. M. (2000) *Medicine (Baltimore)* **79**, 170-200
48. Dinauer, M. C. (2007) *Methods Mol.Biol.* **412**, 489-504
49. Matute, J. D., Arias, A. A., Wright, N. A., Wrobel, I., Waterhouse, C. C., Li, X. J., Marchal, C. C., Stull, N. D., Lewis, D. B., Steele, M., Kellner, J. D., Yu, W., Meroueh, S. O., Nauseef, W. M., and Dinauer, M. C. (2009) *Blood* **114**, 3309-3315
50. Williams, D. A., Tao, W., Yang, F., Kim, C., Gu, Y., Mansfield, P., Levine, J. E., Petryniak, B., Derrow, C. W., Harris, C., Jia, B., Zheng, Y., Ambruso, D. R., Lowe, J. B., Atkinson, S. J., Dinauer, M. C., and Boxer, L. (2000) *Blood* **96**, 1646-1654
51. Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K., and Lambeth, J. D. (1999) *Nature* **401**, 79-82
52. Matsuno, K., Yamada, H., Iwata, K., Jin, D., Katsuyama, M., Matsuki, M., Takai, S., Yamanishi, K., Miyazaki, M., Matsubara, H., and Yabe-Nishimura, C. (2005) *Circulation* **112**, 2677-2685
53. Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F., and Krause, K. H. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 497-504
54. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., and Lambeth, J. D. (2001) *Gene* **269**, 131-140
55. Paffenholz, R., Bergstrom, R. A., Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R. J., Jagla, W., Heinzmann, U., Marquardt, A., Bareiss, A., Laufs, J., Russ, A., Stumm, G., Schimenti, J. C., and Bergstrom, D. E. (2004) *Genes Dev.* **18**, 486-491
56. Banfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., and Krause, K. H. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 46065-46072
57. Cheng, G., Ritsick, D., and Lambeth, J. D. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 34250-34255
58. Kiss, P. J., Knisz, J., Zhang, Y., Baltrusaitis, J., Sigmund, C. D., Thalmann, R., Smith, R. J., Verpy, E., and Banfi, B. (2006) *Curr.Biol.* **16**, 208-213
59. Nakano, Y., Longo-Guess, C. M., Bergstrom, D. E., Nauseef, W. M., Jones, S. M., and Banfi, B. (2008) *J.Clin.Invest* **118**, 1176-1185
60. Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demareux, N., and Krause, K. H. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 37594-37601
61. Banfi, B., Tirone, F., Durussel, I., Knisz, J., Moskwa, P., Molnar, G. Z., Krause, K. H., and Cox, J. A. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 18583-18591
62. Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M. S., Deme, D., and Virion, A. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 37265-37269

63. De, D., X, Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J. E., and Miot, F. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 23227-23233
64. Edens, W. A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J. M., Lee, T., Edens, H. A., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, D. B., Benian, G. M., and Lambeth, J. D. (2001) *J.Cell Biol.* **154**, 879-891
65. Grasberger, H. and Refetoff, S. (2006) *J.Biol.Chem.* **281**, 18269-18272
66. Wong, J. L., Creton, R., and Wessel, G. M. (2004) *Dev.Cell* **7**, 801-814
67. Moreno, J. C., Bikker, H., Kempers, M. J., van Trotsenburg, A. S., Baas, F., de Vijlder, J. J., Vulsma, T., and Ris-Stalpers, C. (2002) *N.Engl.J.Med.* **347**, 95-102
68. Johnson, K. R., Marden, C. C., Ward-Bailey, P., Gagnon, L. H., Bronson, R. T., and Donahue, L. R. (2007) *Mol.Endocrinol.* **21**, 1593-1602
69. O'Brien, P. J. (2000) *Chem.Biol.Interact.* **129**, 113-139
70. Davies, M. J., Hawkins, C. L., Pattison, D. I., and Rees, M. D. (2008) *Antioxid.Redox.Signal.* **10**, 1199-1234
71. Daiyasu, H. and Toh, H. (2000) *J.Mol.Evol.* **51**, 433-445
72. Klebanoff, S. J. (2005) *J.Leukoc.Biol.* **77**, 598-625
73. Wang, J. and Slungaard, A. (2006) *Arch.Biochem.Biophys.* **445**, 256-260
74. Conner, G. E., Salathe, M., and Forteza, R. (2002) *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **166**, S57-S61
75. Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G., and Fessler, J. H. (1994) *EMBO J.* **13**, 3438-3447
76. Horikoshi, N., Cong, J., Kley, N., and Shenk, T. (1999) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **261**, 864-869
77. Mitchell, M. S., Kan-Mitchell, J., Minev, B., Edman, C., and Deans, R. J. (2000) *Cancer Res.* **60**, 6448-6456
78. Gotenstein, J. R., Swale, R. E., Fukuda, T., Wu, Z., Giurumescu, C. A., Goncharov, A., Jin, Y., and Chisholm, A. D. (2010) *Development* **137**, 3603-3613
79. Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Bjerrum, P. J., Christensen, S. B., and Hanley, M. R. (1994) *Agents Actions* **43**, 187-193
80. Putney, J. W., Jr. (1986) *Cell Calcium* **7**, 1-12
81. Smyth, J. T., Hwang, S. Y., Tomita, T., DeHaven, W. I., Mercer, J. C., and Putney, J. W. (2010) *J.Cell Mol.Med.* **14**, 2337-2349
82. Kano, S., Iizuka, T., Ishimura, Y., Fujiki, H., and Sugimura, T. (1987) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **143**, 672-677

83. Geiszt, M., Kaldi, K., Szeberenyi, J. B., and Ligeti, E. (1995) *Biochem.J.* **305** (Pt 2), 525-528
84. Reeves, E. P., Lu, H., Jacobs, H. L., Messina, C. G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E. O., Warley, A., Roes, J., and Segal, A. W. (2002) *Nature* **416**, 291-297
85. Rada, B. K., Geiszt, M., Kaldi, K., Timar, C., and Ligeti, E. (2004) *Blood* **104**, 2947-2953
86. Hall, A. (2005) *Biochem.Soc.Trans.* **33**, 891-895
87. Manser, E., Leung, T., and Lim, L. (1995) *Methods Enzymol.* **256**, 130-139
88. Hart, M. J., Shinjo, K., Hall, A., Evans, T., and Cerione, R. A. (1991) *J.Biol.Chem.* **266**, 20840-20848
89. Garrett, M. D., Major, G. N., Totty, N., and Hall, A. (1991) *Biochem.J.* **276** (Pt 3), 833-836
90. Sirokmany, G., Szidonya, L., Kaldi, K., Gaborik, Z., Ligeti, E., and Geiszt, M. (2006) *J.Biol.Chem.* **281**, 6096-6105
91. Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., and Krause, K. H. (2000) *Science* **287**, 138-142
92. Geiszt, M., Lekstrom, K., and Leto, T. L. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 51661-51668
93. Levy, R., Rotrosen, D., Nagauker, O., Leto, T. L., and Malech, H. L. (1990) *J.Immunol.* **145**, 2595-2601
94. Zhen, L., King, A. A., Xiao, Y., Chanock, S. J., Orkin, S. H., and Dinanuer, M. C. (1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 9832-9836
95. Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., and Kohda, D. (2001) *Nat.Struct.Biol.* **8**, 526-530
96. Banfi, B., Clark, R. A., Steger, K., and Krause, K. H. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 3510-3513
97. Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nunoi, H., and Sumimoto, H. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 25234-25246
98. Ueyama, T., Geiszt, M., and Leto, T. L. (2006) *Mol.Cell Biol.* **26**, 2160-2174
99. Dutta, S. and Rittinger, K. (2010) *PLoS.One.* **5**, e10478
100. Geiszt, M., Lekstrom, K., Brenner, S., Hewitt, S. M., Dana, R., Malech, H. L., and Leto, T. L. (2003) *J.Immunol.* **171**, 299-306
101. Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Sumimoto, H., Kishi, K., Tsunawaki, S., Hirayama, T., and Rokutan, K. (2004) *J.Immunol.* **172**, 3051-3058
102. Kawahara, T., Teshima, S., Oka, A., Sugiyama, T., Kishi, K., and Rokutan, K. (2001) *Infect.Immun.* **69**, 4382-4389

103. Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 1417-1423
104. Yang, S., Madyastha, P., Bingel, S., Ries, W., and Key, L. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 5452-5458
105. Ambasta, R. K., Kumar, P., Griendling, K. K., Schmidt, H. H., Busse, R., and Brandes, R. P. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 45935-45941
106. Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinanuer, M. C., and Knaus, U. G. (2006) *Cell Signal.* **18**, 69-82
107. Lyle, A. N., Deshpande, N. N., Taniyama, Y., Seidel-Rogol, B., Pounkova, L., Du, P., Papaharalambus, C., Lassegue, B., and Griendling, K. K. (2009) *Circ.Res.* **105**, 249-259
108. Cucoranu, I., Clempus, R., Dikalova, A., Phelan, P. J., Ariyan, S., Dikalov, S., and Sorescu, D. (2005) *Circ.Res.* **97**, 900-907
109. Sturrock, A., Cahill, B., Norman, K., Huecksteadt, T. P., Hill, K., Sanders, K., Karwande, S. V., Stringham, J. C., Bull, D. A., Gleich, M., Kennedy, T. P., and Hoidal, J. R. (2006) *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **290**, L661-L673
110. Loya, F., Yang, Y., Lin, H., Goldwasser, E., and Albitar, M. (1994) *Blood* **84**, 1831-1836
111. Maxwell, P. H., Osmond, M. K., Pugh, C. W., Heryet, A., Nicholls, L. G., Tan, C. C., Doe, B. G., Ferguson, D. J., Johnson, M. H., and Ratcliffe, P. J. (1993) *Kidney Int.* **44**, 1149-1162
112. Ebert, B. L. and Bunn, H. F. (1999) *Blood* **94**, 1864-1877
113. Bruick, R. K. (2003) *Genes Dev.* **17**, 2614-2623
114. Maranchie, J. K. and Zhan, Y. (2005) *Cancer Res.* **65**, 9190-9193
115. Block, K., Gorin, Y., Hoover, P., Williams, P., Chelmicki, T., Clark, R. A., Yoneda, T., and Abboud, H. E. (2007) *J.Biol.Chem.* **282**, 8019-8026
116. Sorescu, D., Weiss, D., Lassegue, B., Clempus, R. E., Szocs, K., Sorescu, G. P., Valppu, L., Quinn, M. T., Lambeth, J. D., Vega, J. D., Taylor, W. R., and Griendling, K. K. (2002) *Circulation* **105**, 1429-1435
117. Kuroda, J., Nakagawa, K., Yamasaki, T., Nakamura, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Igarashi, K., Shibata, Y., Sueishi, K., and Sumimoto, H. (2005) *Genes Cells* **10**, 1139-1151
118. Hecker, L., Vittal, R., Jones, T., Jagirdar, R., Luckhardt, T. R., Horowitz, J. C., Pennathur, S., Martinez, F. J., and Thannickal, V. J. (2009) *Nat.Med.* **15**, 1077-1081
119. Oram, J. D. and Reiter, B. (1966) *Biochem.J.* **100**, 382-388
120. Riedel, C., Dohan, O., De, I., V, Ginter, C. S., and Carrasco, N. (2001) *Trends Biochem.Sci.* **26**, 490-496

121. Gerson, C., Sabater, J., Scuri, M., Torbati, A., Coffey, R., Abraham, J. W., Lauredo, I., Forteza, R., Wanner, A., Salathe, M., Abraham, W. M., and Conner, G. E. (2000) *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **22**, 665-671
122. El Hassani, R. A., Benfares, N., Caillou, B., Talbot, M., Sabourin, J. C., Belotte, V., Morand, S., Gnidehou, S., Agnandji, D., Ohayon, R., Kaniewski, J., Noel-Hudson, M. S., Bidart, J. M., Schlumberger, M., Virion, A., and Dupuy, C. (2005) *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **288**, G933-G942
123. Forteza, R., Salathe, M., Miot, F., Forteza, R., and Conner, G. E. (2005) *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **32**, 462-469
124. Harper, R. W., Xu, C., Eiserich, J. P., Chen, Y., Kao, C. Y., Thai, P., Setiadi, H., and Wu, R. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 4911-4917
125. Moskwa, P., Lorentzen, D., Excoffon, K. J., Zabner, J., McCray, P. B., Jr., Nauseef, W. M., Dupuy, C., and Banfi, B. (2007) *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **175**, 174-183
126. Conner, G. E., Wijkstrom-Frei, C., Randell, S. H., Fernandez, V. E., and Salathe, M. (2007) *FEBS Lett.* **581**, 271-278
127. Sun, X., Sui, H., Fisher, J. T., Yan, Z., Liu, X., Cho, H. J., Joo, N. S., Zhang, Y., Zhou, W., Yi, Y., Kinyon, J. M., Lei-Butters, D. C., Griffin, M. A., Naumann, P., Luo, M., Ascher, J., Wang, K., Frana, T., Wine, J. J., Meyerholz, D. K., and Engelhardt, J. F. (2010) *J.Clin.Invest* **120**, 3149-3160
128. Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., Pezzulo, A. A., Ramachandran, S., Rogan, M. P., Davis, G. J., Hanfland, R. A., Wohlford-Lenane, C., Dohrn, C. L., Bartlett, J. A., Nelson, G. A., Chang, E. H., Taft, P. J., Ludwig, P. S., Estin, M., Hornick, E. E., Launspach, J. L., Samuel, M., Rokhlina, T., Karp, P. H., Ostedgaard, L. S., Uc, A., Starner, T. D., Horswill, A. R., Brogden, K. A., Prather, R. S., Richter, S. S., Shilyansky, J., McCray, P. B., Jr., Zabner, J., and Welsh, M. J. (2010) *Sci.Transl.Med.* **2**, 29ra31
129. Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S., and Lee, W. J. (2005) *Science* **310**, 847-850
130. Zambrowicz, B. P., Friedrich, G. A., Buxton, E. C., Lilleberg, S. L., Person, C., and Sands, A. T. (1998) *Nature* **392**, 608-611
131. Gevaert, T., Vriens, J., Segal, A., Everaerts, W., Roskams, T., Talavera, K., Owsianik, G., Liedtke, W., Daelemans, D., Dewachter, I., Van Leuven, F., Voets, T., De Ridder, D., and Nilius, B. (2007) *J.Clin.Invest* **117**, 3453-3462
132. Mochizuki, T., Sokabe, T., Araki, I., Fujishita, K., Shibasaki, K., Uchida, K., Naruse, K., Koizumi, S., Takeda, M., and Tominaga, M. (2009) *J.Biol.Chem.* **284**, 21257-21264
133. Thorneloe, K. S., Sulpizio, A. C., Lin, Z., Figueroa, D. J., Clouse, A. K., McCafferty, G. P., Chendrimada, T. P., Lashinger, E. S., Gordon, E., Evans, L., Misajet, B. A., Demarini, D. J., Nation, J. H., Casillas, L. N., Marquis, R. W., Votta, B. J., Sheardown, S. A., Xu, X., Brooks, D. P., Laping, N. J., and Westfall, T. D. (2008) *J.Pharmacol.Exp. Ther.* **326**, 432-442
134. Tonks, N. K. (2003) *FEBS Lett.* **546**, 140-148

135. Ritsick, D. R., Edens, W. A., Finnerty, V., and Lambeth, J. D. (2007) *Free Radic.Biol.Med.* **43**, 31-38
136. Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., and Dolan, L. (2008) *Science* **319**, 1241-1244
137. Heinecke, J. W. and Shapiro, B. M. (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 7959-7962
138. Donko, A., Orient, A., Szabo, P. T., Nemeth, G., Vantus, T., Keri, G., Orfi, L., Hunyady, L., Buday, L., and Geiszt, M. (2009) *Free Radic.Res.* **43**, 440-445
139. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R. A. (2002) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 349-363
140. Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L., and Gabbiani, G. (2007) *Am.J.Pathol.* **170**, 1807-1816
141. Yang, J. and Liu, Y. (2001) *Am.J.Pathol.* **159**, 1465-1475
142. Cheng, G., Salerno, J. C., Cao, Z., Pagano, P. J., and Lambeth, J. D. (2008) *Free Radic.Biol.Med.* **45**, 1682-1694
143. Bornstein, P. (1992) *FASEB J.* **6**, 3290-3299
144. Santanam, U., Zanesi, N., Efanov, A., Costinean, S., Palamarchuk, A., Hagan, J. P., Volinia, S., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T., Croce, C. M., and Pekarsky, Y. (2010) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**, 12210-12215
145. Khan, K., Rudkin, A., Parry, D. A., Burdon, K. P., McKibbin, M., Logan, C. V., Abdelhamed, Z. I., Muecke, J. S., Fernandez-Fuentes, N., Laurie, K. J., Shires, M., Fogarty, R., Carr, I. M., Poulter, J. A., Morgan, J. E., Mohamed, M. D., Jafri, H., Raashid, Y., Meng, N., Piseth, H., Toomes, C., Casson, R. J., Taylor, G. R., Hammerton, M., Sheridan, E., Johnson, C. A., Inglehearn, C. F., Craig, J. E., and Ali, M. (2011) *Am.J.Hum.Genet.* **89**, 464-473

9. Saját közlemények

9.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Geiszt M.**, Szeberényi B.J., Káldi K., Ligeti E., Role of different sources of calcium in the regulation of superoxide production of human neutrophil granulocytes. *Free Radical Biology and Medicine* (1999) 26, 1092-1099. **IF: 4.079**
2. **Geiszt M.**, Dagher M.C., Molnár G., Havasi A., Faure J., Paclet M.H., Morel F., Ligeti E. Characterization of Rac GTP-ase activating proteins (Rac-GAP) in human neutrophil granulocytes. *Biochem. J.* (2001) 351, 851-858. **IF: 4.326**
3. **Geiszt M.**, Kapus A., Ligeti E. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? *J. Leukoc. Biol.* (2001) 69, 191-196. **IF: 4.516**
4. **Geiszt M.**, Lekstrom K., Brenner S., Hewitt S.M., Dana, R., Malech H.L., Leto T.L. NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace gp91^{phox} in the regulated production of superoxide by phagocytes. (2003) *J. Immunol.* 171, 299-306. **IF: 6.702**
5. **Geiszt M.**, Lekstrom K., Witta J., Leto T.L. Proteins homologous to p47^{phox} and p67^{phox} support superoxide production by NADP(H) oxidase 1 in colon epithelial cells. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 20006-20012 **IF: 6.482**
6. **Geiszt M.**, Lekstrom K., Leto T.L. Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NOH-1S transcript variant. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 51661-8 **IF: 6.355**
7. Ueyama T., **Geiszt M.**, Leto T.L. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. (2006) *Mol. Cell. Biol.* 26, 2160-74. **IF: 6.773**
8. **Geiszt M.**, Leto T. L. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. (2004) *J. Biol. Chem.* (2004) 279, 51715-8 **IF: 6.355** (összefoglaló közlemény)
9. **Geiszt M.**, Kopp J.B., Várnai P., Leto TL. Identification of Renox, an NAD(P)H-oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2000) 97, 8010-8014. **IF: 10.789**

