

3 Methoden und Material

3.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.1.1 Kultivierung der Nierenepithelzellen

Für die Bestimmung des intrazellulären cGMP-Spiegels wurde die Nierenepithel-Zelllinie LLC-PK-1 vom Schwein (*porcine kidney epithelial cells*; ATCC CL 101) verwendet. Die Zellen wurden in Ham's F12 Zellkulturmedium mit 20% DMEM, 15% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

3.1.2 Kultivierung der Endothelzellen

Für die Northern-Blot-Untersuchungen wurde die humane Endothel-Zelllinie ECV 304 (ECACC 92091712) in den Passagen 3-9 verwendet. Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte in Medium 199, das 10% fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthält. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

Für die Western-Blot-Analysen wurden primäre vaskuläre Endothelzellen aus der Schweineaorta (*porcine aortic endothelial cells*, PAE) der Passagen 2-4 eingesetzt. Die Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) unter Zusatz von 15% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle 2 Tage.

3.1.3 Kultivierung der gastralen Epithelzellen

Als Modell für Untersuchungen am Epithel der Magenschleimhaut dienten die humanen gastralen Epithelzelllinien AGS (ATCC CRL 1739) und KATO-III (ATCC HTB 103). Beide Zelllinien sind aus einem Adenokarzinom des humanen Magenepithels (*human gastric adenocarcinoma*) isoliert worden.

Zur Kultivierung der Zelllinie AGS (Barranco et al., 1983) wurde Ham's F12 Zellkulturmedium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin eingesetzt. Die Zelllinie KATO-III (Sekiguchi et al., 1978) wurde in RPMI 1640 Zellkulturmedium unter Zusatz von 20% fetalem Kälberserum, 4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle 2 Tage.

3.2 Bestimmung des cyclischen GMP mittels Immunoassay

Die LLC-PK-1-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen (*wells*) bis zur Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Nüchternphase in Medium ohne Serum folgte eine Inkubation über 15 Minuten mit Zellkulturmedium, das zusätzlich 0,5 mM des Phosphodiesterase-Hemmstoffes IBMX enthielt (Polte et al., 2000). Bei Vorinkubation mit Hämoglobin (20 μ M) oder SOD (15 U/ml) wurden diese ebenfalls zugesetzt. Für den Vergleich der Bioaktivierung von Glyceroltrinitrat und NO-Naproxen wurde über 5 Stunden mit der jeweiligen Substanz vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ebenfalls über 15 Minuten mit IBMX-haltigem Zellkulturmedium inkubiert.

Im Anschluss folgte die Hauptinkubation der Zellen mit NO-Naproxen, Glyceroltrinitrat, oder SIN-1 über 15 Minuten.

Nach der Inkubation wurde der Zellüberstand abgesaugt und die Zellen mit 500 μ l Ethanol, der bei 60°C im Trockenschrank abgedampft wurde, auf den Platten fixiert (Friedl et al., 1985). Anschließend wurden 500 μ l Wasser pro Well zugegeben und die Zellkulturschalen bei -80°C eingefroren. Durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurden die Zellen lysiert und die cyclischen Nukleotide freigesetzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand aliquotiert (Hinz & Schröder, 1998).

Die Bestimmung des cGMP-Spiegels erfolgte mit einem Enzymimmunoassay-Kit (Maxey et al., 1992; Pradelles et al., 1989) entsprechend den Angaben der Herstellerfirma Cayman Chemical (Alexis, Grünberg). Freigesetztes cGMP der Proben konkurriert mit an Acetylcholinesterase gekoppeltem cGMP um Bindungsstellen an spezifischen cGMP-Antikörpern, die auf dem Boden einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen immobilisiert sind. Nach Inkubation über 18 Stunden wurden die Platten gewaschen und die Acetylcholinesterase-Aktivität mit Hilfe von Ellmanns Reagenz bestimmt. Das Enzym katalysiert die Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, deren Extinktion bei 412 nm vermessen werden kann. Die Konzentration an freiem cGMP ist der gemessenen Extinktion umgekehrt proportional.

3.3 Northern-Blot-Analyse

Für das Northern-Blot-Verfahren wird aus Proben isolierte RNA zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden die Moleküle aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägerschicht (z.B. Nylonmembran) übertragen und fixiert. Durch Hybridisierung mit geeigneten, markierten Gensonden können spezifische RNA-Moleküle sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden (Alwine et al., 1977).

