

**Molekulare Mechanismen und funktionelle Konsequenzen
der Induktion antioxidativer Gene durch
Protonenpumpenhemmer**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Stephanie Schulz

geb. am: 13.06.1980 in: Jena

Gutachter /in:

1. Prof. Dr. Charlotte Kloft, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. Henning Schröder, Minneapolis
3. Prof. Dr. Sönke Behrends, Braunschweig

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

urn:nbn:de:gbv:3-000014179

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014179>]

Meinen Eltern und Linchen

Die Natur ist unerbittlich und unveränderlich,
und es ist ihr gleichgültig,
ob die verborgenen Gründe und Arten ihres Handelns
dem Menschen verständlich sind oder nicht.

(Galileo Galilei)

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	7
1.1 Protonenpumpeninhibitoren	7
1.1.1 Eigenschaften der PPIs	7
1.1.2 Pleiotrope Effekte der PPIs	9
1.1.3 Omeprazol	11
1.1.4 Lansoprazol	12
1.2 Die Magenschleimhaut – Protektion und Schädigung	12
1.2.1 Schutzmechanismen der Magenschleimhaut	12
1.2.2 Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies in der Pathogenese gastroduodener Ulzerationen	13
1.2.3 Gastrointestinale und kardiovaskuläre Risiken von NSAIDs	15
1.3 Das Hämoxigenase/Ferritin-System	16
1.3.1 Funktion und Isoformen der Hämoxigenase	16
1.3.2 Die HO-1-Produkte als Mediatoren protektiver Effekte	18
1.3.3 Die induzierbare HO-1 - ein mögliches Therapieprinzip?	19
1.3.4 Das Eisenspeicherprotein Ferritin	20
1.4 Regulationsmechanismen der HO-1-Induktion	21
1.4.1 Genregulatorische Proteine	21
1.4.2 Signaltransduktion der HO-1	23
1.4.2.1 MAP-Kinasen	24
1.4.2.2 PI3K-Signalweg	25
1.4.2.3 Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase	26
2 PROBLEMSTELLUNG	28
3 MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 Zellkultur	30
3.1.1 Kultivierung der Endothelzellen	30
3.1.2 Kultivierung der Makrophagen	30
3.1.3 Kultivierung der Mausfibroblasten	30
3.1.4 Kultivierung der gastralen Epithelzellen	30
3.2 Versuchstiere	31
3.3 Western-Blot-Analyse	31
3.3.1 Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse	31
3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford	31
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	32

Inhaltsverzeichnis	2
3.3.4 Protein-Transfer (Western-Blot)	32
3.3.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern	32
3.4 Northern-Blot-Analyse	33
3.4.1 Gewinnung und Isolierung von Plasmid-DNA	33
3.4.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	34
3.4.3 DNA-Gelelektrophorese und Fragmentisolierung	34
3.4.4 Inkubationsprotokoll zur Northern-Blot-Analyse	34
3.4.5 RNA-Isolierung	34
3.4.6 RNA-Gelelektrophorese	35
3.4.7 RNA-Fixierung auf Nylon-Membranen durch Vakuum-Blotting	35
3.4.8 Markierung von DNA-Sonden mit ³² P-Desoxycytidin-Triphosphat	35
3.4.9 Vor- und Haupthybridisierung	36
3.4.10 Detektion und Quantifizierung	36
3.5 Real time RT-PCR	36
3.5.1 Inkubationsprotokoll zur Real time RT-PCR	37
3.5.2 RNA-Isolierung	37
3.5.3 Probenauftragung und Real time RT-PCR	37
3.6 Bestimmung der HO-Aktivität durch spektrometrische Vermessung von Bilirubin	38
3.6.1 Inkubationsprotokoll zur Aktivitätsbestimmung	39
3.6.2 Aufarbeitung der Proben	39
3.6.3 HO-Aktivitätsbestimmung	39
3.7 Bestimmung der HO-Aktivität durch gaschromatographische CO-Messung	40
3.7.1 Applikation der Substanzen	40
3.7.2 Gewebepräparation	41
3.7.3 HO-Reaktion	41
3.7.4 CO-Quantifizierung	41
3.8 Bestimmung freier Sauerstoffradikale	42
3.8.1 Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung	42
3.8.2 Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz	43
3.9 Untersuchungen zur Viabilität – LDH-Assay	43
3.9.1 Inkubationsprotokoll	43
3.9.2 Enzymreaktion	44
3.10 Bestimmung der HO-1-Promotoraktivität	44
3.10.1 Inkubationsprotokoll BLI	44
3.10.2 Probenaufarbeitung und <i>in vivo</i> BLI	45
3.11 Material	45
3.12 Puffer, Lösungen und Medien	47
3.12.1 Puffer	47
3.12.2 Lösungen	48
3.12.3 Substanzlösungen	48

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>3</u>
3.12.4 Medien	49
3.13 Statistik	49
3.14 Kooperationen	49
4 ERGEBNISSE	50
4.1 Effekte auf die Transkription des HO-1 Gens	50
4.1.1 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol in gastralen Epithelzellen	51
4.1.2 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol und Omeprazol in Endothelzellen	51
4.1.3 Effekte von Ranitidin und Lansoprazol auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen	53
4.1.4 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA in Makrophagen	54
4.1.5 Effekte von Lansoprazol und Omeprazol am murinen HO-1-Promotor	54
4.1.6 Zusammenfassung	56
4.2 HO-1-Induktion auf Proteinebene	56
4.2.1 Konzentrationsabhängige Effekte auf die Induktion des HO-1-Proteins in Endothelzellen	56
4.2.2 Zeitabhängige Effekte auf die Induktion des HO-1-Proteins in Endothelzellen	58
4.2.3 Konzentrationsabhängige Effekte auf die Induktion des HO-1-Proteins in Makrophagen	59
4.2.4 Zusammenfassung	60
4.3 Untersuchungen zur Viabilität	60
4.3.1 Effekte von Omeprazol und Lansoprazol auf die Viabilität von Endothelzellen	61
4.3.2 Effekte von Omeprazol und Lansoprazol auf die Viabilität von Makrophagen	61
4.3.3 Zusammenfassung	62
4.4 HO-Aktivität im Zellsystem	62
4.4.1 Effekt auf die HO-Aktivität in Endothelzellen	63
4.4.2 Effekt auf die HO-Aktivität in Makrophagen	64
4.4.3 Zusammenfassung	64
4.5 Ferritininduktion auf Proteinebene	64
4.5.1 Zeitabhängige Induktion des Ferritinproteins in Endothelzellen	65
4.5.2 Konzentrationsabhängige Induktion des Ferritinproteins in Endothelzellen	66
4.5.3 Induktion des Ferritinproteins in Makrophagen	67
4.5.4 Zusammenfassung	68
4.6 HO-1-Genregulation	69
4.6.1 Einfluss des Transkriptionsblockers Actinomycin D und des Translationblockers Cycloheximid	69
4.6.2 Einfluss von ROS	70

4.6.3	Einfluss des TRX/TRX-Reduktasesystems und NO-abhängiger Stoffwechselwege	72
4.6.4	Einfluss des PI3K-Stoffwechselweges	74
4.6.4.1	Northern-Blot-Analyse	74
4.6.4.2	<i>Real time</i> RT-PCR	75
4.6.4.3	HO-1-Promotoraktivität	76
4.6.5	Einfluss des MAP-Kinasen-Stoffwechselweges	78
4.6.5.1	Northern-Blot-Analyse	78
4.6.5.2	HO-1-Promotoraktivität	80
4.6.6	Zusammenfassung	82
4.7	Charakterisierung antioxidativer Effekte von PPIs in einem Modell für oxidativen Stress	82
4.7.1	Konzentrationsabhängiger Effekt von Lansoprazol und Omeprazol in Endothelzellen	83
4.7.2	Konzentrationsabhängiger Effekt von Lansoprazol und Omeprazol in Makrophagen	84
4.7.3	Zeitabhängiger Effekt von Omeprazol in Makrophagen	86
4.7.4	Einfluss des HO-1-Produktes Bilirubin in Makrophagen	87
4.7.5	Einfluss eines HO-Inhibitors auf die antioxidativen Effekte der PPIs in Makrophagen	87
4.7.6	Zusammenfassung	89
4.8	CO-Produktion in verschiedenen Geweben der Maus nach Omeprazolapplikation	89
4.8.1	Orale Applikation von Omeprazol	89
4.8.2	Intraperitoneale Applikation von Omeprazol	90
4.8.3	Zusammenfassung	91
5	DISKUSSION	92
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	107
7	LITERATURVERZEICHNIS	109
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	132
8.1	Originalarbeiten	132
8.2	In Kurzform publizierte Vorträge und Poster (<i>Abstracts</i>)	132
9	DANKSAGUNG	133