10. **Geiszt M.**, Witta J., Baffi J., Lekstrom K., Leto T.L. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. (2003) *FASEB J.* 17, 1502-1504. **IF: 7.172**

11. Donkó Á., Péterfi Z., Sum A., Leto T., **Geiszt M.** Dual oxidases (2005) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 360, 2293-300. **IF: 3.510** (összefoglaló közlemény)

12. **Geiszt M.** NADPH oxidases: new kids on the block. (2006) *Cardiovasc. Res.* 71, 289-99. **IF: 4.997** (összefoglaló közlemény)

13. Donkó A., Ruisanchez E., Orient A., Enyedi B., Kapui R., Péterfi Z., de Deken X., Benyó Z., **Geiszt M.** Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1. *Free Radic. Biol. Med.* (2010) 49, 2040-8. **IF: 5.707**

14. Donkó A., Orient A., Szabó P.T., Németh G., Vántus T., Kéri G., Orfi L., Hunyady L., Buday L., **Geiszt M.** Detection of hydrogen peroxide by lactoperoxidase-mediated dityrosine formation. (2009) *Free. Radic. Res.* 43, 440-5. **IF: 2.215**

15. Péterfi Z., Donkó A., Orient A., Sum A., Prókai A., Molnár B., Veréb Z., Rajnavölgyi E., Kovács K.J., Müller V., Szabó A.J., **Geiszt M.** Peroxidasin is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney. (2009) *Am. J. Pathol.* 175, 725-35. **IF: 5.673**

9.2 Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. Mócsai A., Bánfi B., Kapus A., Farkas Gy., **Geiszt M.**, Buday L., Faragó A., Ligeti E. Differential effects of two tyrosine kinase inhibitors and an inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade on degranulation and superoxide production of human neutrophil granulocytes *Biochem. Pharmacol.* (1997) 54, 781-789. **IF: 2.443**
2. Ligeti E., **Geiszt M.** Medical Importance of small GTP-binding proteins (Hungarian) *Orvosi Hetilap* (1999) 140, 2385-2391. IF: -
3. Molnár G., Dagher M. C., **Geiszt M.**, Settleman J., Ligeti E. Role of prenylation in the interaction of Rho-family small GTPases with GTPase activating proteins. *Biochemistry* (2001) 40, 10542-10549. **IF: 4.114**
4. Káldi K., Szeberényi J., Rada B.K., Kovács P., **Geiszt M.**, Mócsai A., Ligeti E. Contribution of phospholipase D and a brefeldin A sensitive ARF to chemoattractant induced superoxide production and secretion of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* (2002) 71, 695-700. **IF: 4.132**
5. Rada B.K., Geiszt M., Van Bruggen R., Német K., Roos D., Ligeti E. Calcium signalling is altered in myeloid cells with a deficiency in NADPH oxidase activity. *Clin. Exp. Immunol.* (2003) 132, 53-60. **IF: 2.347**
6. Rada B.K., **Geiszt M.**, Káldi K., Timár C., Ligeti E. Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. (2004) *Blood* 104, 2947-53. **IF: 9.782**
7. Rada B.K., **Geiszt M.**, Hably C., Ligeti E. Consequences of the electrogenic function of the phagocytic NADPH oxidase (2005) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 360, 2293-300. **IF: 4.997** (összefoglaló közlemény)
8. Sirokmány G., Szidonya L., Káldi K., Gáborik Z., Ligeti E., **Geiszt M.** Sec14 homology domain targets p50RhoGAP to endosomes and provides a link between Rab and Rho GTPases. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 6096-105. **IF: 5.808**
9. Leto TL, **Geiszt M.** Role of nox family NADPH oxidases in host defense. (2006) *Antioxid. Redox. Signal.* 8(9-10), 1549-61. **IF: 4.232** (összefoglaló közlemény)

10. Orient A., Donkó A., Szabó A., Leto TL., **Geiszt M.** Novel sources of reactive oxygen species in the human body. (2007) *Nephrol Dial. Transplant.* 22, 1281-8. **IF: 3.167**
(összefoglaló közlemény)
11. Enyedi B, Várnai P, Geiszt M. Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1L-alpha and intraluminal calcium. (2010) *Antioxid. Redox. Signal.* 13, 721-9. **IF: 8.209**
12. Borbély G., Szabadkai I., Horváth Z., Markó P., Varga Z., Breza N., Baska F., Vántus T., Huszár M., Geiszt M., Hunyady L., Buday L., Órfi L., Kéri G. Small-Molecule Inhibitors of NADPH Oxidase 4. (2010) *J. Med. Chem.* 53, 6758-62 **IF: 5.207**
13. Petheo G.L., Orient A., Baráth M., Kovács I., Réthi B., Lányi A., Rajki A., Rajnavölgyi E., **Geiszt M.** Molecular and functional characterization of Hv1 proton channel in human granulocytes. *PLoS One.* (2010) 5, e14081. **IF: 4.411**

Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney

Miklós Geiszt*, Jeffrey B. Kopp†, Péter Várnai‡, and Thomas L. Leto*§

*Laboratory of Host Defenses, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, †Kidney Disease Section, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, and ‡Endocrinology and Reproduction Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892

Edited by Irwin Fridovich, Duke University Medical Center, Durham, NC, and approved May 3, 2000 (received for review March 27, 2000)

Oxygen sensing is essential for homeostasis in all aerobic organisms, but its mechanism is poorly understood. Data suggest that a phagocytic-like NAD(P)H oxidase producing reactive oxygen species serves as a primary sensor for oxygen. We have characterized a source of superoxide anions in the kidney that we refer to as a renal NAD(P)H oxidase or Renox. Renox is homologous to gp91^{phox} (91-kDa subunit of the phagocyte oxidase), the electron-transporting subunit of phagocytic NADPH oxidase, and contains all of the structural motifs considered essential for binding of heme, flavin, and nucleotide. *In situ* RNA hybridization revealed that renox is highly expressed at the site of erythropoietin production in the renal cortex, showing the greatest accumulation of renox mRNA in proximal convoluted tubule epithelial cells. NIH 3T3 fibroblasts overexpressing transfected Renox show increased production of superoxide and develop signs of cellular senescence. Our data suggest that Renox, as a renal source of reactive oxygen species, is a likely candidate for the oxygen sensor function regulating oxygen-dependent gene expression and may also have a role in the development of inflammatory processes in the kidney.

Reactive oxygen species (ROS) have a central role in diverse physiological and pathological processes. When produced in high amounts by professional immune cells such as neutrophil granulocytes, ROS have antimicrobial activity serving in the first line of host defense (1). However, ROS produced at low levels by nonimmune cells have been implicated in growth factor signaling, mitogenic responses, apoptosis, and oxygen sensing (2, 3). In phagocytic cells, the precursor of ROS is superoxide (O₂^{•−}), which is produced by the NADPH oxidase, a complex of membrane-bound cytochrome b₅₅₈, cytosolic factors p47^{phox}, p67^{phox}, and p40^{phox}, and the small GTPase Rac2 (1). The heme-binding component of cytochrome b₅₅₈ is gp91^{phox} (91-kDa subunit of the phagocyte oxidase), a glycosylated flavoprotein associated with p22^{phox}. Recently, two other mammalian homologues of gp91^{phox} have been described: Mox1, a protein with cell-transforming activity (4), and the thyroid oxidase p138^{Tox} (5). Mox1 is highly expressed in the colon and is detected at lower levels in uterus, prostate, and vascular smooth muscle. Overexpression of Mox1 in NIH 3T3 fibroblasts results in increased superoxide production and mitogenic activity. These data suggest the involvement of Mox1 in regulation of the cell cycle; however, its exact physiological function remains elusive. An alternatively spliced variant of the Mox1 transcript was also identified, encoding a truncated, four-transmembrane segment-containing protein that apparently has proton channel activity (6). The thyroid oxidase p138^{Tox} is homologous to gp91^{phox} and Mox1 within its C-terminal region but also contains an additional N-terminal portion that has similarities with peroxidases (5). The function of p138^{Tox} has not been demonstrated directly, although it is hypothesized to be involved in thyroid hormone biosynthesis.

A phagocyte-type oxidase has been postulated to function in kidney as an oxygen sensor that regulates erythropoietin (EPO) synthesis (3). EPO is produced in the renal cortex; although the precise cellular source remains controversial, it seems to be produced either by proximal convoluted tubule epithelial cells or by peritubular interstitial cells (7, 8). A widely accepted model for oxygen sensing (3) hypothesizes that superoxide anion and its downstream reactive oxygen intermediates are formed in pro-

portion to local oxygen concentrations within the vicinity of EPO-producing cells. These oxidize and destabilize the transcription factor HIF-1 α , thereby decreasing expression of hypoxia-inducible genes, including EPO. When oxygen concentrations decrease, less superoxide is formed, and HIF-1 α is stabilized, enabling enhanced expression of EPO.

Overproduction of ROS in the kidney is also thought to have other important pathophysiological consequences, because it is associated with tissue injury and inflammatory reactions affecting tubular and glomerular cell functions (9). Herein, we describe the identification and characterization of a previously uncharacterized source of superoxide in the kidney referred to as a renal oxidase or Renox, which is highly expressed in the proximal tubules of the renal cortex and may fulfill the function of the putative oxygen sensor in the kidney.

Materials and Methods

cDNA Cloning and Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Analysis.

BLAST nucleotide searches (10) were conducted in the database of expressed sequence tags (EST) with nucleotide sequences corresponding to conserved C-terminal regions of gp91^{phox}. The mouse cDNA EST clone (GenBank accession no. AI 226641) was obtained from Genome Systems (St. Louis). Based on the sequence information of this clone, the full-length cDNA sequence was obtained by 5' and 3' RACE performed with the SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH) with mouse kidney mRNA as a template for cDNA synthesis.

Based on sequence derived from related human EST clones (GenBank accession nos. AW237557 and AI241222), the ORF of human renox was amplified from human kidney cDNA with primers 5'-GGCGGCATGGCTGTGTCCTGGA-3' and 5'-CCTTAGAAATTGCACTCATTCC-3'.

Northern Blot Analysis and *in Situ* Hybridization. Mouse multiple-tissue Northern blot membranes (CLONTECH) were probed at 50°C with a radiolabeled oligonucleotide probe (5'-GGCGGCTACATGCACACCTGAGAAAATGAAT-AGTTACACCACATGTGAT-3') corresponding to murine renox cDNA in ExpressHyb (CLONTECH) hybridization solution. Oligonucleotide probe was labeled with a DNA 5' labeling kit (Roche Molecular Biochemicals). For analysis of transfected cells, total RNA was prepared from 10⁷ cells (15 μ g) electrophoretically separated on a 1% agarose formaldehyde gel and transferred to nylon membrane. Membranes were probed at

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: Renox, renal oxidase; ROS, reactive oxygen species; gp91^{phox}, 91-kDa subunit of the phagocyte oxidase; EPO, erythropoietin; RACE, rapid amplification of cDNA ends; EST, expressed sequence tag.

Data deposition: The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database (accession nos. AF261944 and AF261943).

§To whom reprint requests should be addressed. E-mail: tleto@nih.gov.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Article published online before print: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10.1073/pnas.130135897. Article and publication date are at www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.130135897

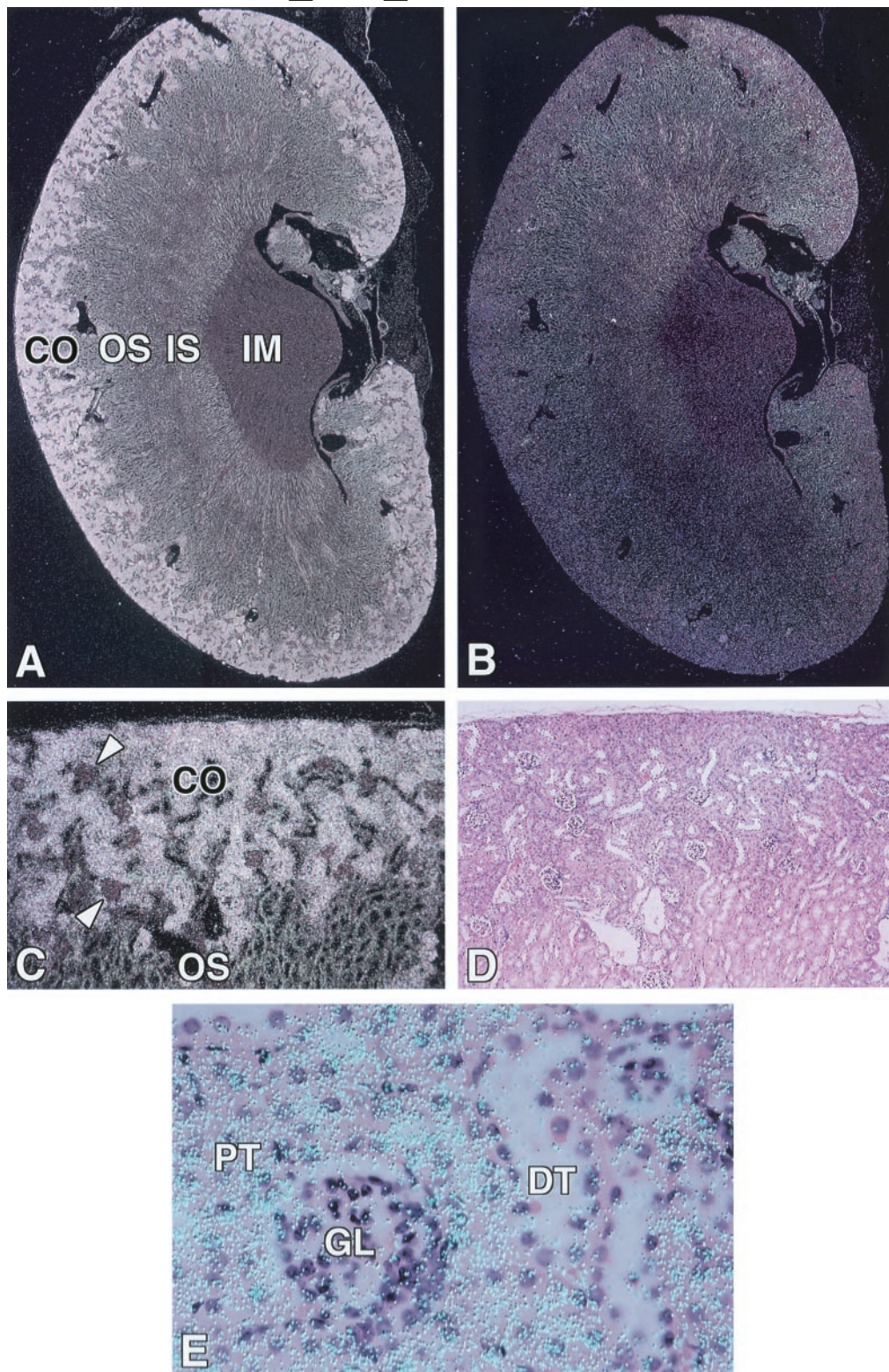


Fig. 3. Detection of Renox mRNA in proximal convoluted tubule cells by *in situ* hybridization. Antisense (A, C, and E) and sense (B) probes demonstrated specific expression of Renox transcripts within the proximal convoluted tubule cells of the renal cortex (CO). (A–C) Dark-field images in which the positive silver grain signal appears white. (D) Hematoxylin/eosin staining of the field shown in C. (E) Superimposed polarized epi-illumination and bright-field images (in which the signal appears green). High magnification in E shows a strong positive signal in proximal tubule (PT) epithelial cells, whereas glomeruli (GL; marked by arrowheads in C) and distal tubule (DT) epithelial cells are negative for Renox mRNA expression. (A and B) $\times 14.5$ magnification; (C and D) $\times 60$; (E) $\times 500$. OS, outer stripe of the medulla; IS, inner stripe of the medulla; IM, inner medulla. The expression patterns shown were confirmed in two other independent hybridization experiments.

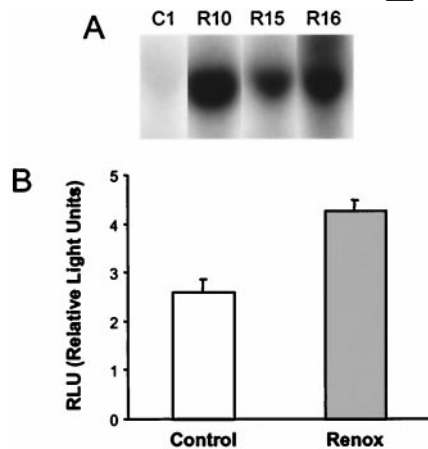


Fig. 4. Transfection of NIH 3T3 cells with pcDNA3.1-*renox* resulted in increased production of superoxide. (A) Detection of the *renox* message by Northern blotting in transfected NIH 3T3 fibroblasts. Lane C1 represents a control cell line transfected with the empty vector, and R10, R15, and R16 correspond to cloned *renox*-transfected cell lines. (B) Detection of superoxide production in *renox*-transfected cell lines. The control bar represents cells transfected with empty pcDNA 3.1 vector. The data represent the average response of three control and three *renox*-transfected cell lines (shown in A) analyzed in two separate assays.

within the medulla. In contrast, glomeruli, which were noted for expression of phagocyte oxidase components, did not show significant Renox mRNA expression.

During fetal life, EPO is produced mainly by the liver (3). We were unable to detect Renox mRNA by *in situ* hybridization in the liver of 16-day-old mouse embryos, although expression of Renox mRNA was detected by reverse transcription-PCR in human fetal liver (data not shown).

To explore the enzymatic function of Renox, NIH 3T3 fibroblasts were transfected with *renox* cDNA constructed in the pcDNA3.1 vector. NIH 3T3 clones expressing high levels of Renox mRNA were identified by reverse transcription-PCR and analyzed further by Northern blotting. Cell lines showing the highest expression of Renox mRNA were selected and assayed in further experiments (Fig. 4A). Superoxide production was measured by chemiluminescence with an enhanced luminol-containing reagent that has high sensitivity and specificity for superoxide. *Renox*-transfected cells showed significant superoxide production when compared with several control (empty vector) transfected lines (Fig. 4B), a response that was not increased by elevating intracellular calcium concentrations and activating protein kinase C with phorbol esters (data not shown).

Interestingly, when compared with control transfected cells, *renox*-transfected fibroblasts showed drastic changes in cellular morphology and a significantly decreased rate of proliferation (Fig. 5). Compared with the normal, spindle-shaped morphology of NIH 3T3 cells, *renox*-transfected fibroblasts became flattened and larger in size, developed long processes, and often contained multiple nuclei. These phenotypic changes are characteristic of the phenomenon of cellular senescence, which can be induced by ROS (16). We did not, however, obtain evidence of increased apoptosis in *renox*-transfected cells in two independent assays (genomic DNA fragmentation and nuclear staining assays).

