

**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

1 Einleitung

1.1 Nichtsteroidale Antiphlogistika

1.1.1 Erwünschte und unerwünschte Wirkungen der klassischen NSAIDs

Vor mehr als 100 Jahren wurde Acetylsalicylsäure (ASS) als fiebersenkendes Schmerzmittel und Entzündungshemmer in die Therapie eingeführt. Es folgten zahlreiche verwandte Substanzen, die heute die Arzneistoffgruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs, *Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs*) bilden. Erst 1971 konnte geklärt werden, dass die Wirkung auf einer Hemmung der Cyclooxygenase (Prostaglandin-H-Synthase) beruht, die Arachidonsäure in die Vorstufen der Prostaglandine, des Thromboxans und des Prostacyclins überführt (Vane, 1971).

Prostaglandine sind sowohl an der Erregung und Sensibilisierung von Schmerzrezeptoren als auch an der Entstehung von Fieber und entzündlichen Reaktionen beteiligt. Daher wirken NSAIDs sowohl analgetisch als auch antipyretisch und antiphlogistisch. Durch Eingriff in die Thromboxansynthese hemmen NSAIDs die Plättchenaggregation und wirken antithrombotisch. Hier hat ASS die größte Bedeutung, da die Cyclooxygenase der Thrombozyten durch Acetylierung irreversibel blockiert wird (Reilly & FitzGerald, 1988).

NSAIDs gehören zu den am häufigsten angewendeten Präparaten bei Schmerzen, Migräne und Fieber sowie entzündlichen und degenerativen Gelenkerkrankungen. ASS wird in niedriger Dosierung als Thrombozytenaggregationshemmer oftmals über Jahre zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse eingenommen.

NSAIDs werden im Allgemeinen gut vertragen. Länger andauernde Therapien und die Einnahme höherer Dosen gehen jedoch mit einer Vielzahl unerwünschter Wirkungen einher, die vor allem den Gastrointestinaltrakt und die Niere betreffen. Dabei kommt es häufig zu dyspeptischen Beschwerden und an den Schleimhäuten im Gastrointestinaltrakt zu oberflächlichen Erosionen bis hin zu tiefer reichenden Läsionen, die zu subepithelialen Blutungen und zur Bildung von Ulzera führen können. Die Nierenfunktion wird durch verminderte Ausscheidung von Natriumionen und Wasser gestört, was erhöhten Blutdruck und Ödembildungen hervorrufen kann (Hawkey & Langman, 2003; Rainsford, 1999; Wolfe et al., 1999).

Schädigungen der Schleimhaut treten am häufigsten im Magen auf, doch auch der Dünndarm kann betroffen sein (Bjarnason et al., 1993). Das Risiko NSAID-induzierter Komplikationen steigt mit zunehmendem Alter, bei gleichzeitiger Einnahme von Corticoiden oder Antikoagulanzen sowie bei gastrointestinalen Blutungen und Ulkus in der Vorgeschichte. Ob das Geschlecht, Rauchen, Alkoholkonsum oder die Besiedlung mit *Helicobacter pylori* eine Rolle spielen, ist noch nicht eindeutig geklärt (Simon et al., 1996; Wolfe et al., 1999). Die Störung der Nierenfunktion stellt einen besonderen Risikofaktor bei Hypertonikern und herzinsuffizienten Patienten dar.

Nicht nur den erwünschten, sondern auch den unerwünschten Wirkungen der NSAIDs liegt die systemische Hemmung der Prostaglandin-Synthese zugrunde. Daher konnten sowohl die parenterale Gabe als auch die Synthese von Prodrugs oder die Formulierung magenresistenter Manteltabletten die Magenverträglichkeit der NSAIDs nur geringfügig verbessern (Wolfe et al., 1999).

1.1.2 Schutzmechanismen der Magenschleimhaut

Die Magenschleimhaut ist einer Vielzahl von potenziell schädigenden Agenzien ausgesetzt. Dazu zählen insbesondere die Magensäure, physiologische Detergenzien (z.B. Gallensalze), Pepsine, bakterielle Produkte und exogene Substanzen wie Arzneistoffe und Alkohol. Um einer Schädigung vorzubeugen, hält die Schleimhaut im physiologischen Zustand ein komplexes System an protektiven Mechanismen aufrecht, das als Mukosabarriere bezeichnet wird (Wallace & Granger, 1996).

Die erste Barriere besteht aus der Sekretion von Säure, Schleim und Bicarbonat. Die Säure wirkt antibakteriell und verhindert die Ausbreitung mit der Nahrung aufgenommener Keime. Die Schleimschicht schützt vor mechanischen und enzymatischen Angriffen und hält mit Hilfe der Pufferfunktion der Bicarbonationen einen pH-Gradienten zwischen pH 7 in den Epithelzellen und pH 2 im Magenlumen aufrecht.

Als zweite Barriere dient die Epithelzellschicht. Die Intaktheit aller Zellmembranen und interzellulären Schlussleisten des Oberflächenepithels ist essentiell für die Integrität der Mukosa. Im Fall einer Schädigung existieren rasch aktivierbare Mechanismen zur Regenerierung des Epithels (Paimela et al., 1995).

Das als gastrale Mikrozirkulation bezeichnete Blutgefäßsystem hält einen dritten Abwehrmechanismus aufrecht. Wenn durch eine Schädigung der Mukosa Säure und andere aggressive Faktoren in den subepithelialen Raum eindringen, erfolgt durch Aktivierung afferenter Sensornerven ein rapider Anstieg des Blutflusses. Diese reaktive Hyperämie ermöglicht die Abpufferung der Säure, den Abtransport toxischer Substanzen und die Versorgung von Wundheilungsprozessen mit Plasma (Holzer & Sametz, 1986; Wallace, 2001).

Ein vierter Abwehrmechanismus ist das mukosale Immunsystem bestehend aus verschiedenen Zelltypen, die als Wächter fungieren. Insbesondere Mastzellen und Makrophagen werden durch Antigene und Endotoxine aktiviert, setzen Mediatoren frei und rufen dadurch eine lokale Entzündungsreaktion hervor.

Die fünfte und letzte Stufe der Abwehr wird aktiviert, wenn eine Ulzeration der Mukosa entstanden ist. Unter diesen Umständen werden Reparaturmechanismen induziert, die das Zellwachstum, die Angiogenese neuer Blutgefäße und die Re-Innervierung der Mukosa koordinieren (Wallace & Ma, 2001).

Eine wichtige Mediatorfunktion zum Schutz der Mukosa besitzen die Prostaglandine. Sie stimulieren die Sekretion von Schleim und Bicarbonat und regulieren die Durchblutung und den Gefäßtonus der gastralen Mikrozirkulation (Hawkey & Rampton, 1985).

Auch die Entzündungsreaktion im Fall einer Aktivierung von Mastzellen und Makrophagen in der Mukosa wird von Prostaglandinen kontrolliert. So werden die Freisetzung von Tumor Nekrose Faktor(TNF)- α und Interleukin-1 aus Makrophagen und die Produktion des Chemotaxins Leukotrien B₄ in neutrophilen Granulozyten gehemmt. Prostaglandine blockieren außerdem die Freisetzung von Histamin, TNF- α und PAF (Plättchen-aktivierender Faktor) aus Mastzellen (Wallace & Ma, 2001). Ebenso hemmen sie die Expression von Adhäsionsmolekülen und damit die Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten und deren Migration in das Gefäßendothel der gastralen Mikrozirkulation (Asako et al., 1992).

Als zweiter essentieller Mediator der Mukosa-Protektion fungiert Stickstoffmonoxid (NO), das größtenteils in Synergie mit den Prostaglandinen wirkt.

1.1.3 Bedeutung von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid wird endogen durch die Familie der NO-Synthasen aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Sauerstoff gebildet. Man unterscheidet bisher drei Isoenzyme, die Produkte verschiedener Gene sind. Die konstitutiven NO-Synthasen eNOS (endotheliale NOS) und nNOS (neuronale NOS) werden vorwiegend in Endothelzellen und neuronalen Zellen exprimiert. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird nach exogener Stimulation vor allem in Makrophagen, aber auch in Endothelzellen und glatten Muskelzellen gebildet (Förstermann et al., 1994).

Wichtige physiologische Funktionen von Stickstoffmonoxid werden über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase vermittelt. Die Guanylatcyclase katalysiert die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat (Ignarro, 1999). Als *second messenger* ist cGMP in der Lage, unter anderem Calcium-Ionenkanäle zu regulieren und sowohl Phosphodiesterasen als auch Proteinkinasen zu aktivieren (Denninger & Marletta, 1999).

In Endothelzellen gebildetes NO ist wichtigster Regulator der Durchblutung und des Gefäßtonus. Als *Endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) vermittelt Stickstoffmonoxid über Aktivierung der Guanylatcyclase die gefäßerweiternde Wirkung des Acetylcholins (Ignarro et al., 1987). Durch Absenkung des intrazellulären Calciumionen-Spiegels kommt es zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und damit zur Gefäßerweiterung. Die endothelialen NO-Synthasen werden sowohl durch eine Erhöhung des Calciumspiegels als auch durch verschiedene vasoaktive Substanzen (Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Thrombin u.a.) und Scherkräfte aktiviert. Eine wichtige Rolle spielt die eNOS in den Endothelzellen der gastralen Mikrozirkulation bei der Induktion der reaktiven Hyperämie. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der NO-Synthase die hyperämische Reaktion verhindert und so zur Schleimhautschädigung führt (Lippe & Holzer, 1992).

Eine weitere physiologische Aufgabe von NO ist die Regulation der Thrombozytenfunktion. NO hemmt deren Aggregation, die Adhäsion an Gefäßwände und die Sekretion vasoaktiver Substanzen durch aktivierte Thrombozyten. Dadurch wirkt NO antithrombotisch und hält die Durchblutung aufrecht. Auch diese Effekte werden über die Aktivierung der Guanylatcyclase vermittelt. (Lowenstein et al., 1994).

Die Epithelzellen der Magenschleimhaut bilden ebenfalls NO und tragen dadurch zur physiologischen Integrität der Mukosa bei. NO stimuliert über Aktivierung der Guanylatcyclase die Produktion und Sekretion von Schleim (Brown et al., 1993). Darüber hinaus stimuliert NO den Transport von Chloridionen aus dem Epithel in das Lumen und damit die Sekretion von Flüssigkeit. Eine gesteigerte Flüssigkeitssekretion vermindert die Adhäsion von Bakterien und verdünnt die Konzentration schädigender Agenzien (Wallace & Miller, 2000). Im Duodenum trägt NO auch zur Sekretion von Bicarbonat bei (Holm et al., 1998).

Im zentralen und peripheren Nervensystem hat NO Bedeutung als Neurotransmitter, der unabhängig von Synapsen Signale zwischen Zellen weiterleiten kann. So spielt NO im zentralen Nervensystem nicht nur bei der Schmerzwahrnehmung sondern auch bei der Ausprägung von Neuronen, bei der Gedächtnisfunktion und bei Lernvorgängen eine wichtige Rolle (Morris et al., 1992). Im peripheren Nervensystem reguliert NO als Neurotransmitter der NANC(nicht adrenerg nicht cholinerg)-Neuronen die Peristaltik des Gastrointestinaltrakts, insbesondere die direkte Relaxation der glatten Muskulatur (Martin et al., 2001).

Durch iNOS-Enzyme gebildetes NO agiert als Modulator der Wundheilung, von Entzündungsprozessen und der unspezifischen Immunabwehr.

Durch Stimulation der Angiogenese und der Kollagensynthese in Wundfibroblasten beschleunigt Stickstoffmonoxid die Heilung von Wunden und damit auch von gastralen

Ulzera. Während eine Hemmung der NOS die Heilungsprozesse verzögert, tragen NO-Donoren zur Heilung bei (Elliott et al., 1995; Schaffer et al., 1997). Auch eine gute Durchblutung am Rande der Wunde ist für die Heilung essentiell und wird durch NO positiv beeinflusst (Martin et al., 2001).

In Abhängigkeit von der Konzentration kontrolliert Stickstoffmonoxid Cytokin-vermittelte Entzündungsreaktionen. Eine konstante NO-Freisetzung durch konstitutive NO-Synthasen stabilisiert Mastzellen und hemmt die Freisetzung von TNF- α und Interleukinen aus Makrophagen (Wallace & Ma, 2001). NO verhindert außerdem die Interaktionen von Leukozyten mit dem Gefäßendothel. Es konnte gezeigt werden, dass NO sowohl die Expression von β -2 Adhäsionsmolekülen auf neutrophilen Granulozyten als auch von P-Selektin auf Endothelzellen hemmt (Wallace & Miller, 2000). So führte eine Hemmung der NO-Synthase zur vermehrten Adhäsion neutrophiler Granulozyten (Kubes et al., 1991), während NO-freisetzende Verbindungen die Adhäsion der Leukozyten hemmten (Kosonen et al., 1999).

Doch NO fungiert nicht nur als antiinflammatorischer Mediator. Bei der unspezifischen Immunabwehr kommt es durch Cytokine und Endotoxine zur Aktivierung von Makrophagen und Leukozyten. Diese Zellen produzieren dann neben reaktiven Sauerstoffspezies hohe Konzentrationen an NO, wodurch vermehrt proinflammatorische und cytotoxische Effekte auftreten. Durch Interaktionen mit Metallionen und Thiolgruppen modifizieren NO und durch Reaktion mit Superoxid entstandenes Peroxynitrit Proteine und Nucleinsäuren derart, dass sie eine cytotoxische Wirkung auf pathogene Organismen und infizierte Zellen entfalten (Liew & Cox, 1991; Martin et al., 2001).

1.1.4 Entstehung einer NSAID-induzierten Schleimhautschädigung

Aufgrund ihres Säurecharakters rufen manche NSAIDs direkt topische Verletzungen der Magenschleimhaut hervor. Im sauren Milieu des Magens liegen die schwachen Säuren undissoziiert vor und können so leicht durch die Schleimschicht und die Zellmembranen des Epithels migrieren. Im Zellinneren dissoziieren sie aufgrund des höheren pH-Wertes, was zu einer Akkumulation von Protonen und damit zur Zellschädigung führt. Die Migration in die Schleimschicht verringert zusätzlich deren Hydrophobie, wodurch sich die Barrierefunktion verschlechtert (Schoen & Vender, 1989).

Schwerwiegender sind aber die systemischen Effekte der NSAIDs. Wird durch Hemmung der Cyclooxygenase die Synthese der Prostaglandine in den Epithelzellen reduziert, verringert sich die Produktion von Schleim und Bicarbonat, die Durchblutung der Mukosa nimmt ab und die Epithelzellen werden in ihrer Proliferation gehemmt. Die Mukosabarriere wird überwindbar. Säure und andere aggressive Faktoren können die Epithelschicht angreifen (Schoen & Vender, 1989; Whittle, 2003; Wolfe et al., 1999). Schon geringe Dosen von NSAIDs reichen aus, die Prostaglandin-Synthese in der Magenschleimhaut zu unterdrücken (Lee et al., 1994). Durch die Hemmung der Thromboxan-Synthese und damit der Plättchenaggregation können NSAIDs Magen-Darm-Blutungen verursachen und die Heilung bereits vorhandener Ulzera verzögern (Prichard et al., 1989).

Ein initialer Schritt der NSAID-induzierten Mukosaschädigung ist die Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel der gastralen Mikrozirkulation. NSAIDs induzieren durch Stimulation der Freisetzung proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α eine vermehrte Expression der Leukozyten-Adhäsionsmoleküle (Andrews et al., 1994; Santucci et al., 1994). Dadurch wird die Durchblutung auf zweierlei Art und Weise beeinträchtigt. Zum einen können sich durch vermehrte Adhäsion von Leukozyten Mikrothromben im Gefäßsystem bilden, was ischämische Situationen hervorrufen und zum Verschluss bis hin zur Ruptur der Gefäße führen kann. Zum anderen werden die

Endothelzellen direkt geschädigt. Durch Adhäsion aktivierte Leukozyten setzen Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid frei. Reaktive Sauerstoffspezies wirken cytotoxisch auf Endothelzellen, indem sie Lipidperoxidationen in den Zellmembranen initiieren sowie mit Proteinen und der DNA interagieren. Sauerstoffradikale reagieren außerdem direkt mit NO, wodurch in den Gefäßen ein Mangelzustand entsteht (Wallace, 1997). Dass oxidativer Stress zur Schädigung der Magenschleimhaut beiträgt, konnten In-vivo-Studien belegen. Antioxidanzien und die Infusion antioxidativer Enzyme wie Superoxiddismutase und Catalase entfalteten protektive Wirkungen (Takeuchi et al., 1991; Vaananen et al., 1991).

Darüber hinaus aktivieren NSAIDs das mukosale Immunsystem und bewirken eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Leukotrien B₄, Histamin und PAF aus aktivierten Makrophagen und Mastzellen. Diese sind nicht nur starke Vasokonstriktoren sondern erhöhen auch die Permeabilität der Epithelschicht und können durch Chemotaxis weitere Immunzellen anlocken und aktivieren (Wallace, 1997).

1.1.5 Weiterentwicklungen von NSAIDs

Anfang der Neunzigerjahre wurde erkannt, dass es sich bei der Cyclooxygenase (COX) um zwei unterschiedlich exprimierte Isoformen handelt (Fletcher et al., 1992; Needleman & Isakson, 1997). Man ging zunächst davon aus, dass die COX-1 als konstitutiv exprimiertes Enzym die physiologische Bildung der Prostaglandin-Derivate z.B. im Magen, in der Niere und in den Thrombozyten katalysiert, während die Expression der COX-2 erst bei Schmerz- und Entzündungsreaktionen durch Cytokine und Endotoxine induziert wird. Die klassischen NSAIDs sind Hemmstoffe beider Isoformen. Die Identifizierung der COX-2 führte zur Suche nach selektiven Hemmstoffen, die die erwünschten Wirkungen der NSAIDs hervorrufen und weniger gastrale und renale Nebenwirkungen verursachen sollten (FitzGerald & Patrono, 2001; Mitchell & Warner, 1999).

Die ersten Vertreter dieser als Coxibe bezeichneten Arzneistoffgruppe, Rofecoxib und Celecoxib, kamen 1999 auf den Markt. Ihre verminderte ulzerogene Wirkung konnte in der *VIGOR*- und der *CLASS*-Studie gezeigt werden, in denen die Coxibe das Risiko für gastrointestinale Komplikationen in etwa halbierten (Bombardier et al., 2000; Silverstein et al., 2000).

In den letzten Jahren belegten allerdings immer mehr Studien, dass die COX-2 nicht nur eine pathophysiologische Funktion besitzt. Das Enzym wird in der Niere, im Uterus sowie im zentralen Nervensystem und in der Magenschleimhaut konstitutiv exprimiert. Es spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (Zimmermann et al., 1998). Coxibe beeinflussen die Nierenfunktion durch Retention von Natriumionen und Wasser, erhöhen den Blutdruck und verursachen Ödembildungen. Diese Effekte waren durchaus mit denen äquivalenter Dosen nicht-selektiver NSAIDs vergleichbar (FitzGerald & Patrono, 2001; Hawkey & Langman, 2003). Die selektive Hemmung der COX-2 verzögerte im Tiermodell ebenfalls die Heilung von Magenzulzera (Mizuno et al., 1997; Schmassmann et al., 1998).

Noch schwerwiegender scheint aber ein sich abzeichnendes kardiovaskuläres Risiko der Coxibe zu sein (Mukherjee et al., 2001). So traten in der *VIGOR*-Studie unter Rofecoxib-Therapie fünfmal mehr Herzinfarkte auf als beim klassischen NSAID Naproxen. Die *CLASS*-Studie zeigte hingegen keinen Unterschied in der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse zwischen Coxib und klassischen NSAIDs. Allerdings durfte ASS als Thrombozytenaggregationshemmer eingenommen werden.

Eine Erklärung für das erhöhte Risiko könnte die fehlende plättchenhemmende Wirkung der Coxibe liefern. Coxibe verringern die Synthese des gefäßerweiternd und antiaggregatorisch wirkenden Prostacyclins (PGI₂) in den Gefäßen. Die COX-1-vermittelte Synthese des vasokonstriktiven und proaggregatorischen Thromboxans

(TxA₂) bleibt dagegen unbeeinflusst. Da Coxibe so das Gleichgewicht der funktionellen Antagonisten PGI₂ und TxA₂ in Richtung des prothrombotischen TxA₂ verschieben könnten, erhöhen sie möglicherweise das kardiovaskuläre Risiko (Mitchell & Warner, 1999; Weir et al., 2003).

Welche Vor- und Nachteile eine längerfristige Therapie mit Coxiben gegenüber klassischen NSAIDs mit sich bringt, muss noch in weiteren klinischen Studien geklärt werden. So könnte die gleichzeitige Gabe von ASS die kardiovaskulären Risiken der Coxibe ausgleichen, bei länger andauernder Therapie aber auch deren gastrointestinalen Vorteile zunichte machen. Für Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko, bestehender endothelialer Dysfunktion oder eingeschränkter Nierenfunktion erscheint eine Therapie mit Coxiben bis jetzt folglich eher problematisch.

Eine in den letzten Jahre entwickelte Alternative zu den klassischen NSAIDs und den Coxiben stellen die NO-NSAIDs oder CINODs (COX-inhibiting Nitric Oxide Donators) dar. Dabei handelt es sich um konventionelle NSAIDs wie ASS, Naproxen oder Flurbiprofen, die eine Stickstoffmonoxid-freisetzende Nitrooxybutyl- oder Nitrooxymethylphenyl-Gruppe tragen (Keeble & Moore, 2002; Muscara & Wallace, 1999; Wallace et al., 1994).

1.2 NO-NSAIDs

1.2.1 NO freisetzende NSAIDs

Eine Vielzahl von Studien lässt vermuten, dass Stickstoffmonoxid die gastroprotektive Funktion von Prostaglandinen unter einer Therapie mit COX-Hemmern übernehmen kann. Daher wurde untersucht, wie sich die gleichzeitige Gabe von NO und NSAIDs auf die Integrität der Mukosa auswirkt.

In diesen Studien schützten spontan NO-freisetzende Verbindungen und organische Nitrate wie Glyceroltrinitrat die Mukosa, indem sie die Durchblutung aufrecht hielten und die Leukozyten-Adhäsion am Gefäßendothel hemmten (Barrachina et al., 1995; Kosonen et al., 1999; Lopez-Belmonte et al., 1993). Ebenso wurde die Heilung gastraler Ulzera beschleunigt (Konturek et al., 1993). Konventionelle NO-Donoren haben jedoch unerwünschte systemische Wirkungen und die NO-Freisetzung verläuft schnell und kurzzeitig. Dies führte zur Entwicklung der NO-NSAIDs, in denen NO über eine Esterbindung an ein NSAID gekoppelt ist, was zu einer langsameren und länger andauernden NO-Freisetzung führt (Elliott et al., 1995; Wallace et al., 1994).

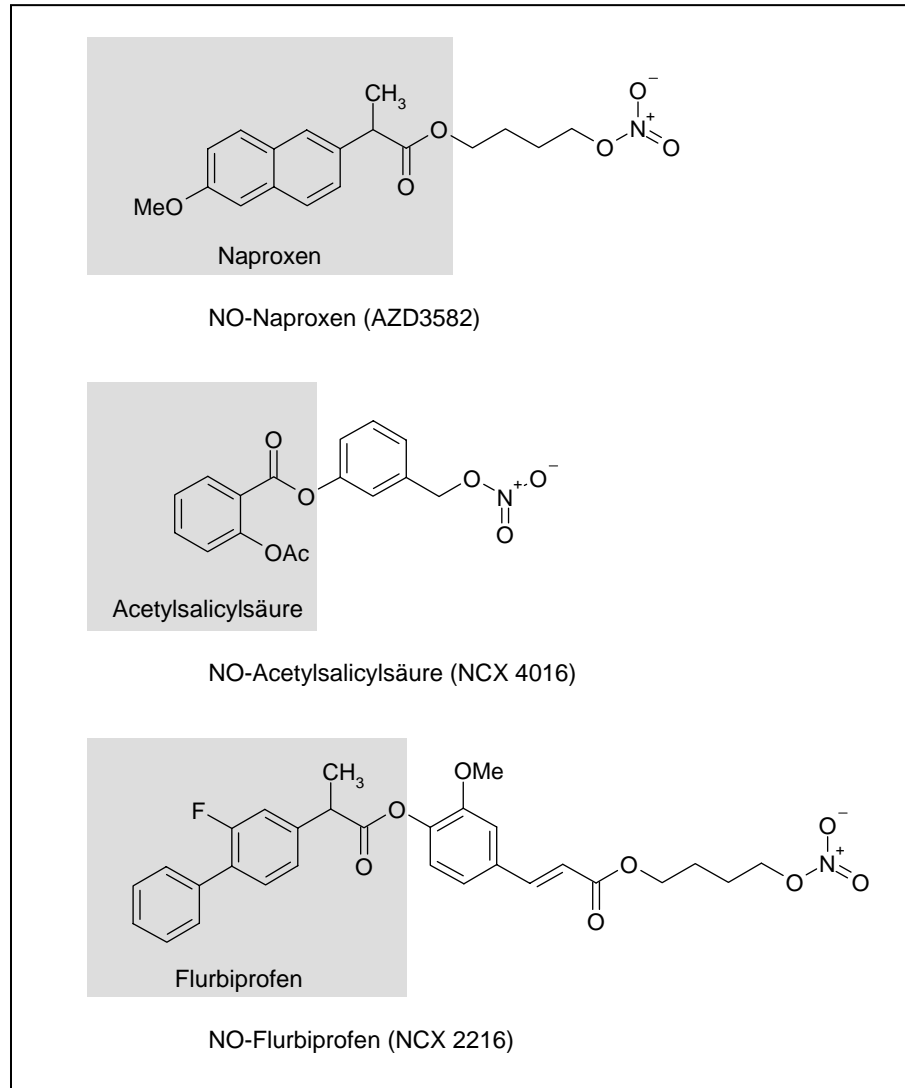


Abb. 1: Strukturen ausgewählter NO-NSAIDs

Die NO-NSAIDs zeigten in Tiermodellen akuter und chronischer Entzündungen antiinflammatorische und antipyretische Wirkungen, die mit denen der NO-freien Muttersubstanzen vergleichbar waren. Das NO-Derivat von Naproxen wirkte sogar stärker analgetisch als Naproxen selbst (Davies et al., 1997). Darüber hinaus hemmte NO-Acetylsalicylic acid (NO-ASS) die Plättchenaggregation effektiver als ASS (Momi et al., 2000). In allen Studien blieb der Gastrointestinaltrakt vor Schädigungen bewahrt. NO-NSAIDs verringerten weder die Durchblutung der Magenschleimhaut noch induzierten sie Leukozyten-Adhäsionsmoleküle auf dem Gefäßendothel. Auch Nierenfunktion und Blutdruck wurden durch NO-NSAIDs nicht beeinflusst (Wallace et al., 1994). Außerdem wurde gezeigt, dass NO-NSAIDs die Heilung von Wunden und bestehenden Magengeschwüren beschleunigten (Elliott et al., 1995; Muscara et al., 2000a). Vor kurzem wurden die Ergebnisse der präklinischen Studien auch in den ersten Humanstudien mit NO-ASS und NO-Naproxen bestätigt (Fiorucci et al., 2003; Hawkey et al., 2003). So trat bei vierzig gesunden Freiwilligen nach 7 Tagen eine dosisabhängige Schädigung der Magenschleimhaut durch ASS auf, während die Beeinträchtigungen durch NO-ASS um 90% reduziert waren. Die Behandlung mit NO-ASS unterschied sich nicht signifikant von der mit Placebo, obwohl das Ausmaß der Hemmung der COX-1 durch NO-ASS und ASS vergleichbar war (Fiorucci et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob NO-NSAIDs in verschiedenen Zellkulturmodellen Stickstoffmonoxid derart freisetzen, dass es zu Reaktionen mit NO-sensitiven Enzymen wie der löslichen Guanylatcyclase oder Bestandteilen anderer Signalwege, z.B. Proteinkinasen, kommt. Besondere Aufmerksamkeit galt hierbei der NO-abhängigen Induktion antioxidativer Proteine am Beispiel der Hämoxigenase-1, deren zellprotektiven Effekte zum Wirkprofil der NO-NSAIDs beitragen könnten.

1.2.2 Zielstrukturen von Stickstoffmonoxid in biologischen Systemen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges, hochreaktives Radikal, das aufgrund seiner Lipophilie frei durch Zellmembranen diffundieren kann. NO reagiert in biologischen Systemen vor allem mit Thiol-Gruppen tragenden Molekülen und Proteinkomplexen, die Redox-reaktive Metallionen beinhalten. Derartig strukturierte Proteine spielen häufig eine Rolle als Enzyme, Ionenkanäle und Rezeptoren sowie Signalproteine und Transkriptionsfaktoren.

Die Reaktion von NO mit solchen Metalloproteinen kann zur Aktivierung aber auch zum Aktivitätsverlust von Enzymen führen. Hämoglobin und Enzyme wie Cytochrom P450 und die lösliche Guanylatcyclase enthalten Redox-reaktive Metallionen in Form von zweiwertigem Eisen, das in der prosthetischen Häm-Gruppe als Zentralatom fungiert (Lancaster & Hibbs, 1990). So ändert die lösliche Guanylatcyclase durch Nitrosylierung des Eisenatoms der Häm-Gruppe ihre Konformation und wird aktiviert (Ignarro, 1999). Durch die Nitrosylierung der Häm-Gruppe bei den Cytochrom-P450-Enzymen kann es zum Häm-Verlust und damit zur Inaktivierung kommen (Stamler et al., 1992).

Während Stickstoffmonoxid mit Metallionen direkt unter Bildung von Nitrosyladdukten reagiert, ist die Reaktion mit Thiol-Gruppen nur indirekt dem NO-Radikal zuzuordnen. In Gegenwart von Sauerstoff findet zunächst die Autooxidation von NO zu NO₂ (Stickstoffdioxid) statt. Durch weitere Reaktionen von NO und NO₂ entsteht in einer Gleichgewichtsreaktion N₂O₃ (Distickstofftrioxid), das *in vitro* beispielsweise mit Glutathion nahezu vollständig zu S-Nitrosoglutathion reagiert (Wink et al., 1994).

Die S-Nitrosylierung hat ähnlich wie die Phosphorylierung von Proteinen die Eigenschaft eines physiologischen Signals (Stamler, 1994). Während z.B. G-Proteine wie p21^{ras} durch S-Nitrosylierung von Cysteinresten aktiviert werden, wird die Aktivität des NMDA-Rezeptors gehemmt. Einige Transkriptionsfaktoren, darunter AP-1 und NFκB, tragen reaktive Thiolgruppen in der DNA-bindenden Region. Modifikationen dieser Thiole können die Bindungseigenschaften verändern und damit zur Aktivierung oder Inhibierung der Transkriptionsfaktoren führen (Lander et al., 1995a; Marshall et al., 2000; Stamler, 1994).

1.2.3 NO als antioxidativer, antiapoptotischer und zellprotektiver Mediator

In den letzten Jahren konnte in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid in verschiedenen Zellmodellen für oxidativen Stress eine protektive Wirkung entfalten kann. Dabei wirkt NO nicht nur durch direkte Reaktionen sondern auch über den *second messenger* cGMP und die Modulation von Transkriptionsfaktoren.

Durch direkte Reaktion mit NO werden Sauerstoff- und Hydroxylradikale neutralisiert und damit weiteren Reaktionen entzogen (Wink et al., 1999). Mit Superoxid (O₂⁻) reagiert NO zu Peroxynitrit (ONOO⁻), das ein starkes Oxidanz darstellt. In erster Linie vermittelt diese Reaktion *in vivo* aber nicht Oxidationen, sondern fängt NO ab und verhindert direkte Effekte, z.B. bei der Regulation des Blutdrucks (Furchgott & Vanhoutte, 1989). Die Reaktion mit Superoxid hemmt außerdem die Haber-Weiss-

Reaktion, in der aus Superoxid und Wasserstoffperoxid u.a. das hoch reaktive Hydroxylradikal (HO^\cdot) gebildet wird. Diese reaktive Sauerstoffspezies führt durch Lipidperoxidation und DNA-Strangbrüche zur Zellschädigung.

