

**Untersuchungen zur Regulation der Hämoxygenase-1  
durch cAMP-abhängige Prostaglandine**

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Stephan Schürger

geb. am: 19. Oktober 1978 in Erlangen

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. W. Sippl, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. H. Schröder, Minneapolis (USA)
3. Prof. Dr. T. Hohlfeld, Düsseldorf

Halle (Saale), den 3. Juli 2008 (Tag der Verteidigung)

**urn:nbn:de:gbv:3-000014092**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014092>]



*Meinen Eltern und meinem Bruder Alex*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Prostaglandine</b>	<b>7</b>
1.1.1 Biochemie der Prostaglandine	7
1.1.1.1 Nomenklatur, Struktur und Biosynthese	7
1.1.1.2 Prostanoidrezeptoren	9
1.1.1.3 Physiologische Funktionen der Prostaglandine	10
1.1.1.4 Prostaglandine und Atherosklerose	11
1.1.2 Biosynthese, Wirkungen und therapeutischer Einsatz der untersuchten Prostaglandine	14
1.1.2.1 Alprostadil (PGE <sub>1</sub> )	14
1.1.2.2 Iloprost (Prostacyclinanalogon)	16
1.1.2.3 Prostaglandin F <sub>2α</sub> (PGF <sub>2α</sub> )	17
1.1.2.4 15-Deoxy-Δ <sup>12,14</sup> -prostaglandin J <sub>2</sub> (d-PGJ <sub>2</sub> )	17
<b>1.2 Die Hämoxygenase</b>	<b>19</b>
1.2.1 Konstitutive und induzierbare Isoformen der Hämoxygenase	19
1.2.2 HO-1-Produkte und Ferritin	19
1.2.3 HO-1 als protektives Protein und therapeutische Zielstruktur	21
<b>1.3 Genregulation der HO-1</b>	<b>23</b>
1.3.1 Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden mit Einfluss auf die HO-1-Genregulation	23
1.3.1.1 Transkriptionsfaktoren	23
1.3.1.2 Vorgeschaltete Signalkaskaden	24
1.3.2 Genregulation der HO-1 durch cAMP-abhängige Signalwege und CREB	25
<b>2 PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>27</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Zellkultur</b>	<b>29</b>
3.1.1 Kultivierung der Endothelzellen	29
3.1.2 Kultivierung der Makrophagen	29
3.1.3 Kultivierung der Nierenepithelzellen	29
3.1.4 Kultivierung der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen	29
<b>3.2 Western-Blot-Analyse</b>	<b>30</b>
3.2.1 Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse	30
3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford	30
3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.2.4 Proteintransfer durch Western-Blot	31
3.2.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern	31

<b>3.3</b>	<b>Genreporter-Assay</b>	<b>32</b>
3.3.1	Konstruktion von Reporterplasmiden	32
3.3.2	Transformation von kompetenten Zellen	33
3.3.3	Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA	33
3.3.4	Identifikation durch Restriktionsverdau	33
3.3.5	Transfektion	34
3.3.6	Inkubationsprotokoll zum Genreporter-Assay	34
3.3.7	Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay	34
<b>3.4</b>	<b>Biolumineszenz-Assay</b>	<b>35</b>
3.4.1	Inkubationsprotokoll zur Biolumineszenzmessung	35
3.4.2	Biolumineszenzmessung	36
<b>3.5</b>	<b>Northern-Blot-Analyse</b>	<b>36</b>
3.5.1	DNA-Sonden	36
3.5.2	Inkubationsprotokoll zur Northern-Blot-Analyse	37
3.5.3	RNA-Isolierung	37
3.5.4	RNA-Gelelektrophorese	37
3.5.5	RNA-Fixierung auf Nylon-Membranen durch Vakuum-Blotting	37
3.5.6	Markierung der DNA-Sonde mit <sup>32</sup> P-Desoxycytidintriphosphat	38
3.5.7	Vor- und Haupthybridisierung	38
3.5.8	Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle	38
<b>3.6</b>	<b>Bestimmung der cyclischen Nukleotide</b>	<b>39</b>
3.6.1	Inkubationsprotokoll zur Bestimmung von cAMP/cGMP	39
3.6.2	Probenaufarbeitung	39
3.6.3	Enzymimmunoassay (EIA)	39
<b>3.7</b>	<b>Bestimmung der Hämoxygenase-Aktivität</b>	<b>40</b>
3.7.1	Inkubationsprotokoll zur Aktivitätsmessung	40
3.7.2	Probenaufarbeitung	40
3.7.3	HO-Aktivitätsbestimmung	40
<b>3.8</b>	<b>Bestimmung freier Sauerstoffradikale</b>	<b>42</b>
3.8.1	Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung	42
3.8.2	Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz	42
<b>3.9</b>	<b>Material</b>	<b>43</b>
<b>3.10</b>	<b>Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien</b>	<b>44</b>
3.10.1	Substanzen	44
3.10.2	Puffer	44
3.10.3	Lösungen	45
3.10.4	Medien	46
<b>3.11</b>	<b>Statistik</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Induktion auf translationaler Ebene</b>	<b>47</b>
4.1.1	Konzentrationsabhängige Induktion des HO-1-Proteins	47
4.1.1.1	Effekt von PGE <sub>1</sub>	47