Discussion

In this study, we describe the characterization of a previously uncharacterized renal gp91^{phox} homologue called Renox. Using Northern blot and *in situ* hybridization techniques, we have shown that Renox mRNA is highly expressed in the kidney, particularly in the proximal convoluted tubule cells of the renal

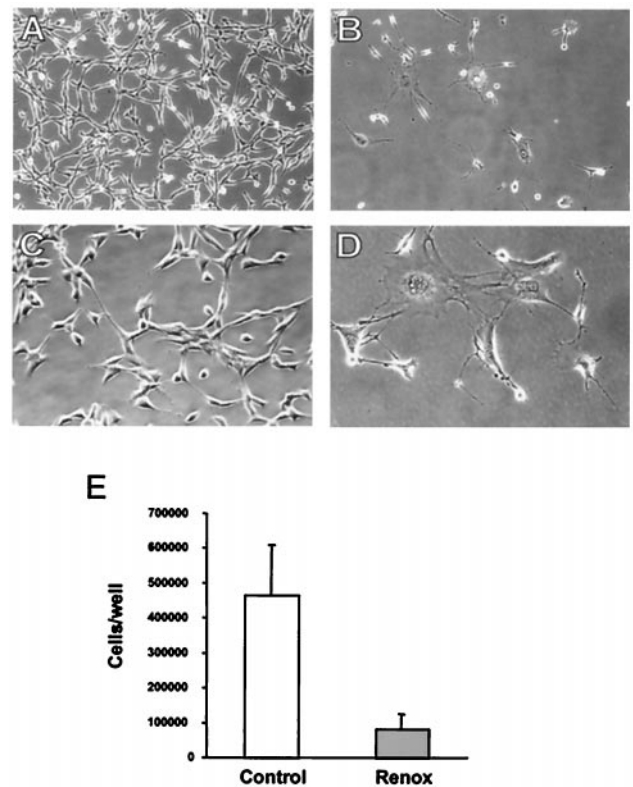


Fig. 5. *Renox* transfection of NIH 3T3 cells resulted in the appearance of a senescent phenotype. (A and C) Control (empty vector-transfected) cells grew faster and exhibited uniform spindle-shaped morphology. (B and D) *Renox* transfectants were heterogeneous, flattened, and enlarged cells, frequently containing multiple nuclei. (E) *Renox* transfection inhibits the proliferation of NIH 3T3 cells. On day 1, wells were seeded with 10,000 cells per well of either control or *renox*-transfected cells. Cells were allowed to grow for 96 h and then counted on day 4. These phenotypic changes were observed in three separate transfection experiments. Data in E represent the average of three control and three *renox*-transfected cell lines, which were also analyzed in Fig. 4.

cortex. We could also demonstrate the enzymatic function of Renox by overexpressing it in NIH 3T3 fibroblasts. Both its coincident expression within the site of EPO production and its demonstrated capacity for superoxide production provide provocative evidence for considering this enzyme as the candidate oxygen sensor of the kidney. Although it is generally accepted that EPO is produced in the renal cortex, there are conflicting reports on the exact cellular source of the hormone. Several studies, including one that used a transgenic approach, indicated that EPO is produced by the proximal convoluted tubule cells (7, 17), and others that used similar experimental techniques detected the EPO mRNA exclusively in the peritubular interstitial cells in the renal cortex (8, 18). This disparity, however, is likely unimportant in terms of location of the oxygen sensor, because long-lived ROS such as hydrogen peroxide are membrane permeable and would readily diffuse into neighboring cells. The localization of an oxygen sensor within proximal tubule cells is appropriate for its presumed function in EPO regulation, because these cells are the major determinants of kidney oxygen consumption and are sensitive to hypoxia. Therefore, specific expression of Renox in these cells represents a compelling argument in support of its proposed role as the oxygen sensor regulating EPO synthesis.

Recently, a cytochrome *b*-type NAD(P)H oxidoreductase, cytochrome *b5* + *b5R*, was described and proposed to function

as an oxygen sensor (19). However, its ubiquitous expression pattern makes this protein an unlikely candidate to be the dedicated oxygen sensor responsible for the regulation of EPO synthesis in the kidney. Furthermore, this study did not demonstrate ROS-producing activity of this enzyme *in vivo* in COS cells overexpressing the protein.

The growth arrest and senescence phenotype induced by Renox provides a good model for examining the toxicity of high oxygen concentrations, an effect that is likely mediated by increased production of ROS. Although the increase in ROS detected in *renox*-transfected cells seems to be relatively modest when considering the dramatic phenotypic changes observed, it is likely that significantly higher levels of ROS exist within intracellular compartments that are not detected by the extracellular chemiluminescence probe. These effects of Renox stand in sharp contrast to the transforming activity of Mox1 described in the same host cell background (4). Differences in the subcellular localization of these enzymes or their yield of superoxide may account for these conflicting observations. Opposing proliferation and senescence responses to ROS have already been documented in other studies (16, 20). Previously, it was demonstrated that Ras-transformed NIH 3T3 fibroblasts show increased proliferation and superoxide production, responses induced by the Ras-dependent activation of another small GTPase, Rac1 (20). In contrast, oncogenic Ras induces growth arrest and senescent phenotype in human primary fibroblasts (21), which was also attributed to the increased production of ROS (16). Taken together, these data suggest that the effect of ROS on the cell cycle may be determined by several factors, including the enzymatic source, its intracellular localization, the yield of ROS generation, processing of downstream metabolites, and other host cell factors.

The kidney is susceptible to oxidative damage induced by ischemia-reperfusion, inflammatory, and toxic drug reactions that can lead to renal diseases such as acute ischemic renal failure, acute glomerulonephritis, and chronic or acute tubular disease (9). Although circulating leukocytes are known to be important mediators of oxidative damage to renal tissues, particularly the glomerular basement membrane, several resident renal cell types are also recognized for their capacity for

significant superoxide release. The kidney was noted for high levels of p22^{phox} expression (22), and several "phagocyte-specific" oxidase components have been detected in glomerular mesangial cells (23) or podocytes (24) by reverse transcription-PCRs and immunochemical methods. We detected p22^{phox} neither in NIH 3T3 cells where we demonstrated enhanced ROS production after *renox* transfection nor in MIMCD3 cells, which endogenously express Renox. Cell-free assays have also detected NADH and NADPH-dependent oxidase activities in tubular cell membrane preparations (25), although the identities of these enzymes have been unclear. The identification of Renox as a source of superoxide in proximal convoluted tubules could have important physiological and pathological implications, because ROS play significant roles in tubular hypertrophic responses to angiotensin II (26) and the nephrotoxicity of drugs such as cyclosporin and aminoglycosides (9).

Because the phagocyte oxidase is induced by inflammatory cytokines such as interferon- γ (ref. 27; consistent with the presence of interferon responsive elements in several *phox* genes), future work should address whether the *renox* gene is also directly responsive to inflammatory cytokines. Such responsiveness may account for the diminished EPO synthesis observed in a variety of inflammatory diseases (3). Further analysis of Renox function would be facilitated by creation of transgenic animal models, which will provide a better understanding of oxygen sensing and its role in EPO synthesis and may also help to explore the role of Renox in experimental models of kidney diseases. Pharmacological inhibitors targeted to Renox may have an important role in stimulation of intrinsic EPO synthesis in certain diseases where anemia is caused by insufficient EPO production.

Note Added in Proof. A recent BLAST search of the unfinished High Throughput Genomic Sequences database revealed that genomic clones assigned to chromosome 11 also contain sequence corresponding to *renox*.

We thank R. Dana, M. Lavigne, K. Lekstrom, R. Rahimpour, M. Schwartz, and K. Dyer for their technical suggestions and advice and C. H. Fox for assistance in *in situ* hybridization experiments.

- Leto, T. L. (1999) in *Inflammation Basic Principles and Clinical Correlates*, eds. Gallin, J. I. & Snyderman, R. (Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia), pp. 769–787.
- Adler, V., Yin, Z., Tew, K. D. & Ronai, Z. (1999) *Oncogene* **18**, 6104–6111.
- Ebert, B. L. & Bunn, H. F. (1999) *Blood* **94**, 1864–1877.
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K. & Lambeth, J. D. (1999) *Nature (London)* **401**, 79–82.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M. S., Deme, D. & Virion, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 37265–37269.
- Bánfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demareux, N. & Krause, K. H. (2000) *Science* **287**, 138–142.
- Loya, F., Yang, Y., Lin, H., Goldwasser, E. & Albitar, M. (1994) *Blood* **84**, 1831–1836.
- Maxwell, P. H., Osmond, M. K., Pugh, C. W., Heryet, A., Nicholls, L. G., Tan, C. C., Doe, B. G., Ferguson, D. J., Johnson, M. H. & Ratcliffe, P. J. (1993) *Kidney Int.* **44**, 1149–1162.
- Baud, L. & Ardaillou, R. (1986) *Am. J. Physiol.* **251**, F765–F776.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Fox, C. H. & Cottler-Fox, M. (1993) in *Current Protocols in Immunology*, ed. Coico, R. (Wiley and Green, New York), Vol. 2, pp. 12.8.1–12.8.21.
- de Mendez, I. & Leto, T. L. (1995) *Blood* **85**, 1104–1110.
- Finegold, A. A., Shatwell, K. P., Segal, A. W., Klausner, R. D. & Dancis, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31021–31024.
- Yu, L., Quinn, M. T., Cross, A. R. & Dinauer, M. C. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7993–7998.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430–434.
- Lee, A. C., Fenster, B. E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N. S., Hirai, T., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Howard, B. H. & Finkel, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7936–7940.
- Maxwell, A. P., Lappin, T. R., Johnston, C. F., Bridges, J. M. & McGeown, M. G. (1990) *Br. J. Haematol.* **74**, 535–539.
- Koury, S. T., Bondurant, M. C. & Koury, M. J. (1988) *Blood* **71**, 524–527.
- Zhu, H., Qiu, H., Yoon, H. W., Huang, S. & Bunn, H. F. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14742–14747.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Sollott, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., Sundaresan, M., Finkel, T. & Goldschmidt-Clermont, P. (1997) *Science* **275**, 1649–1652.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. (1997) *Cell* **88**, 593–602.
- Sumimoto, H., Nozaki, M., Sasaki, H., Takeshige, K., Sakaki, Y. & Minakami, S. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 902–906.
- Radeke, H. H., Cross, A. R., Hancock, J. T., Jones, O. T., Nakamura, M., Kaever, V. & Resch, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21025–21029.
- Greiber, S., Munzel, T., Kastner, S., Muller, B., Schollmeyer, P. & Pavenstadt, H. (1998) *Kidney Int.* **53**, 654–663.
- Cui, X. L. & Douglas, J. G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3771–3776.
- Hannken, T., Schroeder, R., Stahl, R. A. & Wolf, G. (1998) *Kidney Int.* **54**, 1923–1933.
- Levy, R., Rotrosen, D., Nagauker, O., Leto, T. L. & Malech, H. L. (1990) *J. Immunol.* **145**, 2595–2601.

Proteins Homologous to p47^{phox} and p67^{phox} Support Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase 1 in Colon Epithelial Cells*

Received for publication, February 5, 2003, and in revised form, March 24, 2003
Published, JBC Papers in Press, March 25, 2003, DOI 10.1074/jbc.M301289200

Miklós Geiszt^{‡§}, Kristen Lekstrom[‡], Jassir Witta[¶], and Thomas L. Leto^{‡¶}

From the [‡]Laboratory of Host Defenses, NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, the [§]Department of Physiology, Semmelweis University, Faculty of Medicine, P.O. Box 259, H-1444 Budapest, Hungary, and the [¶]Department of Pharmacology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland 20814

Superoxide production by phagocytes involves activation of a multi-component NADPH oxidase. Recently, several homologues of the catalytic component of the phagocyte oxidase, gp91^{phox}, were identified in various tissues. Here we describe two proteins, p41 and p51, with significant homology to two cytosolic components of the phagocytic oxidase, p47^{phox} and p67^{phox}. Like p47^{phox}, p41 contains an amino-terminal Phox homology domain, two SH3 domains, and a conserved carboxyl-terminal, proline-rich motif. Similarly, p51 is homologous to p67^{phox}, containing four amino-terminal tetra-trico-peptide repeats, a conserved “activation domain” motif, a PB1 domain, and a carboxyl-terminal SH3 domain. The highest levels of p41 transcript are detected in the colon and in other gastrointestinal tissues that express Nox1, the predominant gp91^{phox} homologue in these tissues. In contrast, the p51 transcript showed a more widespread expression pattern, suggesting that it may support other tissue-specific oxidases. Mouse colon *in situ* hybridization detected both transcripts in the epithelial cells of colon crypts. Heterologous co-expression of p41 and p51 significantly enhances the superoxide-generating activity of Nox1-expressing cells; thus, p41 and p51 appear to be novel regulators of Nox1. These proteins also support the activity of gp91^{phox}, albeit at much lower levels than the cytosolic phox counterparts. Our results suggest colon epithelial cells contain a multi-component NAD(P)H oxidase with a molecular architecture similar to the phagocytic oxidase.

Neutrophils and other circulating phagocytic cells are recognized for their unique capacity for robust reactive oxidant generation. This activity is attributed to a phagocyte-specific NADPH oxidase (phox), which serves as an effective microbicidal system (1). Patients with deficient phox activity suffer from chronic granulomatous disease, an inherited disease characterized by enhanced susceptibility to microbial infections due to the absence of or defects in any one of several essential phagocyte oxidase components (1, 2). The phox system is subject to tight regulation, as it is dormant in resting cells and becomes activated in response to infectious or inflammatory stimuli. This involves the coordinated translocation of several phosphorylated cytosolic phox factors, as well as the activation

of the small GTPase Rac2, which assemble in a membrane-bound complex with flavocytochrome b558 (1).

Recently, several oxidases have been identified in other tissues, based on their homology to the catalytic core component of the flavocytochrome, gp91^{phox} (3–8). These novel enzymes are proposed to serve a variety of functions, including oxygen sensing, hormone biosynthesis, and signal transduction affecting vasoregulation, cellular proliferation, senescence, and apoptosis; however, little is known about the factors that influence the oxidative output of these related Nox family oxidases. The thyroid and lymphoid oxidases contain multiple calcium-binding EF-hands, consistent with their apparent activation by calcium signals (5, 6, 8). The renal oxidase, Nox4 or Renox, produces measurable amounts of superoxide and induces cellular senescence when heterologously expressed in transfected NIH-3T3 cells, suggesting that this enzyme may be constitutively active, consistent with its proposed role in oxygen sensing (4, 7). In contrast, the colon-specific oxidase, Nox1, appears to be a low-activity enzyme when ectopically expressed (3). Nox1 exhibits functional similarities to the phagocyte oxidase, as it restores differentiation- and activation-dependent superoxide production when transduced into gp91^{phox}-deficient myeloid cell models, indicative of a capacity to cross talk with other phox components.¹ Furthermore, co-expression of two cytosolic phox components, p47^{phox} and p67^{phox}, augments Nox1 activity in an activation-dependent manner. These observations demonstrate a significant level of functional homology (cofactor-dependence and regulated superoxide production) between Nox1 and its closest relative, gp91^{phox}, raising the interesting possibility that Nox1 may function as a multi-component, phox-like oxidase in differentiated colon cells. Based on these findings, we searched for candidate phox-like proteins as potential functional partners of Nox1. Here we identify two novel proteins that have significant structural homology to p47^{phox} and p67^{phox} and that are capable of supporting Nox1 activity.

MATERIALS AND METHODS

Sequence Analysis—We performed initial data base searches in the non-redundant peptide sequence data base of GenBankTM using the protein sequences of p47^{phox} and p67^{phox} as query sequences. The following IMAGE clones were identified and obtained from Research Genetics: the human p41 cDNA (4661469), the mouse p41 cDNA (6399072), the mouse p51 cDNA (4988389), and the human p51 cDNA (5197877). The full coding sequence for human p51 cDNA was amplified from human kidney cDNA using Advantage 2 polymerase (Clontech) and primers designed from IMAGE clone 5197877 (5' primer: ATGGCCTCTCTGGGGGACCT; 3' primer: GCATCATTAGGGCTGATCTCCCTG). We conducted additional nucleotide BLAST searches in the data

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Bldg. 10, Rm. 11N106, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892. Tel.: 301-402-5120; Fax: 301-402-4369; E-mail: tleto@nih.gov.

¹ Geiszt, M., Lekstrom, K., Brenner, S., Hewitt, S. M., Dana, R., Malech, H. L. and Leto, T. L. (2003) *J. Immunol.*, in press.

dc_250_11

FIG. 1. Comparison of the deduced amino acid sequence of human p41 (GenBank™ accession number AY255768) with its phagocyte oxidase homologue, p47^{phox}. A, the sequence alignment denotes identical residues by “.” and conservative substitutions by “.”. Structural domains are designated as follows: PX domains (dotted underline), PXXP motif (double underline), SH3 domains (dashed underline), proline-rich motifs (boxed sequence), phosphorylated serines in p47^{phox} (single underline). B, schematic representation of structural domains within p41 and p47^{phox}. The phosphorylated serine/arginine-rich (auto-inhibitory) domain is unique to p47^{phox}.

A

p41 MAGPRYPVSVQGAALVQI-KRL-----QTFAFSVRWSDGSDTFVRRSWDEFROL-KTLKE 53
 p47^{phox} M-GDTF---IRHIALLGFEKRFVPSQHYVYMFVVKWQDLSEKVVYRRFTEIYEFHKTLE 56

TFPVEAGLLRRSDRVLPKLLDAPILGRVGRTRSGRLARLQILLETYSRRLLATAEVRARSPT 113
 MFPIEAGAINPENRIIPHL-PAPKWFQDQRAAEN--RQGLTEYCSLMSLPKISRCPH 113

ITGFFAPQPLDLEPALPFGSRVILPTPEEQPLSRAAGRLSIHS-LEAQSILRCLQFFCTQD 172
 LLDFKVRPDDLK--LPTDNQTKKPEYILMPKDGKSTATDITGPIILQTYRAIADY--EK 169

TRDRPFOAQAEGLDVLRLHPSGWVWLVENEDRQTAWFPAPYLEEA-APGQGREGGPSLGS 231
 TSGSEMALSTGDVVEVVEKESGWFQMKAKR-GWIPASFLEPLDSPDETPEPNY-- 226

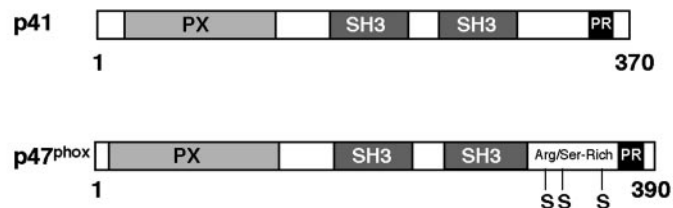
SGPQFCASRAYESSRADELSPAGARVRVLETSDRGWMLCRYGDRAGLLPAVLLRPEGL- 290
 AGEFYVAIKAYTAVEGDEVSLLEGEAVEVIHKLIDGWWVIRKDDVTGYFPMYKQSGQD 286

-----GA-----LLSGTGFRGGDD-----PAGEAR 310
 VSQAQRQIKRGAPPRSSIRNAHSIHQSRKRLSQDAYRRNSVRFQQRQRARPGQSP 346

GFP---EPSQATAPPTVPTRESFGAIQSRCCTVTRRALERRPRRQGRPGCVDSVPHP 366
 GSPLLEERQTRSKPQPAVFPRESADLILNRCSESTKRKL----- 386

TTEQ 370
 ASAV 390

B



base of expressed sequence tags (dbEST) to identify other homologous EST entries, verifying the results of direct sequence analysis.