Darüber hinaus kann NO Radikal-abhängige Lipidperoxidationen beenden, indem es mit Lipid-Peroxo-Radikalen reagiert und dadurch die Radikalkettenreaktion terminiert (Rubbo et al., 1994).

Zu den protektiven Effekten, die durch direkte Reaktion von NO vermittelt werden, gehört auch die Hemmung von Caspase-Enzymen. Die Caspasen sind eine Familie von Cystein-Proteasen, die mit dem Interleukin-1 β konvertierenden Enzym (ICE) verwandt sind. Man teilt sie in zwei Gruppen ein, die Caspase-1-ähnlichen und die Caspase-3-ähnlichen Enzyme. Die Aktivierung der Caspase-3-Enzymfamilie ist eine Hauptreaktion beim Cytokin-vermittelten apoptotischen Zelltod. In Endothelzellen konnte mit Hilfe von NO-Donoren gezeigt werden, dass niedrige NO-Spiegel die Caspasen 1 und 3 posttranslational durch S-Nitrosylierung inaktivierten und dadurch die TNF- α induzierte Apoptose hemmten (Dimmeler et al., 1997; Fiorucci et al., 1999b).

Die antiapoptotische Wirkung von Stickstoffmonoxid wird in unterschiedlichen Zelltypen aber nicht nur direkten Reaktionen zugeschrieben. In Hepatozyten konnte zusätzlich zur Hemmung der Caspase-Aktivität auch die Involvierung des *second messengers* cGMP gezeigt werden (Kim et al., 1997c; Saavedra et al., 1997). Darüber hinaus hemmte Stickstoffmonoxid apoptotische Prozesse in humanen Eosinophilen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Endothelzellen über Induktion cGMP-abhängiger Signalwege (Beauvais et al., 1995; Genaro et al., 1995; Oberle & Schröder, 1997; Polte et al., 1997; Sciorati et al., 1997; Shen et al., 1998). Allerdings wurde ebenfalls in Endothelzellen und B-Lymphozyten sowie in Brustepithelzellen (MCF-7) gezeigt, dass cGMP nicht an der antiapoptotischen Wirkung beteiligt war (Dimmeler et al., 1997; Kim et al., 1998; Mannick et al., 1994).

Ein Schwerpunkt der Erforschung zellschützender Eigenschaften von Stickstoffmonoxid lag in den letzten Jahren auf der Induktion antioxidativer und antiapoptotischer Proteine. Dabei belegen immer mehr Studien, dass die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress vorrangig auf der Stufe der Transkription reguliert wird. Die posttranslationale Modifikation von Transkriptionsfaktoren könnte dabei einen wichtigen Mechanismus darstellen, über den zelluläre Systeme Veränderungen im Redox-Gleichgewicht registrieren (Marshall et al., 2000).

NO besitzt sowohl durch direkte Reaktionen mit Elementen von Transkriptionsfaktoren als auch indirekt durch Stimulation bestimmter Signalwege die Eigenschaft, die Expression von Proteinen zu regulieren. Hierzu zählen u.a. das antiapoptotische Protein Bcl-2 (Ciani et al., 2002), die Superoxiddismutase (Frank et al., 1999; Sano et al., 1997), das Eisenspeicherprotein Ferritin (Oberle et al., 1999) und mindestens zwei Vertreter der so genannten Hitzeschockproteine, HSP70 und HSP32, für die zellschützende Eigenschaften beschrieben wurden (Kim et al., 1997b; Polte et al., 2000).

Die Induktion von Hitzeschockproteinen (*heat shock proteins*, HSP) schützt Zellen nicht nur vor Schädigungen durch Hitze sondern auch durch Cytokin-vermittelte Prozesse und oxidativem Stress. So induzierte NO in Hepatozyten das HSP70 und schützte diese vor durch TNF- α - und Actinomycin-D-induzierter Apoptose (Kim et al., 1997b). Das Hitzeschockprotein HSP32 mit einem Molekulargewicht von 32 kDa ist identisch mit der Hämoxxygenase Typ 1. Diese nimmt eine besondere Stellung als antioxidativ, antiapoptotisch und antiinflammatorisch wirkendes Enzym ein.

1.3 Die Hämoxygenase

1.3.1 Konstitutive und induzierbare Isoformen

Die Hämoxygenase gehört zur Familie der Monooxygenasen. Das Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim oxidativen Abbau des Häms zu Biliverdin und äquimolaren Mengen an Kohlenstoffmonoxid (CO) und Eisen. Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Wiedergewinnung des Eisens aus dem Hämoglobin alternder Erythrozyten und beim Abbau anderer Hämproteine (Abb. 2). Das lineare Tetrapyrrol Biliverdin wird im Folgenden sofort durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert (Choi & Alam, 1996).

Bis heute wurden drei Isoformen der Hämoxygenase identifiziert, die Produkte unterschiedlicher Gene sind. Die Hämoxygenase Typ 2 (HO-2, 36 kDa) wird konstitutiv im zentralen Nervensystem, in der Leber, Milz und im Gefäßsystem exprimiert. Die erst vor kurzem identifizierte Hämoxygenase Typ 3 (HO-3, 33 kDa) wird ebenfalls konstitutiv exprimiert. Sie besitzt jedoch nur eine geringe katalytische Aktivität. Ihre zelluläre Funktion ist noch weitgehend ungeklärt. Die Hämoxygenase Typ 1 (HO-1) ist die induzierbare, ubiquitär im Organismus vorkommende Isoform (Maines et al., 1986; McCoubrey et al., 1997; Otterbein & Choi, 2000). Die HO-1 wird durch das natürliche Substrat Häm und eine Vielzahl strukturell stark unterschiedlicher Agenzien induziert. Neben Schwermetallen, Hormonen und Hitzeschock sind dies vor allem Stickstoffmonoxid und verwandte Spezies sowie Agenzien, die oxidativen Stress verursachen. Darunter sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS oder *reactive oxygen intermediates*, ROI), Endotoxine, Cytokine wie TNF- α , UV-Licht, Natriumarsenit, Hyperoxie und Glutathionmangel von besonderer Bedeutung (Choi & Alam, 1996; Foresti & Motterlini, 1999; Hartsfield et al., 1997).

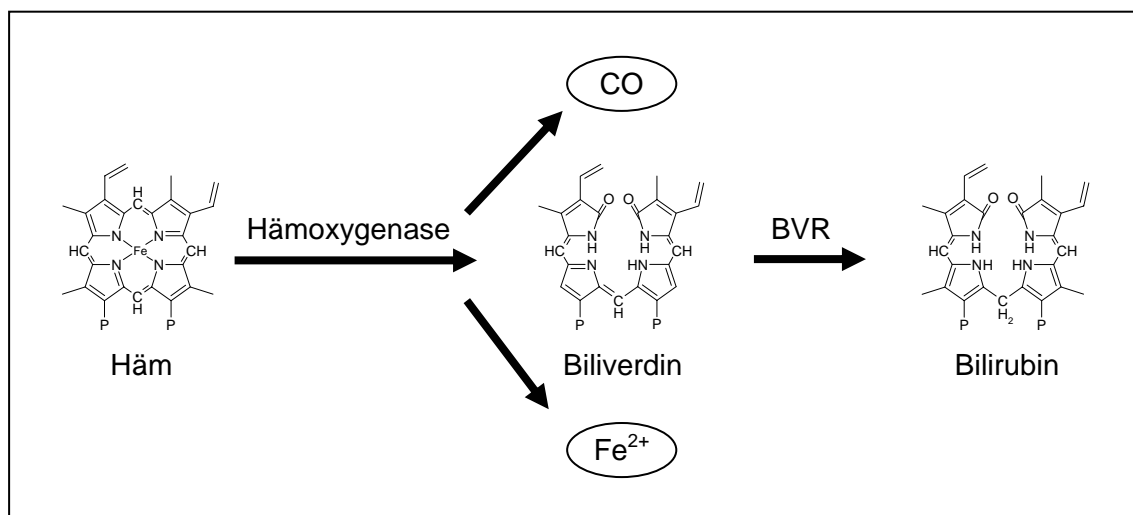


Abb. 2: Schematische Darstellung des Abbaus der Häm-Gruppe. (BVR: Biliverdin-Reduktase, CO: Kohlenstoffmonoxid, P = Propionatrest)

1.3.2 Die induzierbare HO-1 und ihre Funktion als protektives Protein

In den letzten Jahren wurde für die induzierbare Hämoxygenase eine Vielzahl von protektiven Effekten *in vitro* und *in vivo* beschrieben. Die Induktion oder Überexprimierung des Enzyms schützte die unterschiedlichsten Zelltypen vor Schädigung durch Prooxidanzien (Clark et al., 2000a; Inguaggiato et al., 2001; Motterlini et al., 1996a; Polte et al., 2000). So vereint die HO-1 antiatherosklerotische und antiapoptotische Eigenschaften (Brouard et al., 2000; Petrache et al., 2000; Siow et al., 1999) mit einer antiinflammatorischen und Schmerz-modulierenden Wirkung (Haider et al., 2002; Steiner et al., 2001; Wagener et al., 2001; Willis et al., 1996). Im Speziellen schützte die HO-1 *in vivo* Transplantate vor der Abstoßung (Soares et al., 2001), die Niere vor toxischer Glomerulonephritis (Mosley et al., 1998) und bei induzierter Rhabdomyolyse (Nath et al., 1992) sowie das Herz vor Schädigung durch Ischämie und Reperfusion (Yet et al., 2001). Darüber hinaus spielt das Enzym eine entscheidende Rolle im Wachstum und bei der Angiogenese. Durch Regulation der Synthese von Wachstumsfaktoren und der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung kontrolliert die HO-1 Zellproliferation, Apoptose und Hypertrophie (Durante, 2003).

Die Bedeutung der Hämoxygenase Typ 1 *in vivo* zeigte sich an HO-1-defizienten *Knockout*-Mäusen. Kultivierte Fibroblasten dieser Mäuse produzierten hohe Spiegel an freien Sauerstoff-Radikalen und zeigten starke Cytotoxizität durch Prooxidanzien. Die Gabe von Endotoxin verursachte in den *Knockout*-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren vermehrte Leberzellnekrose durch oxidative Schädigung und eine höhere Mortalität durch endotoxischen Schock (Poss & Tonegawa, 1997b). Darüber hinaus entwickelten die Mäuse eine Eisenmangel-Anämie mit Eisenablagerung in Leber und Niere, die zur chronischen Entzündung der Organe führte (Poss & Tonegawa, 1997a). Die gleichen Befunde zeigte der erste klinische Fall humaner HO-1 Defizienz, der darüber hinaus u.a. unter starken Wachstumsstörungen, Hyperlipidämie mit schwerwiegender Atherosklerose und Endothelschädigung sowie Leuko- und Thrombozytose litt (Kawashima et al., 2002; Yachie et al., 1999).

Für diese weitgreifenden protektiven Effekte der HO-1 werden, neben dem Abbau des prooxidativen und cytotoxischen Häms (Jeney et al., 2002; Vincent, 1989), vor allem die katalytischen Produkte Kohlenstoffmonoxid (CO), freie Eisenionen sowie Biliverdin und Bilirubin verantwortlich gemacht.

Kohlenstoffmonoxid besitzt eine mit NO vergleichbare Bedeutung als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem und ist ebenso in der Lage über Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase den Gefäßmuskeltonus und die Plättchenaggregation zu regulieren (Foresti & Motterlini, 1999; Maines, 1997). Durch Hemmung der Expression proinflammatorischer Cytokine besitzt endogen gebildetes CO entzündungshemmende Eigenschaften (Otterbein et al., 2000). In Endothelzellen und Fibroblasten konnte eine Hemmung der TNF- α -vermittelten Apoptose durch CO gezeigt werden (Brouard et al., 2002; Petrache et al., 2000). Darüber hinaus schützte CO *in vivo* gegen Lungenschädigung durch Hyperoxie (Otterbein et al., 1999) und beugte atherosklerotischen Läsionen vor, die bei chronischer Transplantatabstoßung und Ballondilatation von Gefäßen vermehrt auftreten (Otterbein et al., 2003). Diese Effekte wurden mit Hemmung der Aktivierung und Migration von Leukozyten und der Proliferation von Gefäßmuskelzellen in Verbindung gebracht.

Bilirubin wurde früher zumeist als cytotoxisches, lipidlösliches Abfallprodukt eingestuft, das man in hohen Konzentrationen mit Gelbsucht und Hirnschäden bei Neugeborenen assoziierte. Doch Stocker et al. zeigten 1987 zum ersten Mal, dass Bilirubin in physiologischen Konzentrationen *in vitro* antioxidativ wirkt, indem es reaktive Sauerstoffspezies bindet und neutralisiert. In der Hemmung der Lipidperoxidation übertraf Bilirubin sogar die antioxidativen Eigenschaften von α -Tocopherol und Vitamin C

(Stocker et al., 1987). Durch Aktivierung der HO-2 endogen gebildetes Bilirubin schützte kultivierte Neuronen vor Wasserstoffperoxid-induzierter Schädigung. Der Effekt konnte durch Inkubation mit Bilirubin in nanomolaren Konzentrationen reproduziert werden (Dore et al., 1999). Wenn in HeLa-Zellen die Expression der Biliverdin-Reduktase mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden blockiert wurde, waren erhöhte Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies und vermehrter apoptotischer Zelltod feststellbar (Baranano et al., 2002). Die antioxidativen Eigenschaften des Bilirubins wurden durch verschiedene Studien *ex vivo* und *in vivo* belegt. So konnte an isolierten Rattenherzen ein kardioprotektiver Effekt sowohl durch Stimulation der HO-1 als auch durch exogenes Bilirubin im Ischämie-Reperfusion-Modell gezeigt werden (Clark et al., 2000b). Dennery et al. stellten im Tiermodell einen protektiven Effekt erhöhter Plasmaspiegel an unkonjugiertem Bilirubin gegen Hyperoxie-vermittelte oxidative Schädigung fest (Dennery et al., 1995). Humanstudien zeigten bei Patienten mit höherem Bilirubin-Plasmaspiegel ein geringeres Risiko für eine koronare Herzkrankheit (Hopkins et al., 1996; Mayer, 2000; Schwertner et al., 1994). Außerdem wurde das Gilbert-Syndrom, eine benigne Hyperbilirubinämie, mit einem geringeren Risiko für die koronare Herzkrankheit in Zusammenhang gebracht (Vitek et al., 2002).

Durch Spaltung der Häm-Gruppe freigesetzte Eisenionen sind ein starker physiologischer Induktor des Ferritins. Dieses Eisenspeicherprotein kommt ubiquitär im Körper vor. Die Regulation der Expression findet hauptsächlich auf translationaler Ebene statt. In den letzten Jahren konnten verschiedene Studien zeigen, dass Ferritin antioxidative und cytoprotektive Eigenschaften besitzt. Diese Wirkung ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass Ferritin durch Speicherung des freien Eisens der Sauerstoffradikalbildung den Katalysator entzieht. So schützte die Stimulation der Ferritinexpression Endothelzellen vor oxidativer Schädigung (Balla et al., 1992; Oberle & Schröder, 1997; Oberle et al., 1999) und Ferritin-defiziente Zellen wiesen eine gesteigerte Empfindlichkeit auf (Lin & Girotti, 1998).

Auch wenn in einigen Arbeiten die Effekte der HO-1 einzelnen Produkten zugeordnet werden, so ist in der Gesamtheit davon auszugehen, dass die cytoprotektiven, antiinflammatorischen und antiapoptotischen Effekte der HO-1 aus einem Zusammenspiel aller katalytischen Produkte resultieren.

1.4 Genregulation der HO-1

1.4.1 Genregulation der HO-1 durch cGMP-abhängige Signalwege

Welche Rolle der *second messenger* cGMP bei der Genregulation der HO-1 spielt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert und bedarf noch weiterer Klärung. In glatten Gefäßmuskelzellen ist die HO-1 durch NO-Donoren induzierbar. Lipophile, membran-gängige cGMP-Analoga wie 8-Bromo-cGMP induzierten die HO-1 jedoch nicht (Durante et al., 1997; Hartsfield et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse ergaben Studien in Hepatozyten (Kim et al., 1995) und Endothelzellen (Matterlini et al., 1996a). Auch der selektive Guanylatcyclase-Hemmstoff ODQ blockierte sowohl in glatten Gefäßmuskelzellen als auch in Nierenepithelzellen die Induktion der HO-1 durch NO nicht (Hartsfield et al., 1997; Liang et al., 2000).

Im Gegensatz dazu zeigten Immenschuh et al. in primären Hepatozyten eine Induktion der HO-1 durch 8-Bromo-cGMP, die mit Hilfe von KT5823, einem spezifischen Hemmstoff der cGMP-abhängigen Proteinkinase G, blockiert werden konnte (Immenschuh et al., 1998). Außerdem gibt es Belege für eine cGMP-abhängige Induktion in Endothelzellen. So waren die Effekte von NO-Donoren in bovinen Endothelzellen durch den Guanylatcyclase-Hemmstoff ODQ hemmbar und konnten mit Hilfe lipophiler

cGMP-Analoga reproduziert werden (Polte et al., 2000). Darüber hinaus induzierte 8-Bromo-cGMP die HO-1 in humanen Endothelzellen und in Nierenepithelzellen (Kiemer et al., 2003; Polte et al., 2002).

1.4.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Proteinkinasen und Proteinphosphatasen sowie GTP-bindende Proteine sind Bestandteile zahlreicher zellulärer Signalwege. Unter den Proteinkinasen hat in den letzten Jahren eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen, die so genannten Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAP-Kinasen, MAPK) eine besondere Bedeutung erlangt (Arbabi & Maier, 2002; Davis, 1993; Widmann et al., 1999).

Neben der namensgebenden Aktivierung durch bestimmte Wachstumsfaktoren (Mitogene) konnte bisher gezeigt werden, dass MAP-Kinasen durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden, die auch die Transkription der HO-1 induzieren. So führte z.B. die Inkubation von Zellen mit Phorbolestern, Cytokinen, UV-Licht, Hitzeschock, LPS und Induktoren von oxidativem Stress zur Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen (Elbirt et al., 1998).

Zu dieser Familie von Proteinkinasen zählen die extrazellulär regulierte Kinase (ERK; auch als p42/p44 bezeichnet), die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK; auch als Stress-aktivierte Proteinkinase SAPK bezeichnet) sowie die p38 MAP-Kinase.

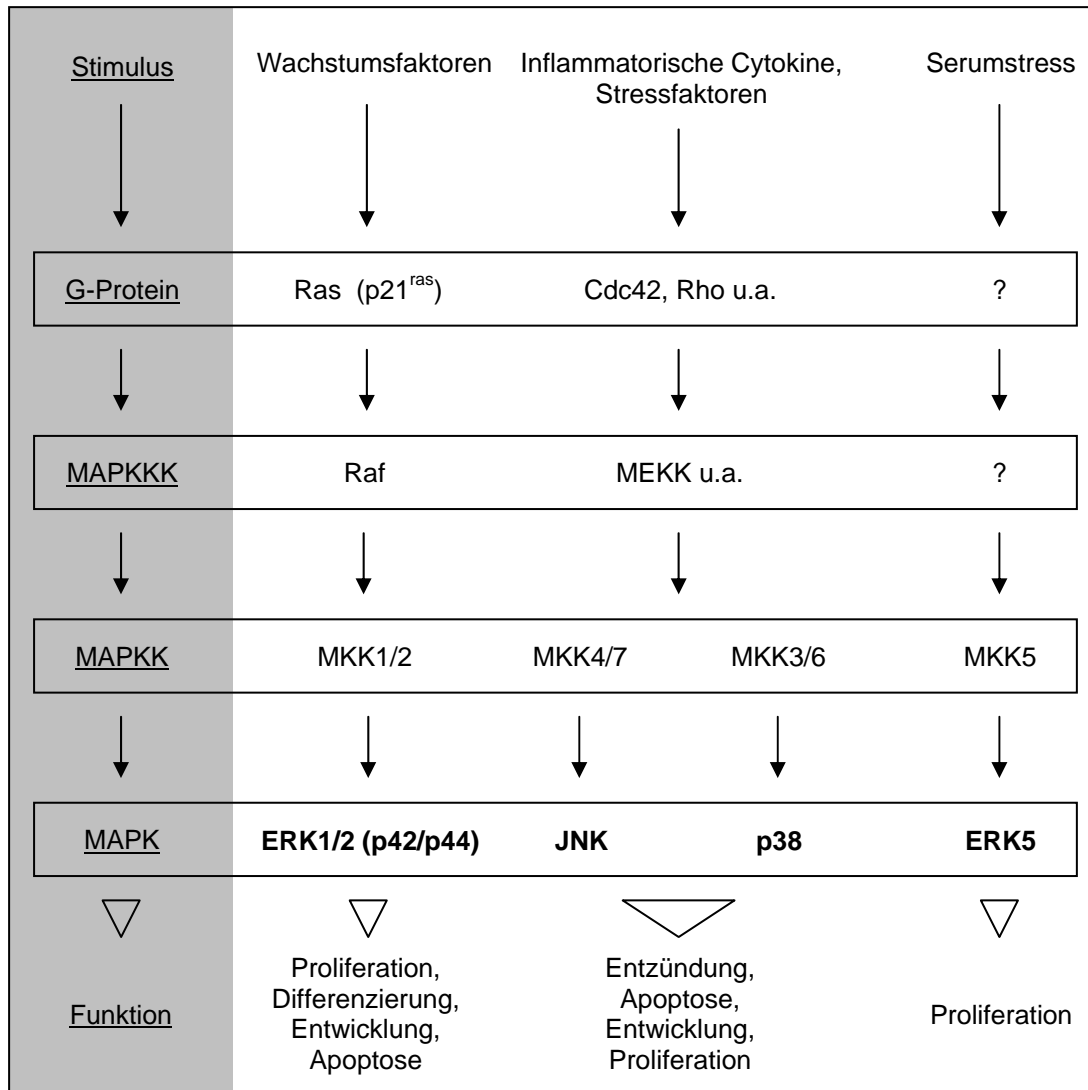


Abb. 3: Die vier Hauptsignalwege der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Zur Aktivierung müssen MAP-Kinasen an einem Threonin- und an einem Tyrosinrest phosphoryliert werden. Der MAP-Kinase-Aktivator, der beide Phosphorylierungen katalysiert, ist die so genannte MAP-Kinase-Kinase (MAPKK oder MKK). Diese wird stimuliert durch eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK oder MEKK), die zuvor durch ein GTP-bindendes Protein (z.B. Ras, Cdc42) aktiviert wurde (Davis, 1993). Nach der Aktivierung dieser Kaskade wird das Signal durch Phosphorylierung verschiedener cytoplasmatischer Proteine weitergeleitet. Darüber hinaus können die Kinasen durch Translokation in den Zellkern genregulatorische Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (*Activator-Protein-1*), der TCF-Familie (*Ternary Complex Factors*), CNC-bZIP-Proteine (*Cap`N`Collar-Basic-Leucin-Zipper*) und STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) aktivieren (Karin, 1995; Pearson et al., 2001; Yu et al., 2000). Auch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (*Nuclear-Factor κB*) durch MAP-Kinasen wurde beschrieben (Carter et al., 1999; Korus et al., 2002).

Die MAP-Kinase ERK nimmt bei der Regulation von Zelldifferenzierungs- und Zellproliferationsvorgängen eine zentrale Rolle ein. Die Kinasen p38 und JNK werden hauptsächlich durch verschiedene zelluläre Stressformen aktiviert.

1.4.3 Aktivierung von MAP-Kinasen durch Stickstoffmonoxid

In humanen T-Zellen aktivieren Stickstoffmonoxid und chemisch verwandte Spezies (NO_x) das GTP-bindende Protein $p21^{\text{ras}}$. Dieses den ERK-Kinase-Signalweg einleitende Protein wurde als essentiell für die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ beschrieben (Lander et al., 1995a; Lander et al., 1995b). Weitere Studien zeigten, dass NO und NO_x in diesem Zelltyp die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 aktivieren (Lander et al., 1996).

Durch Inkubation mit dem NO -Donor Nitroprussid-Natrium (SNP) wurde in Nierenepithelzellen (HEK293) die Kinase JNK (Kim et al., 1997a) und in Makrophagen (RAW 264.7) die Kinase JNK und p38 aber nicht ERK aktiviert (Jun et al., 1999). In der gleichen Makrophagen-Zelllinie wurde die LPS-induzierte Phosphorylierung von JNK und p38 durch NO verstärkt und verlängert (Jacobs & Ignarro, 2003). Pfeilschifter und Huwiler zeigten die Aktivierung der MAP-Kinase JNK durch verschiedene NO -Donoren in glomerulären Mesangial- und Endothelzellen (Pfeilschifter & Huwiler, 1996). Ebenfalls in Mesangialzellen aktivierten NO -Donoren die MAP-Kinasen ERK1/2 (Callsen et al., 1998). In vaskulären Endothelzellen wurden ERK1/2 durch Inkubation mit SNP stimuliert (Parenti et al., 1998). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass eine Inkubation von primären bovinen Endothelzellen (BAEC) mit dem NO -Donor SperminNONOat die Phosphorylierung von ERK, JNK und p38 stimuliert. Darüber hinaus stimulierte NO über einen ERK und p38 abhängigen Mechanismus die Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern (Buckley et al., 2003).

1.4.4 Beteiligung von MAP-Kinasen an der Genregulation der HO-1

Bei der NO -abhängigen Induktion der HO-1 haben Buckley et al. in Endothelzellen eine Beteiligung von MAP-Kinasen nachgewiesen. Spezifische Inhibitoren der MAP-Kinasen p38 und ERK hemmten die Induktion der HO-1-Proteinexpression durch SperminNONOat konzentrationsabhängig (Buckley et al., 2003). Chen und Maines zeigten in HeLa-Zellen eine Beteiligung der Kinasen p38 und ERK, nicht aber JNK an der Induktion der HO-1-mRNA durch spontane NO -Donoren (Chen & Maines, 2000).

In einigen Zellsystemen gibt es Belege für eine Beteiligung von MAP-Kinasen an der Induktion der HO-1-mRNA durch verschiedene Stressfaktoren. So war die HO-1-Induktion durch Reoxygenierung nach Anoxie in Endothelzellen der Ratte (PAEC) von der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 abhängig (Zhang et al., 2002). In humanen Brustepithelzellen (MCF-7) erfolgte eine Promotor-Konstrukt-Aktivierung durch Cadmium über p38-abhängige Signalwege (Alam et al., 2000). Eine HO-1-Promotor-Aktivierung in Hepatomzellen des Huhns (LMH) durch Cadmium, Arsenit und Hitzeschock erforderte die Aktivität der Kinasen ERK und p38, war aber von JNK unabhängig (Elbirt et al., 1998). In Hepatozyten der Ratte wurde eine Abhängigkeit der HO-1-Genexpression von JNK und p38 nachgewiesen (Kietzmann et al., 2003). In humanen Endothelzellen war für die HO-1-Induktion durch das kardiovaskuläre Hormon ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK und JNK erforderlich (Kierner et al., 2003). Darüber hinaus wurde für die HO-1-Induktion durch die pflanzlichen Antioxidanzien Curcumin und Kaffeesäurephenylester eine Abhängigkeit vom MAP-Kinase-p38-Signalweg in Nierenepithelzellen der Ratte (NRK-52E) gezeigt (Balogun et al., 2003).

1.4.5 Genregulatorische Proteine mit Einfluss auf die HO-1-Promotorregion

Bisher konnten durch Untersuchungen am HO-1-Gen der Maus mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Konstrukten zwei 5' distale *Enhancer*-Regionen, E1 und E2 (auch als SX2 und AB1 bezeichnet), identifiziert werden. Diese aktivieren die Transkription als Reaktion auf verschiedene, zumeist oxidativen Stress auslösende Agenzien (z.B. Häm, Cadmium, Phorbol ester, Arsenit, H₂O₂ und LPS). Jede dieser Enhancer-Regionen enthält Kopien so genannter *Stress-Response-Elements* (StRE), die u.a. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (z.B. c-Jun, c-Fos) und CNC-bZIP-Proteine (z.B. Nrf2) enthalten (Alam et al., 1994; Alam et al., 1995; Huang et al., 2000).

Die strukturell und funktionell ähnlichen Bindungsstellen der DNA humaner Zellen werden meist als *Antioxidant-Responsive-Elements* (ARE) bezeichnet (Balogun et al., 2003). Diese wurden nicht nur in der Promotorregion des HO-1-Gens (Alam et al., 1999) sondern auch bei anderen antioxidativen Enzymen wie der γ -Glutamylcystein-Synthase (Wild et al., 1999) und der L- und H-Kette des Ferritins (Wasserman & Fahl, 1997) gefunden.

Neben DNA-Sequenzen, an die AP-1 und Nrf2 binden, wurden auch Bindungsstellen für AP-2, NF κ B, Interleukin-6 und andere Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion der HO-1 gefunden (Choi & Alam, 1996; Lavrovsky et al., 1994).

Die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie und Nrf2 haben gemeinsam, dass es sich um basische Proteindimere handelt, die an der DNA Leucin-Zipper-Strukturen ausbilden.

Aktivator-Protein-1 (AP-1) ist eine kollektive Bezeichnung für dimerische Transkriptionsfaktoren, die aus Jun-, Fos- oder ATF (*Activating Transcription Factor*)-Proteinen bestehen. Die AP-1 Proteine Jun und Fos sind Produkte so genannter *immediate-early-response* Gene, deren Transkription zur initialen zellulären Antwort auf verschiedene Stressformen gehört (Bebien et al., 2003).

Eine Reihe von Studien zeigte die Abhängigkeit der HO-1-Induktion von AP-1-Proteinen. So führte die pharmakologische Hemmung der AP-1-Aktivität in humanen Endothelzellen zu einer verminderten HO-1-Induktion durch IL-1 α , TNF- α (Terry et al., 1998) und ANP (Kierner et al., 2003). Weiterhin verhinderten dominant-negative Mutanten von c-Jun im Gegensatz zum Wildtyp die Arsenit-vermittelte Aktivierung des HO-1-Promotors in Hepatomzellen (Elbirt et al., 1998). Auch in Makrophagen (RAW 264.7) stellte sich sowohl die durch LPS als auch die durch Hypoxie induzierte Transkription des HO-1-Gens als AP-1-abhängig heraus (Camhi et al., 1998; Lee et al., 2000).

Das CNC-bZIP-Protein Nrf2 (*NF-E2-Related Factor 2*) liegt im Cytosol an das Hemmprotein KEAP1 assoziiert vor. Durch Prooxidanzien und elektrophile Agenzien wird dieser Hemmmechanismus inaktiviert und Nrf2 in den Zellkern transloziert (Huang et al., 2000; Itoh et al., 1999). Da das KEAP1-Protein viele Cysteinreste enthält, wird vermutet, dass der Nrf2-KEAP1-Komplex als zellulärer Sensor für oxidativen Stress fungiert (Itoh et al., 1999).

Nrf2 wird eine wichtige Rolle bei der Regulation antioxidativer Gene zugeordnet. Nrf2-Deletionsmutanten waren wesentlich empfindlicher gegenüber oxidativer Zellschädigung (Ishii et al., 2000) und exprimierten signifikant niedrigere Konzentrationen antioxidativer Proteine bei Inkubation mit Prooxidanzien (Yu et al., 2000). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Nrf2 die HO-1-Induktion durch Cadmium und andere Agenzien in diversen Zelltypen vermittelt (Alam et al., 1999; Alam et al., 2000; He et al., 2001). Auch das pflanzliche Antioxidanz Curcumin bewirkte in Nierenepithelzellen (NRK-52E) die Inaktivierung des Nrf2-KEAP1-Komplexes und eine gesteigerte Nrf2-Bindung an den HO-1-Promotor (Balogun et al., 2003). Darüber

hinaus aktivierte das natürliche Substrat der HO-1 deren Transkription in Nierenepithelzellen durch Stabilisierung des Nrf2-Proteins (Alam et al., 2003).

Der Transkriptionsfaktor NF κ B (*Nuclear Factor* κ B) ist ein dimerisches Protein bestehend aus Proteinen der Rel-Familie (p50, p65, p52, cRel und RelB). Vor allem das p50-p65 Heterodimer ist an der Aktivierung der Transkription verschiedener Gene im Entzündungsgeschehen (u.a. TNF- α , ICAM-1, NOS2) beteiligt. Im inaktiven Stadium liegt NF κ B im Cytosol an das Hemmprotein I κ B assoziiert vor. Verschiedene Stimuli, darunter TNF- α , UV-Licht und H₂O₂, können die Degradation von I κ B einleiten. Dadurch wird NF κ B freigesetzt und in den Zellkern transloziert (Thanos & Maniatis, 1995).

