

A Nox4 NADPH oxidáz működésének vizsgálata

Doktori értekezés

Zana Melinda

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Geiszt Miklós, D.Sc.
egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Benkő Szilvia, Ph.D.
egyetemi adjunktus
Dr. Kardon Tamás, Ph.D.
egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Sarkadi Balázs, D.Sc.
egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Cervenák László, Ph.D.
tudományos főmunkatárs
Dr. Nagy Péter, D.Sc.
tudományos osztályvezető

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	11
1.1 A reaktív oxigén származékokról általában	11
1.2 A NADPH-oxidázok, mint természetes ROS források	12
1.2.1 A NADPH-oxidázok szerkezeti felépítése	13
1.2.2 A NADPH-oxidázok alegységei és regulátorai	14
1.2.3 A NADPH-oxidázok szöveti eloszlása.....	16
1.3 A Nox4	17
1.3.1 Azonosítása.....	17
1.3.2 Szerkezeti sajátosságai	19
1.3.3 A Nox4 komplex szöveti expressziós mintázata	20
1.3.4 A Nox4 sejten belüli lokalizációja.....	21
1.3.5 A Nox4 aktivátorai, regulátorai	23
1.3.6 Nox4 szerepe	30
1.3.7 Nox4 inhibitorok.....	35
1.4 A TGF- β jelpálya	36
1.4.1 A TGF- β 1 indukált jelpályák.....	37
1.4.2 Nox4 indukciója TGF- β 1-n keresztül.....	38
1.5 H ₂ O ₂ , mint szignalizációs molekula	40
1.5.1 Fizikai-kémiai tulajdonságai.....	40
1.5.2 A H ₂ O ₂ hatásmechanizmusa.....	40
1.5.3 A H ₂ O ₂ eliminálása.....	42
1.5.4 A H ₂ O ₂ szignalizációs célmolekulái	43
1.5.5 H ₂ O ₂ fluoreszcens mérési módszerei.....	46
1.5.6 Genetikailag kódolt H ₂ O ₂ szenzorok.....	47
2. Célkitűzések	56
3. Anyagok és módszerek	57
3.1 Felhasznált anyagok	57

3.2 Plazmid konstrukciók készítése	57
3.3 QPCR	58
3.4 Sejtkultúra, felhasznált sejtvonalak.....	59
3.4.1 p22 ^{phox} és Nox4 deficiens egértörzsek.....	59
3.4.2 Farok fibroblaszt sejtek preparálása	60
3.4.3 Nox4 expresszió indukálása	60
3.5 Tranziens transzfekció és géncsendesítés	60
3.6 Immunfluoreszcens jelölés	61
3.7 Western blot analízis	61
3.8 Mikroszkópos technikák	62
3.8.1 Konfokális mikroszkópia.....	62
3.8.2 Mikrofluorimetriás mérések	62
3.9 Statisztika	64
4. Eredmények	65
4.1 A PerFRET szonda karakterizálása.....	65
4.2 TGF- β 1 H ₂ O ₂ termelést indukál humán pulmonáris és dermális fibroblaszt sejteken.....	67
4.3 A Nox4-, és p22 ^{phox} -deficiens egerek TGF- β 1 indukciót követő H ₂ O ₂ termelése	69
4.4 A p22 ^{phox} és Nox4 mRNS expressziós szintjei primer fibroblasztokban	70
4.5 p22 ^{phox} fehérje mennyiségi meghatározása	72
4.6 Sejten belüli lokalizációs vizsgálatok	76
4.6.1 Nox4 és p22 ^{phox} szubcelluláris lokalizációja dermális fibroblasztokban.....	76
4.6.2 BJ fibroblasztokban H ₂ O ₂ szintek nyomon követése HyPer szenzorral.....	78
4.6.3 A Nox4-p22 ^{phox} komplexének orientációs vizsgálatai.....	80
5. Megbeszélés	82
5.1 A PerFRET intracelluláris H ₂ O ₂ szenzor karakterizálása	82
5.2 A Nox4, NADPH oxidáz jellemzése fibroblasztokban.....	83
5.2.1 A Nox4 oxidáz TGF- β 1 hatására fibroblasztokban H ₂ O ₂ -t termel.....	83
5.2.2 A p22 ^{phox} és Nox4 fehérje kapcsolata.....	85
5.2.3 A Nox4-p22 ^{phox} komplex lokalizációs vizsgálatai.....	88
6. Következtetések	92
7. Összefoglalás	94

9. Summary	95
10. Irodalomjegyzék	96
11. Saját közlemények	134
11.1 Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:	134
11.2 Egyéb, a témához tágabb körben kapcsolódó publikációk:	134
12. Köszönetnyilvánítás	136

1. Rövidítések jegyzéke

A549	Humán tüdő eredetű adenokarcinóma sejtvonala
AA	Arachidonic Acid; arachidonsav
AIEE	Aggregation-induced Emission; aggregáció-indukált emisszió
AP-1	Aktivátor Protein 1
AQP	Aquaporin, víz csatorna
AR22 ⁰ CGD	Autoszómális recesszív öröklésű krónikus granulomatózis
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1; apoptózis-szabályzott kináz 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATII	Angiotensin II; Angiotenzin II
Bach2	BTB Domain And CNC Homolog 2; BTB domén és CNC Homológ 2
BiP	Binding immunoglobulin protein, GRP-78
BJ	Humán bőr eredetű fibroblaszt
BSA	Bovine Serum Albumin; szarvasmarha szérum albumin
CGD	Chronic granulomatous disease; krónikus granulomatózis betegség
CHIP	C-terminus of Hsc70-interacting protein
Co-Smad	Common partner Smad: Smad4
CRAC	Calcium release-activated channel
CYBA	p22 ^{phox} citokróm b α -alegysége

CFP	Cyan Fluorescent Protein; ciánkék fluoreszcens fehérje
DCFH	2',7'-dichloro-dihidrofluorescein
DH	Dehidrogenáz domén
DM	dehidrogenáz domén
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetil-szulfoxid
cDNS	komplementer DNS szál
DPI	difenil-jodónium
DTT	dithiothreitol
Duox	Dual oxidase; dual oxidáz
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	diamin-tetraacetát
EF-hand	kalcium-kötő motívum
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein; zöld fluoreszcens fehérje
Elk1	ETS domain-containing protein Elk-1
EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition; epithéliális-mezenchimális átalakulás
ER	endoplazmás retikulum
ER _{lum}	ER luminális felszíne
ER _{cyto}	ER citoszólikus felszíne
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase; extracelluláris szignál szabályozott kináz
EST	Expressed Sequence Tag

Ero1	ER oxidoreductin 1; endoplazmás retikulum oxidoreduktáz 1
FA	Fokális adhézio
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FBS	Fotal Bovine Serum; főtális borjú szérum
bFGF	basic Fibroblast growth factor; fibroblaszt növekedés factor
FIG1	HiF-1 α aszparagin hidroxiláz-1
FKBP	FK506 binding protein; FK506-kötő fehérje
FRB	FKBP-rapamiyn binding domain; FKBP-rapamicin kötő domén
FRET	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
GFP	Green Fluorescent Protein; zöld fluoreszcens fehérje
gp91 ^{phox}	Nox2, Cytochrome b-245 β polipeptid
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation
H. Renox	humán Nox4
HA-tag	Human influenza hemagglutinin epitope; hemagglutinin fúziós fehérje epitóp
HDF	Humán Dermális Fibroblaszt
HEAC	Humán Aorta Endothél sejt
HEPES	2-4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil-etánszulfonsav
HEK293FS	HEK293 freestyle sejt vonal
Hic-5	Hydrogen Peroxide-inducible Clone-5; H ₂ O ₂ -indukálható 5-ös klón
HIF1 α	Hypoxia-inducible Factor 1-alpha; hypoxia indukált faktor 1-alfa

HPF	Human Pulmonary Fibroblast, humán tüdő eredetű fibroblaszt
HRE	Hypoxia Responsive Element; hypoxia érzékeny minta
HRP	tormaperoxidáz
HSP70	70 kilodalton Heat Shock Protein; 70 kDa-os hősokk fehérje
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell; humán köldökvéna endothél sejtvonat
IP3R	Inozitol Trifoszfát Receptor
I-Smad	Inhibitory Smad: Smad5, Smad6
JNK	c-jun N-terminal kinase; c-jun N-terminális kináz
KEAP	Kelch-like ECH-associated protein 1
Ki	inhibíciós állandó
Km	Michaelis-Menten állandó
LAP	Látencia-asszociált protein
M.Renox	Egér Nox4
MPO	Mieloperoxidáz
mRNS	hírvivő RNS
NAC	N-acetil-cisztein
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NF- γ B	nukleáris factor γ B
NLS	Nuclear Localization Signal; Nukleáris lokalizációs szignál
NO	nitrogén-monoxid
Nox	NADPH oxidase; NADPH oxidáz
NOXA1	NADPH Oxidase Activator 1; NADPH oxidáz aktivátor 1

NOXO1	NADPH Oxidase Organizer 1
Nrf2	Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-like 2
NSCLC	Non-small Cell Lung Cancer
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
O ₂ • ⁻	szuperoxid
Oct-1	Octamer-binding Transcription Factor 1; octamer-kötő transzkripció faktor 1
ORF	Open Reading Frame, gén kódoló szakasza
OSCN ⁻	hipotiocianát
p40 ^{phox}	Neutrophil Cytosol Factor 4; fagocita oxidáz 40 kDa tömegű komponense
p47 ^{phox}	Neutrophil Cytosolic Factor 1; fagocita oxidáz 47 kDa tömegű komponense
p67 ^{phox}	Neutrophil Cytosolic Factor 2; fagocita oxidáz 67 kDa tömegű komponense
PARP	Poli-ADp ribóz polimeráz
PASMC	Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell; tüdő artériás simaizom sejt
PCR	Polymerase Chain Reaction; polimeráz láncreakció
PDI	Protein Disulfide Isomerase; protein diszulfid izomeráz
PHD	HIF-1 α prolin hidroxiláz
PKC	Protein Kinase C; protein kináz C
PMA	Forbol-Mirisztoil-Acetát
PMN	Polymorphonuclear Leukocytes; Poli-Morfo-Nukleáris sejt
Poldip2	2-es típusú polimeráz delta interakciós fehérje
PTEN	Phosphatase and tensin homolog, foszfatáz és tenzin homológ

PTP	Protein Tyrosine Phosphatase; protein tirozin foszfatáz
PTP-B1	Protein Tyrosine Phosphatase B1; protein tirozin foszfatáz B1
QPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction; kvantitatív PCR
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RENOX	Renal Oxidase, Nox4; vese-oxidáz
RNS	ribonukleinsav
ROS	Reactive Oxygen Species; reaktív oxigén származék
R-Smad	Receptor-regulated Smads: Smad2, Smad3
RyR1	Rianodin Receptor 1
SARA	Smad anchor for receptor activation
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SH3	SRC Homology 3 Domain; Src 3 homológia domén
siRNS	short interfering RNA; kis interferáló RNS
SMA	Smooth Muscle Actin; simaizom aktin
SOC	Store Operated Ca ²⁺ Channel; Ca ²⁺ raktár-regulált kalcium csatorna
SOD	Superoxide dismutase; szuperoxid-dizmutáz
SRE	Smad Responsive Element
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STIM1	Stromal Interaction Molecule 1
TASK-1	TWIK-related acid-sensitive K ⁺ channel 1

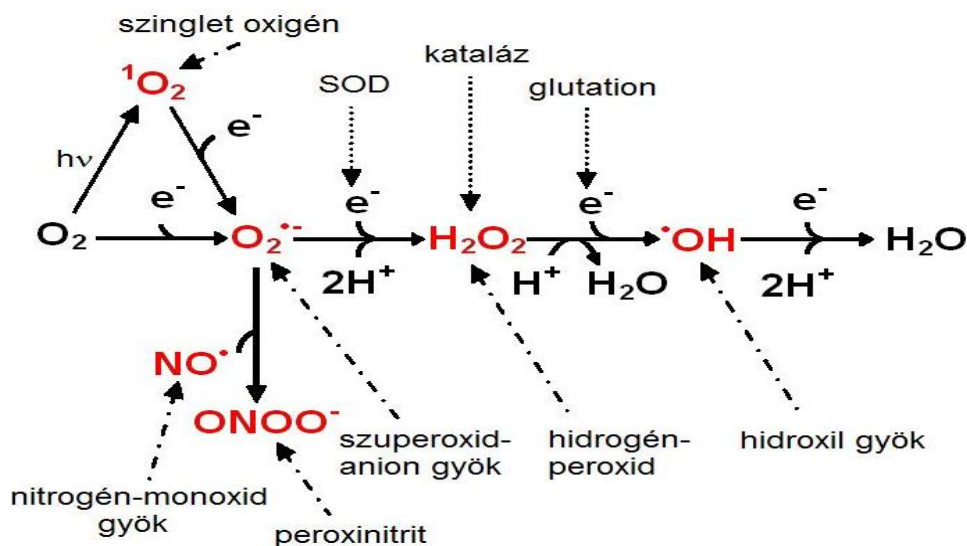
TG	Thapsigargin
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1; transzformáló növekedési faktor β 1
TGFBR	Transforming Growth Factor β 1 Receptor; transzformáló növekedési faktor β 1 receptor
TM	Transzmembrán régió
TNF α	Tumor nekrosis faktor α
TRP	Tranziens receptor potenciál ioncsatorna szupercsalád
Trx	Thioredoxin; tioredoxin
Tsk4/5	Tirozin kináz szubsztrát 5 SH3 doménnel
TTF	Tail-tip Fibroblast; farkvég eredetű fibroblaszt
TYR	Tirozináz gén (<i>Try</i>)
Vmn2r	Vomeronazális 2-es receptor pseudogén
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell; érfal simaizom sejt
Yap1	Yeast Activator Protein 1
YFP	Yellow Fluorescent Protein; sárga fluorescens fehérje

1. Bevezetés

1.1 A reaktív oxigén származékokról általában

A reaktív oxigén származékok (ROS) szerepe a szervezetben napjainkban is intenzíven kutatott terület. Kezdetben pathofiziológias folyamatokhoz kötötték őket, de ez a kép az elmúlt néhány évtized alatt erőteljesen átformálódott. Mára bizonyított, hogy a szabályzott ROS termelés számos területen esszenciális komponense a szervezet egészséges homeosztázisának, mint például az immunvédelem, a hormonszintézis, az idegrendszer működése, az oxigénérzékelés és a vazoreguláció (1).

A reaktív oxigén származékok molekuláris oxigénből kialakuló molekulák: tágabb értelemben ide soroljuk a szuperoxidot ($O_2^{\cdot-}$), a hidrogén-peroxidot (H_2O_2), a szinglet oxigént (1O_2), valamint az ózont (O^3) (1. ábra). Közülük szabadgyöknek csak a szuperoxid és a hidroxilgyök ($\cdot OH$) tekinthető, heves reakcióképességükért a legkülső elektronhéjukon található párosítatlan elektron felel (2). Az oxigén más molekulákkal, például nitrogénnel is kialakíthat reaktív származékokat, mint a nitrogén-monoxid ($\cdot NO$) és peroxinitrit ($ONOO^-$), amelyek szintén fontos jelátviteli mediátorok (3).



1. ábra: A Reaktív oxigén-, és nitrogén származékok egymásba alakulásának sematikus rajza: A molekuláris oxigén lépésenkénti, egyértékű redukciója szuperoxidot ($O_2^{\cdot-}$),

hidrogénperoxidot (H_2O_2), hidroxil gyököt ($\cdot OH$) és végül vizet eredményez. Szinglet oxigén csak nagyobb gerjesztési energia által jöhet létre. Eliminálásukat szuperoxid-diszmutázok (SOD), katalázok, peroxiredoxinok, citokróm-oxidázok, illetve nem enzimatis antioxiidáns rendszerek, például glutation, α -tokoferol, aszkorbinsav és liponsav is képes katalizálni (4).

A szervezetben nagyobb mennyiségben a mitokondrium sejtlegzése során kaszkád-szerű reakcióban melléktermékként termelődik szuperoxid, melyet a mitokondrium mátrixában a szuperoxid-diszmutáz (SOD) hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) alakít tovább. Emellett az endoplazmás retikulum (ER) lumenében a szekretoros fehérjék oxidatív érése során is keletkezik ROS, főként H_2O_2 az Ero1 oxidoreduktáz enzim termékeként (5, 6).

A sejtekben keletkezett ROS, mint direkt szignalizációs molekulák, szigorúan regulált folyamatokban, szerves és szervetlen vegyületek oxidációjával megváltoztathatják azok aktivitását, fiziológias funkcióját (7). Eliminálásukat számos enzim (szuperoxid-diszmutázok, katalázok, peroxiredoxinok, citokróm-oxidázok), valamint nem enzimatis antioxiidáns rendszerek, például glutation α -tokoferol, aszkorbinsav és liponsav is képes katalizálni. Fokozott termelődésük, vagy a sejtek és a szövet redukciós kapacitásának csökkenése túlterheli a fiziológias redox egyensúlyt, mely oxidatív stresszt idéz elő (8). A fokozott oxidatív környezet gyors lánreakcióban triggereli a DNS, fehérje, lipid vagy szénhidrát molekulák aspecifikus oxidációját vagy peroxidációját, ezáltal a biológias szövetek strukturális és funkcionális integritása csökken, hozzájárulnak pathofiziológias elváltozások kialakulásához, mint neurodegeneráció, tumorigenezis fokozódás, valamint a diabetes és öregedés egyik lehetséges okának is tartják (9–14).

1.2 A NADPH-oxidázok, mint természetes ROS források

A NADPH-oxidáz (Nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát oxidáz; Nox) enzimek többsejtű organellumokban a szabályzott ROS termelődésért felelősek (15–17).

Elsőként a polimorfonukleáris (PMN) fagocita sejtekben kifejeződő NADPH-oxidáz (Nox2 vagy gp91^{phox}) enzimkomplex működését írták le (18), ahol a fagocita sejt direkt baktericid hatású degranulációja során kialakuló oxidatív robbanás fokozott oxigén fogyasztása az enzimkomplex szuperoxid termelésére fordítódik (19). 1970-ben Klebanoff jellemezte az

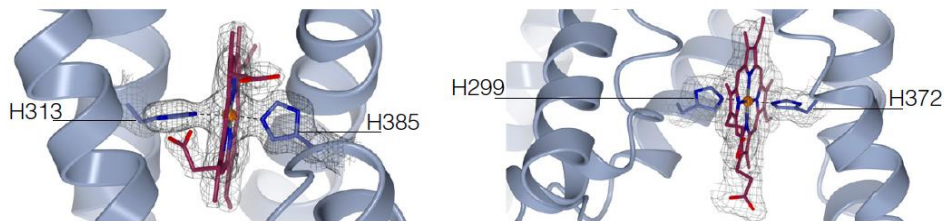
oxidatív robbanásban közreműködő mieloperoxidázt (MPO) (20), 1973-ban Babior azonosította, hogy a keletkező termék szuperoxid (21), 1980 körül már összekapcsolták a krónikus granulomatózisban (CGD) szenvedő betegek bakteriális fertőzésekkel szembeni csökkent ellenállását az enzimkomplex hibás működésével. Noha a NADPH-oxidáz komplex funkcióját gyorsan felismerték, de alegységeit csak a későbbi évtizedekben sikerült maradéktalanul azonosítani (22–27).

A Nox2 karakterizálásával párhuzamosan számos megfigyelés támasztotta alá, hogy más sejtípusokban is megfigyelhető hasonló funkciójú enzim, például fibroblasztokban (28), érfal simaizom sejtekben (29) vagy különböző humán tumoros sejtvonalakban (30). A jelenleg ismert 7 Nox homológ pontos azonosítása a 2000-es évek elejére lett teljes: Nox2-öt követte a Nox1 (31, 32), Nox4 (33, 34), Nox3 (35), Nox5 (35, 36), Duox1 és Duox2 (37–40).

1.2.1 A NADPH-oxidázok szerkezeti felépítése

A legfontosabb közös jellemzőjük egy konzervált, transzmembrán katalitikus doménon keresztüli elektrontranszfer, ahol elektron donorként NADPH-t, akceptorként molekuláris oxigént használnak, amely a reakció során szuperoxid anionná vagy hidrogén-peroxiddá alakul át (41). Számos szerkezeti azonosság is felfedezhető a család tagjai között, a C-terminális végük felől haladva a közös motívumok az alábbiak:

- Egy citoszólikus DH (dehidrogenáz domén), mely tartalmaz egy NADPH- és flavin-adenin-dinukleotid- (FAD) kötő domént;
- Hat konzervált, α -helikális transzmembrán (TM) szakasz;
- A III-as, és V-ös TM régióban két-két konzervált hisztidin, melyek két prosztetikus hem csoport koordinálást végzik (2. ábra) (42);

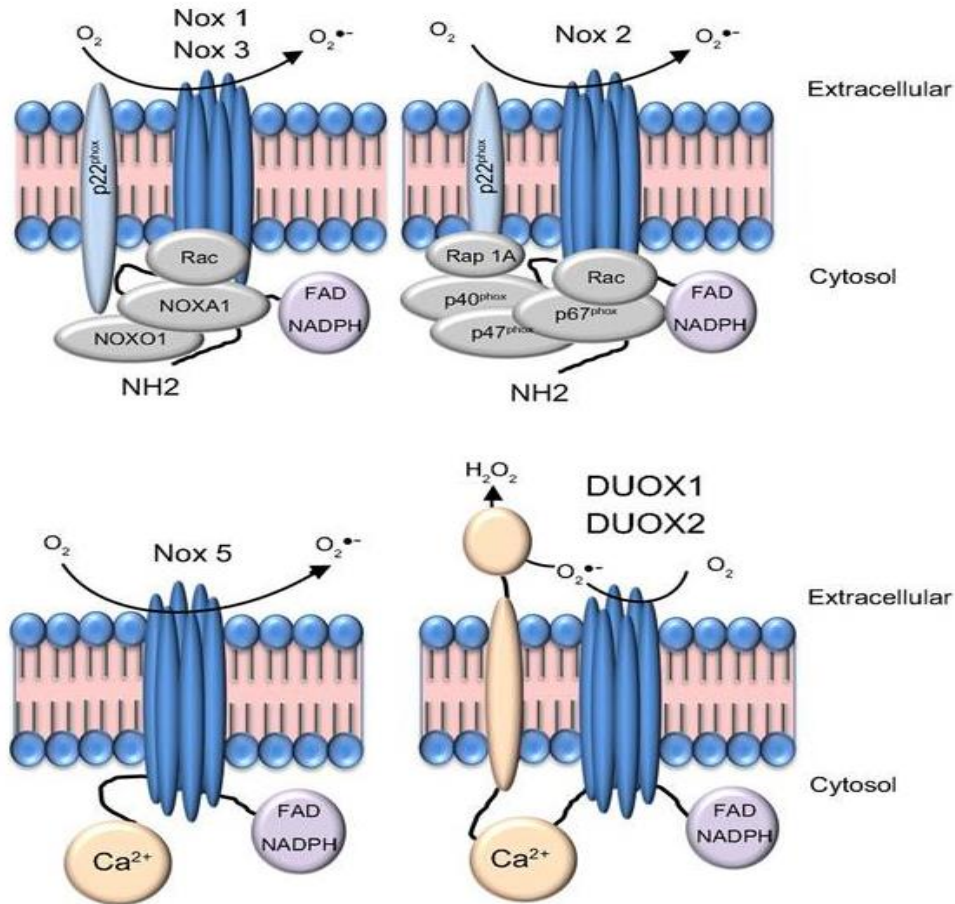


2. ábra: A konzervált hisztidinek predikált elhelyezkedése: A III-as és V-ös TM régióban elhelyezkedő hisztidinek a Nox5 feltételezett aktív konformációjának krisztallográfias modelljében (43).

Ezen alapvető közös elemeken kívül a Nox5, a Duox1 és a Duox2 (Dual oxidase 1, 2) tartalmaz négy intracellulárisan elhelyezkedő „EF-hand” motívumot is, melyek az enzimkomplexek szabályzásához szükséges Ca^{2+} kötésért felelősek (35). A Duox enzimek konzervált hisztidin aminosavai a IV-es, és VI-os TM régióban helyezkednek el. Tartalmaznak továbbá egy 'extra' TM szakaszt és egy extracelluláris peroxidáz-szerű motívumot is. Evolúciós megközelítésben a Nox5 enzim áll a legtávolabb a fagocita oxidáztól (43, 44).

1.2.2 A NADPH-oxidázok alegységei és regulátorai

A NADPH oxidázok aktiválódásához, szabályzásához elengedhetetlen különböző citoszólikus fehérjék jelenléte (3. ábra). A Nox2 ($\text{gp91}^{\text{phox}}$) igényli a legtöbb alegység együttes kapcsolódását, de az analógia a Nox1 és Nox3 esetén is hasonló: a membránhoz kötött p22^{phox} fehérje stabilizálja a Nox enzimet, illetve dokkoló egység a sejt stimulációját követően transzlokálódó citoszólikus irányító egységek számára: a p47^{phox} (fagocita oxidáz 47 kD tömegű komponense) és Noxo1 (NADPH organizer 1), az aktivátor p67^{phox} (fagocita oxidáz 67kDa tömegű komponense) és Noxa1 (NADPH oxidáz aktivátor 1), valamint a Rac kis G-fehérje (24, 45, 46). A legkésőbb felfedezett p40^{phox} (fagocita oxidáz 40 kDa tömegű komponense) inkább modulációs alegység (27, 47–49).



3. ábra: A NADPH oxidázok alegységeinek sematikus rajza: A Nox1 és Nox3 oxidázok szükséges alegysége a stabilizáló $p22^{phox}$, szabályzó faktoraik a $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ és homológjai a Noxo1, Noxa1, valamint GTP-kötött Rac. A Nox2 további modulációs alegysége a $p40^{phox}$. A Nox5 és Duox1-2 a szerkezetében található kalcium-kötő EF-hand motívum segítségével érzékeli az intracelluláris kalcium koncentrációváltozást, más regulátoruk nincs, csak éresi faktoraik (50).

A Nox5 és a Duox enzimek szabályozása eltérő, a Dual oxidázoknak kifejeződésük során éresi faktorokra (Duoxa1 és Duoxa2) van szükségük, amelyek az ER-ből a plazmamembránba történő transzlokációját mediálják (16). A Nox5 jelen ismereteink szerint szintén nem igényel citoszólikus partnereket vagy a $p22^{phox}$ stabilizálását (36, 51–53). Aktivációjához az intracelluláris szabad kalcium vagy kalcium-kötött kalmodulin bekötődésével kialakuló konformációváltozás szükséges (35, 36, 51).

1.2.3 A NADPH-oxidázok szöveti eloszlása

Értekezésem fő témáját, a Nox4 enzimet külön fejezetben kívánom bemutatni, a többi jelenleg ismert NADPH oxidáz szöveti eloszlását, aktivátorait, regulátorait és főbb funkcióját az alábbi táblázatban foglaltam össze:

	<i>Szöveti eloszlása</i>	<i>Sejtfunkció</i>	<i>Szabályzók</i>
Nox1	vastagbél epithél sejtek ér simaizom, uterus	kolon antibakteriális védekezés, nyálkahártya homeosztázisa	p22 ^{phox} , Rac, NOXO1, NOXA1
Nox2	PMN sejtek, neuronális sejtek, kardiomiocita, harántcsíkolt izom, hepatocita, endothél sejtek, és hemopoetikus őssejtek	immunválasz	p22 ^{phox} , Rac p47 ^{phox} (NOXO2) p67 ^{phox} , p40 ^{phox}
Nox3	belső fül	hiányában súlyos vesztibuláris zavar	p22 ^{phox} , Rac1, NOXO1, NOXA1
Nox5	lép, here, uterus érfal simaizom, placenta	többféle hosszúságú izoforma, Nox5 funkciója jelenleg ismeretlen	Ca ²⁺ jelre szuperoxid termelés
Duox1	pajzsmirigy légúti epithél sejtek, cerebellum, testis	nyálkahártyafelszínek védelme	Duoxa1, Duoxa2
Duox2	pajzsmirigy nyálmirigy, uterus gastrointesztinális epithelium	hormonszintézishez esszenciális jodid ionok oxidációja	Duoxa1, Duoxa2

1.táblázat: A NADPH oxidázok szöveti eloszlása és legjellegzetesebb funkciói: A Nox és Duox enzimek szöveti expressziója, vastagon jelölve az oxidáz legmagasabb expressziós helye, valamint funkcióik (1, 54).

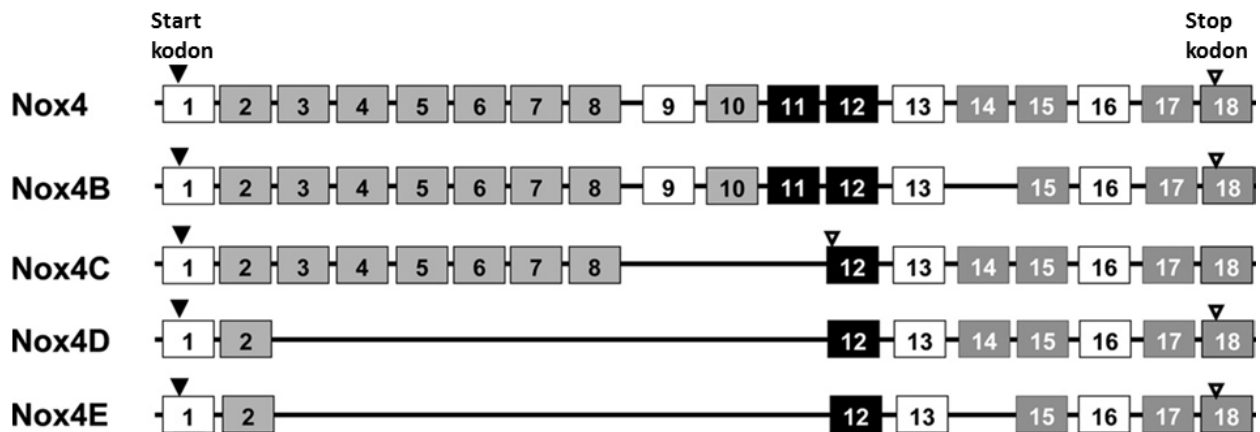
1.3 A Nox4

Jelen fejezetben az irodalom átfogó álláspontját szeretném bemutatni a NADPH oxidázok talán legmegosztóbb tagjáról, a Nox4-ről. Élettani szerepéről, de még expressziós helyéről is a szakirodalom sokszor egymással ellentétes következtetésekre jutott.

1.3.1 Azonosítása

Először 2000-ben Geiszt és munkatársainak sikerült vese lizátumból azonosítani a Nox4-et kódoló mRNS-ét, majd teljes hosszúságában megklónozták a Nox4-et (33). Egy évvel később Shiose és munkatársai is megerősítették a vesében egy 25 exonból álló Nox2 homológ (Renal oxidase, Renox) intenzív jelenlétét (34).

A Nox4 génje a 11q14.3-q21 kromoszómarszen található, a humán gén 160kb ölel át a genomban és 18 exont tartalmaz. Ezen génről mRNS szintű vizsgálatok során azonosítottak további négy splice variánst (Nox4A-D) (4. ábra) (55).



4. ábra: A Nox4 splice-variánsainak exon struktúrája: A boxokban a számok az exon sorszámát tartalmazzák, a fekete boxok a FAD-kötő domént, a szürkék fehér betűkkel a NADPH kötésért felelős szakaszokat, a szürke boxok fekete betűkkel pedig a transzmembrán régiókat jelölik. A fehérek linker szekvenciáknak felelnek meg (55).

Ezen splice variánsok fiziológiai szerepéről még kevesebb adat áll rendelkezésre. A Nox4D nem rendelkezik TM régióval és hiányos FAD-kötő doménje is, azonban nukleáris lokalizációt mutat humán és patkány érfal simaizom (VSMC) sejtekben, ahol csökkent ROS

termelésével redox érzékeny transzkripció faktorokat modulál, mint az ERK1/2 (Extracellular Signal Regulated Kinase) vagy a Elk1 (ETS domain-containing protein Elk-1) (56). Azon A549 (humán tüdő eredetű adenokarcinóma) sejtek ROS termelése is csökkent, ahol a NADPH- és FAD-kötő domének csak részlegesen hiányoztak, A TM doménekkel nem rendelkező variánsok a citoszólban fejeződnek ki, de ROS termelésük intakt maradt (55).

A teljes hosszúságú fehérje egy 578 aminosavból álló 66,5 kDa tömegű protein, melynek aminosav sorrendje 57%-os homológiát és 39%-os egyezést mutat a Nox2 enzimmel. A humán és az egér Nox4 egymással 90%-ban homológ (5. ábra) (33, 34).

```

H. Renox MAVSWRSWLANEGVRLHLCLFIWLSMNVLLFWKTEFLLYNQGPPEYHYLHQMLGLGLCLSR 58
M. Renox MAVSWRSWLANEGVRLHLCLLIWLSLNVLLFWKTEFLLYNQGPPEYYYIHQMLGLGLCLSR 58
Consensus W NEG+ +++WL +NV LF + +Y+ GP+Y Y ++LG L L+R
M. gp91Phox MGNWAVNEGLSFEVILVWLGENVLEFVFNYYKVYDDGPKYNYTRKLLGSALALAR 54
* *
ASASVLNLLNCSLILLPMCRTLAYLRGSQKVPSSRRTRRLLDKSRTEFHITCGVTICIFSGVHVAHL- 124
ASASVLNLLNCSLILLPMCRTLAYLRGSQKVPSSRRTRRLLDKSKTLHITCGVTICIFSGVHVAHL- 124
A A+ LN NC LILLP+CR +L++LRGS S R RR LD++ T H I + + +H AHL
APAACLNFNCMLLILLPVCRNLLSFLRGSSACCSTRIRRQDRNLETFHKMVAWMIALHTAHTIAHLF 121
-----VNAL-----NFSV-----NYSEDFVELNAARYRDEDPRKLLF---TTVPGLTGVCMVVVL 171
-----VNAL-----NFSV-----NYSEDFLELNAARYQNEDEPRKLLF---TTIPGLTGVCMVVVL 171
VNA +S+ N +E++ LN AR + ++P L+ T + G+TG+ + + L
NVEWCVNARVGISDRYSIALSDIGDNEEY--LNFAREKIKNPEGGLYVAVTRLAGITGIVITLCL 186
* *
FLMIETASTYAIRVSNYDIFWYTHNLFVVFYMLLTLHVSGGLLKYQTNLDTHPPGCISLNRTSSQNIS 238
FLMVEASTYAIRVSNYDIFWYTHNLFVVFYMLLTLHVSGGLLKYQTNVDTHPPGCISLNQTSSQNMS 238
L++T+ST IR S ++FWYTH+LF +F++ L +H + +++ QT SL + N+
LLIITSSTKTIRRSYFVFWYTHHLEFVIFFIQLAIGHAERIVRGQT-----AESLEE---HNLD 242
L-PEYFSEHFHEPFPEGFSPKPAEFTQHKFVKICMEEPREFQANFPQTWLVISGPLCLYCAERLYRYIR 304
I-PDYVSEHFHGSGLPRGFSKLEDRYQKTLVKICLLEPKQAHPQTWLVISGPLCLYCAERLYRCIR 304
+ + + E + K +K C PKE + P TW WI GP+ LY ERL R R
ICADKIE-----WGK-----IKEC-PVEKBAQNPMTWKWVIGEMELYLCERLVRVFW 290
SNKPVTTIISVISHPSDVMEIRMVKENFKARPGQYITLHCPSVSALENIPFTLTMCPPTETKATFGVHL 371
SNKPVTTIISVINHPSDVMEIRMIKENFKARPGQYIILHCPSVSALENIPFTLTMCPPTETKATFGVHL 371
S + V I V+ HP +EL+M K+ FK GQYI + CP VS LE IPFTLTMCPPTETKATFGVHL P E F +H
SQQKVVTIKVVTTHPFKTIELQMKKGFMEVQYIFVKCPKVKLEWIPFTLTMCPPTETKATFGVHL 355
KIVGDWTERFRDLLLLPPSSQDSEILPFIQSRNPKLYIDGPFSGPFEEISLNYEVS LCVAGS GIGVTPF 438
KVVGDWTERFRDLLLLPPSSQDSEILPFIHSRNPYKLYIDGPFSGPFEEISLNYEVS LCVAGS GIGVTPF 438
++VGDWTE L D + F + PK+ +DGPF+ E+ +YEV + V GIGVTPF
RIVGDWTEG----LFNACGCDKQ--EFQDAWKLPKIAVDGPFGTASEDVFSYEVVMLVGA GIGVTPF 416
ASILNTLLDDWKPY-----KLRRLYFIWVCRDIQSFQWFADLLCMLHKNKFWQENRDPYVNIQLYL 498
ASILNTLLDDWKPY-----KLRRLYFIWVCRDIQSFQWFADLLCMLHKNKFWQENRDPYVNIQLYL 498
ASIL ++ W Y KL+++YF W+CRD +F+WFAADLL +L + + N +++ +YL
ASILKSV---WYKYCDNATSLKLLKIYFYWLCRDIHAFEFWADLLQLLETQMQRNANFLSYNIYL 480
SQTGDIQK-----IIGEKYHALNSRLFIGRPRWKLLEFDEIAKYNRKGKTVGVFCCGPNLSL 552
SQTGDIQK-----IIGEKYHTLNSRLFIGRPRWKLLEFDEIAKCNRKGKTVGVFCCGPNSSI 552
+ D Q I G K TL GRP W F IA + T+GVF CGP ++
TGWDESQANHFVAVHDEEKDVITGLKQKTL----YGRPNWDNEFKTIASEHPNTTIGVFLCGPEAL 542
SKTL--HKLSNQNS-YGTRFEYNKESFS 578
SKTL--HLSNRNNS-YGTRFEYNKESFS 578
++TL ++SN+ G F +NKE+F
AETLSKQSISSNSESGPRGVHFIENKFN 570

```

5. ábra: A humán és az egér Nox4 szekvenciájának összehasonlítása a Nox2 enzimmel: Fekete háttérrel kaptak a transzmembrán régiók, piros keretben a FAD-kötő szekvencia részlet, az összes konzervált, NADPH kötésért felelős régió fekete keretben látható. A „Consensus” sorban

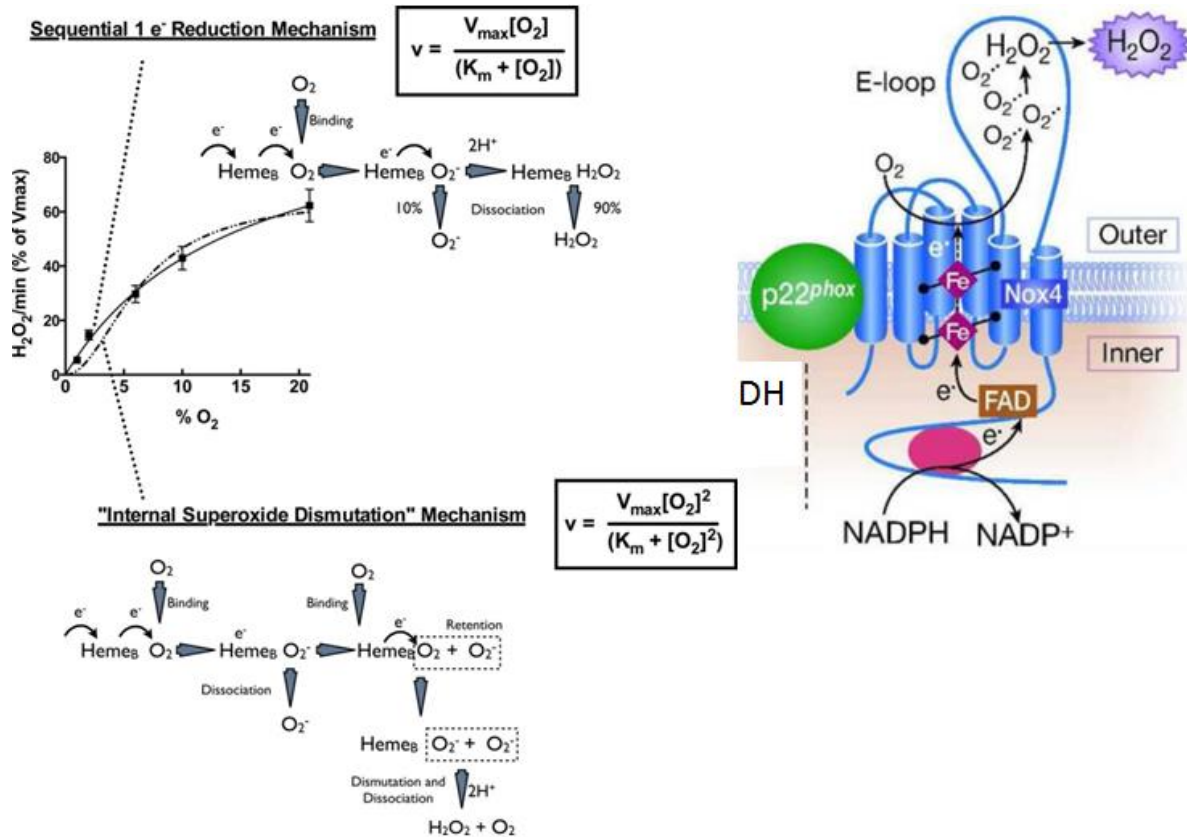
szereplő betűk aminosav azonosságot, a „+” szimbólumok pedig hasonlóságot jelölnek. H. Renox: Human Nox4, M. Renox: egér Nox4 (33).