3.3.1 Gewinnung und Isolierung der Sonden

Als Sonden dienen Fragmente der kodierenden Regionen der entsprechenden Gene. Diese lagen als Plasmid-DNA in *Escherichia coli* DH5- α -Kulturen vor. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *Plasmid-Midi-Isolation-Kits* der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Dieses System basiert auf einer modifizierten alkalischen Zellyse (Birnboim & Doly, 1979), gefolgt von einer spezifischen DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. Die Isolation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

Gensonde	Größe	Restriktion
Hämoxxygenase-1 human	1000 bp	Eco R I
β -Aktin human	450 bp	Nco I / Pst I

Tabelle 1: Gensonden

3.3.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die benötigten DNA-Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (s. Tabelle 1) aus den Plasmiden geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde entsprechend den Produktinformationen über 1 Stunde bei 37°C inkubiert (Roche, Mannheim).

3.3.3 DNA-Gelelektrophorese und Fragmentisolierung

Die Sonden-DNA wurde nach der Restriktionsspaltung in einem 0,8%-igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA enthielt das Gel den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Als Referenz diente ein Standard mit DNA-Fragmenten definierter Größe (Promega, Mannheim).

Mit Hilfe von UV-Licht wurden die DNA-Banden detektiert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten.

Für die Isolierung der DNA aus den Gelbanden wurde der *Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und die Extraktion nach den Herstellerangaben vorgenommen.

3.3.4 Inkubationsprotokoll zur RNA-Isolierung

Die entsprechenden Zellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen über 8 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet und die Pellets bei -80°C gelagert.

3.3.5 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus den Zellpellets wurde nach der *Single-Step*-Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987) mit Hilfe des TRIZOL-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert. Das Reagenz besteht aus einem Phenol-Guanidinisothiocyanat-Gemisch. Die Zellen werden aufgeschlossen und Zellkomponenten gelöst, ohne dass die RNA gespalten wird. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Die RNA verbleibt ausschließlich in der wässrigen Phase, aus der sie mit Isopropanol gefällt werden kann. Die Präparation der RNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

3.3.6 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Konzentration wurde am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bestimmt. Anschließend wurden je 25 μg RNA mit 4fach konzentriertem Ladepuffer (Formamid, Formaldehyd, 10x MOPS, 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid) versetzt und 10 Minuten bei 60°C denaturiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1%-igen Formaldehyd-Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen (Rave et al., 1979; Sambrook et al., 1989). Als Referenz diente ein Standard mit RNA-Fragmenten definierter Größe (Sigma, Taufkirchen).

3.3.7 RNA-Fixierung auf Nylon-Membranen durch Vakuum-Blotting

Mit der Methode des Vakuum-Blottens kann RNA aus einem Agarosegel über Vakuum-verstärkte Diffusion auf eine Nylonmembran transferiert werden. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst fotografiert. Anschließend wurden sie 20 Minuten in DEPC-Wasser mit 0,05 N NaOH, 5 Minuten in reinem DEPC-Wasser und zweimal 15 Minuten in konzentriertem Transferpuffer (20x SSC) gewaschen. Mit Hilfe eines Vakuum-Blotters (Biometra, Göttingen) erfolgte der 90minütige Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺; Amersham, Freiburg). Danach wurden die Membranen für 30 Minuten bei 80°C in einem Trockenschrank gelagert. Dieses so genannte *baking* fixiert die RNA-Moleküle auf der Nylonmembran durch Ausbildung von Bindungen zwischen den Basen der RNA und den positiv geladenen Aminogruppen der Nylonmembran.

3.3.8 Markierung von DNA-Sonden mit ^{32}P -Desoxycytidin-Triphosphat

Die Sonden wurden mit Hilfe des *Random Primed DNA Labeling Kits* der Firma Roche (Mannheim) markiert. Diese von Feinberg und Vogelstein (Feinberg & Vogelstein, 1983) entwickelte Methode basiert auf der Hybridisierung eines Gemisches aller möglichen Hexanukleotid-Kombinationen mit dem zu markierenden DNA-Fragment.

Die als Sonde einzusetzende doppelsträngige DNA wird zunächst für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Sobald ein Hexanukleotid des Reaktionsgemisches als Primer an den DNA-Strang binden kann, wird der komplementäre Strang durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase synthetisiert. Durch Zugabe von ^{32}P -Desoxycytidin-Triphosphat (Amersham, Freiburg) und einer Mischung der übrigen Nukleotide wird der komplementäre DNA-Strang als radioaktiv markierte Sonde gebildet.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten werden die nicht inkorporierten Nukleotide durch Zentrifugation des Reaktionsansatzes auf *Quick Spin* Säulen, Sephadex G50 (Amersham, Freiburg), abgetrennt.