1.4.6 NO/cGMP und HO-1-regulatorische Proteine

Verschiedene Studien belegten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Signalwegen, die für die Expression der HO-1 diskutiert werden. So wurde gezeigt, dass NO über Guanylatcyclase- und Proteinkinase-G-abhängige Mechanismen in Fibroblasten die MAP-Kinase p38 und in Mesangialzellen die MAP-Kinasen ERK1/2 aktiviert (Browning et al., 2000; Callsen et al., 1998). Darüber hinaus sind Zusammenhänge zwischen cGMP-abhängiger Genaktivierung und AP-1-Elementen nachgewiesen worden (Gudi et al., 1996; Pilz et al., 1995). In Hepatozyten wurde das HO-1-Gen durch cGMP über das so genannte cAMP-Response/AP-1-Element aktiviert (Immenschuh et al., 1998). Erhöhte cGMP-Spiegel und eine konstitutiv aktive Mutante der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) aktivierten in Fibroblasten die MAP-Kinase JNK und darüber die AP-1-Aktivität (Soh et al., 2001).

2 Problemstellung

Die regelmäßige Einnahme klassischer NSAIDs kann durch Hemmung der Prostaglandin-Synthese schwerwiegende Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt und eine Funktionsstörung der Niere verursachen. Die Folgen sind dyspeptische Beschwerden, Erosionen der Mukosa bis hin zu Magen-Darm-Ulzera und ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko durch Anstieg des Blutdrucks (Hawkey & Langman, 2003; Rainsford, 1999; Wolfe et al., 1999).

Erkenntnisse darüber, dass endogen gebildetes NO und die Prostaglandine synergistisch protektive Wirkungen in der Magenschleimhaut medieren und exogen zugeführtes NO die bei Hemmung der COX fehlenden Prostaglandine ersetzen könnte, führte zur Entwicklung NO-freisetzender NSAIDs (Wallace et al., 1994). Die NO-NSAIDs oder CINODs (COX-inhibiting Nitric Oxide Donators) sind klassische saure NSAIDs, deren Carboxylgruppe mit einer NO-freisetzenden Nitrooxybutyl- oder Nitrooxymethylphenyl-Gruppe verestert ist (Keeble & Moore, 2002; Muscara & Wallace, 1999).

Protektive Effekte der NO-NSAIDs im Gastrointestinaltrakt, in der Niere und im kardiovaskulären System lassen eine Beteiligung antioxidativer und zellschützender Stoffwechselwege an den noch nicht vollständig geklärten Wirkmechanismen vermuten (Cirino, 2003; Wallace et al., 2002).

Ziel der Arbeit war eine Charakterisierung von NO-NSAIDs als NO-Donoren im Zellkulturmodell. Dabei sollte zunächst der Frage nachgegangen werden, ob NO-NSAIDs Stickstoffmonoxid derart freisetzen, dass es zu Reaktionen mit NO-sensitiven Strukturen wie der löslichen Guanylatcyclase kommt. Die Bestimmung des intrazellulären cGMP-Spiegels bei Aktivierung dieses Enzyms kann als sensibler Marker für die NO-Freisetzung dienen (Bennett et al., 1989). Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob NO-NSAIDs und organische Nitrate wie GTN über gemeinsame Stoffwechselwege bioaktiviert werden.

Besondere Aufmerksamkeit sollte der NO-abhängigen Induktion antioxidativer Proteine am Beispiel der Hämoxxygenase-1 gelten. Die antioxidativen, antiinflammatorischen und cytoprotektiven Effekte einer Induktion des HO-1-Stoffwechsels wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt und könnten einen Teil des Wirkprofils der NO-NSAIDs erklären (Foresti & Motterlini, 1999; Immenschuh & Ramadori, 2000).

Die HO-1 ist durch spontane NO-Donoren unter anderem in Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen und Nierenepithelzellen induzierbar (Durante et al., 1997; Liang et al., 2000; Polte et al., 2000). Einige Studien zeigen allerdings, dass bestimmte Prostaglandine die HO-1 induzieren oder bei einer Induktion synergistisch wirken (Chen et al., 2002a; Koizumi et al., 1995). Daher sollte geprüft werden, ob NO-NSAIDs die HO-1 induzieren, obwohl sie ein duales Wirkprinzip besitzen: NO-NSAIDs setzen NO erst durch enzymatische Spaltung frei und stellen gleichzeitig potente Hemmstoffe beider Isoenzyme der Cyclooxygenase und damit der Prostaglandin-Synthese dar.

Mit Hilfe der Northern-Blot-Technik sollte der Frage nachgegangen werden, ob verschiedene NO-NSAIDs die Transkription der HO-1 in Endothelzellen aktivieren. Weiterhin wurde untersucht, ob eine vermehrte mRNA-Bildung zu einer gesteigerten Proteinexpression der HO-1 führt.

Von Interesse war außerdem, ob die NO-abhängige Aktivierung des cGMP/Guanylatcyclase-Systems den genregulatorischen Wirkungen der NO-NSAIDs

zugrunde liegt oder ob andere NO-aktivierbare Signaltransduktionswege wie die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen eine Rolle spielen.

Um die protektiven Wirkungen im Magen näher zu beschreiben, sollte betrachtet werden, ob NO-NSAIDs auch in gastralen Epithelzellen die mRNA- und Protein-Synthese der HO-1 stimulieren.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung direkter oder indirekter antioxidativer Eigenschaften der NO-NSAIDs.

Da reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Pathogenese der NSAID-induzierten Schädigung der Magenschleimhaut eine entscheidende Rolle spielen, sollte untersucht werden, ob NO-NSAIDs in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress antioxidative Wirkungen zeigen. Dieses Modell sollte sowohl für gastrale Epithelzellen als auch für Endothelzellen angewandt werden.

Ob ein Zusammenhang zwischen der Stimulation des HO-1-Stoffwechsels und einer Senkung des ROS-Spiegels besteht, sollte durch Versuche mit dem HO-1-Metaboliten Bilirubin und einem spezifischen Inhibitor der HO-1-Aktivität untersucht werden.

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

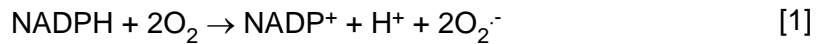
Tabelle 2: Erstantikörper

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.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von NO-Naproxen als NO-Donor im Zellkulturmodell

4.1.1 Effekte von NO-Naproxen auf den cGMP-Spiegel

Als sensibler Marker für die NO-Freisetzung einer Substanz kann die Bestimmung des intrazellulären cGMP-Spiegels dienen. Die Nierenepithelzelllinie LLC-PK-1 ist ein etabliertes Zellkulturmodell für Untersuchungen zur Aktivierung des cGMP/Guanylatcyclase-Systems durch organische Nitrate (Bennett et al., 1989; Hinz & Schröder, 1998; Schröder & Schrör, 1990).

In diesem Modell sollte am Beispiel des NO-Naproxens untersucht werden, ob NO-NSAIDs im Zellversuch Stickstoffmonoxid derart freisetzen, dass es zu einer Reaktion mit NO-sensitiven Strukturen wie der löslichen Guanylatcyclase kommt.

LLC-PK-1-Zellen wurden 15 Minuten mit dem Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX (0,5 mM) vorbehandelt. Im Anschluss wurde weitere 15 Minuten mit NO-Naproxen (1-30 μM) inkubiert. Die Inkubation von LLC-PK-1-Zellen mit NO-Naproxen führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des cGMP-Spiegels. Es konnten bis zu 27fach höhere Konzentrationen im Vergleich zum basalen cGMP-Spiegel un behandelter Zellen bestimmt werden. Unter den gleichen Bedingungen hatte Naproxen keinen Effekt auf die cGMP-Bildung (Abb. 4).

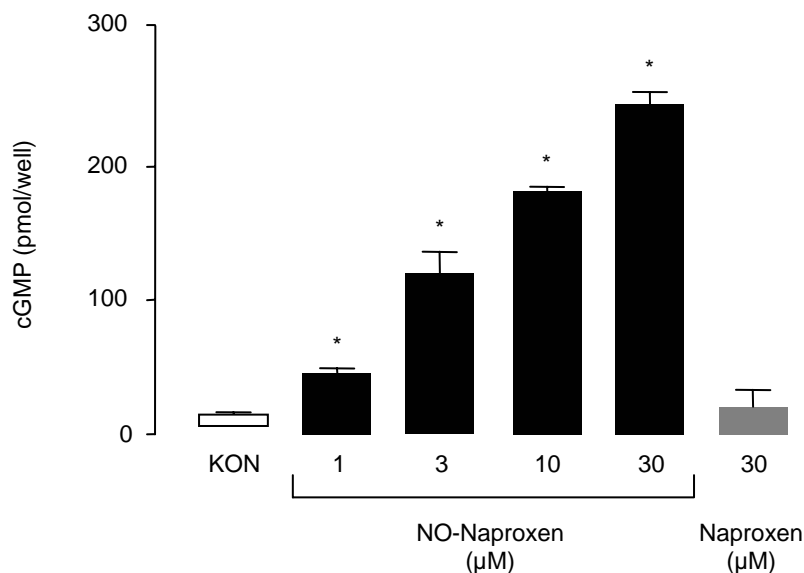


Abb. 4: Effekt von NO-Naproxen auf die cGMP-Bildung in Nierenepithelzellen.

LLC-PK-1-Zellen wurden 15 Minuten mit IBMX vorbehandelt. Im Anschluss wurde 15 Minuten mit NO-Naproxen (1-30 μM) oder Naproxen (30 μM) inkubiert.

*) : $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten.

Das freie NO-Radikal reagiert mit Superoxid rasch zu Peroxynitrit. Die Superoxiddismutase (SOD) baut Superoxid zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff ab. Dadurch verlängert sich bei Vorbehandlung der Zellen mit SOD die Halbwertszeit des freien NO-Radikals (Gryglewski et al., 1986).

Eine 15minütige Vorinkubation mit SOD (15 U/ml) verstärkte die cGMP-Stimulation durch NO-Naproxen um etwa 100 %. Durch Vorbehandlung der Zellen mit Hämoglobin lassen sich hingegen freie NO-Radikale abfangen und NO-vermittelte Effekte blockieren (Martin et al., 1988). Hämoglobin (20 μ M) senkte den cGMP-Spiegel nahezu auf den Basalwert un behandelter Zellen (Abb. 5). Beide Substanzen hatten keine Eigeneffekte auf den cGMP-Spiegel.

Diese Versuche verdeutlichen, dass die Erhöhung des cGMP-Spiegels ursächlich auf die Freisetzung von NO zurückzuführen ist.

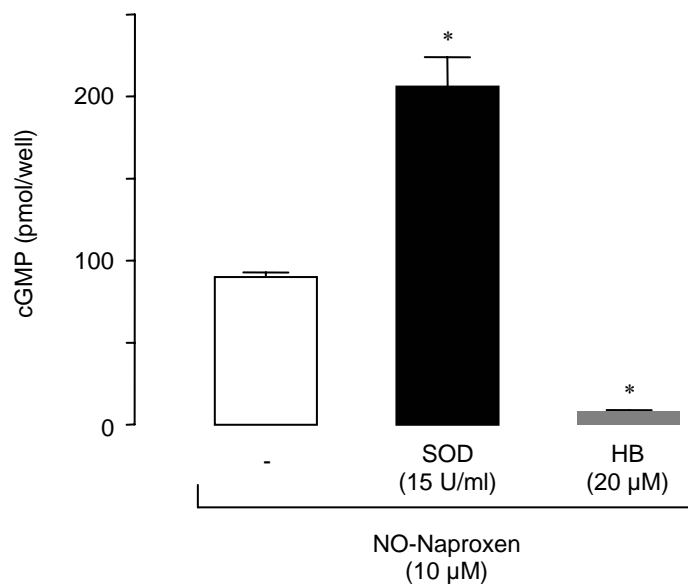


Abb. 5: Effekt von Superoxiddismutase (SOD) und Hämoglobin (HB) auf die cGMP-Stimulation durch NO-Naproxen.

LLC-PK-1-Zellen wurden 15 Minuten mit SOD (15 U/ml) oder HB (20 μ M) vorbehandelt. Im Anschluss wurde 15 Minuten mit NO-Naproxen (10 μ M) inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (-), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten.

4.1.2 Einfluss einer Vorinkubation mit NO-Donoren auf die cGMP-Stimulation

Über welche Stoffwechselwege NO-NSAIDs bioaktiviert werden, ist noch nicht bekannt. Durch Vorbehandlung von LLC-PK-1-Zellen mit Glyceroltrinitrat (GTN) sollte untersucht werden, ob NO-NSAIDs und organische Nitrate durch die gleichen Enzymsysteme verstoffwechselt werden.

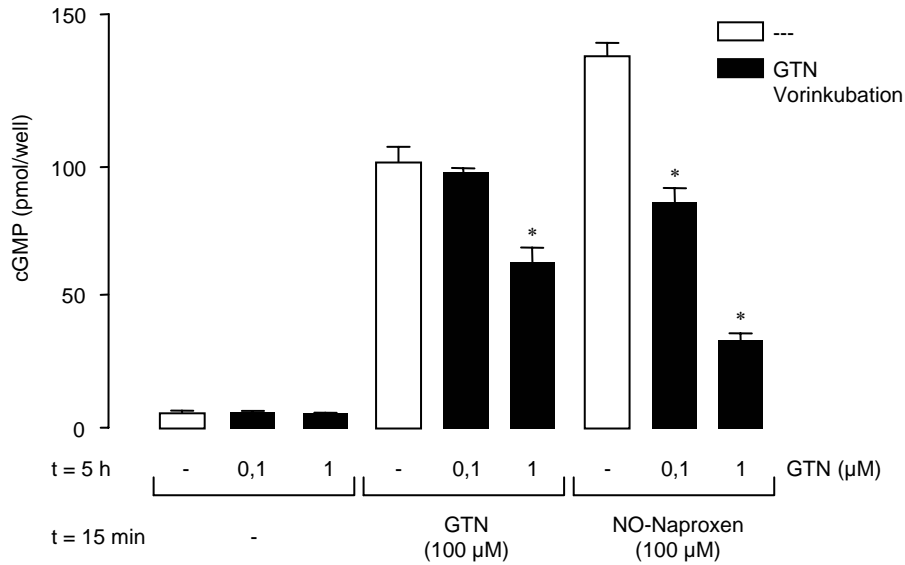


Abb. 6: Effekt einer Vorinkubation mit Glyceroltrinitrat (GTN) auf die anschließende Inkubation mit GTN oder NO-Naproxen.

LLC-PK-1-Zellen wurden 5 Stunden mit GTN (0,1-1 µM) vorbehandelt. Nach Auswaschen mit PBS wurde 15 Minuten mit IBMX-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit GTN (100 µM) oder NO-Naproxen (100 µM) über weitere 15 Minuten.

*) : P < 0,05; Inkubation vs. Kontrolle (-), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n = 3-6 Einzelexperimenten.

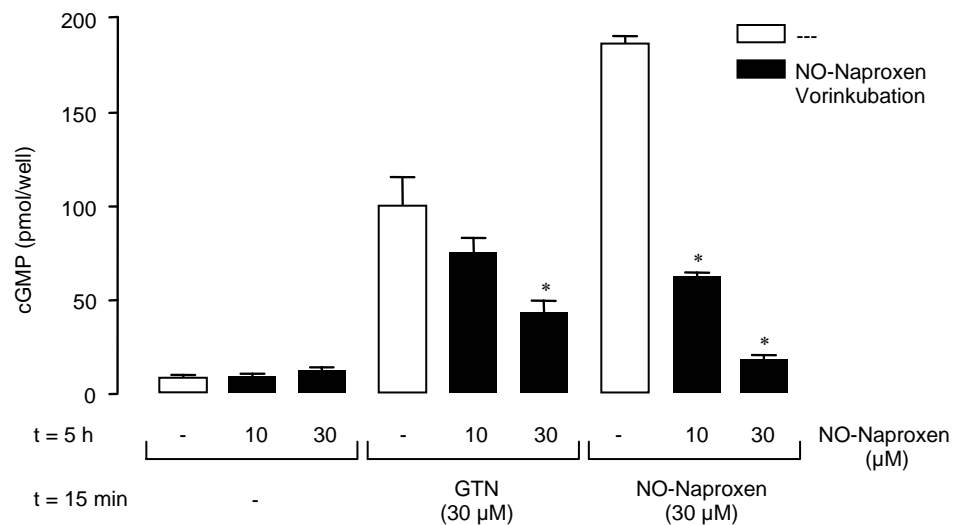


Abb. 7: Effekt einer Vorinkubation mit NO-Naproxen auf die anschließende Inkubation mit GTN oder NO-Naproxen.

LLC-PK-1-Zellen wurden 5 Stunden mit NO-Naproxen (10-30 µM) vorbehandelt. Nach Auswaschen mit PBS wurde 15 Minuten mit IBMX-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit GTN (30 µM) oder NO-Naproxen (30 µM) über weitere 15 Minuten.

*) : P < 0,05; Inkubation vs. Kontrolle (-), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n = 3-6 Einzelexperimenten.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit GTN (0,1-1 μM) über 5 Stunden schwächte die cGMP-Stimulation einer sich anschließenden Inkubation mit NO-Naproxen oder GTN signifikant ab (Abb. 6). Ebenso reduzierte eine Vorbehandlung mit NO-Naproxen (10-30 μM) den Anstieg der cGMP-Konzentration durch eine sich anschließende Inkubation mit GTN oder NO-Naproxen (Abb. 7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Freisetzung von NO aus NO-Naproxen und organischen Nitraten wie GTN über gemeinsame Stoffwechselwege verläuft.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde der Einfluss einer spontan NO-freisetzenden Verbindung untersucht. Der NO-Donor SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin) ist der aktive Metabolit des Koronartherapeutikums Molsidomin und setzt NO unabhängig von enzymatischer Spaltung frei. Durch Ringöffnung geht SIN-1 in SIN-1A über, aus dem sich NO spontan abspaltet (Feelisch, 1998; Polte et al., 1997). Im Gegensatz zu NO-Naproxen und GTN blieb die cGMP-Stimulation durch SIN-1 (10 μM) bei Vorinkubation der Zellen mit GTN, NO-Naproxen oder SIN-1 selbst unbeeinflusst (Abb. 8).

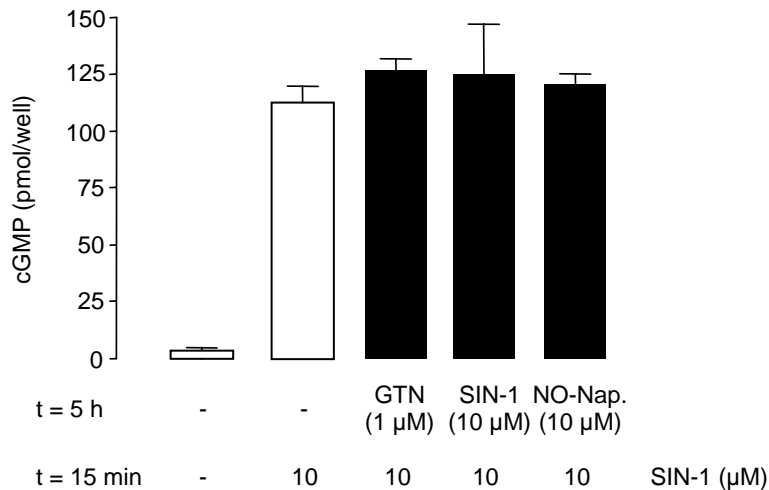


Abb. 8: Effekt einer Vorinkubation mit GTN, SIN-1 oder NO-Naproxen auf die anschließende Inkubation mit SIN-1.

LLC-PK-1-Zellen wurden 5 Stunden mit GTN (1 μM), SIN-1 (10 μM) oder NO-Naproxen (10 μM) vorbehandelt. Nach Auswaschen mit PBS wurde 15 Minuten mit IBMX-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit SIN-1 (10 μM) über weitere 15 Minuten.

*) $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (-), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten.

4.1.3 Zusammenfassung

NO-Naproxen verhält sich im Zellkulturmodell als NO-Donor. Innerhalb von 15 Minuten stimuliert NO-Naproxen konzentrationsabhängig einen Anstieg des cGMP-Spiegels in LLC-PK-1-Zellen. Kontrollversuche mit Naproxen und Vorbehandlung der Zellen mit SOD und Hämoglobin belegen, dass der Effekt dem freigesetzten NO-Radikal zuzuschreiben ist.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NO-Naproxen über Stoffwechselwege bioaktiviert wird, die auch an der Metabolisierung organischer Nitrate wie Glyceroltrinitrat beteiligt sind.

4.2 Induktion der Hämoxxygenase-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen

4.2.1 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch NO-NSAIDs

Die zellprotektiven Wirkungen von NO-NSAIDs in oxidativen Stresssituationen lassen eine Beteiligung antioxidativer Proteine vermuten. Eine Vielzahl von Studien belegt eine protektive Wirkung der induzierbaren Hämoxxygenase sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Foresti & Motterlini, 1999). Die bisherigen Ergebnisse charakterisieren die NO-NSAIDs als NO-Donoren im Zellkulturmodell. Die HO-1 ist durch NO-Donoren induzierbar und schützt Endothelzellen vor Schädigung durch oxidativen Stress (Motterlini et al., 1996a; Polte et al., 2000).

Mittels Northern-Blot-Analyse sollte der Frage nachgegangen werden, ob NO-NSAIDs die Transkription des HO-1-Gens in der humanen Endothelzelllinie ECV 304 aktivieren. Dazu wurden die Endothelzellen 8 Stunden mit NO-Naproxen, NO-Flurbiprofen oder NO-Acetylsalicylsäure (NO-ASS) inkubiert.

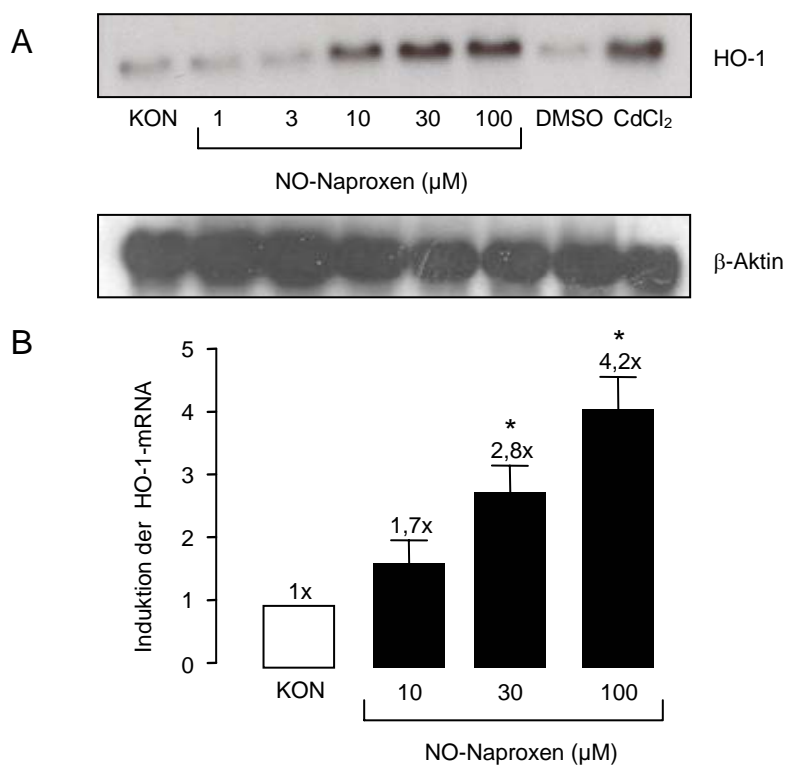


Abb. 9: Effekt von NO-Naproxen auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

(A) Repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin-Kontrolle, (B) Densitometrische Auswertung. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit NO-Naproxen (1-100 μ M), DMSO (1 μ l/ml) oder CdCl₂ (10 μ M) inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 4-6$ Einzelexperimenten.

Die Inkubation der Endothelzellen mit NO-Naproxen führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der HO-1-mRNA im Bereich von 10-100 μ M (Abb. 9). Mit einer NO-Naproxen-Konzentration von 30 μ M war eine signifikante, 2,8fache

Induktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle feststellbar. Mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 100 μM war im Durchschnitt eine 4,2fache Stimulation der mRNA-Bildung zu erkennen. Höhere Konzentrationen erbrachten keine weitere Steigerung (ohne Abb.). Als Kontrolle diente eine Inkubation mit dem HO-1-Induktor Cadmiumchlorid (CdCl_2 , 10 μM). NO-Naproxen wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die maximale DMSO-Konzentration lag bei 1 $\mu\text{l/ml}$ im Inkubationsansatz. In dieser Konzentration zeigte DMSO keine Eigeneffekte.

Im Gegensatz dazu hatte eine Inkubation mit Naproxen im Konzentrationsbereich bis 300 μM keinen induktiven Effekt auf die HO-1-mRNA-Bildung (Abb. 10).

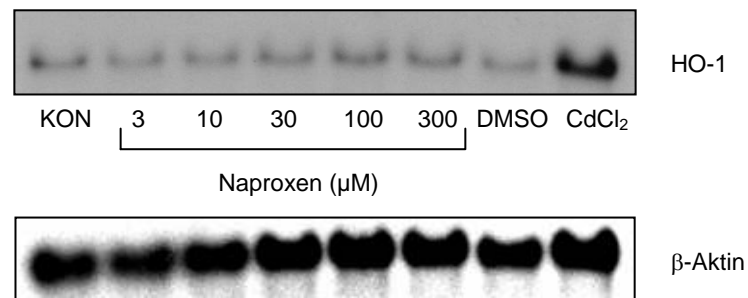


Abb. 10: Effekt von Naproxen auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit Naproxen (3-300 μM), DMSO (1 $\mu\text{l/ml}$) oder CdCl_2 (10 μM) inkubiert.

Darüber hinaus wurden die Endothelzellen mit NO-ASS im Konzentrationsbereich von 10-300 μM inkubiert. Erst ab 100 μM NO-ASS war eine signifikante, durchschnittlich 2,2fache Induktion der HO-1-mRNA gegenüber der unbehandelten Kontrolle detektierbar. Die höchste verwendete Konzentration von 300 μM stimulierte die HO-1-mRNA-Bildung durchschnittlich 4,1fach (Abb. 11). Noch höhere Konzentrationen erbrachten keine weitere Steigerung (ohne Abb.).

Acetylsalicylsäure (ASS) hatte im Konzentrationsbereich von 300 μM bis 1000 μM keinen Effekt auf den HO-1-mRNA-Spiegel (Abb. 11A).

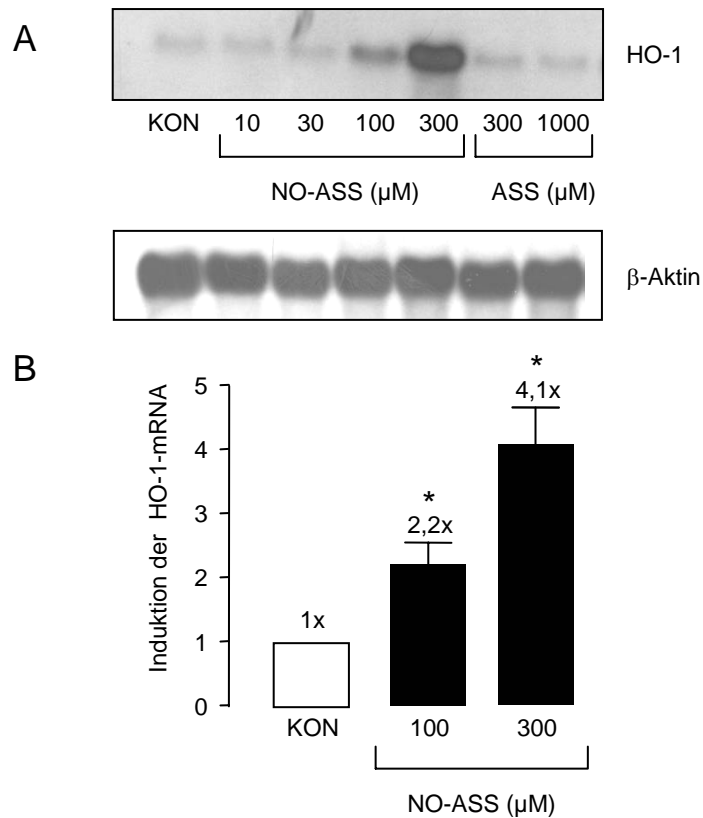


Abb. 11: Effekt von NO-ASS und Acetylsalicylsäure (ASS) auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

(A) Repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin-Kontrolle, (B) Densitometrische Auswertung. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit NO-ASS (10-300 μM) oder ASS (300-1000 μM) inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 4-6$ Einzelexperimenten.

Als weiteres NO-NSAID wurde NO-Flurbiprofen untersucht. Auch NO-Flurbiprofen aktivierte die Transkription des HO-1-Gens (Abb. 12). Interessanterweise führten im Vergleich zu den anderen untersuchten NO-NSAIDs schon geringe Konzentrationen im Bereich von 0,3-30 μM zu einer Induktion der HO-1-mRNA. Höhere Konzentrationen erbrachten keine stärkere Stimulation (ohne Abb.). Die maximal erreichbare, durchschnittlich 1,9fache Stimulation mit 30 μM NO-Flurbiprofen war deutlich geringer ausgeprägt als bei den Vergleichssubstanzen NO-Naproxen und NO-ASS.

Flurbiprofen hatte im gleichen Konzentrationsbereich keinen induktiven Effekt auf die HO-1-mRNA-Bildung (Abb. 13).

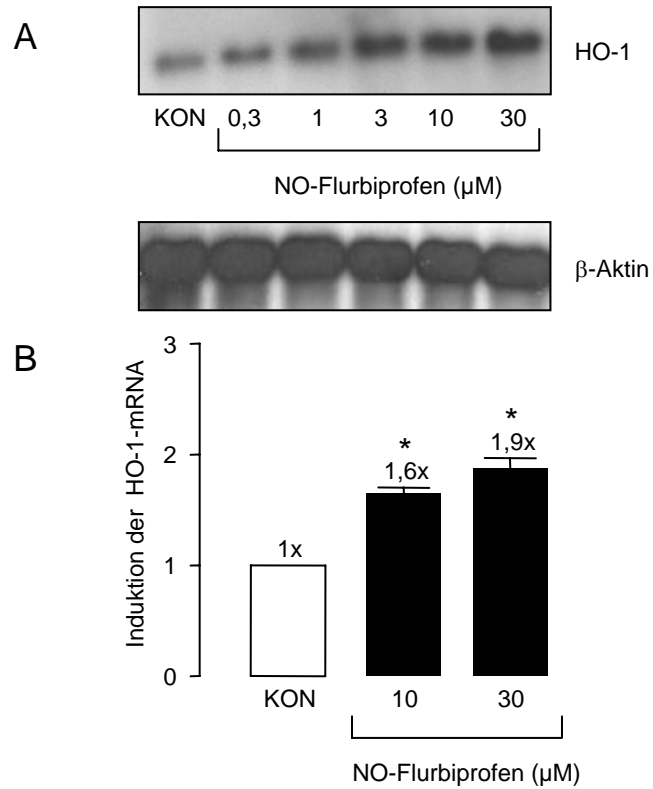


Abb. 12: Effekt von NO-Flurbiprofen auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

(A) Repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin-Kontrolle, (B) Densitometrische Auswertung. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit NO-Flurbiprofen (0,3-30 μM) inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 4-6$ Einzelexperimenten.

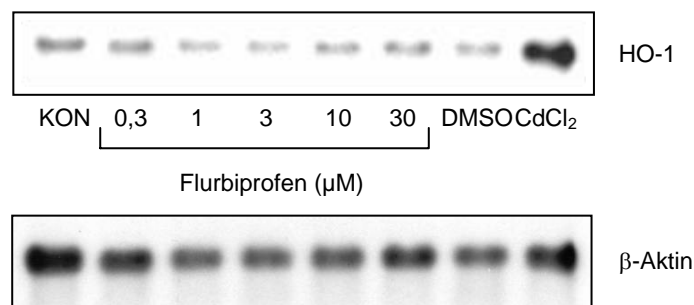


Abb. 13: Effekt von Flurbiprofen auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit Flurbiprofen (0,3-30 μM), DMSO (1 $\mu\text{l/ml}$) oder CdCl₂ (10 μM) inkubiert.