1.3.2 Szerkezeti sajátosságai

A Nox4 is tartalmazza a NADPH oxidáz aktivitáshoz szükséges közös szerkezeti doméneket. A 6 hidrofób TM α -hélix 5 hurkot képez (A-E), melyek közül az A-, C-, és E-hurok extracelluláris vagy valamely sejtalkotó lumináris tere felé nézve az oxigén redukcióját végzi (57). Katalitikus aktivitásáért a viszonylag hosszú, citoszólikus C-terminális végén található DH domén, valamint a III-as és V-ös transzmembrán régiókban található négy konzervált hisztidin felel, melyek két hem-et kötnek, akár a klasszikus (p22^{phox}-dependens Noxok: Nox1, Nox2 és Nox3) Noxok. A DH domén tartalmaz egy prosztetikus FAD- és egy NADPH-kötőhelyet, melyeket az intracelluláris B-loop konzervált argininjei stabilizálnak, ezáltal megfelelő távolságba kerül a FAD és az egyik hem molekula az elektron átvételéhez (58). *In vitro* sejtmentes, tisztított Nox2/4 kiméra TM és DH domén tesztek alapján a Nox4 DH doménje a NADPH-t preferálja a NADH-val szemben (Km 55 μ M) (59, 60).

A Nox4 intrinsic tulajdonsága, hogy H₂O₂-ot termel szuperoxid képződése mellett. A Nox4 a harmadik extracelluláris E-hurkán egy 10-, és egy 18 aminosavas konzervált inzercióval hosszabb, mint a Nox1 és a Nox2 E-hurka. Ezen inzerciók külön-külön törlése is túlsúlyban szuperoxid termelést eredményezett (61). Két hipotézis is lehetséges a H₂O₂-ot termelésre: az első szerint egyszerre egy elektron redukciója megy végbe és a képződő termék attól függően lesz szuperoxid vagy hidrogén-peroxid, hogy gyorsabb-e az első szuperoxid disszociációja, mint a szekvenciális elektronátvétel sebessége a második Hem (HemB) molekulán. Az úgynevezett “belső szuperoxid-diszmutáz mechanizmus” szerint egyszerre két diszkrét oxigénkötési lépés zajlik le, melyek mindegyike szuperoxidot eredményez. Ezek már az aktív centrumban rögtön diszmutálódnak és hidrogén-peroxid szabadul fel (6. ábra)(62, 63).

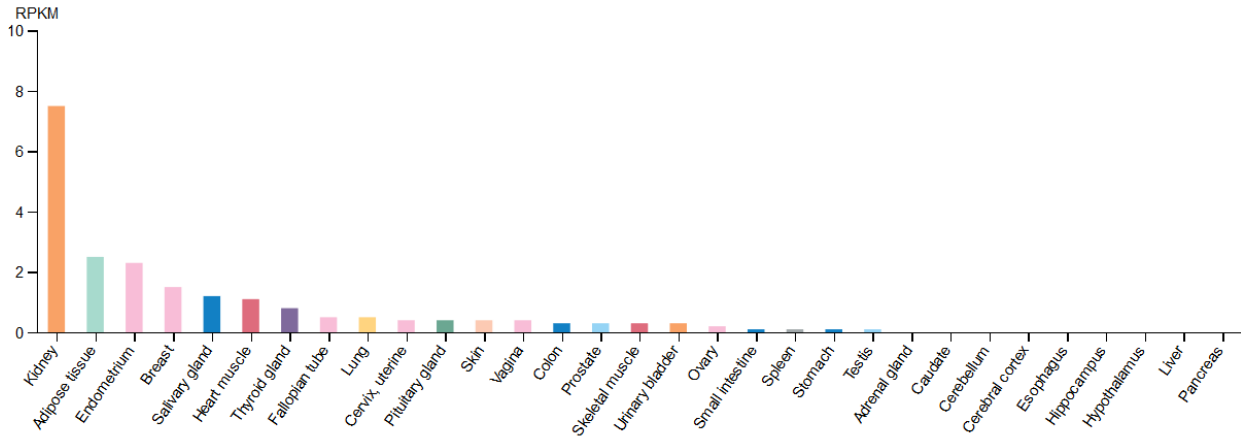
Egyedülállóan a p22^{phox}-dependens Nox-ok között a Nox4 DH doménje aktivációt követően intrinsic aktivált konformációban marad, a NADPH-ról folyamatos az elektrontranszfer FAD-ra, majd a hem molekulákra, ezáltal konstitutívan aktív komplex jön létre (6. ábra)(59).



6. ábra: A Nox4 H₂O₂ termelésének kinetikai modelljei: Az ábra felső részén a szekvenciális, egyszerre egy elektron redukciós modellje látható, a képződő termék az első szuperoxid disszociációjának és a következő elektronátvétel sebességének függvénye. Az ábra alsó részén az egyszerre két diszkrét oxigénkötési lépés és hidrogén-peroxid szabadulásának sebessége látható. Jobb oldalon a Nox4 H₂O₂ képzésének sematikus modellje látható (62, 63).

1.3.3 A Nox4 komplex szöveti expressziós mintázata

In situ hibridizációs kísérletekben több munkacsoport is a legnagyobb mennyiségben a vesében detektálta a Nox4 mRNS-ét. Geiszt és munkatársai az egér Nox4 mRNS-ét a proximális tubulusban és kisebb mennyiségben a vesevelő gyűjtőcsatornáiban azonosították (33). Más munkacsoportok szerint a humán izoforma a disztális tubulusokban (34, 64, 65), a peritubuláris térben (66) fejeződik ki. Egyéb felnőtt szövetekben az expressziós szintje elmarad a vesében kifejeződő Nox4 mennyiségétől (7. ábra):



7. ábra: A Nox4 szöveti expressziós eloszlása RNS-seq adatok alapján: RPKM (reads per kilobase per million mapped reads): felillesztett kilobázisok száma a leolvasott readek függvényében. (GTEx – Genotype - Tissue Expression:genotípus - szöveti expresszió <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000086991-NOX4/tissue>).

A Nox4 sejtszintű expressziós mintázata széleskörű eloszlást mutat, leírták ér endothél sejtekben (67–69), érfal simaizom sejtekben (70–75), adventitiális-, tüdő-, és bőr eredetű fibroblasztokban (76–78), adipocitákban (79), hepatocitákban (80, 81), osteoklasztokban (82, 83), neuronális sejtekben (84, 85), valamint hemopoetikus őssejtekben is (86).

1.3.4 A Nox4 sejtben belüli lokalizációja

A Nox4-et szubcellulárisan szinte minden sejtalkotóban kimutatták már: a nukleuszban, mitokondriumban, az ER-ban, fokális adhézióban, plazmamembránban és perinukleárisan is. A 3. táblázatban összefoglaltam, hogy a Nox4-et különböző mérési módszerekkel hol detektálták:

<i>Sejttípus</i>	<i>Modell</i>	<i>Módszer</i>	<i>Sejten belüli elhelyezkedés</i>	<i>Ref.</i>
Epithél sejtek: HEK293, COS7	Nox4 overexpresszió	KM	ER	(87)
HEK293	indukálható Nox4 overexpresszió	KM, TIRF mikroszkópia, szuperoxid detektálás	PM, ER, perinukleáris	(60, 88)
HUVEC	Nox4-GFP expresszió	HyPer, TIRF mikroszkópia	ER	(89)
HUVEC	endogén Nox4	Immunhisztokémia, elektronmikroszkópia	nukleusz	(90)
HEK293, humán ASM	Nox4 overexpresszió	KM	citoszkeleton, ER	(91)
HAEC	AdNox4-V5 overexpresszió	KM	ER	(92)
Humán monocita eredetű makrofág	oxLDL-stimulált makrofág	KM, immunhisztokémia	ER, nukleusz	(93)
Felnőtt és neonatális kardiomiocita	endogén és overexpresszált Nox4	KM	perinukleáris régió, valószínűleg ER	(94)
Primer patkány VMSC	endogén Nox4	KM	FA, stressz rostok, nukleusz	(95, 96)
Nox4 Tg egér Primer kardiomiocita	endogén Nox4	KM	mitokondrium	(97)
Patkány vese cortex és mesenchialis sejtek	sztreptozin indukálta patkány diabetes modell	KM, Mitokondrium izolálás	mitokondrium, ER	(98)
Szívspecifikus Nox4 expresszált kardiomiocita	endogén Nox4	SOD gátolható ROS termelés, Kemiluminescens úton lucigeninnel tisztított mitokondriumon	mitokondrium	(99)
Nox4 transzgenikus és KO egér kardiomiocita	endogén Nox4	WB, KM, Sejtfractionálás	nukleusz, mitokondrium, mikroszóma	(100)
Egér hepatocita	Nox4 csendesítés shRNS-el	WB, KM, Elektronmikroszkópia	nukleusz külső-, belső membrán hálózat	(101)
THP-1 monocita	<i>in vitro</i> előidézett metabolikus stressz LDL, magas glükóz koncentráció	KM	aktin remodelling, F-aktin	(102)
Primer humán tüdő simaizom sejt	endogén Nox4	KM	ER, nukleusz	(103)
Primer nyúl, és egér vázizom sejt	endogén Nox4	WB, Sejtfractionálás	szarkoplazmás retikulum, mikroszóma	(104)
HUVEC, HMEC	Nox4-GFP overexpresszió	KM	ER	(68)

2. táblázat: A Nox4 feltételezett intracelluláris lokalizációja különböző sejttípusokban detektálva: PM: plazmamembrán, ER: endoplazmás retikulum, FA: fokális adhézió, WB: Western blot, KM: konfokális mikroszkópia, ASM: felnőtt vázizom, HEAC: humán aorta endothél sejt, HMEC: humán dermális endothél sejt.

A 2. táblázat is azt benyomást kelti, hogy a szakirodalomban nincs egységes álláspont a Nox4 pontos lokalizációját illetően sem. Szerkezetét tekintve nem található rajta semmilyen szignál- vagy retenciós szekvencia, mégis a legtöbb esetben az ER és a mitokondrium membránjában detektálták mind primer sejtekben, mind heterológ expressziós rendszerekben.

1.3.5 A Nox4 aktivátorai, regulátorai

1.3.5.1 A p22^{phox} fehérje

A p22^{phox} fehérjét 1987-ben Parkos és munkatársai izolálták humán promielotikus leukémia sejtekből, mely a cDNS könyvtár szerint a humán CYBA gén termékének, a citokróm b_{-245mv} (b₅₅₈) könnyű láncának azonosítottak (105). A humán CYBA gén 8,5kb hosszúságú, a 16. kromoszóma hosszabbik karján (16q24.2) található, 6 exont és 5 intront tartalmaz (25). A kifejeződő p22^{phox} 22kDa tömegű, 196 aminosavból felépülő transzmembrán fehérje (106). A fagocita oxidáz (Nox2) a citokróm b₅₅₈ két alegysége a gp91^{phox} és a p22^{phox} (107, 108), melyek egymást kölcsönösen stabilizálják (109), valamint a p22^{phox} feladata az aktivált oxidáz komplex többi alegységének membránhoz horgonyozása (110, 111).

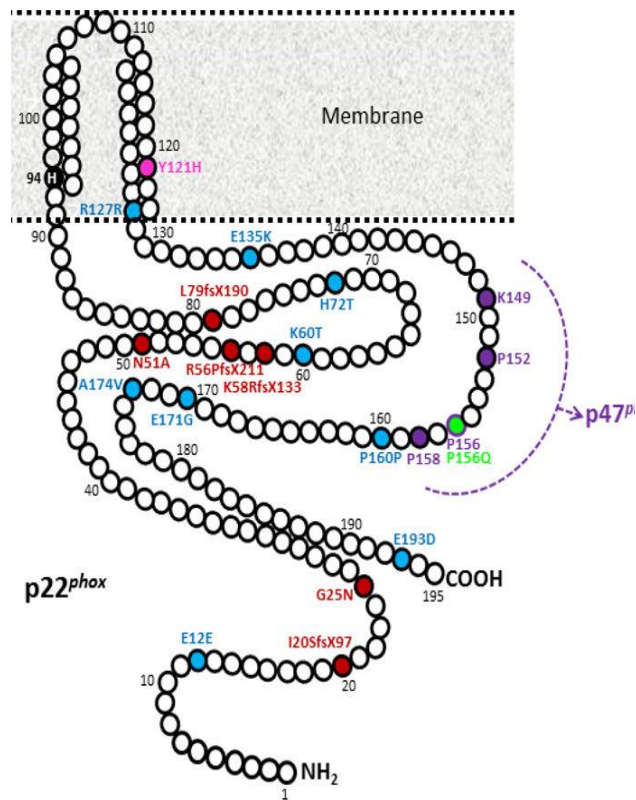
A p22^{phox} génben eddig jellemzett polimorfizmusok megjelennek a fehérje diszfunkcionalitásában is (105, 112–115). Egyedi esetekben izoláltak olyan mutációkat, mely a p22^{phox} teljes vagy részleges hiányát okozták, mint az A125T, a G98A csere, illetve egy 179 bázispáros inzerció (112, 113, 116). A japán populációban jellemző a C242T és a A640G aminosav szubsztitúciója, melyek csökkent vaszkuláris NADPH oxidáz aktivitás által csökkentették a CAD (coronary artery disease) kialakulását (114, 117–119), de ezt kaukázusi amerikai betegekben nem sikerült kimutatni (115). A krónikus granulomatózis betegségben (CGD) szenvedő páciensek kétharmada esetében a citokróm gp91^{phox} génje hibás, mégis ezen betegekben a p22^{phox} gén intakt, de a fehérje expressziója csökkent mértékű (120, 121). Az autoszómális recesszív öröklésű humán p22^{phox} gén AR22⁰CGD mutációi és SNP variánsai, a betegek 5%-a esetében szintén citokróm-deficiens CGD fenotípust eredményeznek (25, 122–127).

A p22^{phox}-deficiens *nmf333* egértörzs, melyet kísérleteink során mi is alkalmaztunk, egy misszenz mutációt hordoz a gén kódoló szakaszán. Az ötös exonban egy pontmutáció

következtében, a fehérje egyik predikált transzmembrán szakaszán, a 121-es pozíciójú tirozin helyett hisztidin található, amely valószínűleg súlyos strukturális változásokat eredményez (128). Az nmf333 egerek recesszíven öröklődő, komplex fenotípust mutatnak, a Nox2 diszfunkciója miatt CGD-szerű immundeficiensek, továbbá egyensúlyérzékelési zavarban is szenvednek a belső fülben rezidens NADPH oxidáz, a Nox3 hibás működése következtében (128–130).

2.3.5.1.1 A p22^{phox} fehérje szerkezete

Ubiquiter fehérje, mRNS-e mind magzati, mind különféle felnőtt szövetekben expresszálódik (1, 105). A fehérje komplett kristályszerkezetének hiányában a transzmembrán régióinak pontos száma egyelőre kérdéses. A hidrofób szakaszok jelenlétéből kiindulva egyes modellek két (107, 131), három (132–134), illetve négy (135) transzmembrán szakaszt is jósolnak. Szélesebb körben elfogadott a két TM régiót tartalmazó változat a molekula kis mérete, N-, és C-terminális citoszolikus vége, és az utólagos glikolizáció hiánya miatt (8. ábra) (1).



8. ábra: A p22^{phox} 2 transzmembrán szakasszal rendelkező sematikus modellje: Az autoszómális recesszív öröklésmentű AR-CGD22⁰-t eredményező mutációk a zölddel jelölt misszensz P156Q mutáció, a kékkel jelölt 9 SNP variáns és hat pirossal jelölt aminosavcsere látható. A rózsaszín jelölt aminosavcsere látható. A rózsaszín Y121H szubsztitúció az nmf333 egér mutációját eredményezi, az első membránt átszelő régióban feketével jelölt 94-es pozíciójú hisztidin a hem kötésben játszhat szerepet. Lilával jelölt a prolin-gazdag régiót alkotó (PRR) (K¹⁴⁶-tól E¹⁶²-ig tartó szakasz), PxxP konszenzus motívum, mely a p47^{phox} SH3 (SRC homológia 3) doménnal lép interakcióba (127).

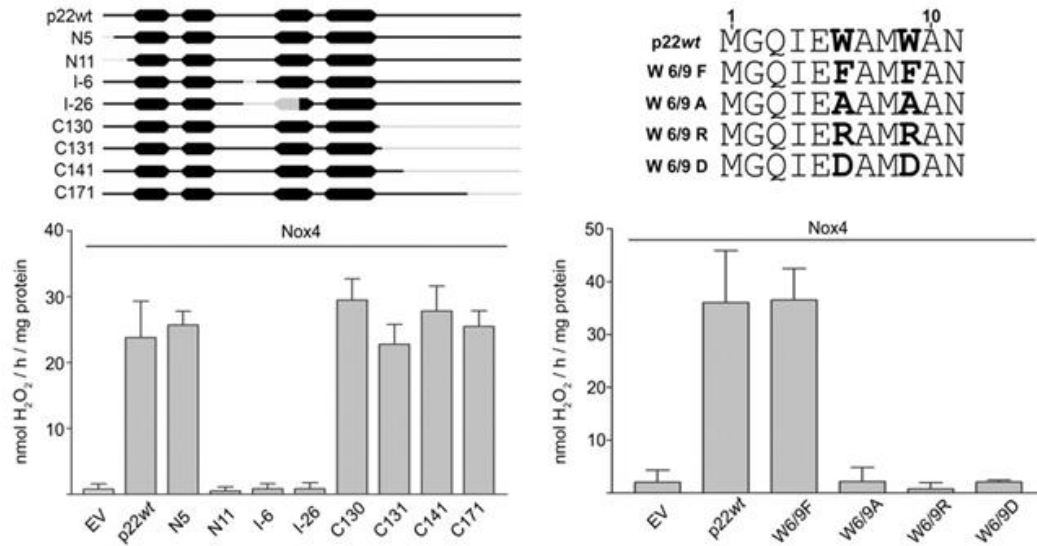
1.3.5.1.2 A p22^{phox} interakciója Nox4-gyel

A p22^{phox} fehérje része a Nox1, Nox2, Nox3, és Nox4 NADPH oxidáz rendszereknek is (91, 129, 130, 136), a Nox1-3 esetén lehetővé teszi további alegységek bekötődését (128, 130). Általánosan elfogadott elképzelés, hogy az alegységek önállóan nem stabilak, a horgonyzó alegység hiányában érésük nem megy végbe, proteaszómális degradációra kerülnek (137, 138).

A p22^{phox} fehérje mennyiségének siRNS-sel történő csendesítése csökkent aktivitást eredményezett a Nox1, Nox2, Nox3 és Nox4 esetén (42, 87), azonban interakciójuk p22^{phox}-szal eltérő lehet. Nox2-deficiens CGD-s betegek fagocitáiban nem detektálható p22^{phox} sem (105), de a Nox3 önállóan is képes PMA indukciót követő bazális ROS termelésre (139), a Nox1 pedig a N-glikolizációs érésen is keresztül megy, de p22^{phox} hiánya csak csökkent szuperoxid termelést eredményez (136).

A p22^{phox} a kódoló szekvenciájában található a C-terminális végén egy prolin-gazdag régió (K¹⁴⁹-E¹⁶²), amely tartalmaz egy konszenzus PxxP motívumot. Ezen szakaszon keresztül képes a p22^{phox} a p47^{phox} és a NOXO1 SH3 (SRC3 homológia) doménjével interakcióba lépni (107, 140). A szakaszban található P156Q szubsztitúció vagy a C-terminális vég trunkálása után a p47^{phox} nem képes kapcsolódni p22^{phox}-hoz, amely a Nox1, Nox2 és Nox3 komplex funkcióvesztéséhez vezetett, ellenben nem befolyásolta a Nox4 aktivációját (1, 141). A p22^{phox} rendelkezik foszforilációs helyekkel is a 134- és a 147-es pozícióban található treoninokon, melyek a prolin-gazdag régió közelében helyezkednek el (142).

A Nox4 aktivációjában eltérő érzékenységet mutatott a kifejeződő p22^{phox} fehérje mutációs vizsgálataiban (143). A p22^{phox} C-terminális trunkálása gátolta a szuperoxid termelést a Nox1-3 enzimeknél, de nem volt hatással a Nox4-re (111, 144), ellenben a p22^{phox} N-terminusának levágása, illetve a 6-os, és 9-es pozíciójú triptofánok cseréje gátolta a Nox4 H₂O₂ termelését (9. ábra) (143).

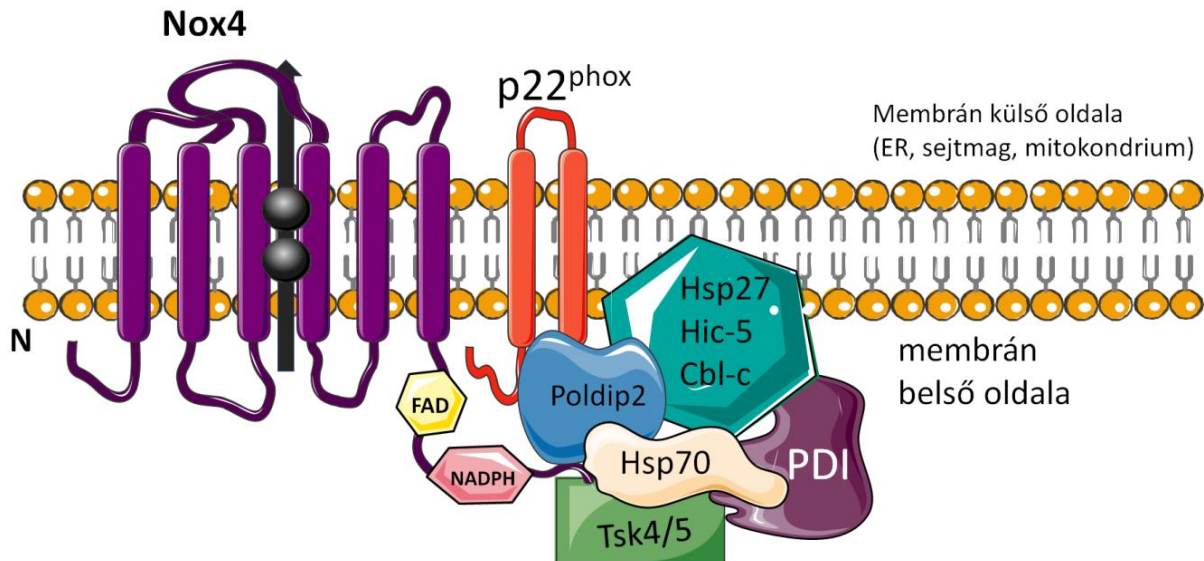


9. ábra: A Nox4 H₂O₂ termelése szempontjából krucialis a p22^{phox} N terminális szakasza: H661 sejtekben heterológ expressziós rendszerben a p22^{phox} trunkált változatai közül a C-terminális trunkálás (C130, C131, C141, C171-től levágva) nem befolyásolta a termelést, míg N-terminális és középső szakaszainak módosított változatai (N1, N11, I6, I26) a vad típusú kontrollnál szignifikánsan alacsonyabb mennyiségű H₂O₂ termeltek (143).

Annak ellenére, hogy a Nox4 nagyfokú homológiát mutat a Nox2-vel, ezen adatok is arra utalnak, hogy szabályozása, érése és aktivációja is eltér a többi p22^{phox}-dependens Noxoktól.

1.3.5.2 A Nox4 egyéb interakciós partnerei

A Nox4 egyértelmű p22^{phox}-függése mellett nem bizonyított, hogy igényelne más, a klasszikus Nox aktivációjához szükséges citoszólikus aktivátorokat, kofaktorokat (87, 91, 145). Ezzel ellentétben számos fehérjéről írták le, hogy hozzájárulnak a Nox4 közvetlen aktivációjához, melyeket a 10. ábrán foglaltam össze.



10. ábra: A *Nox4* és feltételezett aktivátorai, regulátorai: $p22^{\text{phox}}$, mint horgonyzó fehérje, regulátorok: *Poldip2*: 2-es típusú polimeráz delta interakciós fehérje, *HSP27*: 27kDa-os hőszokk fehérje, *PDI*: protein diszulfid izomeráz, *HSP70*: 70kDa-os hőszokk fehérje, *Tsk4/5*: *Src3* homológia doménnel rendelkező tirozin kináz szubsztrát 5, *Hic-5*: H_2O_2 -indukálható 5-ös klón, *Cbl-c*: E3 ubiquitin-protein ligáz.

Janiszewski és munkatársai nyúl VSMC sejteken végzett vizsgálataiban a protein diszulfid izomeráz (PDI) a *Nox4*-gyel interakcióba lépve elősegíti az aktiválódó enzim konformációváltozását (146), valamint direkt kapcsolatot írt le ugyanezen munkacsoport makrofágokban is a PDI, $p22^{\text{phox}}$ és *Nox4* között (147).

Szintén VSMC sejtekben a *Poldip2* (2-es típusú polimeráz delta interakciós fehérje) $p22^{\text{phox}}$ -hoz kötődik, ezáltal háromszorosára fokozza a *Nox4* aktivitását (148–150). A *Poldip2* simaizom sejtekben aktiválja *Nox4*-et, mely hatására fokozódik a fokális adhézciók turnover a RhoA/FAK-függő útvonalon (151). Humán dermális fibroblaszt (HDF) sejteken is leírták, hogy a transzformáló növekedési faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) indukciót követően a katalitikus egységek mellett *Poldip2* is expresszálódik (152).

Egér fibroszarkóma sejtmodellben invadopódia kialakulása során a *Nox1* mellett a $p47^{\text{phox}}$ egy szerkezeti analógja, a *Tsk4/5* (*Src3* homológia doménnel rendelkező tirozin kináz szubsztrát 5) $p22^{\text{phox}}$ -szal történő asszociációja aktiválta a *Nox4*-et is (153).

A *HSP70* (70 kDa-os hőszokk fehérje) asszociációja *Nox4*-gyel csökkenti spontán hipertenzív patkány modell VSMC sejtekben a *Nox4* komplex aktivitását. Ugyanezen

patkánymodell proximális tubulus eredetű (PTC) sejtjeiben leírták, hogy a hősokk fehérje a Nox4 komplex CHIP (proteaszómális degradációs ko-saperon) mediálta ubikvitinációját és proteaszómális degradációját indukálja (96, 154).

A Hic-5 (H₂O₂-indukálható 5-ös klón) szintén negatív feedback visszacsatolással VMSC sejteken gátolja a Nox4 aktivitását, ezáltal csökkentve a redox-függő aktin reorganizációt és sejt migrációt (155, 156).

Gorin és munkatársai 2003-ban publikált eredményei szerint mezangiális sejtekben a NADPH oxidázok közül csak a Nox4 fejeződik ki, aktivációjához pedig aktív Rac1 szükséges. Az angiotenzin II (ATII) az 1-es típusú angiotenzin receptort (ATR1) aktiválja, mely a foszfolipáz A2 (PLA2) által közvetített úton arachidonsav (AA) képződést eredményez, mely Rac1-et indukálja. Az aktivált Rac1 a Nox4-et aktiválja, mely ROS termelésével a redox-függő Akt szerin-treonin kináz / protein kináz B (PKB) útvonal fokozásával a fehérjeszintézist támogatja. A Rac1 domináns negatív variánsa, illetve a Nox4 antiszensz RNS-sel történő csendesítése gátolta az angiotenzin II által indukált fehérjeszintézist is (63). Martyn és munkatársai epithél sejtekben a Nox4 aktivitását intaktnak találták a Rac1 csendesítése vagy kiütése mellett (87, 157, 158). A Nox4 kapcsolata Rac1-gyel lehet sejt-specifikus vagy mezangiális sejtekben más úton termelődött a fehérjeszintézis alatt detektált ROS.

A Nox4 enzimkomplex regulációja egyértelmű posztranszlációs aktiváció hiányában valószínűsíthetően transzkripciós szintű. Mahadev és munkatársai szerint inzulin hatására adipocita sejtek ROS termelése 10-szeresére nőtt, amely az inzulin hatására fokozódó Nox4 expressziójának köszönhető (14).

Azon Nox4 variánsok, ahol mutációt hoztak létre a FAD-, és NADPH-kötő doménben, inzulin hatására kialakuló ROS termelésük 80%-át elvesztették. A domináns negatív mutációk általában nem jellemzőek egy szabályozatlan, konstitutívan aktív fehérjére (14, 158). A Nox4 aktivációja nem transzlációs szinten megy végbe, nincsenek egyértelmű citoszolikus aktivátorai, konstitutívan aktív, ezért szabályozása inkább transzkripciós szinten valósul meg. A 3. táblázatban összefoglaltam azon transzkripciós faktorokat, amelyeknek a Nox4 promóterében felismerőhelye van:

Transzkripciós faktor	Hatás	Sejttípus	felismerőhelye a Nox4 promóterében
E2F	pozitív	VSMC	CAACAGGCTCGCGAGACAAAGGGGCTGGC
Nrf2	pozitív	tüdő endothél	CTATGTCATTAACAATCTGACGCCTGTAATCCCAGCAG
HIF-1 α	pozitív	PASMC	ACGTG
NF- χ B	negatív	PASMC	AGTTTGGG
oct-1	negatív	HUVEC	ATTATTAT
sp3/sp1	pozitív	HEK293	GC-box1: AGGGGGCGGCGAG
c-jun	pozitív	HUVEC	GC-box2: GACCCCGCC
STAT3	pozitív	SMC	AP-1/Smad: TGAGTC
MRTF	pozitív	LLC-PK1	CC(A/T)6GG box)

3. táblázat: A Nox4 lehetséges reguláló transzkripciós faktorai és azok kötőhelyei promóterében: A pozitív hatású faktorok fokozták a gén expresszióját az adott sejtvonalban, míg a negatívak csökkentették. (PASMC: tüdő artériás simaizom sejt, VSMC: érfal simaizom sejt, HUVEC: humán köldökvéna endothél sejt, HEK293: humán embrionális vesesejt 293, SMC: simaizom sejt, LLC-PK1: sertés proximális tubulus epithél sejt) (159–164).

A Nox4 bazális aktivitásához a p22^{phox}-on kívül nincsen szükség egyéb molekulákra, szabályozása leginkább saját expressziós szintjének változásával valósul meg, viszont számos irodalmi adat alapján lehetséges, hogy egyes szövetekben egyéb interakciós partnerek fokozhatják aktivitását (165).

1.3.6 Nox4 szerepe

1.3.6.1 Nox4, talán oxigén szenzor?

Egyelőre nyitott kérdés, hogy milyen funkciót tölthet be, egy a legnagyobb mennyiségben a vesében expresszáldó, konstitutívan aktív, főként H₂O₂-ot termelő enzim. Logikus következtetés lehet a vesében az oxigén szenzor hipotézis, ahol kiemelkedő szerepe van az oxigén tenzió érzékelésének a szövet endokrin funkciója miatt, mint eritropoetin szintézisszabályzás, renin-angiotenzin alapú vérnyomásszabályozás. Hypoxiás körülmények között tüdő eredetű PASMC (pulmonary artery smooth-muscle cells) sejteken írták le, hogy a HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alfa) fokozza a Nox4 expresszióját, ezáltal emelkedik a termelődő ROS mennyisége is (166). A jelátvitelben semlegesnek tekinthető oxigén molekula tenziója redox jellé konvertálódik, továbbá a Nox4 által termelődő H₂O₂ szignalizációs hírvivő molekula, mely celluláris válaszokat vált ki, mint pl. transzkripciós faktorok regulációja, ioncsatornák és antioxidáns enzimek aktivitásának szabályozása (167–169). Nox4-et expresszáldó HEK293 sejtekben a TASK-1 (TWICK-related acid sensitive K⁺) K⁺ csatorna normoxiás körülmények között gátolt volt, mely hypoxia expozíció alatt megszűnt. Ezen gátló hatás a Nox4 siRNS-sel történő csendesítésével nem alakult ki (170). Más munkacsoportok szerint, a Nox4 által termelt ROS stabilizálja HIF-2 α faktort, mert gátolja proteaszómális lebontódását az N-terminális transzaktivációs doménjének hidroxilációjával (161).

Az elméletet támogatja, hogy más Nox-okhoz hasonlóan a Nox4 szokatlanul magas katalitikus állandóval (K_m~18%; Nox2 K_m~2-3%) képes az oxigén molekula kötésére. Az affinitás mértéke már abban a tartományban van, amely az ismert oxigén szenzorokra jellemző, mint pl. a HIF-1 α prolin hidroxiláz (PHD, K_m~10-20%), vagy a HIF-1 α aszparagin hidroxiláz-1 (FIH-1, K_m~8%) (62, 159). A szenzorelmélettel viszont ellentmond, hogy az oxigén tenziója magát a Nox4 expresszióját is regulálja (62).

1.3.6.2 A Nox4 szerepe kardiovaszkuláris szövetekben

A Nox4 kardiovaszkuláris szövetekben betöltött szerepének megismerését nehezíti, hogy nem egyedüli NADPH oxidázként expresszáldó. A Nox4 mellett az érrendszerben kifejeződik a Nox1, a Nox2, és a Nox5 is (171, 172). Ezen NADPH oxidázok közül a Nox4 aktivitása

elsősorban saját expressziós szintjétől függ és azon proinflammatorikus mediátorok, melyek aktiválják a Nox1-et, Nox2-t, inkább szupresszálják a Nox4 expresszióját (173).

Eddigi ismereteink szerint az érrendszerben simaizomsejtek, fibroblasztok és endothél sejtek expresszálják a Nox4-et (67, 69, 74, 95, 174, 175), azonban expressziós szintjében nem tekinthető a Nox4 meghatározó oxidáznak (176), ugyanakkor a Nox4 az egyetlen H_2O_2 termelő és konstitutívan aktív NADPH oxidáz. Mennyiségétől függően a termelődő H_2O_2 kétélű fegyver: vazoprotektív szignalizációs hatású vagy éppen szövetkárosító (177). Kihívást jelent, hogy sejtípusonként eltérő, specifikus hatások jellemzik, például kardiomiocitákban, melyek Nox2-öt is kifejeznek. A Nox4 az intracelluláris membránokban helyezkedik el, akut válasz helyett expressziós szintjének növekedésével válaszol fokozott előterhelésre, hipertrófia-, ATII stimulusra, és az öregedésre (97). Míg ATII által aktivált Nox2 rendszer ROS termelése hipertrófiát és öregedést inicializáló jelpályákat aktivál, mint Ask1, NF- κ B (178). A Nox4 szerepe nem egyértelműen káros, sejt-, és dózisfüggő módon „finomhangolhat” az érrendszerben (171, 179). A Nox4 sejt differenciációt promótál (94, 174, 180), szívspecifikus Nox4 KO egereken végzett kísérletekben az előterhelés fokozásával, vagy hipoxiával indukált stressz kardiomiocitákban a Nox4 inkább a miokardiális angiogenezis egyik regulátora (94, 99).

A Nox4 az artériák simaizom sejtjeinél (VSMC) a fokális adhéziókban fokozza azok átépülését, valamint a sejtek migrációját aktin polarizáció elősegítésével (95, 159). Endothél sejtekben a hipoxiát követő HIF-1 α és vaszkuláris endotheliális növekedési factor (VEGF) expressziója fokozza Nox4 expresszióját is, fenntartva a folyamatos ROS termelést, amely fenntartja az angiogenezist indukáló molekulák fokozott expressziós szintjeit (181–183). Szintén érfal endothél sejtekben a Nox4 által termelt ROS sejtproliferációs jelpályákat erősít a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád tagjain keresztül, a p38-, az extracelluláris szignálok által regulált- (Erk), Jun-terminális (JNK/SAP) kinázokat aktivál (184–187). Nox4-deficiens egérmodellben az ATII-vel indukált iszkémiát követő angiogenezis lassabb volt. A Nox4 hiánya csökkent mennyiségű endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) mennyiségével társult, így a protektív endotheliális mediátorból is kevesebb termelődött (94).

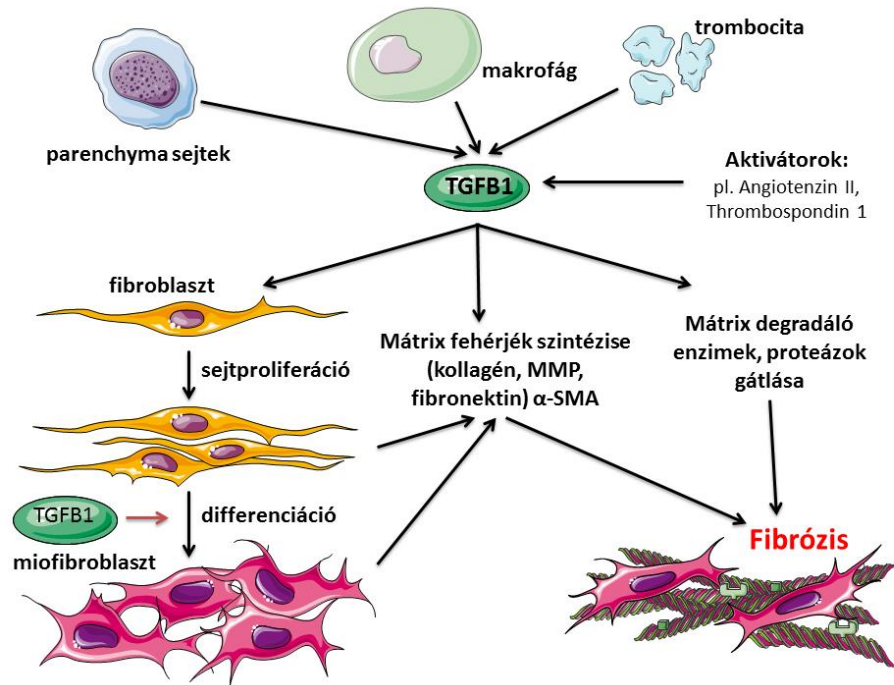
Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a Nox4 az endothéliumban vazoprotektív, anti-atheroszklerotikus hatású Nox, az általa termelt H_2O_2 növeli Akt-függő foszforilációval az endotheliális NO-kibocsátást (188, 189). A célzottan az endothéliumban túltermeltetett Nox4 érfal relaxáció fokozása útján csökkenti az ATII által kiváltott vérnyomás emelkedést (190).

Emellett az általa termelt hidrogén-peroxid a szuperoxiddal ellentétben nem lép reakcióba nitrogén-monoxiddal (NO), így nem keletkezik erősen szövetkárosító hatású peroxinitrit (ONOO⁻) sem (159).

1.3.6.3 A Nox4 hatása szöveti fibrózisokban

A szövetek fibrotikus elváltozása a fiziológiás sebgyógyulási folyamat kóros lefolyása, mely az érintett szerv szöveti struktúráját bontja, annak funkcióját fokozatosan csökkenti. A kontrollálatlan sebgyógyulás miokardiális infarktust, idiopátiás tüdő- és krónikus vesefibrózist eredményezhet (191–193). A progresszív szöveti fibrózisok közös jellemzője az effektor fibroblaszt sejtekből differenciálódó miofibroblasztok megjelenése, amelyekben már mind a fibroblaszt-, mind a simaizom sejtek tulajdonságai keverednek. Termelnek α -simaizom aktint, részt vesznek sérüléskor a sebzáródásban, a szövet regenerálódásában, valamint kóros lefolyású sebgyógyulásnál leírták vese és tüdő fibrózis kialakulásában is (194, 195). Mindkét szövet fibroblasztjaiban rezidens oxidáz a Nox4, mely transzformáló növekedési faktor β 1 (TGF- β 1) profibrotikus citokin stimulusra indukálódik a fibroblaszt-miofibroblaszt fenotípusváltás alatt (196, 197). A differenciálódó miofibroblasztok TGF- β 1 hatására Nox4-függő módon H₂O₂-ot termelnek, mely fokozza ECM és SMA expresszióját, de maga a termelődő ROS a differenciáció hatékonyságát is növeli (77, 198).