Abkürzungsverzeichnis

Act D	Actinomycin D
Akt/PKB	Proteinkinase B
AP-1	Aktivator-Protein 1
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
AREs	<i>Antioxidant response elements</i>
BL	Biolumineszenz
BLI	<i>Bioluminescent imaging</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BVR	Biliverdinreduktase
b-ZIP	<i>Basic-leucin-zipper</i>
CBP	<i>cAMP-responsive element binding protein</i>
CdCl ₂	Cadmiumchlorid
cGMP	Cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CHX	Cycloheximid
CISK	<i>Cytokine independent survival kinase</i>
CK2	Casein-Kinase 2
CNC	<i>Cap'n'Collar</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX	Cyclooxygenase(n)
CrMP	Chrom-Mesoporphyrin IX
CYP	Cytochrom-P
Cys	Cystein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNCB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EpRE	<i>Electrophile response element</i>
FVB	Friend Virus B
GERD	<i>Gastroesophagale reflux disease</i>
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂	Histaminrezeptor 2
H ⁺ /K ⁺ -ATPase	Hydrogen/Kalium-Adenosintriphosphatase
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HO	Hämoxygenase
H. pylori	<i>Helicobacter pylori</i>
HSF-1	<i>Heat shock-factor 1</i>
HsP32	Hitzeschockprotein 32
IGF	<i>Insulin-like-growth factor</i>
IL	Interleukin
IRE	<i>Iron response elements</i>
IRPs	<i>Iron regulatory proteins</i>
kb	Kilobase
Keap1	<i>Kelch-like erythroid-derived CNC homology-associating protein 1</i>
KG	Körpergewicht
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LCK	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LDH	Lactatdehydrogenase

LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
L-NAME	<i>N^G-Nitro-L-arginin-methylester</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
Maf	<i>Mucosuloaponeurotic fibrosarcoma</i>
MARES	<i>Maf recognition elements</i>
MAPK	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase</i>
mHO-1	<i>murine HO-1</i>
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propansulfonsäure</i>
NADPH	<i>Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NSAIDs	<i>Nonsteroidal antiinflammatory drugs</i>
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i>
Nrf2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
P70SK	<i>p70-S6-Kinase</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung</i>
PDK1	<i>Phosphatidylinositol-3-phosphate dependend kinase 1</i>
PDT	<i>Photodynamic therapy</i>
PG	<i>Prostaglandin</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PIP	<i>Phosphatidylinositolphosphat</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-3,4-diphosphat</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear neutrophils</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonylfluorid</i>
PPI	<i>Protonenpumpeninhibitor</i>
Ref-1	<i>Redox effector factor 1</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Rounds per minutes</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SDS	<i>Natriumlaurylsulfat</i>
SDS-Page	<i>Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
SOD	<i>Superoxiddismutase</i>
SSC	<i>Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung</i>
StREs	<i>Stress-Response-Elements</i>
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA-Puffer</i>
TGF-β1	<i>Transforming growth factor β1</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin</i>
TNF-α	<i>Tumornekrosefaktor-alpha</i>
Tris	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
TRX	<i>Thioredoxin</i>
TRXr	<i>Thioredoxin-Reduktase</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>

1 Einleitung

1.1 Protonenpumpeninhibitoren

Vor knapp 20 Jahren wurde mit Omeprazol der erste Protonenpumpeninhibitor (PPI) zur Behandlung säureinduzierter Erkrankungen eingeführt. Seither gelten die PPIs mit einer starken und lang anhaltenden Inhibition der Säuresekretion als Mittel der Wahl in der Ulkus- und Gastritistherapie, bei der Behandlung von Refluxkrankheiten sowie zur Eradikation von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Sachs et al. 1995; Stedman et al. 2000).

1.1.1 Eigenschaften der PPIs

Derzeit befinden sich mit Omeprazol, Esomeprazol, Pantoprazol, Lansoprazol und Rabeprazol fünf PPIs auf dem deutschen Arzneimittelmarkt. Alle PPIs sind substituierte Benzimidazolderivate. Als *Prodrugs* akkumulieren sie in den Parietalzellen des Magens. In deren Canaliculi findet die säurekatalysierte Umlagerung zunächst über eine instabile Spiro-Zwischenverbindung zur Sulfensäure und dann weiter unter Wasserabspaltung zur Wirkform, einem Sulfenamid, statt (Abb. 1) (Sachs et al. 2007). Es kommt zu einer selektiven, irreversiblen Hemmung der Protonenpumpe durch Ausbildung kovalenter Disulfidbrücken zwischen dem kationischen Sulfenamid und Cysteinresten an der α -Untereinheit der Hydrogen/Kalium-Adenosintri-phosphatase (H^+/K^+ -ATPase) (Sachs et al. 1995). Erst durch Neusynthese der H^+/K^+ -ATPase kann der Mechanismus der Säureproduktion regeneriert werden. Dies nimmt einen Zeitraum von ca. 50 Stunden in Anspruch, wodurch eine lang anhaltende pH-Wert-Erhöhung im Magenlumen gewährleistet wird. Die PPIs binden bevorzugt an Cystein (Cys) 813 der H^+/K^+ -ATPase am luminalen *loop* zwischen den transmembranären Domänen 5 und 6 (Abb. 2). Es können aber auch weitere kovalente Bindungen mit anderen Cysteinresten eingegangen werden. Dabei unterscheiden sich die einzelnen PPIs in ihrer Präferenz. Pantoprazol bindet auch an das benachbarte Cys 822, Omeprazol an Cys 892, während Lansoprazol und Rabeprazol beide an Cys 892 und Cys 321 binden (Besancon et al. 1997). Die schwachen Basen werden bei einem in den Canaliculi vorherrschenden pH-Wert von 0,8 vornehmlich am Stickstoff des Pyridinringes protoniert. Alle PPIs besitzen einen pK_a -Wert kleiner als 4,5 und müssen aufgrund ihrer Säureinstabilität in einer magensaftresistenten Arzneiform verabreicht werden (Stedman et al. 2000). Nach der Applikation werden die lipophilen Substanzen im Duodenum resorbiert, auf dem Blutweg im Organismus verteilt und gelangen so schließlich zu ihrem Wirkort, den Belegzellen der Magenschleimhaut. Allgemein haben alle PPIs kurze Halbwertzeiten und eine gute orale Bioverfügbarkeit, welche unter den verschiedenen Substanzen z.T. leicht variiert. Bei Omeprazol und Esomeprazol kann nach einer initialen Bioverfügbarkeit von 25% bis 40% ein Anstieg auf ca. 50% bis 70% nach fünf Tagen verzeichnet werden. Die Bioverfügbarkeit von Lansoprazol und Pantoprazol liegt konstant bei etwa 80% (Klotz 2005).