3.3.9 Vor- und Haupthybridisierung

Die Membranen wurden zunächst über 2 Stunden bei 65°C mit 100 µg/ml Fisch-DNA enthaltender Hybridisierungslösung (10% Dextransulfat, 1 M NaCl, 1% SDS in DEPC-Wasser) vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen der Sonde zu minimieren. Anschließend wurde die Haupthybridisierung über 24 Stunden bei 65°C mit der jeweiligen Sonde in Hybridisierungslösung durchgeführt.

3.3.10 Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle

Nach der Haupthybridisierung wurden die Membranen zunächst jeweils zweimal 15 Minuten mit 2x SSC in DEPC-Wasser bei Raumtemperatur und 0,5x SSC in DEPC-Wasser bei 65°C gewaschen. Danach folgte eine zweistündige Exposition einer Bildplatte des Fuji *Bio-Imaging Analysers* BAS 1500 (Fujifilm, Japan). Diese aus Europium-Kristallen bestehenden Schirme ermöglichen eine erste Auswertung der markierten Membranen.

Anschließend wurde ein Autoradiographiefilm (Amersham, Freiburg) über 24 Stunden mit Hilfe eines so genannten *Hyperscreens* bei -80°C exponiert. Dieser Schirm absorbiert die Strahlung starker β -Strahler und gibt sie in Form von Licht wieder ab, das den Film schwärzt. Die densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms Tina 2.0 (Raytest GmbH, Straubenhardt) durchgeführt.

Die Membranen wurden im Anschluss an die Detektion mit 0,1% SDS in DEPC-Wasser gewaschen, um die gebundenen Sondenmoleküle zu entfernen. Anschließend folgte eine zweite Hybridisierung mit einer β -Aktin-Gensonde. Die RNA dieses Haushaltsproteins diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele.

3.4 Western-Blot-Analyse

Beim Western-Blot-Verfahren werden Proteine mit immunochemischen Methoden detektiert (Towbin et al., 1979). Dazu werden die Zellen nach der Inkubation lysiert und das Gesamtprotein mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Lämmli, 1970). Anschließend transferiert man die Proteine mit Blotting-Verfahren auf eine Membran. Die Detektion der Proteine erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper.

3.4.1 Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse

Die Zellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum wurden die Zellen mit den Substanzen über weitere 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet und in Lysispuffer (Tris, EDTA, 1% Triton X-100, 1 μ M PMSF) resuspendiert.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit Hilfe eines Kits der Firma Bio-Rad (München) vorgenommen. Hierbei bilden Proteine Komplexe mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau, die über ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. Der Proteingehalt wird anschließend über eine Kalibriergerade berechnet, die parallel zu den Proben mit Rinderserumalbumin (12,5 – 200 μ g/ml) erstellt wurde.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten eine negative Ladung. Da diese zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt (Sambrook et al., 1989).

Bei der verwendeten Methode nach Lämmli (Lämmli, 1970) werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5% Polyacrylamid konzentriert und anschließend im 15%igen Trenngel aufgetrennt. Es wurden vertikale Minigel-Elektrophoresekammern von Biometra (Göttingen) verwendet.

Die Proben (20-100 μ g Protein) wurden mit 5fach konzentriertem Ladepuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA, 2% SDS, 2% Glycerol) und 2,5 M Dithiothreitol versetzt und über 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 V über 3-4 Stunden in den mit Laufpuffer (50 mM Tris-HCl, 384 mM Glycin, 0,1% SDS) gefüllten Gelkammern. Als Molekulargewichtsmarker diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgrößen (Gibco, Mannheim).

3.4.4 Protein-Transfer durch Western-Blot

Das Proteinmuster des Gels wurde mit Hilfe des *Tankblot*-Verfahrens in einem vertikalen Puffertank (Eigenbau) auf eine Nitrocellulosemembran (Biometra, Göttingen) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 100 mA und 5°C über 14-16 Stunden. Hierbei diente der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker zur Kontrolle der Transfereffizienz (Sambrook et al., 1989). Zur Kontrolle der Beladung wurden die Gele nach dem Transfer mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt und fotografiert (Silhavy et al., 1984).

3.4.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung (Tris-Puffer mit 4% fettfreiem Trockenmilchpulver) inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper über 2 Stunden (Shibahara et al., 1985).