A TGF- β 1 indukálja a miofibroblasztok extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék szintézisét, mint pl. fibronektin (FN), fibrilláris kollagének (199) és proteoglikánok (200), valamint a sejtípus morfológiájára jellemző α -simaizom aktin (SMA) termelését (201). Az SMA a fokális adhézióba beépülve fokozza az adhézió erejét (202), azonban jelenléte nem mutatható ki ép vese interstíciumában, ahol a fibroblasztok mennyisége is alacsony (203).



11. ábra: A TGF- β 1 általános szerepe fibrózisban, főként a Nox4-et befolyásoló útvonalban: TGF- β 1-et a szövetbe infiltráló makrofágok, trombociták és parenchyma sejtek szekretálják, endogén faktorok, mint angiotenzin II, és thrombospondin-1 fokozzák aktivitását. A TGF- β 1 hatására a rezidens fibroblasztok proliferálnak és miofibroblaszttá differenciálódnak. Ezen sejtek extracelluláris mátrix fehérjéket szintetizálnak. Az extracelluláris mátrix növekedése fokozódik a proteázok, degradáló enzimek gátlásával, mely pathofiziológiás fibrózist eredményezhet.

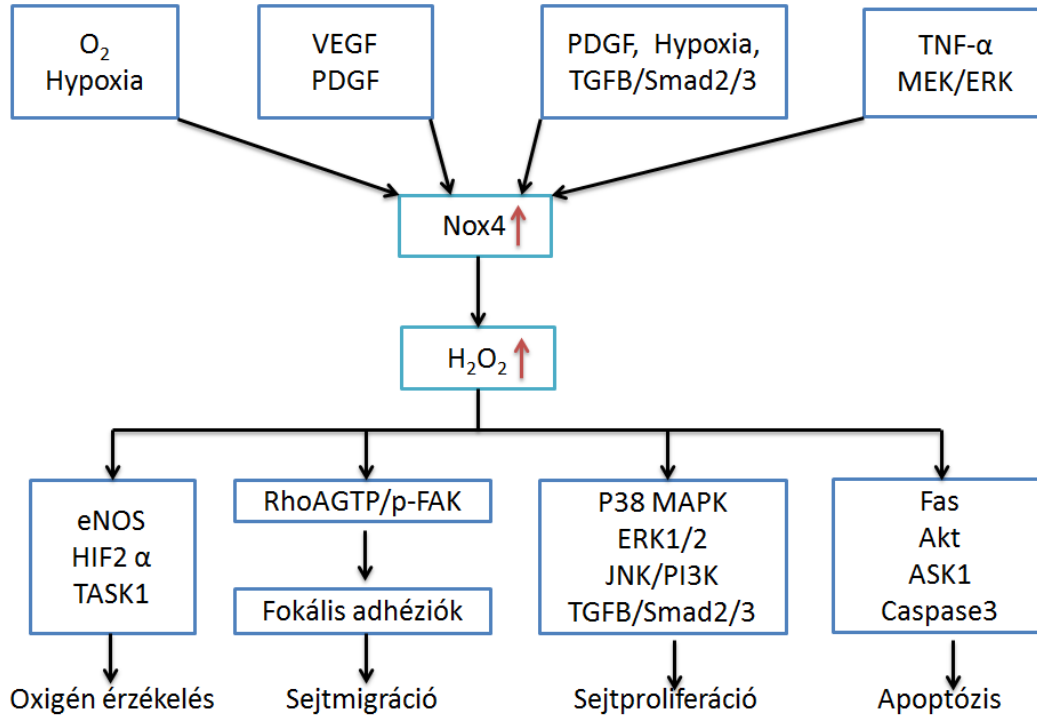
Amara és munkatársai idiopátiás tüdő fibrózisban szenvedő betegekből izolált tüdő fibroblaszt sejtekben kimutatták, hogy a Nox4, a prokollagén-1 és α -SMA mRNA expressziós szintje is emelkedett (191, 204). Ugyanezen munkacsoport egereken végzett kísérletében a Nox4 csendesítése, inhibíciója csökkentette a bleomycin-indukált tüdőfibrózis súlyosságát. Nox4 KO egerekben szintén bleomycinnel indukált tüdőfibrózisban csökkent az alveoláris epithél sejtek ROS indukált sejthalála (204, 205), habár fontos megjegyezni, hogy Nox4-deficiens egérmodellekben a vese fejlődése megtartott, Nox4 hiányában is kialakul többféle krónikus vesebetegség-modellben annak fibrotikus elváltozása. Viszont a Nox4 hiánya krónikus vesefibrózis-modellben súlyosabb fibrózist eredményez (193, 206).

1.3.6.4 A Nox4 szerepe tumorigenezisben, karcinogenezisben

A reaktív oxigén származékok jelenléte esszenciális a sejtek fiziológiás metabolizmusához, azonban túlermelődése vagy eliminációjának zavara önmagában is DNS károsító hatású kettős törést okozhat, a DNS direkt oxidációja mutációkhoz vezethet (207). A Nox4 és az általa generált ROS szerepét leírták a tumorigenezis minden fázisában: a sejtek proliferációja, differenciálódása, migrációja vagy az angiogenezis, citoskeletális remodelling (64). Egyes munkacsoportok a Nox4-et a sejtmagban detektálták, ahol a Nox4 fokozott aktivitása genetikai instabilitást okoz, felelőssé tehető a kialakuló oxidatív stresszért, mely redox-függő transzkripció faktorokat aktivál, mint az NF χ B (nukleáris faktor χ B), a Keap (Kelch-like ECH-associated protein 1) vagy a Bach2 (BTB domén és CNC Homológ 2) (90, 101, 208).

A Nox4-et leírták anti-, és proapoptotikus hatásúként is (209), de több közlemény szerint inkább a túlélési jelpályákat támogatja (210, 211). Krónikus mieloid leukémia-, és NSCLC (non-small cell lung cancer) sejtekben a Nox4-hez köthető emelkedett ROS szint aktiválta a PI3K/Akt/PTEN (foszfátidilinozitol-3-kináz, protein tirozin foszfatáz és tenzin homológ) jelátviteli utat a PP1A, PP2A (protein foszfatáz 1-, és 2A) proapoptotikus szerin-treonin foszfatázok gátlásán keresztül (212, 213). Hasnyálmirigy eredetű tumoros sejtvonalakban is megfigyelték, hogy a Nox4 által termelt H₂O₂ gátolta a protein tirozin foszfatázokat (PTP, LMW-PTP: kis molekulású PTP), melyek fenntartották a túlélési szignált közvetítő kinázok aktivitását, mint a Janus kináz (JAK) (214). A TGF- β 1 és TNF α (tumor nekrosis faktor α) indukciót követő Nox4 aktiválódás és az ezt követő oxidatív stressz ellenben apoptózist eredményezett egy másik kísérletben (159).

A Nox4 fiziológiás szerepe a különböző szöveti és sejtszintű expressziós mintázat következtében széles spektrumon mozog, a vesében és tüdőben talán oxigén szenzor, kardiovaszkuláris szövetekben növekedési faktorok általi aktivációja sejtmigrációt, proliferációt indukál, hasnyálmirigy-, májsejtekben túlélési szignálokat közvetít. Túlzott működése és a generált oxidatív stressz pedig onkogenezist vagy sejthalált inicializálhat. Ezen jelpályákat a 12.ábrán foglaltam össze.



12. ábra: A Nox4 által regulált jelátviteli útvonalak és fiziológias funkcióik: A Nox4 és általa generált H_2O_2 a sejt számos endogén jelére reagálva redox úton regulál fehérjéket, melyek lehetnek szerin-treonin kinázok, foszfatázok vagy transzkripciós faktorok, ezzel modulálva az adott szignalizációs kaszkád hatásfokát.

1.3.7 Nox4 inhibitorok

Az előző alfejezetekben vázoltam, hogy a Nox4 és az általa termelődő ROS mennyiségétől függően számos pathológias folyamatot felerősíthet. Azon közleményekben, ahol a Nox4 mennyiségét sh-, vagy siRNS-sel történő csendesítéssel csökkentették, ezáltal a túlműködéséből eredő oxidatív stressz káros hatása is redukálódott, mint a tüdőfibrosis súlyossága (191), a tumor szövetekben a HIF-1 α , VEGF expressziós szintje (215) és az angiogenesis mértéke (216). A Nox4 felelős lehet felnőtt vesében a fokozott oxidatív stresszért (217). Egér proximális tubulus sejttenyészetben a magas glükóz szint, streptozotocin indukált 1-es típusú diabeteszes patkány-, és egérmódelben, illetve inzulin indukcióval *in vitro* is fokozódott a Nox4 és p22^{phox} expressziója (14, 218, 219). A Nox4 komplex konstitutív aktivitása tartós ROS termelést eredményez, amely fenntartja a profibrotikus p38 jelpályát (220). A fibrotikus elváltozások egyik útvonala a TGF- β 1 alapú aktiváció, mely szintén indukálja Nox4

expresszióját. Felmerül a Nox4, mint célmolekula, amely inhibíciójával specifikusan gátolható vagy csökkenthető lenne akár a tüdőfibrózis vagy számos tumorigenezis. Ezen törekvések első állomása volt a különböző thiol-módosító endogén és természetes anyagok keresése, melyek nem specifikusan, de gátolták a Nox4-et (221). Nox4 specifikus gátlószer még nem elérhető, de olyan pyrazolopiridin-dion szerkezetű, kismolekulasúlyú inhibitorok igen, melyek a Nox1 és Nox4-et együttesen gátolják a többi Nox homológgal szemben (222)(GenKyoTex S.A. sajtóanyag 2015). Ilyen molekulák a GKT137831 (204, 223) és a GKT136901 (220, 224), melyek farmakokinetikai tulajdonságai kedvezőek, állatkísérletekben szignifikánsan csökkentették a májban, tüdőben, vesében indukált fibrózisos és gyulladásos modellek súlyosságát (204, 225–228). A GKT137831 tesztelték 200 diabéteszes nefropátiában szenvedő beteg bevonásával fázis II-es klinikai kísérleti stádiumban, de 2015-ben a vizsgálatot lezárták, a hatóanyagot azóta más betegségmodellben tesztelik (222, 228) (GenKyoTex sajtóanyag 2015). A 4. táblázatban a Nox4-re vonatkozó 2017-es inhibitorok adatait mutatom be:

Gátlószer	Fő célpont	Egyéb	Mellékhatás
GKT136901	Nox1, Nox4, Nox5	Nox2	<i>peroxinitrit scavenger</i>
GKT137831	Nox1, Nox4, Nox5	Nox2	
VAS3947	Nox1, Nox2, Nox4	Nox5	
Fulvene-5	Nox2, Nox4		
Celastrol	Nox1, Nox2	Nox4, Nox5	<i>topoizomeráz II inhibitor</i>

4. táblázat: Inhibitorok, melyek gátolják a Nox4-et is. Ezen gátlószerek fő célpontja a Nox4, de nem szelektívek Nox4-re, illetve más, nem specifikus hatást is kiválthatnak (165, 228, 229).

1.4 A TGF- β jelpálya

Emlősökben a TGF- β profibrotikus citokinnek számos izoformája ismert, nagyobb mennyiségben szöveti makrofágok és monociták képesek szintetizálni (230). Immunszupresszív hatásúak, sejtprolifерációt, extracelluláris mátrix fehérjék szintézisét stimulálják, központi szerepet töltenek be a szervezetben kialakuló szöveti fibrózisokban, a tüdőfibrózis kialakulása pedig a TGF- β 1 aktivációjához köthető (231, 232). Méréseink során mi is TGF- β 1 kezeléssel indukáltuk a NADPH oxidáz komplexet.

A szupercsaládba több, mint 30 tag tartozik, activinek és inhibinek, emlős szervezetben három olyan TGF- β izotípus fejeződik ki, melyek biológiai szerepükben nagyon hasonlóak: TGF- β 1, -2, és -3 (233, 234). Látens formájukban a LAP fehérje (látencia-asszociált protein) komplexben köti, szférikusán gátolva, hogy receptorukhoz kötődhessenek. A LAP plazmin vagy mátrix metalloproteináz (MMP) általi proteolitikus emésztését és/vagy integrinokkal (pl. $\alpha\beta$ 6, $\alpha\beta$ 8) történő interakciót követően képes elengedni a TGF- β 1-et, mely beköt szerin/treonin-kináz receptorukhoz, ezzel aktiválva a jelátviteli útvonalat (235–237).

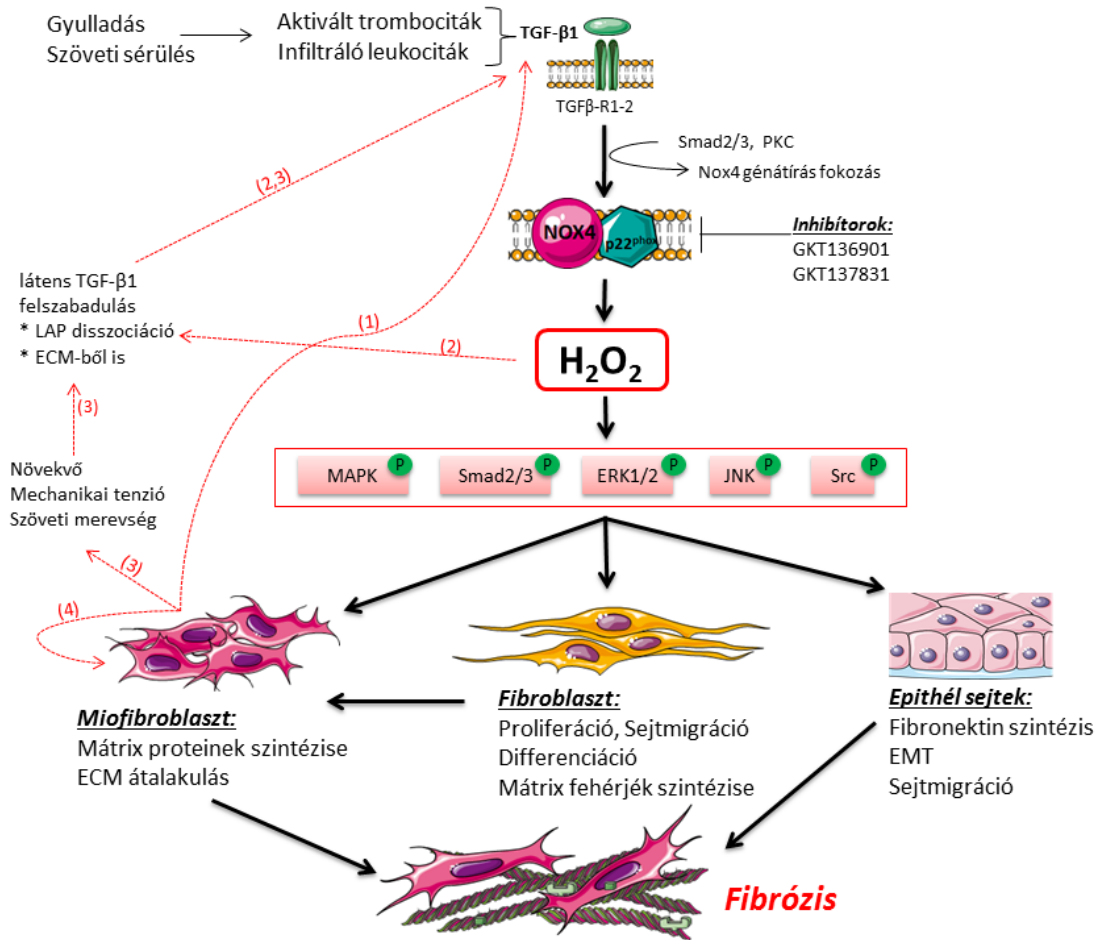
1.4.1 A TGF- β 1 indukált jelpályák

Az aktivált TGF- β 1 által indukált jelpályák Smad fehérjék aktivációján keresztül transzmittálódnak (238). A ligandkötődést követően a TGF β -RI-II receptor komplex stabilizálódik a membránban, az RI receptor szekvenciálisan foszforilálni fogja az R-Smadokat, amelyek ezáltal disszociálni fognak a SARA (Smad anchor for receptor activation) horgonyzó fehérjéről és transzlokálódnak a nukleuszba (238, 239). A Smad fehérjék szerepük szerint három csoportra oszthatóak: az R-Smad fehérjék (receptor-regulated Smads; Smad2, Smad3), melyek a TGF β -RI által aktiválódnak és direkt részt vesznek a TGF- β szignalizációban; a Co-Smad-ok (common partner Smad; Smad4), melyek az R-Smadokhoz kapcsolódva támogatják a transzlokációjukat a sejtmagba és az I-Smadok (inhibitory Smad; Smad5, Smad6), melyek az R-Smad-ok szignalizációját gátolják (237, 240–242). A sejtmagba történő transzlokációt követően fokozza a Smad-reszponzív mintázatot (SRE) tartalmazó gének átírását (243). A TGF- β 1 szerepét más jelpályákban is leírták, amelyeket Smad-tól függetlenül aktivál: pl. a MAP kináz (mitogén aktivált proteinkináz) kaszkád, vagy Rho (Ras homológ) GTP-kötő (guanin trifoszfát) fehérjecsalád aktivációja (244). Ezen szignalizációs útvonalak differenciálódási jeleket közvetítenek, EMT (epitheliális mezenchimális tranzíció) során epitheliális, sejtadhéziós struktúrák reorganizációját eredményezik, valamint stressz és gyulladásos citokinek által kiváltott transzkripciós válaszban vesznek részt (245, 246).

1.4.2 Nox4 indukciója TGF- β 1-en keresztül

A TGF- β 1 hatását transzkripciós faktorok indukcióján keresztül fejt ki (60, 87). Humán tüdő fibroblaszt sejteken lokalizáltak a Nox4 promóterében egy iniciációs helyet, mely konzervált patkányban és egérben (197). A transzkripciós start előtt -3.97 kb és -4.76 kb távolságban egy 15bp hosszú AP-1/Smad kötő hely található, mely a TGF- β 1, R-Smad-on keresztüli expresszió fokozódásért felelős (162). Idiopátiás tüdőfibrózisban szenvedő betegek fibroblaszt sejtjei magasabb Nox4 expressziót mutattak, mely megfigyelést korábban már állatmodellekben is igazoltak (191, 198). A Nox4 genetikai vagy farmakológiai úton történő gátlása csökkentette a pulmonáris fibrózis lefolyását (191, 198, 205), bár más munkacsoport Nox4 knockout egér modellben nem látták ezt a pozitív hatást (247). Más sejtekben is leírták azon megfigyelést, hogy a TGF- β 1 növelte a Nox4 expresszióját, például kardiovaszkuláris-, vese-, és tüdő eredetű fibroblasztok miofibroblasztokká differenciálódása alatt (77, 191, 198, 248), epithél sejtek mezenchimális átalakulása során (249, 250), tüdő-, érrendszeri simaizom (103, 251) és hepatocita (80, 252) sejtekben is.

A Nox4 expressziója szignifikánsan fokozódik fibroblasztokban TGF- β 1 hatására, fibrotikus folyamatokban fokozza a fibroblaszt-miofibroblaszt differenciációt, sejtproliferációt, extracelluláris mátrixfehérjék szintézisét, miközben gátolja degradációjukat (232, 237, 253). A 13. ábrán foglaltam össze az elmúlt fejezetek lényegét.



13. ábra: A TGF-β1 által indukált, Nox4 aktivációt követő profibrotikus válaszreakciók: Sebesülést követően az aktivált trombociták és szövetbe infiltráló inflammatorikus és érrendszeri sejtek lokálisan TGF-β1-et szekretálnak, amely a helyi fibroblasztokban aktiválja a Nox4 génátírást Smad2/3 és PKC jelátviteli utakon. A Nox4 által termelt H₂O₂ erősíti a MAPK kaskádát, az ERK, JNK és Src kináz útvonalakat, visszacsatol a Smad2/3-ra. A miofibroblaszt differenciáció, sejtproliferáció, az ECM proteinek szintézise a sebzáródást facilitálják (77, 254). Elnyúló sérülés vagy gyulladás folyamatos aktivációt, feed-forward szabályzást tart fenn (255)(1). További, látens TGF-β1 szabadul fel direkt oxidáció hatására a LAP fehérje disszociációjával (2), illetve az ECM-ből, ahol a miofibroblasztok által termelt szekréciós fehérjék, fokozódó mechanikai tenziót, szöveti merevséget okoznak, amely integrineken keresztül, fizikai úton szabadítja fel a LAP-hoz kötött TGF-β1-et (236, 256)(3). Az ECM biokémiai úton is modulálja a TGF-β1 jelátvitelt pl. fibrillin, fibronectin, vagy proteoglikánok útján. Ezen molekulák közül számos direkt és indirekt úton visszacsatolással szabályozza az ECM átalakulást is, mint pl. mátrix metalloproteázok, kollagén vagy plazminogén

aktivátor inhibitor (257)(4). ECM: extracelluláris mátrix, EMT: epitheliális mezenchimális tranzíció (197, 258).

1.5 H₂O₂ mint szignalizációs molekula

Az alap sejtelettani funkciókhoz köthető jelátviteli útvonalak redox szabályzásának lehetősége egyre nagyobb teret nyer. A “redox regulation” kifejezésre a Pubmed 23663 találatot adott, míg a “hydrogen peroxide signal(l)ing” keresésre 7756 darabot. A reaktív oxigén származékok közül kis hatótávolságuk és reaktivitásuk miatt leginkább a H₂O₂ tekinthető specifikus jelátviteli mediátornak (2, 259). Viszonylag stabil, leukocitákban *in vivo* a H₂O₂ féléletideje 1ms, míg a szuperoxidé (O²⁻) 1μs (260). A hosszabb féléletidő, valamint párosítatlan elektron hiányában kevésbé reaktív, mint a többi ROS. Fiziológiás körülmények között a H₂O₂ regulált körülmények között intracelluláris forrásokból, mint a mitokondriális légzési lánc, és NADPH oxidázok útján szabadul fel. A bazális citoszólikus steady-state koncentrációja aránylag alacsony (~1-10nM) (261), mely szignalizációs esemény során tranziensen 500-700nM-ra emelkedhet (262).

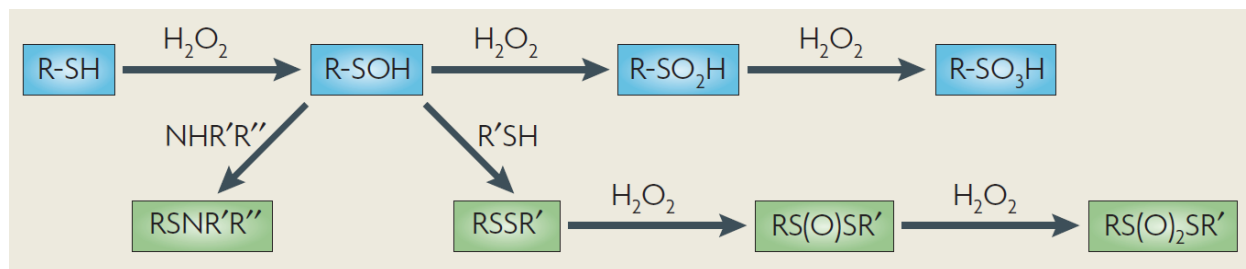
1.5.1 Fizikai-kémiai tulajdonságai

A H₂O₂ erősen poláros molekula, fizikai-kémiai tulajdonságai alapján inkább a vízre hasonlít, hozzá képest kisebb a membrán permeabilitása, melyet befolyásol a membránt alkotó fehérjék glikoziláltsági és foszforiláltsági állapota, a lipidréteg összetétele (lipid raftok) valamint az ozmotikus nyomás a membrán két oldalán (263, 264). Több, nem-klasszikus típusú aquaporin (AQP) csatorna is képes a víz mellett kisebb poláros molekulák regulált felvételére, transzportjára, mint a H₂O₂. Ilyen az AQP8 csatorna (265–267), az AQP3-as víz/glicerin csatorna (268, 269), illetve egy közlemény szerint az AQP9-es csatorna is (270), bár ezt más munkacsoportok még nem igazolták.

1.5.2 A H₂O₂ hatásmechanizmusa

A hidrogén-peroxid főként a fehérjék cisztein oldalláncainak szabad tiol-csoportjait (-SH) képes oxidálni. Oxidációjukkal reaktív szulfénsav keletkezik (-SOH), mely diszulfid-híd

képződést tesz lehetővé két közeli szulfénsav cisztein oldalláncai között vagy H_2O_2 jelenlétében tovább oxidálódhat szulfonsavvá (-SOOH). A szulfénsav szulfenamid kötés kialakításával amid-csoporttal is képes reakcióba lépni, további H_2O_2 a szulfonsavat irreverzibilis reakcióban szulfonsavvá (-SO₃H) alakítja tovább (271, 272). Ezen redox módosítások a fehérjék megfelelő konformációjának felvételét segítik, mely fokozhatja vagy éppen gátolhatja a célmolekula aktivációját (14. ábra) (2, 273).



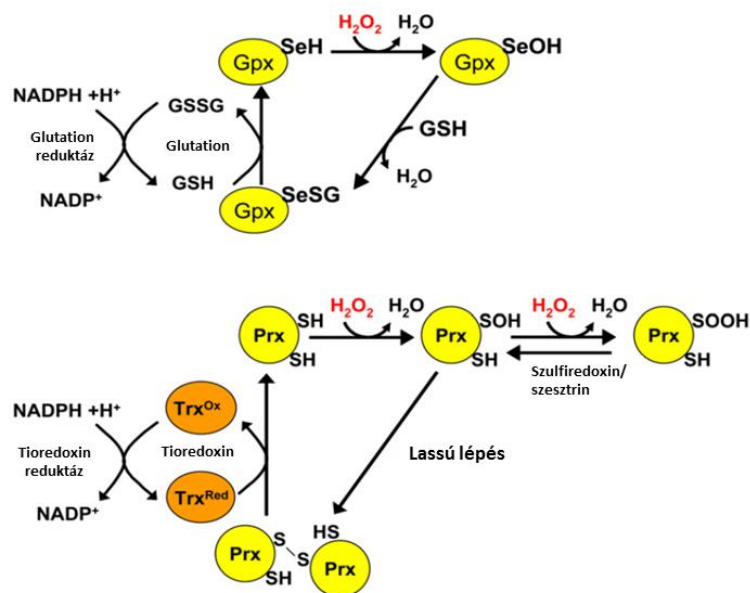
14. ábra: Fehérjék cisztein oldalláncainak szabad tiol csoportjainak oxidációs lehetőségei: H_2O_2 expozíciót követően a szabad tiol- csoport szulfénsavvá (-SOH) oxidálódik, mely reakcióba léphet amid csoporttal (RSNR'R'') vagy más tiol csoporttal (RSSR'). További H_2O_2 jelenlétében szulfonsavvá (R-SO₂H), majd szulfonsavvá (R-SO₃H) oxidálódhatnak, mely már irreverzibilis módosítás (2).

A fehérjék különböző cisztein oldalláncai nem egyenlő mértékben képesek reagálni a H_2O_2 molekulával, mely a folyamat szelektivitását és specificitását nyújtja. Ahhoz, hogy a hidrogén-peroxid reakcióba lépjen egy fehérje szabad tiol-csoportjával több kritériumnak is meg kell felelnie (262). Csak azon ciszteinek szabad tiol-csoportjai reakcióképesek, melyek fiziológias körülmények között (pH=6.8-7.2) alacsony pKa (<8.3) értékkel rendelkeznek (274), ezért főként szabad tiolát (-S⁻) formában vannak és szférikusán elérhetőek a hidrogén-peroxid számára (275). Szintén a szubsztrát specificitást növeli, hogy a szabad tiol-csoportok reakciósebessége széles tartományban mozog ($10\text{-}10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), továbbá a fehérjék szabad cisztein oldalláncai közül fiziológias pH mellett (pH:7,4) körülbelül 10% található ionizált formában (276). A H_2O_2 , noha kisebb affinitással és regulációs funkcióhoz túl lassú reakcióban ($10^{-2}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), de képes a fehérjék metionin oldalláncait metionin-szulfonná vagy metionin-szulfonidá oxidálni (277).

1.5.3 A H_2O_2 eliminálása

A H_2O_2 katalitikus redukcióját széleskörű reverzibilis mechanizmusok segítik sejtípusról függően: glutation reduktázok, két ciszteint tartalmazó peroxidredoxinok, katalázok, tioredoxin reduktázok, melyek saját cisztein (-SH), vagy szeleoncisztein (-SeOH) oldalláncain történő oxidációval vízzé redukálják a hidrogén-peroxidot intra-, vagy intermolekuláris diszulfid-híd képződése közben (15. ábra) (278, 279). Ezen felül még kis antioxidáns molekulák is képesek redukálni a H_2O_2 -t, mint α -tokoferol, liponsav, aszkorbinsav és húgysav is (280).

A legjelentősebb H_2O_2 elimináló intracelluláris fehérjék a peroxidredoxinok, melyek a sejt oldható fehérjekészletének 1%-át adják, reaktivitásuk 7 nagyságrenddel, koncentrációjuk 2-3 nagyságrenddel nagyobb (a PrxI 16-60 μM , a PrxII 20 μM), mint a szignalizációs célmolekuláiké (263, 281). Tiol reaktivitásuk is nagyon magas 10^5 - $10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$, így két hipotézis létezik arra vonatkozóan, hogy a H_2O_2 szignalizációs hatása hogyan érvényesülhet a peroxidredoxinok redukáló ereje és mennyisége mellett (282–284).



15. ábra: A klasszikus antioxidáns enzimrendszerek redox módosításai: A tioredoxin vagy a glutation reduktáz, visszaredukálja a tioredoxint (Trx), illetve a glutationt (GSH, GSSG), mely így reakcióba lép a glutation peroxidázzal (Gpx) vagy a peroxidredoxinokkal (Prx), amelyek

cisztein oldalláncai redukálódnak szabad tiol csoportokká, ezáltal újra képesek H₂O₂-ot redukálni saját oxidációjuk közben (278).

Az első szerint a H₂O₂ diffúzióval közel kerül a célfehérjék tiol csoportjaihoz, amelyekkel az “ütközést” követően direkt reagál, bimolekuláris szubsztitúcióval a cisztein tiolátjából szulfénsav (Cys-SOH) és víz keletkezik. A környezetben a H₂O₂-ért versengő peroxiredoxinok (és más peroxidázok is) a szignalizáció idején ideiglenesen inaktivált formában vannak, mint a humán Prx1 esetén, amely hiperoxidáltság és magas H₂O₂ expozíció alatt lokálisan lassabban regenerálódik (285–289).

A másik hipotézis szerint a tiol-peroxidázok magas koncentrációjuk és kivételes reaktivitásuk miatt mindig legyőzik a potenciális target fehérjéket a H₂O₂-ért folyó verseny során (290). A tiol-peroxidázok alacsony szignalizációs mértékű H₂O₂ koncentráció emelkedés mellett is reagálnak a H₂O₂-dal, a célfehérjék oxidációját is a tiol-peroxidázok végzik saját regenerációjuk során, mely lehet direkt kapcsolat vagy oxidoreduktázok által közvetített (284, 291). Így a tiol-peroxidázok inkább jeltovábbítók, mint kompetítorok, a tiol-csoportok közötti specificitás fehérje-fehérje interakciókon keresztül valósul meg (281).

1.5.4 A H₂O₂ szignalizációs célmolekulái

A teljesség igénye nélkül, azokat a funkció szerinti csoportokat szeretném bemutatni, melyek a legjellegzetesebb jeltovábbítók, ezen fehérjékre már az előző fejezetekben is számos példa felmerült.

1.5.4.1 Transzkripciós faktorok

Már a baktériumoknál is találunk redox érzékeny transzkripciós faktorokat, mint például az OxyR vagy PerR fehérje, mely két erősen konzervált ciszteinje a fiziológiásnál minimálisan is magasabb H₂O₂ szint esetén intramolekuláris diszulfid hidat képez, mely a transzkripciós faktorban aktív konformációt hoz létre (292). Eukarióták között (Yap1, Maf1, Hsf1 and Msn2/4) és emlős szervezetekben is számos transzkripciós faktorról írták le, hogy redox reguláció alatt áll, mint az AP-1, NRF2, CREB, HSF1, HIF-1, TP53, NF-κB, NOTCH, SP1 és SCREB-1 (293–297). Az oxidáció során kialakuló diszulfid hidak általi konformációváltozás a transzkripciós

faktorokat több szinten szabályozhatják: emelheti a transzkripció faktor stabilitását azáltal, hogy csökkenti az ubikvitin E3 ligáz komplexhez való kapcsolódását (Nrf2/Keap1, MKP-1) (298, 299); a citoplazma-sejtmag közötti transzlokáció fokozásával (c-Jun/c-Fos) (300, 301); illetve a transzkripció faktor felszabadításával a membrán horgonyokból, komplexekből (SREBP-1, bHLH3i) (294, 296).

1.5.4.2 Kinázok, foszfatázok

A foszfatázok és kinázok elsősorban energiaigényes foszforilációs szabályozás alatt állnak, kaszkád-szerűen erősítik a jelátvitelt. Redox szabályzásuk inkább a környezet oxidatív állapotától függ, oxidatív stressz során a sejtben a fiziológiánál jóval magasabb H₂O₂ expozícióra leírtak aktiváló és gátló hatást is (294). A H₂O₂ által közvetített szignalizációs jel a sejt redox állapotának jelzőrendszere, amely kinázok és foszfatázok redox szabályozásán keresztül módosíthatja a sejt foszfo-szabályzott útvonalait, összegezve a különféle aktivációs csatornákon érkező eltérő ingereket.

A Ca²⁺/Kalmodulin-dependens kináz (CaMKII) autofoszforilációs aktivációja mellett, oxidatív stressz alatt szabályzó doménjében található metionin oxidációjával is aktiválódik (277). A protein kináz A katalitikus alegysége (PKA C) hidrogén-peroxid hatására, a klasszikus cAMP útvonaltól függetlenül is aktiválódik, mely szintén elindítja a jelátviteli kaszkádot (277, 302). A mitogén-aktivált protein kináz kaszkád (MAPK), amely egyik fő útvonala az extracelluláris ingerekre érkező intracelluláris válaszreakcióknak, redox reguláció alatt is állnak (303–305). Az extracelluláris szignál szabályzott kinázok (ERK) közül bizonyos sejtekben az ERK1/2 és az ERK5, az Src kinázok közül a c-Src és Fyn is indukálható H₂O₂-dal (301, 306–309). A c-jun N-terminális és p38 MAPK kinázok egyik upstream aktivációs kináza az apoptózis-szabályzott kináz 1 (ASK1), oxidatív stressz alatt aktív kinázként sejtthalált, apoptózist inicializál (310–312).

Számos protein tirozin foszfatáz (PTP) reagál a redox környezet változására. Azon PTP enzimek, melyek redox szenzitívek, katalitikus doménjeikben konzervált cisztein oldalláncok találhatóak, melyek pKa értéke alacsony. Ilyenek pl. a PTEN, vagy PTP-B1 foszfatázok (272, 313). A redox egyensúly ingadozása, akár alacsony H₂O₂ koncentráció is erősíti a foszforilációs úton indukált apoptózist kinázok aktiválásával (JNK, ASK1) és foszfatázok (PTP) egyidejű reverzibilis gátlásával, ezzel potencírozva a receptor kinázok hatását (294, 314, 315).

1.5.4.3 Ioncsatornák

Egyre több közlemény támasztja alá, hogy a sejtek kalcium háztartása különböző ioncsatornák és pumpák szabályozásán keresztül redox úton is regulált. Feszültségfüggő kalcium csatornák közül az L- (long lasting) és T-típusú (tranziens) csatornán (CaV) keresztül folyó Ca^{2+} áramot szövet-, sejt-specifikusan direkt oxidációval modulálja a környezet H_2O_2 szintje. Indirekt úton is hatással van a H_2O_2 a csatornák expressziós szintjére és kihelyeződésükre (316–321). A tranziens receptor potenciál ioncsatorna szupercsalád (TRP) több tagjáról is leírták, hogy oxidáló ágensek Ca^{2+} permeabilitás növekedést okoznak (322, 323). A TRPM2 melasztatin receptor 2, (régebbi nevén TRPC7) egy nem szelektív, feszültségfüggő kation csatorna, mely közvetlen is aktiválódik ROS jelenlétében. Feltételezett aktív centrumában tartalmaz két konzervált ciszteint, amely szerinre vagy alaninra történő cserélésével poli-ADP ribóz stimulusra nem aktiválódik (324, 325). A PARP (poli-ADP ribóz polimeráz) oxidatív környezetben aktivitása fokozódik, felismeri az 1- és 2-szálú DNS töréseket, köti a károsodott DNS-t, katalizálja NAD lebontását nikotinamiddá és ADP-ribózzá, majd azokat polimerizálja vagy célfehérjékhez kapcsolja (162).

Az intracelluláris Ca^{2+} raktárak telítettségétől függő kalcium csatornák (store operated calcium channel, SOC) és a Ca^{2+} felszabadulás indukálta Ca^{2+} (Ca^{2+} release Ca^{2+} channels, CRAC) csatornák is válaszolnak redox aktivációra (320, 326). A SOC indukálta kalcium belépés gátolható volt tiol oxidáló ágensekkel és $300\mu\text{M}$ H_2O_2 -dal is (327). Direkt és specifikus hatást írtak le a CRAC csatorna fő komponenséről, az Orai1-ről, mely H_2O_2 -dal történő preinkubációt követően nem aktiválható az egyik katalitikus aktiváció szempontjából fontos cisztein oxidációjának köszönhetően (320). Jurkat T sejteken a CRAC komplex ER kalcium szint “érzékelője”, a STIM1 (stromal interaction molecule 1) hatására H_2O_2 jelenlétében fokozódik a Ca^{2+} áram (328).

Az ER-ban található ligand vezérelt csatornák, mint az IP3R (inozitol trifoszfát receptor) és a RyR1 (rianodin receptor 1) is depletálja az ER kalcium raktárait oxidáció hatására (329, 330). Ezen molekulák redox-függő oldalláncai a citoszólhoz képest erősen oxidált ER luminális tere felé néznek (331). Az endoplazmás retikulumban (ER) található Ca^{2+} pumpa (SERCA) cisztein oldalláncán keresztül szintén redox szabályzás alatt is áll, tiol csoportjain keresztüli oxidáció inhibeálta aktivitását (329, 330, 332).

1.5.5 H₂O₂ fluoreszcens mérési módszerei

A reaktív oxigén származékok vizsgálatának legnagyobb nehézsége a rendelkezésre álló mérési módszerek aspecificitása, pontatlansága vagy lassú reakció ideje. Ideálisan olyan eszközre lenne szükségünk, mely kinetikai mérések során képes pikomólos nagyságrendtől valós időben, detektálható jellé alakítani specifikusan a H₂O₂ mennyiségét. Az ideális intracelluláris H₂O₂ szenzoroknak a magas térbeli felbontás mellett további kívánalmaknak kell megfelelnie: biokompatibilis anyagból készüljön, kifejezhető vagy könnyen bejuttatható legyen és a lehető legkisebb mértékben befolyásolja a sejt alapvető élettani paramétereit (333).

1.5.5.1 Intracelluláris hasításon alapuló festékek

Általánosságban elmondható ezen fluoreszcens festékekről, hogy észter vagy acetát származékként membránpermeábilisak, a sejten belül nem specifikus észterázok leemésztik az észter csoportot, így permeabilitásukat elvesztve feldúsulnak a sejtben (285). Ilyen széles körben elterjedt festékek például a 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein (DCFH) (334), dihydrorhodamine (DHR123) (335), dihidroethidium (336), dihydrocalcein (337). Oxidatív környezetben a molekulák dihidro-csoportjaik oxidálódását követően fluoreszkáló vegyületekké alakulnak, intenzitásuk nő. A felsorolt vegyületek hátránya, hogy nem szelektívek, akkumulatívak, ezért sejten belüli lokalizáció meghatározására nem alkalmasak. Fotoszenzitívek, ezért ezen elven működő festékek által generált adatokat úgy kell tekinteni, mint az összes jelen lévő oxidáló ágens együttes hatásának eredményét (285, 333).

A fluoreszcens festékek újabb generációját képezik az ún. védő funkciójú boronát-csoporton keresztüli hatásmechanizmussal rendelkezők (285) vagy a pentafluorobenzenszulfonil vegyületek (338), melyek specifikusabbak, ahol a molekula a H₂O₂ hatására lehasadó boronát csoport árnyékoló hatása eltűnésével válik fluoreszcenssé. Előnyük, hogy különböző hullámhosszon gerjeszthetők új fluoreszcein származékaik, mint például a 600nm-en emittáló naftofluoreszcein (NPF1) alapú próbák (339), Peroxy-Orange-1 (PO1) vagy Peroxy Yellow-1 (PY1) fantázianevűek (340, 341), így egymással kombinálhatók, viszont lassú reakcióidejűek, nem alkalmazhatók valós idejű detektálásra. A szondák fejlesztett változatai már képesek a szignalizációs tartományban is detektálni, mint például a monoboronát csoporttal maszkírozott 2-

metil-4-metoxi Tokio Green 1 (Peroxy Green-1; PG1) és resorufin (Peroxy Crimson-1; PC1), melyek A431 sejtek EGF stimulusra adott H_2O_2 termelését detektálták olyan esetekben, ahol az elődeik még nem érzékelnek (341, 342). Az összes festék irreverzibilis változáson megy keresztül az oxidációja során (333, 340).