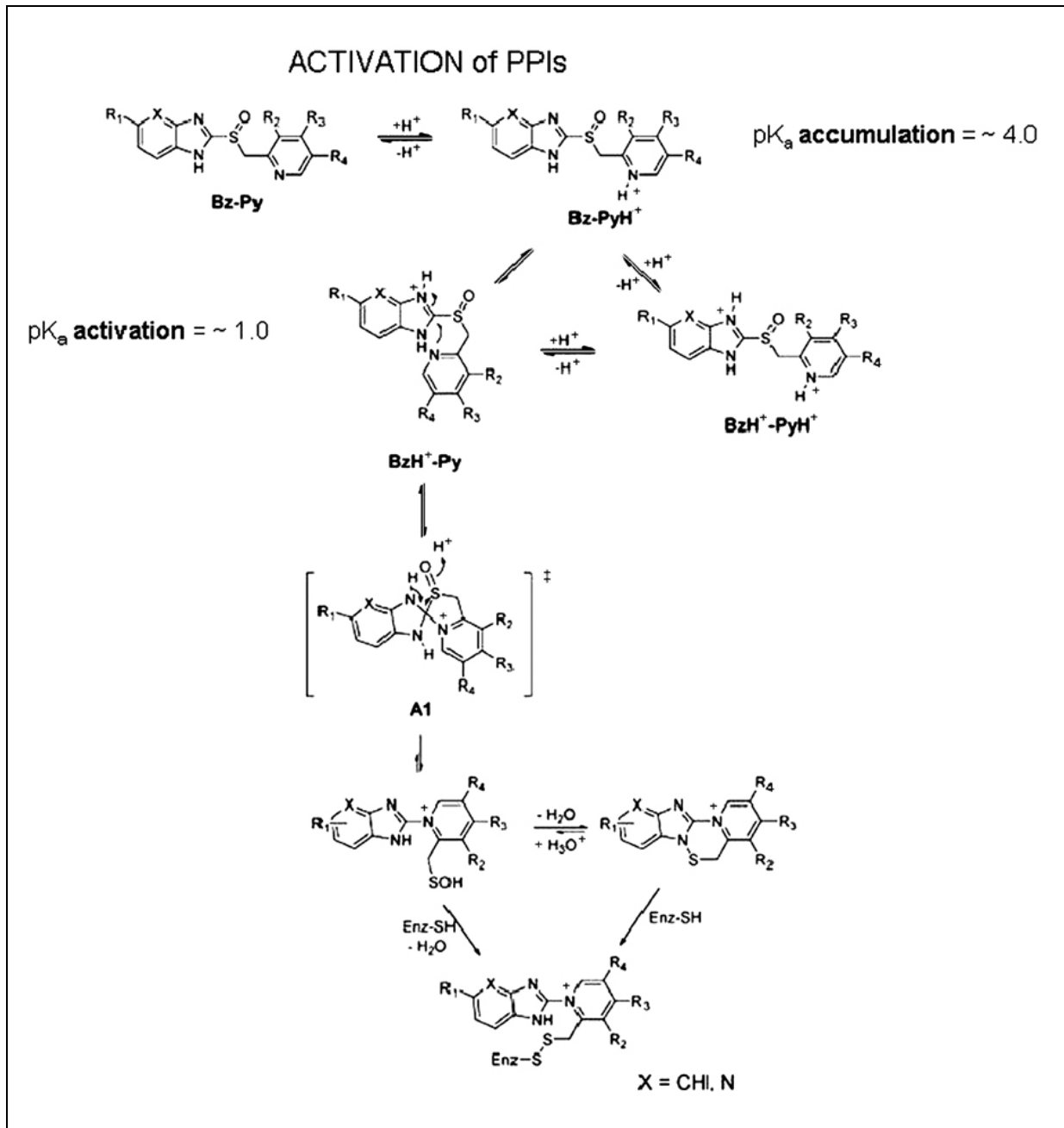


Abbildung 1: Säurekatalysierte Aktivierung der PPIs zur Wirkform (Abb. entnommen aus: Sachs et al. 2007): Zunächst erfolgt die Protonierung des Pyridinringes, wodurch die Akkumulation im Canaliculus-Lumen begünstigt wird. Durch den in den Canaliculi vorherrschenden pH-Wert unter 1,0 erfolgt die Protonierung der Imidazolgruppe und der anschließende Ringschluss zur Spiro-Zwischenverbindung (A1). Diese Spiro-Verbindung ist instabil und lagert sich zur Sulfensäure um. Die Sulfensäure ist sehr thiophil und kann entweder eine kovalente Bindung mit der SH-Gruppe von Cystein eingehen oder unter Wasserabspaltung zum Sulfenamid reagieren, welches ebenfalls kovalent an Cystein bindet.

Gemein ist den PPIs weiterhin die rasche hepatische Eliminierung, welche durch die Cytochrom-P-450 Enzyme (CYP) CYP2C19 sowie zum geringeren Teil durch CYP3A4 katalysiert wird. Signifikante Unterschiede hinsichtlich des klinischen Wirkprofils bzw. des säurereduzierenden Potentials der verschiedenen PPIs zeigen sich kaum (Verdu et al. 1994; Timmer et al. 1995; Hartmann et al. 1996; Florent et al. 1997; Tolman et al. 1997;

Williams et al. 1998). Einige Studien lassen zwar einen Vorteil von Lansoprazol 30 mg/Tag gegenüber Pantoprazol 40 mg/Tag (Florent et al. 1997) sowie einen Vorteil von Rabeprazol 20 mg/Tag gegenüber Omeprazol 20 mg/Tag (Williams et al. 1998) vermuten. Um von einer signifikanten Überlegenheit zu sprechen, sind jedoch weitere Studien erforderlich. Eine Metaanalyse von Klok und Mitarbeitern deutet darauf hin, dass sich die genannten Unterschiede v.a. durch die verschiedenen Einnahmedosen begründen lassen. Prinzipiell kann man davon ausgehen, dass bei identischer Dosierung der einzelnen PPIs die Effektivität einer pH-Wert-Erhöhung für alle PPIs gleich wäre (Klok et al. 2003). In der Eradikationstherapie von *H. pylori* treten auch bei unterschiedlichen Einnahmedosen keine signifikanten Unterschiede auf (Pipkin et al. 1998; Spinzi et al. 1998). Gesichert ist jedoch, dass die Prazole einen deutlichen Vorteil bei der Therapie säurebedingter Erkrankungen gegenüber H_2 -Antihistaminika sowie den häufig angewendeten Antazida aufweisen (Hawkey et al. 1993; Gisbert et al. 2001; Salas et al. 2002).

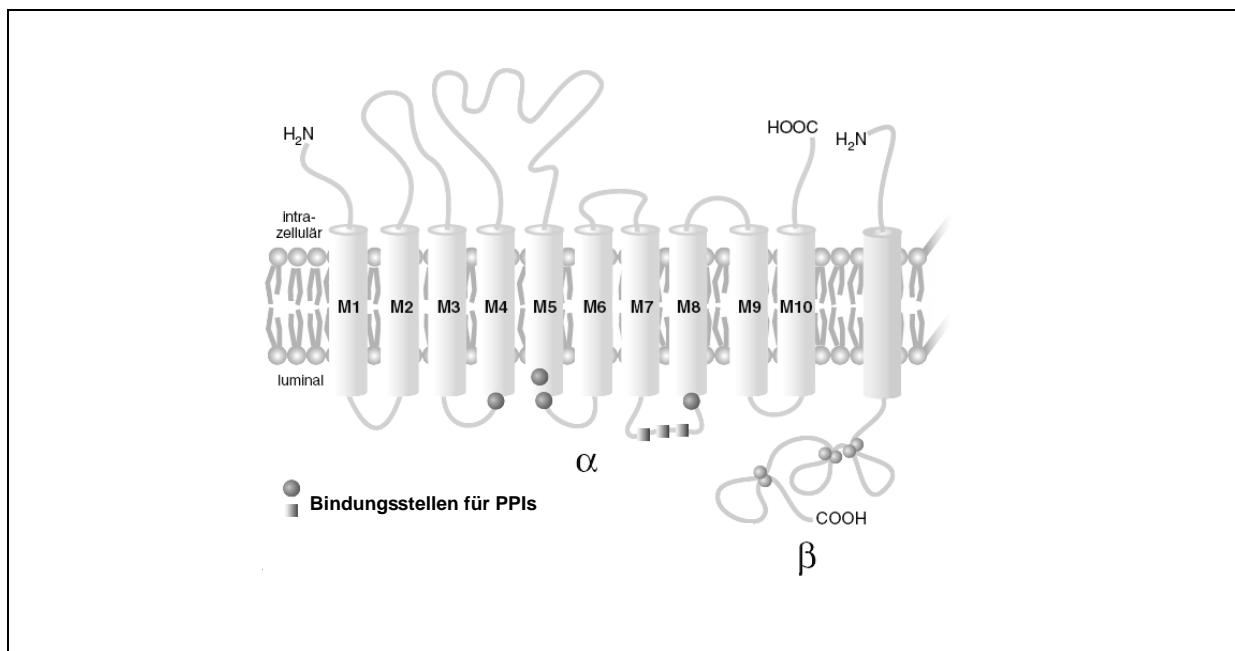


Abbildung 2: Struktur der H⁺/K⁺-ATPase mit PPI-Bindungsstellen (Schubert-Zsilavec et al. 2005): Die H⁺/K⁺-ATPase besteht aus einer α- und einer β-Untereinheit. In der α-Untereinheit, welche aus 10 transmembranären Domänen (M1-M10) besteht, befindet sich das katalytische Zentrum. Die kationische Wirkform der PPIs, das Sulfenamid, bindet bevorzugt an Cys 813 an der luminalen Seite der H⁺/K⁺-ATPase zwischen M5 und M6.