4.2.2 Zeitabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch NO-ASS

Am Beispiel von NO-ASS wurde außerdem die Bildung der HO-1-mRNA in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Die Endothelzellen wurden mit NO-ASS (300 μM) inkubiert.

Bereits nach 4 Stunden Inkubation war HO-1-mRNA im Northern-Blot-Experiment detektierbar. Die mRNA-Konzentration erhöhte sich mit zunehmender Inkubationsdauer und erreichte ihr Maximum im betrachteten Zeitraum nach 8 Stunden (Abb. 14).

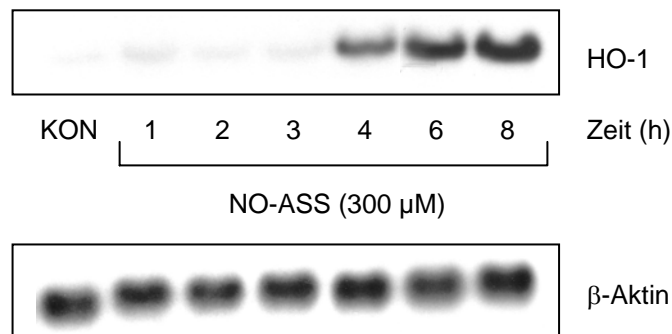


Abb. 14: Zeitverlauf der HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelerperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden bis zu 8 Stunden mit NO-ASS (300 μM) inkubiert.

4.2.3 Konzentrationsabhängiger Effekt von NO-NSAIDs auf die HO-1-Proteinexpression

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Stimulation der mRNA-Bildung zu einer vermehrten Proteinsynthese der HO-1 führt. Primäre Endothelzellen (PAE) wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen oder NO-ASS inkubiert.

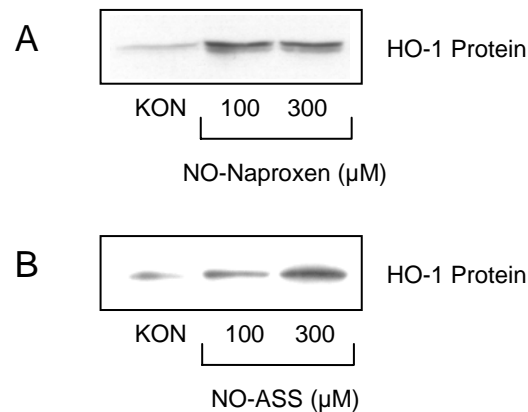


Abb. 15: Effekt von NO-Naproxen (A) und NO-ASS (B) auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

(A) Endothelzellen (PAE) wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen (100-300 μM) inkubiert. (B) Endothelzellen (PAE) wurden 24 Stunden mit NO-ASS (100-300 μM) inkubiert. Repräsentative Western Blots aus n = 3 Einzelexperimenten.

Aus Abb. 15 ist ersichtlich, dass die NO-NSAIDs die Expression des HO-1-Proteins konzentrationsabhängig stimulierten.

Dabei führte NO-Naproxen in einer Konzentration von 100 μM zu einer signifikanten Steigerung der HO-1-Proteinexpression. Die dreifach höhere Konzentration zeigte keinen stärkeren Effekt (Abb. 15A). Dieses Resultat steht in Einklang mit den Ergebnissen auf transkriptioneller Ebene.

Auch NO-ASS stimulierte die HO-1-Proteinexpression. Wie auf mRNA-Ebene hatte eine Konzentration von 300 μM den stärksten Effekt (Abb. 15B).

4.2.4 Effekt des COX-2-Hemmers Rofecoxib

Zu den Weiterentwicklungen der NSAIDs gehören auch die selektiven Hemmstoffe der COX-2, die Coxibe. Eine Charakterisierung des Wirkprofils der NO-NSAIDs sollte daher auch einen Vergleich mit Coxiben einschließen. Der COX-2-Hemmer Rofecoxib wurde unter gleichen Bedingungen wie die NO-NSAIDs untersucht.

Eine Inkubation humaner Endothelzellen mit Rofecoxib über 8 Stunden hatte keinen Effekt auf die Transkription des HO-1-Gens (Abb. 16). Dieses Ergebnis belegt zusammen mit den Untersuchungen mit NO-freien NSAIDs die Unabhängigkeit des Effektes von einer Hemmung der Cyclooxygenase.

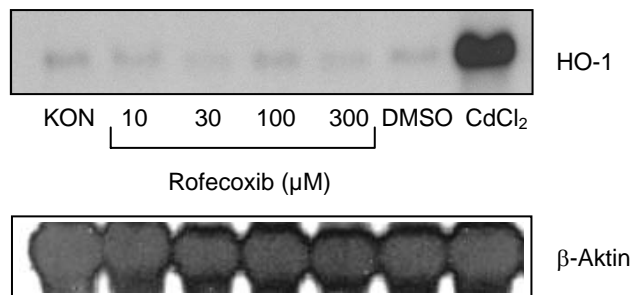


Abb. 16: Effekt von Rofecoxib auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit Rofecoxib (10-300 μ M), DMSO (1 μ l/ml) oder CdCl₂ (10 μ M) inkubiert.

4.2.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass NO-NSAIDs die Transkription des HO-1-Gens in Endothelzellen konzentrations- und zeitabhängig aktivieren. Die Stimulation der mRNA-Bildung führt zu einer konzentrationsabhängigen Expression des HO-1-Proteins.

Dabei sind die Verbindungen unterschiedlich potent. Bereits bei Inkubation mit 10 μ M NO-Flurbiprofen oder NO-Naproxen war HO-1-mRNA detektierbar. Die Induktion durch NO-Flurbiprofen erreichte ihr Maximum schon bei einer Konzentration von 30 μ M und fiel im Vergleich mit den anderen NO-NSAIDs mit 1,9facher Stimulation deutlich geringer aus. Die maximale Stimulation von durchschnittlich 4,2fach war mit 100 μ M NO-Naproxen zu erreichen. NO-ASS zeigte erst in Konzentration von 300 μ M eine vergleichbar starke Stimulation. Diese Ergebnisse charakterisieren NO-Naproxen in physiologisch relevanter Konzentration von 100 μ M als den stärksten Induktor der HO-1-mRNA im Vergleich zu NO-ASS und NO-Flurbiprofen.

Auch in Western-Blot-Experimenten zeigte sich bereits mit 100 μ M NO-Naproxen eine Stimulation der HO-1-Proteinexpression, die erst mit 300 μ M NO-ASS vergleichbar stark ausfiel.

Die NO-freien Muttersubstanzen zeigten keine Effekte auf die HO-1-mRNA-Bildung. Ebenso unwirksam war der selektive COX-2-Hemmer Rofecoxib. Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivierung der Transkription ursächlich auf die Freisetzung von NO zurückzuführen ist, nicht auf die Hemmung der COX-Isoenzyme.

4.3 Induktion der Hämoxigenase-1 durch NO-NSAIDs in gastralen Epithelzellen

Die vorhergehenden Versuche zeigen eine Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen. Diese Effekte können sowohl im kardiovaskulären System als auch in der gastralen Mikrozirkulation von Bedeutung sein. Im Folgenden sollte die Wirkung von NO-NSAIDs in der Magenschleimhaut näher untersucht werden.

Die Integrität der Epithelschicht ist maßgeblich an der Barrierefunktion der Mukosa beteiligt. Mit Hilfe von Northern- und Western-Blot-Analyse wurde der Frage nachgegangen, ob NO-NSAIDs die HO-1 auch im gastralen Epithel induzieren. Als Modell für die Epithelschicht der Magenschleimhaut dienten die humanen gastralen Epithelzelllinien AGS und KATO-III.

4.3.1 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA am Beispiel von NO-ASS

Die gastrale Epithelzelllinie KATO-III wurde 8 Stunden mit NO-ASS im Konzentrationsbereich von 30-300 μM oder mit ASS (300 μM) inkubiert.

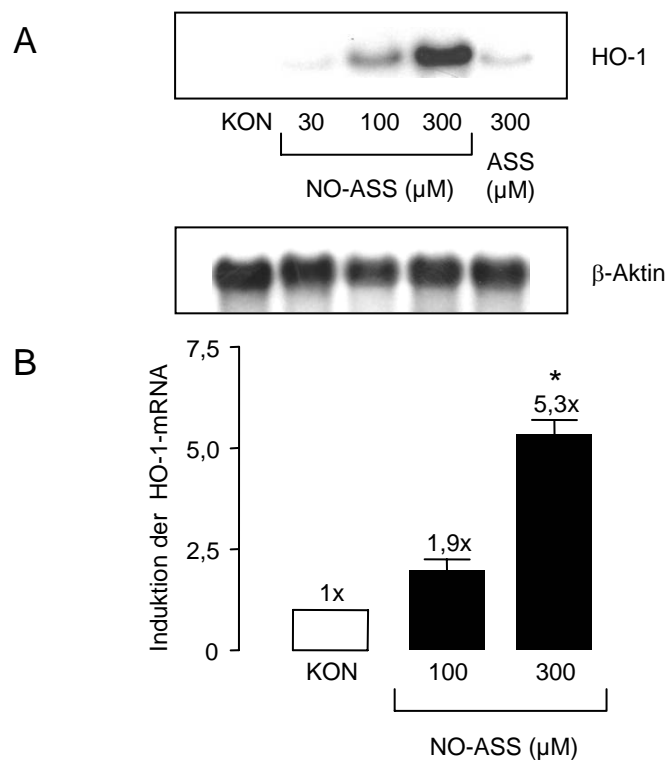


Abb. 17: Effekt von NO-ASS und ASS auf die HO-1-mRNA in gastralen Epithelzellen.

(A) Repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin-Kontrolle, (B) Densitometrische Auswertung. KATO-III-Zellen wurden 8 Stunden mit NO-ASS (30-100 μM) oder ASS (300 μM) inkubiert.

*) : $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 4-6$ Einzelexperimenten.

Auch in gastralen Epithelzellen stimulierte NO-ASS die Transkription des HO-1-Gens. Die HO-1-mRNA war ab einer NO-ASS-Konzentration von 100 μM detektierbar. Eine signifikante, durchschnittlich 5,3fache Induktion der HO-1-mRNA gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen war mit 300 μM NO-ASS feststellbar. ASS (300 μM) hatte keinen Effekt auf die HO-1-mRNA (Abb. 17).

4.3.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von NO-NSAIDs auf die HO-1-Proteinexpression

Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine Inkubation mit NO-NSAIDs in gastralen Epithelzellen die Proteinexpression der HO-1 stimuliert. Die gastrale Epithelzelllinie AGS wurde 24 Stunden mit NO-Naproxen (30-1000 μM) oder NO-ASS (100-300 μM) inkubiert.

Die Inkubation mit NO-Naproxen stimulierte die Proteinexpression konzentrationsabhängig. Die maximale Stimulation ist mit einer Konzentration von 100 μM erreicht. Die zehnfach höhere Konzentration erbrachte keine weitere Steigerung (Abb. 18A).

Auch NO-ASS steigerte die Expression des HO-1-Proteins. Dabei ist die maximale Stimulation mit einer Konzentration von 100 μM möglich. Durch die dreifach höhere Konzentration wurde die Proteinexpression nicht mehr stärker aktiviert (Abb. 18B).

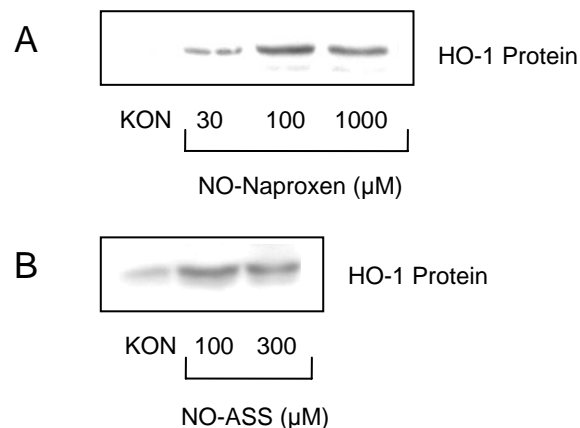


Abb. 18: Effekt von NO-Naproxen (A) und NO-ASS (B) auf die Expression des HO-1-Proteins in gastralen Epithelzellen.

(A) AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen (30-1000 μM) inkubiert. (B) AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-ASS (100-300 μM) inkubiert. Repräsentative Western Blots aus $n = 3$ Einzelexperimenten.

4.4 HO-1-Genregulation durch NO-NSAIDs

4.4.1 Einfluss von Sauerstoffradikalen

Die HO-1 wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Agenzien induziert. Viele dieser Substanzen verursachen direkt oder indirekt oxidativen Stress (Choi & Alam, 1996; Foresti & Motterlini, 1999). Auch mit dem starken Oxidanz Peroxynitrit, das aus Reaktion von NO mit Superoxid entsteht, wurde eine Induktion der HO-1 in Endothelzellen gezeigt (Foresti et al., 1999).

Es wurde untersucht, ob die Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder der Reaktion zu Peroxynitrit abhängig ist. N-Acetylcystein (NAC) ist eine Vorstufe des endogenen, antioxidativ wirkenden Glutathions. NAC wirkt neutralisierend auf Sauerstoffradikale und inhibierte auch die Induktion der HO-1 durch Peroxynitrit in Endothelzellen (Foresti et al., 1999).

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit NAC (10 mM) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit NO-ASS (300 μ M) inkubiert.

Aus Abb. 19 ist ersichtlich, dass NAC in einer Konzentration von 10 mM keinen Einfluss auf die HO-1-Induktion durch NO-ASS hatte. In der verwendeten Konzentration zeigte NAC keine Eigeneffekte.

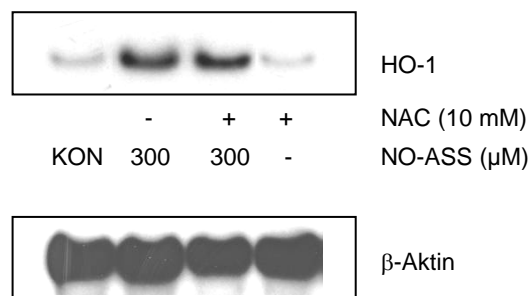


Abb. 19: Effekt des Antioxidanz NAC auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelerperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit NAC (10 mM) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (300 μ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Die Superoxiddismutase (SOD) baut Superoxid ab und verhindert dadurch die Reaktion mit NO zu Peroxynitrit (Gryglewski et al., 1986).

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit SOD (15 U/ml) vorbehandelt. Im Anschluss wurde die Inkubation mit NO-Naproxen (30 μ M) über 8 Stunden fortgesetzt.

Die Vorbehandlung mit SOD hatte keinen Einfluss auf die HO-1-Induktion durch NO-Naproxen (Abb. 20). SOD zeigte keine Eigeneffekte.

Diese Versuche demonstrieren, dass die NO-NSAID-induzierte Genaktivierung der HO-1 durch NO und nicht durch ROS oder Peroxynitrit vermittelt wird.

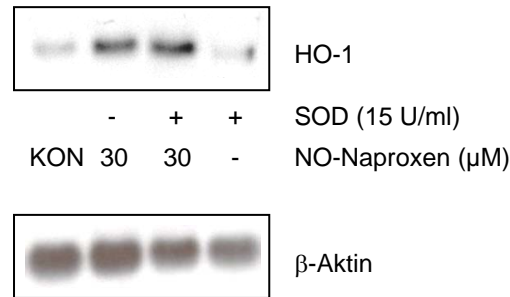


Abb. 20: Effekt der SOD auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-Naproxen in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit SOD (15 U/ml) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-Naproxen (30 μ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

4.4.2 Einfluss von cGMP-abhängigen Stoffwechselwegen

Wesentliche physiologische Wirkungen von NO werden über eine vermehrte Bildung von cGMP durch Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase vermittelt. Als *second messenger* spielt cGMP eine wichtige physiologische Rolle bei der Regulation von Calcium-Ionenkanälen und Aktivierung von Phosphodiesterasen und Proteinkinasen (Denninger & Marletta, 1999; Waldman & Murad, 1987). Welche Rolle cGMP bei der NO-vermittelten Induktion der HO-1 spielt, ist noch nicht geklärt. Einige Studien zeigen, dass cGMP nicht an der HO-1-Induktion durch spontane NO-Donoren beteiligt ist (Hartsfield et al., 1997; Liang et al., 2000). Andere belegen eine Involvierung von cGMP durch Aktivierung der Guanylatcyclase und der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (Immenschuh et al., 1998; Polte et al., 2000).

Ob cGMP im gleichen Zellkulturmodell wie die NO-NSAIDs die Transkription des HO-1-Gens aktiviert, wurde mit Hilfe des lipophilen, membrangängigen cGMP-Analogons 8-Bromo-cGMP (8-Br-cGMP) untersucht. Die Endothelzellen wurden 8 Stunden mit 8-Br-cGMP (30-1000 μ M) inkubiert. Als Kontrolle diente der HO-1-Induktor CdCl_2 (100 μ M).

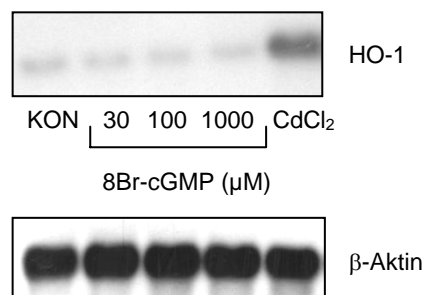


Abb. 21: Effekt von 8-Br-cGMP auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit 8-Br-cGMP (30-1000 μ M) oder CdCl_2 (10 μ M) inkubiert.

Die Inkubation mit 8-Br-cGMP hatte keinen Einfluss auf die Transkription des HO-1 Gens in Endothelzellen (Abb. 21).

Zusätzlich wurde der Einfluss eines Inhibitors der löslichen Guanylatcyclase auf die HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs untersucht. Der Hemmstoff 1H-(1,2,4)-Oxadiazol(4,3a)quinoxalin-1-on (ODQ) ist selektiv für die durch NO aktivierbare lösliche Guanylatcyclase. Andere Nukleotid-Synthasen wie die membranständige Guanylatcyclase oder die Adenylatcyclase werden nicht beeinflusst (Brunner et al., 1996). Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit ODQ (10 μ M) vorbehandelt. Anschließend wurde 8 Stunden mit NO-Naproxen (30-100 μ M) inkubiert. Aus Abb. 22 ist ersichtlich, dass ODQ keinen Einfluss auf die NO-Naproxen-vermittelte HO-1-Induktion ausübte.

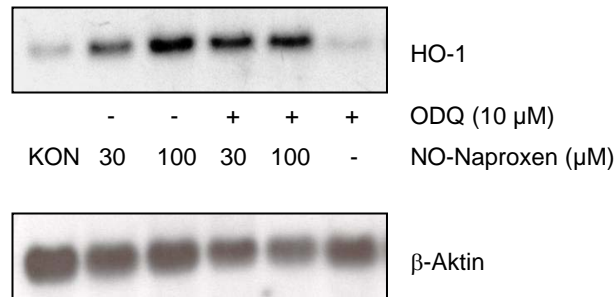


Abb. 22: Effekt von ODQ auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-Naproxen in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit ODQ (10 μ M) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-Naproxen (30-100 μ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Darüber hinaus wurde eine Beteiligung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG) untersucht. Proteinkinasen phosphorylieren Proteine und sind dadurch an der Aktivierung genregulatorischer Proteine beteiligt. Um eine mögliche Beteiligung der PKG an der HO-1-Induktion zu untersuchen, wurde der spezifische Hemmstoff KT5823 verwendet (Immenschuh et al., 1998). Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit KT5823 (1 μ M) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit NO-ASS (100-300 μ M) inkubiert.

Der PKG-Inhibitor hatte keine Effekt auf die Induktion der HO-1 durch NO-ASS (Abb. 23).

Die Versuche mit 8-Br-cGMP, ODQ und KT5823 in Endothelzellen zeigen, dass die HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs von cGMP als Mediator unabhängig ist.

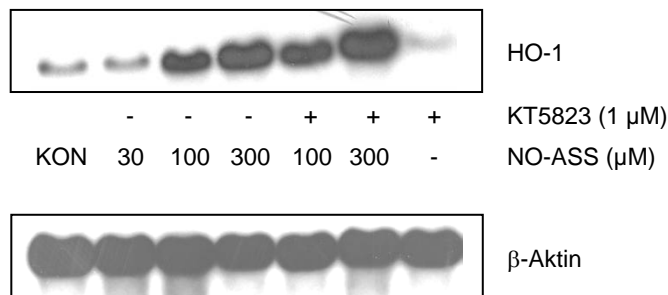


Abb. 23: Effekt des PKG-Inhibitors KT5823 auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit KT5823 (1 μ M) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (30-300 μ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

4.4.3 Einfluss des Translationsblockers Cycloheximid

Der Proteinsynthese-Hemmstoff Cycloheximid (CHX) blockiert die Translation von mRNA am Ribosom. Mit Hilfe von CHX sollte untersucht werden, ob die Aktivierung der Transkription des HO-1-Gens eine De-novo-Synthese von Proteinen erfordert.

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit CHX (5 μ g/ml) vorbehandelt. Anschließend folgte eine 8stündige Inkubation mit NO-ASS (100-300 μ M).

Der Translationsblocker hob die HO-1-Induktion durch NO-ASS nahezu vollständig auf (Abb. 24). Im Durchschnitt waren nur 12,6% der mRNA-Bildung feststellbar, die eine NO-ASS-Konzentration von 300 μ M in nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 28).

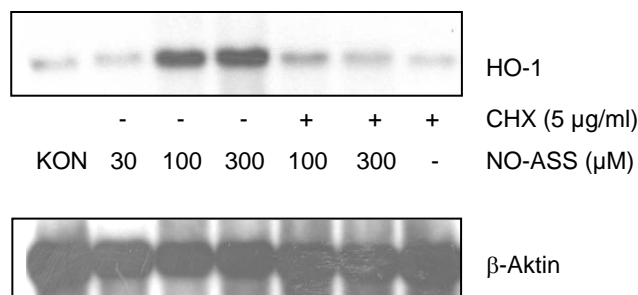


Abb. 24: Effekt des Translationsblockers CHX auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit CHX (5 μ g/ml) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (30-100 μ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Dieses Ergebnis spricht für die Beteiligung von neu gebildeten Proteinen an der Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs. Das HO-1-Gen wird also nicht durch direkte Interaktion von NO mit der DNA aktiviert. Die Notwendigkeit einer De-novo-Synthese lässt die Beteiligung so genannter *immediate-early-response* Gene vermuten. Dazu zählen beispielsweise Monomere des Transkriptionsfaktors AP-1,

dessen Involvement in die HO-1-Genaktivierung eine Reihe von Studien postuliert (Camhi et al., 1998; Elbirt et al., 1998; Kiemer et al., 2003; Terry et al., 1998).

4.4.4 Einfluss von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass NO in verschiedenen Zelltypen Bestandteile von MAP-Kinase-Signalwegen aktiviert (Jun et al., 1999; Kim et al., 1997a; Lander et al., 1996; Pfeilschifter & Huwiler, 1996).

Auch für die NO-abhängige Induktion der HO-1 wurde eine Beteiligung von MAP-Kinasen demonstriert (Buckley et al., 2003; Chen & Maines, 2000).

Ausgehend von diesen Befunden wurde untersucht, ob MAP-Kinasen an der Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen beteiligt sind.

Für die Kinasen p38, JNK und ERK sind spezifische, zellpermeable Inhibitoren erhältlich. Das Pyridinylimidazol-Derivat SB203580 ist ein spezifischer Hemmstoff der MAP-Kinase p38. Durch kompetitive Bindung an die ATP-Bindungsstelle wird die katalytische Aktivität der Kinase gehemmt (Lee et al., 1999).

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit SB203580 (45 μ M) vorbehandelt. Im Anschluss folgte eine Inkubation mit NO-ASS (100-300 μ M) über 8 Stunden.

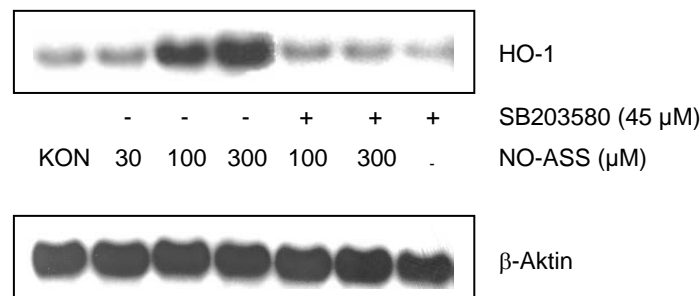


Abb. 25: Effekt des p38-Hemmstoffs SB203580 auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit SB203580 (45 μ M) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (100-300 μ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Der p38-Inhibitor SB203580 hob den Effekt von NO-ASS auf die HO-1-mRNA weitgehend auf (Abb. 25). Im Durchschnitt waren nur 17,7% der mRNA-Bildung feststellbar, die NO-ASS in einer Konzentration von 300 μ M in nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 28). SB203580 zeigte in der verwendeten Konzentration keine Eigeneffekte. Dieses Ergebnis belegt eine Beteiligung der MAP-Kinase p38 an der HO-1-Induktion.

Die MAP-Kinasen p38 und JNK werden über gemeinsame Stoffwechselwege aktiviert (Abb. 3). Daher wurde auch eine Beteiligung der Kinase JNK an der HO-1-Induktion durch NO-ASS untersucht. Das Anthrapyrazolon-Derivat SP600125 ist ein spezifischer JNK-Inhibitor. SP600125 ist ebenfalls ein ATP-kompetitiver Hemmstoff der katalytischen Aktivität, der im Zellkulturmodell dosisabhängig die Phosphorylierung von c-Jun hemmt (Bennett et al., 2001).

Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit SP600125 (45 μM) vorbehandelt und über weitere 8 Stunden mit NO-ASS (100-300 μM) inkubiert.

Die Vorbehandlung mit SP600125 hob die HO-1-Induktion durch NO-ASS nahezu vollständig auf (Abb. 26). Im Vergleich zu den nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte NO-ASS in einer Konzentration von 300 μM die HO-1-mRNA-Bildung nur um durchschnittliche 11,8% (Abb. 28).

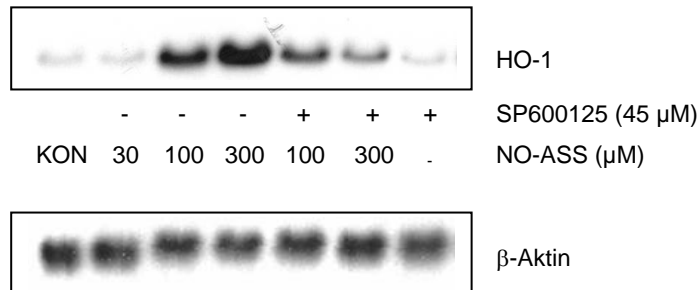


Abb. 26: Effekt des JNK-Hemmstoffs SP600125 auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit SP600125 (45 μM) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (100-300 μM) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Während der zur Aktivierung von p38 und JNK führende Signalweg vorwiegend durch inflammatorische Cytokine und verschiedene Stressfaktoren stimuliert wird, sind an der Aktivierung der MAP-Kinase ERK vor allem Wachstumsfaktoren beteiligt. Mit PD098059 existiert auch für diesen Signalweg ein spezifischer Inhibitor. Im Unterschied zu den anderen Substanzen ist PD098059 kein kompetitiver Hemmstoff und interferiert weder mit ATP noch mit der Substratbindung. PD098059 beeinflusst nicht die MAP-Kinase ERK selbst, sondern blockiert spezifisch die MAP-Kinase-Kinase, die ERK phosphoryliert.

Wiederum wurden die Endothelzellen 15 Minuten mit PD098059 (45 μM) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit NO-ASS (100-300 μM) inkubiert.

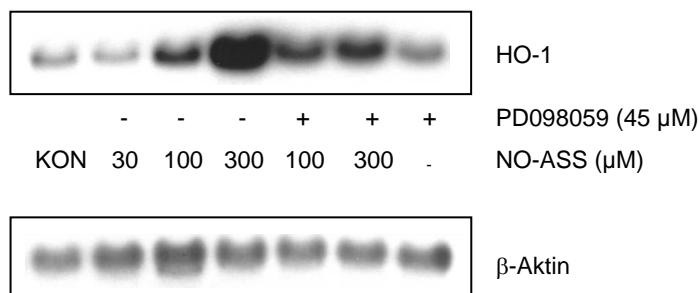


Abb. 27: Effekt des ERK-Hemmstoffs PD098059 auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus $n = 3$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit PD098059 (45 μM) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (100-300 μM) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Bei Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem ERK-Inhibitor PD098059 war ebenfalls eine signifikante Hemmung der HO-1-Induktion durch NO-ASS erkennbar (Abb. 27). PD098059 zeigte in der verwendeten Konzentration keine Eigeneffekte.

Die Hemmung war aber deutlich geringer ausgeprägt als bei Verwendung der p38- und JNK-Inhibitoren. Im Durchschnitt wurden noch 59,2% der HO-1-mRNA gebildet, die NO-ASS in einer Konzentration von 300 μ M in nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 28). Diese Hemmversuche führen zu der Annahme, dass die MAP-Kinase ERK bei der NO-NSAID-induzierten Genaktivierung der HO-1 auch eine Rolle spielt, die Bedeutung der p38- und JNK-Kinasen scheint aber wesentlich größer zu sein.

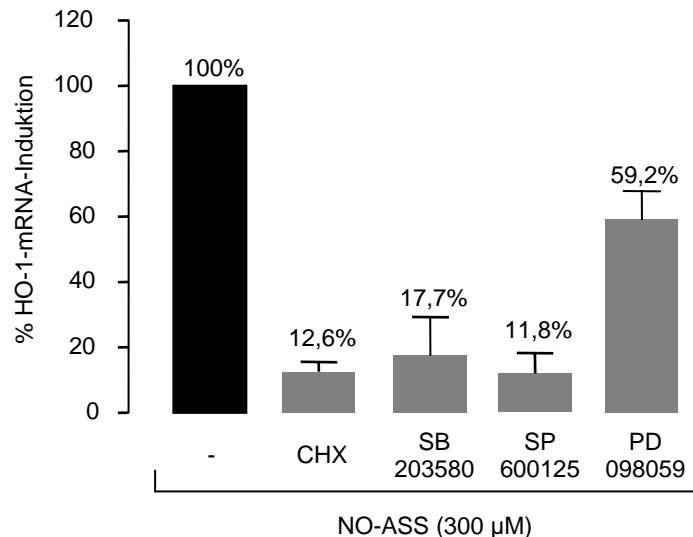


Abb. 28: Effekte von CHX und MAP-Kinase-Inhibitoren auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Densitometrische Auswertung.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten.

4.4.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen zeigen, dass die Transkription durch NO-vermittelte Effekte und nicht durch ROS oder Peroxynitrit induziert wird.

Der *second messenger* cGMP scheint bei der Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs nicht beteiligt zu sein.

Mit Hilfe des Translationsblockers CHX konnte gezeigt werden, dass die Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs eine De-novo-Synthese von Proteinen erforderte.

Die Experimente mit spezifischen Inhibitoren von MAP-Kinase-Signalwegen belegen eine Involvierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK bei der Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs. Vor allem die Stress-aktivierten Kinasen p38 und JNK scheinen eine bedeutende Rolle zu spielen.

4.5 Effekte der NO-NSAIDs in einem Modell für oxidativen Stress

In einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress wurde untersucht, ob NO-NSAIDs direkt oder indirekt antioxidative Wirkungen zeigen.

Dabei wurden Endothelzellen oder gastrale Epithelzellen mit NADPH inkubiert, wodurch die NADPH-abhängige Oxidase zur Superoxid-Bildung angeregt wird (Griendling et al., 2000; Guzik et al., 2000). Die NADPH-abhängige Oxidase zählt neben der Xanthin-Oxidase zu den im Entzündungsgeschehen hochregulierten Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren (Terry et al., 1998).

Die Konzentration an ROS lässt sich mit Hilfe von Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz am Luminometer messen (Li et al., 1998; Tarpey et al., 1999). Die Chemilumineszenz wurde in relativen Lichteinheiten (RLU) bestimmt. Die Stimulation der ROS-Bildung durch NADPH in unbehandelten Kontrollzellen wurde als maximal erreichbarer RLU-Wert (RLU_{max}) zu 100% gesetzt.