1.5.5.2 Nanopartikulumok

A nanorészecskék jellemzően 1-100 nm közötti mérettartományú, valamilyen nehézfém centrummal rendelkező molekulák (333). A legelterjedtebb szenzorok arany vagy ezüst alapúak biokompatibilitásuk és stabilitásuk miatt, bár ezek is toxikusak lehetnek a sejtekre. Az ezüst alapú nanorészecskék H_2O_2 specificitása kérdéses (343), de arany alapú próbák (Au nanoclusters, AuNCs) az intracelluláris redukált glutation pikomólos nagyságrendű detektálását teszik lehetővé (344). Léteznek már fluoreszcens és lumineszcens, “ultra-szenzitív” változatok is, melyek reverzibilisek, de pH optimumuk a fiziológiás alatt van (345). A reakció indirekt úton követhető, a hidrogén-peroxid AuNC-t oxidálja, mely szekvenciálisan oxidálni fogja a 3,3,5,5-tetramethylbenzidine-t (TMB), amely színváltozása fluoreszcens energia transzferrel mérhető (345). A nanorészecskék alcsoportját képezik a quantum pontok (Quantum Dots; QD), melyek egy félvezető magból és héjból épülnek fel. Széles excitációs- és keskeny emissziós spektrumuk van, hosszú fluoreszcens félélet idejük miatt kedvezőbbek optikai tulajdonságaik, ezek közül is kiemelkedik a vízzel oldható, karbon alapú QD hidrogén-peroxid szondák csoportja alacsony citotoxicitása, foto-stabilitása, és biológiai rendszerekben történő egyszerűbb használata miatt (333, 343, 346). Legtöbbjük azonban nehézfém tartalma miatt nem környezetbarát, nem regenerálhatóak, kevésbé H_2O_2 specifikusak, ezért biológiai rendszerekben egyelőre nehézkes a használatuk.

1.5.6 Genetikailag kódolt H_2O_2 szenzorok

A sejten belüli reaktív oxigén származékok mérésének egyik lehetőségét a genetikailag kódolt fehérjék alkotják. Előnyük, hogy dinamikusan követik a H_2O_2 szintjének változását, szubcellulárisan irányíthatóak, nanomólos nagyságrendű az érzékenységi tartományuk.

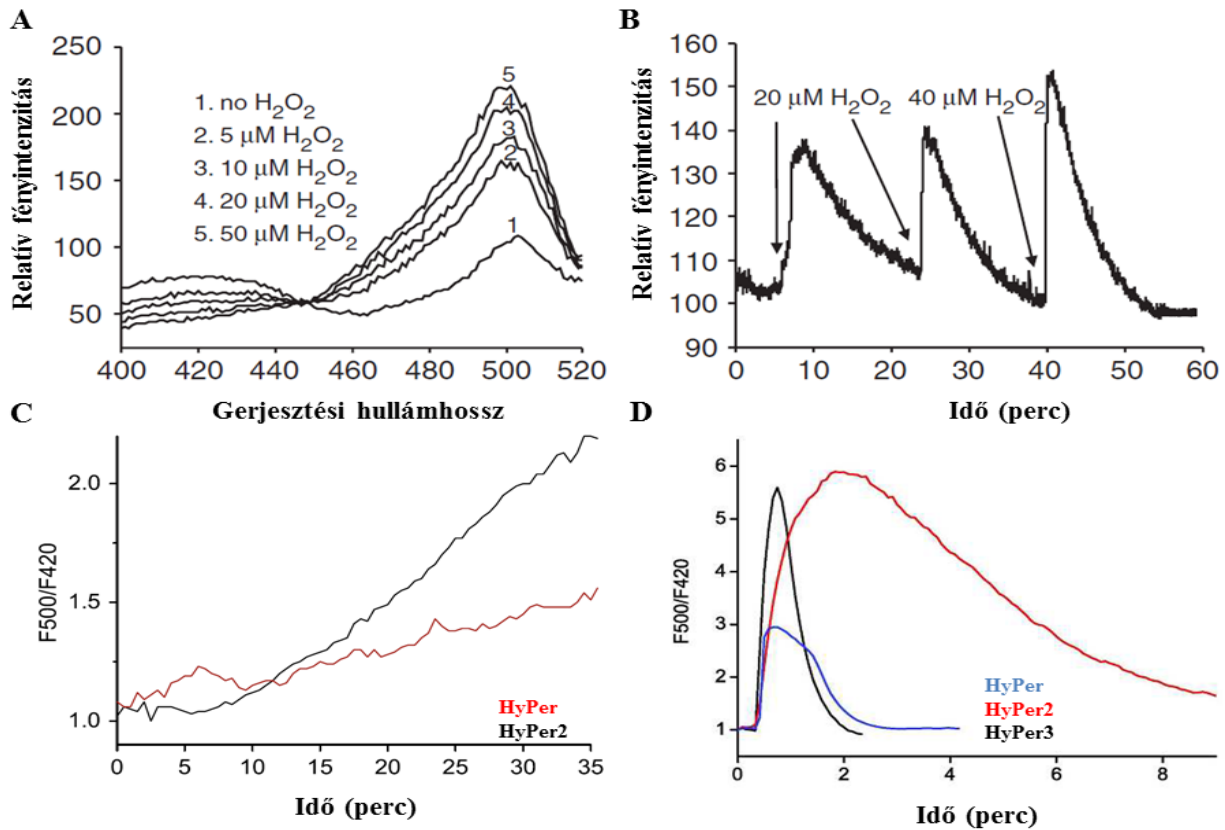
A módosított fluoreszcens fehérjék alapját 1962-ben Shimomura és munkatársai általi zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein, GFP) felfedezése majd sikeres klónozása adta (347, 348). A következő években számos mutagenézissel módosított, stabilabb, eltérő emissziós spektrummal rendelkező, más színű változatokat mutattak be (349, 350).

2004-ben publikálták az első redox változásokat detektáló szondákat, melyekben a GFP-ben két aminosavat ciszteinre cseréltek (S147C, Q204C), így oxidáló ágensek hatására diszulfid hidat képeznek, mely a fehérje konformációváltozását eredményezi, ezáltal annak gerjesztési spektruma is változik. Ezen roGFP szenzoroknak oxidációt követően 400 nm-en nő, 490 nm-en csökken a gerjeszthetősége, később szignál szekvenciák segítségével különböző sejtalkotókba irányíthatóakká váltak (351, 352). A szonda oxidáltságának állapotát egy ún. gerjesztési hányadossal (EM_{400}/EM_{490}) lehet nyomon követni, mely a fent említett két hullámhosszon gerjesztve és 515 nm-en detektálva képződik (285, 351).

1.5.6.1 A HyPer szondák

Az első specifikusan H_2O_2 -érzékeny szondát 2006-ban Belousov és mtsi. készítették az *Escherichia coli* OxyR transzkripció fehérje regulációs doménjének egy cirkulárisan permutált sárga fluoreszcens (YFP) fehérjének a fuzionáltatásával (353, 354). A HyPer1 szondában az OxyR fehérje két szabályzó ciszteinjé (C199 és C208) közé beépítettek egy N- és C-terminális végén összeépített, cirkuláris YFP-t, így növelve a molekula gerjesztési spektrumát (355). Az így létrehozott fúziós fehérjének két gerjesztési maximuma van 490- és 500 nm-en, míg a kibocsátása 516 nm-en detektálható. A H_2O_2 a cisztein oldalláncokat oxidálja, ezáltal a molekula konformációt vált, ezáltal 490 nm-en csökken, míg 500 nm-en nő az intenzitása, így az ebből számolt gerjesztési hányadosa (HyPer ratio) arányos lesz a szonda oxidáltságával (16. ábra) (354). Az elmúlt években készültek továbbfejlesztett változatok, mint a HyPer2, ahol a regulációs doménben egy pontmutáció miatt (A406V) a HyPer2 stabil dimert képez, a gerjesztési hányados 6-7-szerese lett az eredetinek (356). A HyPer3 szintén monomer, a reakcióidejét a 34-es pozíciójű hisztidin tirozinra (H34T) cserélésével növelték (16. ábra) (357). A két pontmutáció együttes jelenléte extrém féléletidőt és reakciósebességet eredményezett, ezért valós idejű mérésekre nem alkalmas (358). Készült piros fluoreszcens változat is, az R-GECO1 Ca^{2+} szonda, cirkulárisan permutált fluorofórja és az eredeti OxyR domén segítségével (359). A HyPer-Red

gerjesztési maximuma 575 nm-en, míg kibocsátása 605 nm-en detektálható. Kinetikus paramétereit, mint pH- és H_2O_2 érzékenysége összemérhető a HyPer1-gyel, de dinamikus reakcióidő tartománya kb. 30%-a az eredeti szondának (358, 360).

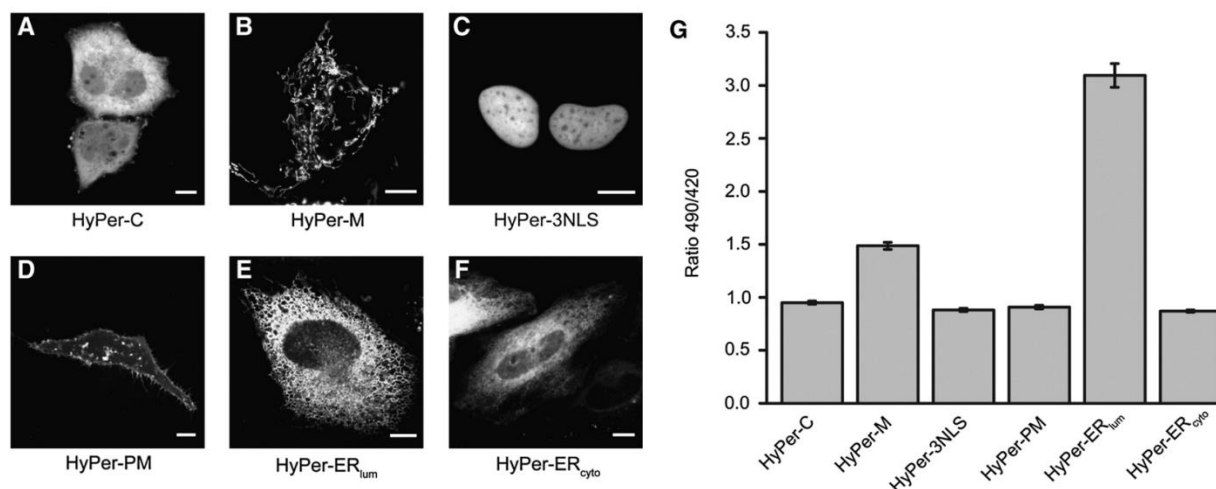


16. ábra: A HyPer fizikai-kémiai tulajdonságai: A. HyPer1 gerjesztési maximumai 500 és 420 nm eltérő irányú választ ad különböző koncentrációjú H_2O_2 hozzáadására. **B.** A 490 nm-es gerjesztési spektrumának kinetikai változása 530nm-en detektálva kataláz jelenlétében. 20 és 40 μM H_2O_2 hozzáadását követően. **C.** A HyPer (piros vonal) és HyPer2 (fekete vonal) érzékenységének összehasonlítása PDGF-es stimulált NIH3T3 sejtek citoszólójában **D.** A HyPer (kék vonal) és HyPer2 (piros vonal), HyPer3 (fekete vonal) válaszreakcióinak időbeli összehasonlítása individuális, tranziensen transzfektált HeLa Kyoto sejteken (Enyedi Balázs PhD értekezése (356, 357).

A szondák specificitását a reagáló ciszteinek elhelyezkedése adja, melyek egy hidrofób zsebben találhatóak a molekula belsejében és így más oxidáló ágens, mint a szuperoxid, a NO,

vagy a peroxinitrit előtt szférikusán nem elérhetőek (354). A hagyományos fluoreszcens változatok is pH szenzitívek (minimális pH változás változtatja a kromofór protonáltságát), melyek a cirkuláris permutációval létrehozott HyPer szondákban még erősebb. Ezért a HyPer1 jó alap volt pH szenzor készítéséhez, ahol az egyik ciszteinjét szerinre cserélve (C199S) rontották redox érzékenységét (358). Mivel a HyPer1 a H_2O_2 mellett válaszol a pH változásra is, ezért használata mellett indokolt a pH változást is nyomon követni, akár a C199S mutáns szondával.

Az eredeti HyPer1 sejtalkotókba irányítása különböző lokalizációs szignálok segítségével lehetőséget adott egyes intracelluláris kompartmentek oxidatív környezetének feltérképezésére (17. ábra)(6, 360, 361).

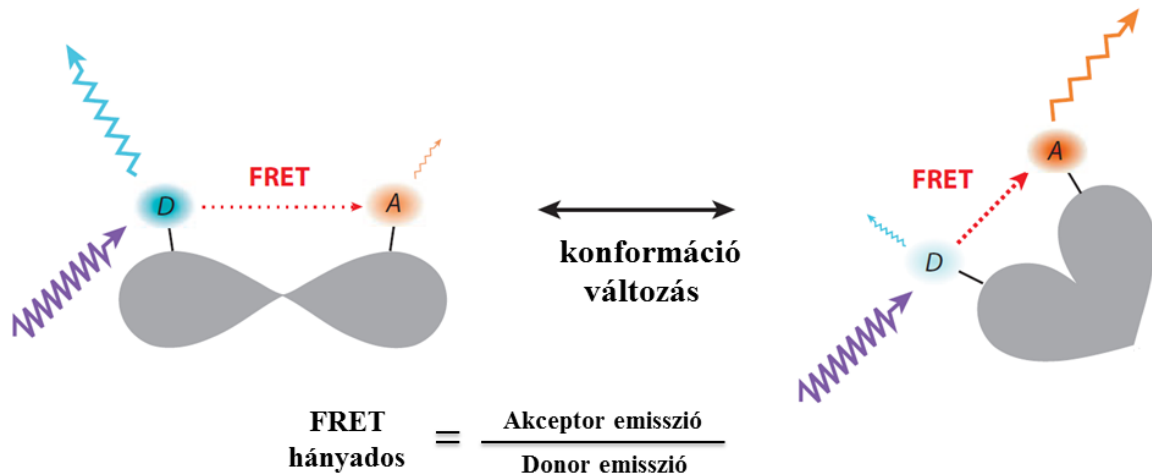


17. ábra: Különböző sejtalkotók H_2O_2 szintje HeLa sejteken: Tranziensen transzfektált HeLa sejtek konfokális mikroszkópos képei a citoszólban (A), a mitokondriumban (B) a sejtmagban (C), a plazmamembránban (D), az ER lumináris (E) és citoszólikus (F) oldalán. Az ábra G részén látható a különböző sejtalkotók HyPer hányadosa fiziológias körülmények között (6).

1.5.6.2 FRET alapú H_2O_2 szondák

Egészen új alternatívát kínálnak a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) elvén működő szondák, melyek két fluoreszcens fehérje közötti fotonkibocsátás nélküli energiaátadáson (Fröster-effektus) alapulnak (362). Az energiaátadás feltétele, hogy a donor

fluorofór emissziós spektruma és az akceptor fluorofór abszorpciós spektruma között átfedés legyen, így ha a két fluorofór megfelelő közelségbe kerül, akkor a donor emittált energiájának egy része az akceptor fehérjét gerjeszti. Így az aktiváló konformációváltozás a donor emisszióját csökkenti, az akceptorét emeli (18.ábra). Emissziós ratiometriás módszerrel az akceptor és donor emissziójának hányadosával képezhető a FRET hányados vagy FRET index, mellyel számszerűsíthető a változás mértéke (18. ábra)(363).

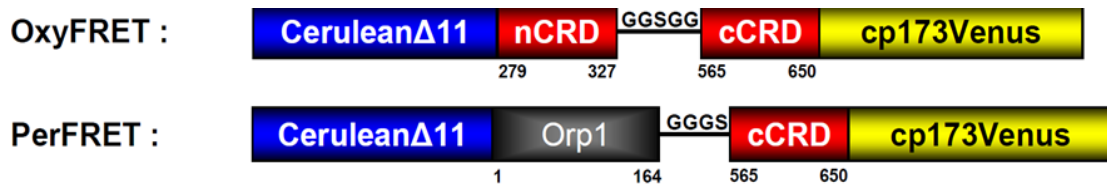


18. ábra: A FRET szondák működési elve: A donor kromofór (D) gerjesztése során fényt emittál, mely konformációváltozást követően, ha az akceptor (A) megfelelő közelségbe kerül a gerjesztett energiát az akceptor kromofórnak adja át. Az akceptor fluorofór (A) emissziója emelkedik, a donoré csökken (362).

1.5.6.2.1 Az OxyFRET és PerFRET

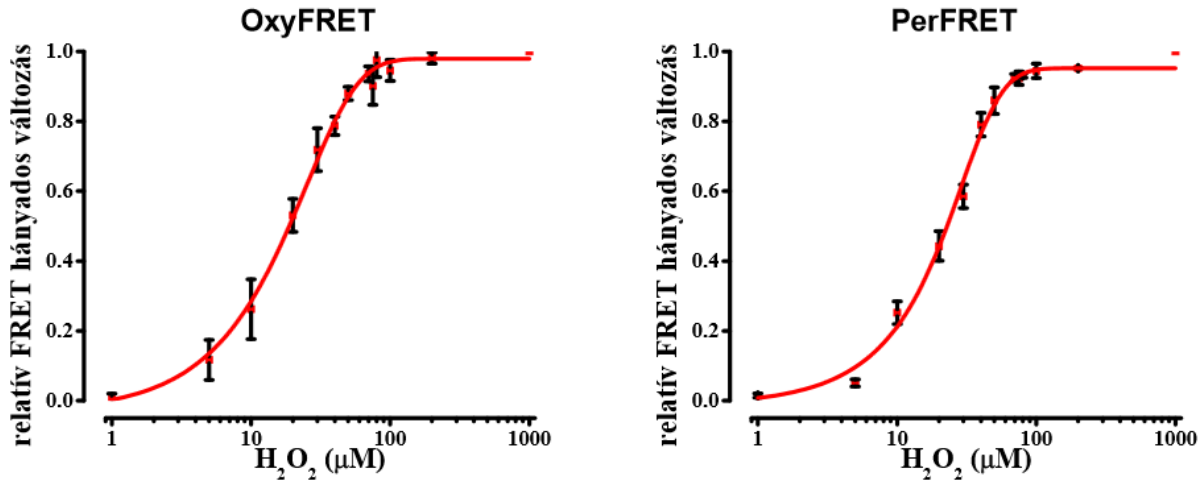
Dr. Enyedi Balázs ezen elv alapján készített két, fiziológias mennyiségű H_2O_2 mérésére alkalmas szondát. A két szonda *S. cerevisiae* H_2O_2 érzékelésének alapján nyugszik. Hidrogén-peroxid jelenlétében az Oxidáns receptor 1 (Orp1, Oxidant receptor protein 1) glutation peroxidáz az Élesztő aktivátor fehérje 1 (Yap1, Yeast activator protein 1) transzkripció faktorral redox relé rendszert alkotnak. Nyugalmi körülmények között a Yap1 transzkripció faktor NES (nukleáris export szignál) motívumához kötődik egy nukleáris export fehérje, gátolva sejtmagi felhalmozódását (364, 365). H_2O_2 jelenlétében Orp1 fehérje 36-os pozíciójú cisztein oldallánca oxidálódik, mely a Yap1 598-as pozíciójú cisztein oldalláncával intermolekuláris diszulfidhidat

alakít ki. A kialakuló konformációváltozás a Yap1 N- és C-terminális cisztein gazdag doménjeiben (nCRD és cCRD) található cisztein oldalláncai között további három intramolekuláris diszulfidhídát alakít ki (366). Az Orp1 hatására, H_2O_2 jelenlétében kialakuló konformáció elfedi a nukleáris export szignált, valamint felszabadul a nukleáris lokalizációs szignál (NLS), így a Yap1 feldúsul a sejtmagban. Az Orp1 és Yap1 fehérjék redukálását a tioredoxin reduktáz rendszer (Trx) végzi (367). A szondák H_2O_2 specifikusságát ezen élesztő fehérjék cisztein gazdag régiói adják. A Yap1 cisztein gazdag doménjeit (nCRD: N279-K32, cCRD: 565-N650) és az Orp1-et teljes hosszúságában illesztette Dr. Enyedi Balázs a Cerulean Δ 11, és a cirkulárisan permutált Venus173 (cpVenus173) fluorofórok mellé (368) (19.ábra).



19. ábra: Az OxyFRET és PerFRET szondák domén-szerkezete és válaszreakciója H_2O_2 hozzáadására. A: A Yap1 fehérje két CRD szakasza egy rövid GGSGG linker szekvenciával került beillesztésre, a Cerulean Δ 11 fluoreszcens fehérje az OxyFRET-ben az nCRD-hez, a PerFRET-ben az Orp1-hez fuzionáltatva. A cp173Venus pedig a Yap1 cCRD doménjével összefűzve alakítja ki a FRET párt (368).

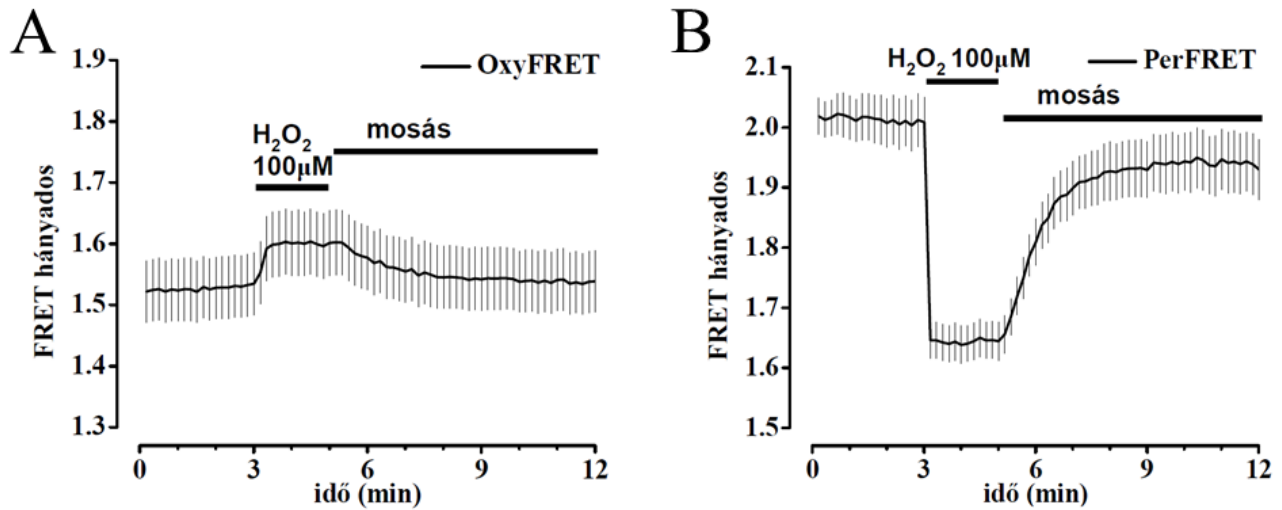
Az OxyFRET rekombináns szonda tartalmazza a Yap1 nCRD-t egy módosított Cerulean Δ 11 sárga színű fluoreszcens fehérjével fuzionáltatva, valamint a Yap1 cCRD doménjét egy rövid glicin és szerin aminosavakból álló hídval összekötve. Az eukarióta expressziós vektorban a rekombináns fehérjét egy konstitutívan aktív CMV (cytomegalovírus) promóter hajtja. Az OxyFRET nCRD doménjének Orp1-re történő cserélésével készült el a PerFRET, ahol rövidebb, GSGG linker köti össze a két domént (19.ábra) (368).



20. ábra: Az OxyFRET és PerFRET szondák dózis-hatás görbéje: Hela sejtekben az OxyFRET és PerFRET szondák érzékenysége különböző koncentrációjú H_2O_2 hozzáadásával kiváltott FRET hányados értéke alapján. A relatív FRET hányados a nyugalmi, illetve 1 mM H_2O_2 hatására kialakuló hányadoshoz viszonyítva (368).

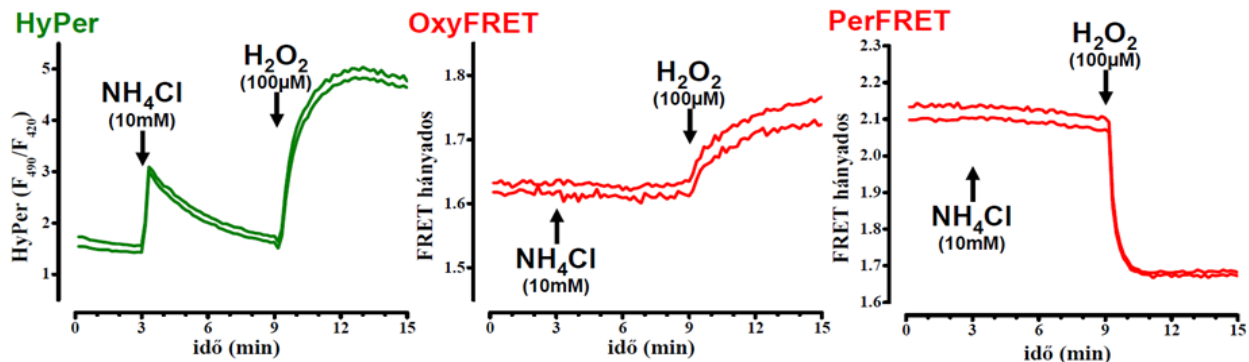
Az OxyFRET és a PerFRET szondák érzékenysége dózis-hatás görbéjük alapján a sejtben 18,8 μM , illetve 22,8 μM értéknél található a H_2O_2 félmaximális oxidáló koncentrációja, amely meghaladja a HyPer érzékenységét, melynek félmaximális oxidáló H_2O_2 koncentrációja 76 μM (20. ábra)(6, 368). A szondák alacsonyabb koncentráció tartományban válaszolnak az intracelluláris H_2O_2 koncentrációra, de telítődésük a HyPer1 szondához hasonló 100 μM koncentrációtartományban van.

A PerFRET szonda H_2O_2 expozícióra a FRET hányadosának csökkenését eredményezi. Az Orp1 fehérjében kialakuló intramolekuláris diszulfid-híd képződésből eredő konformációváltozás a fluorofórok távolodását okozza, ezáltal csökken a FRET hányadosa. Gyors $[H_2O_2]$ változások kinetikai vizsgálatára a PerFRET lehet alkalmas, FRET hányadosa széles tartományban dinamikusan válaszol H_2O_2 expozícióra, majd kimosása után gyorsan regenerálódik. Ezzel szemben az OxyFRET FRET hányadosa emelkedik, de válasza kisebb tartományban változik (21.ábra).



21. ábra: Az OxyFRET és PerFRET szondák regenerálódása: 100 μM H₂O₂ hozzáadást követően HeLa sejtekben expresszált OxyFRET (A) és PerFRET (B) szondák a H₂O₂ kimosása során regenerálódnak (Dr. Enyedi Balázs PhD értekezésének ábrája).

Mindkét szonda *in vitro* reverzibilisen oxidálható, további előnyük, hogy a fiziológias tartományban alacsonyabb pH érzékenységük, mint akár a HyPer1 szenzoré (22. ábra) (358, 368).



22. ábra: A HyPer, OxyFRET és PerFRET szenzorok pH függésének összehasonlítása: HeLa sejteken mért 10mM NH₄Cl és kontrollként 100 μl H₂O₂ hatására kialakuló szignálok összehasonlítása, az ábrákon a mikroszkóp látóterében egyszerre mért sejtek szignálja látható (368).

A HyPer1 aspecifikus választ ad a NH₄Cl-dal eltolt pH változásra, így ezen szondák nem alkalmasak olyan élettani folyamatok nyomon követésére, melyek pH változással is járnak, mint

akár a NADPH oxidázok aktivitásából eredő H^+ ionok keletkezése és javasolt mellette a C199S mutáns szondával kontrollálni. Az OxyFRET és PerFRET nem válaszolt ugyanekkora pH változásra, és további előnyük, hogy a FRET elvének köszönhetően, specifikus válasznál a fluorofórok emissziója ellentétes irányba változik.

Az OxyFRET és PerFRET szondák karakterizálásában már én is részt vettem, ezért további vizsgálatukat a Módszerek és az Eredmények című fejezetekben fogom bemutatni.

Léteznek már a H_2O_2 mérési módszerek különböző metszetei, mint pl. a FRET alapú, arany QD nanoparikulumok, tiramid reakcióval ötvözve. Működési elve, hogy az arany QD (EXmax 605 nm) felszínéhez kötött torma-peroxidáz (HRP) (donor fluorofór) és a tiramiddal jelölt karbocianin (Cy5) festék (akceptor) fluoreszcens spektrumai részben átfednek, H_2O_2 jelenlétében a Cy5-jelölt HRP-QDs formáció alakul ki, a FRET hányados értékében 10-100 nM H_2O_2 koncentrációtartományban lineáris függést írtak le (369). A Ratio-Peroxyfluor-1-nél (RFP1) a FRET hányadost a kumarin donor és a fluor/fluoreszcein-akceptor partnerek közötti spektrális átfedés generálja. Érzékenységet az akceptor festéken található boronát-észter védőcsoport H_2O_2 -specifikus eltávolítása okozza. A közleményben élesztő mitokondriumába irányítva szelektívnek találták H_2O_2 -ra NO és szuperoxidtal szemben (370).

2. Célkitűzések

Doktori munkám során több, egymással szorosan összefüggő kérdéskört vizsgáltam az alábbi főbb célokra fókuszálva:

- A PreFRET genetikailag kódolt intracelluláris H_2O_2 szint érzékelő szonda működési elvének jellemzése mutációanalízissel.
- Primer humán pulmonáris és dermális fibroblaszt sejtek endogén Nox4 expressziójának és aktivációjának vizsgálata.
- A Nox4 és p22^{phox} kapcsolatának vizsgálata Nox4 KO és p22^{phox} -deficiens egérmodellek segítségével.
- Nox4 és p22^{phox} szubcelluláris lokalizációjának feltérképezése és az aktivált komplex által termelődő H_2O_2 intracelluláris jelenlétének detektálása.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált anyagok

A kísérleteim során felhasznált anyagok közül az Alexa-488, -568 konjugált monoklonális és poliklonális antitesteket, a pcDNA3.1 klónozó vektort, a Lipofectamine LTX, RNAiMAX transzfekciós reagenseket, az Amplex Red oldatait az Invitrogen™ Life Technologies cégtől rendeltük. Az IgG-1 típusú monoklonális (16G7) p22^{phox} elleni antitestet kollaborációs partnerünk bocsátotta rendelkezésünkre (371). A szintén monoklonális AU1 elleni antitest a Covance (AFC-130P) cégtől származik, míg poliklonális társát (ab3401) az Abcamtól rendeltük. A kísérletekben használt V5 elleni monoklonális antitestet AbD Serotec cégtől, az anti-BiP monoklonális antitestet pedig a BD Bioscience-től szereztük be. TGF- β 1-et az R&D System-től vásároltuk. A rapamicint intézetünkől Dr. Várnai Péter bocsátotta rendelkezésünkre, aki az R&D System-től vásárolta. A szövettanhoz és mérésekhez használt műanyag flakákat és lemezeket Greiner Bio One GmbH-től vásároltuk. A Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk a β -actin elleni monoklonális antitestet és azon egyéb reagenseket, anyagokat, amelyeket nem tüntettem fel külön.

3.2 Plazmid konstrukciók készítése

Az alapvető molekuláris biológiai eljárásokhoz használt reagenseket a Fermentas cégtől szereztük be. A PCR reakciókhoz minden esetben Phusion Hot Start DNS polimerázt (Finnzymes) használtunk gyártói protokoll alapján.

A p22^{phox} fehérjét expresszáló plazmidból készítettünk AU1-epitóppal jelölt változatot is. A p22^{phox} kódoló szekvenciát (ORF) PCR-rel erősítettük fel humán renális cDNS könyvtárból (Applied Biosystems/Ambion). A primerek adapterként hordoztak 5' irányban NheI, 3' irányban BamHI restrikciós vágóhelyeket, amelyek segítségével a PCR fragmenst beillesztettük a pcDNA3.1 (Thermo Fischer) vektorba. Így a vektorról kifejeződő p22^{phox} C-terminálisan hordozza a V5-epitópot. Az AU1-epitópot N-terminálisan helyeztük el irányított mutagenézissel (QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent) a gyártó által kiadott útmutató alapján.

A Nox4 V5-epitóppal ellátott változata plazmid formában már elérhető volt laborunkban, melyet kiindulásként használtunk. N-terminálisan irányított mutagenézissel AU1-es antigén determinánst illesztettünk rá, majd egy új STOP kodonnal leválasztottuk a V5-epitópot.

Készítettünk továbbá egy kémiaailag indukálható heterodimerizációs rendszert, ahol az FKBP12-FRB dimerpár tagjai rapamicin jelenlétében gyors transzlokációval komplexet formálnak (372). Ezt kihasználva a 12 kDa nagyságú FK506 fehérjét (FKBP12) fuzionáltattunk Nox4-hez és p22^{phox}-hoz. Rapamicin jelenlétében az mTOR kináz rapamicin-kötő doménje komplexet képez az FKBP12 fehérjével. A kötődés láthatóvá tételéhez az FRB molekulához egy YFP fluoreszcens fehérjét, az FKBP12 fehérjéhez pedig egy CFP-t kötöttünk. PCR reakcióban amplifikáltuk fel Dr. Várnai Péter pEGFP (Clontech) alapú plazmidjáról a CFP-FRB-HA szekvenciát tartalmazó fragmenst, melyet NheI-BglIII vágóhelyekkel N-terminálisan a Nox4 ORF elé ligáltunk. A p22^{phox} tartalmú plazmidra ugyanezen PCR terméket Sali-MfeI- vágóhelyek segítségével C-terminálisan illesztettük rá. A kísérlethez a dimerizációs komplex párját, a FRB-YFP-t Dr. Várnai Pétertől használatra készen kaptuk (372).

A HyPer1-et kódoló plazmidokat Dr. Enyedi Balázs készítette és karakterizálta (Enyedi 2010) Belousov és munkatársai által létrehozott citoszólikus HyPer1 szenzort kódoló plazmidja alapján (Evrogen, (354)). Minden általunk készített plazmidot szekvenálással ellenőriztünk.

3.3 QPCR

Sejtvonalainkból frissen izoláltunk teljes RNS-t Trifast reagenssel a gyári protokollban leírtak szerint. 1 µg RNS-ből 20 µl térfogatban cDNS-t szintetizáltunk, melyhez M-MuLV reverz transzkriptáz enzimet használtuk oligo (dT)18 primerrel a gyártó javaslatára alapján. A cDNS-ből 1 µl-t (50 ng RNS) használtunk a QPCR reakciókhoz, melyhez LightCycler FastStart DNA Master SYBR GreenI reakció mix-et alkalmaztunk 10 µL térfogatban LightCycler 1.5 készüléken (Roche). A standard PCR protokollt alkalmaztuk: 95 °C 10 perc, majd 40 ciklus 95 °C 10 sec, 60 °C 5 sec, 72 °C 15- 25 sec (target hossza [bp]/25), melynek végén olvadási görbét vettünk fel 65 °C-tól 95 °C-ig 0,1 °C/s sebességgel.

LightCycler Software 4.05 programmal értékeltük ki az eredményeket. Második derivált módszerrel határoztuk meg a ciklusszámot (C_p, crossing point), ahol az ampikon mennyisége

eléri a detektálási küszöböt. Értékelésünkhöz egy háztartási gén, a β -aktin kifejeződésének mértékével osztottuk az adott mintában jelen lévő gén termékeinek mennyiségét és a normált, relatív expressziókat ábrázoltuk.

3.4 Sejtkultúra, felhasznált sejtvonalak

A kísérleteinkhez használt Hela-WT (ATCC:CCL-2TM), dermális fibroblaszt (BJ, ATCC:CRL-2522TM) és a HEK293FS (InvitrogenTM Life Technologies) sejtvonalakat 10 %-os főtális borjú szérummal (FBS), 50 U/mL penicillinnel és 50 ug/mL streptomycinnel kiegészített DMEM médiumban (Lonza) tenyésztettük. A humán pulmonális fibroblaszt (HPF, PromoCell, C-12360) primer sejtvonalat a gyártó által javasolt és forgalmazott fibroblaszt médiumban tartottuk fenn 2%-os FBS-el, 5 ng/mL fibroblaszt növekedési faktorról (bFGF), valamint 5 ug/mL inzulinnal kiegészítve. A Nox4-túltermelő HEK293FS sejtvonalat Dr. Donkó Ágnes készítette, fenntartása azonos a háttér HEK293FS sejtekkel.

3.4.1 *p22^{phox}* és *Nox4* deficiens egértörzsek

A *3FAFyh* (MGI:3818889) elnevezésű *Nox4* deficiens egértörzset az Oak Ridge National Laboratory (Oak Ridge, TN, USA) bocsátotta rendelkezésünkre, amely homozigóta formája életképes, sugárzás-indukálta tirozináz (*Tyr*) hiánya miatt albínó (Rinchik 1993). A *Nox4* teljes genomi szekvenciája hiányzik a *Tyr* génnel szomszédos 7. kromoszóma q-karján (c-lókuszt), amelyet Southern Blot analízissel ellenőriztünk. A PCR alapú analízis igazolta, hogy egy 2100 kilobázis hosszú deléción jött létre a *Nox4-Tyr* lókusztban. A hiányzó DNS szegmens lefedi a *Nox4* upstream teljes régióját, továbbá érinti az olfaktorikus-vomerónazális receptor család génjeinek egy részét (*Vmn2r-70*-től *Vmn2r-79*-ig) és a folát hidroláz 1-et (*Folh1*). A deléciót disztálisan közvetlen követő szakaszon elhelyezkedő *Gmr5* és *Ctsc* szekvenciái intaktak maradtak.

Az nmf333, *p22^{phox}*-deficiens egértörzs a Jackson Laboratory-ból származik (Bar Harbor, ME, USA). A *p22^{phox}* fehérjében a 121-es pozíciójú tirozin helyett egy misszenz mutáció miatt hisztidin található. A génben történt tirozin-hisztidin aminosav csere a transzmembrán domént érinti, amely súlyos strukturális változásokat eredményez és a fehérje instabilitását okozza. A

recesszíven öröklődő mutáció fej és test billenéssel járó fenotípust eredményez (Parkos 1989, Nakano 2008).

Az egereket normál diétán tartottuk, vizet *ad libitum* adtunk. Állatkísérleteinket az XIV-I-001/2140-4/2012 számú engedély birtokában végezhetjük el.

3.4.2 Farok fibroblaszt sejtek preparálása

Az egerekből 8 hetes korban farokvégből készítettünk sejtenyészetet (TTF, tail-tip fibroblast), melyet az izolációt követően 30 percen keresztül kollagenázzal emésztettük, majd felhasználás előtt pár napig 10 % FBS és 1 % penicillin/sztreptomocinnel kiegészített DMEM-ben növesztettük.

3.4.3 Nox4 expresszió indukálása

A humán és egér sejt vonalakat tripszinnel történő mobilizálás után 12-lyukú plate-en növesztettük 90-98 %-os konfluenciáig. Ezt követően egy éjszakára alap médiumukból csökkentettük a szérumszámot 0,05 %-ra. Másnap teljes szérumszám mellett 5 ng/mL TGF- β 1-et adtunk, rutinszerűen 24 óráig. Minden sejt típusnál a saját, alap tápoldatát készítettük el szérumszám depletált és TGF- β 1-gyel kiegészített formában.

3.5 Tranziens transzfekció és géncsendesítés

A plazmidokat tranziens transzfekcióval expresszáltattuk a sejtekben. Kémiai úton Lipofectamine LTX reagenst használtunk, míg a BJ és HPF sejt vonalakat esetén elektroporálással juttatuk be a plazmidokat a Life Technologies által forgalmazott Neon Transfection System segítségével.

Kémiai transzfektálás során tripszines emésztéssel a transzfekciót megelőző napon a sejteket átültettük 2×10^5 -en sűrűségben 6-lyukú plate-ekre. Másnap médiumcsere követően 1 μ g DNS-t, 1 μ l Plus reagenst és 3 μ l Lipofectamine LTX reagenst alkalmaztunk a gyártó által

javasolt protokoll alapján. Mikroszkópos mérésekhez a sejteket 1×10^5 -en sűrűségben 10 cm-es fedőlemezre ültettük át, mielőtt transzfektáltuk volna.