1.1.2 Pleiotrope Effekte der PPIs

In der Vergangenheit wurde mehrfach gezeigt, dass der deutliche Vorteil von Prazolen bei der Behandlung von Ulzerationen und Refluxerkrankungen sowie in besonderem Maße bei der Protektion der Magenschleimhaut gegenüber Schädigungen durch NSAIDs (*Nonsteroidal antiinflammatory drugs*) nicht alleine mit der effektiven Säurehemmung begründet werden kann (Blandizzi et al. 1999; Natale et al. 2004; Pozzoli et al. 2007). Säureunabhängige, gastroprotektive Effekte, denen vermutlich antioxidative, radikalsenkende Wirkmechanismen zugrunde liegen, geraten zunehmend in den Fokus

der Untersuchungen (Lapenna et al. 1996; Suzuki et al. 1996; Biswas et al. 2003). Inwieweit es sich dabei um direkte oder indirekte antioxidative Effekte handelt sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen werden kontrovers diskutiert und untersucht. Die Arbeitsgruppe um Wandall postulierte, dass Omeprazol die Aktivierung und Degranulation von polymorphonukleären Granulozyten (PMN) und somit deren O_2^- Generation unterbinden kann, was auf antiinflammatorische Aktivität schließen lässt (Wandall 1992). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Suzuki und Mitarbeiter bei Untersuchungen mit Lansoprazol, welche zeigten, dass auch Lansoprazol in der Lage ist, die Akkumulation von Neutrophilen und somit eine Freisetzung toxischer Metabolite zu inhibieren (Suzuki et al. 1995). Studien von Blandizzi und Mitarbeiter festigten die These, dass die Effizienz der PPIs nicht ausschließlich im antisekretorischen Wirkmechanismus begründet liegt, sondern vielmehr verschiedene, gastroprotektive Mechanismen für die Überlegenheit der PPIs verantwortlich sind. Diese gastroprotektiven Eigenschaften werden v.a. auf eine verminderte Lipidperoxidation und Proteinoxidation sowie eine erhöhte Verfügbarkeit von sulfhydrylhaltigen Verbindungen wie Glutathion zurückgeführt (Blandizzi et al. 1999; Natale et al. 2004; Blandizzi et al. 2005). In anderen Studien wird weniger der Einfluss auf die Glutathionspiegel, sondern eine erhöhte Aktivität der Cu/Zn-Superoxiddismutase in den Vordergrund gestellt (Koch et al. 2002; Koch et al. 2004). Kontrovers bleibt weiterhin die Rolle der Prostaglandine bei der PPI-vermittelten Gastroprotektion. Tsuji und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine 14tägige, hochdosierte PPI-Gabe eine gesteigerte Cyclooxygenase (COX)-2-Expression und Prostaglandinfreisetzung in der Rattenmukosa bewirkt (Tsuji et al. 2002). Andere Arbeitsgruppen konnten in ihren Untersuchungen jedoch keinen Zusammenhang zwischen PPI-Applikation und Prostaglandinsynthese feststellen (Natale et al. 2004; Blandizzi et al. 2005). Weiterhin ist eine Hemmung der Translokation und Aktivierung von NF κ B (Nuclear Factor κ B), die zu einer unterdrückten Produktion von Interleukin(IL)-8 und somit zu einer verminderten Migration und Endotheladhäsion von PMN führt (Handa et al. 2006), in der Diskussion. Als gesichert gilt, dass bei Ulzeration und Gastriden neben dem erhöhten Säuretonus oxidative Gefäßschädigungen eine entscheidende Rolle in der Entzündungskaskade spielen (Vaananen et al. 1991; Yamada et al. 1991; Davies et al. 1994; Bandyopadhyay et al. 2001). Prazole sind in der Therapie säurebedingter Magenerkrankungen Mittel der 1. Wahl und zeigen einen deutlichen Therapievorteil gegenüber anderen antisekretorischen Medikamenten auf. Die Ursache dafür könnte, neben einer starken und lang anhaltenden Säurehemmung, die Induktion antioxidativer und antiinflammatorischer Mechanismen sein. Es wird sowohl von direkten als auch von indirekten Effekten ausgegangen, wobei die detaillierten Zusammenhänge und Regulationswege noch nicht vollständig geklärt sind (Biswas et al. 2003; Agnihotri et al. 2007).

1.1.3 Omeprazol

Omeprazol (Abb. 3A) gilt als Leitsubstanz für die Gruppe der PPIs und wurde nach seiner Erstsynthese 1978 unter dem Namen Losec[®] 1988 auf dem europäischen Arzneimittelmarkt zugelassen. Als der Klassenvertreter mit dem höchsten Erfahrungswert wird Omeprazol bei der Therapie von gastroösophagealen Refluxerkrankungen (GERD), peptischen Ulzera und zur Eradikation von *H. pylori* in den Standarddosierungen von 20 mg/Tag und 40 mg/Tag erfolgreich eingesetzt. Es ist wie alle Substanzen dieser Klasse ein substituiertes Benzimidazol mit einem pK_a von 3,97. Initial fällt die Bioverfügbarkeit von Omeprazol mit 25% bis 40% geringer aus als die der meisten anderen PPIs. Einer nichtlinearen Kinetik folgend, steigt die Bioverfügbarkeit nach etwa fünf Tagen jedoch auf ca. 50% bis 70% an (Andersson et al. 1990; Tolman et al. 1997). Die Metabolisierung erfolgt wie bei allen Prazolen hepatisch über verschiedene CYP-450-Isoenzyme. Ein Teil der Verstoffwechslung erfolgt über CYP3A4 zu 3-Hydroxymethyl- und Sulfonyl-derivaten. Größere Bedeutung hat jedoch der Abbau über CYP2C19 zu 5-Desmethyl- und insbesondere zu 5-Hydroxymethylderivaten. Interessanterweise zeichnet sich die Metabolisierung von Omeprazol durch eine stereoselektive Differenzierung aus. Das (*S*)-Enantiomer Esomeprazol wird vornehmlich zum Sulfonyl- sowie zum 5-Desmethylderivat umgesetzt. Die Entstehung des 5-Hydroxymethylderivates durch CYP2C19 wird dagegen beim (*R*)-Enantiomer favorisiert (Äbelö et al. 2000). Prinzipiell ist Omeprazol (v.a. das (*R*)-Enantiomer) das Prazol, welches am stärksten durch CYP2C19 umgesetzt wird (Klotz 2005). Das Risiko für schwere unerwünschte Arzneimittelwirkungen ist allgemein als sehr gering einzustufen (Stedman et al. 2000). Neben Hepatitis und Nephritis wurde für Omeprazol ein vermehrtes Auftreten von Sehstörungen diskutiert. Eine Kohortenstudie von Garcia Rodriguez und Mitarbeitern verglich Omeprazol mit vier unterschiedlichen H₂-Antihistaminika. Dabei wurde kein erhöhtes Risiko von Omeprazol für vaskuläre oder entzündliche Erkrankungen am Auge im Vergleich zu den untersuchten Antihistaminika festgestellt (Garcia Rodriguez et al. 1996). Allgemein werden die Konsequenzen einer anhaltenden Hypergastrinämie, als Gegenregulationsmechanismus einer konstanten pH-Wert-Erniedrigung durch Prazole, diskutiert und bedürfen weiterer Untersuchungen (Yeomans et al. 2000; Lamberts et al. 2001; Jensen 2006).

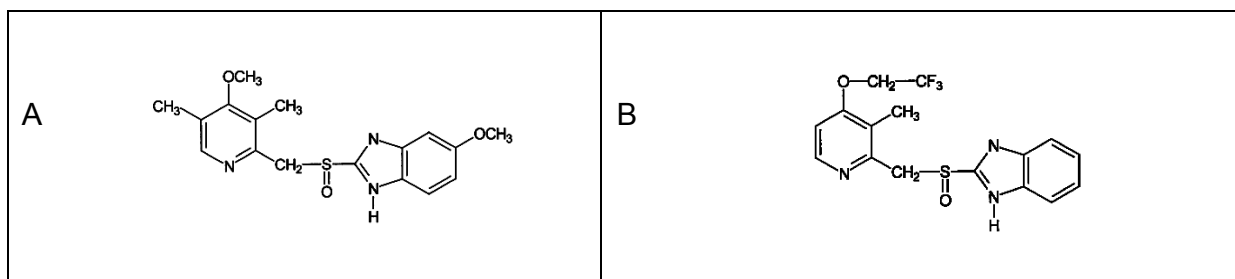


Abbildung 3: Strukturen von Omeprazol (A) und Lansoprazol (B).