4.5.1 Effekt von NO-Naproxen in Endothelzellen

Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen in PBS resuspendiert und mit NO-Naproxen (3-300 μ M) sowie NADPH (100 μ M) und Lucigenin (50 μ M) inkubiert.

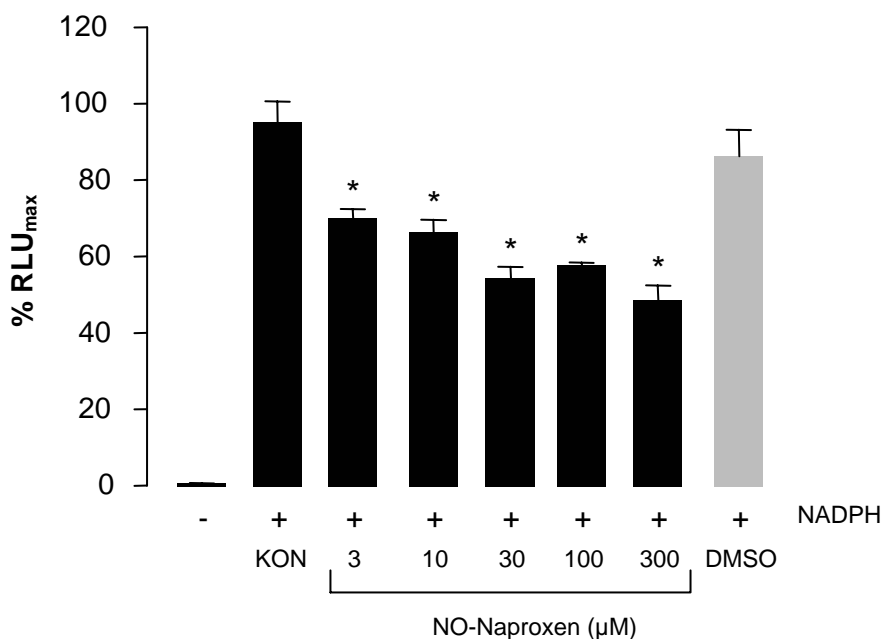


Abb. 29: Direkter Effekt von NO-Naproxen auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen.

ECV-304-Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit NO-Naproxen (3-300 μ M) oder DMSO (1 μ l/ml), NADPH (100 μ M) und Lucigenin (50 μ M) 10 Minuten inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Die Konzentration an ROS wurde durch direkte Zugabe von NO-Naproxen konzentrationsabhängig reduziert. Bereits in einer Konzentration von 3 μ M verringerte

NO-Naproxen den ROS-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant. Bei Inkubation mit einer NO-Naproxen-Konzentration von 300 μM war nur etwa 50% der ROS-Bildung detektierbar, die in den unbehandelten Kontrollzellen durch NADPH stimuliert wurde.

NO-Naproxen wurde in DMSO gelöst. Die verwendete DMSO-Konzentration (1 $\mu\text{l/ml}$) zeigte keinen signifikanten Effekt (Abb. 29).

Stickstoffmonoxid neutralisiert Sauerstoff- und Hydroxylradikale durch direkte Reaktionen. Mit Superoxid reagiert NO direkt zu Peroxynitrit. Diese Reaktion hemmt die Haber-Weiss-Reaktion, in der sich aus Superoxid und Wasserstoffperoxid unter anderem das hoch reaktive Hydroxylradikal bildet (Wink et al., 1999). Damit wäre die antioxidative Wirkung NO-freisetzender NSAIDs durch direkte Neutralisation von Sauerstoffradikalen erklärbar.

Die Ergebnisse zur Induktion der HO-1 zeigen auch indirekte, potenziell antioxidative Wirkungen der NO-NSAIDs.

Um den Einfluss der Induktion antioxidativer Proteine wie der HO-1 durch NO-NSAIDs zu untersuchen, wurden die Endothelzellen mit NO-Naproxen oder Naproxen 24 Stunden vorinkubiert. Durch die kurze Halbwertszeit und die hohe Reaktivität von NO in biologischen Medien sind direkte neutralisierende Wirkungen durch freie NO-Radikale nach 24 Stunden nicht mehr zu erwarten.

Die Zellen wurden mit PBS ausgewaschen und geerntet. Im Anschluss wurden sie resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 10 Minuten inkubiert.

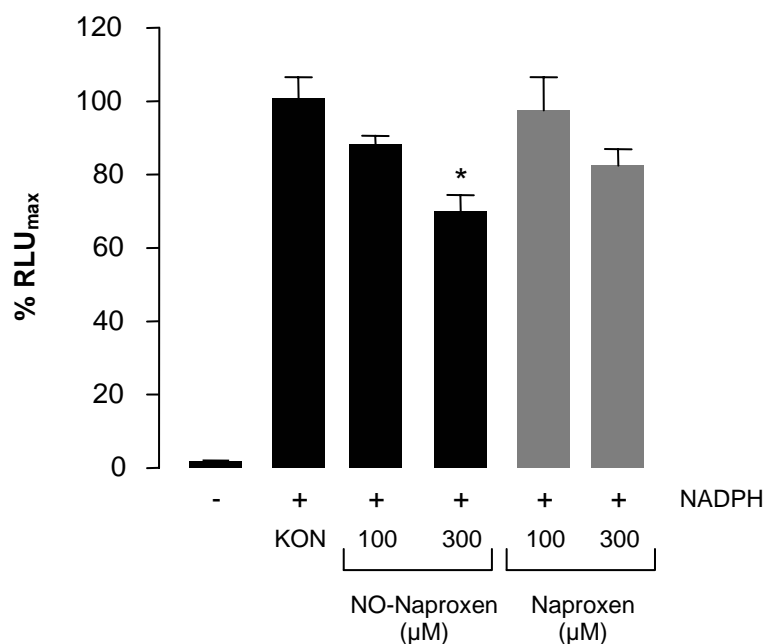


Abb. 30: Effekt von NO-Naproxen und Naproxen auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen.

ECV-304-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen (100-300 μM) oder Naproxen (100-300 μM) vorinkubiert. Im Anschluss wurde geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 10 Minuten inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelerperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Auch nach 24stündiger Vorinkubation der Endothelzellen reduzierte NO-Naproxen den ROS-Spiegel konzentrationsabhängig (Abb. 30). Mit einer NO-Naproxen-Konzentration von 300 μM zeigte sich eine signifikante Reduktion detektierbarer ROS um etwa 30 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Die Vorinkubation der Endothelzellen mit Naproxen zeigte keine signifikanten Effekte auf die Konzentration an ROS.

4.5.2 Effekte von NO-NSAIDs in gastralen Epithelzellen

Das Modell für oxidativen Stress wurde ebenfalls für die gastrale Epithelzelllinie KATO-III verwendet. Die Inkubationen erfolgten analog zu denen in Endothelzellen mit NO-Naproxen oder Naproxen bzw. NO-ASS oder ASS.

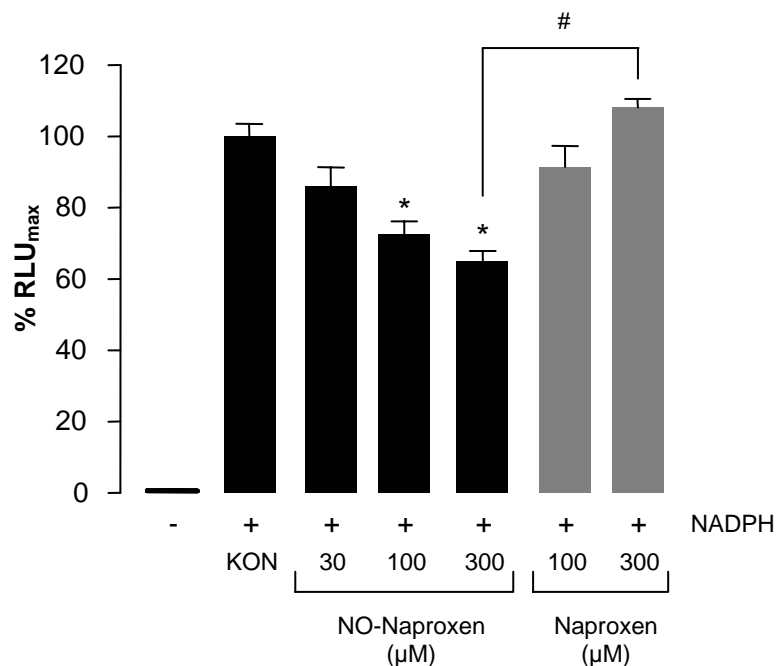


Abb. 31: Effekt von NO-Naproxen und Naproxen auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in gastralen Epithelzellen.

KATO-III-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen (30-300 μM) oder Naproxen (100-300 μM) vorinkubiert. Im Anschluss wurde geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 10 Minuten inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#): $P < 0,05$; NO-Naproxen (300 μM) vs. Naproxen (300 μM), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Auch in gastralen Epithelzellen senkte eine Vorinkubation mit NO-Naproxen über einen Zeitraum von 24 Stunden die ROS-Spiegel bei Stimulation der Superoxidbildung mit NADPH konzentrationsabhängig (Abb. 31). Erste Effekte wurden ab einer Konzentration von 30 μM sichtbar. Eine signifikante Reduktion des ROS-Spiegels im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 100 μM . Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 300 μM NO-Naproxen war der signifikante Effekt einer etwa 30%igen Reduktion des ROS-Spiegels mit dem in Endothelzellen vergleichbar ausgeprägt. Mit Naproxen zeigten sich keine signifikanten Effekte.

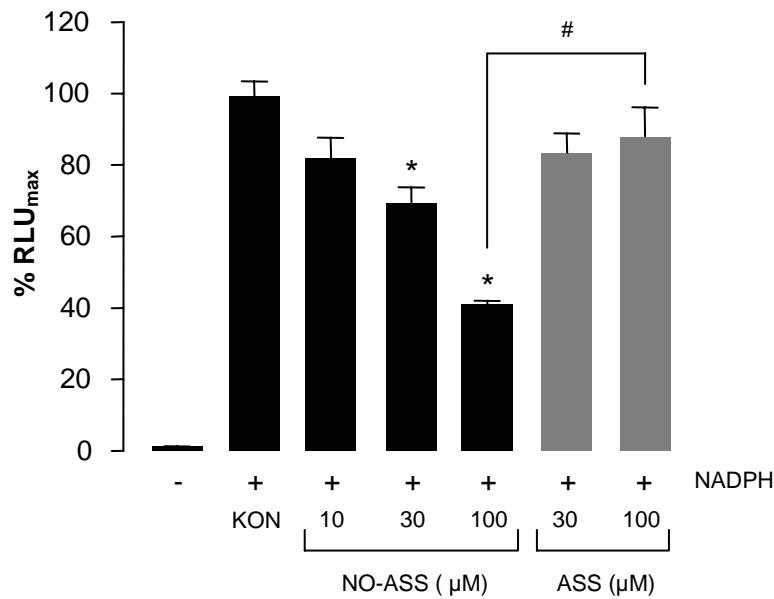


Abb. 32: Effekt von NO-ASS und ASS auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in gastralen Epithelzellen.

KATO-III-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-ASS (10-100 μM) oder ASS (30-100 μM) vorinkubiert. Im Anschluss wurde geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 10 Minuten inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#): $P < 0,05$; NO-ASS (100 μM) vs. ASS (100 μM), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Deutlichere Effekte zeigten sich bei Vorbehandlung der KATO-III-Zellen mit NO-ASS oder ASS. Bereits ab 30 μM NO-ASS wurde die Konzentration an ROS signifikant um etwa 30% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen reduziert. Mit einer Konzentration von 100 μM NO-ASS waren nur noch etwa 40% des ROS-Spiegels detektierbar, den NADPH in nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 32).

4.5.3 Einfluss des HO-1-Metaboliten Bilirubin

Um eine mögliche Beteiligung der HO-1 an den antioxidativen Effekten der NO-NSAIDs zu analysieren, wurde der Einfluss des HO-1-Metaboliten Bilirubin auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den verwendeten Zelltypen untersucht.

Die HO-1 wird als antioxidatives Enzym beschrieben (Foresti & Motterlini, 1999; Polte et al., 2000). Die antioxidative Wirkung wird dabei vor allem dem Metaboliten Bilirubin zugeordnet. Eine Reihe von Studien charakterisierte Bilirubin *in vitro* und *in vivo* als direktes Antioxidanz (Clark et al., 2000b; Dore et al., 1999; Stocker et al., 1987).

Die jeweiligen Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, geerntet und in PBS resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit NADPH (100 μM), Lucigenin (50 μM) und Bilirubin 10 Minuten inkubiert.

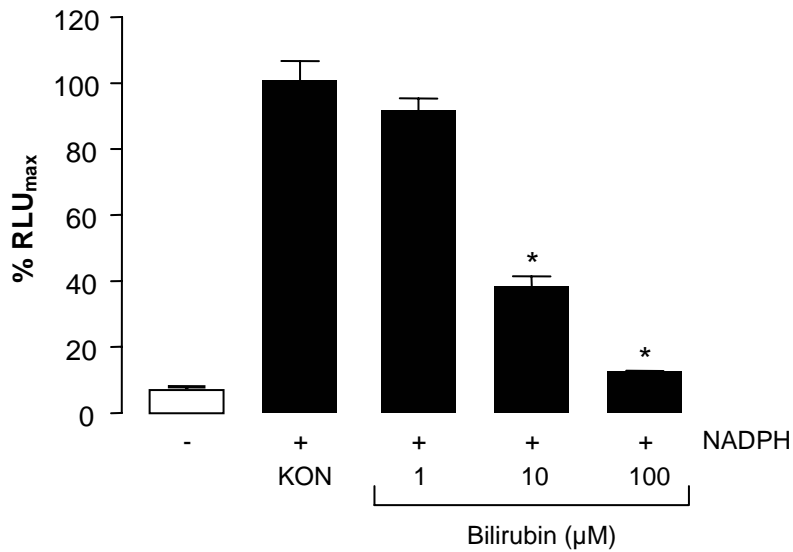


Abb. 33: Effekt von Bilirubin auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen.

ECV-304-Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit Bilirubin (1-100 µM), NADPH (100 µM) und Lucigenin (50 µM) 10 Minuten inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Bilirubin wirkte in Endothelzellen konzentrationsabhängig antioxidativ. Ab 10 µM eingesetzter Konzentration war eine signifikante Reduktion des ROS-Spiegels festzustellen. Eine Bilirubin-Konzentration von 100 µM reduzierte die ROS-Bildung bei Stimulation der NADPH-Oxidase um 90% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 33). Damit wurde der ROS-Spiegel annähernd auf das Niveau nicht-stimulierter Kontrollzellen gesenkt.

Der Einfluss einer Inkubation mit Bilirubin wurde auch in den gastralen Epithelzellen untersucht. Auch in diesem Zellmodell wirkte Bilirubin antioxidativ (Abb. 34). Bereits ab einer Konzentration von 0,3 µM zeigte sich ein signifikanter Effekt auf den ROS-Spiegel. In der höchsten verwendeten Konzentration senkte Bilirubin die Konzentration an ROS bei Stimulation der NADPH-Oxidase um etwa 80% im Vergleich zur Kontrolle.

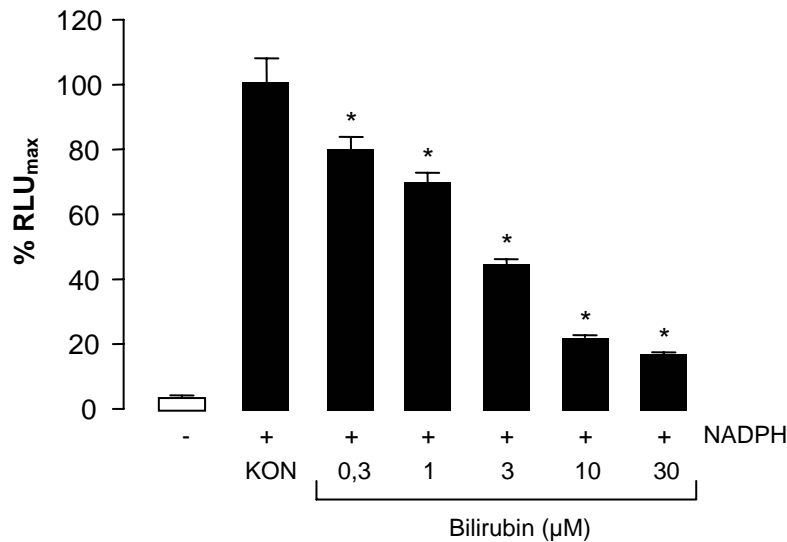


Abb. 34: Effekt von Bilirubin auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in gastralen Epithelzellen.

KATO-III-Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit Bilirubin (1-100 µM), NADPH (100 µM) und Lucigenin (50 µM) 10 Minuten inkubiert.

*) : $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

4.5.4 Einfluss eines Hämoxxygenase-Inhibitors auf die antioxidative Wirkung der NO-NSAIDs

Die signifikanten Effekte der NO-NSAIDs auf die Konzentration an freien Sauerstoffradikalen bei 24stündiger Vorbehandlung der jeweiligen Zelllinie sprechen für eine Stimulation antioxidativer Stoffwechselwege. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass NO-NSAIDs die HO-1 in beiden untersuchten Zelltypen induzieren. Auch der HO-1-Metabolit Bilirubin zeigte bereits in niedrigen Konzentrationen signifikante antioxidative Effekte.

Mit Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP) steht ein selektiver Hemmstoff der Hämoxxygenase zur Verfügung (Foresti et al., 1999; Petrache et al., 2000; Polte et al., 2000). Durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit SnPP sollte der Frage nachgegangen werden, ob die antioxidativen Effekte der NO-NSAIDs ursächlich auf die Induktion der HO-1 zurückzuführen sind.

Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit SnPP (10 µM) vorbehandelt und anschließend mit NO-Naproxen oder NO-ASS über 24 Stunden inkubiert. Die Aufarbeitung und Inkubation zur Messung der ROS-Spiegel wurde wie bei den vorausgegangenen Versuchen durchgeführt.

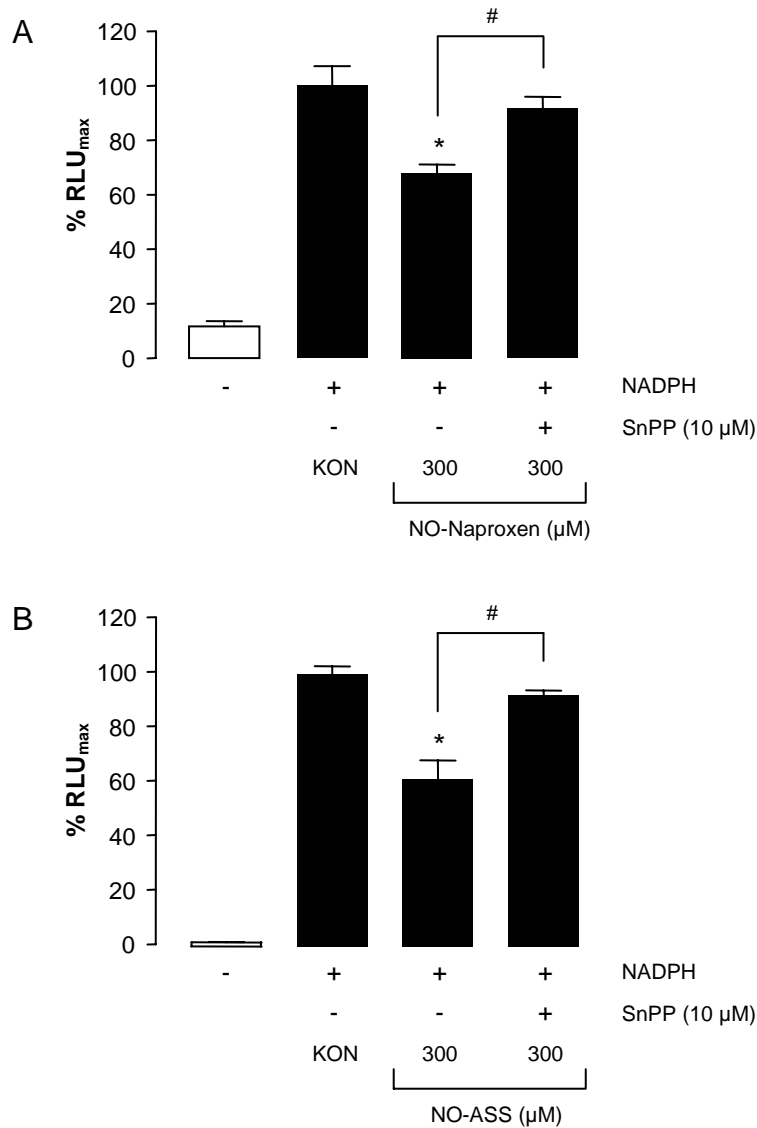


Abb. 35: Einfluss des Hämoxygenase-Inhibitors SnPP auf die Reduktion der NADPH-abhängigen ROS-Bildung durch NO-Naproxen (A) und NO-ASS (B).

ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit SnPP vorbehandelt und anschließend 24 Stunden mit NO-Naproxen (300 µM) oder NO-ASS (300 µM) inkubiert. Im Anschluss wurde geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 µM) und Lucigenin (50 µM) 10 Minuten inkubiert.

*): $P < 0,05$; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#): $P < 0,05$; NO-NSAID vs. NO-NSAID + SnPP, einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Die Versuche mit SnPP zeigen eine signifikante Aufhebung des NO-NSAID-induzierten Effekts in Endothelzellen durch Hemmung der HO-1-Aktivität. Diese Ergebnisse belegen eindeutig einen kausalen Zusammenhang zwischen der HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs und deren antioxidativer Wirkung bei Inkubation von Endothelzellen über 24 Stunden.

4.5.5 Zusammenfassung

NO-NSAIDs zeigten in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress direkte und indirekte antioxidative Wirkungen. Sowohl bei direkter Zugabe als auch nach 24stündiger Vorinkubation mit anschließendem Auswaschen reduzierten NO-NSAIDs den Anstieg der Sauerstoffradikal-Konzentration bei Stimulation der NADPH-Oxidase.

Der HO-1-Metabolit Bilirubin zeigte im gleichen Modell konzentrationsabhängige antioxidative Effekte. Dieser Befund dokumentiert, dass HO-1-Metabolite unter den gewählten Bedingungen als Mediatoren der NO-NSAID-Effekte in Frage kommen.

Mit Hilfe des Hämoxygenase-Inhibitors SnPP konnte schließlich ein kausaler Zusammenhang zwischen der HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs und deren antioxidativen Wirkungen festgestellt werden.

5 Diskussion

NSAIDs gehören weltweit zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten und den gängigsten, frei verkäuflichen Präparaten. Der längerfristige Einsatz von NSAIDs zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen ist jedoch vor allem durch gastrointestinale Komplikationen und eine Störung der Nierenfunktion eingeschränkt (Wallace, 1997). Bei etwa 15-30% der Patienten, die regelmäßig NSAIDs einnehmen, lassen sich endoskopisch Magen-Darm-Ulzera feststellen. Dyspeptische Beschwerden im oberen Gastrointestinaltrakt treten sogar bei bis zu 60% der NSAID-Anwender auf (Laine, 2003). Darüber hinaus erhöhen NSAIDs den Blutdruck und beeinflussen die Wirksamkeit antihypertensiver Therapien. Für Herz-Kreislauf-Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen mangelt es bisher jedoch an wirksamen, weniger riskanten Alternativen.

Die Einnahme von NSAIDs hat sich als Therapie auch zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse etabliert. ASS blockiert bei niedrig dosierter (75-100 mg/Tag), regelmäßiger Einnahme effektiv die TxA_2 -Synthese durch irreversible Hemmung der COX-1 in den Thrombozyten. In den meisten Geweben bleibt die Bildung der Prostaglandine unbeeinflusst, allerdings nicht im Magen. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse der *US Preventive Services Task Force* betrachtete fünf klinische Studien, in denen ASS zur Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen über 4-7 Jahre eingenommen wurde. Die zusammengefassten Daten dieser Studien zeigen, dass ASS das Risiko für eine koronare Herzkrankheit um 28% senkte. Die Gesamtmortalität blieb allerdings unbeeinflusst. Dies wird unter anderem den gastrointestinalen Komplikationen zugeschrieben. Insbesondere bei älteren Patienten trägt die Häufigkeit gastrointestinaler Blutungen signifikant zur Gesamtmortalität bei (Fiorucci & Del Soldato, 2003; Hayden et al., 2002).

Diese Nebenwirkungen limitieren den Nutzen der NSAIDs als hochwirksame, therapeutisch wertvolle Arzneistoffgruppe. In den letzten Jahren wurden daher verschiedene Strategien verfolgt, die gastrale Toxizität der NSAIDs zu verringern. Der Einsatz von Prodrugs, Magensäure-resistenten Manteltabletten oder Formulierungen, die den Arzneistoff langsam freisetzen, konnte die gastralen Nebenwirkungen nicht signifikant reduzieren (Wolfe et al., 1999). Eine andere Strategie ist die gleichzeitige Gabe von NSAIDs und Misoprostol. Dieses Prostaglandin-Derivat soll bei Hemmung der COX-1 in der Mukosa fehlende Prostaglandine ersetzen. In der *MUCOSA*-Studie reduzierte Misoprostol signifikant das Auftreten gastrointestinaler Komplikationen bei der gleichzeitigen Einnahme von NSAIDs (Silverstein et al., 1995). Allerdings treten auch unter dieser Therapie eine Reihe von Nebenwirkungen auf. Dazu zählen Krämpfe, dyspeptische Beschwerden und bei etwa 11% der Patienten in der *MUCOSA*-Studie eine Diarrhö. Auf Grund eines relativ hohen Kosten-Nutzen-Verhältnisses wird die prophylaktische Gabe von Misoprostol daher oftmals in Frage gestellt (Wallace, 1997).

Zu den weiteren Strategien gehört die Begleittherapie mit Hemmstoffen der Säuresekretion wie Histamin- (H_2) -Rezeptorantagonisten oder Protonenpumpen-Hemmern. Die H_2 -Rezeptorantagonisten senken das Risiko für gastrale Ulzera nicht effektiv. Darüber hinaus können sie die Warnsymptome schwerer gastrointestinaler Komplikationen maskieren. Protonenpumpen-Hemmer dagegen fördern die Heilung NSAID-induzierter Ulzera und reduzieren das Risiko für gastrale Blutungen. Außerdem mindern sie dyspeptische Beschwerden (Hawkey & Langman, 2003). Da Protonenpumpen-Hemmer in der Regel gut verträglich sind, wird deren prophylaktische Gabe bei Risikopatienten zusätzlich zur NSAID-Therapie empfohlen (Laine, 2003).

Die 1999 auf den Markt gekommenen Coxibe sollten die Ansprüche an sicherere NSAIDs in der Schmerz- und Rheumatherapie erfüllen und die zusätzliche Gabe eines Protonenpumpen-Hemmers überflüssig machen. Coxibe hemmen selektiv die bei Schmerz und Entzündung induzierte COX-2. Die konstitutiv exprimierte COX-1 in der Magenschleimhaut wird jedoch nicht beeinflusst (FitzGerald & Patrono, 2001; Mitchell & Warner, 1999). Das belegen klinische Studien, in denen das Risiko für gastrointestinale Komplikationen um 50% gesenkt war (Bombardier et al., 2000; Silverstein et al., 2000). Doch auch die Coxibe sind nicht frei von unerwünschten Wirkungen. Die COX-2 wird nicht nur durch proinflammatorische Mediatoren induziert, sondern auch konstitutiv exprimiert. Durch Hemmung von COX-2-Enzymen in der Niere erhöhen Coxibe den Blutdruck und verursachen Ödembildungen (Hawkey & Langman, 2003). Die Hemmung der COX-2 beeinträchtigt die Wundheilung und verzögert die Heilung von Magenulzera (Mizuno et al., 1997; Schmassmann et al., 1998). Bei Hypertonie, Herzinsuffizienz oder eingeschränkter Nierenfunktion ist die Therapie mit Coxiben daher mit dem gleichen Risiko verbunden wie der Einsatz klassischer NSAIDs.

Da Coxibe die COX-1 in den Thrombozyten per se nicht beeinflussen, besitzen sie nicht die positiven antithrombotischen Eigenschaften klassischer NSAIDs. Im Gegenteil scheinen Coxibe das kardiovaskuläre Risiko eher zu erhöhen (Mukherjee et al., 2001). Die *VIGOR*-Studie bestätigte die gastrointestinale Sicherheit des Coxibs Rofecoxib, belegte aber auch ein fünffach höheres Herzinfarkttrisiko im Vergleich zum klassischen NSAID Naproxen (Bombardier et al., 2000). Die *CLASS*-Studie mit Celecoxib lässt sich dahingehend deuten, dass dieses Risiko durch die Begleittherapie mit ASS vermeidbar ist (Silverstein et al., 2000). Eine gleichzeitige Einnahme von ASS könnte jedoch langfristig die gastrointestinalen Vorteile zunichte machen. Bei älteren, multimorbiden Patienten stellt sich daher die Frage, ob eine Schmerztherapie mit Coxiben überhaupt sinnvoll ist.

Die Entwicklung gastroprotektiver NSAIDs ist nach wie vor von großem medizinischem Interesse. Die neueste Weiterentwicklung von NSAIDs sind die dual wirkenden NO-NSAIDs. Diese kombinieren die Hemmung beider COX-Isoenzyme mit einer kontrollierten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Keeble & Moore, 2002).

In der Magenschleimhaut endogen gebildetes NO wirkt mit den Prostaglandinen synergistisch protektiv. Eine Reihe von Studien bestätigt, dass NO bei Hemmung der COX die Funktion der Prostaglandine übernehmen kann. Durch Dilatation der Gefäße hält NO die Durchblutung der Mukosa aufrecht. Am Gefäßendothel hemmt NO die Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten. NO stimuliert zusätzlich die luminale Sekretion von Schleim, Flüssigkeit und Bicarbonat. Außerdem kann NO sowohl Endothel- als auch Epithelzellen direkt vor Schädigung durch prooxidative oder proapoptotische Agenzien schützen (Wallace & Miller, 2000).

Die gleichzeitige Applikation von NO-Donoren und NSAIDs schützte im Tiermodell die Mukosa und beschleunigte die Heilung gastraler Ulzera (Barrachina et al., 1995; Konturek et al., 1993; Kosonen et al., 1999; Lopez-Belmonte et al., 1993). Eine epidemiologische Studie belegte darüber hinaus, dass bei Einnahme konventioneller NO-Donoren das gesteigerte Risiko gastrointestinaler Blutungen durch niedrig dosierte ASS deutlich geringer ist (Lanas et al., 2000). Spontan NO-freisetzende Verbindungen und organische Nitrate wie GTN eignen sich jedoch nicht zur Präventionstherapie. Sie setzen NO schnell und kurzzeitig frei und haben dadurch für diese Indikation unerwünschte blutdrucksenkende Effekte.

NO-NSAIDs sind saure NSAIDs, deren Carboxylgruppe mit einer NO-freisetzenden Gruppe (z.B. Nitrooxybutyl-, Nitrooxymethylphenyl-Gruppe) verestert ist. NO wird aus diesen Verbindungen enzymatisch abgespalten. Die Freisetzung erfolgt daher langsamer und dauert länger an als bei konventionellen NO-Donoren. Im Tiermodell verlief die NO-Freisetzung aus NO-NSAIDs mit niedriger Rate über mehrere Stunden. Die Nitratkonzentrationen im Plasma und der Anstieg der cGMP-Konzentration in Thrombozyten lagen deutlich unter den mit organischen Nitraten wie GTN erreichten

Konzentrationen (Muscara et al., 2001). In der kontrollierten Freisetzung könnte auch die Begründung dafür liegen, warum NO-NSAIDs den systemischen Blutdruck nicht beeinflussen. Im Tiermodell erfolgte keine Blutdrucksenkung durch die Gabe von NO-NSAIDs. Nur bei experimentell hervorgerufener Hypertension senkten NO-NSAIDs den Blutdruck (Muscara et al., 2001; Wallace et al., 1994). Auch in den ersten Humanstudien wurde der Blutdruck durch NO-NSAIDs nicht beeinflusst (Fiorucci et al., 2003; Hawkey et al., 2003).