Elektroporációhoz 10 μ L-es Neon Kit-et használtunk, melyhez 4×10^5 -en sejtet alkalmaztunk reakciónként. A sejtek előkészítése a gyártói leírás alapján történt. A fibroblasztokat 1600 mV-tal, 20 ms alatt 1-szer ütöttük meg.

Géncsendesítéshez a standard eljárást alkalmaztuk, 60-70 %-os konfluencia mellett 25 pM specifikus vagy kontroll siRNS-et transzfektáltunk Lipofectamine RNAiMAX reagenssel a forgalmazó ajánlása alapján. A sejteket 2-3 napig inkubáltuk felhasználás előtt.

3.6 Immunfluoreszcens jelölés

A sejteket 10 cm-es lemezre ültetést követően transzfektáltuk, majd 24-48 órás inkubációt követően dolgoztuk fel. 30 percig fixáltuk szobahőmérsékleten 4 % paraformaldehidet tartalmazó PBS oldatban. PBS-es mosást követően 100 mM glicin tartalmú PBS-es oldattal inkubáltuk 10 percig. Újabb alapos PBS-es mosást követően a sejteket permeabilizáltuk 20 perc alatt 1 %-os BSA, 0.1 %-os Triton-X100 tartalmazó PBS-sel, majd blokkoltuk 1 óráig 3 %-os BSA-t tartalmazó PBS-ben. Az első és második antitesteket 3 %-os BSA tartalmú PBS-ben inkubáltuk 1 vagy 2 órán át. Újabb PBS-es mosást alkalmaztunk a két antitest között és a lemezeket végül Mowiol 4-88 reagenssel (glicerin és 4-88 polivinil alkohol vizes oldata, melyet Tris-el puffereltünk 8.5-ös pH-ra) rögzítettük.

3.7 Western blot analízis

Fehérje expressziós vizsgálatokhoz a sejteket jeges PBS oldattal átmostuk, majd jégen proteináz inhibitor koktéllal (Roche Life Science) kiegészített RIPA pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % Na-deoxikolat, 1 % TritonX) lizáltuk. A felkapart sejteket 4 °C-ra előhűtött centrifugában 13400 rpm-el 10 perc alatt centrifugáltuk. A felülúszót 4x-os Laemmli pufferrel (0.005 % brómfenolkék, 4 % SDS, 20 % glicerol, 0.1 M Tris) egészítettük ki. A kezelés típusától függően 10 percig 100°C-on denaturáltuk vagy forralás nélkül futtattuk 12 %-os SDS-poliakrilamid gélen. Ezt követően átblottoltuk a gélt nitrocellulóz membránra, majd blokkoltuk 1

órát 5 %-os tejporos PBS-ben. A primer antitestet 3 %-os BSA-t tartalmazó oldatban alkalmaztuk, amelyet szobahőmérsékleten 1 óráig rázattuk a membránnal. A kötődéshez HRP-konjugált anti-nyúl vagy anti-egér másodlagos antitestet (Amersham Pharmaceuticals) 1:5000-es hígításban használtunk, melyet kemilumineszcens elven működő eljárással (ECL, GE Healthcare) hívtunk elő FUJI Super RX filmre.

3.8 Mikroszkópos technikák

3.8.1 Konfokális mikroszkópia

Zeiss LSM510 típusú pásztázó konfokális mikroszkóppal készítettünk képeket általában 63-szoros nagyítású, 1.4-es numerikus apertúrájú Plan-Apochromat Objektívvel. A gerjesztéshez 25 milliwattos, 458 nm-en és 488 nm-en emittáló argon lézert, egy 405 nm-en emittáló dióda lézert, valamint 1 milliwattos, 543 nm-en emittáló hélium/neon lézert alkalmaztunk. A képek 1-2 μm optikai szeletvastagsággal multitrack módban készültek, hogy minimalizáljuk a fluorofórok közötti átbeszélés mértékét. Cerulean esetén az emissziót 420-480 nm-es szűk sávú filterrel detektáltuk, Alexa-488, Venus, GFP és a HyPer esetén 500 és 530 nm-es szűk sávú filterrel, míg mRFP, mCherry és az Alexa-568 mérése során 560 nm felett széles sávú átengedő filter segítségével készítettük a képeket. Az utómunkálatokhoz a Zeiss Zen programját használtuk.

3.8.2 Mikrofluorimetriás mérések

3.8.2.1 Intracelluláris H_2O_2 szintek detektálása HyPer1 szenzorral

Mikrofluorimetriás mérésekhez egy fordított állású Axio Observer (Zeiss) mikroszkópot alkalmaztunk 40x1.4-es numerikus apertúrájú (Fluar, Zeiss) olaj immerziós objektívvel és Cascade II (Photometrics) kamerával felszerelve. A fényt Xenon ívlámpával gerjesztettük, amelyből DeltaRAM monokromátoron (Photon Technology International) átengedve állítottuk be a kívánt hullámhosszt.

A 10 cm-es fedőlemezre ültetett sejteket 24-48 órával a HyPer transzfekcióját követően excitációs ratiometriával mértük. A fehérje fluoreszcens változásának detektálásához 490 és 420 nm-en szekvenciálisan gerjesztettük, a kibocsátott fényt pedig 505 nm-es dikroikus tükrön és egy 525/36 nm-es emissziós szűrőn engedték át, valamint mértük a molekula emissziós maximumát

520nm-en. A fehérje abszorpciós maximuma a fehérje oxidáltsági állapotának függvénye, amelyet háttérkorrekciót követően a két kibocsátott fluoreszcens jel intenzitásának hányadosával jellemzünk (HyPerF₄₉₀/F₄₂₀). Ez az érték az intracelluláris sejtalkotó H₂O₂ szintjével arányos.

A méréshez a 10 cm-es fedőlemezeket 37 °C-on előmelegített mérőkamrákba (Attofluor) helyeztük át, H-médiumra (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,8 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM glukóz, pH = 7,4) cseréltük a tápoldatot. A mérések során 100 µl, 10-szeresre hígított reagensekkel dolgoztunk, melyet 1 mL médiumba kevertünk. A 3-tól 30 percig terjedő egyedi méréseket 10 másodperces képkészítéssel MetaFluor (Molecular Devices) programmal rögzítettük és ugyanezen programmal értékeltük ki. Azonos mérési napok külön mérőlemezeit biológiai párhuzamosnak tekintettük.

3.8.2.2 Intracelluláris H₂O₂ szintek detektálása PerFRET és OxyFRET szenzorral

A FRET szondákat tranziens módon transzfektálva hasonló elven mértük, mint a HyPert. Közvetlen mérés előtt az előmelegített mérőkamrákban H-médiumra cseréltük a tápoldatot, majd 3 perces előinkubációt követően 37 °C-on 1 mM H₂O₂ hozzáadásával maximálisan oxidáltuk a szondákat.

A szondákat 435 nm-en gerjesztettük, majd az emittált fényt szétválasztottuk egy Dual-View (Photometrics) tükörrendszer segítségével, ahol átvezettük egy 505 nm-es dikroikus tükrön, illetve egy 480/30 és egy 580/30 nm-es szűrőn, így egyidejűleg detektáltuk 480 nm-en a donor (CeruleanΔ11) és 535 nm-en az akceptor (cp173Venus) kibocsátott emissziós fény intenzitását. Eredményeinket a háttérintenzitás levonása után az alapvonalra normált értékekből generált FRET hányadossal ábrázoltuk. A FRET hányadosban az akceptor által kibocsátott emissziós szignált elosztottuk a donor által kibocsátott donor emissziójával.

$$\text{FRET hányados} = \frac{\text{akceptor emisszió}_{(535\text{nm})}}{\text{donor emisszió}_{(480\text{nm})}}$$

3.8.2.3 Rapamicin-alapú dimerképzés

A rapamicin indukálta heterodimerizációs kísérletekhez az FKBP12-FRB doménpárt alkalmaztuk. BJ sejteket 6-lyukú plate-ben fedőlemezre szélesztettük, majd 60 %-os konfluencia szint mellett kotranszfektáltuk FRB-YFP-vel és a CFP-FKBP12-p22^{phox} vagy CFP-FKBP12-Nox4 plazmiddal. A kotranszfekciót követő napon mérőkamrába és H-médiumba helyeztük át a fedőlemezeket, ahol kinetikai méréseket végeztünk 5-10 másodperces képkészítési frekvenciával általában 15 percig. A rapamicint 300 nM-os végkoncentrációban adtuk 10x hígításban 1 mL médiumba keverve.

3.8.3 Extracelluláris H₂O₂ mérése Amplex Red assay-vel

Az extracelluláris térbe szekretált H₂O₂ szintjének meghatározására a Life Technologies Amplex Red módszerét alkalmaztuk. Az Amplex Red reagens (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) egy nem-fluoreszcens, színtelen molekula, mely enzimatis oxidáció után fluoreszcens rezorufinná alakul. Kinetikai és kvantitatív mérésekre is alkalmas, 1:1 sztöchiometriás arányban detekálja a H₂O₂-ot. Néhány tényező korlátozza megbízhatóságát vagy alkalmazhatóságát, például peroxidázok oxidálhatják, elektrondonorok (NADH) jelenlétében végbe mehet fotoszenzitív redukciója.

A 12-lyukú plate-re ültetett adherens sejteket konfluens állapotban H-médiumban 50 µM Amplex Red reagens (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) és 0.1 U/mL HRP jelenlétében 37 °C-on inkubáltuk. A 30 perces inkubálást követően a rezorufin fluoreszcenciáját 590 nm-en POLARStar OPTIMA fluoriméterrel 60 percig, percenkénti leolvasással detektáltuk. A Nox4 gátlásához 1 µM DPI-t is adtunk az inkubációs H-médiumhoz.

3.9 Statisztika

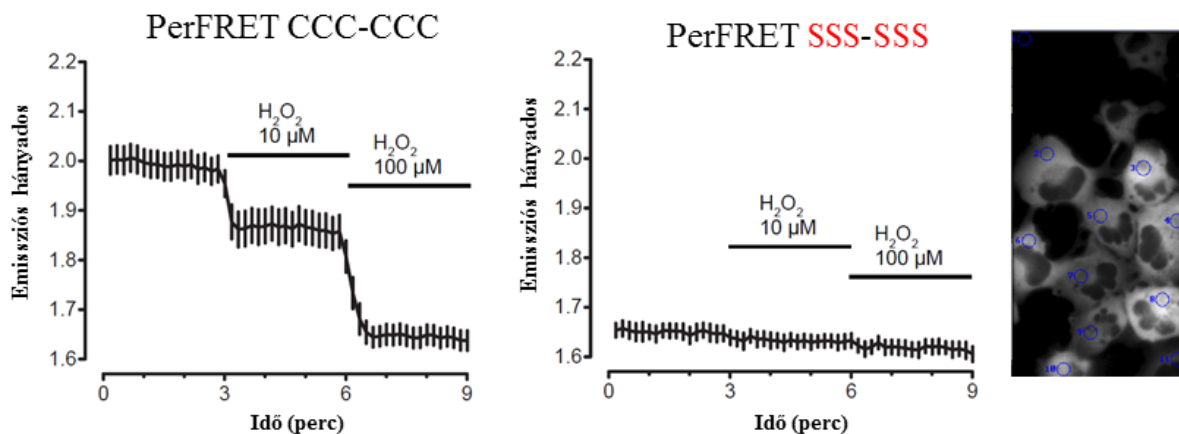
Kísérleteinket minden esetben minimum három alkalommal végeztük el, az adatokat átlag ± standard hiba formában ismertettük. Statisztikai értékelésekhez Sigmaplot 13.0 Software-t alkalmaztunk, amelyben a csoportok közötti különbségeket Student-féle t-próbával vagy Mann-Whitney-U teszttel ellenőriztük. Szignifikánsnak a 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük, Student-féle t-próbák esetén a szignifikancia küszöböt Bonferroni korrekcióval is ellenőriztük.

4. Eredmények

4.1 A PerFRET szonda karakterizálása

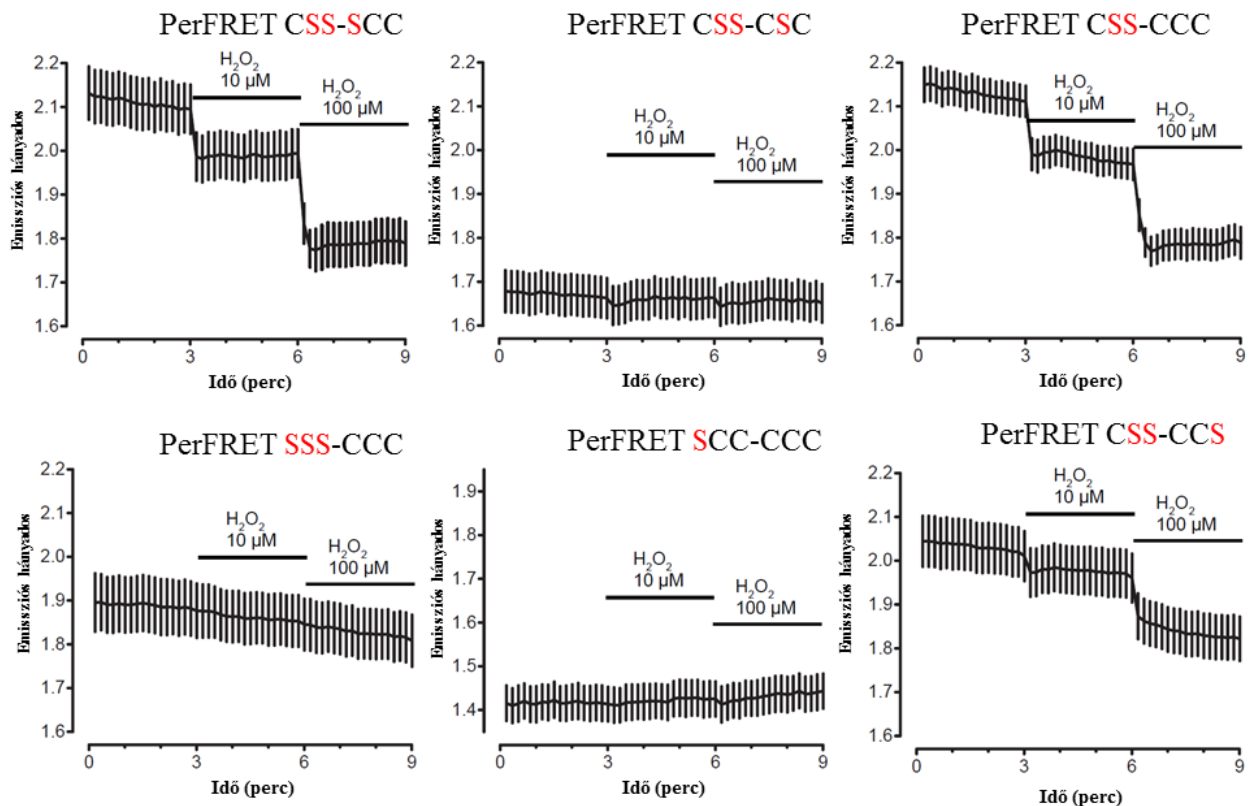
Munkámat kutatócsoportunkban Dr. Enyedi Balázs által készített új, FRET alapú intracelluláris H_2O_2 szondák karakterizálásával kezdtem. Az általa létrehozott szenzorok lehetőséget nyújtanak, hogy FRET technikával, fiziológiás koncentrációtartományban, valós időben detektálhassuk az intracelluláris H_2O_2 szintet. Hidrogén-peroxid specifikus, amely az Orp1 és Yap1 cCRD közötti intramolekuláris diszulfid hidak kialakulásával járó konformációváltozáson alapul, amely a fuzionáltatott donor és akceptor fluorofórok a PerFRET-ben érdekes módon távolodnak, így a FRET hányadosa csökken.

Annak érdekében, hogy jobban megértsük a szonda működését, megvizsgáltuk mely ciszteinek felelősek a PerFRET esetén a H_2O_2 -ra adott specifikus válaszáért, ezért elkészítettünk a CRD doménekben előforduló összes cisztein aminosav szerinre cserélt változatát és fontosabb kombinációit. A PerFRET-ben a hidrogén-peroxid hatására kialakuló diszulfid hidak az Orp1 fehérjében található 3db (36,64,82-es pozíciókban, alábbiakban is ezt ábrázoltam elől) és a Yap1 cCRD doménjében szintén 3db (598,620,629-es pozíciókban) cisztein között jöhet létre. A szondákat HeLa sejtekben tranziensen expresszáztattuk, majd 10-, és 100 μM H_2O_2 hozzáadásával teszteltük válaszkészségüket az eredeti PerFRET és az összes cisztein mutálásával létrehozott kontrollhoz PerFRET-hez hasonlítva (23. ábra).



23. ábra: A PerFRET és az összes cisztein szerinre cserélt kontroll PerFRET szonda FRET hányadosai: HeLa sejtekben expresszált PerFRET PerFRET SSS-SSS 535/480 nm-en detektált emissziójának időgörbéi 10- és 100 μM H_2O_2 -ot követően, illetve egy mikroszkópos látótér képe, ahol a mérés során a kék körökben detektáltuk az egyik hullámhosszon a sejtek emisszióját (16-45 sejt, átlag \pm SEM ábrázolva).

HeLa sejtekben a PerFRET szonda összes variánsa megfelelően kifejeződött, mindegyik változat citoszólikus lokalizációt mutatott, amelyet magyaráz a Yap1 fehérje cCRD doménjében található nukleáris export szignál szekvencia jelenléte. Az alábbi egyszeres és többszörös mutációkat készítettük el, hogy megállapíthassuk mely ciszteinek esszenciálisak a PerFRET funkciójához szükséges diszulfid hidak kialakításához (24. ábra).



24. ábra: A PerFRET szonda cisztein mutált oldalláncainak analízise: HeLa sejtekben expresszált, egyszeresen és többszörösen mutált szondák 535/480 nm-en detektált emissziójának időgörbéi. Stimulációként 10- és 100 μM H_2O_2 -ot adtunk (16-45 sejt, átlag \pm SEM).

A 24. ábrán látható, hogy az Orp1 és 36-os pozíciójú cisztein mutálása elegendő volt a PerFRET teljes funkcióvesztéséhez. A C64S és C82S variánsok alapján a második és harmadik cisztein az Orp1-ben nem esszenciális. A Yap1 cCRD középső cisztinjével az Orp1 36-os ciszteinjével interakcióba lép, a másik két Yap1 cCRD mutálása nem okozott zavart a H₂O₂ érzékelésben.

A Yap1 cCRD domén 598-as és 629-es pozíciójú ciszteinje sem bizonyult esszenciálisnak a H₂O₂ érzékeléshez a PerFRET-ben. Az alábbi 5. táblázatban foglaltam össze a PerFRET szonda mutációit és reakcióképességét.

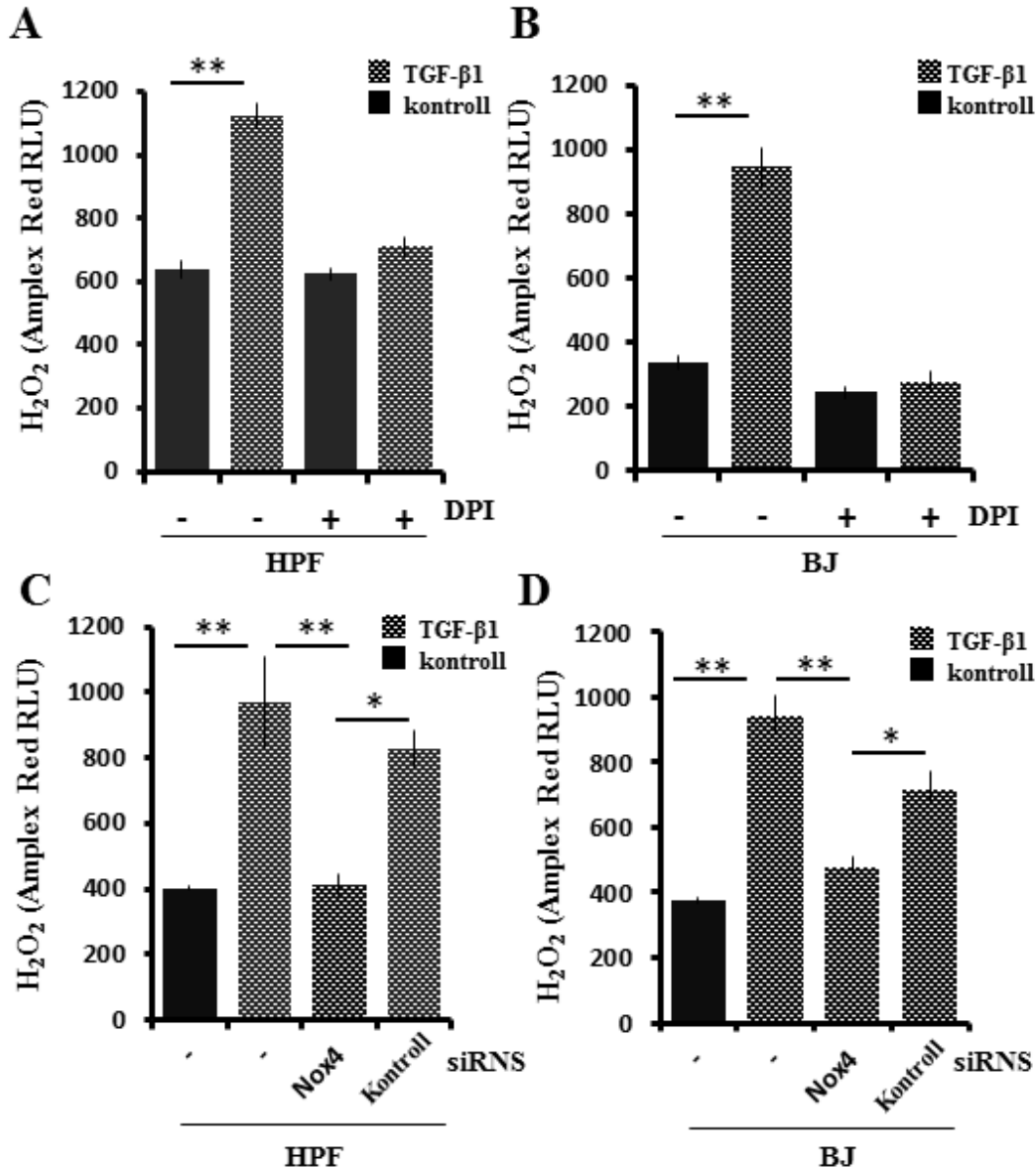
	Reakciókészség	Mutáció az Orp1 doménben	Mutáció az cCRD doménben
PerFRET ^{CCC - CCC}	++	-	-
PerFRET ^{CSS - CCC}	++	C64S, C82S	-
PerFRET ^{SSS - CCC}	nincs	C36S, C64S, C82S	-
PerFRET ^{SCC - CCC}	nincs	C36S	-
PerFRET ^{CSS - SCC}	++	C64S, C82S	C598S
PerFRET ^{CSS - CSC}	nincs	C64S, C82S	C620S
PerFRET ^{CSS - CCS}	+	C64S, C82S	C629S
PerFRET ^{SSS - SSS}	nincs	C36S, C64S, C82S	C598S, C620S, C629S

5. táblázat: A PerFRET mutációinak és reakcióképességének összefoglaló táblázata: A PerFRET szondában található Orp1 és Yap1 cCRD cisztein mutáció, illetve válaszkészsége 10- és 100 µM H₂O₂ stimulust követően. A PerFRET szintjét jelöltem ++ jelöléssel, illetve +-t kapott az a szonda, amely csökkent mértékben, de válaszolt a H₂O₂-ra.

4.2 TGF-β1 H₂O₂ termelést indukál humán pulmonáris és dermális fibroblaszt sejteken

Több munkacsoport is igazolta már, hogy a Nox4 TGF-β1 hatására indukálódik, H₂O₂-ot termel bőr és tüdő eredetű fibroblasztokban, illetve TGF-β1 stimulus jelenléte a szövetek fibrotikus elváltozása során is gyakori (77, 373). Megvizsgáltuk, hogy TGF-β1 kezelés hatására dermális és pulmonáris fibroblasztokban megjelenik-e H₂O₂ a sejtek extracelluláris terében. Ehhez szérum depléciót követően TGF-β1-gyel indukáltuk 24 órára a fibroblaszt sejteket, majd 60 percig Amplex Red módszerrel mértük a termelődő H₂O₂ szintjét kontroll és a mérés során DPI-vel kezelt sejteken. Kis mennyiségben a DPI általánosan használt, nem-specifikus Nox gátlószer, mely FAD-ról elektront képes elvonni, ezúton megszakítva az elektrontranszport

láncot (374, 375). Ugyanezen körülmények között kontroll kísérletként a sejtvonalakban csendesítettük a Nox4 expressziót Nox4 elleni specifikus és kontroll siRN-sel (25. ábra).

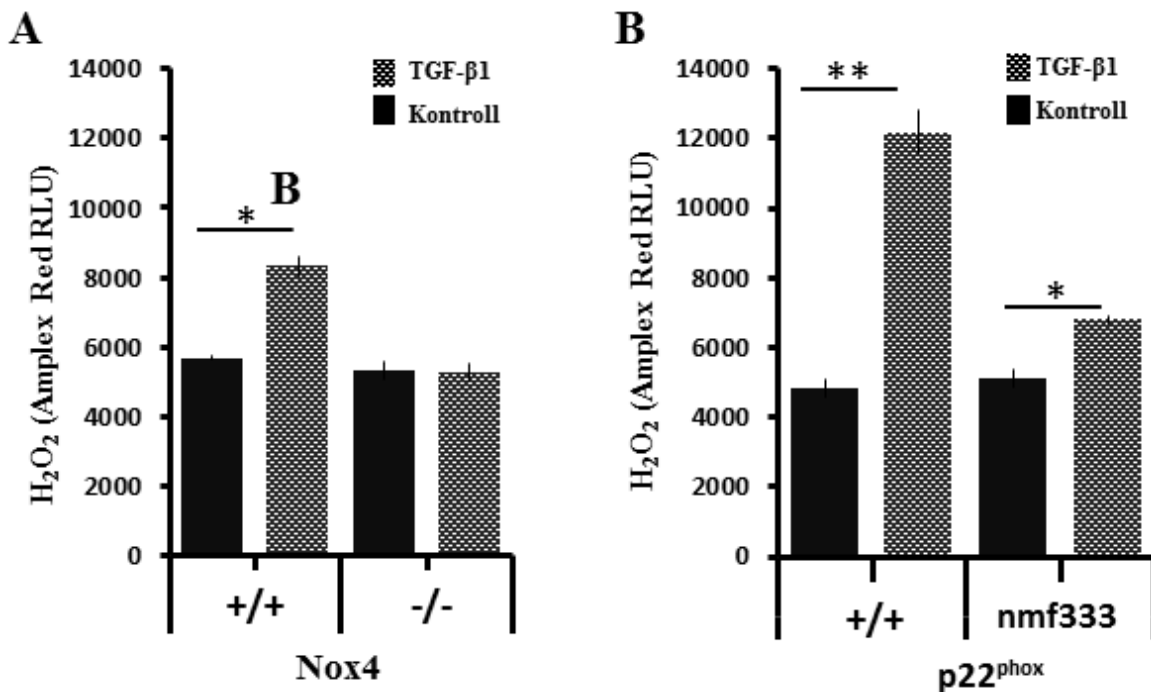


25. ábra: TGF-β1-gyel kezelt humán pulmonáris (HPF) és dermális (BJ) fibroblasztok H₂O₂ termelése: A sejteket szérum depléciót követően 5 ng/mL TGF-β1-gyel kezeltük 24 óráig, majd Amplex Red reagenssel mértük a termelődő H₂O₂ szintjét az extracelluláris térben HPF(A) és BJ (B) esetén. A Nox4 enzim gátlására 1 μM DPI-t alkalmaztunk a mérés során. HPF (C) és BJ (D) sejteket előkezeltünk Nox4 specifikus és kontroll siRNS-sel, majd mértük Amplex Red méréssel a termelődő H₂O₂-ot TGF-β1 indukciót követően. (n=3, ±SEM, *P<0.001, **P<0.002)

Az extracelluláris térben humán pulmonáris és dermális fibroblasztokban a TGF- β 1 stimulus szignifikánsan növelte a H₂O₂ termelődést. A H₂O₂ termelés gátolható volt DPI-vel és Nox4 elleni specifikus siRNS-sel, tehát az extracelluláris térben megjelenő H₂O₂ a Nox4 aktivációjához köthető.

4.3 A Nox4-, és p22^{phox}-deficiens egerek TGF- β 1 indukciót követő H₂O₂ termelése

Tisztázni szeretnénk volna, hogy a fibroblasztokban megjelenik-e H₂O₂ termelés valamelyik oxidáz komponens hiányában is. 8 hetes, Nox4 KO, p22^{phox}-deficiens, illetve vad típusú társaikból farokvég fibroblaszt sejteket preparáltunk, majd szérum depletáltuk a tenyészetet és 24 óráig TGF- β 1-gyel kezeltük. A sejtek extracelluláris terében Amplex Red módszerrel mértük a termelődő H₂O₂ mennyiségét:

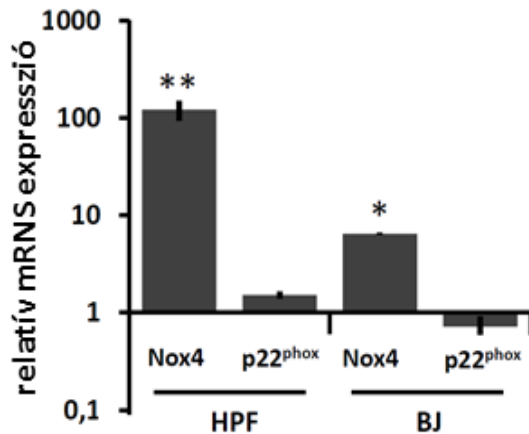


26. ábra: Nox4-, és p22^{phox}-deficiens egerek H₂O₂ termelése TGF- β 1 indukciót követően: 8 hetes vad típusú és Nox4(A) vagy p22^{phox} (B) mutáns egerek farokvégeiből izolált fibroblaszt sejteket kezeltünk szérum depleciót követően TGF- β 1-gyel, majd Amplex Red teszttel mértük a H₂O₂ megjelenését az extracelluláris térben. (n=3, \pm SEM, *P<0.001, **P<0.002)

Méréseink alapján a vad típusú fibroblasztok esetén a TGF- β 1 kezelés indukálta a H₂O₂ termelést, szignifikáns különbséget mutatva a kontroll sejtekhez képest. A Nox4 knockout eredetű sejtekben az indukciót nem követte H₂O₂ termelés, míg a p22^{phox}-deficiens sejtvonal esetén maradt egy kis reziduális H₂O₂ termelés. A csökkent H₂O₂ megjelenését okozhatja a kis mértékű p22^{phox} expresszió, ami a gén Y121H aminosav cseréjéből eredő instabil p22^{phox} fehérjét eredményezi, mely a Nox4-gyel alkothat instabil, kis mennyiségű funkcionális komplexet. Megfigyeléseink alapján a Nox4 és a p22^{phox} együttes jelenléte esszenciális a NADPH oxidáz aktivitásához.

4.4 A p22^{phox} és Nox4 mRNS expressziós szintjei primer fibroblasztokban

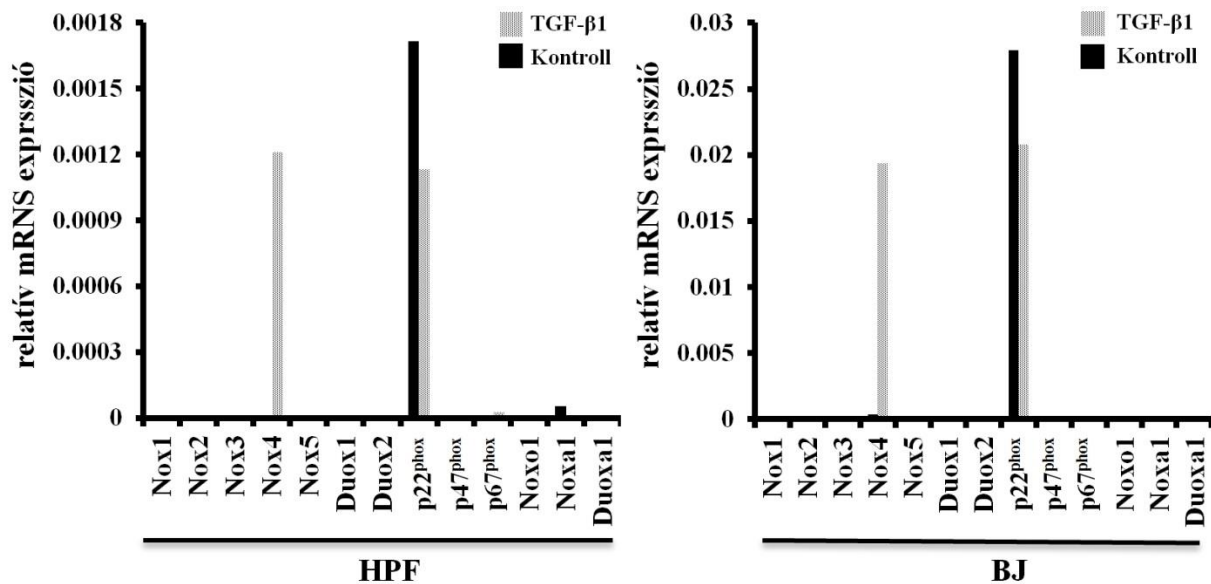
Kísérleteinknek ebben a fázisában még nem volt elég információnk arról, hogy a Nox4 komplex aktivitásának csökkenése a fehérjék expresszió-csökkenése, instabilitása okozza-e, hogy a komplex szabályzása transzkripció vagy transzláció szinten valósul meg. A kérdés megválaszolásához megvizsgáltuk, hogy a TGF- β 1 indukciónak van-e transzkripció szinten hatása a p22^{phox} és Nox4 mRNS-ek mennyiségére. Ehhez BJ és HPF fibroblasztokat indukáltunk 24 órás TGF- β 1 kezeléssel, majd teljes RNS-t izoláltunk belőlük, cDNS-sé írtunk át, és QPCR reakcióban mértük a relatív expressziós szintjüket (27. ábra).



*27. ábra: p22^{phox} és Nox4 relatív mRNS szintjei TGF- β 1 kezelést követően HPF és BJ fibroblasztokban. 24 órás TGF- β 1 indukciót alkalmaztunk kontroll DMSO kezelés mellett HPF és BJ sejteken, melyekből teljes RNS-t izoláltunk, cDNS-sé írtuk át, majd QPCR segítségével meghatároztuk a p22^{phox} és Nox4 mRNS szinteket. A kontrollként kezelt sejtek expressziós szintjeit tekintettük 1-nek (n=3, \pm SEM, *P<0.001, **P<0.002.)*

Az Nox4 és p22^{phox} relatív expressziós szintjét a kontroll, DMSO kezelést kapott sejtek mRNS szintjeihez hasonlítottuk, a nyugalmi expressziós szinteket tekintettük 1-nek. A sejtvonalakban a Nox4 mRNS mennyisége TGF- β 1 kezelés hatására a nyugalmi szintekhez képest szignifikánsan emelkedett, ezzel ellentétben a p22^{phox} mRNS mennyiségét nem befolyásolta a TGF- β 1 kezelés.

Egyéb sejt típusokról, például makrofágokról vagy endothél sejtekről ismert, hogy kifejeznek más Nox rendszereket is, amelyek lehetséges forrásai a H₂O₂ termelésnek (1). Ennek vizsgálatára a humán pulmonáris és dermális sejtvonalainkból teljes RNS-t izoláltunk, cDNS-sé írtuk át. QPCR reakcióban ellenőriztük kontroll sejteken és TGF- β 1 indukciót követően, hogy expresszálódik-e más NADPH oxidáz.



28. ábra: Nox/Duox oxidázok és regulátoraik relatív mRNS szintjei TGF- β 1 kezelést követően HPF és BJ fibroblasztokban: 24 órás TGF- β 1 indukciót alkalmaztunk HPF és BJ sejteken, melyekből teljes RNS-t izoláltunk, cDNS-sé írtuk át, majd QPCR segítségével meghatároztuk a különböző NADPH oxidáz komponensek mRNS szintjeit. A kontroll β -aktin mRNS mennyiségre normalizált értéket ábrázoltuk (n=3).

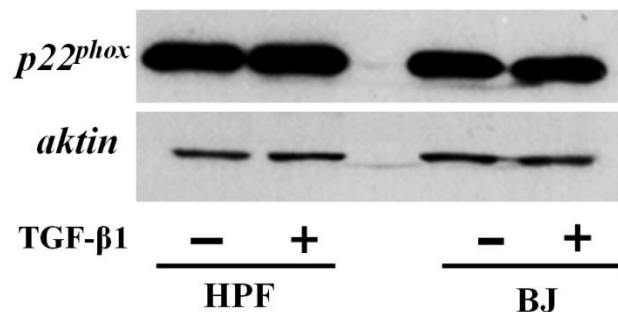
Az eredményeink alapján ezen humán primer bőr és tüdő eredetű fibroblaszt sejtek nagy valószínűséggel nem rendelkeznek más NADPH oxidáz rendszerrel. A p22^{phox} mRNS-e indukciótól függetlenül is jelen van, de a Nox4 expressziója is csak indukciót követően

kimutatható. Kizárólag az indukálatlan HPF sejtekben a p67^{phox} egy szerkezeti analógja, a Noxa1 is nagyon késői ciklusban, de megjelent. Ha specifikus jelet tapasztaltunk, mennyisége valószínűleg nagyon kismértékű, kevésbé valószínű, hogy fiziológias szerepe lenne a Nox4 esetében, mert a Noxa1 a Noxo1-gyel, a p47^{phox} analógjával lép interakcióba, mely 40 ciklus alatt sem adott jelet a QPR reakcióban. A Noxo1 a Nox1 esetében szintén a p22^{phox} PxxP-motívumánál kötődik, de ellentétben a Nox1-gyel ezen prolin gazdag régió eltávolítása nincs befolyással a Nox4 aktivitására (1), valamint a Nox4-gyel ko-expresszáltatva p47^{phox}/p67^{phox} vagy a Noxo1/Noxa1 regulátorokat, a Nox4 ROS termelésére nem volt hatásuk (67, 91).

A Nox4 expressziója csak indukciót követően kimutatható, primer humán fibroblasztokban a Nox4 gén átírása transzkripciós nyomás nélkül nincs detektálható mennyiségben, viszont a p22^{phox} mRNS-e az indukciós hatástól független. Az alapján, hogy mRNS-e indukció hiányában nem detektálható, nem valószínű, hogy a Nox4 akut válaszra lenne képes.

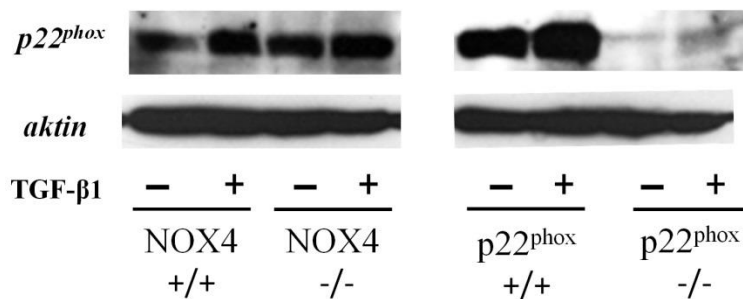
4.5 p22^{phox} fehérje mennyiségi meghatározása

Szerettük volna megvizsgálni, hogy a p22^{phox} fehérje mennyisége függ-e a Nox4 expressziójától, illetve a TGF- β 1 kezeléstől. Ehhez primer BJ és HPF sejt vonalakat kezeltünk 24 óráig TGF- β 1-gyel és kontroll DMSO oldattal, majd feltártuk a sejteket és Western Blot kísérletben ellenőriztük a p22^{phox} fehérje mennyiségét (29. ábra). Ezt kollaborációs partnerünk által a rendelkezésünkre bocsátott monoklonális p22^{phox} (16G7) elleni antitest tette lehetővé (371), viszont a Nox4 ellen nem állt rendelkezésünkre specifikus antitest, így fehérje mennyiségét nem tudtuk nyomon követni.



29. ábra: HPF és BJ sejtek TGF- β 1 indukció hatásának vizsgálata a p22^{phox} fehérje expressziójára Western Blot kísérletben. 25 cm²-es tenyésztőtálra szélesztett, konfluens HPF és BJ fibroblasztokat szérumban depletáltuk majd 24 óráig TGF- β 1-gyel kezeltük. A sejteket RIPA pufferben feltártuk, Western Blot technikával feldolgoztuk, majd a membránt p22^{phox} és aktin elleni antitesttel hívtuk elő (Reprezentatív ábra).