1.1.4 Lansoprazol

Nach der erfolgreichen Markteinführung von Omeprazol folgten 1993 Pantoprazol und Lansoprazol (Abb. 3B) als weitere Vertreter dieser Arzneistoffklasse. Das Grundgerüst ist auch hier ein Benzimidazol mit einer Sulfoxidstruktur. Durch die Einführung von drei Fluoratomen als Substituenten am Pyridinring erhöht sich die Lipophilie von Lansoprazol gegenüber Omeprazol. Der pK_a Wert von 4,01 ist mit dem von Omeprazol vergleichbar. Deutliche Unterschiede zeigen sich jedoch in der Kinetik. Einer Dosislinearität folgend liegt die Bioverfügbarkeit von Lansoprazol konstant zwischen 80-91% (Landes et al. 1995; Gerloff et al. 1996). Bei der Metabolisierung werden beide Enantiomere bevorzugt durch CYP2C19 und nur in geringerem Maße durch CYP3A4 abgebaut. Auch hier zeigt sich eine stereoselektive Präferenz des CYP2C19-Enzyms, wobei es für eine vollständige Klärung noch weiterer Studien bedarf. Die Arbeitsgruppe von Katsuki postuliert z.B., dass eine stereoselektive Metabolisierung v.a. durch CYP3A4 vermittelt wird (Katsuki et al. 2001). Aktuellere Studien lassen jedoch einen intensiveren Abbau des (*S*)-Enantiomeres gegenüber dem (*R*)-Enantiomer durch CYP2C19 mittels Hydroxylierung vermuten. Der Einsatz von reinem (*R*)-Lansoprazol wäre demnach mit einem höheren klinischen Nutzen verbunden (Kim et al. 2003; Miura 2006). Interessanterweise unterscheidet sich somit die Metabolisierung der jeweiligen (*S*)- und (*R*)-Enantiomere von Omeprazol und Lansoprazol hinsichtlich ihrer Stereoselektivität. Lansoprazol wird bei der Therapie von peptischen Ulzerationen, Refluxerkrankungen sowie zur Eradikation von *H. pylori* in den Standarddosierungen von 15 mg/Tag, 30 mg/Tag bzw. 60 mg/Tag erfolgreich eingesetzt. Das Wechselwirkungs- und Nebenwirkungsprofil ist mit dem von Omeprazol vergleichbar, wobei die Datenlage ein etwas geringeres Auftreten von Nephritis sowie von Sehstörungen aufzeigt (Stedman et al. 2000).

1.2 Die Magenschleimhaut – Protektion und Schädigung

1.2.1 Schutzmechanismen der Magenschleimhaut

Aufgrund der physiologischen Funktion des Magens ist seine Schleimhaut einer Vielzahl aggressiver Faktoren ausgesetzt. Dazu zählen neben schädigenden Agenzien und bakteriellen Keimen auch eine permanente Belastung mit stark unterschiedlichen pH-Werten, Osmolaritäts- und Temperaturbedingungen. Der Begriff Mukosabarriere („*mucosal defense*“) bezeichnet ein komplexes System aus protektiven Mechanismen der Magenschleimhaut, welches einer Schädigung entgegen wirkt (Wallace et al. 1996). Wallace und Granger postulieren verschiedene Komponenten, die im Zusammenspiel die Protektion der Magenschleimhaut bewirken. Die erste Stufe dieses Netzwerkes besteht in der Sekretion von Säure, Muzin, Bikarbonat, antibakteriellen Substanzen (Immunoglobulinen und Lactoferrin) sowie von oberflächenaktiven Phospholipiden. Sowohl die Säure als auch die zähe Schleim-Bikarbonat-Schicht limitieren das Eindringen von antigenem Material ins Intestinum. Oberflächenaktive Phospholipide

halten die Oberfläche hydrophob und fungieren gemeinsam mit Schleim und Bikarbonat als Barriere der Epithelschicht gegenüber der Salzsäure im Magenlumen.

Zweiter „Schutzschild“ ist das Oberflächenepithel, welches in der Lage ist, auf Störungen und Verletzung mit spontan aktivierbaren Mechanismen zur Selbstregeneration zu reagieren. Dieser Prozess ist durch die Migration intakter Epithelzellen aus tieferen Schichten gekennzeichnet (Paimela et al. 1995). Darüber hinaus unterliegt die Epithelschicht, mit einer „turnover“ Zeit von 2-4 Tagen (Wallace et al. 1996), raschen Erneuerungsmechanismen und zeigt eine außergewöhnliche Widerstandsfähigkeit gegenüber niedrigen pH-Werten (Sanders et al. 1985).

Dritter Abwehrmechanismus ist das als gastrale Mikrozirkulation bezeichnete Blutgefäßsystem. Generell dient es zur Gewebeversorgung mit Nährstoffen, Sauerstoff und Bikarbonat. Ein durch Schädigung bedingter Rückstrom von aggressiven Faktoren in den subepithelialen Raum resultiert in einer neural vermittelten Beschleunigung des mukosalen Blutflusses. Diese reaktive Hyperämie ermöglicht die Abpufferung der Säure, den Abtransport von Toxinen und die Versorgung von Wundheilungsprozessen mit Plasma (Holzer et al. 1986; Wallace et al. 1996).

Auch das mukosale Immunsystem dient der Mukosaprotektion. Mastzellen und Makrophagen signalisieren das Eindringen von Antigenen und Endotoxinen und setzen Mediatoren frei, welche eine lokale Entzündungsreaktion des Organismus hervorrufen.

Bei Verletzung bzw. Ulzeration der Magenschleimhaut wird ein weiterer Schutzmechanismus aktiviert. Das geschädigte Gewebe induziert Reparaturmechanismen, die durch Zellwachstum, Angiogenese neuer Blutgefäße und Re-Innervierung der Mukosa mit extrinsischen und intrinsischen Nerven gekennzeichnet sind (Wallace et al. 2001).

Als wichtige Mediatoren mukosaprotektiver Prozesse fungieren die Prostaglandine. Zum einen stimulieren sie die Sekretion von Schleim und Bikarbonat und sind an der Regulation der gastralen Mikrozirkulation beteiligt, zum anderen kontrollieren sie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und hemmen die Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten sowie deren Migration in das Gefäßendothel der gastralen Mikrozirkulation.

Ein weiterer Mediator mit Protektionsfunktion ist Stickstoffmonoxid (NO), das größtenteils in Synergie mit den Prostaglandinen wirkt. NO stimuliert über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase die Produktion von Schleim und Bikarbonat und ist somit für die gastrale Mikrozirkulation von Relevanz (Lippe et al. 1992; Brown et al. 1993). Darüber hinaus kann NO auch als Modulator von Wundheilungsprozessen, von Entzündungsprozessen und der unspezifischen Immunabwehr agieren.

1.2.2 Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies in der Pathogenese gastroduodenaler Ulzerationen

Nach wie vor gilt bei der Entstehung von gastralen Ulzerationen und Refluxerkrankungen das Diktum: „*no acid, no ulcer*“ (Syha et al. 2005). Allerdings lässt die Tatsache, dass bei einer Vielzahl der Patienten mit gastralen Ulzerationen keine erhöhten Säurespiegel auftreten, eine Beteiligung säureunabhängiger Faktoren in der Pathogenese gastroduodenaler Ulzerationen vermuten (Biswas et al. 2003). Die Störung des sensiblen

Gleichgewichtes zwischen gastroprotektiven und aggressiven Faktoren wird heute allgemein als Ursache für die Ulkuserstehung angesehen. Im Gegensatz zur Mukosabarriere ist das komplexe System an schädigenden Faktoren sowie ihr Zusammenspiel noch nicht vollständig geklärt. Die deletäre Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die Magenmukosa scheint bei der Ausbildung von Schleimhauterosionen und -läsionen durch NSAIDs oder durch die Besiedlung des Magens mit *H. pylori* sowie in der Pathogenese von Stressulzerationen und Refluxösophagitiden von entscheidender Bedeutung zu sein (Langman et al. 1991; Das et al. 1997; Jung et al. 2001; Oh et al. 2001b). Durch Pylorusverschluss oder Stress induzierte Ulzerationen bei Ratten zeigten unveränderte bzw. verminderte Säurespiegel (Hayase et al. 1986; Das et al. 1993). Die Applikation von Antazida schützt interessanterweise nicht vor der Entstehung eines Stressulkus (Cho et al. 1979). Darüber hinaus wurden als signifikante Parameter einer Hydroxylradikal-induzierten Membranschädigung bei Stressulzerationen erhöhte Lipidperoxidation, erhöhte Proteinoxidation sowie verminderte Glutathionspiegel beobachtet (Das et al. 1993; Das et al. 1997; Das et al. 1998). Der verminderte Schutz der Mukosa durch die Hemmung der Prostaglandinsynthese ist u.a. ausschlaggebend für die Entstehung von NSAID-induzierten Mukoseschädigungen. Des Weiteren ist die Entkopplung mitochondrialer oxidativer Phosphorylierungen in dessen Folge es zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität kommt (Somasundaram et al. 2000), der aggressive Angriff von Gallensäure und Bakterien sowie die Aktivierung von Neutrophilen in der Pathogenese von NSAID-bedingten Ulzerationen von entscheidender Relevanz. Eine kritische Rolle nehmen dabei v.a. die aktivierten Neutrophilen ein, welche in das intestinale Gewebe einfallen und dort schädigende ROS produzieren (Yamada et al. 1991; Basivireddy et al. 2002). Im Zusammenhang mit *H. pylori*-Infektionen konnte z.B. eine vermehrte ROS-Produktion, eine Verminderung gastraler Antioxidantien und eine damit verbundene, ausgeprägte Gewebeschädigungen gezeigt werden (Jung et al. 2001). In Studien von Wetscher und Mitarbeitern wurde der Beweis erbracht, dass Mukosaschäden bei Refluxösophagitis durch ROS vermittelt werden und die Gabe von verschiedenen Radikalfängern ösophagale Mukosaläsionen verhindern kann (Wetscher et al. 1995a; Wetscher et al. 1995b; Wetscher et al. 1995c). Darüber hinaus konnte in humanen Studien vor kurzem gezeigt werden, dass gastrale Ulzerationen im Zusammenhang mit Hydroxylradikal-vermittelten oxidativen Schädigungen der Membranlipide und -proteine sowie verminderten Glutathionspiegeln stehen (Bhattacharjee et al. 2002). Das stark reaktive Hydroxylradikal wird im Verlauf der Haber-Weiss-Reaktion durch Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit dem Superoxidradikal gebildet.