Da NO-NSAIDs aus zwei aktiven Gruppen bestehen, setzt sich das Wirkprofil aus COX-abhängigen und NO-vermittelten Effekten zusammen. Einige der antiinflammatorischen, analgetischen und antithrombotischen Wirkungen sind nicht mit höheren Konzentrationen der Muttersubstanzen zu erreichen und daher eindeutig der NO-Freisetzung zuzuschreiben (Wallace et al., 2002). Die molekularen Wirkmechanismen der NO-NSAIDs sind allerdings noch nicht vollständig geklärt.

Bisher konnte gezeigt werden, dass einige der Effekte über die NO-abhängige Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und die gesteigerte Bildung des *second messengers* cGMP vermittelt werden.

Über diesen Signalweg dilatieren NO-NSAIDs lokal Blutgefäße und halten die Durchblutung von Geweben aufrecht. So schützen NO-NSAIDs nicht nur Magen und Niere vor ischämischer Schädigung, neuere Studien zeigen auch eine kardioprotektive Wirkung.

In der vorliegenden Arbeit konnte NO-Naproxen als potenter Aktivator des cGMP/Guanylatcyclase-Systems charakterisiert werden. Die verwendeten LLC-PK-1-Zellen stellen ein etabliertes Modell für Untersuchungen an diesem System dar (Bennett et al., 1989; Hinz & Schröder, 1998; Schröder & Schröder, 1990). NO-Naproxen stimulierte in LLC-PK-1-Zellen die cGMP-Bildung konzentrationsabhängig bis zu 27fach über den Basalspiegel. Untersuchungen mit Superoxiddismutase (SOD) und Hämoglobin belegen, dass die Steigerung des cGMP-Spiegels ursächlich auf die Freisetzung von NO zurückzuführen ist. Die SOD wirkt neutralisierend auf Superoxid, das mit NO zu Peroxynitrit reagiert (Wink et al., 1999). Die Vorbehandlung mit SOD verdoppelte den Effekt von NO-Naproxen auf die cGMP-Bildung. Hämoglobin fungiert als NO-Radikalfänger und hob den Effekt von NO-Naproxen nahezu vollständig auf.

Welche Enzymsysteme die Abspaltung von NO aus den NO-NSAIDs katalysieren, bedarf noch der Klärung. Eine Vorinkubation der LLC-PK-1-Zellen mit GTN über 5 Stunden führte zur konzentrationsabhängigen *Downregulation* der NO-Freisetzung sowohl aus GTN als auch aus NO-Naproxen. Ebenso war bei einer Vorinkubation mit NO-Naproxen die NO-Freisetzung aus GTN und NO-Naproxen selbst konzentrationsabhängig reduziert. Diese Kreuzempfindlichkeit zwischen NO-Naproxen und GTN gibt einen Beleg dafür, dass beide Verbindungen über gleiche Stoffwechselwege bioaktiviert werden. Dies steht in Einklang mit einer NO-ASS-Studie im gleichen Modellsystem (Grosser & Schröder, 2000). Für organische Nitrate wie GTN konnte eine Beteiligung von Cytochrom-P450-Enzymen gezeigt werden, die somit auch für die Bioaktivierung der NO-NSAIDs in Frage kommen. (Schröder, 1992; Yuan et al., 1997). Chen et al. identifizierten kürzlich eine mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase, die zur NO-Freisetzung aus GTN beiträgt und auch bei der Bioaktivierung der NO-NSAIDs eine Rolle spielen könnte (Chen et al., 2002b).

NO-NSAIDs wirken ebenfalls über den Mediator cGMP antithrombotisch. So besitzt NO-ASS durch den dualen Wirkmechanismus stärkere antithrombotische Eigenschaften als ASS (Momi et al., 2000). In der initialen Phase der Entstehung einer Thrombose spielen aktivierte Monozyten und Makrophagen eine entscheidende Rolle. Diese Zellen bilden TxA₂ und exprimieren den *tissue factor* (Gewebethromboplastin,

Faktor III). Außerdem setzen sie proinflammatorische Cytokine, Chemotaxine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei.

Eine Reihe von Studien untersuchte den Wirkmechanismus von NO-ASS als antithrombotischem Agens. NO-ASS hemmte die TxA_2 -Bildung, die Aktivität des *tissue factors* und die Freisetzung von TNF- α und IL-6 in LPS-stimulierten Monozyten über einen NO- und cGMP-abhängigen Mechanismus. ASS hatte hingegen keine signifikanten Effekte (Minuz et al., 2001). Darüber hinaus inhibierte NO-ASS die Plättchenadhäsion und -aggregation bei Stimulation mit Thrombin. Auch dieser Effekt ist der Freisetzung von NO zuzuschreiben, da er mit Hemmung der COX nicht erreicht werden kann (Lechi et al., 1996).

Bei inflammatorischen Prozessen kommt es zu einer vermehrten Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten am Gefäßendothel. Dies kann zum thrombotischen Verschluss der Gefäße führen. Außerdem setzen aktivierte Leukozyten ROS und Proteasen frei und schädigen die Endothelschicht direkt (Wallace, 1997). An kultivierten Endothelzellen konnte eine Hemmung dieser Prozesse durch NO und cGMP gezeigt werden (Kosonen et al., 1999). Auch NO-NSAIDs reduzierten *in vitro* die Leukozyten-Adhäsion (Wallace et al., 1999). Als Mechanismus wird eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen diskutiert. Inwiefern der Effekt von einer gesteigerten cGMP-Bildung abhängt, ist noch nicht eindeutig geklärt (Wallace et al., 2002).

Einige der antiinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften der NO-NSAIDs sind direkten, cGMP-unabhängigen Effekten von Stickstoffmonoxid zuzuordnen. Als Wirkmechanismus wird die Hemmung einer Enzymfamilie von Proteasen, der Caspasen, postuliert.

Eine direkte Inhibierung der Caspase-Enzyme durch S-Nitrosylierung konnte mit NO-Donoren in Endothelzellen und Hepatozyten demonstriert werden (Dimmeler et al., 1997; Kim et al., 1997c). Am besten untersucht ist die NO-vermittelte Hemmung von Caspase-1 und Caspase-3. Die Caspase-1 ist das IL-1 β -konvertierende Enzym, dessen Expression vor allem im Entzündungsgeschehen hochreguliert wird. Die Caspase-3 ist eine so genannte Effektor-Caspase der Apoptose und als solche entscheidend am Zelltod durch proapoptotische Stimuli beteiligt (Kim et al., 1997c).

Im Tiermodell konnten Fiorucci et al. zeigen, dass die orale Gabe von ASS, Naproxen und Flurbiprofen eine zeit- und dosisabhängige Schädigung der Magenschleimhaut induzierte. Diese stand mit einer gesteigerten Apoptoserate und Aktivität von Caspase-Enzymen im Zusammenhang. NO-NSAIDs verursachten hingegen keine Schädigung der Mukosa und hemmten die Aktivität der Caspase-1 und -3. (Fiorucci et al., 1999a; Fiorucci et al., 1999b). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch mit NO-Flurbiprofen in kultivierten Magenzellen (Johal & Hanson, 2000). Außerdem wurde nachgewiesen, dass NO-NSAIDs durch Hemmung der Aktivität von Caspase-1 und -3 Endothelzellen vor TNF- α -induzierter Apoptose schützen (Fiorucci et al., 1999b). Eine Hemmung der Caspase-1 konnte auch in LPS-stimulierten Monozyten gezeigt werden. Sie stellt einen COX-unabhängigen, entzündungshemmenden Mechanismus der NO-NSAIDs dar (Fiorucci et al., 2000).

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen am Beispiel des NO-Naproxens klar, dass NO-NSAIDs als potente intrazelluläre NO-Donoren fungieren und damit in der Lage sind, die oben beschriebenen NO- bzw. cGMP-sensitiven Signalwege zu aktivieren.

Diese Arbeit beschäftigt sich außerdem mit einem weiteren möglichen Wirkmechanismus der NO-NSAIDs. Es konnte gezeigt werden, dass NO-NSAIDs durch intrazelluläre Freisetzung von NO die HO-1 in Endothelzellen induzieren.

In den letzten Jahren untersuchte eine Reihe von Studien die HO-1-Induktion durch Stickstoffmonoxid in den unterschiedlichsten Zelltypen. In Endothelzellen stimulierten spontan NO-freisetzende Verbindungen die Proteinexpression und Enzymaktivität der HO-1 (Motterlini et al., 1996a; Polte et al., 2000). In Gefäßmuskelzellen erfolgte mit spontanen NO-Donoren eine konzentrations- und zeitabhängige Stimulation der Transkription des HO-1-Gens (Durante et al., 1997; Hartsfield et al., 1997). Auch in Hepatozyten war mit NO-Donoren sowohl im Zellversuch als auch nach Gabe im Tiermodell ein signifikanter Anstieg der HO-1-mRNA-Konzentration detektierbar (Immenschuh et al., 1998; Motterlini et al., 1996b). Darüber hinaus stimulierte der NO-Donor SNP die mRNA-Bildung, Proteinexpression und Enzymaktivität der HO-1 in Nierenepithelzellen (Liang et al., 2000).

Einige Studien konnten allerdings für bestimmte Prostaglandin-Derivate einen induktiven oder bei einer Induktion der HO-1 synergistisch wirkenden Effekt nachweisen, während NSAIDs die Proteinexpression hemmten (Chen et al., 2002a; Koizumi et al., 1995). Es ist daher von Bedeutung, dass NO-NSAIDs die HO-1 induzieren, obwohl sie gleichzeitig beide COX-Isoenzyme und somit die Prostaglandin-Synthese hemmen. Offensichtlich kommt es aufgrund der NO-freisetzenden Eigenschaften zur HO-1-Induktion auch unter Bedingungen einer gleichzeitig gehemmten Prostaglandin-Synthese.

Die NO-NSAIDs NO-Naproxen, NO-ASS und NO-Flurbiprofen stimulierten im mikromolaren Konzentrationsbereich sowohl die mRNA-Bildung als auch die Proteinexpression der HO-1. Die Transkription des HO-1-Gens wurde konzentrations- und zeitabhängig aktiviert. Der Effekt ist ursächlich auf die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und nicht auf die Hemmung von COX-Enzymen zurückzuführen. Weder die NO-freien Muttersubstanzen noch der selektive COX-2-Hemmer Rofecoxib zeigten einen induktiven Effekt auf die HO-1.

Die klinische Bedeutung der HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs könnte sich in einer verbesserten Endothelfunktion und einem geringeren kardiovaskulären Risiko manifestieren. Während klassische NSAIDs und COX-2-Hemmer den Blutdruck erhöhen können, zeigten NO-NSAIDs sowohl im Tiermodell als auch in Humanstudien antihypertensive und protektive Eigenschaften im kardiovaskulären System und in der Niere (Muscara et al., 2000b; Wallace & Del Soldato, 2003). Die hier vorgelegten Ergebnisse lassen erkennen, dass die antioxidativen und vasodilatatorischen Wirkungen der HO-1-Metabolite Bilirubin und CO neben den NO-vermittelten Effekten zum vorteilhaften kardiovaskulären und renalen Profil der NO-NSAIDs beitragen könnten. Dies unterscheidet die NO-NSAIDs deutlich von den Coxiben, die am Beispiel des Rofecoxibs keinen induktiven Effekt auf die HO-1 zeigten und das kardiovaskuläre Risiko durch Erhöhung des Blutdrucks und prothrombotische Effekte erhöhen können (Mukherjee et al., 2001).

Die getesteten NO-NSAIDs waren hinsichtlich der Aktivierung des HO-1-Gens unterschiedlich potent. NO-Naproxen zeigte in Endothelzellen bereits in einer Konzentration von 30 μM eine signifikante, etwa 3fache Induktion der HO-1-mRNA. Mit 100 μM NO-Naproxen wurde die Bildung der HO-1-mRNA etwa auf das 4Fache der Konzentration unbehandelter Kontrollzellen gesteigert. Im Vergleich dazu induzierten 100 μM NO-ASS die HO-1-mRNA nur etwa 2fach. Eine Stimulation um das 4Fache war erst mit einer Konzentration von 300 μM zu erreichen.

NO-Flurbiprofen hingegen führte schon in einer Konzentration von 10 μM zu einer signifikanten Induktion. Allerdings trat die maximal erreichbare, etwa 2fache Stimulation schon bei einer Konzentration von 30 μM auf. Damit war der Effekt von NO-Flurbiprofen im Vergleich zu NO-Naproxen und NO-ASS deutlich schwächer, obwohl NO-Flurbiprofen und NO-Naproxen die gleiche NO-freisetzende Nitrooxybutyl-Gruppe tragen.

Bei der Expression des HO-1-Proteins nach Inkubation über 24 Stunden zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Die Aktivierung der mRNA-Bildung führt also auch zu einer gesteigerten HO-1-Proteinexpression. NO-Naproxen stimulierte in einer Konzentration von 100 μM die Proteinsynthese signifikant. Die dreifach höhere Konzentration erbrachte wie auf mRNA-Ebene keine weitere Steigerung. Ähnlich stark war die Proteinexpression erst bei einer NO-ASS-Konzentration von 300 μM ausgeprägt.

In physiologisch relevanter Gewebe- oder Plasma-Konzentration von weniger als 100 μM zeigte NO-Naproxen somit die stärkste Induktion der HO-1 auf mRNA- und Protein-Ebene in Endothelzellen.

Konzentrationen im mikromolaren Bereich sind auch als lokale Plasma- oder Gewebekonzentrationen *in vivo* zu erwarten und damit von klinischer Relevanz. Die erste Humanstudie mit NO-Naproxen belegte eine Naproxen-Bioverfügbarkeit aus NO-Naproxen von 95%. Bei oraler Gabe von NO-Naproxen oder Naproxen waren die minimalen Plasmakonzentrationen mit etwa 250 μM im *steady state* und die AUC (*area under the curve* = Fläche unter der Blutspiegel/Zeit-Kurve) vergleichbar. Dies spricht für eine ähnliche Resorption beider Verbindungen aus dem Magen. (Hawkey et al., 2003).

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen könnten sowohl durch deren Membrangängigkeit als auch durch die Freisetzungskinetik der NO-Gruppe verursacht sein. NO-Naproxen ist ein sehr lipophiles Öl, das als Emulsion zum Einsatz kam. Eine beschleunigte Passage durch Zellmembranen könnte dadurch ermöglicht sein und die überlegene Wirksamkeit von NO-Naproxen im verwendeten Zellkulturmodell erklären. Als NO-freisetzende Gruppe tragen NO-Naproxen und NO-Flurbiprofen eine Nitrooxybutyl-Gruppe, während NO-ASS eine Nitrooxymethylphenyl-Gruppe trägt (Abb. 1). Die Größe dieser Molekülgruppe könnte eine unterschiedliche NO-Freisetzung aus NO-ASS und NO-Naproxen begründen. Im NO-Flurbiprofen-Molekül sind NSAID und Nitrooxybutyl-Gruppe darüber hinaus über einen weiteren *Spacer* verestert. Die damit verbundene Molekülgröße und die zusätzlich erforderliche Esterase-Aktivität könnten eine langsamere Bioaktivierung erklären. Die bereits ab einer Konzentration von 10 μM signifikante Induktion der HO-1 spricht für eine bessere Membrangängigkeit von NO-Flurbiprofen im Vergleich zu NO-Naproxen und NO-ASS. Die insgesamt deutlich niedrigere, maximal erreichbare Stimulation im betrachteten Zeitraum von 8 Stunden weist auf eine verlangsamte Freisetzung von NO hin.

Eine *In-vivo*-Studie mit NO-Flurbiprofen zeigte erhöhte Nitratspiegel sogar im Gehirn nach oraler Gabe. Dieses Ergebnis spricht nicht nur für eine retardierte Bioaktivierung im systemischen Kreislauf sondern auch für eine gute Membrangängigkeit von NO-Flurbiprofen. Im Einklang damit konnte ein Potenzial dieser Verbindung bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen gezeigt werden (Prosperi et al., 2001).

Auch die Ergebnisse auf cGMP-Ebene sprechen für eine bessere Membrangängigkeit und gesteigerte NO-Freisetzung aus NO-Naproxen. Bei Inkubation von LLC-PK-1-Zellen mit 30 μM NO-Naproxen konnte eine bis zu 27fach höhere cGMP-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt werden. Eine Versuchsreihe mit NO-ASS im gleichen Zelltyp zeigte in Konzentrationen bis zu 500 μM nur eine maximal etwa 9fache Stimulation der cGMP-Bildung (Grosser & Schröder, 2000). Untersuchungen mit NO-Flurbiprofen ergaben bei einer Konzentration von 30 μM nur eine etwa 3fache, mit 300 μM eine etwa 13fache Steigerung des cGMP-Spiegels (ohne Abb.).

Im Hinblick auf NO-abhängige Effekte zeigte NO-Naproxen in physiologischen Konzentrationen unter 100 μM insgesamt die größte Potenz. Sowohl bei der cGMP-Bildung als auch bei der Induktion der HO-1 auf mRNA- und Proteinebene war mit NO-Naproxen im Vergleich zu NO-ASS und NO-Flurbiprofen die maximale Stimulation am stärksten. Die Korrelation zwischen der an der cGMP-Bildung gemessenen NO-

Freisetzung und der HO-1-Induktion weist noch einmal deutlich auf die kausale Rolle von NO als Mediator hin.

Mit Hilfe der gastralen Epithelzelllinien KATO-III und AGS konnte außerdem festgestellt werden, dass NO-NSAIDs die HO-1 auch in diesem Zelltyp induzieren. Eine NO-abhängige Induktion der HO-1 in gastralen Epithelzellen wird in dieser Arbeit erstmalig dokumentiert.

Am Beispiel von NO-ASS wurde nachgewiesen, dass die Bildung der HO-1-mRNA in gastralen Epithelzellen mit maximal etwa 5facher Stimulation mit den Ergebnissen in Endothelzellen vergleichbar ist. Auch eine gesteigerte Proteinexpression war ab einer Konzentration von 100 μM NO-ASS oder NO-Naproxen festzustellen.

Die HO-1 wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als antiinflammatorisches, antiatherogenes und cytoprotektives Protein charakterisiert (Foresti & Motterlini, 1999; Immenschuh & Ramadori, 2000; Polte et al., 2000). Eine vermehrte Expression der HO-1 könnte Bestandteil des Wirkprofils der NO-NSAIDs sein und einen bislang unbekanntem Wirkmechanismus darstellen.

Diese Hypothese ist anhand dreier wesentlicher Schritte der Schädigung der Magenschleimhaut durch NSAIDs zu begründen:

(1) Die initiale Phase der Mukosa-Schädigung ist ein Entzündungsgeschehen, zu dem die vermehrte Produktion von ROS durch Leukozyten und mukosale Immunzellen beiträgt.

Die HO-1 gilt als ein Modulator entzündlicher Prozesse. Die antiinflammatorische Wirkung wird dabei vor allem dem beim Hämabbau gebildeten CO zugeschrieben. CO hemmt die Freisetzung proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α und IL-1 β und steigert die Produktion entzündungshemmender Interleukine (Otterbein et al., 2000; Willis et al., 1996). Wichtige Metabolite des HO-1-Stoffwechsels wirken antioxidativ und können Endothel- und Epithelzellen vor Schädigung durch ROS schützen. In-vitro-Studien zeigten für Bilirubin direkte antioxidative Wirkungen, die die von α -Tocopherol und Vitamin C übertrafen (Stocker et al., 1987). Die physiologische Relevanz von Bilirubin als Antioxidanz belegt eine Reihe von Tiermodell- sowie Humanstudien (Clark et al., 2000b; Dennery et al., 1995; Mayer, 2000; Schwertner et al., 1994). In Zellkultur schützten 10 nM Bilirubin HeLa-Zellen vor Schädigung durch die 10.000fach höhere Konzentration an Wasserstoffperoxid. Erklärbar ist dies dadurch, dass Bilirubin nicht nur stöchiometrisch mit ROS zu Biliverdin reagiert, sondern durch die Biliverdin-Reduktase in einem Redox-Zyklus regeneriert wird (Baranano et al., 2002). Ebenfalls antioxidative und cytoprotektive Funktion besitzt das Eisenspeicherprotein Ferritin, dessen Translation durch freie Eisenionen stimuliert wird (Balla et al., 1992; Oberle et al., 1999).

(2) Durch Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten sowie deren Aggregation kommt es in der gastralen Mikrozirkulation zu Thrombenbildung und ischämischen Zuständen.

Durch HO-1-Aktivität gebildetes CO reguliert den Tonus der Gefäßmuskulatur und hemmt die Plättchenaggregation. Ähnlich wie NO entfaltet CO diese Wirkungen auch über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (Ryter et al., 2002).

(3) Eine gesteigerte Apoptoserate stört die Integrität der Mukosa durch endotheliale Dysfunktion und Verlust der Barrierefunktion des Epithels. Störungen von Zellwachstum und Angiogenese beeinflussen die Heilung gastrointestinaler Ulzera.

Durch HO-1-Aktivität gebildetes CO wirkt antiapoptotisch. So schützte endogenes CO Endothelzellen vor TNF- α -induzierter Apoptose (Brouard et al., 2002; Brouard et al., 2000). Darüber hinaus spielt die HO-1 eine entscheidende Rolle im Zellwachstum und

bei der Angiogenese. Dies könnte auch bei der Regeneration der Magenschleimhaut von Bedeutung sein (Durante, 2003).

Durch NO-NSAIDs induzierte HO-1 könnte also über die Metabolite Bilirubin und CO sowie eine Stimulation der Ferritin-Synthese durch freie Eisenionen zur gastralen Protektion beitragen.

Inwieweit sich die genomischen Effekte von NO-NSAIDs funktionell tatsächlich als antioxidative Schutzwirkung manifestieren, wurde in der vorliegenden Arbeit in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress untersucht. Im Entzündungsgeschehen ist das Gefäßendothel einer Vielzahl von Oxidanzien ausgesetzt, die durch aktivierte Leukozyten und hochregulierte Enzyme wie die Xanthin-Oxidase und die NADPH-abhängige Oxidase produziert werden (Terry et al., 1998).

Die pathophysiologische Situation des oxidativen Stresses wurde durch Inkubation der jeweiligen Zellen mit NADPH hervorgerufen. Dadurch wird die NADPH-abhängige Oxidase stimuliert, Superoxid-Radikale zu bilden (Griendling et al., 2000; Guzik et al., 2000).

Am Beispiel des NO-Naproxens konnte gezeigt werden, dass NO-NSAIDs in Endothelzellen antioxidative Eigenschaften schon bei direkter Zugabe zum Inkubationsansatz entfalten. Diese Eigenschaft ist durch direkte Neutralisation von ROS durch NO zu erklären (Wink et al., 1999). Doch die Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs ließ auch die Existenz indirekter, potenziell antioxidativer Eigenschaften vermuten. Da eine Inkubation mit NO-NSAIDs über 24 Stunden zu einer gesteigerten Proteinexpression der HO-1 geführt hatte, wurden die Endothelzellen über diesen Zeitraum mit NO-Naproxen vorbehandelt. Direkte neutralisierende Wirkungen freier NO-Radikale sind aufgrund der kurzen Halbwertszeit und hohen Reaktivität von NO in biologischen Medien nach 24 Stunden ausgeschlossen. Darüber hinaus wurden die Zellen ausgewaschen, um die Substanz zu entfernen.

Auch nach dieser Prozedur konnte eine antioxidative Wirkung von NO-Naproxen in Endothelzellen festgestellt werden, die weder durch direkte Effekte der Substanz noch durch eine neutralisierende Wirkung von NO selbst hervorgerufen sein konnte. Während NO-Naproxen den ROS-Spiegel signifikant senkte, zeigte die NO-freie Muttersubstanz keine Wirkung.

Um die Verhältnisse in der Magenschleimhaut besser untersuchen zu können, wurde das gleiche Zellkulturmodell ebenfalls für gastrale Epithelzellen verwendet. Es zeigten sich auch in diesem Zelltyp indirekte antioxidative Effekte der NO-NSAIDs nach 24stündiger Vorbehandlung und anschließendem Auswaschen der Zellen.

Diese Befunde zeigen klar, dass NO-NSAIDs zu einer lang anhaltenden, dauerhaften Zellprotektion führen, die mit einer Induktion antioxidativer Gene erklärt werden kann.

Durch Behandlung der Zellen mit Bilirubin sollte der Frage nachgegangen werden, ob HO-1-Metabolite unter den gewählten Bedingungen als Mediatoren des antioxidativen Effekts fungieren können. Bei Behandlung von Endothelzellen und gastralen Epithelzellen mit Bilirubin wurden konzentrationsabhängige antioxidative Effekte des HO-1-Metaboliten aufgezeigt. Im niedrigen mikromolaren Bereich reduzierte Bilirubin die Konzentration an ROS bei Stimulation der NADPH-Oxidase nahezu auf das Niveau un behandelter Kontrollzellen. Daher kommt Bilirubin im verwendeten Zellkulturmodell als Mediator antioxidativer Wirkungen in Frage. Die eingesetzten Konzentrationen lagen im oberen Bereich des Referenz-Intervalls für Bilirubin-Plasmaspiegel, der sich in Humanstudien als präventiver Faktor für die koronare Herzkrankheit zeigte (Mayer, 2000).

Darüber hinaus konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen indirekten antioxidativen Effekten von NO-NSAIDs und einer Induktion der HO-1 in Versuchen mit dem Hämoxygenase-Inhibitor Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP) festgestellt werden. Eine

Vorbehandlung von Endothelzellen mit SnPP hob den antioxidativen Effekt einer 24stündigen Inkubation mit NO-Naproxen oder NO-ASS zu einem signifikanten Teil wieder auf. Dieses Ergebnis belegt eindeutig eine ursächliche Beteiligung des HO-1-Stoffwechsels an der antioxidativen Wirkung der NO-NSAIDs.

Die HO-1 kommt nicht nur als Mediator der protektiven Effekte der NO-NSAIDs in Frage. In einem Tiermodell für Arthritis bewirkte die Behandlung mit NO-Naproxen im Vergleich zu Naproxen eine stärkere Schmerzhemmung (Cicala et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie mit NO-ASS in einem Hyperalgesie-Modell (al-Swayeh et al., 2000). Die Mechanismen dafür sind bisher nicht geklärt. Interessanterweise entfaltete durch HO-1-Aktivität endogen gebildetes CO in einem Tiermodell für die Hypersensitivität von Nocizeptoren eine schmerzhemmende Wirkung (Steiner et al., 2001). In mit dem HO-1-Gen transfizierten Endothelzellen ging eine Stimulation des Enzyms mit einer Abnahme der COX-Aktivität und damit der Bildung Schmerzmediierender Prostaglandine einher (Haider et al., 2002).

Die Minderdurchblutung der Magenschleimhaut ist nicht nur ein initialer Schritt bei der NSAID-induzierten Schädigung. Sie tritt ebenfalls während des haemorrhagischen oder endotoxischen Schocks auf. Auch unter diesen Umständen konnte gezeigt werden, dass NO-NSAIDs eine protektive Wirkung besitzen (Wallace et al., 1995). Dies legte die Vermutung nahe, dass NO-NSAIDs in ischämischen Situationen auch kardioprotektive Wirkungen entfalten könnten. In der Tat bewirkte die Gabe von NO-NSAIDs in Tiermodellen für Ischämie und Reperfusion eine Reduktion der Myokard-Schädigung sowie der Infarktgröße. Diese Effekte waren NO-abhängig, unter ASS oder selektiven COX-Hemmern fiel die Schädigung des Herzmuskels schwerwiegender aus (Rossoni et al., 2002). NO-ASS und NO-Flurbiprofen reduzierten ferner die Restenoserate nach Ballondilatation oder perkutaner transluminaler Angioplastie (Maffia et al., 2002; Napoli et al., 2001). Als Mechanismus wird eine NO-abhängige Hemmung der Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur und der Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen postuliert. Interessanterweise war NO-ASS sowohl bei Gabe vor als auch nach der Angioplastie wirksam. Die beste Wirkung wurde durch eine Vorbehandlung über eine Woche erreicht (Napoli et al., 2001). Dies lässt vermuten, dass eine so genannte Präkonditionierung des Gewebes beteiligt ist. Bei diesem Phänomen kommt es durch bestimmte Agenzien zu einer Hochregulation defensiver Hitzeschockproteine. Die HO-1 (HSP32) und das HSP70 sind Hitzeschockproteine, die durch NO stimulierbar sind (Kim et al., 1997b; Polte et al., 2000). Die vermehrte Expression dieser Proteine verleiht dem Gewebe Widerstand (Foresti & Motterlini, 1999).

Eine Induktion der endothelialen HO-1 durch NO-NSAIDs, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, könnte diese klinischen Beobachtungen erklären. Im Tiermodell verbesserte eine Induktion der HO-1 durch Hämin 24 Stunden vor einer Ischämie die Myokard-Funktion und verringerte die Infarktgröße bei Reperfusion der isolierten Herzen. Auch exogen in nanomolaren Konzentrationen zugeführtes Bilirubin zeigte ähnliche kardioprotektive Wirkungen (Clark et al., 2000b). Die Herzen transgener Mäuse mit kardialer Überexprimierung der HO-1 waren *ex vivo* in Abhängigkeit von der HO-1-Konzentration vor oxidativer Schädigung durch Ischämie und Reperfusion geschützt. *In vivo* zeigte sich eine deutlich reduzierte Infarktgröße (Yet et al., 2001). Die Autoren postulieren einen Schutz des Herzens durch Induktion der HO-1. Damit könnte die stressfreie Induktion der HO-1 durch therapeutische Maßnahmen einen großen Stellenwert erlangen.

In einer Vielzahl von klinischen und experimentellen Studien zeigen sich folglich Übereinstimmungen zwischen dem Wirkprofil der NO-NSAIDs und den Effekten einer HO-1-Induktion. Diese Befunde belegen, dass Metabolite des HO-1-Stoffwechsels potenziell als Mediatoren von NO-NSAID-Effekten in Frage kommen.

Die HO-1 ist ein Stressprotein und wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Agenzien induziert. Die meisten besitzen die Eigenschaft direkt oder indirekt oxidativen Stress zu verursachen (Choi & Alam, 1996; Foresti & Motterlini, 1999).

Die HO-1-Induktion durch den spontanen NO-Donor SperminNONOat in Gefäßmuskelzellen ist von einer Sauerstoffradikal-Bildung abhängig, da das Antioxidanz NAC den Effekt inhibierte (Hartsfield et al., 1997). Die Effekte der NO-Donoren SNP, SIN-1 und SNAP hingegen wurden durch NAC nicht beeinflusst (Durante et al., 1997). Außerdem minderte NAC die HO-1-Induktion durch SNP auch nicht in HeLa-Zellen (Chen & Maines, 2000).

Daher stellte sich die Frage, ob die Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs auf einer vermehrten Bildung freier Sauerstoffradikale beruht. Auch das starke Oxidanz Peroxynitrit, das aus Reaktion von NO mit Superoxid entsteht, wurde als Induktor der HO-1 in Endothelzellen beschrieben. Foresti et al. zeigten eine Aufhebung der Peroxynitrit-induzierten HO-1-Proteinexpression durch NAC (Foresti et al., 1999).

Anhand einer Vorbehandlung der Endothelzellen mit NAC wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Aktivierung der Transkription des HO-1-Gens durch NO-NSAIDs weder durch Sauerstoffradikale noch durch Peroxynitrit stimuliert wird. Darüber hinaus beeinflusste eine Vorbehandlung der Zellen mit SOD die HO-1-Induktion nicht. Dies beweist zusätzlich die Unabhängigkeit des Effekts von einer Peroxynitrit-Bildung, da die SOD Superoxid-Radikale neutralisiert. Diese Ergebnisse belegen eine stressfreie und NO-abhängige Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs.

Eine Vielzahl von Studien beschäftigte sich bis heute mit der NO-abhängigen Induktion der HO-1 durch konventionelle NO-Donoren. Insbesondere der Signalweg zur Genaktivierung ist nach wie vor ungeklärt. Auch für die NO-NSAIDs stellte sich die Frage, welche Wege der Signaltransduktion in Frage kommen.