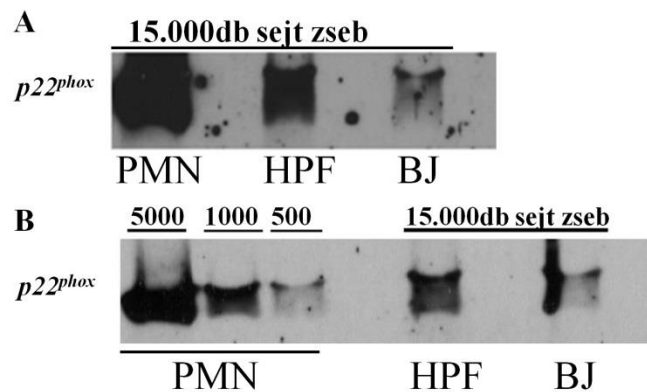
Ezen fibroblaszt sejtek p22^{phox} fehérje mennyiségét változatlanok találtuk a TGF- β 1 kezeléstől függetlenül. Következő lépésként Nox4 KO, p22^{phox}-deficiens és vad típusú egértörzsekből izolált farok fibroblasztok p22^{phox} fehérje mennyiségét vizsgáltuk meg a szokásos szérumban depleciót követő TGF- β 1 és kontroll kezelés után. Szintén 8 hetes egér farokvégből preparáltunk fibroblaszt sejteket, amelyet pár nap növesztés után TGF- β 1 kezeléssel indukáltunk, majd Western blot kísérlettel tettük láthatóvá a p22^{phox} fehérje expresszióját (30. ábra).



30. ábra: Nox4 KO, p22^{phox}-deficiens és vad típusú egértörzsekből izolált farok fibroblasztok p22^{phox} fehérje expressziója. 8 hetes Nox4 KO, p22^{phox}-deficiens nmf333 és vad típusú egértörzsek farokvégből fibroblaszt sejteket izoláltunk, majd TGF- β 1-gyel 24 óráig kezeltük, és Western Blot kísérlethez feldolgoztuk, a membránt β -aktin és p22^{phox} (16G7) elleni antitesttel hívtuk elő. (Reprezentatív ábra).

Mindkét vad típusú- és a Nox4 KO egerekben a p22^{phox} fehérje kimutatható volt, szignifikáns különbséget mennyiségükben Nox4 hiányában, illetve a TGF- β 1 kezelés után sem tapasztaltunk. A p22^{phox}-deficiens nmf333-ban minimális szinten detektálható volt a p22^{phox} fehérje, amelynek jelenlétét Amplex Red kísérleteinkben is láttuk a TGF- β 1 indukciót követő kis mennyiségű H₂O₂ termelésben. Ezen eredmények alapján a Nox4 jelenléte vagy a TGF- β 1 indukció nem befolyásolja a p22^{phox} fehérje expresszióját a fibroblasztokban.

Kíváncsiak voltunk, hogy jobban karakterizált NADPH oxidáz rendszerekhez hasonlítva kvantifikálható-e és a humán primer fibroblaszt sejtek által termelt p22^{phox} mennyisége összemérhető-e más, p22^{phox}-partnerrel együttműködő Nox rendszerrel. Ehhez a poli-morfonukleáris (PMN) neutrophil granulocita sejtek NADPH oxidáz 2 rendszerét hívtuk segítségül. Elsőként minden sejttypusból azonos mennyiséget dolgoztunk fel a Western blot kísérlet során, majd megpróbáltuk a PMN sejtekből készített hígítási sor mellett kititrálni a p22^{phox} mennyiségét (31. ábra) (376).

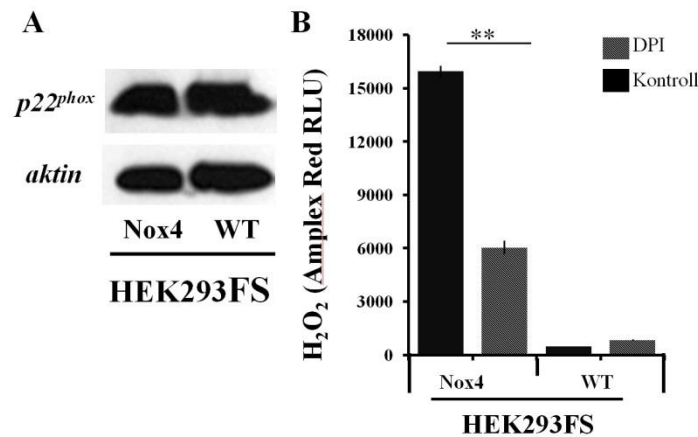


31. ábra: A p22^{phox} fehérje mennyiségi összehasonlítása: 15000 db sejtet dolgoztunk fel HPF és BJ sejtekből, melyeket RIPA pufferben feltárva Western blot kísérletben p22^{phox} elleni antitesttel hívtunk elő. Kontrollként azonos mennyiségű PMN sejtet töltöttünk a zsebekbe, melyet intézetünkben Dr. Csépanyi-Kömi Roland készített elő (A). Az ábra alsó részén látható Western blot kísérletben a humán fibroblasztokból szintén 15000db sejtet vizsgáltunk PMN sejtekből készített hígítási sor mellett. A membránt p22^{phox} elleni antitesttel hívtuk elő (B) (Reprezentatív ábra).

A p22^{phox} fehérje expressziója a bőr és tüdő eredetű fibroblasztokban jelentősen alacsonyabbnak bizonyult a PMN sejtek membránjában expresszálódó Nox2 rendszert stabilizáló p22^{phox} mennyiségéhez képest. A pulmonáris fibroblasztok több p22^{phox} fehérjét expresszáltak, mint a dermális fibroblasztok, de 1:1-es heterodimerképzést feltételezve p22^{phox}-szal a Nox4 komplex predikálható mennyisége mindkét sejt vonalban a p22^{phox} fehérje mennyisége valószínűsíthetően sokkal alacsonyabb, mint a PMN sejtek Nox2 rendszere.

Laborunkban Dr. Donkó Ágnes korábban készített Nox4-et stabilan expresszáló HEK293FS sejt vonalat, melyben megvizsgáltuk, hogy Nox4 expresszió befolyásolja-e a p22^{phox}

fehérje mennyiségét. A Nox4 rendszer aktivitását H_2O_2 termelés útján ellenőriztük Amplex Red méréssel, melyet a 32. ábrán mutatok be.



32. ábra: HEK293FS sejtvonalak p22^{phox} expressziója és H₂O₂ termelése: Konfluens Nox4-et stabilan expresszáló és kontroll HEK293FS sejteket RIPA pufferes feltárást követően Western blot kísérlet során p22^{phox}- és kontrollként aktinra hívtuk elő a membránt (A). 12-lyukú tenyésztő tálra szélesztett konfluens tenyészet H₂O₂ termelését Amplex Red reakcióban mértük 60 percig. A komplex gátlására 1 uM DPI-t kezelést alkalmaztunk (n=3, ±SEM, **P<0.002)

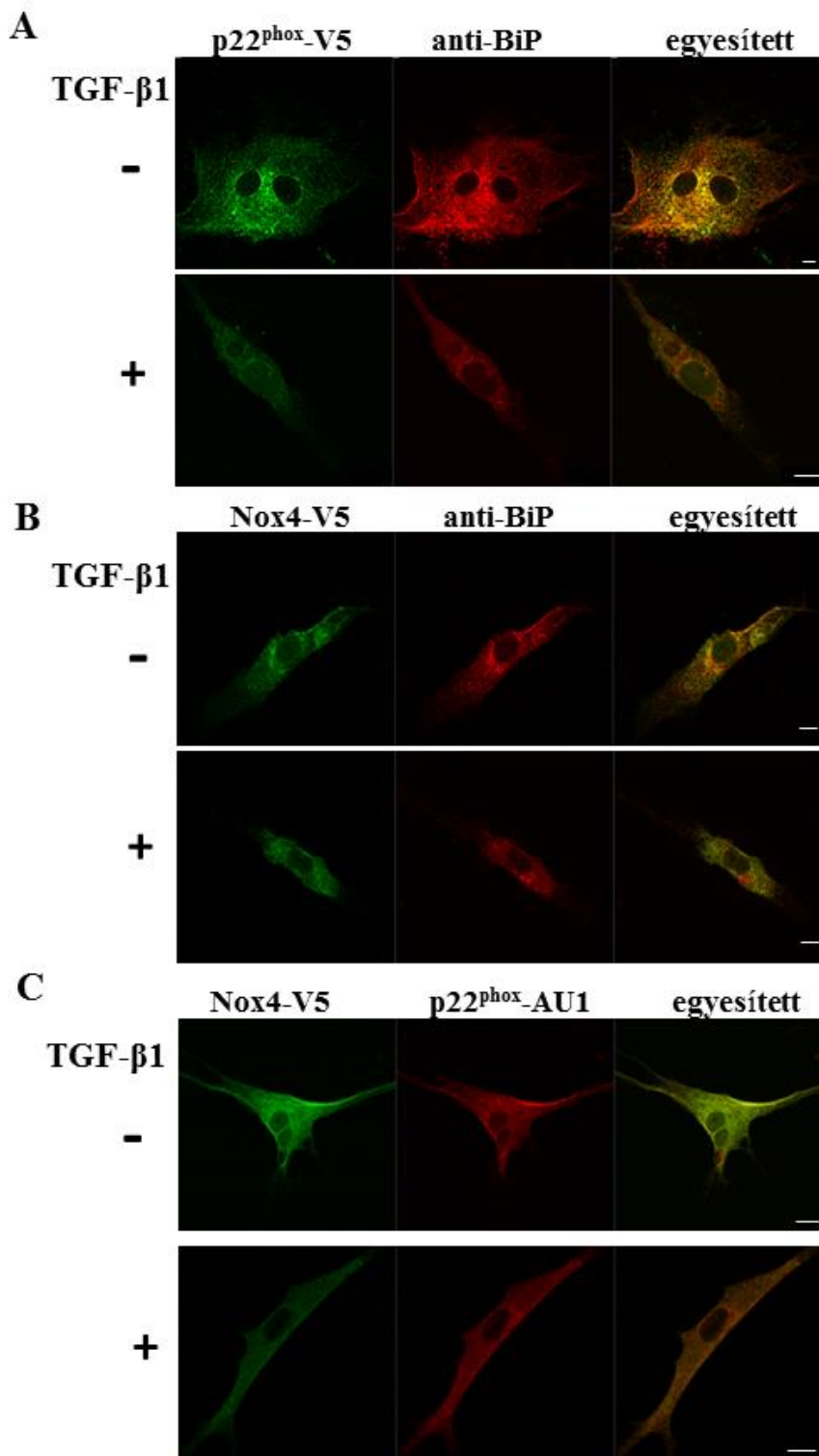
Nem találtunk szignifikáns különbséget a Nox4-gyet stabilan expresszáló és kontroll sejtek p22^{phox} fehérje mennyiségében. A Nox4 rendszer heterológ expressziós rendszerben is konstitutívan aktívnak tűnt, a H₂O₂ termelés DPI inhibítorral gátolható volt, valamint a HEK293FS sejtek Nox4 transzfekció nélkül nem képesek H₂O₂ termelésre.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy primer humán bőr és tüdő eredetű fibroblasztokban a Nox4 jelenléte vagy a TGF-β1 indukció nem befolyásolja a p22^{phox} fehérje expresszióját. Hasonlóképpen a Nox4 KO egerek fibroblasztjaiban is megtalálható a p22^{phox} fehérje, mennyisége vad típusú társaikból izolált fibroblasztokban is hasonló mennyiségben jelenik meg, TGF-β1 kezeléstől függetlenül. A p22^{phox} fehérje mennyisége a primer fibroblasztokban kevesebb, mint a PMN sejtekben, így valószínűsíthetően a Nox4 komplex is alacsonyabb mennyiségben van jelen, mint a Nox2 a PMN sejtekben. A Nox4 jelenléte HEK293FS sejtekben nem befolyásolta a p22^{phox} fehérje mennyiségét, vele komplexet képezve a sejtek H₂O₂-ot termeltek.

4.6 Sejten belüli lokalizációs vizsgálatok

4.6.1 *Nox4 és p22^{phox} szubcelluláris lokalizációja dermális fibroblasztokban*

Annak vizsgálatára, hogy primer fibroblasztok mely szubcelluláris kompartmentben fejezik ki a Nox4-p22^{phox} komplexet, a Nox4-et V5-epitóppal, míg a p22^{phox}-ot V5-, illetve AU1-epitópokkal jelöltük meg és transziens módon transzfektáltuk dermális fibroblasztokba. TGF- β 1 indukciót is alkalmaztunk, hogy nyomon követhessük, ha az indukció hatására differenciálódó fibroblasztokban változik-e a komplex lokalizációja. Az indukciót követően immunfestéssel tettük láthatóvá a fehérjék elhelyezkedését. ER markerként az endoplazmás retikulum lumenális térben expresszálandó BiP (Binding immunoglobulin protein, GRP-78) hőszokkfehérjével együttes immunfestést alkalmaztunk (33. ábra) (377, 378).



33. ábra: A Nox4 és p22^{phox} fehérjék szubcelluláris lokalizációja dermális fibroblasztokban: Tranziensen transzfektált, permeabilizált BJ sejtek konfokális mikroszkópos ábrája, ahol V5-epitóra specifikus immunfestéssel jelöltük a p22^{phox} (A) és Nox4 (B) fehérjét az

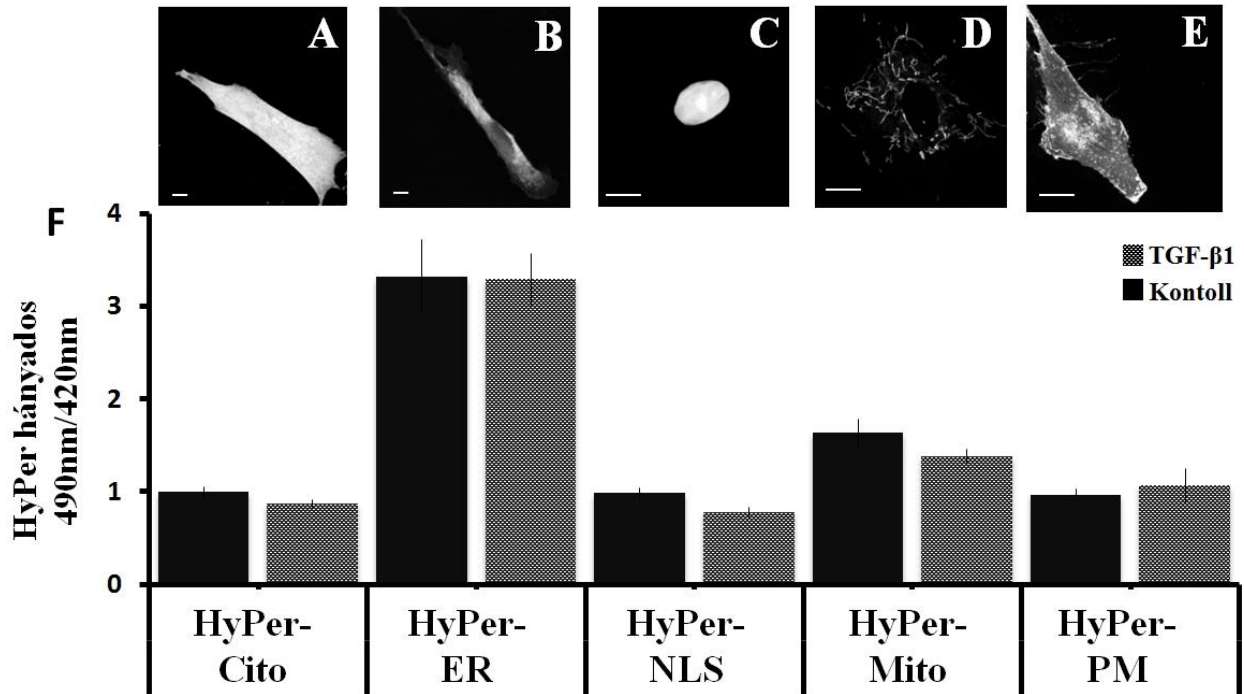
ER rezidens, endogén BiP hőszokkfehérje mellett, illetve ko-expresszáltattuk a Nox4-V5-tel jelölt fehérjét AUI-epitóppal jelölt p22^{phox}-szal(C) majd immunfestéssel tettük láthatóvá festődésüket. A sávok 10 μ m-et jelölnek (Reprezentatív ábra).

Az általunk készített konfokális mikroszkópos képek alapján arra következtettünk, hogy a heterológ rendszerünkben epitóppal jelölt Nox4 és p22^{phox} fehérjék kolokalizálnak. Az ER markerként alkalmazott BiP fehérjével is közös festődést mutatott V5-tel jelölt p22^{phox} és Nox4 fehérje, emellett nem tapasztaltunk egyéb nukleáris vagy mitokondriális festődést jelen kísérleti beállítások mellett. A TGF- β 1 kezelés ebben a kísérleti felállásban nem befolyásolta a komplex szubcelluláris lokalizációját indukció nélkül is az ER membránjában található.

4.6.2 BJ fibroblasztokban H₂O₂ szintek nyomon követése HyPer szenzorral

Az előző eredmények alapján a Nox4 és p22^{phox} az ER membránjában expresszálódik, majd ehhez kapcsolódóan felvetődött, hogy az indukált Nox4 rendszer által termelt H₂O₂ megjelenik-e valamely intracelluláris kompartmentben. Az OxyFRET és PerFRET szondák azon változata, melyet az endoplazmás retikulumba irányítottunk nem veszi fel aktív konformációját, így az ER lumenális oldalán nem tudtam alkalmazni őket. Ezért a HyPer1 szonda használatát választottuk az intracelluláris H₂O₂ mérésekhez, noha érzékenyebb a pH-ra és pontatlanabb mint a FRET-alapúak, de minden kompartmentben alkalmazható. A kísérlethez tranziens módon transzfektáltunk dermális fibroblasztokat különböző sejtalkotókba irányított HyPer1 szenzorral. Irányító szekvenciákként a sejtmagi expresszióhoz (HyPer-NLS) az SV40 T-antigén nukleáris lokalizációs szignálját használtuk háromszoros ismétlődésben, a plazmamembránba targetált változathoz (HyPer-PM) a humán K-Ras C-terminális CAAX-doménjét, az ER lumenális terébe irányított HyPer1-et (HyPer-ER) az egér Vh-lánc ER-irányító szekvenciája és egy KDEL retenciós szignálja közé illesztve juttattuk be.

Mérést megelőzően a dermális fibroblasztokat szérum depletáltuk, majd 24 óráig TGF- β 1-gyel indukáltuk. Indukciót követően konfokális mikroszkóppal ellenőriztük a szondák lokalizációját a sejtek különböző kompartmentjeiben. A HyPer1 szenzor oxidációs állapotát fluorimetriás úton mértük kontroll és TGF- β 1-gyel indukált sejtekben (34. ábra).



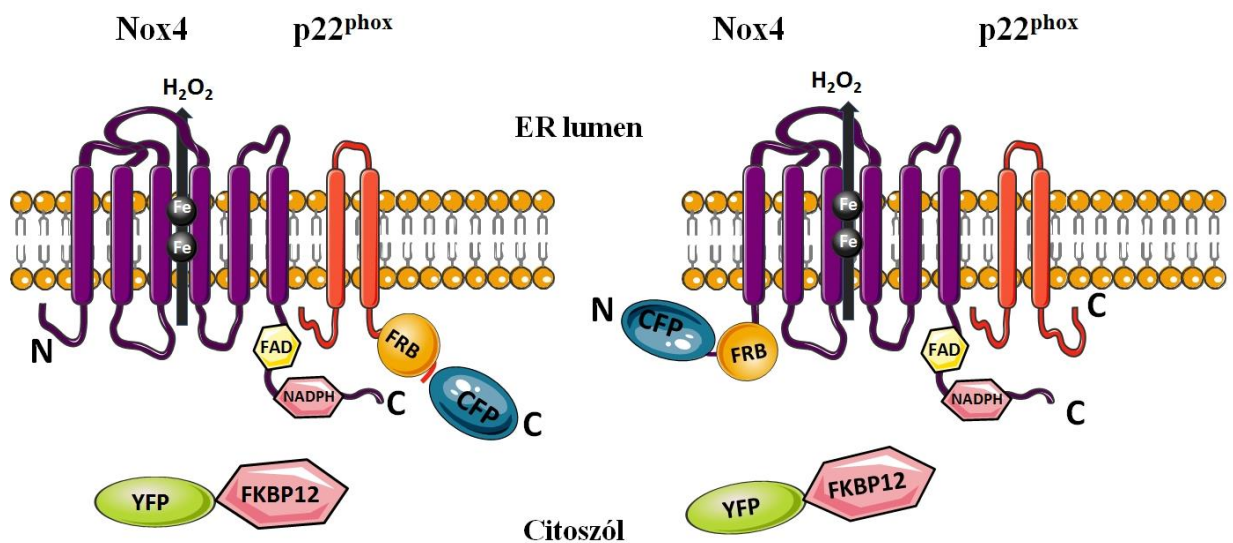
34. ábra: Intracelluláris H_2O_2 szintek mérése HyPer szondával kontroll és aktivált BJ sejteken. Mérést megelőzően szérum depletáltuk a sejteket, majd TGF- β 1-gyel indukáltuk. 24 órával az aktivációt követően konfokális mikroszkóppal ellenőriztük, hogy a tranziensen transzfektált HyPer1 szondák a citoszólban (A), az endoplazmikus retikulum luminális (ER) oldalán (B), a sejtmagban (C), a mitokondriumban (D), valamint a plazmamembránban (E) található-e. Ezt követően fluorimetriás úton megmértük a Hyper1 oxidációs állapotát (F) kontroll kezelt és TGF- β 1 indukált sejtek különböző kompartmentjeiben ($n=4, \pm SEM, *P<0.001$).

A HyPer1 szenzort sikeresen a főbb sejtalkotókba irányítottuk, szignifikáns különbséget nem találtunk a sejtalkotók oxidáltságában a kontroll és TGF- β 1 indukált sejteken. Az ER lumenében expresszált HyPer1 a kontroll sejteken is már maximálisan oxidált formában van jelen (6), így itt csak csökkenést tudunk volna detektálni, de szintjét mi változatlanak találtuk.

4.6.3 A Nox4-p22^{phox} komplexének orientációs vizsgálatai

A kísérleteink alapján a heterológ expressziós rendszerünkben az ER membránjában detektáltuk a Nox4 és p22^{phox} fehérjéket. A HyPer1 szenzoros vizsgálatokban nem láttuk jelét a komplex rendszer által termelt H₂O₂-nak. Az ER membránjában összeépülő komplex a H₂O₂-t termelheti a luminális tér felé vagy a citoszól irányába. Jelenlegi topológiai ismereteink szerint a p22^{phox} és Nox4 N-, és C-terminális vége is a membrán ugyanazon felszínén található. Várnai professzor segítségével építettünk egy kémiaailag indukálható, heterodimerizációs rendszert, ahol az FKBP12 fehérje, az mTOR kináz rapamicin-kötő doménjével, az FRB-vel rapamicin jelenlétében gyors transzlokációval komplexet formál (372).

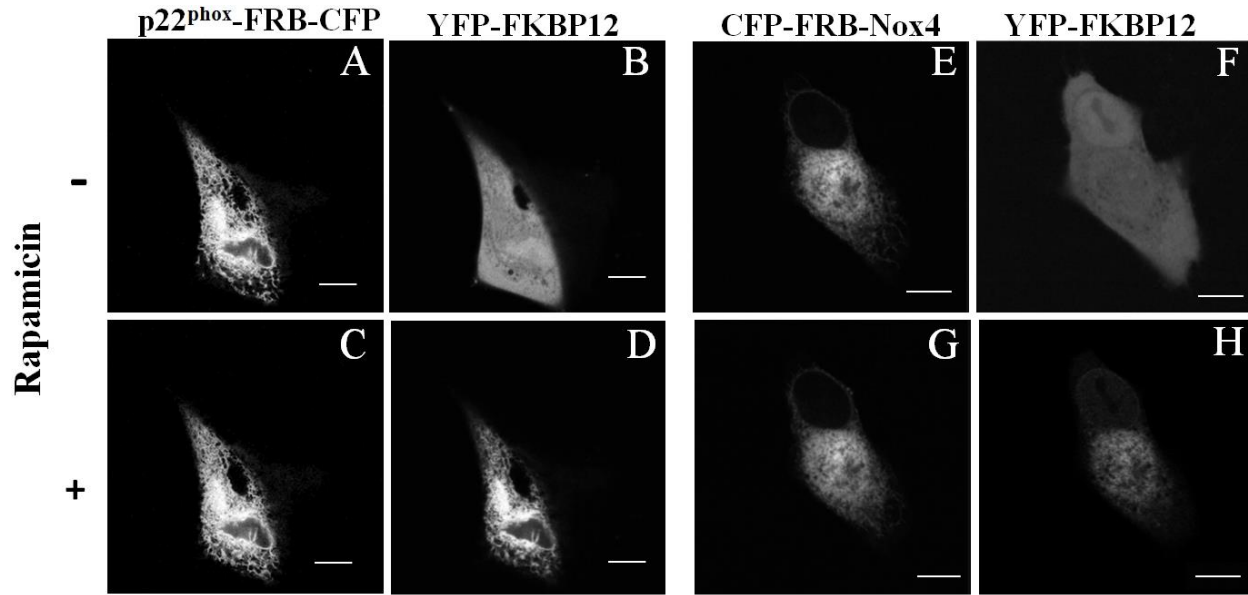
A dimerpár FRB tagját a Nox4 N-terminális, illetve a p22^{phox} C-terminális végéhez illesztettük, a dimerképzők mozgásának láthatóvá tételéhez az FRB molekulához egy Cerulean (CFP) fluoreszcens fehérjét, a citoszólban kifejeződő FKBP12 fehérjéhez pedig sárga (YFP) fluoreszcens fehérjét kötöttünk (35. ábra). A plazmid konstrukciók elkészítését a Módszerek c. fejezetben ismertettem.



35. ábra: Rapamicin alapú indukciós rendszer sematikus rajza: A Nox4 fehérjére N-terminális, a p22^{phox} fehérjére C-terminális oldalra illesztettük rá a dimerizációs pár FRB doménjét CFP fluoreszcens fehérjével jelölve. Transziensen kotranszfektáltuk a sárga

fluoreszcens fehérjével fuzinált FKBP12 domént, mely rapamicin nélkül a citoszólban expresszálódik.

Konfokális mikroszkóppal készítettünk képeket a tranziensen transzfektált sejtekről rapamicin hozzáadását megelőzően és azt követően, melyet a 36. ábrán mutatok be.



36.ábra: FKBP12 fehérje transzlokációja és heterodimerizációja FRB-vel rapamicin hozzáadását követően dermális fibroblasztokban. A sejtekbe tranziens kotranszfekcióval bejuttattuk a dimerizációs párokat: $p22^{phox}$ -FRB-CFP és YFP-FKBP12 (A-D) vagy CFP-FRB-Nox4 és YFP-FKBP12 (E-H). Készítettünk a 300 mM rapamicin hozzáadása előtt képeket (A-B, E-F), illetve a rapamicin hozzáadása után 3 perccel (C-D, G-H) (Reprezentatív ábra).

BJ sejtekben a rapamicin alapú indukciós rendszerünk sikeresen kifejeződött, valamint festődése alapján rapamicin hozzáadását követően a YFP-FKBP12 fúziós fehérje transzlokálódott az ER membránjához. Ezen eredmények alapján a Nox4 N-terminusa és $p22^{phox}$ C-terminális oldala térben elérhető volt dimerpár citoszólikus komponense számára, így ha a Nox4 N-terminális és $p22^{phox}$ C-terminális vége a citoszólban található, akkor a komplex H_2O_2 termelése az ER lumenális oldala felé irányul.

5. Megbeszélés

5.1 A PerFRET intracelluláris H₂O₂ szenzor karakterizálása

Ph.D hallgatóként Dr. Enyedi Balázs új FRET technikán alapuló intracelluláris hidrogén-peroxid mérőszenzoraival kezdtem meg munkámat. Az eddig elérhető intracelluláris, valós idejű genetikailag kódolt hidrogén-peroxid szenzorok számos limitációval rendelkeznek (6, 338, 358, 359), azonban a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer elve tette lehetővé, hogy a sejten belül fiziológias koncentrációtartományban történő H₂O₂ változások is dinamikusan követhetőek legyenek. Az OxyFRET és PerFRET szenzorok az Orp1, Yap1 élesztő fehérjék természetes redox relé rendszerén alapulnak, ezáltal specifikusak hidrogén-peroxidra (365), valamint kevésbé pH érzékenyek köszönhetően a módosított Venus és Cerulean fluoreszcens fehérjéknek (368). A tudományterületen elterjedt HyPer1 szenzor vagy más fluoreszcens hidrogén-peroxid mérésre alkalmas fehérjék mellett jó alternatívát jelenthetnek ezen H₂O₂ próbák pH változással járó vagy alacsony H₂O₂ koncentrációtartományban történő folyamatok monitorozására.

A PerFRET szenzor két fluorofór közé illesztett Orp1 fehérjéből, és egy rövid, merev linker szekvenciával hozzákötött Yap1 élesztő fehérje C-terminális cisztein gazdag régiójából áll. A szondák működési elve nem teljesen tisztázott, érdekes módon az oxidáció során kialakuló diszulfid hidak a fehérjében olyan konformációváltozást okoznak, melynek következtében távolodnak a fluorofórok, csökken az emissziójuk. Ezzel ellentétben az OxyFRET-ben a Yap1 nCRD és cCRD oxidációja a FRET hányados emelkedésével jár. A H₂O₂ általi oxidációra adott eltérő működési mechanizmus szintén előnyös, párhuzamosan alkalmazva őket, mint egy belső kontroll, könnyebben felismerhető, ha aspecifikus jelet detektálunk.

A PerFRET szonda működésének megértéséhez HeLa sejtekben mutációanalízissel vizsgáltam, hogy mely cisztein oldalláncok oxidációja esszenciális a funkcióhoz szükséges diszulfid hidak kialakításához. Dózisfüggően vizsgáltuk válaszkészségüket H₂O₂-ra, az eredetihez hasonlóan, a mutált szondák is a citoszólban megfelelően expresszálódtak. Tapasztalataink alapján az Orp1 első (C36) ciszteinje és a Yap1 nCRD doménjének középső ciszteinje (C620) esszenciális, szerinre cserélésük teljes funkcióvesztést okoz. *In vivo* vizsgálatok

is azt támasztják alá, hogy élesztőben eredetileg is az Orp1 C36-os ciszteinje is alakít ki intermolekuláris diszulfid hidat a Yap1 C598-as ciszteinjével (365, 379). Az Orp1 és Yap1 további két ciszteinje nem létfontosságú, de bizonyos mutáció kombinációk csökkentik a FRET hányadost, tehát a szonda maximális válaszkészségéhez szükségesek, hogy a megfelelő konformáció kialakítását további diszulfid hidakkal támogassák.

5.2 A Nox4, NADPH oxidáz jellemzése fibroblasztokban

A NADPH oxidázok családjából a Nox4 rendszert vizsgáltuk bőr-, tüdő eredetű fibroblaszt sejteken. A Nox4, melyet eredetileg vese oxidázként ismertünk meg (33, 34), az elmúlt két évtized intenzív kutatásai alapján több szövettípusban is kifejeződik, szerepet játszhat regulált ROS termelésükben (35, 68, 84, 184). Noha szinte mindegyik sejtalkotóban detektálták már a komplexet, intracelluláris elhelyezkedése, a H_2O_2 termelésének pontos helye szignalizációs szempontból is kiemelt fontosságú (89, 90, 95, 98, 143). A sokrétű, gyakran egymással látszólagos ellentétben álló eredmények megnehezítik fiziológiás, illetve pathofiziológiás szerepének megismerését, még mindig keveset tudunk szabályzásáról és árnyalódik a kép az interakciós partnereiről is (145, 380).

5.2.1 A Nox4 oxidáz TGF- β 1 hatására fibroblasztokban H_2O_2 -ot termel

Az előzetes irodalmi adatok és saját kísérleteink is igazolták, hogy a Nox4 oxidáz humán dermális és pulmonáris fibroblasztokban TGF- β 1 hatására expresszálódik, majd az extracelluláris térben szuperoxid köztitermék képződése mellett mérhető mennyiségű H_2O_2 -ot termel (62, 87, 143, 149, 381). A folyamat Nox specifikus DPI inhibitorral és Nox4-specifikus siRNS kezeléssel gátolható volt.

Először mi karakterizáltuk a TGF- β 1 Nox4-re gyakorolt hatását Nox4 KO és p22^{phox}-deficiens egérmodellek farokvég fibroblasztjaiban. A TGF- β 1 kezelést követő 24. órában a Nox4 KO egerekből származó sejteken teljes mértékben elmaradt a H_2O_2 termelés, míg a p22^{phox}-deficiens egerek farok fibroblasztjaiban maradt némi reziduális H_2O_2 termelés. A csökkent H_2O_2 megjelenését eredményezheti a p22^{phox} gén aminosav cseréjéből eredő instabil p22^{phox} fehérje jelenléte, de a termelt H_2O_2 mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a vad típusú

egerek fibroblasztjaiban. Ezen megfigyelések alapján a p22^{phox} és a Nox4 jelenléte is esszenciális a NADPH oxidáz aktivitásához. Egér primer fibroblasztokban is kimutattuk, hogy a TGF- β 1 indukció a miofibroblaszt differenciáció alatt az indukciót követő 24. órában is H₂O₂ termelést indukált, mely Nox4 eredetű.

A TGF- β 1 általában transzkripciós szintű változásokat idéz elő, mely lassabb válaszreakciókat eredményez. Egyik legfontosabb markere a fibroblasztok miofibroblasztá történő differenciációjának (238, 253). A Nox4-ről korábban leírták, hogy agonista stimulációra nem válaszol akut H₂O₂ termeléssel (145), inkább konstitutívan aktív enzim (59, 87), mely transzkripciós nyomás fokozódásával aktiválódik (191, 218, 219). Megvizsgáltuk, hogy a TGF- β 1 kezelésnek milyen hatása van a Nox4 és a p22^{phox} transzkripciójára QPCR reakcióban. Nyugalmi környezetben, indukáló hatás nélkül a humán primer bőr és tüdő eredetű fibroblasztokban a Nox4 mRNS mennyisége alig detekálható. A TGF- β 1 indukció hatására a dermális és pulmonáris fibroblasztokban erősen emelkedik a Nox4 mRNS mennyisége, amely erős transzkripciós nyomásra utal. Ez az indukció-specifikus mRNS szint emelkedés nem figyelhető meg p22^{phox} mRNS mennyiségében, mely konstans expressziós szintet mutat az indukciótól függetlenül. Más Nox, Duox komponensek mRNS-ét szignifikáns mennyiségben nem tudtuk kimutatni a humán fibroblaszt sejtekben. Egyedül a pulmonáris fibroblasztokban és csak az indukció nélküli mintákban ha specifikus jelet detektáltunk, akkor valószínűleg nagyon kismértékű Noxa1 expressziót tapasztaltunk. Ezt dermális fibroblasztokban vagy indukció után, mikor már a Nox4 is jelen van, már nem tudtuk kimutatni. Kevésbé valószínű, hogy a Noxa1-nek fiziológias szerepe lenne a Nox4 esetében, mert a Noxa1 a Noxo1-gyel, a p47^{phox} analógiájával lép interakcióba, amely szintén a p22^{phox} PxxP-motívumánál kötődik, de ezen prolin gazdag régió trunkálása nincs befolyással a Nox4 aktivitására (1), valamint a Nox4-gyel koexpresszálatva p47^{phox}/p67^{phox} vagy a Noxo1/Noxa1 regulátorokat a Nox4 ROS termelésére nem volt hatásuk (67, 91). Más NADPH oxidáz komplex mRNS-e nem expresszálódik, így a Noxa1-nek sincs egyéb partnere.

Az általunk vizsgált primer humán-, és egér eredetű fibroblasztok esetén a Nox4 gén átírása egészen addig nem eredményez kimutatható mennyiségű Nox4 mRNS-t, míg nincs transzkripciós nyomás, viszont a p22^{phox} mRNS-e az indukciós hatástól függetlenül szignifikáns mennyiségben jelen van. A TGF- β 1 indukció hatására megjelenő H₂O₂ termelés és ennek

specifikusan Nox4 elleni siRNS-sel vagy DPI-vel történő gátlása kizárólag a Nox4 rendszer aktivitásához köthető.

Nem valószínű, hogy a H₂O₂ termelés akut válaszreakció lenne, mely az indukciót követő 24. órában is fennáll, illetve a Nox4 mRNS-e indukció előtt számottevő mennyiségben nincs jelen. Irodalmi és saját eredményeink alapján a fibroblasztokban a Nox4 gén átírása is fokozódik TGF-β1 hatására a miofibroblaszt differenciáció során, megjelenik a Nox4, és a már jelen lévő a p22^{phox}-szal összeépülő komplex aktív, konstitutív módon H₂O₂-ot termel. Az aktivitás órákon, napokon keresztül fennmarad, amely a tartósan jelen lévő TGF-β1 által aktivált transzkripció jelátviteli utak folyamatos aktivitásából adódó konstans génexpresszióval vagy a fehérje degradációjának szabályozásával is fenntartható (162). Patkány VSCM sejtekben már leírták korábban, hogy az IGF-1 (Inzulinszerű növekedési faktor-1) a Nox4 mRNS szintjének változása nélkül növelte a Nox4 fehérje expresszióját (382).

Szintén a Nox4 transzkripció szintű szabályozását támogatja, hogy a Nox4 esetén nincs olyan egyértelmű agonista, amely akutan fokozná aktivitását. A Duox-ok és a Nox5 esetén a Ca²⁺ koncentráció aktiválja a komplexet, a többi p22^{phox}-dependens Nox-ok esetén a komplex regulátorai, aktivátorai már eleve jelen vannak a citoszólban, plazmamembránban, az alegységek foszforilációs úton aktiválhatók, mely a komplex gyors összeépülésével aktív konformációt hoz létre (145).

5.2.2 A p22^{phox} és Nox4 fehérje kapcsolata

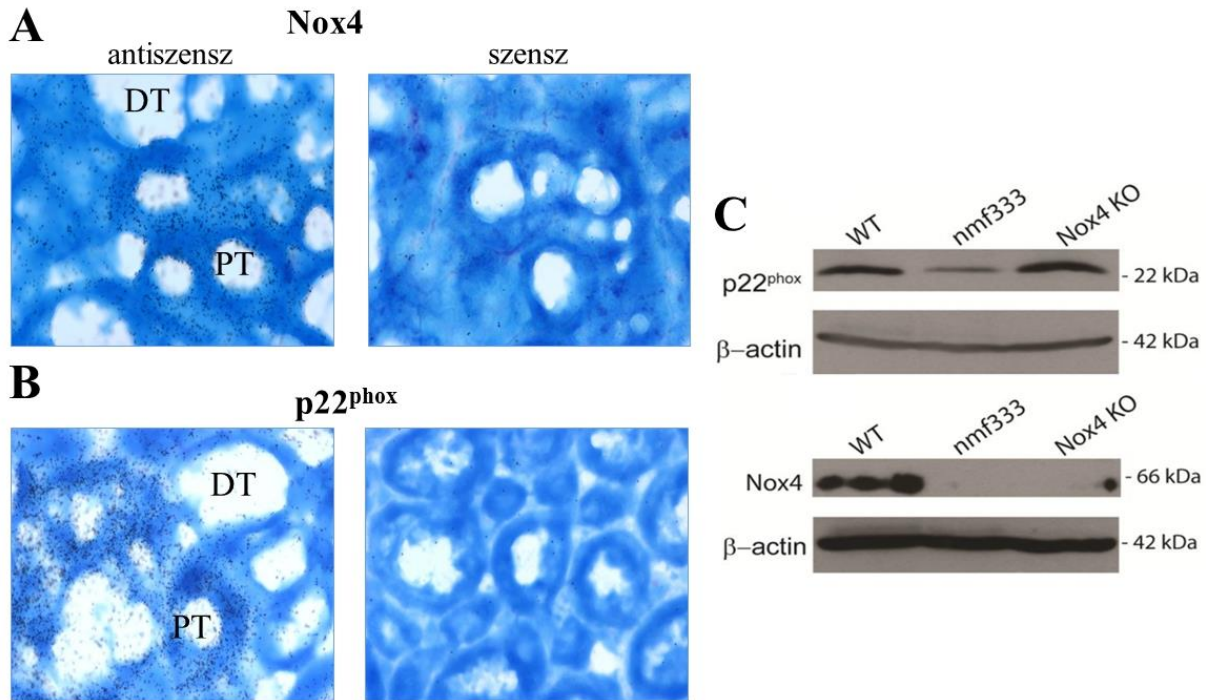
A p22^{phox} mRNS szinten konstans expressziót mutat humán pulmonáris és dermális fibroblaszt sejtekben TGF-β1 indukció nélkül is. Western blot kísérletekben vizsgáltuk, hogyan alakul a p22^{phox} mennyisége fehérje szinten primer humán -, és egér Nox4 KO, p22^{phox}-deficiens egerekből izolált fibroblasztjainkban nyugalmi állapotban és TGF-β1 indukció után.