4.1.1.2	Effekt von Iloprost	49
4.1.1.3	Effekte von weiteren Prostaglandinderivaten	50
4.1.2	Zeitabhängige Induktion des HO-1-Proteins	52
4.1.3	Induktion des Ferritinproteins	53
4.1.4	Zusammenfassung	56
<b>4.2</b>	<b>Induktion auf transkriptioneller Ebene</b>	<b>57</b>
4.2.1	Promotorstudien	57
4.2.1.1	Effekte von PGE <sub>1</sub> auf humane HO-1-Promotorkonstrukte	58
4.2.1.2	Effekte von PGE <sub>1</sub> auf murine HO-1-Promotorkonstrukte	59
4.2.1.3	Vergleich der Effekte verschiedener Prostaglandine auf den humanen HO-1-Promotor	60
4.2.2	Biolumineszenz-Assay	61
4.2.3	Induktion der HO-1-mRNA	62
4.2.4	Zusammenfassung	63
<b>4.3</b>	<b>Funktionelle Untersuchungen</b>	<b>64</b>
4.3.1	Effekt von PGE <sub>1</sub> auf die Hämooxygenase-Aktivität	64
4.3.2	Effekte in einem Modell für oxidativen Stress	65
4.3.2.1	Einfluss des HO-1-Produkts Bilirubin	65
4.3.2.2	Antioxidative Eigenschaften von PGE <sub>1</sub>	66
4.3.3	Zusammenfassung	68
<b>4.4</b>	<b>Molekulare Mechanismen der HO-1-Induktion durch Prostaglandinderivate</b>	<b>69</b>
4.4.1	Messung der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP	69
4.4.1.1	Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit PGE <sub>1</sub>	69
4.4.1.2	Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit Iloprost	72
4.4.1.3	Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit anderen Prostaglandinderivaten	73
4.4.1.4	Bestimmung der intrazellulären cGMP-Spiegel nach Stimulation mit PGE <sub>1</sub>	74
4.4.2	Effekt eines cAMP-Analogons auf die HO-1-Induktion	75
4.4.2.1	Effekt von db-cAMP auf die HO-1-Proteinexpression	75
4.4.2.2	Effekt von db-cAMP auf die Aktivität des HO-1-Promotors	76
4.4.3	Einfluss eines Inhibitors der Adenylatcyclase auf die HO-1-Induktion durch PGE <sub>1</sub>	78
4.4.3.1	Einfluss von DDA auf die PGE <sub>1</sub> -induzierte HO-1-Proteinexpression	78
4.4.3.2	Einfluss von DDA auf die PGE <sub>1</sub> -induzierte HO-1-Promotor-Aktivität	79
4.4.4	Einfluss von Proteinkinase-Inhibitoren auf die HO-1-Induktion	80
4.4.4.1	Einfluss von Proteinkinase-Inhibitoren auf die PGE <sub>1</sub> -induzierte HO-1-Promotoraktivität	80
4.4.4.2	Einfluss eines PKA-Inhibitors auf die PGE <sub>1</sub> -induzierte HO-1-Proteinexpression	81
4.4.5	Beteiligung von CRE an der HO-1-Signalkaskade	82
4.4.6	Zusammenfassung	83

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>118</b>
<b>8.1</b>	<b>Originalarbeiten</b>	<b>118</b>
<b>8.2</b>	<b>In Kurzform publizierte Vorträge und Poster (Abstracts)</b>	<b>118</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>119</b>



## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MSH	<i><math>\alpha</math>-melanocortin-stimulating-hormon</i>
AA	Arachidonsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	<i>Activator protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>antioxidant response element</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bbf	<i>B site binding factor</i>
BLI	Biolumineszenz-Imaging
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BVR	Biliverdinreduktase
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CRE	<i>cAMP-response element</i>
CREB	<i>cAMP-response element-binding protein</i>
CRP	C-reaktive Protein
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
db-cAMP	<i>N<sup>6</sup>,2'-O-Dibutyryl-adenosine 3',5'-cyclic monophosphat</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DAG	Diacylglycerol
DDA	2',3'-Dideoxyadenosin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGLA	Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	PGD-Rezeptor
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d-PGJ <sub>2</sub>	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J <sub>2</sub>
EDRF	<i>Endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
EP	PGE-Rezeptor
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FP	PGF-Rezeptor
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HO-1	Hämoxygenase-1
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IP	PGI-Rezeptor
IRE	<i>Iron-responsive element</i>
IRE-BP	<i>Iron-responsive element binding protein</i>

JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kB	Kilobase
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginin-methylester
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MARE	<i>Maf recognition element</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
NSAIDs	nichtsteroidale antiphlogistische Analgetika
ODQ	1-H-(1,2,4)-Oxadiazol-(4,3a)quinoxalin-1-on
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub> (Alprostadil)
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin (Iloprost)
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PI3K	Phosphoinositid-3'-Kinase
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
RLU	<i>Relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of mean</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TP	TXA <sub>2</sub> -Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Thromboxan
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VSCM	<i>vascular smooth muscle cells</i>