Lipton et al. demonstrierten die Freisetzung von freiem Häm aus Hämoproteinen durch NO (Lipton et al., 1993). Damit wäre eine Stimulierung der HO-1 über erhöhte Substratspiegel möglich. In Fibroblasten und HeLa-Zellen wurde eine Stabilisierung der HO-1-mRNA durch den langsam freisetzenden NO-Donor DETA/NO (Halbwertszeit bis zu 15 Stunden) gezeigt. Mit dem schnell freisetzenden NO-Donor SperminNONOat blieb dieser Effekt in HeLa-Zellen aus und war in Fibroblasten deutlich schwächer ausgeprägt (Bouton & Demple, 2000). Untersuchungen mit NO-NSAIDs und dem Transkriptions-Inhibitor Actinomycin D zeigten in den in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen hingegen keine Stabilisierung der mRNA bei Vorstimulierung der HO-1 mit Cadmium (ohne Abb.).

Der *second messenger* cGMP ist Hauptmediator der physiologischen Effekte von Stickstoffmonoxid. Auf Grundlage der starken cGMP-Stimulation durch NO-NSAIDs wurde untersucht, ob die HO-1-Induktion von cGMP als Mediator abhängig ist. Zunächst induzierte das lipophile, membrangängige cGMP-Analogon 8-Br-cGMP die Transkription der HO-1 weder in Endothelzellen noch in gastralen Epithelzellen. Da die Membrangängigkeit modifizierter cyclischer Nukleotide stark variieren kann, folgten weitere Untersuchungen (Schröder et al., 1990). Das Oxadiazolquinoxalin-Derivat ODQ ist ein selektiver Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase, der keine Effekte auf die membranständige Guanylatcyclase oder die Adenylatcyclase besitzt (Brunner et al., 1996). Andere Studien mit spontanen NO-Donoren belegen schon in niedrigeren Konzentrationen eine Hemmwirkung auf die HO-1-Proteininduktion (Polte et al., 2000). Die Genaktivierung der HO-1 durch NO-Naproxen wurde hingegen nicht gehemmt.

Signaltransduktionsprozesse durch cGMP werden in erster Linie durch Aktivierung von Proteinkinasen vermittelt. Um eine mögliche Beteiligung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G zu untersuchen, wurde der spezifische Inhibitor KT5823 verwendet (Durante et al., 1997; Immenschuh et al., 1998). Auch KT5823 inhibierte die NO-Naproxen-induzierte Genaktivierung der HO-1 nicht.

Die Experimente mit 8-Br-cGMP und den selektiven Inhibitoren der löslichen Guanylatcyclase sowie der Proteinkinase G belegen, dass cGMP an der Signaltransduktion nicht beteiligt ist. Vergleichbare Ergebnisse zeigten Studien in Gefäßmuskelzellen, Hepatozyten und Endothelzellen mit konventionellen NO-Donoren und cGMP-Analoga (Durante et al., 1997; Hartsfield et al., 1997; Kim et al., 1995; Motterlini et al., 1996a). Dies steht im Widerspruch zu anderen Studien, die eine Induktion des HO-1-Proteins über cGMP-abhängige Signalwege beschreiben (Immenschuh et al., 1998; Kiemer et al., 2003; Polte et al., 2002). Eine Erklärung dafür ist zunächst in der Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme zu suchen, deren Expressionsverhalten stark variieren kann (Hartsfield et al., 1999). Darüber hinaus wurden Substanzen verwendet, die NO spontan und in hohen Konzentrationen freisetzen. Außerdem wurden mit Protein- und mRNA-Analysen unterschiedliche Ebenen der Induktion betrachtet.

In den letzten Jahren zeigte eine Reihe von Studien, dass NO in verschiedenen Zellsystemen Bestandteile des MAP-Kinase-Signalweges aktiviert (Abb. 3). Die MAP-Kinasen bilden eine Familie von Proteinkinasen, die durch Wachstumsfaktoren, inflammatorische Cytokine und Stressfaktoren aktiviert wird (Arbabi & Maier, 2002; Davis, 1993; Widmann et al., 1999). Interessanterweise induziert eine Vielzahl der MAP-Kinase-aktivierenden Stimuli auch die HO-1 in den unterschiedlichsten Zelltypen. Es ist allgemein anerkannt, dass Mitglieder der MAP-Kinase-Familie in verschiedenen Zelltypen durch den gleichen Stimulus sowohl aktiviert als auch inhibiert werden können (Chen & Maines, 2000). NO aktivierte in Mesangial- und T-Zellen den JNK-Signalweg und die Phosphorylierung von c-Jun sowie den ERK-Signalweg (Callsen et al., 1998; Lander et al., 1996; Pfeilschifter & Huwiler, 1996). In Nierenepithelzellen stimulierte NO die Kinase JNK und in Makrophagen die Kinasen JNK und p38, nicht aber die Kinase ERK (Jun et al., 1999; Kim et al., 1997a). In Endothelzellen wurde eine Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, p38 und ERK mit spontanen NO-Donoren festgestellt (Buckley et al., 2003; Parenti et al., 1998; Pfeilschifter & Huwiler, 1996). Im Gegensatz dazu wurde in B-Lymphozyten eine inhibierende Wirkung von NO auf die MAP-Kinase JNK beschrieben (So et al., 1998).

Die MAP-Kinasen werden auch als möglicher Signaltransduktionsweg für eine Induktion der HO-1 diskutiert. Eine Vielzahl von Studien belegt die Beteiligung an der HO-1-Induktion vor allem durch Stressfaktoren in verschiedenen Zellsystemen (Alam et al., 2000; Elbirt et al., 1998).

Insbesondere in Endothelzellen war die HO-1-Induktion durch Reoxygenierung nach Anoxie von der Aktivität der Kinasen JNK, p38 und ERK abhängig (Zhang et al., 2002). Außerdem induzierte das kardiovaskuläre Hormon ANP die HO-1 über JNK- und ERK-abhängige Signalwege (Kiemer et al., 2003).

Ein direkter Zusammenhang zwischen der NO-abhängigen Induktion der HO-1 und der Aktivität von MAP-Kinasen in Endothelzellen konnte von Buckley et al. gezeigt werden. Die Induktion der HO-1-Proteinexpression durch SperminNONOat wurde durch spezifische Inhibitoren der MAP-Kinasen p38 und ERK konzentrationsabhängig gehemmt (Buckley et al., 2003). Chen und Maines zeigten in HeLa-Zellen eine Beteiligung der Kinasen p38 und ERK, nicht aber JNK an der Induktion der HO-1-mRNA durch spontane NO-Donoren (Chen & Maines, 2000).

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass MAP-Kinasen in die Genregulation der HO-1 durch NO-NSAIDs involviert sind. Untersuchungen mit spezifischen, zellpermeablen Inhibitoren der Kinasen JNK, p38 und ERK ergaben, dass die HO-1-Induktion durch NO-ASS mit allen drei Inhibitoren signifikant gehemmt wurde. Eine fast vollständige Aufhebung des Effektes war mit den Inhibitoren des JNK- und p38-Signalweges zu erreichen.

Ein spezifischer Inhibitor der MAP-Kinase p38 ist das Pyridinylimidazol-Derivat SB203580. Die katalytische Aktivität der Kinase wird durch kompetitive Bindung von SB203580 an die ATP-Bindungsstelle gehemmt (Lee et al., 1999). Die MAP-Kinase p38 ist Teil des Signalweges, der überwiegend durch inflammatorische Cytokine und Stressfaktoren induziert wird. Durch Phosphorylierung aktiviert p38 Transkriptionsfaktoren und regulatorische Proteine, die im Entzündungsgeschehen, bei der Apoptose sowie bei Zellproliferation und Entwicklung eine Rolle spielen. Der gleiche Signaltransduktionsweg führt auch zur Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK). Diese Serin/Threonin-Proteinkinase wird auch als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) bezeichnet. Sie wird unter anderem durch inflammatorische Cytokine, Endotoxine, UV-Licht und Hypoxie induziert. JNK phosphoryliert das Protein c-Jun, welches als Bestandteil dimerischer Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielt. Das Anthrapyrazolon-Derivat SP600125 ist ein spezifischer, ATP-kompetitiver Inhibitor für JNK. SP600125 hemmt im Zellkulturmodell dosisabhängig die Phosphorylierung von c-Jun (Bennett et al., 2001).

In Endothelzellen wurde der Einfluss beider Inhibitoren auf die HO-1-Induktion durch NO-ASS untersucht. SB203580 hob die dosisabhängige Induktion durch NO-ASS weitgehend auf. Im Durchschnitt lag die Hemmung bei etwa 80%. SP600125 zeigte mit etwa 90% eine noch stärkere Hemmung der HO-1-Induktion durch NO-ASS.

Die MAP-Kinase ERK wird überwiegend durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Auch für diese Kinase wurde mit PD098059 ein spezifischer Inhibitor verwendet. Im Unterschied zu den beiden anderen MAP-Kinase-Inhibitoren beeinflusst PD098059 nicht die Kinase ERK selbst. Vielmehr hemmt PD098059 spezifisch die MAP-Kinase-Kinase, welche ERK phosphoryliert und aktiviert. Die Hemmung ist nicht kompetitiv, PD098059 interferiert weder mit ATP noch mit der Substratbindung (Alessi et al., 1995). Der ERK-Inhibitor zeigte ebenfalls eine signifikante Wirkung auf die HO-1-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen. Mit einer etwa 40%igen Hemmung war der Effekt aber nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den Inhibitoren der Stress- und Cytokin-aktivierten Signaltransduktionswege. Damit scheint dieser Signalweg eine den Kinasen JNK und p38 untergeordnete Rolle zu spielen.

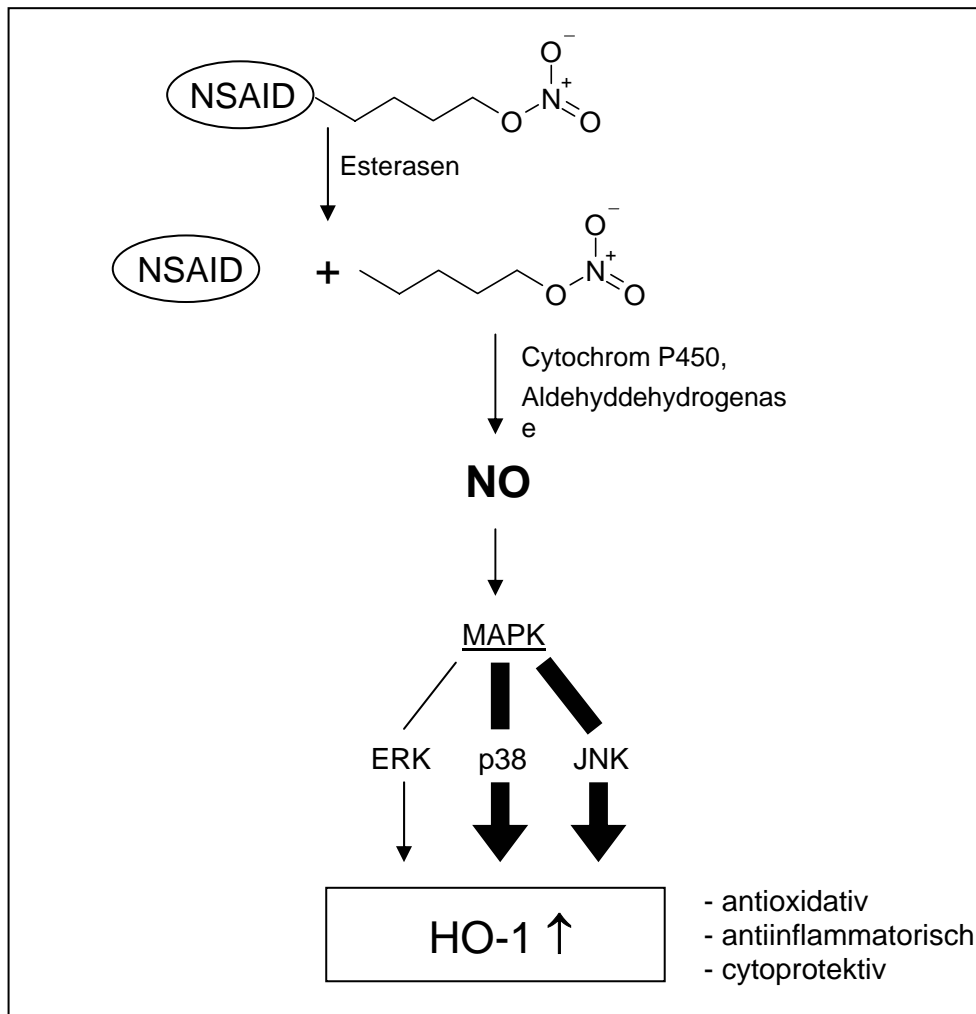


Abb. 36: Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs

Die Untersuchungen mit dem Translationsblocker Cycloheximid gaben einen Hinweis darauf, dass die Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs nicht durch direkte Interaktion von NO mit der DNA induziert wird. Die nahezu vollständige Aufhebung des Effekts von NO-ASS demonstriert, dass eine innerhalb kurzer Zeit stimulierbare De-novo-Synthese von Proteinen erforderlich ist.

Als Proteine, die die Aktivierung der Transkription des HO-1-Gens regulieren, wurden in den letzten Jahren vor allem die Transkriptionsfaktoren AP-1 und Nrf2 diskutiert (Alam et al., 2003; Buckley et al., 2003; Lee et al., 2000). Darüber hinaus wurden in der Promotorregion des HO-1-Gens verschiedener Spezies unter anderem Bindungsstellen für AP-2, NF κ B sowie Interleukin- und Prostaglandin-Derivate gefunden (Choi & Alam, 1996; Koizumi et al., 1995; Lavrovsky et al., 1994).

Die starken Effekte des JNK-Inhibitors deuten auf eine Beteiligung von c-Jun an der Genaktivierung durch NO-NSAIDs hin. Dieses Protein kann sowohl als Bestandteil von AP-1-Dimeren als auch durch Dimerisierung mit Nrf2 mit *Antioxidant-Responsive-Elements* in der Promotorregion des HO-1-Gens interagieren (Alam et al., 1999; He et al., 2001).

In humanen Endothelzellen führte die pharmakologische Hemmung der AP-1-Aktivität zu einer verminderten HO-1-Induktion durch Cytokine und ANP (Kiemer et al., 2003;

Terry et al., 1998). In Hepatomzellen verhinderten dominant-negative Mutanten von c-Jun die Aktivierung des HO-1-Promotors durch Arsenit (Elbirt et al., 1998).

In verschiedenen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass Nrf2 eine Induktion der HO-1 vermittelte (Alam et al., 1999; Alam et al., 2000; He et al., 2001; Ishii et al., 2000). Interessant ist dabei auch, dass Häm als natürliches Substrat der HO-1 deren Induktion in Nierenepithelzellen durch Stabilisierung des Nrf2-Proteins aktivierte (Alam et al., 2003).

Erst kürzlich zeigten Buckley et al. in Endothelzellen, dass der NO-Donor SperminNONOat in Abhängigkeit von den MAP-Kinasen p38 und ERK sowohl die Translokation von Nrf2 in den Zellkern als auch die HO-1-Proteinexpression induzierte. Eine Beteiligung der Kinase JNK wurde nicht untersucht (Buckley et al., 2003).

Da NO-NSAIDs im Gegensatz zu konventionellen NO-Donoren für genregulatorische Studien aufgrund des dualen Wirkprinzips eher ungeeignet sind, wurden diese Effekte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Hemmversuche mit den MAP-Kinase-Inhibitoren und Cycloheximid in Endothelzellen lassen aber eine weitreichende Übereinstimmung mit den Studien zur Genaktivierung der HO-1 durch Nrf2 und AP-1-Elemente im gleichen Zelltyp erkennen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass NO-NSAIDs Stickstoffmonoxid intrazellulär freisetzen. Dadurch kommt es zur Aktivierung NO-sensitiver Strukturen wie der löslichen Guanylatcyclase. Über die Bildung des *second messengers* cGMP werden eine Vielzahl der beschriebenen Wirkungen der NO-NSAIDs vermittelt.

Darüber hinaus wurde erstmalig belegt, dass NO-NSAIDs über NO-abhängige Prozesse die HO-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Endothelzellen und gastralen Epithelzellen induzieren. Diese Effekte werden weder über cGMP noch durch Bildung von ROS oder Peroxynitrit mediiert. Vielmehr konnte eine Abhängigkeit von den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p38, JNK und ERK gezeigt werden.

Darüber hinaus zeigten NO-NSAIDs in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress direkte und indirekte antioxidative Wirkungen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen den indirekten antioxidativen Effekten und der Induktion der HO-1 konnte ebenfalls belegt werden.

Diese Ergebnisse charakterisieren die NO-NSAIDs als potente Induktoren antioxidativer und antiinflammatorischer Stoffwechselwege. Die Induktion der HO-1 ist ein neuartiger Wirkmechanismus, der ursächlich an protektiven Effekten von NO-NSAIDs in der Magenschleimhaut, der Niere und im kardiovaskulären System beteiligt sein könnte.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob NO-NSAIDs in verschiedenen Zellkulturmodellen Stickstoffmonoxid derart freisetzen, dass es zu Reaktionen mit NO-sensitiven Zielstrukturen kommt.

Die NO-Freisetzung konnte in LLC-PK-1-Zellen durch Bestimmung des intrazellulären cGMP-Spiegels gezeigt werden. In diesem Zelltyp stimulierten NO-NSAIDs am Beispiel des NO-Naproxens konzentrationsabhängig die cGMP-Bildung. Kontrollversuche mit Naproxen und Vorbehandlung der Zellen mit SOD oder Hämoglobin belegen, dass der Effekt dem freigesetzten NO-Radikal zuzuschreiben ist. Eine Vorinkubation mit GTN oder NO-Naproxen führte zur *Downregulation* der NO-Freisetzung aus beiden Verbindungen. Diese Kreuzempfindlichkeit belegt, dass organische Nitrate und NO-NSAIDs über gemeinsame Stoffwechselwege bioaktiviert werden.

Besondere Aufmerksamkeit galt der NO-abhängigen Induktion antioxidativer Proteine am Beispiel der HO-1.

In Endothelzellen induzierten NO-NSAIDs die HO-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konzentrations- und zeitabhängig. Die NO-freien Muttersubstanzen zeigten ebenso wie der selektive COX-2-Hemmer Rofecoxib keinen induktiven Effekt auf die HO-1. Diese Ergebnisse belegen, dass der Effekt ursächlich auf die Freisetzung von NO zurückzuführen ist, nicht auf eine Hemmung von COX-Isoenzymen.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine NO-abhängige Induktion der HO-1 in gastralen Epithelzellen nachgewiesen. Auch in diesem Zelltyp aktivierten NO-NSAIDs die Transkription des HO-1-Gens und führten zu einer vermehrten Proteinexpression.

Untersuchungen zur Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen ergaben, dass diese durch NO-vermittelte Effekte und nicht über reaktive Sauerstoffspezies oder Peroxynitrit induziert wird. Der *second messenger* cGMP spielte keine Rolle bei der Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs.

Eine Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem Translationsblocker CHX zeigte, dass die Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs eine De-novo-Synthese von Proteinen erforderte.

Unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren Mitogen-aktivierter Proteinkinasen wurde eine Beteiligung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK an der HO-1-Genaktivierung durch NO-NSAIDs dokumentiert. Besonders die Stress-aktivierten Kinasen p38 und JNK scheinen eine entscheidende Mediatorfunktion zu besitzen.

Inwieweit sich die genomischen Effekte von NO-NSAIDs funktionell als antioxidative Schutzwirkung manifestieren, wurde in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress untersucht.

In Endothelzellen und gastralen Epithelzellen zeigten NO-NSAIDs sowohl direkte als auch indirekte antioxidative Wirkungen. Eine direkte Zugabe reduzierte ebenso wie eine 24stündige Vorinkubation mit anschließendem Auswaschen die durch NADPH stimulierte Konzentrationserhöhung an Sauerstoffradikalen.

Im gleichen Modell zeigte der HO-1-Metabolit Bilirubin konzentrationsabhängige antioxidative Effekte. Dieses Ergebnis dokumentiert, dass HO-1-Metabolite unter den gewählten Bedingungen als Mediatoren der NO-NSAID-Effekte fungieren können.

Mit Hilfe eines Hämoxygenase-Inhibitors konnte schließlich ein kausaler Zusammenhang zwischen der HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs und deren indirekten antioxidativen Wirkungen festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit charakterisieren die NO-NSAIDs als potente Aktivatoren antioxidativer und antiinflammatorischer Stoffwechselwege. Die Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs ist ein hier erstmalig beschriebener Wirkmechanismus, der ursächlich an protektiven Effekten der NO-NSAIDs in der Magenschleimhaut, der Niere und im kardiovaskulären System beteiligt sein könnte.

Darüber hinaus zeichnet sich für die NO-NSAIDs ein therapeutisches Potenzial ab, das weit über das konventioneller NSAIDs und Coxibe hinaus geht.

7 Literaturverzeichnis

- ALAM J, CAI J, SMITH A** (1994). Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J Biol Chem* 269: 1001-9
- ALAM J, CAMHI S, CHOI AM** (1995). Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer. *J Biol Chem* 270: 11977-84
- ALAM J, STEWART D, TOUCHARD C, BOINAPALLY S, CHOI AM, COOK JL** (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274: 26071-8
- ALAM J, WICKS C, STEWART D, GONG P, TOUCHARD C, OTTERBEIN S, CHOI AM, BUROW ME, TOU J** (2000). Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J Biol Chem* 275: 27694-702
- ALAM J, KILLEEN E, GONG P, NAQUIN R, HU B, STEWART D, INGELFINGER JR, NATH KA** (2003). Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F743-52
- ALESSI DR, CUENDA A, COHEN P, DUDLEY DT, SALTIEL AR** (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270: 27489-94
- AL-SWAYEH OA, CLIFFORD RH, DEL SOLDATO P, MOORE PK** (2000). A comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of nitroaspirin and aspirin. *Br J Pharmacol* 129: 343-50
- ALWINE JC, KEMP DJ, STARK GR** (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5350-4
- ANDREWS FJ, MALCONTENTI-WILSON C, O'BRIEN PE** (1994). Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on LFA-1 and ICAM-1 expression in gastric mucosa. *Am J Physiol* 266: G657-64
- ARBABI S & MAIER RV** (2002). Mitogen-activated protein kinases. *Crit Care Med* 30: S74-S79
- ASAKO H, KUBES P, WALLACE J, GAGINELLA T, WOLF RE, GRANGER DN** (1992). Indomethacin-induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxygenase products. *Am J Physiol* 262: G903-8
- BALLA G, JACOB HS, BALLA J, ROSENBERG M, NATH K, APPLE F, EATON JW, VERCELLOTTI GM** (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267: 18148-53
- BALOGUN E, HOQUE M, GONG P, KILLEEN E, GREEN CJ, FORESTI R, ALAM J, MOTTERLINI R** (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 371: 887-95
- BARANANO DE, RAO M, FERRIS CD, SNYDER SH** (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16093-8
- BARRACHINA MD, CALATAYUD S, CANET A, BELLO R, DIAZ DE ROJAS F, GUTH PH, ESPLUGUES JV** (1995). Transdermal nitroglycerin prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Eur J Pharmacol* 281: R3-4
- BARRANCO SC, TOWNSEND CM, JR., CASARTELLI C, MACIK BG, BURGER NL, BOERWINKLE WR, GOURLEY WK** (1983). Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 43: 1703-9

- BEAUVAIS F, MICHEL L, DUBERTRET L** (1995). The nitric oxide donors, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils. *FEBS Lett* 361: 229-32
- BEBIEN M, SALINAS S, BECAMEL C, RICHARD V, LINARES L, HIPSKIND RA** (2003). Immediate-early gene induction by stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene* 22: 1836-1847
- BENNETT BL, SASAKI DT, MURRAY BW, O'LEARY EC, SAKATA ST, XU W, LEISTEN JC, MOTIWALA A, PIERCE S, SATOH Y, BHAGWAT SS, MANNING AM, ANDERSON DW** (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13681-6
- BENNETT BM, LEITMAN DC, SCHRÖDER H, KAWAMOTO JH, NAKATSU K, MURAD F** (1989). Relationship between biotransformation of glyceryl trinitrate and cyclic GMP accumulation in various cultured cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 316-23
- BIRNBOIM HC & DOLY J** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523
- BJARNASON I, HAYLLAR J, MACPHERSON AJ, RUSSELL AS** (1993). Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* 104: 1832-47
- BOMBARDIER C, LAINE L, REICIN A, SHAPIRO D, BURGOS-VARGAS R, DAVIS B, DAY R, FERRAZ MB, HAWKEY CJ, HOCHBERG MC, KVIEN TK, SCHNITZER TJ** (2000). Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 343: 1520-8, 2 p following 1528
- BOUTON C & DEMPLE B** (2000). Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. Translation-independent stabilization of the mRNA and evidence for direct action of nitric oxide. *J Biol Chem* 275: 32688-93
- BRADFORD MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- BROUARD S, OTTERBEIN LE, ANRATHER J, TOBIASCH E, BACH FH, CHOI AM, SOARES MP** (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 192: 1015-26
- BROUARD S, BERBERAT PO, TOBIASCH E, SELDON MP, BACH FH, SOARES MP** (2002). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 277: 17950-61
- BROWN JF, KEATES AC, HANSON PJ, WHITTLE BJ** (1993). Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 265: G418-22
- BROWNING DD, MCSHANE MP, MARTY C, YE RD** (2000). Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275: 2811-6
- BRUNNER F, SCHMIDT K, NIELSEN EB, MAYER B** (1996). Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 48-53
- BUCKLEY BJ, MARSHALL ZM, WHORTON AR** (2003). Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 973-9
- CALLSEN D, PFEILSCHIFTER J, BRUNE B** (1998). Rapid and delayed p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by nitric oxide: the role of cyclic GMP and tyrosine phosphatase inhibition. *J Immunol* 161: 4852-8

- CAMHI SL, ALAM J, WIEGAND GW, CHIN BY, CHOI AM** (1998). Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 226-34
- CARTER AB, KNUDTSON KL, MONICK MM, HUNNINGHAKE GW** (1999). The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J Biol Chem* 274: 30858-63
- CHEN K & MAINES MD** (2000). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46: 609-17
- CHEN YC, SHEN SC, LEE WR, LIN HY, KO CH, LEE TJ** (2002a). Nitric oxide and prostaglandin E2 participate in lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced heme oxygenase 1 and prevent RAW264.7 macrophages from UV-irradiation-induced cell death. *J Cell Biochem* 86: 331-9
- CHEN Z, ZHANG J, STAMLER JS** (2002b). Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8306-11
- CHOI AM & ALAM J** (1996). Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 9-19
- CHOMCZYNSKI P & SACCHI N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9
- CIANI E, GUIDI S, BARTESAGHI R, CONTESTABILE A** (2002). Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J Neurochem* 82: 1282-9
- CICALA C, IANARO A, FIORUCCI S, CALIGNANO A, BUCCI M, GERLI R, SANTUCCI L, WALLACE JL, CIRINO G** (2000). NO-Naproxen modulates inflammation, nociception and downregulates T cell responses in rat Freund's adjuvant arthritis. *Br J Pharmacol* 130: 1399-1405
- CIRINO G** (2003). Nitric oxide releasing drugs: from bench to bedside. *Dig Liver Dis* 35 Suppl 2: S2-8
- CLARK JE, FORESTI R, GREEN CJ, MOTTERLINI R** (2000a). Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem J* 348 Pt 3: 615-9
- CLARK JE, FORESTI R, SARATHCHANDRA P, KAUR H, GREEN CJ, MOTTERLINI R** (2000b). Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H643-51
- DAVIES NM, ROSETH AG, APPELYARD CB, MCKNIGHT W, DEL SOLDATO P, CALIGNANO A, CIRINO G, WALLACE JL** (1997). NO-naproxen vs. naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti-inflammatory effects. *Aliment Pharmacol Ther* 11: 69-79
- DAVIS RJ** (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268: 14553-6
- DENNERY PA, McDONAGH AF, SPITZ DR, RODGERS PA, STEVENSON DK** (1995). Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med* 19: 395-404
- DENNINGER JW & MARLETTA MA** (1999). Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411: 334-50
- DIMMELER S, HAENDELER J, NEHLS M, ZEIHNER AM** (1997). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 185: 601-7
- DORE S, TAKAHASHI M, FERRIS CD, ZAKHARY R, HESTER LD, GUASTELLA D, SNYDER SH** (1999). Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2445-50

- DURANTE W, KROLL MH, CHRISTODOULIDES N, PEYTON KJ, SCHAFER AI** (1997). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 80: 557-64
- DURANTE W** (2003). Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease. *J Cell Physiol* 195: 373-82
- ELBIRT KK, WHITMARSH AJ, DAVIS RJ, BONKOVSKY HL** (1998). Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 273: 8922-31
- ELLIOTT SN, MCKNIGHT W, CIRINO G, WALLACE JL** (1995). A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 109: 524-30
- FEELISCH M** (1998). The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358: 113-22
- FEINBERG AP & VOGELSTEIN B** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- FIORUCCI S, ANTONELLI E, SANTUCCI L, MORELLI O, MIGLIETTI M, FEDERICI B, MANNUCCI R, DEL SOLDATO P, MORELLI A** (1999a). Gastrointestinal safety of nitric oxide-derived aspirin is related to inhibition of ICE-like cysteine proteases in rats. *Gastroenterology* 116: 1089-106
- FIORUCCI S, SANTUCCI L, FEDERICI B, ANTONELLI E, DISTRUTTI E, MORELLI O, RENZO GD, COATA G, CIRINO G, SOLDATO PD, MORELLI A** (1999b). Nitric oxide-releasing NSAIDs inhibit interleukin-1beta converting enzyme-like cysteine proteases and protect endothelial cells from apoptosis induced by TNFalpha. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 421-35
- FIORUCCI S, SANTUCCI L, CIRINO G, MENCARELLI A, FAMILIARI L, SOLDATO PD, MORELLI A** (2000). IL-1 beta converting enzyme is a target for nitric oxide-releasing aspirin: new insights in the antiinflammatory mechanism of nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Immunol* 165: 5245-54
- FIORUCCI S & DEL SOLDATO P** (2003). NO-aspirin: mechanism of action and gastrointestinal safety. *Dig Liver Dis* 35 Suppl 2: S9-19
- FIORUCCI S, SANTUCCI L, GRESELE P, FACCINO RM, DEL SOLDATO P, MORELLI A** (2003). Gastrointestinal safety of NO-aspirin (NCX-4016) in healthy human volunteers: a proof of concept endoscopic study. *Gastroenterology* 124: 600-7
- FITZGERALD GA & PATRONO C** (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 345: 433-42
- FLETCHER BS, KUJUBU DA, PERRIN DM, HERSCHMAN HR** (1992). Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem* 267: 4338-44
- FORESTI R & MOTTERLINI R** (1999). The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic Res* 31: 459-75
- FORESTI R, SARATHCHANDRA P, CLARK JE, GREEN CJ, MOTTERLINI R** (1999). Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J* 339 (Pt 3): 729-36
- FÖRSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHWARZ P, GATH I, KLEINERT H** (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23: 1121-31
- FRANK S, ZACHAROWSKI K, WRAY GM, THIEMERMANN C, PFEILSCHIFTER J** (1999). Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a novel nitric oxide-regulated gene in rat glomerular mesangial cells and kidneys of endotoxemic rats. *Faseb J* 13: 869-82
- FRIEDL A, HARMENING C, SCHURICHT B, HAMPRECHT B** (1985). Rat atrial natriuretic peptide elevates the level of cyclic GMP in astroglia-rich brain cell cultures. *Eur J Pharmacol* 111: 141-2