Western blot kísérleteinkben a p22^{phox} fehérje mennyiségét is változatlanok találtuk, jelen van vad típusú és Nox4 KO egerekben is, valamint mindkét humán primer fibroblasztban, míg az nmf333 egereken a p22^{phox} fehérje szinten alig mutatható ki. Ezek alapján a p22^{phox} fehérje TGF-β1 indukció és Nox4 hiányában is jelen van ezen fibroblasztokban. Western blot kísérletek és az Amplex Red mérések alapján arra következtettünk, hogy a p22^{phox} deficiens

egerekből izolált fibroblasztokban a p22^{phox} esszenciális támogatója a Nox4-nek, ellenben a p22^{phox} transzkripció és transláció szinten stabil Nox4 nélkül is. Először mutattuk meg, hogy a fibroblasztokban a p22^{phox} mennyisége transzkripció és transláció szinten is független volt Nox4 expressziótól. Az általunk vizsgált primer humán és egér fibroblasztokban ugyanazon aszimmetrikus kapcsolatot fedeztük fel, mely alapján a Nox4 jelenléte vagy a komplex indukciója nem szükséges a p22^{phox} fehérje kifejeződéséhez, ellenben a Nox4 p22^{phox} hiányában instabil, TGF- β 1 stimulus hatására sem termel H₂O₂-ot.

A Nox4 és p22^{phox} aszimmetrikus kapcsolata nem jellemző más Nox és p22^{phox} rendszerekben, például Nox2, vagy Nox3 hiányában a p22^{phox} sem expresszálódik (49, 105, 129, 383). A Nox4 interakciója eltérő a többi p22^{phox}-dependens Nox-tól. Ellentétben a Nox1, Nox2, vagy Nox3 oxidázokkal, a Nox4 esetén nincs szükség a p22^{phox} C-terminális prolin gazdag szabályzó motívumára (384), ezért a Nox4 p22^{phox}-függése nem a p22^{phox} további Nox-alegységeinek horgonyzó funkciója miatt szükséges. A Nox4 funkcióvesztését a p22^{phox} fehérje N-terminális trunkálása okozza (9. ábra), amely inkább a Nox4-et stabilizáló, komplexképző interakciója miatt esszenciális.

A *nmf333* egértörzsben a csökkent a p22^{phox} expressziót okozó Y121H aminosavcsere von Löhneysen és mtsai szerint nem befolyásolja a Nox4 funkcióját (143). Amennyiben ez igaz lenne és Y121H aminosavcsereje nem lenne befolyással a Nox4-hez való asszociációra, akkor a p22^{phox}-deficiens egerek fark fibroblasztjaiban is tudtunk volna a vad típussal összemérhető mennyiségű hidrogén-peroxidot detektálni. A Y121H mutáció Nox4-re gyakorolt hatását laborcsoportunk korábbi tagja, Dr. Péterfi Zsolt nem publikált in situ hibridizációs és Western blot eredményei is alátámasztják (37. ábra).



37. ábra: A *Nox4* és *p22^{phox}* mRNS mennyiségének vizsgálata *in situ* hibridizációs kísérletben vad típusú, *p22^{phox}* deficiens és *Nox4* KO egerek vese lizátumainak Western blot analízise: Egér vese *in situ* hibridizációs kísérleti eredménye, ahol az ábra A részén a *Nox4* elleni, a B részén a *p22^{phox}* elleni antiszensz és szensz próbák láthatóak. (DT: disztális tubulus, PT: proximális tubulus). Az ábra C részén a *p22^{phox}* és a *Nox4* fehérje expressziós szintjei WT, *p22^{phox}*-deficiens *nmf333* és *Nox4* KO egerek veselizátumában (Dr. Péterfi Zalán nem publikált eredménye).

Dr. Péterfi Zalán számára még elérhető volt a Novus forgalmazta *Nox4* elleni antitest, így Western blot kísérletben vizsgálhatta, hogy az *nmf333* egerek vese lizátumában a *Nox4* fehérje nem jelenik meg. A vad típusú egerek a vese lizátumában kifejeződik a *p22^{phox}* és a *Nox4* fehérje is, míg az a *Nox4* KO állatok lizátumában viszont a *p22^{phox}* kifejeződik *Nox4* hiányában is.

Megvizsgáltuk, hogy a humán fibroblasztokban kifejeződő *p22^{phox}* fehérje mekkora mennyiségben van jelen, melyből becsülhetünk a *Nox4* komplex mennyiségére is. Ehhez PMN sejtek mellett kvantitáltuk a HPF és BJ fibroblasztjainkat. Legnagyobb *p22^{phox}* fehérje expressziót tüdő eredetű HPF sejtekben detektáltuk, de ez a fehérje mennyiség is sokkal alacsonyabb, mint a nyugvó PMN sejtekben. Előfordulhat, hogy a már eleve jelen lévő *p22^{phox}* feleslegben is van, így a *Nox4* komplex predikálható mennyisége, ha 1:1 arányú komplexképzést

feltételezünk, valószínűsíthetően sokkal alacsonyabb mennyiségben van jelen, mint a PMN sejtek Nox2 rendszere.

A Nox4-et stabilan expresszáló HEK293-as rendszerben H₂O₂-ot termelt más NADPH komponens jelenléte nélkül, illetve a humán fibroblasztokban detektált Nox és aktivátoraik alacsony mRNS szintjei arra utalnak, hogy a Nox4 nem igényel más kofaktort a p22^{phox} mellett. A kötődés p22^{phox}-szal elegendő, hogy a Nox4 komplex konstitutív módon aktívvá váljon (33, 87), mely regulációs faktorok hiányában inkább a Nox4 DH doménjének konformációs tulajdonságától függ (59).

Biológiai szerepe is inkább egy alacsonyabb, de konstans ROS szint fenntartása lehet, mely szignalizációs kaszkádok elnyújtott aktivitásához elegendő, mint egy robbanásszerűen gyors, lokálisan magas ROS termelés.

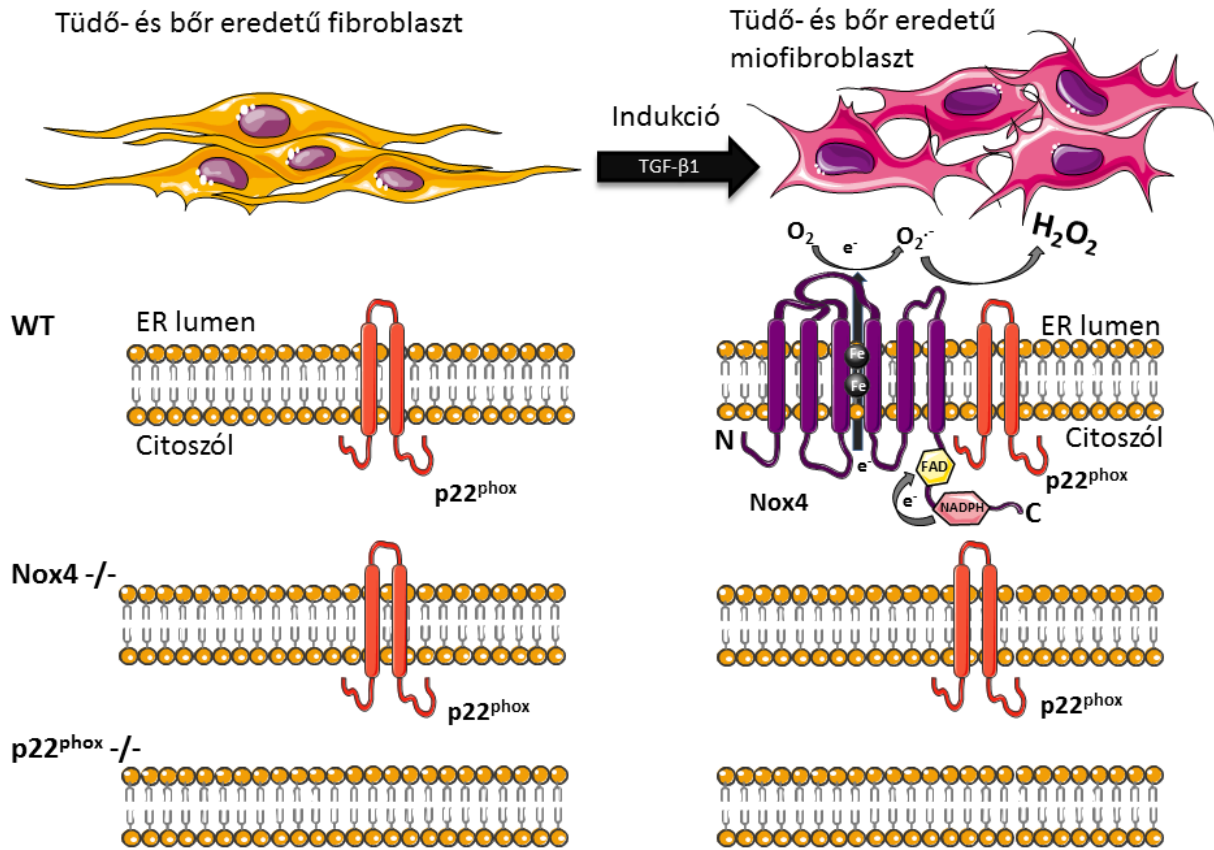
5.2.3 A Nox4-p22^{phox} komplex lokalizációs vizsgálatai

A szakirodalomban sok a bizonytalanság a Nox4 komplex sejten belüli lokalizációjával kapcsolatban. Szöveti szinten a vesében detektálták a legnagyobb mennyiségben (33, 34), Dr. Péterfi Zalán eredményei alapján leginkább a proximális tubulusokban epithéliális sejtjeinél mutatható ki a Nox4 és p22^{phox} *in situ* hibridizációs kísérletben (37. ábra). Szinte az összes szövet valamely sejtípusában leírták jelenlétét (80, 97, 98, 183, 191, 249), szabályozása és az általa termelt ROS szerepe még mindig nem világos. A Nox4-nek a p22^{phox}-on kívül nincs olyan esszenciális regulátora, illetve adapter fehérjéje, mint a p67^{phox} vagy a Rac, mely egyértelművé tenné sejten belüli kifejeződésének helyét, szekvenciájában sincs szignál-, vagy éppen valamilyen retenciós szekvencia. Ugyanakkor biológiai funkciójának megismerésében is meghatározó lenne pontos szubcelluláris elhelyezkedése, mely közelebb vinne célfehérjéi és funkciójának megértéséhez (385). Kicsi annak a valószínűsége, hogy a termelt H₂O₂ a sejten belül nagyobb távolságban fejtené ki szignalizációs hatását (273). Számos kérdés merülhet fel az expresszió helyét illetően, a különbségek, amelyek az irodalomban megjelennek, vajon abból adódnak, hogy sejtípusonként eltérő helyen expresszálódik vagy a sejt eltérő fiziológiás, patológiás állapotának egy jelzője (88).

Nem állt rendelkezésünkre szubcelluláris immunfestéshez eléggé érzékeny és specifikus Nox4 elleni antitest, ezért más megközelítésben vizsgáltuk ezt a kérdéskört. Primer humán fibroblasztokban epitóppal jelölt formában, tranziensen expresszáltattuk a Nox4 és p22^{phox} fehérjéket, ahol egymással és egy ER rezidens fehérjével is közös festődést mutattak. Eredményeink alapján dermális fibroblasztokban a Nox4 és p22^{phox} fehérje kizárólagosan az endoplazmás retikulumban expresszáldott.

A jelenlegi topológiai ismereteink szerint a p22^{phox} valószínűleg 2 transzmembrán szakasszal rendelkezik (131), mind N-, mind C-terminális vége a membrán ugyanazon felszínén található. A rapamicin alapú heterodimerizációs kísérletek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a dimer kialakulása azért jöhetett létre, mert a Nox4 N-terminális-, és a p22^{phox} C-terminális végein található domén elérhető volt a dimerpár citoszólikus tagja számára, így a hidrogén-peroxid termelés az ER lumenális irányába történhet (38. ábra). Ezt közvetve alátámasztja, hogy a HyPer szenzorral sem a citoszólban, sem egyéb sejtalkotóban nem láttuk nyomát az extracelluláris térben mérhető hidrogén-peroxid útjának, dúsulásának. A HyPer pedig az ER lumenében maximálisan oxidált állapotban van (6), így direkt úton egy már erősen oxidált környezetben nem tudtuk detektálni a termelődő extra H₂O₂-t. Sajnos az ER lumenális oldalára targetált FRET szondák nem fejeződnek ki megfelelően, így nem tudtuk a FRET szondákkal is megvizsgálni a sejtalkotó oxidáltságát.

Új eredményeink alapján humán tüdő-, és bőr eredetű fibroblasztokban TGF- β 1 aktivációt követően, miofibroblasztá történő differenciáció során a Nox4 és interakciós partnere, a p22^{phox} az ER lumenális tere felé konstitutív H₂O₂ termeléssel támogatja a sejt ER lumenális terének megfelelő funkcionalitásához szükséges oxidatív környezetét. A Nox4-p22^{phox} között aszimmetrikus kapcsolat áll fenn, a p22^{phox} jelenléte és indukció csak a Nox4 expressziójához esszenciális, a p22^{phox} stabilan kifejeződik Nox4 és indukció nélkül is. Hasonló megfigyelést még egyik p22^{phox}-szal komplexet képző Nox-nál sem írtak le (38. ábra).



38. ábra: A Nox4 és p22^{phox} fehérje aszimmetrikus kapcsolata Nox4 KO és p22^{phox}-deficiens és vad típusú egér farok fibroblasztjaiban: A vad típusú és Nox4 knockout egerek farok fibroblasztjaiban a p22^{phox} TGF-β1 indukció nélkül is stabilan kifejeződik, míg Nox4 KO és p22^{phox}-deficiens állatokban a Nox4 TGF-β1 hatására sem expresszálódik.

Az a feltételezés, hogy az ER luminális oldalán dúsul a Nox4 által termelődő H₂O₂ látszólag ellentétben áll az extracelluláris H₂O₂ jelenlétével. Izgalmas új kutatási irányt jelent, hogy az ER dinamikus újrendeződése kontaktpontokat képez a plazmamembránnal, akár közvetlen kapcsolatot is teremtve az extracelluláris térrel, melyen akár a Nox4 által termelt H₂O₂ is távozhat (386, 387). Jelen munkánk során mi nem vizsgáltuk ezen lehetőségeket.

Az endoplazmás retikulum a sejt legnagyobb kalcium raktára, a szekréciós fehérjék szintézise, érése itt fejeződik be, lipidanyagcserét és/vagy biotranszformációt folytató sejtekben akár a citoplazma nagyobb hányadát is kitöltheti. Az ER redox környezetének kialakítását, folyamatos fenntartását és szabályzását még csak részlegesen sikerült feltérképezni. A luminális

tér erősen oxidált környezete a fehérjék megfelelő érését támogatja diszulfid-hidak kialakításával. A redox környezet változása a fehérjék nem megfelelő foldingját eredményezi, ezért a megfelelő oxidatív, stacioner állapot fenntartása elengedhetelen a fehérjék éréséhez. A fibroblasztok miofibroblasztá történő differenciációja számos (szekréciós) fehérje intenzív termelésével jár, amely fokozott fehérje foldingot igényel az ER-ban. A megfelelő oxidatív környezet fenntartásához, mely a megnövekedett fehérje szintézishez szükséges, a Nox4 komplex által termelt hidrogén-peroxid is hozzájárulhat.

6. Következtetések

Mutációanalízissel megállapítottuk, hogy az új FRET elven működő PerFRET hidrogén-peroxid valós idejű szonda megfelelő működéséhez az összeépített Orp1 és Yap1 cisztein gazdag régióból mely ciszteinek esszenciálisak. Az Orp1 és Yap1 három-három ciszteint tartalmaz, melyből HeLa sejteken, külső H_2O_2 hozzáadásával az Orp1 cisztein gazdag doménjében található 36-os pozíciójú-, és a Yap1 598-as pozíciójú ciszteinje esszenciális. A szenzorban az Orp1 és a Yap1 cCRD doménjében a H_2O_2 oxidálja a cisztein oldalláncokat, melynek következtében kialakuló diszulfid hidak konformációváltozást eredményeznek, a rájuk fuzionált fluorofórok távolodnak és csökken emissziójuk. A csökkenő FRET hányados lesz arányos a H_2O_2 koncentrációval.

Kimutattuk, hogy a Nox4 humán primer dermális és pulmonáris fibroblasztokban TGF- β 1 hatására az extracelluláris térben detektálható mennyiségű hidrogén-peroxidot termel a kezelést követő 24. órában is. Genetikai modellekkel is megerősítettük, hogy a Nox4 aktivitásához a Nox4 és p22^{phox} jelenléte is esszenciális.

Megállapítottuk, hogy humán primer dermális és pulmonáris fibroblasztok a Nox4-en kívül nem expresszálnak más NAPDH oxidáz komplexet. Transzkripciós szintű vizsgálataink során arra a következtetésre jutottunk, hogy a Nox4 oxidáz komplex nem igényel egyéb, a többi NADPH oxidáz rendszerekben előforduló citoszólikus alegységeket, illetve regulátorokat. Ezt a megállapítást megerősítettük HEK293FS sejtekben, ahol a Nox4-et stabilan expresszáló sejtek az endogén p22^{phox}-szal komplexet formálva H_2O_2 -ot termelnek.

Aszimmetrikus kapcsolatot írtunk le a Nox4 és p22^{phox} között, a Nox4 expressziójához a p22^{phox} jelenléte és a TGF- β 1 indukció is szükséges. A Nox4 mennyisége mRNS szintű vizsgálatainkban indukció nélkül alig kimutatható, míg a p22^{phox} kezdeti mennyisége mind mRNS szinten, mind Western Blot kísérleteinkben fehérje szinten változatlan. Nem befolyásolta sem a Nox4 hiánya, sem a TGF- β 1 indukció. Hasonló megfigyelést még egyik p22^{phox}-szal komplexet képző Nox-nál sem írtak le.

Kimutattuk, hogy epitóppal jelölt formában a Nox4 és p22^{phox} humán primer dermális és pulmonáris fibroblasztokban az endoplazmás retikulum membránjában található. Új megközelítésben, kémiai indukálható rendszerben vizsgálva az ER membránjában összeépülő komplex H₂O₂ termelése az ER lumene felé irányul. Ezt közvetett úton, fluorimetriás méréssel is megerősítettük dermális fibroblaszt sejteken, ahol a HyPer1 hidrogén-peroxid szonda oxidáltsága nem változott egyik sejtalkotóban sem. A TGF-β1 indukció hatására Nox4 által termelődött “extra” H₂O₂ nem emelte a citoszól oxidáltságát, így valószínűleg az ER luminális tere felé irányul. A Nox4 NADPH oxidáz huám dermális és pulmonáris fibroblasztokban az ER membránjában található, a TGF-β1 indukció hatására összeépülő, konstitutívan aktív komplex H₂O₂ termelése eddig ismeretlen csatornákon (útvonalon) ürül az extracelluláris térbe.

7. Összefoglalás

Kísérleteink során a legnagyobb mennyiségben a vesében kifejeződő Nox4-p22^{phox} komplexet vizsgáltuk primer humán dermális és pulmonáris fibroblasztokban. A Nox4 TGF- β 1 indukciót követően, a fibroblaszt-miofibroblaszt átalakulás során konstitutívan aktív, mely a sejtek extracelluláris terében szignifikáns mennyiségű hidrogén-peroxid termel. A megfigyelhető H₂O₂ termelés a Nox4-p22^{phox} enzimkomplex aktivitásának köszönhető, melyet Nox4 KO, p22^{phox}-definiens egér genetikai modellek farokvég eredetű fibroblasztjaiban is megerősítettünk.

Transzkripció és transzláció szintű vizsgálataink során arra a következtetésre jutottunk, hogy a p22^{phox} esszenciális komponense a Nox4 NADPH oxidáznak is, mely eredményeink alapján az aktivitásához más interakciós partnert nem igényel a fibroblaszt-miofibroblaszt differenciáció során. A p22^{phox} fehérje, és mRNS szinten is függetlenül a Nox4 mRNS jelenlététől, illetve a TGF- β 1 indukciótól stabil expressziót mutat fibroblasztokban. A kapcsolat eredményeink alapján mind egér, mind humán eredetű fibroblasztokban aszimmetrikus, a Nox4 mRNS-e nem mutatható ki indukció és p22^{phox} hiányában.

Új megközelítésben is vizsgáltuk a Nox4 és p22^{phox} sejten belüli elhelyezkedését, ahol mind kémilag indukálható heterodimerizációs vizsgálatainkkal, mind antitesttel jelölt módon a fehérjéket az ER membránjában tudtuk kimutatni. Orientációs vizsgálataink alapján a Nox4 -függő H₂O₂ termelés feltehetően az ER lumene felé irányul. Ezen hipotézist támogatták fluorimetriás méréseink is, ahol nem tudtuk az “extra” H₂O₂ nyomát más sejt-kompartmentekben detektálni.

Új eredményeink alapján fibroblasztokban, aktivációt követően, a Nox4 és interakciós partnere, a p22^{phox} miofibroblasztá történő differenciáció során az ER luminális tere felé konstitutív H₂O₂ termeléssel támogatja a sejt az ER luminális terének megfelelő funkcionalitásához szükséges oxidatív környezetét.

9. Summary

Currently the most intensively studied dedicated ROS source is the Nox4, which was originally identified as renal oxidase in kidney epithelial cells. Subsequent studies revealed that the expression of Nox4 is not restricted to the kidney; we have characterized the Nox4-p22^{phox} oxidase complex in human primary lung and dermal fibroblasts and also in mice tail-tip fibroblast cells. According to our results during TGF- β 1 induced differentiation of fibroblast to myofibroblast the Nox4 system is constitutively active; the produced ROS is the H₂O₂, which was detected in the extracellular space of the cells. We confirmed this observation in mice tail tip fibroblast based genetical models, where we observed failed H₂O₂ production in the absence of Nox4 or p22^{phox}.

Our transcriptional and translational experiments showed that p22^{phox} is essential and sufficient interactional partner for stabilizing the Nox4 complex. We showed for the first time that the relationship between Nox4 and p22^{phox} is asymmetrical. Both mRNA and protein expression of p22^{phox} are independent of neither induction nor Nox4 presence, however Nox4 is unstable without p22^{phox} or TGF- β 1 induction in fibroblast cells.

Conflicting data were published regarding the expression pattern of Nox4 in different intracellular locations within the cell; hence we built a heterologous dimerization system to see where it is located. We concluded that after induction the Nox4 complex was formed in the ER as its H₂O₂ production released into the luminal site of the ER. These observations were verified by immunohistochemical staining; and indirectly by fluorimetric single-cell measurements, where we could not detect any footprints of extra H₂O₂ production during activation in less oxidative compartments than the ER. Future studies are needed to clarify the possible H₂O₂ channels, or connection among plasma membrane and ER.

Our results suggest that after activation of myofibroblast differentiation the Nox4 and its stabilizing partner, p22^{phox} is formed a constitutively active NADPH oxidase complex in the ER membrane, where its H₂O₂ production may support the increased requirements of oxidative milieu in the luminal site of ER.

10. Irodalomjegyzék

1. Bedard K, Krause K. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 2007; 87(1):245–313.
2. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2007; 8(10):813–24.
3. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(16):9220–5.
4. Fodor Ferenc. A növényi anyagcsere élettana: Oxidatív stresszek és kivédésük: Eötvös Lóránd Tudományegyetem; 2013.
5. Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science (New York, N.Y.)* 2000; 290(5496):1571–4.
6. Enyedi B, Várnai P, Geiszt M. Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1L-alpha and intraluminal calcium. *Antioxidants & redox signaling* 2010; 13(6):721–9.
7. Devasagayam, T P A, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India* 2004; 52:794–804.
8. Sarr D, Tóth E, Gingerich A, Rada B. Antimicrobial actions of dual oxidases and lactoperoxidase. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 2018; 56(6):373–86.
9. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt, Paulo Ivo Homem. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *The Biochemical journal* 2016; 473(24):4527–50.
10. Roy J, Galano J, Durand T, Le Guennec J, Lee JC. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2017; 31(9):3729–45.
11. Forman HJ. Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free radical biology & medicine* 2016; 97:398–407.

12. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews. Drug discovery* 2009; 8(7):579–91.
13. Haigis MC, Yankner BA. The aging stress response. *Molecular cell* 2010; 40(2):333–44.
14. Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G et al. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Molecular and cellular biology* 2004; 24(5):1844–54.
15. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews. Immunology* 2004; 4(3):181–9.
16. Grasberger H, Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281(27):18269–72.
17. Lambeth JD, Neish AS. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annual review of pathology* 2014; 9:119–45.
18. IYER, G. Y. N., ISLAM MF, QUASTEL JH. Biochemical Aspects of Phagocytosis. *Nature* 1961; 192(4802):535–41.
19. Rossi F, Zatti M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 1964; 20(1):21–3.
20. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science (New York, N.Y.)* 1970; 169(3950):1095–7.
21. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of clinical investigation* 1973; 52(3):741–4.
22. Segal AW, Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 1978; 276(5687):515–7.
23. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL et al. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 1986; 322(6074):32–8.

24. Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science (New York, N.Y.)* 1988; 242(4883):1295–7.
25. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *The Journal of clinical investigation* 1990; 86(5):1729–37.
26. Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HL. Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science (New York, N.Y.)* 1988; 242(4883):1298–301.
27. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *The Biochemical journal* 1993; 296 (Pt 3):557–61.
28. Meier B, Cross AR, Hancock JT, Kaup FJ, Jones OT. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *The Biochemical journal* 1991; 275 (Pt 1):241–5.
29. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 1994; 74(6):1141–8.
30. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research* 1991; 51(3):794–8.
31. Bánfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B et al. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. *Science (New York, N.Y.)* 2000; 287(5450):138–42.
32. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; 401(6748):79–82.
33. Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97(14):8010–4.

34. Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S et al. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276(2):1417–23.
35. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir, E G, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001; 269(1-2):131–40.
36. Bánfi B, Molnár G, Maturana A, Steger K, Hegedûs B, Demaurex N et al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276(40):37594–601.
37. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274(52):37265–9.
38. Deken X de, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275(30):23227–33.
39. Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T et al. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *The Journal of cell biology* 2001; 154(4):879–91.
40. Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003; 17(11):1502–4.
41. Deken X de, Corvilain B, Dumont JE, Miot F. Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling. *Antioxidants & redox signaling* 2014; 20(17):2776–93.
42. Kawahara T, Quinn MT, Lambeth JD. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC evolutionary biology* 2007; 7:109.
43. Magnani F, Nenci S, Millana Fananas E, Ceccon M, Romero E, Fraaije MW et al. Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017; 114(26):6764–9.

44. Meijles DN, Fan LM, Howlin BJ, Li J. Molecular insights of p47phox phosphorylation dynamics in the regulation of NADPH oxidase activation and superoxide production. *The Journal of biological chemistry* 2014; 289(33):22759–70.
45. Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM. Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *The Journal of biological chemistry* 1993; 268(28):20983–7.
46. Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T et al. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278(27):25234–46.
47. Bánfi B, Clark RA, Steger K, Krause K. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278(6):3510–3.
48. Nauseef WM. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and cell biology* 2004; 122(4):277–91.
49. Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochemical and biophysical research communications* 2005; 338(1):677–86.
50. Downs CA, Helms MN. Regulation of ion transport by oxidants. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2013; 305(9):L595-603.
51. Bánfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnár GZ et al. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *The Journal of biological chemistry* 2004; 279(18):18583–91.
52. Chen F, Yu Y, Haigh S, Johnson J, Lucas R, Stepp DW et al. Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PloS one* 2014; 9(2):e88405.
53. Pandey D, Gratton J, Rafikov R, Black SM, Fulton, David J R. Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5. *Molecular pharmacology* 2011; 80(3):407–15.
54. Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovascular research* 2006; 71(2):289–99.

55. Goyal P, Weissmann N, Rose F, Grimminger F, Schäfers HJ, Seeger W et al. Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2005; 329(1):32–9.
56. Anilkumar N, San Jose G, Sawyer I, Santos, Celio X C, Sand C, Brewer AC et al. A 28-kDa splice variant of NADPH oxidase-4 is nuclear-localized and involved in redox signaling in vascular cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013; 33(4):e104-12.
57. Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JH, Chavan AJ, Haley B et al. Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *The Biochemical journal* 1992; 284 (Pt 3):781–8.
58. Jackson HM, Kawahara T, Nisimoto Y, Smith, Susan M E, Lambeth JD. Nox4 B-loop creates an interface between the transmembrane and dehydrogenase domains. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285(14):10281–90.
59. Nisimoto Y, Jackson HM, Ogawa H, Kawahara T, Lambeth JD. Constitutive NADPH-dependent electron transferase activity of the Nox4 dehydrogenase domain. *Biochemistry* 2010; 49(11):2433–42.
60. Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O et al. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *The Biochemical journal* 2007; 406(1):105–14.
61. Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD et al. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286(15):13304–13.
62. Nisimoto Y, Diebold BA, Cosentino-Gomes D, Constantino-Gomes D, Lambeth JD. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. *Biochemistry* 2014; 53(31):5111–20.
63. Gorin Y. Nox4 as a potential therapeutic target for treatment of uremic toxicity associated to chronic kidney disease. *Kidney international* 2013; 83(4):541–3.
64. Gregg JL, Turner RM, Chang G, Joshi D, Zhan Y, Chen L et al. NADPH oxidase NOX4 supports renal tumorigenesis by promoting the expression and nuclear accumulation of HIF2 α . *Cancer research* 2014; 74(13):3501–11.

65. Maranchie JK, Zhan Y. Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma. *Cancer research* 2005; 65(20):9190–3.
66. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney international* 1993; 44(5):1149–62.
67. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004; 109(2):227–33.
68. Van Buul, J D, Fernandez-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxidants & redox signaling* 2005; 7(3-4):308–17.
69. Hu T, Ramachandrarao SP, Siva S, Valancius C, Zhu Y, Mahadev K et al. Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *American journal of physiology. Renal physiology* 2005; 289(4):F816-25.
70. Chamulitrat W, Stremmel W, Kawahara T, Rokutan K, Fujii H, Wingler K et al. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2004; 122(4):1000–9.
71. Hoidal JR, Brar SS, Sturrock AB, Sanders KA, Dinger B, Fidone S et al. The role of endogenous NADPH oxidases in airway and pulmonary vascular smooth muscle function. *Antioxidants & redox signaling* 2003; 5(6):751–8.
72. Wingler K, Wünsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free radical biology & medicine* 2001; 31(11):1456–64.
73. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Molecular and cellular biology* 2004; 24(24):10703–17.
74. Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from

- human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circulation research* 2002; 90(11):1205–13.
75. Ellmark, Sara H M, Dusting GJ, Fui, Mark Ng Tang, Guzzo-Pernell N, Drummond GR. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovascular research* 2005; 65(2):495–504.
76. Colston JT, de la Rosa, Sam D, Strader JR, Anderson MA, Freeman GL. H₂O₂ activates Nox4 through PLA₂-dependent arachidonic acid production in adult cardiac fibroblasts. *FEBS letters* 2005; 579(11):2533–40.
77. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S et al. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circulation research* 2005; 97(9):900–7.
78. Dhaunsi GS, Paintlia MK, Kaur J, Turner RB. NADPH oxidase in human lung fibroblasts. *Journal of biomedical science* 2004; 11(5):617–22.
79. Den Hartigh, Laura J, Omer M, Goodspeed L, Wang S, Wietecha T, O'Brien KD et al. Adipocyte-Specific Deficiency of NADPH Oxidase 4 Delays the Onset of Insulin Resistance and Attenuates Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2017; 37(3):466–75.
80. Carmona-Cuenca I, Roncero C, Sancho P, Caja L, Fausto N, Fernández M et al. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *Journal of hepatology* 2008; 49(6):965–76.
81. Hill AJ, Drever N, Yin H, Tamayo E, Saade G, Bytautiene E. The role of NADPH oxidase in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2014; 210(5):466.e1.
82. Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276(8):5452–8.
83. Yang S, Zhang Y, Ries W, Key L. Expression of Nox4 in osteoclasts. *Journal of cellular biochemistry* 2004; 92(2):238–48.

84. Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier-Denis E, Kovari E, Herrmann F et al. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience* 2005; 132(2):233–8.
85. Case AJ, Li S, Basu U, Tian J, Zimmerman MC. Mitochondrial-localized NADPH oxidase 4 is a source of superoxide in angiotensin II-stimulated neurons. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2013; 305(1):H19-28.
86. Piccoli C, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A, Boffoli D et al. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280(28):26467–76.
87. Martyn KD, Frederick LM, Loehneysen K von, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular signalling* 2006; 18(1):69–82.
88. Zhang L, Nguyen, Minh Vu Chuong, Lardy B, Jesaitis AJ, Grichine A, Rousset F et al. New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4. *Biochimie* 2011; 93(3):457–68.
89. Wu R, Ma Z, Liu Z, Terada LS. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Molecular and cellular biology* 2010; 30(14):3553–68.
90. Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, Nakamura K, Takeya R, Kuribayashi F et al. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2005; 10(12):1139–51.
91. Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt, Harald H H W, Busse R, Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279(44):45935–41.
92. Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *The Journal of cell biology* 2008; 181(7):1129–39.

93. Lee CF, Qiao M, Schröder K, Zhao Q, Asmis R. Nox4 is a novel inducible source of reactive oxygen species in monocytes and macrophages and mediates oxidized low density lipoprotein-induced macrophage death. *Circulation research* 2010; 106(9):1489–97.
94. Zhang M, Brewer AC, Schröder K, Santos, Celio X C, Grieve DJ, Wang M et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(42):18121–6.
95. Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004; 24(4):677–83.
96. Gil Lorenzo, Andrea Fernanda, Bocanegra V, Benardon ME, Cacciamani V, Vallés PG. Hsp70 regulation on Nox4/p22phox and cytoskeletal integrity as an effect of losartan in vascular smooth muscle cells. *Cell stress & chaperones* 2014; 19(1):115–34.
97. Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation research* 2010; 106(7):1253–64.
98. Block K, Gorin Y, Abboud HE. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106(34):14385–90.
99. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(35):15565–70.
100. Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Park JY, Xie L et al. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy. *Circulation research* 2013; 112(4):651–63.
101. Spencer NY, Yan Z, Boudreau RL, Zhang Y, Luo M, Li Q et al. Control of hepatic nuclear superoxide production by glucose 6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase-4. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286(11):8977–87.

102. Ullevig S, Zhao Q, Lee CF, Seok Kim H, Zamora D, Asmis R. NADPH oxidase 4 mediates monocyte priming and accelerated chemotaxis induced by metabolic stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2012; 32(2):415–26.
103. Sturrock A, Huecksteadt TP, Norman K, Sanders K, Murphy TM, Chitano P et al. Nox4 mediates TGF-beta1-induced retinoblastoma protein phosphorylation, proliferation, and hypertrophy in human airway smooth muscle cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2007; 292(6):L1543-55.
104. Sun Q, Hess DT, Nogueira L, Yong S, Bowles DE, Eu J et al. Oxygen-coupled redox regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel by NADPH oxidase 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(38):16098–103.
105. Parkos CA, Dinauer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT. Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 1989; 73(6):1416–20.
106. Schapiro BL, Newburger PE, Klempner MS, Dinauer MC. Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. *The New England journal of medicine* 1991; 325(25):1786–90.
107. Leto TL, Adams AG, Mendez I de. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91(22):10650–4.
108. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93(5):1464–76.
109. Yu L, Zhen L, Dinauer MC. Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *The Journal of biological chemistry* 1997; 272(43):27288–94.
110. Harper AM, Chaplin MF, Segal AW. Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *The Biochemical journal* 1985; 227(3):783–8.
111. Zhu Y, Marchal CC, Casbon A, Stull N, Löhneysen K von, Knaus UG et al. Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions critical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281(41):30336–46.

112. Yamada M, Ariga T, Kawamura N, Ohtsu M, Imajoh-Ohmi S, Ohshika E et al. Genetic studies of three Japanese patients with p22-phox-deficient chronic granulomatous disease: detection of a possible common mutant CYBA allele in Japan and a genotype-phenotype correlation in these patients. *British journal of haematology* 2000; 108(3):511–7.
113. Teimourian S, Zomorodian E, Badalzadeh M, Pouya A, Kannengiesser C, Mansouri D et al. Characterization of six novel mutations in CYBA: the gene causing autosomal recessive chronic granulomatous disease. *British journal of haematology* 2008; 141(6):848–51.
114. Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1998; 97(2):135–7.
115. Li A, Prasad A, Mincemoyer R, Satorius C, Epstein N, Finkel T et al. Relationship of the C242T p22phox gene polymorphism to angiographic coronary artery disease and endothelial function. *American journal of medical genetics* 1999; 86(1):57–61.
116. Stasia MJ, Bordigoni P, Martel C, Morel F. A novel and unusual case of chronic granulomatous disease in a child with a homozygous 36-bp deletion in the CYBA gene (A22(0)) leading to the activation of a cryptic splice site in intron 4. *Human genetics* 2002; 110(5):444–50.
117. Xu Q, Yuan F, Shen X, Wen H, Li W, Cheng B et al. Polymorphisms of C242T and A640G in CYBA gene and the risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *PloS one* 2014; 9(1):e84251.
118. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R et al. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102(15):1744–7.
119. Bedard K, Attar H, Bonnefont J, Jaquet V, Borel C, Plastre O et al. Three common polymorphisms in the CYBA gene form a haplotype associated with decreased ROS generation. *Human mutation* 2009; 30(7):1123–33.
120. Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* 1987; 327(6124):717–20.

121. Geiszt M, Kapus A, Ligeti E. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? *Journal of leukocyte biology* 2001; 69(2):191–6.
122. Boer M de, Klein A de, Hossle JP, Seger R, Corbeel L, Weening RS et al. Cytochrome b558-negative, autosomal recessive chronic granulomatous disease: two new mutations in the cytochrome b558 light chain of the NADPH oxidase (p22-phox). *American journal of human genetics* 1992; 51(5):1127–35.
123. Bu-Ghanim HN, Casimir CM, Povey S, Segal AW. The alpha subunit of cytochrome b-245 mapped to chromosome 16. *Genomics* 1990; 8(3):568–70.
124. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Bustamante J, Kannengiesser C, Boer M de et al. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). *Blood cells, molecules & diseases* 2010; 44(4):291–9.
125. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood cells, molecules & diseases* 2010; 45(3):246–65.
126. Badalzadeh M, Tajik S, Fazlollahi MR, Houshmand M, Fattahi F, Alizadeh Z et al. Three novel mutations in CYBA among 22 Iranians with Chronic granulomatous disease. *International journal of immunogenetics* 2017; 44(6):314–21.
127. Stasia MJ. CYBA encoding p22(phox), the cytochrome b558 alpha polypeptide: gene structure, expression, role and physiopathology. *Gene* 2016; 586(1):27–35.
128. Nakano Y, Longo-Guess CM, Bergstrom DE, Nauseef WM, Jones SM, Bánfi B. Mutation of the Cyba gene encoding p22phox causes vestibular and immune defects in mice. *The Journal of clinical investigation* 2008; 118(3):1176–85.
129. Nakano Y, Banfi B, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Allen LH, Nauseef WM. Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. *The Biochemical journal* 2007; 403(1):97–108.
130. Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280(24):23328–39.

131. Taylor RM, Burritt JB, Baniulis D, Foubert TR, Lord CI, Dinauer MC et al. Site-specific inhibitors of NADPH oxidase activity and structural probes of flavocytochrome b: characterization of six monoclonal antibodies to the p22phox subunit. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2004; 173(12):7349–57.
132. Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical journal* 2005; 386(Pt 3):401–16.
133. Meijles DN, Howlin BJ, Li J. Consensus in silico computational modelling of the p22phox subunit of the NADPH oxidase. *Computational biology and chemistry* 2012; 39:6–13.
134. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2002; 59(9):1428–59.
135. Dahan I, Issaeva I, Gorzalczyk Y, Sigal N, Hirshberg M, Pick E. Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". *The Journal of biological chemistry* 2002; 277(10):8421–32.
136. Miyano K, Sumimoto H. N-Linked glycosylation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *Biochemical and biophysical research communications* 2014; 443(3):1060–5.
137. DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM. Processing and Maturation of Flavocytochrome b558 Include Incorporation of Heme as a Prerequisite for Heterodimer Assembly. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(18):13986–93.
138. Wallach TM, Segal AW. Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *The Biochemical journal* 1997; 321 (Pt 3):583–5.
139. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause K. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279(44):46065–72.
140. DeLeo FR, Nauseef WM, Jesaitis AJ, Burritt JB, Clark RA, Quinn MT. A Domain of p47 phox That Interacts with Human Neutrophil Flavocytochrome b558. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(44):26246–51.