Northern Blot and in Situ Hybridization—For the human p41 mRNA detection, human multiple-tissue (2 µg of poly(A)⁺ RNA) and gastrointestinal tissue (1 µg of poly(A)⁺ RNA) Northern blot membranes (Clontech) were probed at 65 °C with a randomly radiolabeled p41 cDNA fragment (Amersham Biosciences), following standard hybridization methods. For detection of the mouse p51 mRNA, mouse multiple tissue Northern blot membranes containing 2 µg of poly(A)⁺ RNA/lane (Clontech) were hybridized with a randomly radiolabeled p51 cDNA fragment. For the analysis of Nox1-transfected fibroblasts, total RNA was prepared from 10⁷ cells (15 µg), electrophoretically separated on a 1% agarose formaldehyde gel, and transferred to nylon membrane. Membranes were probed at 55 °C with a randomly radiolabeled human Nox1 cDNA fragment (Amersham Biosciences) by standard hybridization protocols.

For *in situ* hybridization on mouse colon sections, mouse p41 and p51 cDNAs were used as templates. Single-stranded, [³⁵S]UTP-labeled RNA transcripts (sense or antisense riboprobes) were synthesized by T3, T7, or SP6 RNA polymerases, using linearized vector templates. The probing of mouse colon tissue was performed according to the protocol described at intramural.nimh.nih.gov/lcmr/snge/Protocols/ISHH/ISHH.html. Exposed silver grains from autoradiography were visualized with dark-field optics and were photographed using a red filter to contrast with superimposed Giemsa-stained, bright-field images of the same sections.

Cell Culture and Cell Transfection and Transduction—For expression studies, the complete coding sequence of human Nox1, p41, and p51 were subcloned into pcDNA3.1+ (Invitrogen). NIH-3T3 fibroblasts and Caco2 adenocarcinoma cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml), and sodium pyruvate (1 mM). For establishment of Nox1-expressing NIH-3T3 cell line, fibroblasts were

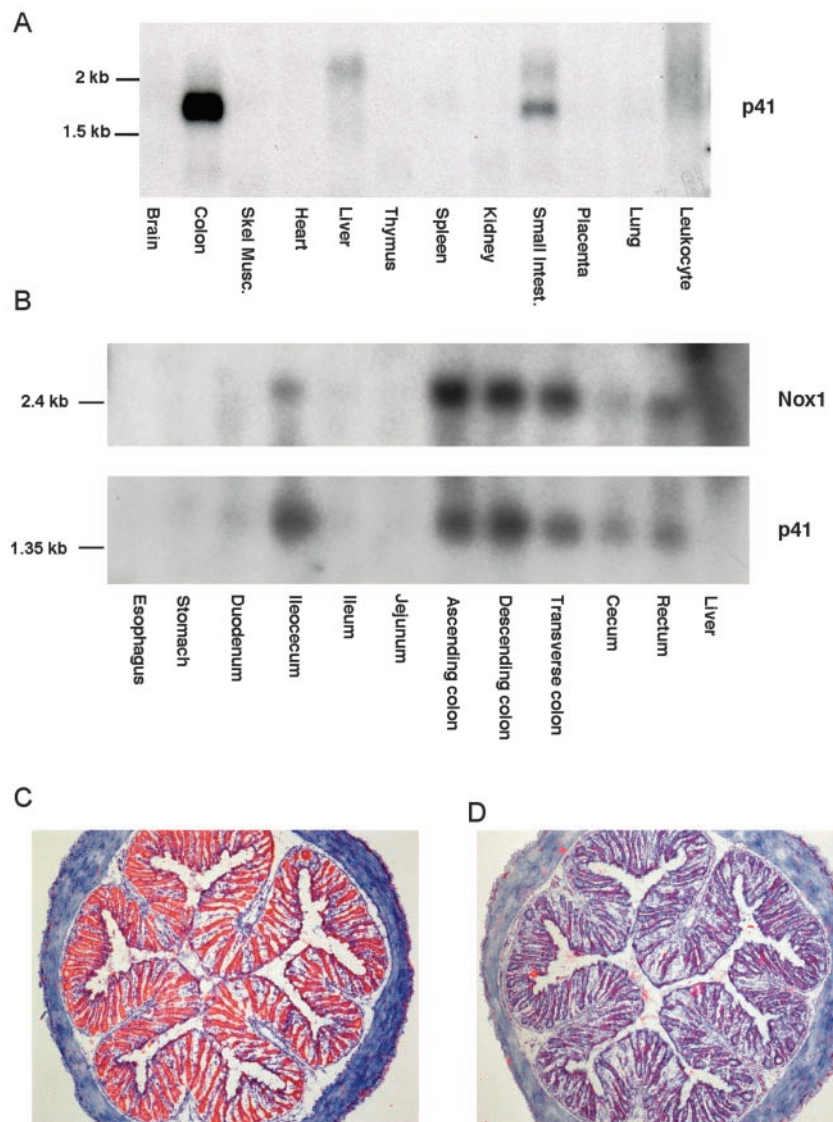
transfected at 60–70% confluence, with pcDNA3.1-Nox1 or the empty pcDNA3.1 vector (Invitrogen) using the Geneporter (Gene Therapy Systems) transfection reagent (3 µg plasmid DNA and 20 µl of Geneporter/300,000–500,000 cells). Cells were selected with G418 (2 mg/ml) 48 h post-transfection, and individual resistant colonies were isolated 7 days later. In transient expression experiments, Caco2 cells and Nox1-NIH-3T3 fibroblasts were transfected with either pcDNA3.1-p41, pcDNA3.1-p51, or the combination of the two plasmids using the Geneporter transfection reagent. K562 cells expressing gp91^{phox} were established using MFG-S-gp91^{phox} retrovirus, as described (9), and were then transiently transfected with the human pcDNA3.1-p41 and pcDNA3.1-p51 plasmids (30 µg DNA/10 million cells) by electroporation (10). Superoxide production by transfected cells was analyzed 24–66 h after transfection. In control experiments, mock transfections using Geneporter alone or control (empty) vector had no significant effect on oxidant release by these cells.

Measurement of Superoxide Production—Superoxide production by Caco2, NIH-3T3, and K562 cells was measured by chemiluminescence using DIOGENES (National Diagnostics), a superoxide-specific chemiluminescence reagent. Adherent cells were trypsinized and washed twice in 1× Hank's balanced solution with Ca²⁺ and Mg²⁺. Measurements were performed in 96-well microtiter chemiluminescence plates (5 × 10⁵ cells/well) at 37 °C over a time course of 1 h using a Lumino-skann luminometer (Labsystems). The net integrated light units recorded from these reactions (adjusted to account for the low luminescence observed in mock-transfected cells) were shown to be sensitive to superoxide dismutase.

RESULTS

Using the BLAST search algorithm, we identified a novel protein sequence in the non-redundant protein data base of GenBank™ deposited by the Human Genome Project that

FIG. 2. **Detection of p41 mRNA in colon epithelium.** A, Northern blotting of human tissues, showing high expression in the colon. Lanes were loaded with 2 μ g of poly(A)⁺ RNA. B, Northern blot detection of Nox1 and p41 mRNAs (upper and lower panels, respectively) in human gastro-intestinal tissues. C, *in situ* hybridization of mouse colon cross-sections to [³⁵S]UTP-labeled p41 antisense RNA probe, showing specific expression in colon crypts. Shown is a bright-field image of Giemsa-stained tissue, superimposed with an epi-illumination dark-field image, in which the light reflected from exposed silver grain signal appears red. D, control p41 sense-strand probe *in situ* hybridization performed identically to C, showing the absence of specific signal.



showed significant homology to *p47^{phox}* (BC015917). Based on its predicted sequence, we named this protein p41 (calculated molecular mass of 41 kDa). A subsequent BLAST search of the Human Genome Data base, using the p41 nucleotide sequence as a query, indicated that the corresponding gene is located on chromosome 16 (16p13.3). The corresponding IMAGE clone (4661469) was obtained and sequenced; the predicted open reading frame encodes a 370-amino acid protein with 27% sequence identity and 46% sequence similarity to human *p47^{phox}* (Fig. 1A). A full coding murine sequence homologous to the human cDNA was identified by a Blast search in the data base of expressed sequence tags (BQ935073); the predicted mouse protein has 66% identity with the human p41nox sequence. Although the overall homology between *p47^{phox}* and p41 is relatively low, p41 shares remarkable structural similarities with its phagocytic counterpart (Fig. 1B). It contains an amino-terminal PX-domain, followed by two tandem SH3-domains. The protein also has a carboxyl-terminal proline-rich sequence motif (320-PPPTVPTRPSP-332) that could serve as a SH3 domain-binding sequence. The homologous proline-rich motif near the carboxyl terminus of *p47^{phox}* was shown to interact with the carboxyl-terminal SH3 domain of *p67^{phox}* (10, 11). Aside from these remarkable similarities, there are several notable differences between these proteins. For example, *p47^{phox}* contains several serine residues within a polybasic,

carboxyl-terminal region ("auto-inhibitory" domain) that were identified as phosphorylation sites that regulate assembly of the phagocytic NAD(P)H oxidase complex (12). Most of these serine residues and their flanking sequences are absent in p41. The PX domain of *p47^{phox}* contains a PXXP motif at position 73–76 that is conserved in several other PX domain sequences and was proposed to participate in an intra-molecular interaction with the carboxyl-terminal SH3 domain of *p47^{phox}* (13). The PXXP sequence motif is absent in the p41 PX domain.

In Northern blotting experiments, p41 mRNA was detected as a 1.6-kb signal in the colon and the small intestine (Fig. 2A). In other blotting experiments that probed a human gastro-intestinal mRNA panel, the p41 transcript was detected in the ileocecal region, the cecum, and the ascending, transverse, and descending colon. When this RNA panel was re-probed with a Nox1-specific probe, a very similar expression pattern was observed (Fig. 2B). Previous experiments in our laboratory indicated that Nox1 is expressed in the epithelial cells of the mouse colon.¹ *In situ* hybridization experiments with fixed mouse colon sections revealed that p41 mRNA is also abundant within epithelial cells of the colon crypts (Fig. 2C).

To explore the possible interaction between Nox1 and p41, we expressed p41 in a K562 erythroleukemia cell line that was previously transduced for Nox1 expression. The co-expression of p41 and Nox1 did not result in any detectable change in

superoxide production in these cells. In other experiments, we co-expressed p41, p67^{phox}, and Nox1 in K562 cells and observed a small detectable increase in superoxide output (data not shown). The relatively low stimulatory effect of p41 on the superoxide-producing activity of Nox1 prompted us to search for proteins homologous to p67^{phox} that could interact with p41. Using the p67^{phox} protein sequence as a query sequence to screen the non-redundant peptide sequence data base in GenBankTM, we identified a sequence homologous to the carboxyl-terminal portion of p67^{phox} that was described as a human colon tumor-specific antigen (NY-CO-31), recognized by autologous antibodies in colon cancer patients (14). Subsequent homology searches with the NY-CO-31 sequence identified larger mouse (BG967340, IMAGE 4988389) and human EST clones (B1753839, IMAGE 5197877) with more extended homology with p67^{phox}. The mouse EST clone was obtained and sequenced. The open reading frame translates into a 444-amino acid protein with 27% identity and 40% similarity to p67^{phox} (Fig. 3A). The human EST appears to contain an intronic sequence that was not observed in any other deposited sequence in dbEST. The open reading frame of the human sequence was amplified from kidney cDNA using primers derived from IMAGE clone 5197877. This cDNA matches other EST sequences and translates into a 476-amino acid protein with 38% sequence identity and 56% sequence similarity to human p67^{phox}. The mouse and human p51 protein sequences are only 60% identical. We named this protein p51, based on the calculated molecular mass of the human p67^{phox} homologue. These proteins exhibit the most remarkable structural conservation with domains in p67^{phox} shown to be involved in interactions with other phox components (Fig. 3); this includes four amino-terminal tetratricopeptide repeats (TPR)² that interact with Rac, a carboxyl-terminal SH3 domain that interacts with p47^{phox}, and a sequence homologous to the activation domain motif of p67^{phox} (residues 199–210) that participates in activation of the phox system (15). Both the human and murine proteins lack sequences homologous to the central SH3 domain of p67^{phox}. Murine p51 lacks additional flanking sequences within central regions of human p51; its PB1 domain also appears to be less conserved, because its homology to the PB1 domain of p67^{phox} was not detected in BLAST searches.

The expression pattern of p51 was first examined by Northern blotting of several mouse tissues. Compared with the expression pattern of p41, the p51 mRNA was more widely detected in various tissues. The p51 transcript was not only detected in mouse colon, uterus, prostate, small intestine, and stomach, tissues where Nox1 expression has been documented (3, 16), but also in lung, thyroid, and salivary glands (Fig. 4A). *In situ* hybridization experiments on mouse colon sections revealed an expression pattern that is indistinguishable from that of p41, suggesting that the two proteins might act together with Nox1 in colon epithelial cells (Fig. 4B). We also detected the p51 mRNA in the human colon by Northern blot and reverse transcription-PCR, although kidney and liver were also positive for the human p51 mRNA (data not shown). Interestingly, although the human colon expresses high levels of Nox1 and p41 mRNA, the expression level of p51 was comparatively low, suggesting that this gene product may be a limiting factor in activation of the colon oxidase.

To study their possible interactions with Nox1, we transfected p41 and p51 in Caco2 colon epithelial adenocarcinoma cells, which express the endogenous Nox1 mRNA (3).¹ As shown in Fig. 5A, neither p41 nor p51 stimulate significant

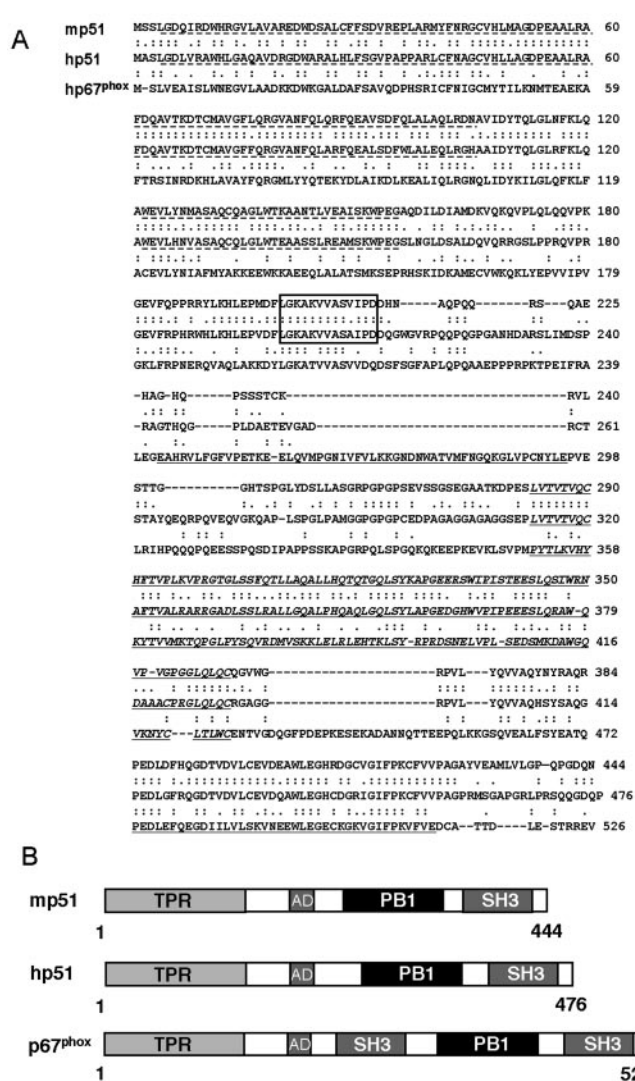


FIG. 3. Comparison of deduced amino acid sequences of p51 and p67^{phox}. A, alignment of murine and human p51 sequences (GenBankTM accession numbers AY255770 and AY255769, respectively) with that of human p67^{phox}, showing conserved tetratricopeptide repeats (TPR; dashed underline), activation domain motifs (boxed), SH3 domains (underlined), and PB1 domains (italics, underlined). B, schematic representation of structural domains in murine and human p51 homologues of p67^{phox}. Human and murine p51 exhibit the greatest structural differences within central regions. Both homologues lack a central SH3 domain.

superoxide production when expressed alone; however, we observed a significant increase in superoxide production when both proteins were present in these Nox1-expressing cells. The overall yield of superoxide in these reconstituted cells was not dependent on PMA stimulation. In other experiments, we co-transfected p41 and p51 into NIH-3T3 fibroblasts that were previously transfected with the human Nox1 cDNA (Fig. 5B). The co-expression of p41 and p51 resulted in significantly enhanced superoxide production, similar to that observed in Caco2 cells, although the activity reconstituted in NIH-3T3 cells was remarkably dependent on PMA stimulation. These experiments confirmed that p41 and p51 interact with Nox1 to form a functional NAD(P)H oxidase complex. We also co-expressed p41 and p51 in mixed pairs with their phagocytic counterparts, p47^{phox} and p67^{phox}, to determine whether these homologous proteins could also support Nox1 activity. Significantly lower levels of oxidase activity were reconstituted when the colon isoforms were co-expressed in combination with the

² The abbreviations used are: TPR, tetratricopeptide repeats; PMS, phorbol 12-myristate 13-acetate.

dc_250_11

A

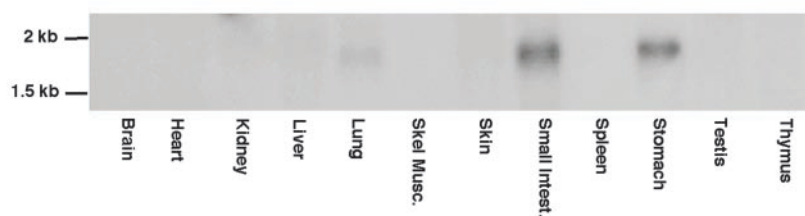
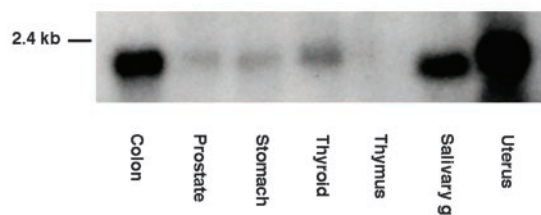
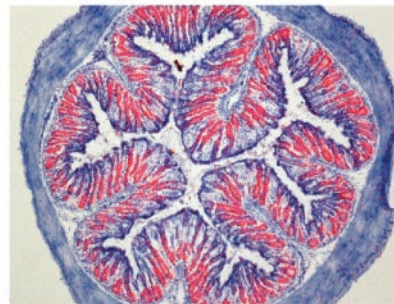


FIG. 4. **Detection of p51 mRNA in mouse tissues.** A, Northern blotting of mouse tissue poly(A)⁺ RNA (1 μg/lane), showing high p51 expression in colon, uterus, and salivary gland, and lower expression in small intestine, stomach, lung, and thyroid gland. B, *in situ* hybridization of mouse colon cross-sections to a [³⁵S]UTP-labeled, p51 antisense probe, showing specific expression in colon crypts. C, *in situ* hybridization of control p51 sense-strand probe, showing the absence of specific signal. Images were processed as superimposed bright-field and dark-field images, as described in the legend to Fig. 2.