Metallionen, v.a. zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}), katalysieren diese Reaktion (Leibovitz et al. 1980). Neben der zelltoxischen Wirkung von ROS durch z.T. irreversible Oxidation von Nucleinsäuren, Lipiden und Proteinen, spielen sie auch bei der unspezifischen zellulären Immunantwort, bei Entzündungsprozessen und bei der Apoptose eine entscheidende Rolle (Bellavite 1988; Stadtman et al. 1997; Morita 2005). Verschiedene Studien zeigen, dass bei gastralen Ulzerationen, hervorgerufen durch Stress, Indomethacin, Ethanol und

H. pylori, eine erhöhte Apoptoserate auftritt. Besondere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang oxidative Schädigungen der DNA durch ROS (Konturek et al. 1999; Fuji et al. 2000; Watanabe et al. 2000).

1.2.3 Gastrointestinale und kardiovaskuläre Risiken von NSAIDs

Abgesehen von einer möglichen ROS-Beteiligung liegt die gastrointestinale Toxizität der NSAIDs v.a. in der Blockade der COX-1 und einer damit unterbundenen Synthese von zytoprotektiven Prostaglandinen wie PGE₂ und Prostazyklin begründet (Schoen et al. 1989; Soll et al. 1991; Wolfe et al. 1999). Der PGE₂-Mangel bewirkt eine vermehrte Magensäurebildung und eine verminderte Muzinproduktion. Schädigende Noxen können die Schleimhaut somit ungehindert angreifen. Darüber hinaus beeinträchtigt der Mangel an vasodilatierendem Prostazyklin die mukosale Mikrozirkulation (Wolfe et al. 1999; Hawkey et al. 2003).

Die unerwünschten Nebenwirkungen der NSAIDs auf die Magenmukosa führten zur Entwicklung selektiver Inhibitoren der bei Schmerz und Entzündungen vermehrt exprimierten COX-2. Obwohl sich zunächst ein therapeutischer Vorteil der sogenannten COXibe gegenüber den konventionellen, unselektiven COX-Inhibitoren vermuten ließ (Bombardier et al. 2000; Silverstein et al. 2000), ist heute sowohl deren gastrointestinale Überlegenheit als auch die Sicherheit und Unbedenklichkeit hinsichtlich kardiovaskulärer Risiken umstritten. Die CLASS-Studie („*Celecoxib long term arthritis safety study*“) zeigte, dass der COX-2-Hemmer Celecoxib weniger häufig gastrointestinale Nebenwirkungen verursachte als herkömmliche NSAIDs wie Ibuprofen. Allerdings wurden die Schlussfolgerungen der CLASS-Studie von Jüni und Mitarbeitern in Frage gestellt (Jüni et al. 2002). Bei Auswertung der Langzeitdaten (12 Monate) im Vergleich zu den 6 Monatsdaten der Studie war für Celecoxib kein signifikanter gastrointestinaler Vorteil zu beobachten. In der VIGOR-Studie betrug die Inzidenz von Ulzerationen und gastrointestinalen Komplikationen bei Rofecoxib 2,1% gegenüber Naproxen mit 4,5%. Schwere kardiovaskuläre Ereignisse einschließlich Myokardinfarkt traten unter Rofecoxibeinnahme jedoch häufiger auf als unter Naproxeneinnahme (Mukherjee et al. 2001) und führten im Jahre 2004 zur Marktrücknahme von Rofecoxib. In der CLASS-Studie zeigten sich keine erhöhten kardiovaskulären Risiken. Dieser Unterschied zwischen den beiden Studien könnte dadurch bedingt gewesen sein, dass bei der VIGOR-Studie jegliche Einnahme von ASS ausgeschlossen war. Im Gegensatz hierzu wurde den Studienteilnehmern in der CLASS-Studie die Einnahme von niedrig dosiertem ASS erlaubt. Vergleiche von Rofecoxib und Celecoxib mit Placebo zeigten für beide COXibe ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Mukherjee et al. 2001).

In jüngerer Zeit wird zunehmend ein allgemein erhöhtes Herz-Kreislauf-Risiko unter NSAID-Therapie diskutiert. Eine Metaanalyse von Kearney und Mitarbeitern entwirft ein differenzierteres Bild hinsichtlich kardiovaskulärer Risiken, die mit der Einnahme von NSAIDs verbunden sind. COX-2-Inhibitoren zeigen entsprechend der Studie kein höheres Risiko als die konventionellen NSAIDs, mit der Ausnahme von Naproxen, das nicht mit einem Anstieg von kardiovaskulären Ereignissen assoziiert zu sein scheint (Kearney et al. 2006). Als Ursache für die kardiovaskulären Risiken gilt u.a. die durch den Prostazyklinmangel erhöhte Natrium- und Wasserretention in der Niere, wodurch es

zu Blutdruckerhöhung und Ödembildung kommen kann (Rainsford 1999; Hawkey et al. 2003). Die Einnahme von gering dosiertem ASS (100-300 mg/Tag) gilt als Prophylaxe gegenüber kardiovaskulären Komplikationen. Hier ist v.a. die effektive Hemmung der Thromboxan A₂-Synthese für die präventive Wirkung verantwortlich. Allerdings scheint jedoch bereits eine Dosis von 300 mg ASS/Tag das gastrointestinale Risiko zu erhöhen (Weil et al. 1995). Eine Metaanalyse der *US Preventive Service Task Force* zeigt eine Senkung der Häufigkeit von koronaren Herzkrankheiten um 28% unter ASS-Therapie für einen Einnahmezeitraum von 4-7 Jahren. Die Gesamtmortalität blieb jedoch unbeeinflusst, was u.a. mit schwerwiegenden gastrointestinalen Ereignissen begründet wird. Insbesondere bei hospitalisierten Patienten mit NSAID-bedingten Blutungen liegt die Mortalitätsrate bei 5-10% (Armstrong et al. 1987). Unter diesen Aspekten ist eine zusätzliche Gabe von ASS zur Behandlung mit selektiven COX-2-Inhibitoren oder herkömmlichen NSAIDs kritisch zu betrachten. Das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wird zwar gemindert, jedoch scheint dies mit vermehrten gastrointestinalen Komplikationen verbunden zu sein.

Eine pharmakologische Strategie, die sowohl gastroprotektiv ist als auch das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse senkt, wäre für Patienten unter einer Dauermedikation mit COX-Inhibitoren daher von großem Nutzen.

Eine Langzeitprophylaxe mit dem PG-Analogen Misoprostol beugt NSAID-induzierten Gastriden und Ulzerationen sowie Magenblutungen vor. Die Patienten-Compliance ist jedoch aufgrund der Nebenwirkungen wie Diarrhö und abdominaler Krämpfe stark eingeschränkt (Silverstein et al. 1995; Hawkey et al. 1998; Graham et al. 2002). H₂-Rezeptorantagonisten wie Ranitidin oder Famotidin haben moderat protektive Effektivität gegenüber NSAID-induzierten, duodenalen Ulzeration. Auf gastrale Ulzerationen, die unter NSAID-Therapie von größerer Problematik sind, nehmen H₂-Antagonisten keinen signifikanten Einfluss (Swift et al. 1989; Simon et al. 1994; Taha et al. 1996). Verschiedene Studien belegen den positiven Effekt einer präventiven PPI-Gabe für Patienten unter einer NSAID-Dauertherapie bei geringem Nebenwirkungsprofil und einer damit verbundenen guten Patienten-Compliance (Ekstrom et al. 1996; Cullen et al. 1998; Yeomans et al. 1998; Stupnicki et al. 2003; Lanas et al. 2006).