141. Leusen JH, Bolscher BG, Hilarius PM, Weening RS, Kaulfersch W, Seger RA et al. 156Pro--Gln substitution in the light chain of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase (p22-phox) leads to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. *The Journal of experimental medicine* 1994; 180(6):2329–34.
142. Lewis EM, Sergeant S, Ledford B, Stull N, Dinauer MC, McPhail LC. Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285(5):2959–67.
143. Löhneysen K von, Noack D, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Knaus UG. Mutational analysis reveals distinct features of the Nox4-p22 phox complex. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283(50):35273–82.
144. Löhneysen K von, Noack D, Hayes P, Friedman JS, Knaus UG. Constitutive NADPH oxidase 4 activity resides in the composition of the B-loop and the penultimate C terminus. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287(12):8737–45.
145. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free radical biology & medicine* 2014; 76:208–26.
146. Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos, Célio X C et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280(49):40813–9.
147. Santos, Célio X C, Stolf BS, Takemoto, Paulo V A, Amanso AM, Lopes LR, Souza EB et al. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *Journal of leukocyte biology* 2009; 86(4):989–98.
148. Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, Du P et al. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 2009; 105(3):249–59.
149. Miller FJ. NADPH oxidase 4: walking the walk with Poldip2. *Circulation research* 2009; 105(3):209–10.

150. Montezano AC, Burger D, Ceravolo GS, Yusuf H, Montero M, Touyz RM. Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5. *Clinical science (London, England : 1979)* 2011; 120(4):131–41.
151. Datla SR, McGrail DJ, Vukelic S, Huff LP, Lyle AN, Pounkova L et al. Poldip2 controls vascular smooth muscle cell migration by regulating focal adhesion turnover and force polarization. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2014; 307(7):H945-57.
152. Dosoki H, Stegemann A, Taha M, Schnittler H, Luger TA, Schröder K et al. Targeting of NADPH oxidase in vitro and in vivo suppresses fibroblast activation and experimental skin fibrosis. *Experimental dermatology* 2017; 26(1):73–81.
153. Diaz B, Shani G, Pass I, Anderson D, Quintavalle M, Courtneidge SA. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Science signaling* 2009; 2(88):ra53.
154. Gil Lorenzo, Andrea F, Costantino VV, Appiolaza ML, Cacciamani V, Benardon ME, Bocanegra V et al. Heat Shock Protein 70 and CHIP Promote Nox4 Ubiquitination and Degradation within the Losartan Antioxidative Effect in Proximal Tubule Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2015; 36(6):2183–97.
155. Fernandez I, Martin-Garrido A, Zhou DW, Clempus RE, Seidel-Rogol B, Valdivia A et al. Hic-5 Mediates TGF β -Induced Adhesion in Vascular Smooth Muscle Cells by a Nox4-Dependent Mechanism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2015; 35(5):1198–206.
156. Desai LP, Zhou Y, Estrada AV, Ding Q, Cheng G, Collawn JF et al. Negative regulation of NADPH oxidase 4 by hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) protein. *The Journal of biological chemistry* 2014; 289(26):18270–8.
157. Price MO, McPhail LC, Lambeth JD, Han C, Knaus UG, Dinauer MC. Creation of a genetic system for analysis of the phagocyte respiratory burst: high-level reconstitution of the NADPH oxidase in a nonhematopoietic system. *Blood* 2002; 99(8):2653–61.

158. Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circulation research* 2006; 98(4):453–62.
159. Guo S, Chen X. The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance. *Journal of drug targeting* 2015; 23(10):888–96.
160. Rozycki M, Bialik JF, Speight P, Dan Q, Knudsen, Teresa E T, Szeto SG et al. Myocardin-related Transcription Factor Regulates Nox4 Protein Expression: LINKING CYTOSKELETAL ORGANIZATION TO REDOX STATE. *The Journal of biological chemistry* 2016; 291(1):227–43.
161. Diebold I, Flügel D, Becht S, Belaiba RS, Bonello S, Hess J et al. The hypoxia-inducible factor-2alpha is stabilized by oxidative stress involving NOX4. *Antioxidants & redox signaling* 2010; 13(4):425–36.
162. Bai G, Hock TD, Logsdon N, Zhou Y, Thannickal VJ. A far-upstream AP-1/Smad binding box regulates human NOX4 promoter activation by transforming growth factor- β . *Gene* 2014; 540(1):62–7.
163. Katsuyama M, Hirai H, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M et al. Sp3 transcription factor is crucial for transcriptional activation of the human NOX4 gene. *The FEBS journal* 2011; 278(6):964–72.
164. Goettsch C, Goettsch W, Brux M, Haschke C, Brunssen C, Muller G et al. Arterial flow reduces oxidative stress via an antioxidant response element and Oct-1 binding site within the NADPH oxidase 4 promoter in endothelial cells. *Basic research in cardiology* 2011; 106(4):551–61.
165. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers, Pamela W M, Wingler K, Schmidt, Harald H H W. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxidants & redox signaling* 2015; 23(5):406–27.
166. Diebold I, Petry A, Hess J, Görlach A. The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Molecular biology of the cell* 2010; 21(12):2087–96.
167. Hancock JT. Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules: their production and role in disease. *British journal of biomedical science* 1997; 54(1):38–46.

168. Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chemistry & biology* 1995; 2(1):13–22.
169. Röhrdanz E, Kahl R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free radical biology & medicine* 1998; 24(1):27–38.
170. Lee Y, Kim B, Chun Y, So I, Choi H, Kim M et al. NOX4 as an oxygen sensor to regulate TASK-1 activity. *Cellular signalling* 2006; 18(4):499–507.
171. Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2009; 47(1):15–22.
172. Santillo M, Colantuoni A, Mondola P, Guida B, Damiano S. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. *Frontiers in physiology* 2015; 6:194.
173. Brandes RP, Takac I, Schröder K. No superoxide--no stress?: Nox4, the good NADPH oxidase! *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011; 31(6):1255–7.
174. Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li J, Gove C, Lambeth JD et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circulation research* 2003; 93(9):802–5.
175. Li J, Stouffs M, Serrander L, Banfi B, Bettiol E, Charnay Y et al. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Molecular biology of the cell* 2006; 17(9):3978–88.
176. Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y et al. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: Nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circulation research* 2001; 88(9):888–94.
177. Morawietz H. Endothelial NADPH oxidases: friends or foes? *Basic research in cardiology* 2011; 106(4):521–5.
178. Maejima Y, Kuroda J, Matsushima S, Ago T, Sadoshima J. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2011; 50(3):408–16.

179. Touyz RM, Montezano AC. Vascular Nox4: a multifarious NADPH oxidase. *Circulation research* 2012; 110(9):1159–61.
180. Murray, Thomas V A, Smyrniak I, Shah AM, Brewer AC. NADPH oxidase 4 regulates cardiomyocyte differentiation via redox activation of c-Jun protein and the cis-regulation of GATA-4 gene transcription. *The Journal of biological chemistry* 2013; 288(22):15745–59.
181. Chen C, Li L, Zhou HJ, Min W. The Role of NOX4 and TRX2 in Angiogenesis and Their Potential Cross-Talk. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2017; 6(2).
182. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery* 2011; 10(6):453–71.
183. Ahmad M, Kelly MR, Zhao X, Kandhi S, Wolin MS. Roles for Nox4 in the contractile response of bovine pulmonary arteries to hypoxia. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2010; 298(6):H1879-88.
184. Goettsch C, Goettsch W, Muller G, Seebach J, Schnittler H, Morawietz H. Nox4 overexpression activates reactive oxygen species and p38 MAPK in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2009; 380(2):355–60.
185. Lener B, Koziel R, Pircher H, Hütter E, Greussing R, Herndler-Brandstetter D et al. The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells. *The Biochemical journal* 2009; 423(3):363–74.
186. Peshavariya H, Dusting GJ, Jiang F, Halmos LR, Sobey CG, Drummond GR et al. NADPH oxidase isoform selective regulation of endothelial cell proliferation and survival. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2009; 380(2):193–204.
187. Bretón-Romero R, Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox biology* 2014; 2:529–34.
188. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circulation research* 2012; 110(9):1217–25.

189. Morawietz H. Cardiovascular protection by Nox4. *Cardiovascular research* 2018; 114(3):353–5.
190. Ray R, Murdoch CE, Wang M, Santos CX, Zhang M, Alom-Ruiz S et al. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011; 31(6):1368–76.
191. Amara N, Goven D, Prost F, Muloway R, Crestani B, Boczkowski J. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGFbeta1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax* 2010; 65(8):733–8.
192. Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton, David J R. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Frontiers in physiology* 2012; 3:412.
193. Nlandu Khodo S, Dizin E, Sossauer G, Szanto I, Martin P, Feraille E et al. NADPH-oxidase 4 protects against kidney fibrosis during chronic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012; 23(12):1967–76.
194. Hewitson TD, Becker GJ. Interstitial myofibroblasts in IgA glomerulonephritis. *American journal of nephrology* 1995; 15(2):111–7.
195. Desmoulière A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2003; 83(12):1689–707.
196. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *The New England journal of medicine* 1994; 331(19):1286–92.
197. Jiang F, Liu G, Disting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- β -mediated fibrotic responses. *Redox biology* 2014; 2:267–72.
198. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nature medicine* 2009; 15(9):1077–81.
199. Tang WW, Van GY, Qi M. Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney international* 1997; 51(3):926–31.

200. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *The American journal of physiology* 1999; 277(1):C1-9.
201. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *The Journal of cell biology* 1986; 103(6 Pt 2):2787–96.
202. Hinz B. Myofibroblasts. *Experimental eye research* 2016; 142:56–70.
203. Boukhalfa G, Desmoulière A, Rondeau E, Gabbiani G, Sraer JD. Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney. *Experimental nephrology* 1996; 4(4):241–7.
204. Jarman ER, Khambata VS, Cope C, Jones P, Roger J, Ye LY et al. An inhibitor of NADPH oxidase-4 attenuates established pulmonary fibrosis in a rodent disease model. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2014; 50(1):158–69.
205. Carnesecchi S, Deffert C, Donati Y, Basset O, Hinz B, Preynat-Seauve O et al. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxidants & redox signaling* 2011; 15(3):607–19.
206. Babelova A, Avaniadi D, Jung O, Fork C, Beckmann J, Kosowski J et al. Role of Nox4 in murine models of kidney disease. *Free radical biology & medicine* 2012; 53(4):842–53.
207. Hemnani T, Parihar MS. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian journal of physiology and pharmacology* 1998; 42(4):440–52.
208. Gordillo G, Fang H, Park H, Roy S. Nox-4-dependent nuclear H₂O₂ drives DNA oxidation resulting in 8-OHdG as urinary biomarker and hemangioendothelioma formation. *Antioxidants & redox signaling* 2010; 12(8):933–43.
209. Yan F, Wang Y, Wu X, Peshavariya HM, Dusting GJ, Zhang M et al. Nox4 and redox signaling mediate TGF- β -induced endothelial cell apoptosis and phenotypic switch. *Cell death & disease* 2014; 5:e1010.
210. Landry WD, Cotter TG. ROS signalling, NADPH oxidases and cancer. *Biochemical Society transactions* 2014; 42(4):934–8.

211. Nakanishi A, Wada Y, Kitagishi Y, Matsuda S. Link between PI3K/AKT/PTEN Pathway and NOX Proteinin Diseases. *Aging and disease* 2014; 5(3):203–11.
212. Naughton R, Quiney C, Turner SD, Cotter TG. Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia* 2009; 23(8):1432–40.
213. Zhang C, Lan T, Hou J, Li J, Fang R, Yang Z et al. NOX4 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and metastasis through positive feedback regulation of PI3K/Akt signaling. *Oncotarget* 2014; 5(12):4392–405.
214. Lee JK, Edderkaoui M, Truong P, Ohno I, Jang K, Berti A et al. NADPH oxidase promotes pancreatic cancer cell survival via inhibiting JAK2 dephosphorylation by tyrosine phosphatases. *Gastroenterology* 2007; 133(5):1637–48.
215. Helfinger V, Henke N, Harenkamp S, Walter M, Epah J, Penski C et al. The NADPH Oxidase Nox4 mediates tumour angiogenesis. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2016; 216(4):435–46.
216. Crosas-Molist E, Bertran E, Sancho P, López-Luque J, Fernando J, Sánchez A et al. The NADPH oxidase NOX4 inhibits hepatocyte proliferation and liver cancer progression. *Free radical biology & medicine* 2014; 69:338–47.
217. Gorin Y, Block K. Nox as a target for diabetic complications. *Clinical science (London, England : 1979)* 2013; 125(8):361–82.
218. Ding H, Hashem M, Triggle C. Increased oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse: changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS. *European journal of pharmacology* 2007; 561(1-3):121–8.
219. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J et al. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventive insulin treatment. *Diabetologia* 2003; 46(10):1428–37.
220. Sedeek M, Callera G, Montezano A, Gutsol A, Heitz F, Szyndralewicz C et al. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. *American journal of physiology. Renal physiology* 2010; 299(6):F1348-58.

221. Borbély G, Szabadkai I, Horváth Z, Markó P, Varga Z, Breza N et al. Small-molecule inhibitors of NADPH oxidase 4. *Journal of medicinal chemistry* 2010; 53(18):6758–62.
222. Green DE, Murphy TC, Kang B, Kleinhenz JM, Szyndralewicz C, Page P et al. The Nox4 inhibitor GKT137831 attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular cell proliferation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012; 47(5):718–26.
223. Aoyama T, Paik Y, Watanabe S, Laleu B, Gaggini F, Fioraso-Cartier L et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2012; 56(6):2316–27.
224. Laleu B, Gaggini F, Orchard M, Fioraso-Cartier L, Cagnon L, Houngninou-Molango S et al. First in class, potent, and orally bioavailable NADPH oxidase isoform 4 (Nox4) inhibitors for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of medicinal chemistry* 2010; 53(21):7715–30.
225. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sentürk H. From fatty liver to fibrosis: a tale of "second hit". *World journal of gastroenterology* 2013; 19(8):1158–65.
226. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *International journal of molecular sciences* 2013; 14(10):20704–28.
227. Lan T, Kisseleva T, Brenner DA. Deficiency of NOX1 or NOX4 Prevents Liver Inflammation and Fibrosis in Mice through Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation. *PloS one* 2015; 10(7):e0129743.
228. Teixeira G, Szyndralewicz C, Molango S, Carnesecchi S, Heitz F, Wiesel P et al. Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors. *British journal of pharmacology* 2017; 174(12):1647–69.
229. Prieto-Bermejo R, Hernández-Hernández A. The Importance of NADPH Oxidases and Redox Signaling in Angiogenesis. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2017; 6(2).
230. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual review of immunology* 1998; 16:137–61.

231. Liu R, Desai LP. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox biology* 2015; 6:565–77.
232. Ask K, Bonniaud P, Maass K, Eickelberg O, Margetts PJ, Warburton D et al. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008; 40(3):484–95.
233. Piek E, Heldin CH, Dijke P ten. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1999; 13(15):2105–24.
234. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature reviews. Immunology* 2002; 2(1):46–53.
235. Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, Baron JL, Munger JS, Kawakatsu H et al. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *The Journal of cell biology* 2002; 157(3):493–507.
236. Jobling MF, Mott JD, Finnegan MT, Jurukovski V, Erickson AC, Walian PJ et al. Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species. *Radiation research* 2006; 166(6):839–48.
237. Koli K, Myllärniemi M, Keski-Oja J, Kinnula VL. Transforming growth factor-beta activation in the lung: focus on fibrosis and reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling* 2008; 10(2):333–42.
238. Derynck R, Feng XH. TGF-beta receptor signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1997; 1333(2):F105-50.
239. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 1998; 95(6):779–91.
240. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2012; 13(10):616–30.
241. Shi Y, Hata A, Lo RS, Massagué J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 1997; 388(6637):87–93.

242. Corcoran JB, McCarthy S, Griffin B, Gaffney A, Bhreathnach U, Börgeson E et al. IHG-1 must be localised to mitochondria to decrease Smad7 expression and amplify TGF- β 1-induced fibrotic responses. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1833(8):1969–78.
243. Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, Heldin C. Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene* 2013; 32(13):1609–15.
244. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425(6958):577–84.
245. Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280(12):11448–57.
246. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *The Journal of investigative dermatology* 2002; 118(2):211–5.
247. Altenhöfer S, Kleikers, Pamela W M, Radermacher KA, Scheurer P, Rob Hermans, J J, Schiffers P et al. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2012; 69(14):2327–43.
248. Bondi CD, Manickam N, Lee DY, Block K, Gorin Y, Abboud HE et al. NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010; 21(1):93–102.
249. Amara N, Bachoual R, Desmard M, Golda S, Guichard C, Lanone S et al. Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a NADP(H) oxidase/NOX4 redox-dependent mechanism. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2007; 293(1):L170-81.
250. Boudreau HE, Casterline BW, Rada B, Korzeniowska A, Leto TL. Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells. *Free radical biology & medicine* 2012; 53(7):1489–99.
251. Ismail S, Sturrock A, Wu P, Cahill B, Norman K, Huecksteadt T et al. NOX4 mediates hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells: the role of autocrine production of transforming growth factor- β 1 and insulin-like growth factor

binding protein-3. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2009; 296(3):L489-99.

252. Jiang JX, Chen X, Serizawa N, Szyndralewicz C, Page P, Schröder K et al. Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo. *Free radical biology & medicine* 2012; 53(2):289–96.

253. Rocic P, Lucchesi PA. NAD(P)H oxidases and TGF-beta-induced cardiac fibroblast differentiation: Nox-4 gets Smad. *Circulation research* 2005; 97(9):850–2.

254. Wei XF, Zhou QG, Hou FF, Liu BY, Liang M. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *American journal of physiology. Renal physiology* 2009; 296(2):F427-37.

255. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(46):20009–14.

256. Grinnell F, Petroll WM. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annual review of cell and developmental biology* 2010; 26:335–61.

257. Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB. Matrix control of transforming growth factor- β function. *Journal of biochemistry* 2012; 152(4):321–9.

258. Sampson N, Berger P, Zenzmaier C. Therapeutic targeting of redox signaling in myofibroblast differentiation and age-related fibrotic disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012; 2012:458276.

259. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annual review of microbiology* 2003; 57:395–418.

260. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nature immunology* 2002; 3(12):1129–34.

261. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology* 2017; 11:613–9.

262. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants & redox signaling* 2006; 8(3-4):243–70.
263. Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell communication and signaling : CCS* 2015; 13:39.
264. Bienert GP, Møller, Anders L B, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282(2):1183–92.
265. Bienert GP, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1840(5):1596–604.
266. Medraño-Fernandez I, Bestetti S, Bertolotti M, Bienert GP, Bottino C, Laforenza U et al. Stress Regulates Aquaporin-8 Permeability to Impact Cell Growth and Survival. *Antioxidants & redox signaling* 2016; 24(18):1031–44.
267. Vieceli Dalla Sega, Francesco, Zambonin L, Fiorentini D, Rizzo B, Caliceti C, Landi L et al. Specific aquaporins facilitate Nox-produced hydrogen peroxide transport through plasma membrane in leukaemia cells. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1843(4):806–14.
268. Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(36):15681–6.
269. Hara-Chikuma M, Satooka H, Watanabe S, Honda T, Miyachi Y, Watanabe T et al. Aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide transport is required for NF- κ B signalling in keratinocytes and development of psoriasis. *Nature communications* 2015; 6:7454.
270. Watanabe S, Moniaga CS, Nielsen S, Hara-Chikuma M. Aquaporin-9 facilitates membrane transport of hydrogen peroxide in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2016; 471(1):191–7.
271. Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng T, Hinks JA, Tonks NK et al. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 2003; 423(6941):769–73.

272. van Montfort, Rob L M, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 2003; 423(6941):773–7.
273. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in enzymology* 2013; 528:3–25.
274. Poole LB, Karplus PA, Claiborne A. Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2004; 44:325–47.
275. Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free radical biology & medicine* 1999; 27(3-4):322–8.
276. Ferrer-Sueta G, Manta B, Botti H, Radi R, Trujillo M, Denicola A. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chemical research in toxicology* 2011; 24(4):434–50.
277. Burgoyne JR, Oka S, Ale-Agha N, Eaton P. Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. *Antioxidants & redox signaling* 2013; 18(9):1042–52.
278. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular cell* 2007; 26(1):1–14.
279. Winterbourn CC, Peskin AV. Kinetic Approaches to Measuring Peroxiredoxin Reactivity. *Molecules and cells* 2016; 39(1):26–30.
280. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental & molecular medicine* 1999; 31(2):53–9.
281. Stöcker S, van Laer K, Mijuskovic A, Dick TP. The Conundrum of Hydrogen Peroxide Signaling and the Emerging Role of Peroxiredoxins as Redox Relay Hubs. *Antioxidants & redox signaling* 2018; 28(7):558–73.
282. Park JW, Piszczek G, Rhee SG, Chock PB. Glutathionylation of peroxiredoxin I induces decamer to dimers dissociation with concomitant loss of chaperone activity. *Biochemistry* 2011; 50(15):3204–10.

283. Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes research and clinical practice* 1999; 45(2-3):101–12.
284. Winterbourn CC, Hampton MB. Redox biology: signaling via a peroxiredoxin sensor. *Nature chemical biology* 2015; 11(1):5–6.
285. Rhee SG, Chang T, Jeong W, Kang D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecules and cells* 2010; 29(6):539–49.
286. Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science (New York, N.Y.)* 2003; 300(5619):650–3.
287. Jarvis RM, Hughes SM, Ledgerwood EC. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. *Free radical biology & medicine* 2012; 53(7):1522–30.
288. Lim JM, Lee KS, Woo HA, Kang D, Rhee SG. Control of the pericentrosomal H₂O₂ level by peroxiredoxin I is critical for mitotic progression. *The Journal of cell biology* 2015; 210(1):23–33.
289. Rawat SJ, Creasy CL, Peterson JR, Chernoff J. The tumor suppressor Mst1 promotes changes in the cellular redox state by phosphorylation and inactivation of peroxiredoxin-1 protein. *The Journal of biological chemistry* 2013; 288(12):8762–71.
290. Randall LM, Ferrer-Sueta G, Denicola A. Peroxiredoxins as preferential targets in H₂O₂-induced signaling. *Methods in enzymology* 2013; 527:41–63.
291. Sobotta MC, Liou W, Stöcker S, Talwar D, Oehler M, Ruppert T et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nature chemical biology* 2015; 11(1):64–70.
292. Storz G, Tartaglia LA, Ames BN. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science (New York, N.Y.)* 1990; 248(4952):189–94.
293. Haddad JJ. Science review: redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for hypoxia-inducible factor-1alpha. *Critical care (London, England)* 2003; 7(1):47–54.

294. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell death and differentiation* 2005; 12(12):1555–63.
295. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RV, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling* 2008; 10(8):1343–74.
296. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox biology* 2014; 2:535–62.
297. Le Rossignol S, Ketheesan N, Haleagrahara N. Redox-sensitive transcription factors play a significant role in the development of rheumatoid arthritis. *International reviews of immunology* 2018; 37(3):129–43.
298. Xu Q, Konta T, Nakayama K, Furusu A, Moreno-Manzano V, Lucio-Cazana J et al. Cellular defense against H₂O₂-induced apoptosis via MAP kinase-MKP-1 pathway. *Free radical biology & medicine* 2004; 36(8):985–93.
299. Kobayashi A, Kang M, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K et al. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and cellular biology* 2006; 26(1):221–9.
300. Abate C, Patel L, Rauscher FJ, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science (New York, N.Y.)* 1990; 249(4973):1157–61.
301. Zhang J, Jin N, Liu Y, Rhoades RA. Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1998; 19(2):324–32.
302. Humphries KM, Deal MS, Taylor SS. Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280(4):2750–8.
303. Torres M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2003; 8:d369-91.
304. Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *BioFactors (Oxford, England)* 2003; 17(1-4):287–96.

305. Latimer HR, Veal EA. Peroxiredoxins in Regulation of MAPK Signalling Pathways; Sensors and Barriers to Signal Transduction. *Molecules and cells* 2016; 39(1):40–5.
306. Abe J, Berk BC. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274(30):21003–10.
307. Wilhelm D, Bender K, Knebel A, Angel P. The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Molecular and cellular biology* 1997; 17(8):4792–800.
308. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271(8):4138–42.
309. Giannoni E, Buricchi F, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Molecular and cellular biology* 2005; 25(15):6391–403.
310. Nadeau PJ, Charette SJ, Landry J. REDOX reaction at ASK1-Cys250 is essential for activation of JNK and induction of apoptosis. *Molecular biology of the cell* 2009; 20(16):3628–37.
311. Katagiri K, Matsuzawa A, Ichijo H. Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in redox signaling. *Methods in enzymology* 2010; 474:277–88.
312. Nomura K, Lee M, Banks C, Lee G, Morris BJ. An ASK1-p38 signalling pathway mediates hydrogen peroxide-induced toxicity in NG108-15 neuronal cells. *Neuroscience letters* 2013; 549:163–7.
313. Lee S, Yang K, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277(23):20336–42.
314. Ren D, Yang H, Zhang S. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277(1):559–65.
315. Henriksen EJ. Effects of H₂O₂ on insulin signaling the glucose transport system in mammalian skeletal muscle. *Methods in enzymology* 2013; 528:269–78.

316. Viola HM, Arthur PG, Hool LC. Transient exposure to hydrogen peroxide causes an increase in mitochondria-derived superoxide as a result of sustained alteration in L-type Ca²⁺ channel function in the absence of apoptosis in ventricular myocytes. *Circulation research* 2007; 100(7):1036–44.
317. Peers C, Scragg JL, Boyle JP, Fearon IM, Taylor SC, Green KN et al. A central role for ROS in the functional remodelling of L-type Ca²⁺ channels by hypoxia. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 2005; 360(1464):2247–54.
318. Fearon IM, Randall AD, Perez-Reyes E, Peers C. Modulation of recombinant T-type Ca²⁺ channels by hypoxia and glutathione. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 2000; 441(2-3):181–8.
319. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Meyenburg A, Mennerick S, Perez-Reyes E, Romano C et al. Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* 2001; 31(1):75–85.
320. Bogeski I, Kummerow C, Al-Ansary D, Schwarz EC, Koehler R, Kozai D et al. Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Science signaling* 2010; 3(115):ra24.
321. Bogeski I, Niemeyer BA. Redox regulation of ion channels. *Antioxidants & redox signaling* 2014; 21(6):859–62.
322. Groschner K, Rosker C, Lukas M. Role of TRP channels in oxidative stress. *Novartis Foundation symposium* 2004; 258:222-30; discussion 231-5, 263-6.
323. Ru X, Yao X. TRPM2: a multifunctional ion channel for oxidative stress sensing. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 2014; 66(1):7–15.
324. Mei Z, Mao H, Jiang L. Conserved cysteine residues in the pore region are obligatory for human TRPM2 channel function. *American journal of physiology. Cell physiology* 2006; 291(5):C1022-8.

325. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T et al. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular cell* 2002; 9(1):163–73.
326. Suzuki Y, Yoshimaru T, Matsui T, Inoue T, Niide O, Nunomura S et al. Fc epsilon RI signaling of mast cells activates intracellular production of hydrogen peroxide: role in the regulation of calcium signals. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2003; 171(11):6119–27.
327. TÖRNQUIST K, VAINIO PJ, BJÖRKLUND S, TITIEVSKY A, DUGUÉ B, TUOMINEN RK. Hydrogen peroxide attenuates store-operated calcium entry and enhances calcium extrusion in thyroid FRTL-5 cells. *Biochem. J.* 2000; 351(1):47.
328. Grupe M, Myers G, Penner R, Fleig A. Activation of store-operated I(CRAC) by hydrogen peroxide. *Cell calcium* 2010; 48(1):1–9.
329. Hidalgo C, Donoso P, Carrasco MA. The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: cellular redox sensors? *IUBMB life* 2005; 57(4-5):315–22.
330. Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovascular research* 2006; 71(2):310–21.
331. Hidalgo C. Cross talk between Ca²⁺ and redox signalling cascades in muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/Ca²⁺ release channels. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 2005; 360(1464):2237–46.
332. Morris TE, Sulakhe PV. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. *Free radical biology & medicine* 1997; 22(1-2):37–47.
333. Moßhammer M, Kühl M, Koren K. Possibilities and Challenges for Quantitative Optical Sensing of Hydrogen Peroxide. *Chemosensors* 2017; 5(4):28.
334. Kalyanaraman B, Darley-USmar V, Davies, Kelvin J A, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology & medicine* 2012; 52(1):1–6.

335. Henderson LM, Chappell JB. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *European journal of biochemistry* 1993; 217(3):973–80.
336. Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of leukocyte biology* 1990; 47(5):440–8.
337. Keller A, Mohamed A, Dröse S, Brandt U, Fleming I, Brandes RP. Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free radical research* 2004; 38(12):1257–67.
338. Maeda H, Fukuyasu Y, Yoshida S, Fukuda M, Saeki K, Matsuno H et al. Fluorescent probes for hydrogen peroxide based on a non-oxidative mechanism. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 2004; 43(18):2389–91.
339. Albers AE, Dickinson BC, Miller EW, Chang CJ. A red-emitting naphthofluorescein-based fluorescent probe for selective detection of hydrogen peroxide in living cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2008; 18(22):5948–50.
340. Li G, Zhu D, Liu Q, Xue L, Jiang H. Rapid detection of hydrogen peroxide based on aggregation induced ratiometric fluorescence change. *Organic letters* 2013; 15(4):924–7.
341. Dickinson BC, Huynh C, Chang CJ. A palette of fluorescent probes with varying emission colors for imaging hydrogen peroxide signaling in living cells. *Journal of the American Chemical Society* 2010; 132(16):5906–15.
342. Miller EW, Tulyathan O, Tulyanthan O, Isacoff EY, Chang CJ. Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling. *Nature chemical biology* 2007; 3(5):263–7.
343. Garg S, Rong H, Miller CJ, Waite TD. Oxidative Dissolution of Silver Nanoparticles by Chlorine: Implications to Silver Nanoparticle Fate and Toxicity. *Environmental science & technology* 2016; 50(7):3890–6.
344. Zhao Q, Chen S, Huang H, Zhang L, Wang L, Liu F et al. Colorimetric and ultra-sensitive fluorescence resonance energy transfer determination of H₂O₂ and glucose by multi-functional Au nanoclusters. *The Analyst* 2014; 139(6):1498–503.
345. Burmistrova N, Kolontaeva O, Duerkop A. New Nanomaterials and Luminescent Optical Sensors for Detection of Hydrogen Peroxide. *Chemosensors* 2015; 3(4):253–73.

346. Chu C, Hsieh M, Su Z, Abdul Amir HF, Korsunsky AM, Guo Z. Hydrogen peroxide sensing based on carbon quantum dots. *MATEC Web of Conferences* 2016; 59:01001.
347. SHIMOMURA O, JOHNSON FH, SAIGA Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology* 1962; 59:223–39.
348. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111(2):229–33.
349. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 1998; 67:509–44.
350. Germond A, Fujita H, Ichimura T, Watanabe TM. Design and development of genetically encoded fluorescent sensors to monitor intracellular chemical and physical parameters. *Biophysical reviews* 2016; 8(2):121–38.
351. Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY et al. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279(13):13044–53.
352. Schwarzer C, Illek B, Suh JH, Remington SJ, Fischer H, Machen TE. Organelle redox of CF and CFTR-corrected airway epithelia. *Free radical biology & medicine* 2007; 43(2):300–16.
353. Bilan DS, Belousov VV. In Vivo Imaging of Hydrogen Peroxide with HyPer Probes. *Antioxidants & redox signaling* 2018; 29(6):569–84.
354. Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature methods* 2006; 3(4):281–6.
355. Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(6):3197–202.
356. Markvicheva KN, Bilan DS, Mishina NM, Gorokhovatsky AY, Vinokurov LM, Lukyanov S et al. A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2011; 19(3):1079–84.

357. Bilan DS, Pase L, Joosen L, Gorokhovatsky AY, Ermakova YG, Gadella, Theodorus W J et al. HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS chemical biology* 2013; 8(3):535–42.
358. Bilan DS, Belousov VV. HyPer Family Probes: State of the Art. *Antioxidants & redox signaling* 2016; 24(13):731–51.
359. Ermakova YG, Bilan DS, Matlashov ME, Mishina NM, Markvicheva KN, Subach OM et al. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature communications* 2014; 5:5222.
360. Booth DM, Joseph SK, Hajnóczky G. Subcellular ROS imaging methods: Relevance for the study of calcium signaling. *Cell calcium* 2016; 60(2):65–73.
361. Malinouski M, Zhou Y, Belousov VV, Hatfield DL, Gladyshev VN. Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments. *PloS one* 2011; 6(1):e14564.
362. Miyawaki A. Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annual review of biochemistry* 2011; 80:357–73.
363. Berney C, Danuser G. FRET or No FRET: A Quantitative Comparison. *Biophysical Journal* 2003; 84(6):3992–4010.
364. Wood MJ, Storz G, Tjandra N. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* 2004; 430(7002):917–21.
365. Ma L, Takanishi CL, Wood MJ. Molecular mechanism of oxidative stress perception by the Orp1 protein. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282(43):31429–36.
366. Okazaki S, Tachibana T, Naganuma A, Mano N, Kuge S. Multistep disulfide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H₂O₂ stress signal. *Molecular cell* 2007; 27(4):675–88.
367. Carmel-Harel O, Stearman R, Gasch AP, Botstein D, Brown PO, Storz G. Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 2001; 39(3):595–605.

368. Enyedi B, Zana M, Donkó Á, Geiszt M. Spatial and temporal analysis of NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide signals by novel fluorescent reporter proteins. *Antioxidants & redox signaling* 2013; 19(6):523–34.
369. Huang X, Wang J, Liu H, Lan T, Ren J. Quantum dot-based FRET for sensitive determination of hydrogen peroxide and glucose using tyramide reaction. *Talanta* 2013; 106:79–84.
370. Albers AE, Okreglak VS, Chang CJ. A FRET-based approach to ratiometric fluorescence detection of hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society* 2006; 128(30):9640–1.
371. Champion Y, Jesaitis AJ, Nguyen, Minh Vu Chuong, Grichine A, Herenger Y, Baillet A et al. New p22-phox monoclonal antibodies: identification of a conformational probe for cytochrome b 558. *Journal of innate immunity* 2009; 1(6):556–69.
372. Varnai P, Thyagarajan B, Rohacs T, Balla T. Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *The Journal of cell biology* 2006; 175(3):377–82.
373. Manickam N, Patel M, Griendling KK, Gorin Y, Barnes JL. RhoA/Rho kinase mediates TGF- β 1-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species. *American journal of physiology. Renal physiology* 2014; 307(2):F159-71.
374. Aldieri E, Riganti C, Polimeni M, Gazzano E, Lussiana C, Campia I et al. Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific. *Current drug metabolism* 2008; 9(8):686–96.
375. Massart C, Giusti N, Beauwens R, Dumont JE, Miot F, van Sande J. Diphenyleneiodonium, an inhibitor of NOXes and DUOXes, is also an iodide-specific transporter. *FEBS open bio* 2013; 4:55–9.
376. Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Xu H, Yao Y, Horke S, Förstermann U et al. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase and NADPH oxidase by betulinic acid in human endothelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2007; 322(2):836–42.

377. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 2004; 71(5):289–97.
378. Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* 2005; 168(3):389–99.
379. Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO journal* 2000; 19(19):5157–66.
380. Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *The FEBS journal* 2008; 275(13):3249–77.
381. Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free radical biology & medicine* 2009; 47(9):1239–53.
382. Meng D, Lv D, Fang J. Insulin-like growth factor-I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research* 2008; 80(2):299–308.
383. Prior K, Leisegang MS, Josipovic I, Löwe O, Shah AM, Weissmann N et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity. *Redox biology* 2016; 9:287–95.
384. Kawahara T, Ritsick D, Cheng G, Lambeth JD. Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280(36):31859–69.
385. Helmcke I, Heumüller S, Tikkanen R, Schröder K, Brandes RP. Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity. *Antioxidants & redox signaling* 2009; 11(6):1279–87.
386. Okeke E, Dingsdale H, Parker T, Voronina S, Tepikin AV. Endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions: structure, function and dynamics. *The Journal of physiology* 2016; 594(11):2837–47.
387. Borgese N, Francolini M, Snapp E. Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. *Current opinion in cell biology* 2006; 18(4):358–64.

11. Saját közlemények

11.1 Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

1. **Zana M**, Péterfi Z, Kovács H, Tóth E Zs, Enyedi B, Morel F, Paclet MH, Donkó A, Morand S, Leto TL, Geiszt M

Interaction between p22^{phox} and NOX4 in the endoplasmic reticulum reveals a novel mechanism of NADPH oxidase complex formation

Free Radic Biol Med. 2018 Feb 20;116:41-49. IF:6,02

2. Enyedi B, **Zana M**, Donkó Á, Geiszt M.

Spatial and temporal analysis of NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide signals by novel fluorescent reporter proteins.

Antioxid Redox Signal. 2013 Aug 20;19(6):523-34 IF:7,667

11.2 Egyéb, a témához tágabb körben kapcsolódó publikációk:

1. Sirokmány G, Pató A, **Zana M**, Donkó Á, Bíró A, Nagy P, Geiszt M. Epidermal growth factor-induced hydrogen peroxide production is mediated by dual oxidase 1.

Free Radic Biol Med. 2016 Aug;97:204-11. IF: 5,606

2. Donkó Á, Morand S, Korzeniowska A, Boudreau HE, **Zana M**, Hunyady L, Geiszt M, Leto TL.

Hypothyroidism-associated missense mutation impairs NADPH oxidase activity and intracellular trafficking of Duox2.

Free Radic Biol Med. 2014 Aug;73:190-200. IF: 5,736

12. Köszönetnyilvánítás

Elsődlegesen szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Geiszt Miklósnak, aki lehetőséget adott, hogy PhD hallgatóként csatlakozzak kutatócsoportjához. Nagyon hálás vagyok az értékes szakmai iránymutatásért, a tudományos gondolkodás alapjaiért, az örök optimista szemléletért, a tudomány iránti töretlen lelkesedéséért, amitől mi, kezdő kutatók is egyenesen rocsztároknak éreztük magunkat. Köszönöm a bizalmat, támogatást, a kifogyhatatlanul sok, remek ötletet!

Köszönettel tartozom Prof. Hunyady Lászlónak, hogy intézetvezetőként lehetővé tette, hogy ebben a kiváló kutatóintézetben folytathassam tudományos munkámat. Köszönöm Prof. Ligeti Erzsébetnek, hogy a Celluláris és molekuláris élettan program vezetőjeként, támogatta és figyelemmel kísérte tudományos munkámat.

Hálás köszönettel tartozom, Dr. Enyedi Balázsnak, aki segített legyőzni a kezdeti nehézségeket, megtiszteltetés, hogy folytathattam az általa készített szenzorokkal a munkát. Köszönöm Dr. Péterfi Zalánnak, Dr. Sirokmány Gábornak, Dr. Donkó Ágnesnek és Dr. Petheő Gábornak a rengeteg gyakorlati segítséget, a támogató hozzáállást, amit PhD társaimmal, Dr. Lázár Enikővel és Dr. Kovács Hajnallal kaptunk. Szakmai igényességük, kitartásuk motiváló környezetet teremtett, ahová öröm volt reggel bemenni. Külön köszönöm Molnár Beáta, Meczker Kata és Szosznyák Tünde asszisztensnőknek a megbízható, gyors, precíz munkájukat. Köszönöm Prof. Várni Péternek a mikroszkóp használathoz nyújtott segítséget, az Enyedi-, a Hunyady-, a Káldi-, a Ligeti-, a Mócsai-, a Spät-, Várnai-labor, és az Élettani Intézet összes dolgozójának minden segítségükért, támogatásukért és a barátságos légkörért. Szerencsés vagyok, hogy ilyen inspiráló kutatócsoportban, intézetben dolgozhattam.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a szeretetüket, támogatásukat és legfőképp türelmüket, melyek nélkül ezen értekezés biztosan nem készült volna el. Hálával tartozom Péternek, aki nélkül ez a munka el sem kezdődött volna.