

**Antioxidative Wirkungen NO-freisetzender NSAIDs
in endothelialen und gastralen Zellen:
Hämoxygenase-1 als möglicher Mediator**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Georg Berndt
geb. am 27. Juni 1976 in Hannover

Gutachter:

1. Prof. Dr. Henning Schröder, Halle (Saale)
2. PD Dr. Johannes-Peter Stasch, Wuppertal
3. Prof. Dr. Karsten Schrör, Düsseldorf

Halle (Saale), 05. Mai 2004 (Tag der Verteidigung)

urn:nbn:de:gbv:3-000006637

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006637>]

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	7
1.1 Nichtsteroidale Antiphlogistika	7
1.1.1 Erwünschte und unerwünschte Wirkungen der klassischen NSAIDs	7
1.1.2 Schutzmechanismen der Magenschleimhaut	8
1.1.3 Bedeutung von Stickstoffmonoxid	9
1.1.4 Entstehung einer NSAID-induzierten Schleimhautschädigung	10
1.1.5 Weiterentwicklungen von NSAIDs	11
1.2 NO-NSAIDs	12
1.2.1 NO freisetzende NSAIDs	12
1.2.2 Zielstrukturen von Stickstoffmonoxid in biologischen Systemen	14
1.2.3 NO als antioxidativer, antiapoptotischer und zellprotektiver Mediator	14
1.3 Die Hämoxxygenase	16
1.3.1 Konstitutive und induzierbare Isoformen	16
1.3.2 Die induzierbare HO-1 und ihre Funktion als protektives Protein	17
1.4 Genregulation der HO-1	18
1.4.1 Genregulation der HO-1 durch cGMP-abhängige Signalwege	18
1.4.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	19
1.4.3 Aktivierung von MAP-Kinasen durch Stickstoffmonoxid	21
1.4.4 Beteiligung von MAP-Kinasen an der Genregulation der HO-1	21
1.4.5 Genregulatorische Proteine mit Einfluss auf die HO-1-Promotorregion	22
1.4.6 NO/cGMP und HO-1-regulatorische Proteine	23
2 PROBLEMSTELLUNG	24
3 METHODEN UND MATERIAL	26
3.1 Zellkultur	26
3.1.1 Kultivierung der Nierenepithelzellen	26
3.1.2 Kultivierung der Endothelzellen	26
3.1.3 Kultivierung der gastralen Epithelzellen	26
3.2 Bestimmung des cyclischen GMP mittels Immunoassay	27
3.3 Northern-Blot-Analyse	28
3.3.1 Gewinnung und Isolierung der Sonden	28
3.3.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	28
3.3.3 DNA-Gelelektrophorese und Fragmentisolierung	28
3.3.4 Inkubationsprotokoll zur RNA-Isolierung	29
3.3.5 RNA-Isolierung	29
3.3.6 RNA-Gelelektrophorese	29
3.3.7 RNA-Fixierung auf Nylon-Membranen durch Vakuum-Blotting	29
3.3.8 Markierung von DNA-Sonden mit ³² P-Desoxycytidin-Triphosphat	30

3.3.9	Vor- und Haupthybridisierung	30
3.3.10	Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle	30
3.4	Western-Blot-Analyse	31
3.4.1	Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse	31
3.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	31
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
3.4.4	Protein-Transfer durch Western-Blot	32
3.4.5	Detektion mit spezifischen Antikörpern	32
3.5	Bestimmung freier Sauerstoffradikale	33
3.5.1	Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung	33
3.5.2	Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz	33
3.6	Material	34
3.7	Substanznummern der NO-NSAIDs	36
3.8	Puffer und Substanzlösungen	36
3.8.1	Puffer	36
3.8.2	Substanzlösungen	37
3.9	Statistik	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	Charakterisierung von NO-Naproxen als NO-Donor im Zellkulturmodell	39
4.1.1	Effekte von NO-Naproxen auf den cGMP-Spiegel	39
4.1.2	Einfluss einer Vorinkubation mit NO-Donoren auf die cGMP-Stimulation	40
4.1.3	Zusammenfassung	43
4.2	Induktion der Hämoxygenase-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen	44
4.2.1	Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch NO-NSAIDs	44
4.2.2	Zeitabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch NO-ASS	48
4.2.3	Konzentrationsabhängiger Effekt von NO-NSAIDs auf die HO-1-Proteinexpression	49
4.2.4	Effekt des COX-2-Hemmers Rofecoxib	50
4.2.5	Zusammenfassung	50
4.3	Induktion der Hämoxygenase-1 durch NO-NSAIDs in gastralen Epithelzellen	51
4.3.1	Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA am Beispiel von NO-ASS	51
4.3.2	Konzentrationsabhängiger Effekt von NO-NSAIDs auf die HO-1-Proteinexpression	52
4.4	HO-1-Genregulation durch NO-NSAIDs	53
4.4.1	Einfluss von Sauerstoffradikalen	53
4.4.2	Einfluss von cGMP-abhängigen Stoffwechselwegen	54
4.4.3	Einfluss des Translationsblockers Cycloheximid	56
4.4.4	Einfluss von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen	57
4.4.5	Zusammenfassung	59
4.5	Effekte der NO-NSAIDs in einem Modell für oxidativen Stress	60
4.5.1	Effekt von NO-Naproxen in Endothelzellen	60

4.5.2	Effekte von NO-NSAIDs in gastralen Epithelzellen	62
4.5.3	Einfluss des HO-1-Metaboliten Bilirubin	63
4.5.4	Einfluss eines Hämoxygenase-Inhibitors auf die antioxidative Wirkung der NO-NSAIDs	65
4.5.5	Zusammenfassung	67
5	DISKUSSION	68
6	ZUSAMMENFASSUNG	82
7	LITERATURVERZEICHNIS	84
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	98
8.1	Originalarbeiten	98
8.2	In Kurzform publizierte Poster (<i>Abstracts</i>)	98
9	DANKSAGUNG	99

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivator-Protein-1
ASS	Acetylsalicylsäure
BVR	Biliverdinreduktase
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CHX	Cycloheximid
CNC-b-ZIP	<i>Cap`N`Collar-Basic-Leucin-Zipper</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX	Cyclooxygenase
DTT	Dithiothreitol
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDRF	<i>Endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HO-1	Hämoxygenase-1
HSP	Hitzeschockprotein
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICE	<i>IL-1β converting enzyme</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamind-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NF κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSAID	<i>Nonsteroidal Antiinflammatory Drug</i>
ODQ	1-H-(1,2,4)-Oxadiazol-(4,3a)quinoxalin-1-on
PAE	<i>porcine aortic endothelial cells</i>
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PGI ₂	Prostacyclin
PK	Proteinkinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase

SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	<i>standard error of mean</i>
SIN-1	3-Morpholinosydnonimin (Linsidomin)
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
SNP	Nitroprussid-Natrium
SnPP	Zinn-Protoporphyrin XI
SOD	Superoxiddismutase
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TCF	<i>Ternary Complex Factor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TxA ₂	Thromboxan