Antikörper	Inkubationszeit	Lösung	Hersteller
HO-1	2 Stunden	1:1000 in 25% Blockierungslösung, 65% Tris/Tween, 10% BSA (0,1 mg/ml)	Alexis, Grünberg

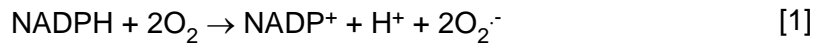
Tabelle 2: Erstantikörper

Nach zweimaligem Waschen der Membranen mit Blockierungslösung folgte die 30minütige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Anti-Kaninchen IgG-HRP; Sigma, Taufkirchen). Im Anschluss wurden die Membranen dreimal 5 Minuten mit Blockierungslösung und zweimal 10 Minuten mit Tris-Puffer (mit 0,5% Tween) gewaschen.

Zur Detektion der gebundenen Zweitantikörper wurde der ECL-Plus-Detektions-Kit der Firma Amersham (Freiburg) eingesetzt. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm. Diese kann durch die Exposition eines Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL; Amersham, Freiburg) mit der Membran nachgewiesen werden. Die Expositionszeit lag bei 1-10 Minuten.

3.5 Bestimmung freier Sauerstoffradikale

Durch Inkubation von Zellen mit NADPH wird die NADPH-abhängige Oxidase stimuliert, Superoxidradikale zu bilden [1] (Griendling et al., 2000; Guzik et al., 2000).



Die Konzentration an Superoxidradikalen kann mit Hilfe von Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz am Luminometer gemessen werden (Li et al., 1998; Tarpey et al., 1999). Durch Vorbehandlung oder direkte Inkubation der Zellen mit potenziell antioxidativ wirkenden Substanzen lässt sich an diesem Modell deren Auswirkung auf die intrazelluläre und extrazelluläre Konzentration an Superoxidradikalen bestimmen.

3.5.1 Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung

Für die Messung wurde die jeweilige Zelllinie in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation in Medium ohne Serum wurde zur Bestimmung genomischer Effekte anschließend über 24 Stunden mit den Substanzen vorinkubiert. Der Hemmstoff SnPP wurde 15 Minuten vor den NO-NSAIDs zugesetzt. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA geerntet. Nach Zentrifugation über 5 Minuten bei 4°C wurden die Zellpellets in PBS resuspendiert und mit 100 µM NADPH und 50 µM Lucigenin für 10 Minuten inkubiert. Die Bestimmung direkter, substanzspezifischer Effekte erfolgte ohne Vorinkubation durch simultane Zugabe der Substanzen und Reagenzien zu den resuspendierten Zellpellets.

3.5.2 Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz

Für die Entstehung der Chemilumineszenz durch die Reaktion von Lucigenin (Bis-N-methylacridiniumnitrat) mit dem Superoxidradikal wird folgender Mechanismus diskutiert. Das Lucigenin-Kation (Luc^{2+}) nimmt zunächst ein Elektron auf und wird zum Radikal reduziert ($\text{Luc}^{\cdot+}$) [2]. Dieses reagiert mit dem Superoxidradikal zu einem instabilen Dioxethan-Intermediat. Bei dessen Zerfall entsteht ein angeregtes Acridon, welches beim Rückfall in den Ruhezustand Licht emittiert [3] (Tarpey et al., 1999; Vasquez-Vivar et al., 1997).



Die Photonen können mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt werden. Als Rohdaten erhält man so genannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden.

Die Messung wurde mit dem Luminometer Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Wildbad) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.6 Material

Alexis Deutschland, Grünberg	cGMP-EIA-Kit, HO-1-Antikörper, ODQ, SNAP, SnPP
American Type Culture Collection (ATCC)	AGS (ATCC CRL 1739), KATO-III (ATCC HTB 103), LLC-PK-1 (ATCC CL 101)
Amersham, Freiburg	Dextransulfat, ECL Plus Detektionsreagenz, ³² P-dCTP, Quick Spin Säulen
AstraZeneca, Södertälje, Schweden	AZD3582 (NO-Naproxen)
Aventis, Frankfurt/Main	SIN-1
Bio-Rad, München	Bradford-Reagenz
European Collection of Cell Cultures (ECACC), Wiltshire, UK	ECV 304 (ECACC 92091712)
Gibco, Eggenstein	Agarose, fetales Kälberserum, Fisch-DNA, PBS, Penicillin/Streptomycin, SDS, Trypsin/EDTA, Tris,
Invitrogen, Karlsruhe	Protein-Marker, Trizol-Reagenz
Merck	Ethanol, Isopropanol
MSD Deutschland, Haar	Rofecoxib
NicOx, Sophia Antipolis, Frankreich	NCX 4016 (NO-ASS), Acetylsalicylsäure NCX 2216 (NO-Flurbiprofen), Flurbiprofen
Promega, Mannheim	DNA-Standard
Qiagen, Hilden	Plasmid Midi Isolations Kit, Gel Extraktions Kit
Roche, Penzberg	<i>Random Primed DNA Labeling Kit</i> , Restriktionsenzyme