B

C



phox proteins, or when both cytosolic phox proteins were expressed in place of p41 and p51 (Fig. 5B). These reconstitution experiments, together with the observed expression patterns, clearly indicate that p41 and p51 are natural functional partners of Nox1 in colon epithelial cells that together form an active colon oxidase.

Reciprocal experiments were also conducted to examine whether p41 and p51 could support the activity of gp91^{phox}. For this purpose, p41 and p51 or their phagocytic counterparts were co-transfected in K562 cells that were previously transfected for high gp91^{phox} expression. Fig. 5C shows that co-expression of p47^{phox} and p67^{phox} restored comparatively higher levels of oxidase activity in these cells. In contrast, the activities supported by p41 and p51 together or as mixed pairs with the phox isoforms were significantly lower (<1%) than the “complete” phox system, again indicative of a considerable functional divergence between the human colon and phagocytic oxidase systems. In all cases the reconstituted activity of gp91^{phox} in these cells was dependent on PMA stimulation.

DISCUSSION

Reactive oxygen species production by phagocytic cells has a well established role in the arsenal of antimicrobial systems of the innate immune system. The multi-component nature of the phox system offers several features for the tight regulation of toxic oxidant production by phagocytes, which is considered essential for the targeted killing of invading microbes. In the past two years, several new homologues of gp91^{phox}, the catalytic core of the phagocytic oxidase, have been described due in part to the rapid growth of nucleic acid sequence databases (3–8). These homologues, now known as members of the Nox/Duox family of NAD(P)H oxidases, all contain highly conserved

structural elements considered necessary for the transport of electrons from the cytosol, through the membrane, to molecular oxygen. These include carboxyl-terminal sequence motifs involved in binding of flavin and NAD(P)H and four conserved histidines that co-ordinate two heme adducts within trans-membrane domains (17). These phox homologues are proposed to serve diverse roles, such as hormone biosynthesis, oxygen sensing, growth factor signaling, apoptosis, and fertilization (3–8). The first homologue to be recognized, Nox1, is a colon-specific oxidase that was implicated in the regulation of cell proliferation (3, 15, 18). The identification of a novel source of reactive oxygen species in the colon epithelium is an important finding, as reactive oxygen species production in this organ could have roles in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. Nox1 causes increased cell proliferation when ectopically expressed in NIH-3T3 fibroblasts, and these Nox1-transfected cells induce tumor formation in nude mice (3, 18). The study suggested that Nox1 is a constitutively active enzyme with low-level superoxide output. In contrast, we recently obtained evidence that Nox1 could interact with cytosolic components of the phagocytic oxidase when expressed in gp91^{phox}-deficient PLB-985 cells and K562 cells. Thus, the reconstituted Nox1 can function as a regulated and activated oxidase complex.¹ The functional interactions between Nox1, p47^{phox}, and p67^{phox} suggest close similarities between the phagocyte and colon enzymes. This prompted us to search for colon-specific homologues of p47^{phox} and p67^{phox}. In this report, we identified and characterized two proteins, p41 and p51, that have considerable homology to the p47^{phox} and p67^{phox} cytosolic components of the phagocytic oxidase and that appear to support the activity of Nox1. While this manuscript was in prep-

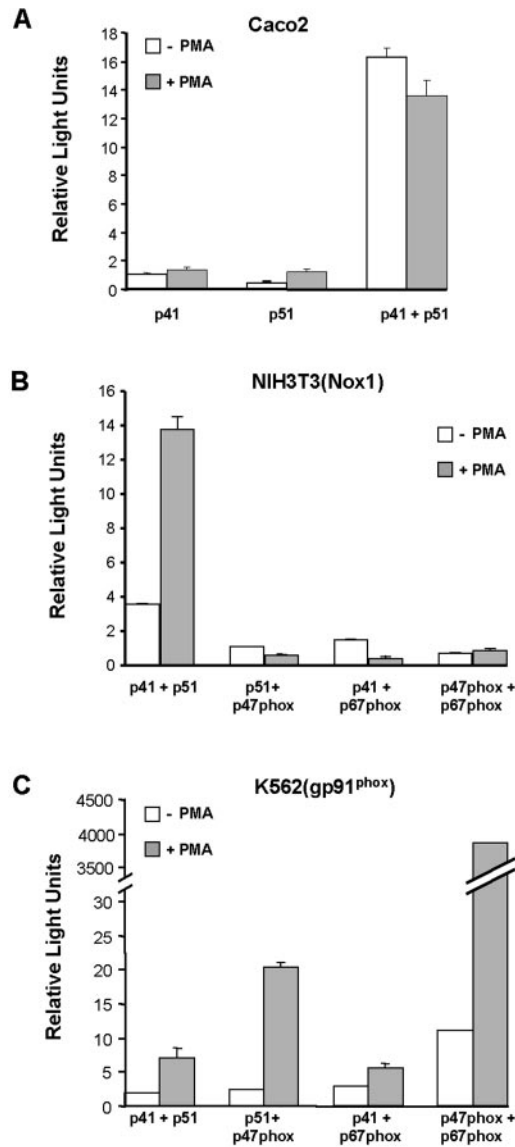


FIG. 5. **p41 and p51 together support superoxide release by Nox1 and gp91^{phox}-expressing cells.** A, chemiluminescence assays of superoxide release by CaCo2 cells transfected 24 h with p41, p51, or both cDNAs. B, superoxide release by Nox1-expressing NIH-3T3 cells transiently transfected (24 h) with p41 and p51 or their phox homologues, p47^{phox} and p67^{phox}. C, superoxide release by gp91^{phox}-expressing K562 cells transiently transfected (66 h) with p41 and p51 or their phox homologues, p47^{phox} and p67^{phox}. Data represent the mean of triplicate assays. Similar results were obtained in four separate transfection experiments.

aration, Banfi *et al.* (19) also described the murine homologues of these proteins, which were designated as NOXO1 (p41) and NOXA1 (p51) for Nox organizer 1 and Nox activator 1, respectively.

Although p41 exhibits significant structural similarity to p47^{phox} in terms of size and conserved domain structure, we noted several important differences between the two proteins that could have important functional consequences. The absence of multiple, conserved serine residues in the carboxyl terminus of p41 suggests that direct, protein kinase C-mediated phosphorylation of this protein does not play a role in the regulation of p41 function. Several reports suggest that p47^{phox} exists in an inhibited state under resting conditions (10, 11, 13, 20) and that this conformation is stabilized through intramolecular interactions between the central SH3 domains and proline-containing motifs within the amino-terminal PX-domain

and the polybasic, carboxyl-terminal domain. It has been proposed that phosphorylation on the carboxyl-terminal serine residues during phagocyte stimulation releases these intramolecular interactions within p47^{phox} and enables SH3 domain interactions with the proline-rich carboxyl terminus of p22^{phox} (10, 11). Two structural differences between p47^{phox} and p41 suggest that an auto-inhibited conformation involving intramolecular SH3 domain contacts is not assumed by p41: (i) the PXXP motif present in the PX domain of several proteins is absent in p41, and (ii) most of the phosphorylated serine residues in the carboxyl-terminal portion, as well as flanking sequences within the polybasic, auto-inhibitory domain of p47^{phox} (residues 299–340) are absent. Interestingly, sequence homologous to p47^{phox} residues 318–329 (RLSQDAYRRNRSV), shown to be involved in interactions with p67^{phox} and the flavocytochrome b (21, 22), is retained in the carboxyl-terminal domain of human p41 (residues 293–304: LLSGTGFRGGDD). These observations suggest that p41 adopts an “open” conformation under resting conditions and that regulation of p41 is achieved by other mechanisms.

When expressed together with p67^{phox} in Nox1-transfected cells, we observed only a moderate stimulatory effect of p41 on superoxide production. This low efficiency observed with proteins combined from the two oxidase systems prompted us to search the nucleic acid databases for colon-specific homologues of p67^{phox}. Using the deposited sequence information about a cloned tumor antigen, we were able to identify both mouse and human homologues of p67^{phox}. Similar to p67^{phox}, p51 contains four amino-terminal TPR repeats and a carboxyl-terminal SH3 domain preceded by a PB1 domain. Both p67^{phox} homologues also contain a short stretch of conserved amino acids immediately following the TPR repeats, which is homologous to the activation domain in p67^{phox} (15, 23) thought to interact with the flavocytochrome b558 complex. p67^{phox} contains another central SH3 domain between amino acids 243 and 298, which is not present in human or murine p51. Previous studies (10, 24, 25) on protein interactions of p67^{phox} allow some speculation about the possible protein partners of p51. For example, the carboxyl-terminal proline-rich motif of p47^{phox}. Because the structural elements necessary for this interaction are well conserved in p51 and p41, it is likely that a similar interaction occurs between these proteins and that the two exist in a complex. Furthermore, the presence of amino-terminal TPR motifs in p51 suggests that this protein interacts with Rac, as in p67^{phox} (26, 27). The presence of PB1 domains in human and mouse p51 suggests that proteins containing the PC motif might be partners of p51. The mouse p51 sequence PB1 domain, however, is less conserved and human p51 lacks sequences homologous to the p67^{phox} lysine residue 355 that was shown to be critical for its interaction with the PC motif of p40^{phox}, suggesting that p40^{phox} is not a regulator of the colon oxidase. Finally, we observed significant structural differences in the C-terminal sequences of human and mouse p51 and p67^{phox}. Neither p51 sequence is entirely hydrophobic; an association of these tail sequences with the membrane, as suggested recently (19), seems unlikely.

Both the expression patterns and our transfection studies with the human p41 and p51 suggest that these proteins are uniquely adapted to function in concert with Nox1 in colon epithelial cells. These proteins together reconstituted high levels of “constitutive” (*i.e.* PMA-independent) activity in Caco2 colon epithelial cells, as was recently demonstrated when the murine forms were heterologously expressed in HEK293 cells (19). In contrast to the murine proteins, however, we demonstrated in some settings (*i.e.* Nox1-expressing NIH-3T3 cells or

gp91^{phox}-expressing cells) that the activity supported by the human proteins is significantly enhanced by PMA stimulation. Future work should explore whether these differences in regulation reflect evolutionary differences in these proteins and whether the environment of differentiated colon epithelial cells renders this oxidase constitutively active. Our studies exploring the effects of co-expression of colon and phagocytic components demonstrated that the human proteins are less capable of functioning as mixed Nox/phox complexes than the murine proteins (19). Because the murine proteins were characterized in a different host system, it is possible that differences in host cell factors may account, in part, for this difference. It is nonetheless tempting to speculate that the significant structural differences in these proteins across species can account for this apparent functional divergence between the phox and Nox1 systems in man.

Although both p41 and p51 are expressed in mouse and human colon, we also detected p51 mRNA in several other tissues and suspect that it might support the activity of other oxidases. In this regard, it is particularly intriguing that p51 is expressed in the thyroid gland, the salivary gland, and the lung, where Duox isoforms are present (5, 6, 28),³ and in the human kidney, which is the primary site of Nox4 (Renox) expression (4, 7). The close homology, as well as the functional similarities in the regulation of Nox1 and gp91^{phox} activities by homologous components, raises the possibility that the colon oxidase has similar host defense functions as the phagocytic system. It is well known that the colon is inhabited by a plethora of microorganisms and must, therefore, maintain an effective epithelial barrier against invasion of the host. This proposed role of the colon oxidase in mucosal defense against these microorganisms is an exciting possibility that will require further investigation.

Note Added in Proof—A consensus terminology for genes encoding p41 and p51 was recently established among several laboratories in this field: NOXO1(p41), for Nox organizer 1, and NOXA1(p51), for Nox activator 1.

REFERENCES

- Leto, T. L. (1999) in *Inflammation Basic Principles and Clinical Correlates* (Gallin, J. I., and Snyderman, R. eds.) pp. 769–787, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Segal, B. H., Leto, T. L., Gallin, J. I., Malech, H. L., and Holland, S. M. (2000) *Medicine* **79**, 170–200
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K., and Lambeth, J. D. (1999) *Nature (Lond.)* **401**, 79–82
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Varnai, P., and Leto, T. L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8010–8014
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M. S., Deme, D., and Virion, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 37265–37269
- De Deken, X., Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J. E., and Miot, F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 23227–23233
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 1417–1423
- Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demareux, N., and Krause, K. H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 37594–37601
- Li, F., Linton, G. F., Sekhsaria, S., Whiting-Theobald, N., Katkin, J. P., Gallin, J. I., and Malech, H. L. (1994) *Blood* **84**, 53–58
- Leto, T. L., Adams, A. G., and de Mendez, I. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10650–10654
- Sumimoto, H., Kage, Y., Nunoi, H., Sasaki, H., Nose, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Minakami, S., and Takeshige, K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5345–5349
- El Benna, J., Faust, R. P., Johnson, J. L., and Babior, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6374–6378
- Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., and Kohda, D. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **6**, 526–530
- Scanlan, M. J., Chen, Y. T., Williamson, B., Gure, A. O., Stockert, E., Gordan, J. D., Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. (1998) *Int. J. Cancer* **76**, 652–658
- Han, C. H., Freeman, J. L., Lee, T., Motalebi, S. A., and Lambeth, J. D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16663–16668
- Teshima, S., Kutsumi, H., Kawahara, T., Kishi, K., and Rokutan, K. (2000) *Am. J. Physiol.* **279**, G1169–G1176
- Biberstine-Kinkade, K. J., DeLeo, F. R., Epstein, R. I., LeRoy, B. A., Nauseef, W. M., and Dinan, M. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 31105–31112
- Arnold, R. S., Shi, J., Murad, E., Whalen, A. M., Sun, C. Q., Polavarapu, R., Parthasarathy, S., Petros, J. A., and Lambeth, J. D. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 5550–5555
- Banfi, B., Clark, R. A., Steger, K., and Krause, K. H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3510–3513
- Shiose, A., and Sumimoto, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 13793–13801
- De Leo, F. R., Ulman, K. V., Davis, A. R., Jutila, K. L., and Quinn, M. T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 7013–7020
- DeLeo, F. R., Nauseef, W. M., Jesaitis, A. J., Burritt, J. B., Clark, R. A., and Quinn, M. T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26246–26251
- Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C. H., and Lambeth, J. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22999–23005
- Finan, P., Shimizu, Y., Gout, I., Hsuan, J., Truong, O., Butcher, C., Bennett, P., Waterfield, M. D., and Kellie, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13752–13755
- Leusen, J. H., Fluiter, K., Hilarius, P. M., Roos, D., Verhoeven, A. J., and Bolscher, B. G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11216–11221
- Koga, H., Terasawa, H., Nunoi, H., Takeshige, K., Inagaki, F., and Sumimoto, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25051–25060
- Lapouge, K., Smith, S. J., Walker, P. A., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., and Rittinger, K. (2000) *Mol. Cell.* **6**, 899–907
- Edens, W. A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J. M., Lee, T., Edens, H. A., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, D. B., Benian, G. M., and Lambeth, J. D. (2001) *J. Cell Biol.* **154**, 879–891

³ Geiszt, M., Witta, J., Baffi, J., Lekstrom, K., and Leto, T. L. (2003) *FASEB J.*, in press.

Matrix Pathobiology

Peroxidasin Is Secreted and Incorporated into the Extracellular Matrix of Myofibroblasts and Fibrotic Kidney

Zalán Péterfi,* Ágnes Donkó,* Anna Orient,*
Adrienn Sum,* Ágnes Prókai,[†] Beáta Molnár,*
Zoltán Veréb,[‡] Éva Rajnavölgyi,[‡]
Krisztina J. Kovács,[§] Veronika Müller,[¶]
Attila J. Szabó,[†] and Miklós Geiszt*

From the Department of Physiology,* the First Department of Pediatrics,[†] and the Department of Pulmonology,[¶] Semmelweis University, Faculty of Medicine, Budapest; the Institute of Immunology,[‡] University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Debrecen; and the Laboratory of Molecular Neuroendocrinology,[§] Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary

Mammalian peroxidases are heme-containing enzymes that serve diverse biological roles, such as host defense and hormone biosynthesis. A mammalian homolog of *Drosophila* peroxidasin belongs to the peroxidase family; however, its function is currently unknown. In this study, we show that peroxidasin is present in the endoplasmic reticulum of human primary pulmonary and dermal fibroblasts, and the expression of this protein is increased during transforming growth factor- β 1-induced myofibroblast differentiation. Myofibroblasts secrete peroxidasin into the extracellular space where it becomes organized into a fibril-like network and colocalizes with fibronectin, thus helping to form the extracellular matrix. We also demonstrate that peroxidasin expression is increased in a murine model of kidney fibrosis and that peroxidasin localizes to the peritubular space in fibrotic kidneys. In addition, we show that this novel pathway of extracellular matrix formation is unlikely mediated by the peroxidase activity of the protein. Our data indicate that peroxidasin secretion represents a previously unknown pathway in extracellular matrix formation with a potentially important role in the physiological and pathological fibrogenic response. (*Am J Pathol* 2009, 175:725–735; DOI: 10.2353/ajpath.2009.080693)

Peroxidases are heme-containing enzymes with highly conserved structure, serving diverse functions in the plant and animal kingdom.¹ Peroxidases catalyze the oxidation of various substrates in the presence of H₂O₂. Mammalian peroxidases have an important role in several physiological processes including host defense and hormone biosynthesis. The family of mammalian peroxidases consists of myeloperoxidase, eosinophil peroxidase, lactoperoxidase, thyroid peroxidase, and the mammalian peroxidasin. Myeloperoxidase, eosinophil peroxidase, and lactoperoxidase have antimicrobial activity and serve in the first line of host defense, while thyroid peroxidase has an essential role in the biosynthesis of thyroid hormones.^{2–4} The function of the mammalian peroxidasin is currently unknown. Peroxidases in plants and in lower animal species frequently participate in extracellular matrix (ECM) formation. In the presence of H₂O₂, peroxidases enzymatically cross-link extracellular proteins through tyrosine residues.⁵ ECM stabilization by dityrosine bridges is well-documented during sea urchin fertilization, where secreted ovoperoxidase is responsible for the formation of cross-links.⁶ Dityrosine formation is also involved in the stabilization of *C. elegans* cuticle, where dual oxidases, carrying both NADPH oxidase and peroxidase-like domains, provide hydrogen peroxide for the crosslinking reaction.⁷

Peroxidasin (PXDN), a unique form of peroxidase was first identified in *Drosophila melanogaster*.⁸ Beside containing a peroxidase domain, which is highly homologous to other animal peroxidases, peroxidasin also contains protein domains characteristic for proteins of the ECM. *Drosophila* PXDN was found to be expressed in several stages of development, but the exact function remained

Supported by grants from the Hungarian Research Fund (OTKA 042573 and NF72669) and the Cystic Fibrosis Foundation (USA) and by grants from the Jedlik Ányos program (1/010/2005). Miklós Geiszt is recipient of a Wellcome Trust International Senior Fellowship.