1.3 Das Hämoxygenase/Ferritin-System

1.3.1 Funktion und Isoformen der Hämoxygenase

Der biologische Prozess der Hämdegradation und damit die Aufgabe, das Eisen aus alternden roten Blutkörperchen zu rezyklieren, wird im Organismus durch die Hämoxygenase katalysiert. Häm nimmt einerseits als prosthetische Gruppe der essentiellen Hämproteine wie Hämoglobin, Myoglobin, CYP 450, induzierbare NO-Synthase sowie lösliche Guanylatzyklase eine ubiquitäre Schlüsselrolle in verschiedensten Enzymsystemen ein. Diese Proteine haben u.a. eine große Bedeutung für den Sauerstofftransport, bei Metabolisierungsprozessen sowie bei der Signaltransduktion. Andererseits besitzt ungebundenes Häm stark prooxidative und damit toxische Eigenschaften (Immenschuh et al. 2006). Die Hämoxygenase vermittelt mit Hilfe von NADPH und Sauerstoff die oxidative Spaltung des Protoporphyrins Häm zu

Biliverdin sowie zu äquimolaren Mengen an Kohlenmonoxid (CO) und freiem Eisen (Fe^{2+}). Im Anschluss wird Biliverdin im Säugetierorganismus durch das zytosolische Enzym Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin umgewandelt (Abb. 4). Das nur schwach wasserlösliche Bilirubin wird zum Transport reversibel an Albumin gebunden, zur Metabolisierung an Glucuronsäure konjugiert und schließlich über die Galle ausgeschieden. Gekoppelt an die Freisetzung des Häm-Eisens ist die Induktion des Eisenspeicherproteins Ferritin (siehe Kapitel 1.3.4.).

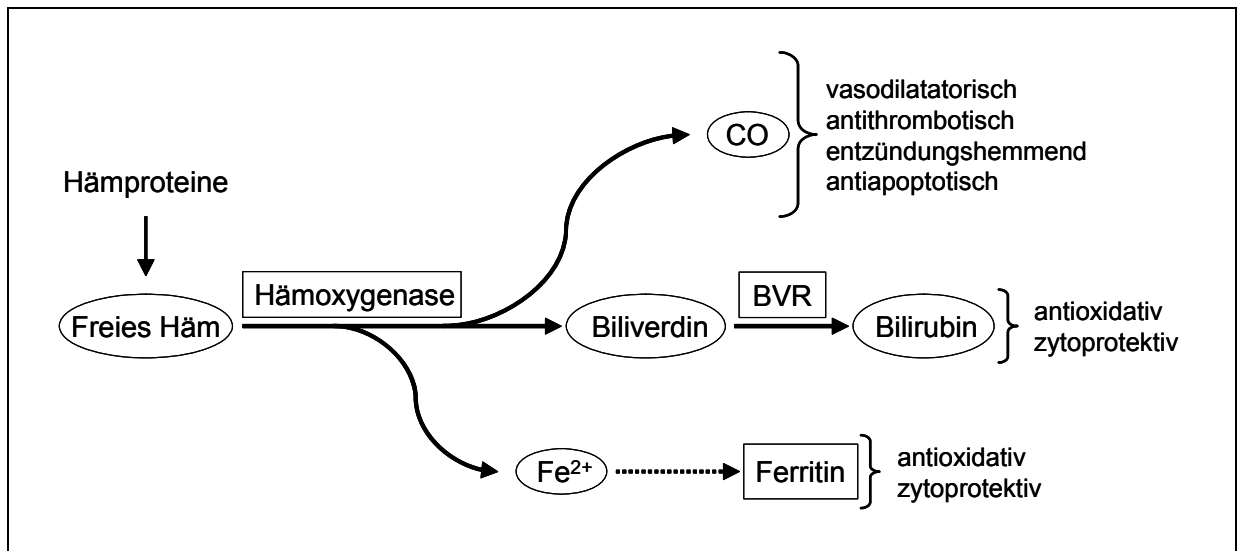


Abbildung 4: Die Hämoxxygenase-Enzymreaktion. Schematische Darstellung der Hämdegradation zu Bilirubin, Kohlenmonoxid und freiem Eisen. (BVR: Biliverdinreduktase, CO: Kohlenstoffmonoxid)

Säugetier-Hämoxxygenase ist ein membrangebundenes Enzym, das durch einen C-terminalen hydrophoben Teil an der mikrosomalen Membran verankert ist (Yoshida et al. 1991). Ein Abbau dieser C-terminalen Sequenz resultiert in einem löslichen, aber katalytisch noch aktiven Enzym. Neben dem Vorkommen in höheren Spezies, findet sich die Hämoxxygenase als lösliches Protein auch in Cyanobakterien, Algen und höheren Pflanzen (Beale et al. 1984; Abraham et al. 1988; Cornejo et al. 1998; Davis et al. 1999). Das limitierende Enzym des Häm katabolismus gehört zur Familie der Monooxygenasen und tritt in drei Isoformen auf, die alle Produkte unterschiedlicher Gene sind. Die Signifikanz der Hämoxxygenase-3 (HO-3, 33 kDa) ist noch nicht vollständig geklärt. Das Protein wird zwar exprimiert, es zeigt jedoch keine oder nur geringe katalytische Aktivität und konnte bis jetzt ausschließlich im Rattenhirn identifiziert werden. Darüber hinaus wird das HO-3-Gen als ein im Prozess der HO-2-Transkription entstandenes Pseudogen diskutiert (Hayashi et al. 2004; Maines et al. 2005). Die Hämoxxygenase Typ 2 (HO-2, 36 kDa) wird konstitutiv exprimiert und ist v.a. im zentralen Nervensystem und in den Testes vorzufinden. Die zu den Hitzeschockproteinen zählende Hämoxxygenase Typ 1 (HO-1, 32 kDa) ist durch eine Vielzahl von Stimuli induzierbar und kommt ubiquitär im Organismus vor, mit der höchsten Konzentration in Milz und Leber (Unno et al. 2007). Da in der Milz der Abbau der Erythrozyten stattfindet, kann man unter physiologischen Bedingungen davon ausgehen, dass dort die Aktivität der Hämoxxygenasen am größten ist (Otterbein et al. 2000b; Morita 2005).

1.3.2 Die HO-1-Produkte als Mediatoren protektiver Effekte

Abgesehen von ihrer primären Aufgabe des Hämabbaus, scheint die HO-1 bei der Bewältigung zellschädigender Stresssituationen von entscheidender Bedeutung zu sein. In den letzten Jahren konnten für die HO-1 eine Vielzahl antioxidativer und zellprotektiver Effekte gezeigt werden, die sich nicht allein mit der Degradation des prooxidativen, zytotoxischen Häms begründen lassen. Die antiinflammatorischen, antiapoptotischen, antiproliferativen sowie antioxidativen Eigenschaften der HO-1 werden dabei durch ihre Abbauprodukte CO, Biliverdin und Bilirubin sowie durch die substratspezifische Induktion des Eisenspeicherproteins Ferritin vermittelt.

CO ist in hohen Konzentrationen ein Atemgift, das die Bindungsstellen für Sauerstoff am Hämoglobin blockiert und somit zum Tod durch Erstickung führen kann. Trotz seiner Bedeutung als hoch toxisches Gas, konnte in vergangenen Jahren gezeigt werden, dass die endogene CO-Freisetzung von entscheidender Relevanz bei körpereigenen Regulationsmechanismen ist. In geringen Konzentrationen kann es wie NO über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase als potenter Vasodilatator agieren und somit Einfluss auf die Regulierung des Gefäßmuskeltonus nehmen (Morita et al. 1995). Darüber hinaus zeigt CO neben der Funktion als Neurotransmitter im Nervensystem (Snyder et al. 1998) auch antiinflammatorische Eigenschaften. Dies lässt sich zunächst durch die Hemmung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β) und der im Gegenzug gesteigerten Produktion des antiinflammatorischen IL-10 erklären. Hemmung der Plättchenaggregation, verminderte Expression des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors Typ 1 (PAI-1) sowie antiapoptotische Eigenschaften, die in verschiedensten Zellmodellen gezeigt werden konnten, sind weitere antiinflammatorische Wirkmechanismen von CO. Die antiproliferativen Effekte von CO werden v.a. durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase sowie der p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase, MAPK) vermittelt (Otterbein et al. 2003a; Ryter et al. 2007). Als Summe dieser Eigenschaften wird CO *in vivo* mit protektiven Effekten bei vaskulären Erkrankungen, Hyperoxieverursachten Lungenschäden, Transplantationen und Fibrose assoziiert (Otterbein et al. 2003b; Kim et al. 2005; Zhou et al. 2005).