Roth, Mannheim	Chloroform, DEPC, DMSO, EDTA, Formaldehyd, Formamid, MOPS, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Polyacrylamid
Schwarz Pharma AG, Monheim	GTN
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	8-Br-cGMP, Bilirubin, CdCl ₂ , Cycloheximid, DTT, Ethidiumbromid, Glutamin, Hämoglobin, IBMX, KT5823, Lucigenin, NAC, NADPH, Naproxen, PD098059, PMSF, RNA-Standard, SB203580, SOD, SP600125, Triton-X 100, Zellkulturmedien

3.7 Substanznummern der NO-NSAIDs

Die verwendeten NO-NSAIDs werden in der Literatur zum Teil mit ihren Substanznummern der Herstellerfirma NicOx (Sophia Antipolis, Frankreich) bezeichnet. NO-Naproxen trägt zusätzlich eine Nummer, die vom Lizenznehmer AstraZeneca (Södertälje, Schweden) stammt (s. Tabelle 3).

NO-NSAID	NicOx-Bezeichnung	AstraZeneca-Bezeichnung
NO-ASS	NCX 4016	-
NO-Flurbiprofen	NCX 2216	-
NO-Naproxen	HCT 3012	AZD3582

Tabelle 3: Substanznummern

3.8 Puffer und Substanzlösungen

3.8.1 Puffer

PBS: 138,0 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 8,1 mM Natriumhydrogenphosphat, 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,3 bei 37°C

MOPS: 20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0 bei 37°C

SSC: 0,15 M Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0 bei 37°C

Tris-Puffer: 20 M Tris, pH 7,4 bei 37°C

Ladepuffer für RNA-Agarose-Gelelektrophorese: 400 µl Formamid, 140 µl Formaldehyd, 80 µl 10x MOPS, 8 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)

Laufpuffer für RNA-Agarose-Gelelektrophorese: 1x MOPS

Ladepuffer für Polyacrylamid-Gelelektrophorese: 0,1 M Tris, 0,01 M EDTA, 2% SDS, 20% Glycerol

Laufpuffer für Polyacrylamid-Gelelektrophorese: 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1 % SDS

Lysispuffer zur Proteinisolation: 25 mM Tris, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7,4 bei 37°C.

3.8.2 Substanzlösungen

NO-Naproxen, NO-ASS, NO-Flurbiprofen, Naproxen, ASS und Flurbiprofen wurden in entsprechenden Mengen DMSO gelöst und so vorverdünnt, dass die Endkonzentration an DMSO bei 1 µl/ml im Inkubationsansatz lag. Zur weiteren Verdünnung der DMSO-Lösungen wurde PBS verwendet. Alle Lösungen wurden am Versuchstag frisch hergestellt.

Die cGMP-Analoga wurden in PBS gelöst und als Stammlösung (10 mM) bei -20°C gelagert.

Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

SnPP und ODQ wurden als Stammlösungen (20 bzw. 50 mM) in DMSO bei -20°C gelagert. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

GTN wurde als Stammlösung (44 mM) in DMSO bei 4-8°C gelagert. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

CHX wurde als „Ready Made“ Lösung (10 mg/ml) gekauft. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

IBMX wurde am Versuchstag in DMSO (50 mM) gelöst und in PBS auf die Einsatzkonzentration 5 mM verdünnt.

Hämoglobin, Bilirubin, SIN-1, Lucigenin und NADPH wurden frisch in den entsprechenden Mengen in PBS gelöst.

3.9 Statistik

Bei den Messungen der cGMP-Stimulation und der Chemilumineszenz sind alle Messdaten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von n unabhängigen Experimenten angegeben. Die videodensitometrischen Daten der Northern-Blot-Analysen basieren auf n = 3-6 unabhängigen Experimenten. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni's multipler Vergleichstest angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit P von $\alpha \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.