Z.P. and Á.D. contributed equally to this work.

Accepted for publication April 23, 2009.

Address reprint requests to Miklós Geiszt, Department of Physiology, Semmelweis University, Faculty of Medicine, PO Box 259 H-1444 Budapest, Hungary. E-mail: geiszt@eok.sote.hu.

Table 1. siRNA Sequences

Name	Sequence
PXDN-1	5'-CCUCCAUCUAGAUCUUCGCUUUA-3'
PXDN-1control	5'-CCUCCCUCAUAGAUGUCCCUUUA-3'
PXDN-2	5'-GCAUAACAACCGGAUUAACAUUUA-3'
PXDN2control	5'-GCAUAAAAACCGGAUUAACAUUUA-3'

Oligonucleotides Used in Quantitative PCR Experiments

Name	Species	Sequence
gabdh F	<i>H. Sapiens</i>	5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGG-3'
gabdh R	<i>H. Sapiens</i>	5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACCTTGG-3'
pxdn F	<i>H. Sapiens</i>	5'-CTCAGCCTTCAGCACACGCTC-3'
pxdn R	<i>H. Sapiens</i>	5'-GAGTTCGGGTGTTTCTCGGT-3'
gabdh F	<i>M. musculus</i>	5'-CTGAGTATGTCGTGGAGTCTACTG-3'
gabdh R	<i>M. musculus</i>	5'-AAGGCCATGCCAGTGAGCTTC-3'
pxdn F	<i>M. musculus</i>	5'-CGAGGCCGGGACCATGGCATC-3'
pxdn R	<i>M. musculus</i>	5'-CTGCAGGCTGGCAAGCTTCCAC-3'

unknown.⁸ Little is still known about the mammalian PXDN protein. A human homolog of *Drosophila* PXDN was originally identified as a p53-responsive gene product from a colon cancer cell line, but it was not characterized in detail.⁹ An independent cloning effort, using subtractive hybridization also led to the identification of the mammalian PXDN gene, which was originally named melanoma gene 50, based on the expression in melanoma samples.¹⁰ This latter study has characterized PXDN as a possible potent melanoma-associated antigen, but it did not examine the possible physiological role of the protein.

Here we demonstrate that peroxidase is expressed by human primary cells, including fibroblasts of different origin, where the protein is localized to the endoplasmic reticulum. On stimulation by transforming growth factor (TGF)- β 1, differentiating myofibroblasts show increased expression of peroxidase. The protein becomes secreted to the extracellular space where it is organized into a fibril-like network. We also show that this pathway of ECM formation is probably not mediated by the peroxidase activity of the protein. Our results suggest that beside the secretion of well-known constituents of the ECM, PXDN secretion by myofibroblasts is a novel way of ECM modification in wound repair and tissue fibrosis.

Materials and Methods

Materials

We used the following antibodies in our studies: Alexa488- and Alexa568-labeled anti-rabbit and anti-mouse Fab (Molecular Probes, Eugene, OR), protein disulfide isomerase (PDI) antibody (RL90), and fibronectin antibody (IST-9) (Abcam, Cambridge, UK), lamin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), β -actin antibody, and smooth muscle actin (SMA) antibody (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Anti-PXDN Antibody

PXDN polyclonal antibody was purified from rabbit serum following intracutaneous injections of glutathione

S-transferase-PXDN (amino acids 1329 to 1479). The antibody was affinity purified using Affigel 10 beads (BioRad Laboratories, Richmond, CA) loaded with the antigen.

Cell Culture and Treatments

COS-7 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagles Medium with Glutamax I (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin (Sigma), and 50 μ g/ml streptomycin (Sigma). Human pulmonary and dermal fibroblasts (PromoCell, Heidelberg, Germany) were grown in fibroblast basal medium supplemented with 2% fetal calf serum, 5 μ g/ml insulin, and 1 ng/ml basic fibroblast growth factor. Cells were grown in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. Before TGF- β 1 treatment, primary fibroblasts were serum-deprived in the presence of 0.05% serum. Cells were treated with TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 24 to 72 hours in the absence of serum. In some experiments the medium was supplemented with 500 μ mol/L δ -aminolevulinic acid (Sigma).

Transient Transfections

PXDN encoding pcDNA 3.1 plasmid was transfected by using Eugene6 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) or Lipofectamine2000 (Invitrogen). Small interfering (si)RNA was transfected in 100 nmol/L concentration using the Interferin siRNA transfection reagent (Polyplus Transfection, Illkirch, France) or RNAiMAX (Invitrogen).

siRNA Sequences

Sequence-specific and control Stealth siRNAs were obtained from Invitrogen. The sequences of PXDN-specific and control siRNAs are provided in Table 1.

Western Blot Experiments

Cells lysed in Laemmli sample buffer were boiled and run on 7.5% or 10% polyacrylamide gels. After blotting onto nitrocellulose membranes blocking was performed in PBS 5% milk and 0.1% Tween 20 for 1 hour at room temperature. We incubated the membranes with the first antibody for 1 hour at room temperature. Membranes were washed five times in PBS 0.1% Tween 20 and horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit secondary antibody (Amersham Pharmaceuticals, Amersham, UK) was used in 1:5000 dilution and signals were detected on FUJI Super RX films using the enhanced chemiluminescence method. To precipitate PXDN from the cell culture medium, the medium was removed, and 1 volume of 100% (w/v) trichloroacetic acid was added to four volumes of medium. The samples were kept on ice for 10 minutes then the precipitate was separated by centrifugation (14,000 rpm, 5 minutes). The pellets were washed three times with 2 ml of cold acetone and dried by placing the tube in 95°C heat block for 5 minutes. The pellets were resuspended in 4× sample buffer then boiled for 10 minutes before they were loaded onto polyacrylamide gels.

Measurement of Peroxidase Activity

COS-7 cells expressing PXDN or primary fibroblasts were lysed in PBS containing 1% hexadecyltrimethylammonium bromide. Peroxidase activity of the lysates was immediately determined by the Amplex Red peroxidase assay (Molecular Probes). After 30 minutes incubation time with the Amplex Red reagent, resorufin fluorescence was measured at 590 nm.

Measurement of H₂O₂ Production

TGF- β 1-induced H₂O₂ production of pulmonary fibroblasts was measured with the Amplex Red assay (Molecular Probes). Attached cells were incubated in the presence of 50 μ Mol/L Amplex Red and 0.1 U/ml horseradish peroxidase in an extracellular medium containing 145 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 0.8 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L glucose, and 10 mmol/L HEPES. After 1 hour incubation at 37°C, resorufin fluorescence was measured at 590 nm.

Immunofluorescent Labeling and Confocal Laser Microscopy

Cells grown on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS then rinsed 5 times in PBS and incubated for 10 minutes in PBS containing 100 mmol/L glycine. Coverslips were washed twice in PBS and permeabilized in PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 for 20 minutes at room temperature. After 1 hour blocking in PBS containing 3% bovine serum albumin cells were incubated with the primary antibody in PBS plus 3% bovine serum albumin, washed thoroughly six times in PBS, and incubated with the secondary an-

tibody for 1 hour and finally washed six times in PBS again. Coverslips were mounted using Mowiol 4-88 anti-fade reagent (prepared from polyvinyl alcohol 4-88, glycerol, H₂O, and Tris pH 8.5).

Confocal images were collected on an LSM510 laser scanning confocal unit (Carl Zeiss) with a 63 × 1.4 numerical aperture plan Apochromat and a 40 × 1.3 numerical aperture plan Neofluar objective (Carl Zeiss). Excitation was with 25-mW argon laser emitting 488 nm, and a 1.0-mW helium/neon laser emitting at 543 nm. Emissions were collected using a 500- to 530-nm band pass filter to collect A488 and a 560-nm long pass filter to collect A568 emission. Usually images from optical slices of 1- to 2- μ m thickness were acquired. Cross talk of the fluorophores was negligible.

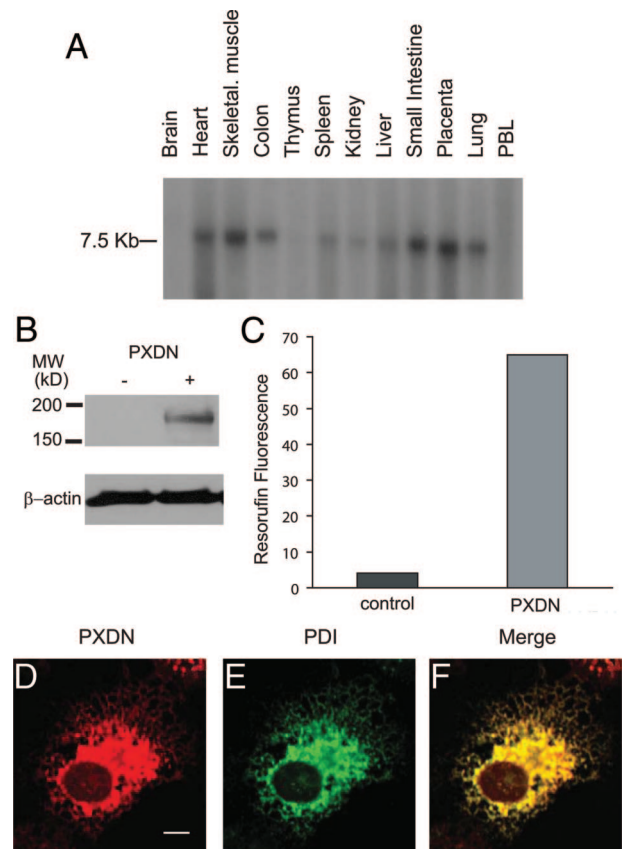


Figure 1. Characterization of PXDN expression and activity. Detection of PXDN (A) mRNA expression by Northern blot analysis. Multiple-tissue (2 μ g of poly[A]⁺ RNA) Northern blot membranes were probed at 65°C with a randomly radiolabeled cDNA fragments corresponding to the 3'-untranslated regions of PXDN. B: Detection of PXDN by Western blot analysis. A polyclonal antibody raised against PXDN recognizes the protein in PXDN-expressing COS-7 cells (+, second lane), whereas it does not produce immunoreactive band in mock-transfected COS-7 cells (-, first lane). Loading controls developed for β -actin indicate that all lanes contained similar amounts of total protein. C: Detection of peroxidase activity in the lysates of PXDN-expressing COS-7 cells. COS-7 cells were transfected with PXDN cDNA; control cells were mock-transfected. After 48 hours cells were lysed in 1% hexadecyltrimethylammonium bromide and were assayed for peroxidase activity by the Amplex Red peroxidase assay. The fluorescent product, resorufin fluorescence was measured at 590 nm. D-F: Intracellular localization of PXDN in transfected COS-7 cells. PXDN-transfected, paraformaldehyde-fixed, permeabilized COS-7 cells were stained for PXDN (D) and the endoplasmic reticulum marker PDI (E). Merge of the fluorescent signals is shown in (F). Scale bar = 20 μ m.

Gene Expression Studies

For the human PXDN mRNA detection, human multiple-tissue (2 μ g of poly[A]⁺ RNA) Northern blot membranes (Clontech) were probed at 65°C with a randomly radio-labeled cDNA fragments corresponding the 3'-untranslated regions of PXDN mRNA following standard hybridization methods. For the quantitative PCR experiments RNA was isolated with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 2 μ g total RNA using oligo(dt)₁₈ primers and RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase in 20 μ l reaction mix according to the manufacturer's (Fermentas) recommendations. One μ l of the first strand was amplified in 10 μ l total volume in a LightCycler 1.5 instrument (Roche) using LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I mix (Roche) with a final Mg²⁺ concentration of 2.25 mmol/L, and final primer concentration of 0.5 μ mol/L. To avoid amplification of the genomic region, primers were designed in separate exons neighboring long introns; the sequences of the primers are provided in Table 1. The following PCR protocol was used: 95°C for 10 minutes, then 40 cycles of 95°C 10 seconds, 60°C 5 seconds, 72°C 15 to 25 seconds (amplicon size [bp]/25), the last step was a melting curve analysis (from 65 to 95°C with a slope of 0.1°C/sec). The quantification was performed by the LightCycler Software 4.05 as follows. The crossing point was determined by the second derivative method. PCR efficiency and standard curve was calculated for each gene by performing amplification on serial dilutions of a mixture of the samples. In each sample the expression of the target gene was divided with the expression of the endogenous control, which was the housekeeping gene *GAPDH*. The relative expression lev-

els were finally normalized to the average expression level of the control samples (set to 1).

Animal Model

Animal experiments were authorized by the Institutional Animal Experiment Committee under permission No. 86/2006 SE TUKEB. Eight-week-old male BALB/c mice were obtained from the National Institute of Oncology. Animals were maintained on standard diet and given water *ad libitum*. Unilateral ureteral obstruction was performed using a standard procedure¹¹ Briefly, under ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) induced general anesthesia complete ureteral obstruction was performed by ligating the left ureter with 8-0 silk after a midline abdominal incision. Mice were sacrificed after 7 days of the procedure and the kidneys (both obstructed and control) were removed. One part of the kidneys was fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde followed by paraffin embedding for histological analysis. Goldner's trichome staining was used for the detection of fibrosis. Histological analysis was performed by Histopathology Ltd, Pécs, Hungary. Samples were coded and examined in a blinded fashion. The remaining kidneys were processed for RNA isolation and immunohistochemistry. We used acetone fixed, 8- μ m thick frozen sections for the immunolocalization of PXDN in control and fibrotic kidneys. After blocking in 1% albumin and 2% normal goat serum we incubated the sections overnight with anti-PXDN and anti-fibronectin antibodies. Sections were then stained with fluorophore-labeled secondary antibodies for 1 hour at room temperature.

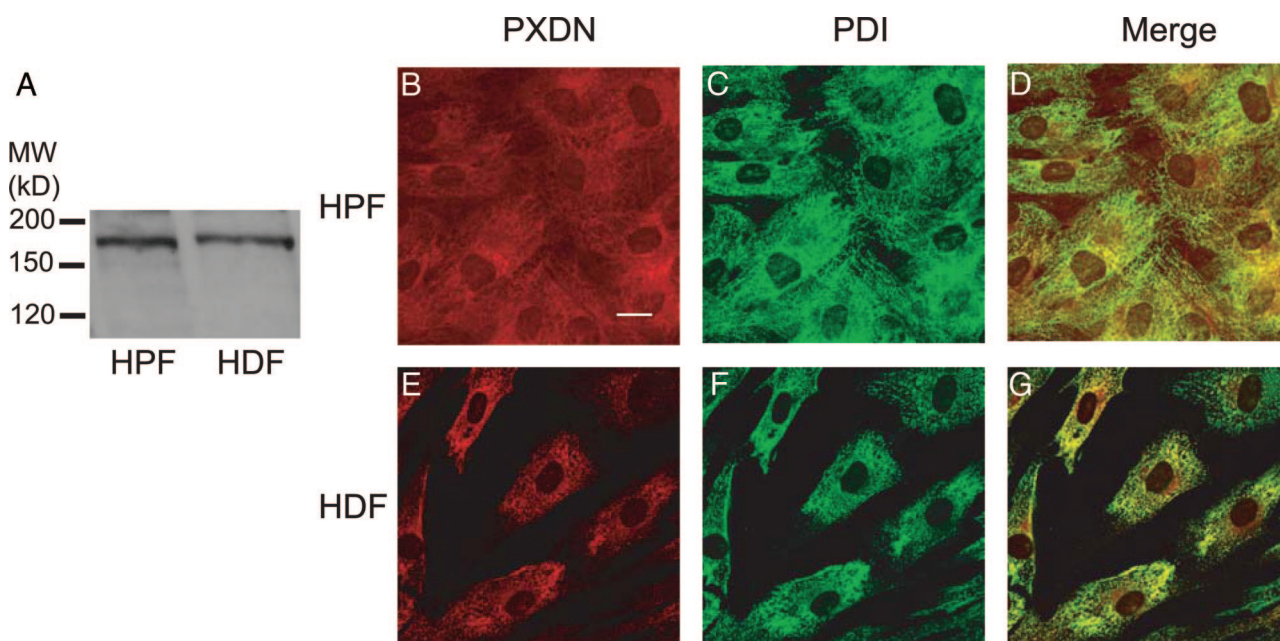


Figure 2. Detection of PXDN protein expression in human pulmonary fibroblasts (HPF) and human dermal fibroblasts (HDF). **A:** Detection of PXDN by Western blot analysis in HPFs (first lane) and HDFs (second lane). A polyclonal, PXDN-specific antibody detects PXDN in both cell types. **B–G:** Intracellular localization of PXDN in human primary fibroblasts. Paraformaldehyde-fixed, permeabilized HPFs (**B–D**) or HDFs (**E–G**) were stained for PXDN (**B, E**) or for the endoplasmic reticulum marker PDI (**C, F**). Merge of red and green fluorescences is shown in (**D**) and (**G**). Note the significant overlap of the two fluorescent signals. Scale bar = 20 μ m.

Results

Characterization of the Expression Pattern of PXDN

Conflicting data have been published regarding the tissue expression pattern of PXDN. While Horikoshi et al suggested that PXDN is ubiquitously expressed in a variety of tissues,⁹ Mitchell et al proposed that it is primarily

a melanoma-specific protein.¹⁰ To clarify these conflicting data we have used the Northern blot technique to study the expression of PXDN mRNA. To exclude the potential cross-hybridization to mRNAs encoding other peroxidases, we have used the 3'-untranslated region of the PXDN cDNA as a probe. As it is shown in Figure 1A, PXDN mRNA was expressed in several human tissues including heart, skeletal muscle, colon, spleen, kidney, liver, small intestine, and placenta, while it was absent in brain, thymus, and leukocytes. A similar picture of expression was also suggested by the analysis of PXDN EST sequences deposited in GenBank.