- FURCHGOTT RF & VANHOUTTE PM** (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 3: 2007-18
- GENARO AM, HORTELANO S, ALVAREZ A, MARTINEZ C, BOSCA L** (1995). Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest* 95: 1884-90
- GRIENGLING KK, SORESCU D, USHIO-FUKAI M** (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501
- GROSSER N & SCHRÖDER H** (2000). A common pathway for nitric oxide release from NO-aspirin and glyceryl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 255-8
- GRYGLEWSKI RJ, PALMER RM, MONCADA S** (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454-6
- GUDI T, HUVAR I, MEINECKE M, LOHMANN SM, BOSS GR, PILZ RB** (1996). Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. Transactivation of the c-fos promoter. *J Biol Chem* 271: 4597-600
- GUZIK TJ, WEST NE, BLACK E, McDONALD D, RATNATUNGA C, PILLAI R, CHANNON KM** (2000). Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86: E85-90
- HAIDER A, OLSZANECKI R, GRYGLEWSKI R, SCHWARTZMAN ML, LIANOS E, KAPPAS A, NASJLETTI A, ABRAHAM NG** (2002). Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 188-94
- HARTSFIELD CL, ALAM J, COOK JL, CHOI AM** (1997). Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 273: L980-8
- HARTSFIELD CL, ALAM J, CHOI AM** (1999). Differential signaling pathways of HO-1 gene expression in pulmonary and systemic vascular cells. *Am J Physiol* 277: L1133-41
- HAWKEY CJ & RAMPTON DS** (1985). Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? *Gastroenterology* 89: 1162-88
- HAWKEY CJ, JONES JI, ATHERTON CT, SKELLY MM, BEBB JR, FAGERHOLM U, JONZON B, KARLSSON P, BJARNASON IT** (2003). Gastrointestinal safety of AZD3582, a cyclooxygenase inhibiting nitric oxide donator: proof of concept study in humans. *Gut* 52: 1537-42
- HAWKEY CJ & LANGMAN MJ** (2003). Non-steroidal anti-inflammatory drugs: overall risks and management. Complementary roles for COX-2 inhibitors and proton pump inhibitors. *Gut* 52: 600-8
- HAYDEN M, PIGNONE M, PHILLIPS C, MULROW C** (2002). Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 136: 161-72
- HE CH, GONG P, HU B, STEWART D, CHOI ME, CHOI AM, ALAM J** (2001). Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem* 276: 20858-65
- HINZ B & SCHRÖDER H** (1998). Vitamin C attenuates nitrate tolerance independently of its antioxidant effect. *FEBS Lett* 428: 97-9
- HOLM M, JOHANSSON B, PETTERSSON A, FANDRIKS L** (1998). Acid-induced duodenal mucosal nitric oxide output parallels bicarbonate secretion in the anaesthetized pig. *Acta Physiol Scand* 162: 461-8
- HOLZER P & SAMETZ W** (1986). Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. *Gastroenterology* 91: 975-81
- HOPKINS PN, WU LL, HUNT SC, JAMES BC, VINCENT GM, WILLIAMS RR** (1996). Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 250-5

- HUANG HC, NGUYEN T, PICKETT CB** (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12475-80
- IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G** (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9
- IGNARRO LJ** (1999). Nitric oxide: a unique endogenous signalling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 19: 51-71
- IMMENSCHUH S, HINKE V, OHLMANN A, GIFHORN-KATZ S, KATZ N, JUNGERMANN K, KIETZMANN T** (1998). Transcriptional activation of the haem oxygenase-1 gene by cGMP via a cAMP response element/activator protein-1 element in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 334 (Pt 1): 141-6
- IMMENSCHUH S & RAMADORI G** (2000). Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 60: 1121-8
- INGUAGGIATO P, GONZALEZ-MICHACA L, CROATT AJ, HAGGARD JJ, ALAM J, NATH KA** (2001). Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. *Kidney Int* 60: 2181-91
- ISHII T, ITOH K, TAKAHASHI S, SATO H, YANAGAWA T, KATOH Y, BANNAI S, YAMAMOTO M** (2000). Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 275: 16023-9
- ITOH K, WAKABAYASHI N, KATOH Y, ISHII T, IGARASHI K, ENGEL JD, YAMAMOTO M** (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13: 76-86
- JACOBS AT & IGNARRO LJ** (2003). Nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinases mediate nitric oxide-enhanced transcriptional expression of interferon-beta. *J Biol Chem* 278: 8018-27
- JENEY V, BALLA J, YACHIE A, VARGA Z, VERCELLOTTI GM, EATON JW, BALLA G** (2002). Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100: 879-87
- JOHAL K & HANSON PJ** (2000). Opposite effects of flurbiprofen and the nitroxybutyl ester of flurbiprofen on apoptosis in cultured guinea-pig gastric mucous cells. *Br J Pharmacol* 130: 811-8
- JUN CD, OH CD, KWAK HJ, PAE HO, YOO JC, CHOI BM, CHUN JS, PARK RK, CHUNG HT** (1999). Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, p38 kinase, and CPP-32 protease pathways. *J Immunol* 162: 3395-401
- KARIN M** (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270: 16483-6
- KAWASHIMA A, ODA Y, YACHIE A, KOIZUMI S, NAKANISHI I** (2002). Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol* 33: 125-30
- KEEBLE JE & MOORE PK** (2002). Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br J Pharmacol* 137: 295-310
- KIEMER AK, BILDNER N, WEBER NC, VOLLMAR AM** (2003). Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells. *Endocrinology* 144: 802-12
- KIETZMANN T, SAMOYLENKO A, IMMENSCHUH S** (2003). Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 278: 17927-36
- KIM H, SHIM J, HAN PL, CHOI EJ** (1997a). Nitric oxide modulates the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activity through activating c-Jun N-terminal kinase kinase. *Biochemistry* 36: 13677-81

- KIM YM, BERGONIA HA, MULLER C, PITT BR, WATKINS WD, LANCASTER JR, JR.** (1995). Loss and degradation of enzyme-bound heme induced by cellular nitric oxide synthesis. *J Biol Chem* 270: 5710-3
- KIM YM, DE VERA ME, WATKINS SC, BILLIAR TR** (1997b). Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 272: 1402-11
- KIM YM, TALANIAN RV, BILLIAR TR** (1997c). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 272: 31138-48
- KIM YM, KIM TH, SEOL DW, TALANIAN RV, BILLIAR TR** (1998). Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *J Biol Chem* 273: 31437-41
- KOIZUMI T, ODANI N, OKUYAMA T, ICHIKAWA A, NEGISHI M** (1995). Identification of a cis-regulatory element for delta 12-prostaglandin J2-induced expression of the rat heme oxygenase gene. *J Biol Chem* 270: 21779-84
- KONTUREK SJ, BRZOZOWSKI T, MAJKA J, PYTKO-POLONCZYK J, STACHURA J** (1993). Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. *Eur J Pharmacol* 239: 215-7
- KORUS M, MAHON GM, CHENG L, WHITEHEAD IP** (2002). p38 MAPK-mediated activation of NF-kappaB by the RhoGEF domain of Bcr. *Oncogene* 21: 4601-12
- KOSONEN O, KANKAANRANTA H, MALO-RANTA U, MOILANEN E** (1999). Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 382: 111-7
- KUBES P, SUZUKI M, GRANGER DN** (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4651-5
- LAINE L** (2003). The role of proton pump inhibitors in NSAID-associated gastropathy and upper gastrointestinal symptoms. *Rev Gastroenterol Disord* 3 Suppl 4: S30-9
- LÄMMLI UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LANAS A, BAJADOR E, SERRANO P, FUENTES J, CARRENO S, GUARDIA J, SANZ M, MONTORO M, SAINZ R** (2000). Nitrovasodilators, low-dose aspirin, other nonsteroidal antiinflammatory drugs, and the risk of upper gastrointestinal bleeding. *N Engl J Med* 343: 834-9
- LANCASTER JR, JR. & HIBBS JB, JR.** (1990). EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1223-7
- LANDER HM, OGIESTE JS, PEARCE SF, LEVI R, NOVOGRODSKY A** (1995a). Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem* 270: 7017-20
- LANDER HM, OGIESTE JS, TENG KK, NOVOGRODSKY A** (1995b). p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem* 270: 21195-8
- LANDER HM, JACOVINA AT, DAVIS RJ, TAURAS JM** (1996). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem* 271: 19705-9
- LAVROVSKY Y, SCHWARTZMAN ML, LEVERE RD, KAPPAS A, ABRAHAM NG** (1994). Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5987-91
- LECHI C, ANDRIOLI G, GAINO S, TOMMASOLI R, ZULIANI V, ORTOLANI R, DEGAN M, BENONI G, BELLAVITE P, LECHI A, MINUZ P** (1996). The antiplatelet effects of a new nitroderivative of acetylsalicylic acid--an in vitro study of inhibition on the early phase of platelet activation and on TXA2 production. *Thromb Haemost* 76: 791-8

- LEE JC, KASSIS S, KUMAR S, BADGER A, ADAMS JL** (1999). p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther* 82: 389-97
- LEE M, CRYER B, FELDMAN M** (1994). Dose effects of aspirin on gastric prostaglandins and stomach mucosal injury. *Ann Intern Med* 120: 184-189
- LEE PJ, CAMHI SL, CHIN BY, ALAM J, CHOI AM** (2000). AP-1 and STAT mediate hyperoxia-induced gene transcription of heme oxygenase-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L175-82
- LI Y, ZHU H, KUPPUSAMY P, ROUBAUD V, ZWEIER JL, TRUSH MA** (1998). Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem* 273: 2015-23
- LIANG M, CROATT AJ, NATH KA** (2000). Mechanisms underlying induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F728-35
- LIEW FY & COX FE** (1991). Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today* 12: A17-21
- LIN F & GIROTTI AW** (1998). Hemin-enhanced resistance of human leukemia cells to oxidative killing: antisense determination of ferritin involvement. *Arch Biochem Biophys* 352: 51-8
- LIPPE IT & HOLZER P** (1992). Participation of endothelium-derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperaemia due to acid back-diffusion. *Br J Pharmacol* 105: 708-14
- LIPTON SA, CHOI YB, PAN ZH, LEI SZ, CHEN HS, SUCHER NJ, LOSCALZO J, SINGEL DJ, STAMLER JS** (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-32
- LOPEZ-BELMONTE J, WHITTLE BJ, MONCADA S** (1993). The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. *Br J Pharmacol* 108: 73-8
- LOWENSTEIN CJ, DINERMAN JL, SNYDER SH** (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120: 227-237
- MAFFIA P, IANARO A, SORRENTINO R, LIPPOLIS L, MAIELLO FM, DEL SOLDATO P, IALENTI A, CIRINO G** (2002). Beneficial effects of NO-releasing derivative of flurbiprofen (HCT-1026) in rat model of vascular injury and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 263-7
- MAINES MD, TRAKSHEL GM, KUTTY RK** (1986). Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 261: 411-9
- MAINES MD** (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-54
- MANNICK JB, ASANO K, IZUMI K, KIEFF E, STAMLER JS** (1994). Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79: 1137-46
- MARSHALL HE, MERCHANT K, STAMLER JS** (2000). Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *Faseb J* 14: 1889-900
- MARTIN MJ, JIMENEZ MD, MOTILVA V** (2001). New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 7: 881-908
- MARTIN W, WHITE DG, HENDERSON AH** (1988). Endothelium-derived relaxing factor and atriopeptin II elevate cyclic GMP levels in pig aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 93: 229-39
- MAXEY KM, MADDIPATI KR, BIRKMEIER J** (1992). Interference in immunoassay. *J Clin Immunoassay* 15: 116-120
- MAYER M** (2000). Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 46: 1723-7

- MCCOUBREY WK, JR., HUANG TJ, MAINES MD** (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725-32
- MINUZ P, DEGAN M, GAINO S, MENEGUZZI A, ZULIANI V, SANTONASTASO CL, SOLDATO PD, LECHI A** (2001). NCX4016 (NO-Aspirin) has multiple inhibitory effects in LPS-stimulated human monocytes. *Br J Pharmacol* 134: 905-11
- MITCHELL JA & WARNER TD** (1999). Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 128: 1121-32
- MIZUNO H, SAKAMOTO C, MATSUDA K, WADA K, UCHIDA T, NOGUCHI H, AKAMATSU T, KASUGA M** (1997). Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology* 112: 387-97
- MOMI S, EMERSON M, PAUL W, LEONE M, MEZZASOMA AM, DEL SOLDATO P, PAGE CP, GRESELE P** (2000). Prevention of pulmonary thromboembolism by NCX 4016, a nitric oxide-releasing aspirin. *Eur J Pharmacol* 397: 177-85
- MORRIS R, SOUTHAM E, BRAID DJ, GARTHWAITE J** (1992). Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells. *Neurosci Lett* 137: 29-32
- MOSLEY K, WEMBRIDGE DE, CATTELL V, COOK HT** (1998). Heme oxygenase is induced in nephrotoxic nephritis and hemin, a stimulator of heme oxygenase synthesis, ameliorates disease. *Kidney Int* 53: 672-8
- MOTTERLINI R, FORESTI R, INTAGLIETTA M, WINSLOW RM** (1996a). NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 270: H107-14
- MOTTERLINI R, HIDALGO A, SAMMUT I, SHAH KA, MOHAMMED S, SRAI K, GREEN CJ** (1996b). A precursor of the nitric oxide donor SIN-1 modulates the stress protein heme oxygenase-1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 167-72
- MUKHERJEE D, NISSEN SE, TOPOL EJ** (2001). Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *Jama* 286: 954-9
- MUSCARA MN & WALLACE JL** (1999). Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am J Physiol* 276: G1313-6
- MUSCARA MN, MCKNIGHT W, ASFAHA S, WALLACE JL** (2000a). Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* 129: 681-6
- MUSCARA MN, MCKNIGHT W, LOVREN F, TRIGGLE CR, CIRINO G, WALLACE JL** (2000b). Antihypertensive properties of a nitric oxide-releasing naproxen derivative in two-kidney, one-clip rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H528-35
- MUSCARA MN, LOVREN F, MCKNIGHT W, DICAY M, DEL SOLDATO P, TRIGGLE CR, WALLACE JL** (2001). Vasorelaxant effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative in normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 133: 1314-22
- NAPOLI C, CIRINO G, DEL SOLDATO P, SORRENTINO R, SICA V, CONDORELLI M, PINTO A, IGNARRO LJ** (2001). Effects of nitric oxide-releasing aspirin versus aspirin on restenosis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2860-4
- NATH KA, BALLA G, VERCELLOTTI GM, BALLA J, JACOB HS, LEVITT MD, ROSENBERG ME** (1992). Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 90: 267-70
- NEEDLEMAN P & ISAKSON PC** (1997). The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol* 24 Suppl 49: 6-8
- OBERLE S & SCHRÖDER H** (1997). Ferritin may mediate SIN-1-induced protection against oxidative stress. *Nitric Oxide* 1: 308-14
- OBERLE S, SCHWARTZ P, ABATE A, SCHRÖDER H** (1999). The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythryl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 28-34

- OTTERBEIN LE, MANTELL LL, CHOI AM** (1999). Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 276: L688-94
- OTTERBEIN LE, BACH FH, ALAM J, SOARES M, TAO LU H, WYSK M, DAVIS RJ, FLAVELL RA, CHOI AM** (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6: 422-8
- OTTERBEIN LE & CHOI AM** (2000). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1029-37
- OTTERBEIN LE, ZUCKERBRAUN BS, HAGA M, LIU F, SONG R, USHEVA A, STACHULAK C, BODYAK N, SMITH RN, CSIZMADIA E, TYAGI S, AKAMATSU Y, FLAVELL RJ, BILLIAR TR, TZENG E, BACH FH, CHOI AM, SOARES MP** (2003). Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med* 9: 183-90
- PAIMELA H, GODDARD PJ, SILEN W** (1995). Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Dig Dis Sci* 40: 2495-6
- PARENTI A, MORBIDELLI L, CUI XL, DOUGLAS JG, HOOD JD, GRANGER HJ, LEDDA F, ZICHE M** (1998). Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 273: 4220-6
- PEARSON G, ROBINSON F, BEERS GIBSON T, XU BE, KARANDIKAR M, BERMAN K, COBB MH** (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-83
- PETRACHE I, OTTERBEIN LE, ALAM J, WIEGAND GW, CHOI AM** (2000). Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L312-9
- PFEILSCHIFTER J & HUWILER A** (1996). Nitric oxide stimulates stress-activated protein kinases in glomerular endothelial and mesangial cells. *FEBS Lett* 396: 67-70
- PILZ RB, SUHASINI M, IDRIS S, MEINKOTH JL, BOSS GR** (1995). Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. *Faseb J* 9: 552-8
- POLTE T, OBERLE S, SCHRÖDER H** (1997). The nitric oxide donor SIN-1 protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity: possible role for cyclic GMP and heme oxygenase. *J Mol Cell Cardiol* 29: 3305-10
- POLTE T, ABATE A, DENNERY PA, SCHRÖDER H** (2000). Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1209-15
- POLTE T, HEMMERLE A, BERNDT G, GROSSER N, ABATE A, SCHRÖDER H** (2002). Atrial natriuretic peptide reduces cyclosporin toxicity in renal cells: role of cGMP and heme oxygenase-1. *Free Radic Biol Med* 32: 56-63
- POSS KD & TONEGAWA S** (1997a). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10919-24
- POSS KD & TONEGAWA S** (1997b). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10925-30
- PRADELLES P, GRASSI J, CHABARDES D, GUISO N** (1989). Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. *Anal Chem* 61: 447-53
- PRICHARD PJ, KITCHINGMAN GK, WALT RP, DANESHMEND TK, HAWKEY CJ** (1989). Human gastric mucosal bleeding induced by low dose aspirin, but not warfarin. *Br Med J* 289: 493-496
- PROSPERI C, SCALI C, PEPEU G, CASAMENTI F** (2001). NO-flurbiprofen attenuates excitotoxin-induced brain inflammation, and releases nitric oxide in the brain. *Jpn J Pharmacol* 86: 230-5
- RAINSFORD KD** (1999). Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med* 107: 27S-35S; discussion 35S-36S

- RAVE N, CRKVENJAKOV R, BOEDTKER H** (1979). Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acids Res* 6: 3559-67
- REILLY IA & FITZGERALD GA** (1988). Aspirin in cardiovascular disease. *Drugs* 35: 154-76
- ROSSONI G, MUSCARA MN, CIRINO G, WALLACE JL** (2002). Inhibition of Cyclooxygenase-2 exacerbates ischaemia-induced myocardial dysfunction in the rabbit. *Br J Pharmacol* 135: 1540-1546
- RUBBO H, RADI R, TRUJILLO M, TELLERI R, KALYANARAMAN B, BARNES S, KIRK M, FREEMAN BA** (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 269: 26066-75
- RYTER SW, OTTERBEIN LE, MORSE D, CHOI AM** (2002). Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235: 249-63
- SAAVEDRA JE, BILLIAR TR, WILLIAMS DL, KIM YM, WATKINS SC, KEEFER LK** (1997). Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and toxicity in the liver. *J Med Chem* 40: 1947-54
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- SANO H, HIRAI M, SAITO H, NAKASHIMA I, ISOBE KI** (1997). A nitric oxide-releasing reagent, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, enhances the expression of superoxide dismutases mRNA in the murine macrophage cell line RAW264-7. *Immunology* 92: 118-22
- SANTUCCI L, FIORUCCI S, GIANANTI M, BRUNORI PM, DI MATTEO FM, MORELLI A** (1994). Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. *Gut* 35: 909-15
- SCHAFFER MR, EFRON PA, THORNTON FJ, KLINGEL K, GROSS SS, BARBUL A** (1997). Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol* 158: 2375-81
- SCHMASSMANN A, PESKAR BM, STETTLER C, NETZER P, STROFF T, FLOGERZI B, HALTER F** (1998). Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br J Pharmacol* 123: 795-804
- SCHOEN RT & VENDER RJ** (1989). Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am J Med* 86: 449-458
- SCHRÖDER H, NEY P, WODITSCH I, SCHRÖR K** (1990). Cyclic GMP mediates SIN-1-induced inhibition of human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Pharmacol* 182: 211-8
- SCHRÖDER H & SCHRÖR K** (1990). Inhibitors of cytochrome P-450 reduce cyclic GMP stimulation by glyceryl trinitrate in LLC-PK1 kidney epithelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342: 616-8
- SCHRÖDER H** (1992). Cytochrome P-450 mediates bioactivation of organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 298-302
- SCHWERTNER HA, JACKSON WG, TOLAN G** (1994). Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 40: 18-23
- SCIORATI C, ROVERE P, FERRARINI M, HELTAI S, MANFREDI AA, CLEMENTI E** (1997). Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gammadelta T lymphocytes. *J Biol Chem* 272: 23211-5
- SEKIGUCHI M, SAKAKIBARA K, FUJII G** (1978). Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jpn J Exp Med* 48: 61-8
- SHEN YH, WANG XL, WILCKEN DE** (1998). Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett* 433: 125-31

- SHIBAHARA S, MUELLER R, TAGUCHI H, YOSHIDA T** (1985). Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7865-7869
- SILHAVY TJ, BERMAN ML, ENQUIST LW** (1984). Experiments with gene fusion, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- SILVERSTEIN FE, GRAHAM DY, SENIOR JR, DAVIES HW, STRUTHERS BJ, BITTMAN RM, GEIS GS** (1995). Misoprostol reduces serious gastrointestinal complications in patients with rheumatoid arthritis receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 123: 241-9
- SILVERSTEIN FE, FAICH G, GOLDSTEIN JL, SIMON LS, PINCUS T, WHELTON A, MAKUCH R, EISEN G, AGRAWAL NM, STENSON WF, BURR AM, ZHAO WW, KENT JD, LEFKOWITH JB, VERBURG KM, GEIS GS** (2000). Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama* 284: 1247-55
- SIMON LS, HATOUM HT, BITTMAN RM, ARCHAMBAULT WT, POLISSON RP** (1996). Risk factors for serious nonsteroidal-induced gastrointestinal complications: regression analysis of the MUCOSA trial. *Fam Med* 28: 204-10
- SIOW RC, SATO H, MANN GE** (1999). Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res* 41: 385-94
- So HS, PARK RK, KIM MS, LEE SR, JUNG BH, CHUNG SY, JUN CD, CHUNG HT** (1998). Nitric oxide inhibits c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 809-13
- SOARES MP, BROUARD S, SMITH RN, BACH FH** (2001). Heme oxygenase-1, a protective gene that prevents the rejection of transplanted organs. *Immunol Rev* 184: 275-85
- SOH J, MAO Y, LIU L, THOMPSON WJ, PAMUKCU R, WEINSTEIN IB** (2001). Protein Kinase G Activates the JNK1 Pathway via Phosphorylation of MEKK1. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 16406-16410
- STAMLER JS, SINGEL DJ, LOSCALZO J** (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-902
- STAMLER JS** (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78: 931-6
- STEINER AA, BRANCO LG, CUNHA FQ, FERREIRA SH** (2001). Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. *Br J Pharmacol* 132: 1673-82
- STOCKER R, YAMAMOTO Y, MCDONAGH AF, GLAZER AN, AMES BN** (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043-6
- TAKEUCHI K, UESHIMA K, HIRONAKA Y, FUJIOKA Y, MATSUMOTO J, OKABE S** (1991). Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. Relation to gastric hypermotility. *Digestion* 49: 175-84
- TARPEY MM, WHITE CR, SUAREZ E, RICHARDSON G, RADI R, FREEMAN BA** (1999). Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res* 84: 1203-11
- TERRY CM, CLIKEMAN JA, HOIDAL JR, CALLAHAN KS** (1998). Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol* 274: H883-91
- THANOS D & MANIATIS T** (1995). Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta interferon gene. *Mol Cell Biol* 15: 152-64
- TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4

- VAANANEN PM, MEDDINGS JB, WALLACE JL** (1991). Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. *Am J Physiol* 261: G470-5
- VANE JR** (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231: 232-5
- VASQUEZ-VIVAR J, HOGG N, PRITCHARD KA, JR., MARTASEK P, KALYANARAMAN B** (1997). Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett* 403: 127-30
- VINCENT SH** (1989). Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids. *Semin Hematol* 26: 105-13
- VITEK L, JIRSA M, BRODANOVA M, KALAB M, MARECEK Z, DANZIG V, NOVOTNY L, KOTAL P** (2002). Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 160: 449-56
- WAGENER FA, EGGERT A, BOERMAN OC, OYEN WJ, VERHOFSTAD A, ABRAHAM NG, ADEMA G, VAN KOOYK Y, DE WITTE T, FIGDOR CG** (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 98: 1802-11
- WALDMAN SA & MURAD F** (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39: 163-196
- WALLACE JL, REUTER B, CICALA C, MCKNIGHT W, GRISHAM MB, CIRINO G** (1994). Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterology* 107: 173-9
- WALLACE JL, CIRINO G, MCKNIGHT W, ELLIOTT SN** (1995). Reduktion of gastrointestinal injury in acute endotoxic shock by flurbiprofen nitroxybutylester. *Eur J Pharmacol* 280: 63-68
- WALLACE JL & GRANGER DN** (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *Faseb J* 10: 731-40
- WALLACE JL** (1997). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology* 112: 1000-16
- WALLACE JL, VERGNOLLE N, MUSCARA MN, ASFAHA S, CHAPMAN K, MCKNIGHT W, DEL SOLDATO P, MORELLI A, FIORUCCI S** (1999). Enhanced anti-inflammatory effects of a nitric oxide-releasing derivative of mesalamine in rats. *Gastroenterology* 117: 557-66
- WALLACE JL & MILLER MJ** (2000). Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 119: 512-20
- WALLACE JL** (2001). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *Am J Med* 110: 19S-23S
- WALLACE JL & MA L** (2001). Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 226: 1003-15
- WALLACE JL, IGNARRO LJ, FIORUCCI S** (2002). Potential cardioprotective actions of no-releasing aspirin. *Nat Rev Drug Discov* 1: 375-82
- WALLACE JL & DEL SOLDATO P** (2003). The therapeutic potential of NO-NSAIDs. *Fundam Clin Pharmacol* 17: 11-20
- WASSERMAN WW & FAHL WE** (1997). Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5361-6
- WEIR MR, SPERLING RS, REICIN A, GERTZ BJ** (2003). Selective COX-2 inhibition and cardiovascular effects: a review of the rofecoxib development program. *Am Heart J* 146: 591-604
- WHITTLE BJ** (2003). Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundam Clin Pharmacol* 17: 301-13
- WIDMANN C, GIBSON S, JARPE MB, JOHNSON GL** (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143-80

- WILD AC, MOINOVA HR, MULCAHY RT** (1999). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 274: 33627-36
- WILLIS D, MOORE AR, FREDERICK R, WILLOUGHBY DA** (1996). Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2: 87-90
- WINK DA, NIMS RW, DARBYSHIRE JF, CHRISTODOULOU D, HANBAUER I, COX GW, LAVAL F, LAVAL J, COOK JA, KRISHNA MC, ET AL.** (1994). Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* 7: 519-25
- WINK DA, VODOVOTZ Y, GRISHAM MB, DEGRAFF W, COOK JC, PACELLI R, KRISHNA M, MITCHELL JB** (1999). Antioxidant effects of nitric oxide. *Methods Enzymol* 301: 413-24
- WOLFE MM, LICHTENSTEIN DR, SINGH G** (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 340: 1888-99
- YACHIE A, NIIDA Y, WADA T, IGARASHI N, KANEDA H, TOMA T, OHTA K, KASAHARA Y, KOIZUMI S** (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103: 129-35
- YET SF, TIAN R, LAYNE MD, WANG ZY, MAEMURA K, SOLOVYEVA M, ITH B, MELO LG, ZHANG L, INGWALL JS, DZAU VJ, LEE ME, PERRELLA MA** (2001). Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res* 89: 168-73
- YU R, CHEN C, MO YY, HEBBAR V, OWUOR ED, TAN TH, KONG AN** (2000). Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem* 275: 39907-13
- YUAN R, SUMI M, BENET LZ** (1997). Investigation of aortic CYP3A bioactivation of nitroglycerin in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 1499-505
- ZHANG X, BEDARD EL, POTTER R, ZHONG R, ALAM J, CHOI AM, LEE PJ** (2002). Mitogen-activated protein kinases regulate HO-1 gene transcription after ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L815-29
- ZIMMERMANN KC, SARBIA M, SCHRÖR K, WEBER AA** (1998). Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 54: 536-40

8 Veröffentlichungen

8.1 Originalarbeiten

BERNDT G, GROSSER N, HOOGSTRAATE J, SCHRÖDER H (2004). A common pathway of nitric oxide release from AZD3582 and glyceryl trinitrate. *Eur J Pharm Sci* 21: 331-335

GROSSER N, OBERLE S, BERNDT G, ERDMANN K, HEMMERLE A, SCHRÖDER H (2004). Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 351-355

POLTE T, HEMMERLE A, BERNDT G, GROSSER N, ABATE A, SCHRÖDER H (2002). Atrial natriuretic peptide reduces cyclosporin toxicity in renal cells: role of cGMP and heme oxygenase-1. *Free Radic Biol Med* 32: 56-63

8.2 In Kurzform publizierte Poster (*Abstracts*)

BERNDT G, GROSSER N, HOOGSTRAATE J, SCHRÖDER H (2002). A common pathway for nitric oxide release from AZD3582 and glyceryl trinitrate. *Ann Rheum Dis* 61 (Suppl 1): 269-270

BERNDT G, GROSSER N, HOOGSTRAATE J, SCHRÖDER H (2002). A common pathway for nitric oxide release from AZD3582 and glyceryl trinitrate. *Pharmacologist* 44 (Suppl 1): A222

BERNDT G, GROSSER N, HOOGSTRAATE J, BORG N, SCHRÖDER H (2002). A common pathway for nitric oxide release from the CINOD AZD3582 and glyceryl trinitrate. *AAPS PharmSci* 4 (4): Abstract W5304

BERNDT G, GROSSER N, HOOGSTRAATE J, BORG N, ANDERSSON LI, SCHRÖDER H (2002). Mechanism of COX inhibition and pathway for nitric oxide release of the CINOD AZD3582. *Eur J Pharm Sci* 17 (Suppl 1): S61

BERNDT G, GROSSER N, HOOGSTRAATE J, SCHRÖDER H (2003). A common pathway for nitric oxide release from the CINOD AZD3582 and glyceryl trinitrate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 376 (Suppl 1): R45

GROSSER N, OBERLE S, HEMMERLE A, BERNDT G, SCHRÖDER H (2003). Endothelial protection by L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible antioxidant mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 376 (Suppl 1): R16

ERDMANN K, BERNDT G, GROSSER N, SCHRÖDER, H (2004). Antioxidant action of methionine in endothelial cells: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 (Suppl 1): R14

ERDMANN K, BERNDT G, GROSSER N, SCHRÖDER, H (2004). Antioxidative Wirkung von Methionin in Endothelzellen: Hämoxygenase-1 und Ferritin als mögliche Mediatoren. *Proc Germ Nutr Soc* 6: 49

9 Danksagung

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Henning Schröder, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die produktive und vertrauensvolle Zusammenarbeit und unzählige ebenso wertvolle wie motivierende Diskussionen. Auch für die weitreichende wissenschaftliche Förderung und die Möglichkeit der Präsentation meiner Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen möchte ich mich bedanken.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie, die ich während dieser Zeit sowohl fachlich als auch menschlich schätzen gelernt habe, danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Aida Abate, Frau Anke Hemmerle, Frau Dr. Stefanie Oberle-Plümpe sowie Frau Dr. Nina Großer für die Einweisung in experimentelle Techniken. Frau Kati Erdmann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft beim experimentellen Arbeiten.

Mein Dank gilt auch allen technischen Mitarbeitern der Abteilung für ihre engagierte Hilfe. Insbesondere danke ich Frau Kathrin Schipporeit und Frau Petra Schwartz für die Unterstützung im Zelllabor und bei der Versuchsdurchführung.

Frau Dipl.-Biochem. Nadine Groß und Frau Dr. Margret Köck danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe beim *troubleshooting* im Isotopenlabor.

Außerdem danke ich Frau Dipl.-Biochem. Uta Raue für die sorgfältige Durchsicht der Manuskripte dieser Arbeit, ihr Verständnis und ihre motivierende Art.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, auf deren Unterstützung und Rückhalt ich jederzeit bauen konnte.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den 24.03.04

Georg Berndt

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Georg Wilfrid Berndt
Geburtsdatum: 27. Juni 1976
Geburtsort: Hannover
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982 – 1986 Grundschohle Klein-Hehlen, Celle
1986 – 1988 Orientierungsstufe Klein-Hehlen, Celle
1988 – 1995 Hermann-Billung-Gymnasium, Celle
Abschluss: Abitur

Studium:

ab WS 1996/97 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität,
Halle-Wittenberg
August 1998 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
September 2000 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 2001 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Approbation zum Apotheker

Praktisches Jahr:

Okt. 2000 – März 2001 St. Bernward Apotheke, Hannover
April 2001 - Sept. 2001 Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich
Pharmazie, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg

Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit April 2001 Doktorand am Institut für pharmazeutische Biologie und
Pharmakologie (Abt. Pharmakologie und Toxikologie),
Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität, Halle-
Wittenberg

Halle (Saale), den 24.03.04