Intracellular Localization and Enzymatic Activity of PXDN

To study the peroxidase activity of PXDN we have expressed the protein in COS-7 cells. Using polyclonal antibodies raised against the protein we could detect PXDN in transfected cells, while mock-transfected cells showed no detectable expression (Figure 1B). We used the Amplex Red assay to study the peroxidase activity of transfected cell lysates. Figure 1C shows that we could detect peroxidase activity only in PXDN-expressing cells, while lysates of mock-transfected cells showed no detectable enzymatic activity. Next we studied the intracellular localization of PXDN in transfected COS-7 cells. Figure 1, D–F show that PXDN colocalized with PDI, a well characterized marker protein of the endoplasmic reticulum.¹²

Next we sought to examine if we can detect endogenously expressed PXDN in human primary cells. Among the cells examined we could detect PXDN protein expression in human pulmonary fibroblasts (HPFs) and human dermal fibroblasts (HDFs) (Figure 2A) and vascular endothelial and smooth muscle cells (data not shown). We used confocal microscopy to study the intracellular distribution of endogenously expressed PXDN protein. In

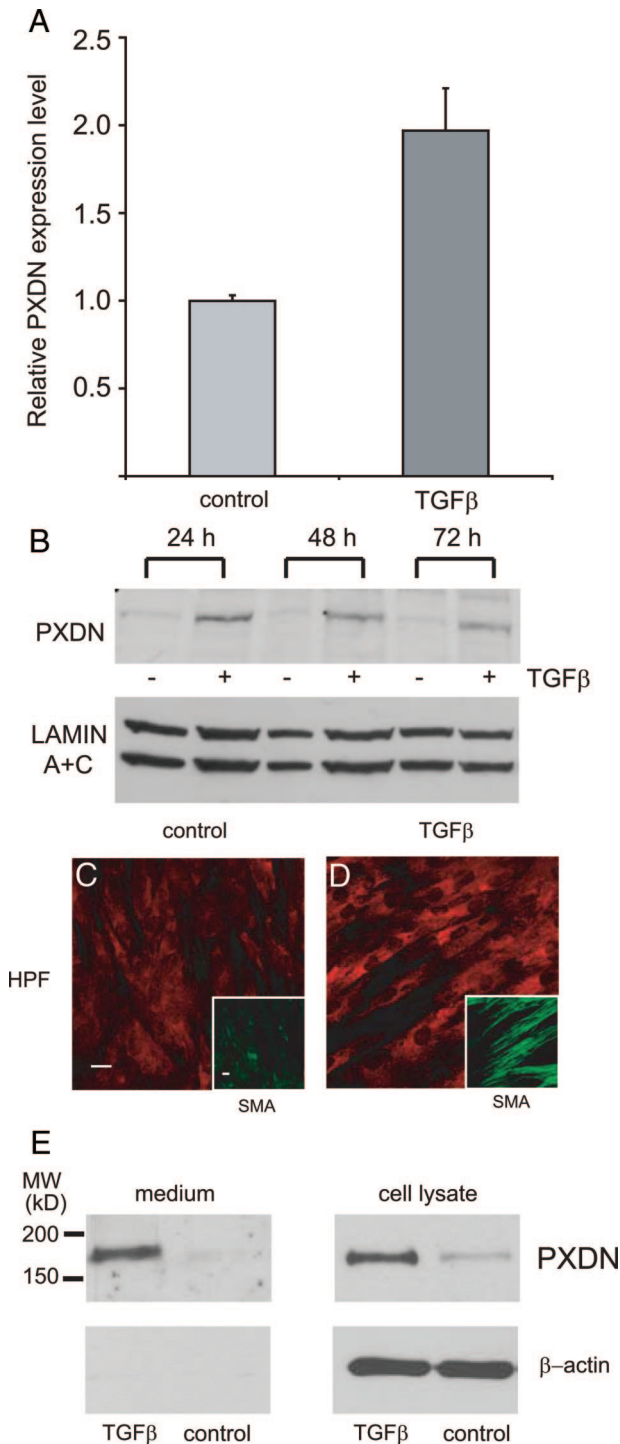


Figure 3. TGF- β 1 increases PXDN expression in human pulmonary fibroblasts (HPF). **A:** Induction of PXDN mRNA expression by TGF- β 1 treatment. HPFs were serum-deprived in the presence of 0.05% serum for 24 hours and were subsequently treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 24 hours. RNA was isolated from the cells and cDNA was synthesized (see *Materials and Methods*). Quantitative PCR experiments were performed with the SybrGreen method. Relative expression levels of PXDN are shown using GAPDH as internal control. The PXDN expression level in uninduced cells is defined as 1. Values are the mean $\pm$ SEM. **B:** Induction of PXDN protein expression by TGF- β 1 in HPFs. HPFs were serum-deprived in the presence of 0.05% serum for 24 hours and were subsequently treated with 5 ng/ml TGF- β 1 (+) for 24, 48, and 72 hours. In the medium of the control cells TGF- β 1 was omitted (-). Western blot analysis was used for PXDN detection (upper panel). Detection of Lamin A and C in loading controls indicate that each lane contained similar amount of protein. **C:** Detection of TGF- β 1-induced PXDN expression by immunofluorescence. HPFs were serum-deprived in the presence of 0.05% serum for 24 hours and were subsequently treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 24 hours (**D**) or left untreated (**C**). Paraformaldehyde-fixed, permeabilized cells were stained for PXDN (red color in **C** and **D**) and for the myofibroblast marker SMA (insets in **C** and **D**). The appearance of SMA expression indicates myofibroblastic differentiation. Scale bars = 20 μ m. **E:** Detection of PXDN in cell culture medium. After 72 hours incubation time TCA was used to precipitate proteins from the medium of control (untreated) and TGF- β 1-treated HPFs. PXDN expression of the cells was analyzed in parallel experiments. Loading controls developed for β -actin indicate that cell lysates contained similar amounts of total protein, while the absence of β -actin in the precipitated samples suggests that PXDN in the medium does not originate from unattached cells.

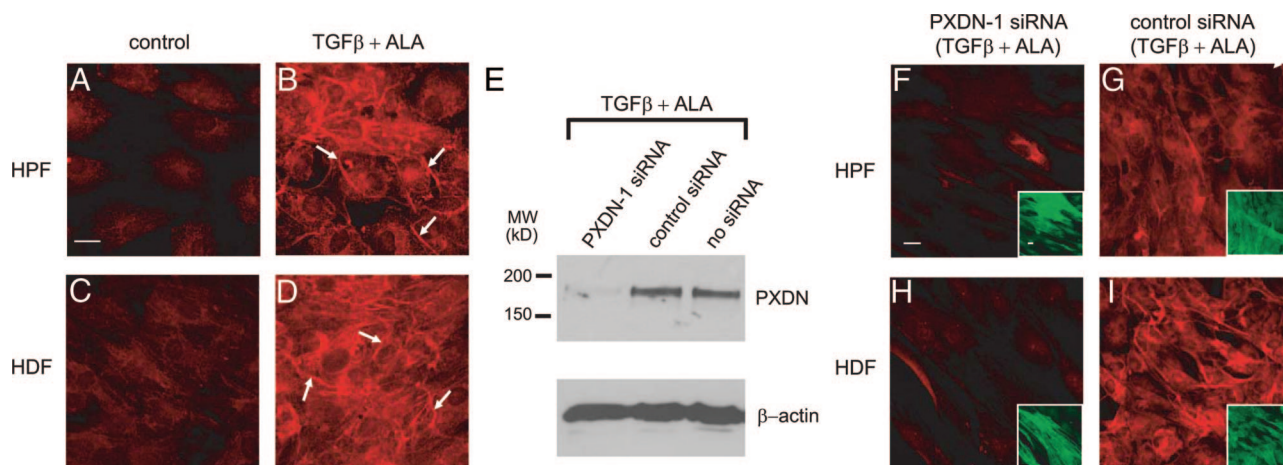


Figure 4. Formation of PXDN-containing fibrils by TGF- β 1-treated HPFs and HDFs. **A–D:** HPFs (**A,B**) and HDFs (**C,D**) were serum-deprived in the presence of 0.05% serum for 24 hours and were subsequently treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 72 hours in the presence of 500 μ mol/L ALA. TGF- β 1 was omitted from the medium of control cells (**A** and **C**). Paraformaldehyde-fixed, permeabilized cells were stained for PXDN. Note the intense staining of fibril-like structures (indicated by **arrows**) around the cells (**B, D**). **E.** Effect of siRNA treatment on PXDN expression detected by Western blot. HDFs were transfected with PXDN sequence-specific siRNAs or “minimally” changed control siRNAs or left untransfected. Myofibroblast differentiation was induced by 5 ng/ml TGF- β 1 for 72 hours in the presence of 500 μ mol/L ALA. Detection β -actin in loading controls indicate that each lane contained similar amount of protein. **F–I:** Effect of siRNA treatment on the development of PXDN-containing fibrils. HPFs (**F,G**) and HDFs (**H,I**) were transfected with PXDN sequence-specific siRNAs (**F,H**) or “minimally” changed control siRNA (**G,I**). siRNAs were transfected to the cells during serum deprivation for 24 hours and myofibroblastic differentiation was subsequently induced by 5 ng/ml TGF- β 1 in the presence of 500 μ mol/L ALA. Paraformaldehyde-fixed, permeabilized cells were stained for PXDN and for the myofibroblast marker SMA. **Insets (F–I)** show SMA staining from the same microscopic field. Scale bars = 20 μ m.

HPFs and HDFs we observed a reticular staining pattern (Figure 2, B and E). The specificity of staining was confirmed by two different PXDN-specific siRNAs (data not shown). The observed intracellular localization suggested that PXDN localized to the endoplasmic reticulum therefore we investigated the localization of PXDN in relation to this organelle. We examined the localizations of PXDN and PDI. When the cells were stained for PDI and PXDN, we observed significant overlap of the two signals suggesting that PXDN indeed localized to the endoplasmic reticulum (Figure 2, C–G). Besides its localization to the endoplasmic reticulum we have also observed perinuclear localization of PXDN in both HPF and HDF cells (Figure 2, D and G).

Induction of PXDN Expression by TGF- β 1 in Pulmonary and Dermal Fibroblasts

PXDN contains several domains, including leucine-rich repeats, immunoglobulin C2-type domains, which are usually found in proteins of the ECM.^{13,14} In accordance with its structural features the *Drosophila* homolog was described to be secreted by Kc cells.⁸ The protein localization software TargetP 1.1 predicts that human PXDN, which contains a signal peptide, goes through the secretory pathway as well. We therefore sought to find conditions when increased protein secretion occurs. When primary fibroblasts are stimulated by TGF- β 1 they go through a drastic phenotypic change and differentiate into myofibroblasts. Myofibroblasts possess contractile features and show intense synthesis of ECM proteins including fibronectin and different types of collagen.^{15,16} We studied the effect of TGF- β 1 on PXDN expression in HPFs. As shown in Figure 3A, we have observed a two-fold increase in PXDN mRNA expression after 10 hours

treatment with TGF- β 1. Figure 3B shows that after 24 hours of TGF treatment we detected an increased level of PXDN protein by Western blot and elevated PXDN level was still observed after 72 hours. We also confirmed this result by immunostaining experiments (Figure 3, C and D) where an increase in PXDN protein level was also evident after 24 hours and remained elevated for 72 hours (data not shown). Induction of the myofibroblast phenotype was confirmed by immunostaining of SMA, which was absent in fibroblasts (see inset in Figure 3C), but appeared during the course of TGF- β 1 treatment (inset in Figure 3D). We were interested if PXDN was secreted to the extracellular space, therefore we analyzed the cell culture medium for its PXDN content. Figure 3E shows that TGF- β 1 stimulated the secretion of PXDN to the cell culture medium. PXDN in the medium did not originate from unattached cells since we could not detect β -actin in the protein precipitate with a highly sensitive antibody.

Localization of PXDN to Fibril-Like Structures in the Extracellular Space

During myofibroblast differentiation cells undergo a drastic phenotypic change that is accompanied by the increased expression of heme-containing proteins such as the NADPH oxidase Nox4¹⁷ and PXDN. Since we applied TGF- β 1 to serum-deprived HPFs we have hypothesized that the cells may lack enough heme to complete the synthesis of PXDN. We therefore supplemented the medium with δ -aminolevulinic acid (ALA), a precursor of heme biosynthesis.¹⁸ Supplementation of the cell culture medium with ALA during the differentiation process did not increase the PXDN content of the medium (data not shown), however we observed a drastic change in PXDN

localization (Figure 4). After 72 hours treatment, PXDN appeared in the form of a dense network extracellular deposition of PXDN (Figure 4, A and B). The appearance of these structures was also observed in myofibroblasts developed from HDFs, suggesting that the characteristic localization of PXDN was not specific for pulmonary cells (Figure 4, C and D). PXDN-specific siRNAs effectively inhibited PXDN expression (Figure 4E) and the development of PXDN-containing fibrils (Figure 4, F–I). Importantly, siRNA treatment did not affect the myofibroblastic differentiation, as judged by the expression SMA in the siRNA-treated cells (insets, Figure 4, F–I). In our next experiments we have performed a detailed characterization of the PXDN-containing structures. Figure 5, A and B shows that PXDN-containing fibrils are frequently formed between neighboring cells and anchor to the proximity of nucleus, however fibrils bridging larger distances were also observed. To confirm the extracellular localization of PXDN we compared the staining pattern of PXDN between nonpermeabilized and permeabilized cells. As shown in Figure 5C PXDN-containing fibrils were detected when cells were not permeabilized. Importantly

the intracellular localization of PXDN was undetectable and the cells did not stain for SMA, confirming the integrity of the plasma membrane (Figure 5D). Parallel experiment on permeabilized cells proved that SMA indeed appeared in the cells during differentiation (Figure 5, E and F). Next we sought to determine the relation of PXDN-fibrils to fibronectin. Figure 6 shows that PXDN fibrils partially colocalize with fibronectin, in cultures of TGF- β 1-treated HPFs (Figure 6, A–C) and HDFs (Figure 6, D–F). Colocalization was frequently observed in thick cable-like structures, while the two proteins did not colocalize in thinner fibrils.

Role of H₂O₂ and Peroxidase Activity in the Secretion and Localization of PXDN

We analyzed the peroxidase activity of fibroblast and differentiated myofibroblast cultures but despite the obvious difference in PXDN expression we could not detect the peroxidase activity of PXDN (data not shown). Since PXDN acts as a functional peroxidase when expressed in COS7 cells (Figure 1C) and TGF- β 1-stimulated fibroblasts were described to produce reactive oxygen species (ROS)¹⁹ we wanted to investigate if we can detect the H₂O₂-consuming activity of PXDN. Confirming the results of earlier reports, we measured increased H₂O₂ production by TGF- β 1-stimulated fibroblasts (Figure 7A). We have hypothesized that if PXDN used the produced H₂O₂, then decreased PXDN expression should result increased release of H₂O₂. As shown in Figure 7A, inhibition of PXDN expression by PXDN-specific siRNA had no effect on the TGF- β 1-induced H₂O₂ production. Next we measured stimulated H₂O₂ production at different time points after the TGF- β 1 stimulus (Figure 7B). H₂O₂ production has peaked at 24 hours and no stimulated ROS-release was observed after 72 hours, when PXDN-containing fibrils appeared in the cell culture.

PXDN Expression Is Increased in a Murine Model of Kidney Fibrosis

We have also studied the possible changes of PXDN expression in a well-characterized mouse model of kidney fibrosis, induced by unilateral ligation of the ureter. We chose this model because the rapid development of kidney fibrosis in this model is dependent on TGF- β 1 signaling²⁰ and it has been previously shown that myofibroblasts appear during the process and secrete large amount of ECM proteins.²⁰ Figure 8A shows, that after 7 days of ligation we have observed a more than threefold increase in PXDN expression. Intense blue staining of kidney tissue with Goldner's trichrome method (Figure 8, B and C) indicated that fibrotic remodeling of the kidney paralleled the increased expression of PXDN. We could also demonstrate the increase of PXDN expression in fibrotic kidneys (Figure 8, D–I). While PXDN was barely detectable in normal kidneys (Figure 8G), the protein becomes enriched in the peritubular space of fibrotic

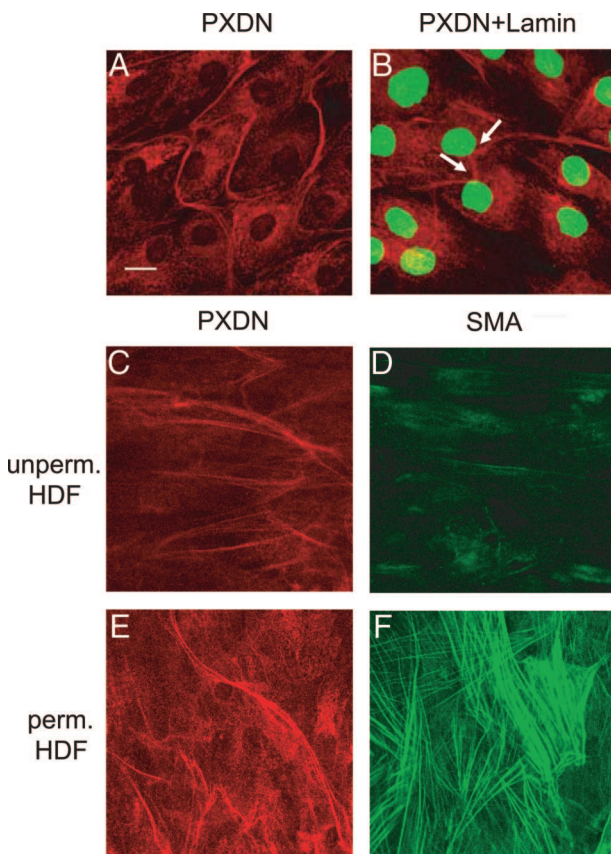


Figure 5. PXDN-containing fibrils are frequently formed between neighboring cells and localize to the extracellular space. **A–B:** HDFs (**A**) and HPFs (**B**) were serum-deprived in the presence of 0.05% serum for 24 hours and were subsequently treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 72 hours in the presence of 500 μ mol/L ALA. Paraformaldehyde-fixed, permeabilized cells were stained for PXDN (**A**) or PXDN (red) and Lamin (green) (**B**). **White arrows** indicate that PXDN-fibrils frequently dock to the proximity of nuclei. **C–F:** HDFs were serum-deprived in the presence of 0.05% serum for 24 hours and were subsequently treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 72 hours in the presence of 500 μ mol/L ALA. Paraformaldehyde-fixed, non-permeabilized (**C,D**) or permeabilized (**E,F**) cells were stained for PXDN and SMA. Scale bar = 20 μ m.

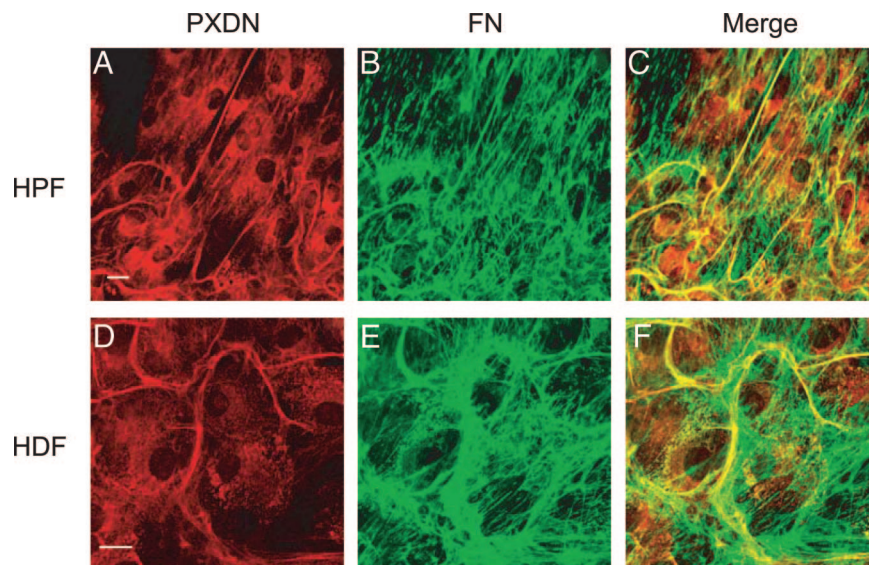


Figure 6. PXDN partially colocalizes with fibronectin in PXDN-containing fibrils. HPFs (**A–C**) and HDFs (**D–F**) were serum-deprived in the presence of 0.05% serum for 24 hours and were subsequently treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 72 hours in the presence of 500 μ mol/L ALA. Paraformaldehyde-fixed, permeabilized cells were stained for PXDN (**A,D**) and fibronectin (**B,E**). Note the intense staining of fibril-like structures around the cells, whereas the intracellular staining is essentially absent. Merge of red and green fluorescences are shown in (**C**) and (**F**). Note the colocalization of PXDN and fibronectin in large, cable-like structures. Scale bar = 20 μ m.

kidneys where it colocalized with fibronectin (Figure 8, D–I). This observation suggests that the stimulatory effect of TGF- β 1 on PXDN expression and secretion was not restricted to *in vitro* conditions.

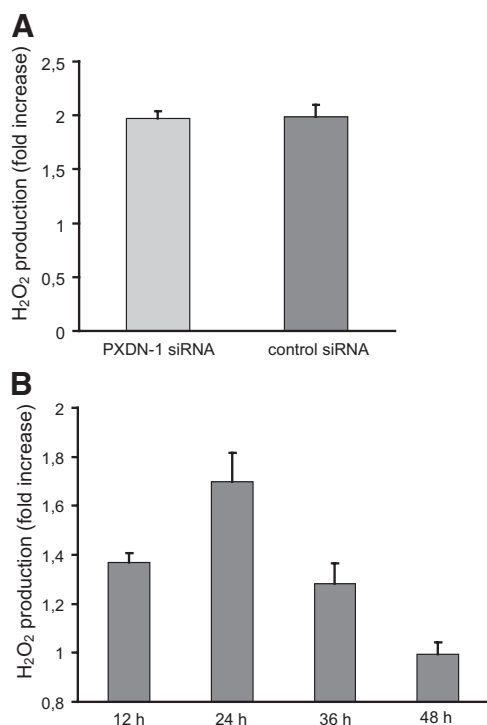


Figure 7. Role of hydrogen peroxide and peroxidase activity in PXDN function. **A:** Effect of PXDN-specific siRNA treatment on TGF- β 1-induced H₂O₂ production. HPFs were transfected with PXDN sequence-specific siRNAs or “minimally” changed control siRNAs. siRNAs were transfected to the cells during serum deprivation for 24 hours and cells were treated with 5 ng/ml TGF- β 1 in the presence of 500 μ mol/L ALA for 24 hours. H₂O₂ production was measured by the Amplex Red assay. H₂O₂ production of uninduced cells is defined as 1. **B:** Kinetics of TGF- β 1 induced H₂O₂ production. HPFs were serum-deprived in the presence of 0.05% serum for 24 hours and were subsequently treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for the indicated periods of time. H₂O₂ production of uninduced cells is defined as 1.

Discussion

Tissue fibrosis represents a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Fibrosis can arise in nearly every organ and it is especially important in the development of kidney diseases, liver cirrhosis, heart disease, and interstitial lung disease.^{21–23} Emerging evidence suggests that regardless of the location, myofibroblasts seem to have a central role in the development of fibrosis. Myofibroblasts also have an important physiological role in wound healing and development. These fascinating cells can develop from fibroblasts and also from epithelial cells during the course of epithelial–mesenchymal transition. During their differentiation, myofibroblasts develop a contractile phenotype due to increased expression of SMA and they also show increased synthesis of ECM proteins, including fibronectin and different types of collagen.^{15,16} In this work we have found that myofibroblasts also synthesize and secrete PXDN, a mammalian peroxidase with previously unknown function. Our results suggest that PXDN deposited in the extracellular space provides a previously unprecedented pathway of ECM formation.

PXDN is a unique member of the peroxidase family because its catalytic domain is surrounded by domains characteristic for proteins of the ECM. These parts include leucine-rich repeats and C2-type immunoglobulin domains, which localize to the N-terminus of the protein, while a vWF C-type domain is localized to the C-terminal part of the protein. PXDN was first described in *Drosophila melanogaster*.⁷ Kc cells of *Drosophila* origin secrete peroxidase to the extracellular medium, where the protein exists in trimers. Based on the expression pattern of its mRNA, *Drosophila* PXDN is present in hemocytes and thought to be involved in ECM synthesis during fly development. There is scant amount of information about the human PXDN. Horikoshi et al isolated cDNAs from cells where apoptosis was induced in a p53-dependent way.⁹ Among the induced cDNAs, they found an alternatively

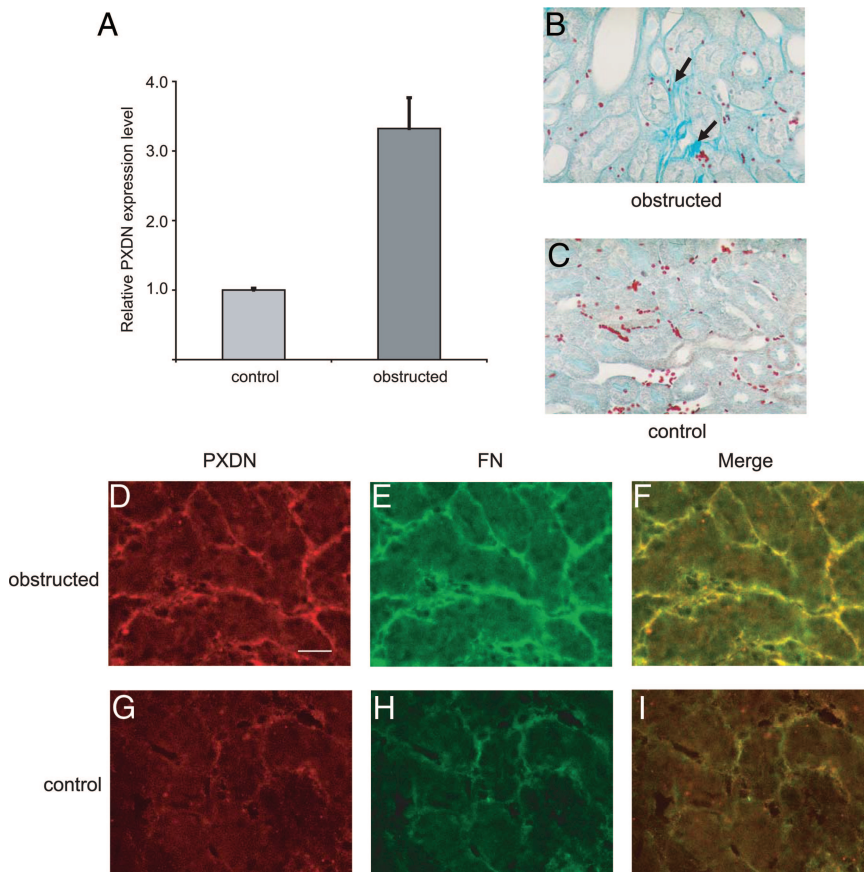


Figure 8. PXDN expression is increased in a TGF- β 1-dependent model of kidney fibrosis. **A:** Induction of PXDN mRNA expression by unilateral ureteral obstruction. Unilateral ureteral obstruction was applied for 7 days after that kidneys were removed and their PXDN expression was measured by quantitative PCR analysis performed with the SybrGreen method. Relative expression levels of PXDN are shown using GAPDH as internal control. The PXDN expression level in control, non-obstructed kidneys is defined as 1. Values are the mean $\pm$ SEM. **B, C:** Detection of unilateral ureteral obstruction-induced kidney fibrosis by Goldner trichrome staining. After 7 days of unilateral ureteral obstruction, kidneys were removed and fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde. After paraffin embedding, sections were made and stained by Goldner's trichrome method. Blue-staining, marked by **black arrows** indicates the development of fibrosis in the peritubular space of obstructed kidneys (**B**). Untreated kidneys from the same animals served as controls (**C**). **D–I:** Detection of PXDN and fibronectin in control and obstructed kidneys. Acetone fixed, frozen sections were stained for PXDN (**D,G**) and fibronectin (**E,H**). Merge of red and green fluorescences are shown in (**F**) and (**I**). Note the peritubular co-localization of PXDN and fibronectin. Scale bar = 20 μ m.

spliced product of the human PXDN gene. The authors have hypothesized that the induction of PXDN might be coupled to the altered ROS metabolism in apoptosis, but they did not elaborate on this idea. According to their study PXDN is expressed in almost all human tissues. In an independent study PXDN was identified as a novel melanoma gene (MG50) based on its expression in melanoma samples and relative absence in normal tissue samples.¹⁰ Our results are in agreement with the report of Horikoshi et al since we have detected PXDN mRNA expression in several tissues, with particularly high expression level in heart, skeletal muscle, small intestine and placenta (Figure 1).⁹ PXDN functions as a peroxidase when expressed in COS-7 cells (Figure 1). To further characterize the peroxidase activity of a purified protein we have also expressed an epitope-tagged form of PXDN in Sf9 insect cells and attempted to purify it. Unfortunately, the protein remained in the insoluble fraction during purification and we have been unable to recover functional protein from that fraction (data not shown).

In our experiments TGF- β 1 increased the expression of PXDN and its secretion to the cell culture medium (Figure 3). Myofibroblastic differentiation is usually induced in serum-deprived cells, since responsiveness to TGF- β 1 is increased under those conditions. We have hypothesized that in the absence of serum, the cellular production of heme might not be sufficient for the synthesis of heme-containing peroxidases. This assumption was also originated from the observation that TGF- β 1

increases the expression of another heme-containing protein, the NADPH oxidase Nox4.¹⁷ In our experiments we observed a more than 100-fold increase in Nox4 expression at mRNA level (data not shown) proving a markedly increased demand for heme, during the myofibroblastic differentiation. When we have supplemented the medium with ALA, a precursor of heme biosynthesis, we could observe the localization of PXDN into fibril-like structures (Figure 4). Although heterologously expressed PXDN exhibited peroxidase activity we could not detect the enzymatic activity of PXDN in fibroblasts and differentiated myofibroblasts. The lack of measurable peroxidase activity might be explained by the fact that PXDN has very low enzymatic activity when compared with other peroxidases. For example COS7 cells, that heterologously express lactoperoxidase, show 100-fold higher peroxidase activity than PXDN-expressing COS7 cells (data not shown). Nelson et al has also shown, that compared with other peroxidases, *Drosophila* PXDN had lower affinity for classical peroxidase substrates.⁷ Alternatively, it is also possible that endogenously expressed PXDN is in complex with another protein that inhibits the enzymatic activity of PXDN. Incorporation of PXDN into larger complexes was also suggested by Nelson et al who could not recover active PXDN from *Drosophila* tissues showing high level expression of the protein.⁷ Nevertheless we cannot exclude the possibility that PXDN still functions as a peroxidase in the endoplasmic reticulum or in the extracellular matrix of myofibroblasts. Since we

could not measure the enzymatic activity of PXDN in myofibroblast cultures we cannot state that ALA indeed increased the maturation of PXDN. However without ALA supplementation TGF- β 1 did not induce the appearance of PXDN in extracellular, fibril-like structures. Since inclusion of ALA during myofibroblast differentiation did not change the amount of precipitable PXDN in the medium, it is possible that formation of PXDN-containing fibrils is a result of a different secretory pathway that is uncovered by assisted heme synthesis. Importantly *in vivo*, during kidney fibrosis PXDN appears in the peritubular space providing further evidence for its secretion (Figure 8). The presence of PXDN-containing fibrils in the extracellular space, suggested the multimerization of the secreted protein and its association to other constituents of the ECM. In fact we could detect partial colocalization of PXDN and fibronectin around the cells (Figure 6). Colocalization of PXDN and fibronectin was also observed in fibrotic kidneys. The domain organization of PXDN suggests that the protein is ideally suited for the stabilization of the ECM through protein–protein interactions. *Drosophila* PXDN was described to exist in a trimeric form, a complex that is thought to be organized through its C-terminal vWF C-type domain.⁷ The same domain is also recognized in mammalian PXDN. This domain is also found in other ECM proteins including the thrombospondin type I and II group of vertebrate matrix proteins, which also exist in the form of trimers.²⁴ The presence of leucine-rich repeats and immunoglobulin loops in PXDN also suggests that this protein readily associates with other ECM proteins. Leucine rich repeats are short sequence motifs present in a number of proteins with diverse functions.¹³ These protein modules are usually involved in homophilic and heterophilic protein-protein interactions. Immunoglobulin loop motifs are also frequently found in neural cell adhesion molecules such as fascilin and neuroglian.¹⁴ The combination leucine-rich repeats and immunoglobulin C2 type domains is not frequently observed in proteins. In fact the only other known mammalian example for such combination is the LRIG (leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains) family of proteins, members of which are transmembrane proteins and were previously shown to negatively regulate the ErbB family of receptor tyrosine kinases.^{25,26}

Peroxidases in lower species are involved in stabilization of the ECM through tyrosine–tyrosine crosslinks.⁵ Oxidative formation of dityrosines contributes to the cuticle synthesis in *C. elegans* and hardening of the fertilization envelope in sea urchin eggs.^{7,27} The ability to form dityrosine crosslinks is a general feature of mammalian peroxidases as well, but the physiological significance of such activity remains to be established. It was reasonable to assume that crosslinking peroxidase activity was involved in the formation of PXDN-containing fibrils, since Thannickal et al described increased H₂O₂ production by TGF- β 1-stimulated lung fibroblasts.^{19,28} In subsequent studies they have also found that H₂O₂ produced by fibroblasts indeed supports dityrosine formation by an exogenous peroxidase.²⁸ In our experiments however, it seems unlikely, since we could not detect the peroxidase

activity of PXDN in myofibroblasts and no increase in dityrosine level was observed during the course of myofibroblast differentiation (data not shown). On the other hand, since the peroxidase domain of PXDN is intact we were interested if reactive oxygen species, more specifically H₂O₂ has any role in the formation of PXDN-containing extracellular structures. Our results, however, suggest that TGF- β 1-stimulated H₂O₂ production unlikely has a role in the formation of PXDN-containing fibrils. First, suppression of PXDN expression did not affect ROS release from the cells, suggesting that H₂O₂ was not used in peroxidase-catalyzed reaction. Second, the kinetics of TGF- β 1-stimulated H₂O₂ production did not parallel the formation of PXDN-containing fibrils, since maximal H₂O₂ production was observed at 24 hours after TGF- β 1-stimulation, when fibroblasts have not differentiated yet into myofibroblasts. The kinetics of TGF- β 1-stimulated ROS production rather suggests that H₂O₂ has a role in the differentiation process itself. Experiments by Cucoranu et al suggest that induction of the ROS-producing enzyme Nox4 would be responsible for oxidative changes during myofibroblastic differentiation.¹⁷

At least three members of the mammalian peroxidase family have host defense function, therefore it will be interesting to explore if secreted PXDN has any antimicrobial activity. This possibility would certainly be important during wound healing when myofibroblasts are normally activated. Activated neutrophil granulocytes have been recently described to form fibril-like structures, neutrophil extracellular traps, which contained elastase, DNA, myeloperoxidase, and showed antimicrobial activity.²⁹

In summary, we conclude that the synthesis and secretion of PXDN by myofibroblasts is a previously unrecognized pathway in the formation of the ECM. Future studies should identify the function of PXDN in myofibroblasts and explore the importance of this pathway in wound healing and in the development of diseases where fibrogenic response seems to be an important part of the underlying pathology.

Acknowledgments

We are grateful to András Kapus and László Buday for helpful comments about the manuscript.

References

1. O'Brien PJ: Peroxidases. *Chem Biol Interact* 2000, 129:113–139
2. Klebanoff SJ: Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005, 77:598–625
3. Wijkstrom-Frei C, El Chemaly S, Ali-Rachedi R, Gerson C, Cobas MA, Forteza R, Salathe M, Conner GE: Lactoperoxidase and human airway host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 29:206–212
4. Ruf J, Carayon P: Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 2006, 445:269–277
5. Daiyasu H, Toh H: Molecular evolution of the myeloperoxidase family. *J Mol Evol* 2000, 51:433–445
6. LaFleur GJ, Jr., Horiuchi Y, Wessel GM: Sea urchin ovoperoxidase: oocyte-specific member of a heme-dependent peroxidase superfamily that functions in the block to polyspermy. *Mech Dev* 1998, 70:77–89

7. Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, Lambeth JD: Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol* 2001, 154:879–891
8. Nelson RE, Fessler LI, Takagi Y, Blumberg B, Keene DR, Olson PF, Parker CG, Fessler JH: Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J* 1994, 13:3438–3447
9. Horikoshi N, Cong J, Kley N, Shenk T: Isolation of differentially expressed cDNAs from p53-dependent apoptotic cells: activation of the human homologue of the *Drosophila* peroxidasin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 261:864–869
10. Mitchell MS, Kan-Mitchell J, Minev B, Edman C, Deans RJ: A novel melanoma gene (MG50) encoding the interleukin 1 receptor antagonist and six epitopes recognized by human cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* 2000, 60:6448–6456
11. Chevalier RL, Thornhill BA, Wolstenholme JT, Kim A: Unilateral ureteral obstruction in early development alters renal growth: dependence on the duration of obstruction. *J Urol* 1999, 161:309–313
12. Ellgaard L, Ruddock LW: The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 2005, 6:28–32
13. Kobe B, Kajava AV: The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 2001, 11:725–732
14. Walsh FS, Doherty P: Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997, 13:425–456
15. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3:349–363
16. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G: The myofibroblast. One function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007, 170:1807–1816
17. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S, Sorescu D: NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 2005, 97:900–907
18. Ponka P: Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 1999, 318:241–256
19. Thannickal VJ, Fanburg BL: Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* 1995, 270:30334–30338
20. Yang J, Liu Y: Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001, 159:1465–1475
21. Wynn TA: Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007, 117:524–529
22. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, III, Martinez FJ: Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 2004, 55:395–417
23. Bataller R, Brenner DA: Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005, 115:209–218
24. Bornstein P: Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J* 1992, 6:3290–3299
25. Suzuki Y, Sato N, Tohyama M, Wanaka A, Takagi T: cDNA cloning of a novel membrane glycoprotein that is expressed specifically in glial cells in the mouse brain. LIG-1, a protein with leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains. *J Biol Chem* 1996, 271:22522–22527
26. Shattuck DL, Miller JK, Laederich M, Funes M, Petersen H, Carraway KL, III, Sweeney C: LRIG1 is a novel negative regulator of the Met receptor and opposes Met and Her2 synergy. *Mol Cell Biol* 2007, 27:1934–1946
27. Heinecke JW, Shapiro BM: The respiratory burst oxidase of fertilization. A physiological target for regulation by protein kinase C. *J Biol Chem* 1992, 267:7959–7962
28. Larios JM, Budhiraja R, Fanburg BL, Thannickal VJ: Oxidative protein cross-linking reactions involving L-tyrosine in transforming growth factor-beta1-stimulated fibroblasts. *J Biol Chem* 2001, 276:17437–17441
29. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004, 303:1532–1535