Interessanterweise zeigt auch Bilirubin, als weiteres Stoffwechselprodukt des Hämatabolismus, ein Janusgesicht. Einerseits ist Bilirubin seit langer Zeit als potentiell toxische Substanz bekannt, die im Serum Neugeborener akkumuliert und Gelbsucht verursachen kann. Unkonjugiertes Bilirubin ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und dort in hohen Konzentrationen neurotoxisch zu wirken (Kernikterus). Andererseits macht Bilirubin den Hauptteil der antioxidativen Kapazität im Serum aus, was sich v.a. in einer direkten Neutralisation von Sauerstoffradikalen sowie in einer Hemmung der Lipidperoxidation manifestiert (Stocker et al. 1987b; Wu et al. 1994). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass ein inverser Zusammenhang zwischen dem Anteil an zirkulierendem Bilirubin und der Entstehung von Arteriosklerose bzw. koronaren Erkrankungen besteht. Verminderte physiologische Serumbilirubinspiegel korrelierten dabei mit bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie z.B. erhöhten LDL-Werten. Im Gegensatz dazu konnten erhöhte Bilirubinwerte mit einem vermehrten Anteil an protektivem HDL-Cholesteroll assoziiert werden (Schwertner et al. 1994; Hopkins et al. 1996). Darüber hinaus wurde für Bilirubin auch eine antiinflammatorische Wirkung durch

verringerte Expression proinflammatorischer Zytokine und anderer Entzündungsmarker aufgezeigt (Maines et al. 2005; Ryter et al. 2007).

Freie Eisenionen (Fe^{2+}), als weitere Abbauprodukte des Häm, katalysieren die Haber-Weiss-Reaktion und forcieren somit die Bildung von ROS. Gekoppelt an die Induktion der HO-1 ist die Expression eines weiteren Stressproteins, das Ferritinprotein. Dieses Enzym besitzt die Fähigkeit, zytosolische Eisenionen zu binden und entzieht somit dem Prozess der Sauerstoffradikalbildung einen essentiellen Katalysator. Als Eisenspeicherprotein kann es somit im Organismus ebenfalls eine antioxidative Wirkung entfalten (Balla et al. 1992a).

Zusammenfassend sind die Metabolisierungsprodukte der HO-1 von entscheidender Bedeutung für die Homöostase im Organismus. Im Vordergrund steht dabei die Regulation oxidativer Stresssituationen.

1.3.3 Die induzierbare HO-1 - ein mögliches Therapieprinzip?

Die Expression der induzierbaren HO-1 wird durch ihr Substrat Häm sowie eine Vielzahl von prooxidativen Stimuli angeregt. Zu den strukturell stark unterschiedlichen Induktoren zählen neben Hitzeschock und oxidativem Stress u.a. Endotoxine, Schwermetalle, UV-Licht, Hydrogenperoxid, Prostaglandine sowie inflammatorische Zytokine (Otterbein et al. 2000b). Außerdem konnte eine Stimulierung der HO-1-Expression auch durch bestimmte Arzneistoffe wie IL-10, Rapamycin, Acetylsalicylsäure, NO-Donoren und Statine gezeigt werden (Grosser et al. 2003a; Grosser et al. 2004a; Grosser et al. 2004b; Bach 2005; Schröder 2006). Bach postulierte 2005 das Modell der HO-1 als „*therapeutic amplification funnel*“, wobei das Enzym als Mediator und Verstärker der therapeutischen Effekte diverser Arzneistoffe agiert. Der jeweilige Arzneistoff induziert die vermehrte Expression des HO-1-Proteins zelltyp- und wirkungsabhängig. Die Produkte der HO-1 sind schließlich durch ihre antioxidativen, antiproliferativen, antiapoptotischen und antiinflammatorischen Eigenschaften für die Vermittlung und die additive Unterstützung des therapeutischen Effektes verantwortlich (Bach 2005).

Das positive Zusammenspiel der katalytischen Endprodukte der HO-1 bei entzündlichen Prozessen sowie bei kardiovaskulären Ereignissen konnte mit HO-1 Antisense- und Knock-out-Modellen gezeigt werden (Yet et al. 2003). In einer Humanstudie von Funk und Mitarbeitern wurde der Einfluss eines GT-Längen-Polymorphismus im humanen HO-1-Promotor auf die HO-1-Induktion untersucht. Patienten mit einer kürzeren Wiederholung der Dinukleotidsequenz antworteten mit einer vermehrten HO-1-Genexpression. Im Vergleich der unterschiedlichen Genotypen hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse, konnte für die Gruppe mit einer vermehrten HO-1-Expression ein vermindertes kardiovaskuläres Risiko gezeigt werden (Funk et al. 2004). Ähnliche Ergebnisse einer positiven Beeinflussung des Blutdruckes und ischämischer Herzerkrankungen durch eine vermehrte HO-1-Expression belegen Studien von Ono und Mitarbeitern (Ono et al. 2003; Ono et al. 2004). Eine Studie von Lo und Mitarbeitern untersuchte Magenkarzinom-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen hinsichtlich des GT-Längen-Polymorphismus. Dabei fanden sich im HO-1-Promoter der Karzinompatienten vermehrt längere GT-Wiederholungen (Lo et al. 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es bei Individuen mit einer verringerten HO-1-

Expression häufiger zu Transplantatabstoßungen sowie zu Restenosen nach Ballondilatation kommt (Schillinger et al. 2004). Vor diesem Hintergrund erscheint eine pharmakologisch herbeigeführte Induktion des HO-1/Ferritin-Systems als denkbare therapeutische Strategie zur Vermeidung und/oder unterstützenden Behandlung bei Erkrankungen in deren Pathogenese ROS von Bedeutung sind.

1.3.4 Das Eisenspeicherprotein Ferritin

Elementares Eisen wird im Organismus zum Zellwachstum und zur Proliferation benötigt. Überschüssiges freies Eisen wirkt allerdings prooxidativ und fördert als Katalysator der Haber-Weiss-Reaktion die Bildung von ROS, welche die Hauptquelle für oxidativen Stress darstellen. Zentrale Bedeutung bei der Regulation und Kontrolle des intrazellulären Eisenspiegels hat das ubiquitär vorkommende Eisenspeicherprotein Ferritin (Theil 1990). Das Holoenzym wird aus 24 Untereinheiten, den so genannten H- und L-Untereinheiten geformt. Diese sind Produkte verschiedener Gene mit differenzierten Funktionen und variieren in ihrer Zusammensetzung je nach Gewebetyp und Zellstatus. Außerdem beeinflusst das Verhältnis von H- und L-Untereinheiten die Eigenschaften von Ferritin hinsichtlich der Fähigkeit, Eisen aufzunehmen, an der Zellproliferation beteiligt zu sein und oxidativen bzw. zytokininduzierten Stress zu reduzieren (Levi et al. 1994; Epsztejn et al. 1999; Theil 2003). Ferritin H zeigt Ferroxidase-Aktivität, indem es zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) in seine reduzierte und damit speicherfähige Form überführt. Die L-Kette wird assoziiert mit der Strukturgebung des Proteins und dem Aufbau des Eisenkerns. Das primär gebildete Apoferritin ist in der Lage, bis zu 4500 Eisenatome zu binden (Orino et al. 2001; Wilkinson et al. 2006).

Von erhöhten Ferritinspiegeln wurde bei zahlreichen Erkrankungen, bei denen oxidativer Stress von pathogenetischer Bedeutung ist (z.B. Ischämie, Arteriosklerose, Krebserkrankungen, neurodegenerative Krankheiten), berichtet (Lin et al. 1996; Lin et al. 1997; Lin et al. 1998; Cozzi et al. 2000; Balla et al. 2007a; Balla et al. 2007b). Eine vermehrte Ferritinsynthese scheint somit einen weiteren Schutzmechanismus gegenüber oxidativer Gewebeschädigung darzustellen. Die Induktion des Stressproteins Ferritin ist meist gekoppelt an die Induktion der HO-1, welche durch Öffnung des Häm-Porphyrinringes freies zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) als Substrat für die Ferroxidase der H-Untereinheit zur Verfügung stellt (Balla et al. 2005). Durch Versuche mit dem Eisenchelator Desferoxamin konnte eine Eisen-abhängige Ferritininduktion gezeigt werden (Oberle et al. 1998; Oberle et al. 1999). Allerdings lassen Studien von Balla und Mitarbeitern mit dem HO-Aktivitätsinhibitor Zinn-Protoporphyrin-IX (SnPP) darauf schließen, dass eine Erhöhung der Ferritinexpression auch ohne eine vorhergehende HO-1-Induktion möglich ist (Balla et al. 2005).

Tsuji und Mitarbeiter postulierten, dass die Expression des Ferritinproteins in Abhängigkeit von oxidativem Stress transkriptionell und translationell reguliert werden kann. Eine Aktivierung des *Electrophile response element* (EpRE) durch oxidative Stimuli wie H_2O_2 nimmt z.B. positiven Einfluss auf die Ferritin-mRNA-Synthese. Auf translationeller Ebene spielen so genannte *Iron regulatory proteins* (IRPs) eine entscheidende Rolle. Sie sind in der Lage, an *Iron response elements* (IRE) in der 5' *untranslated region* (UTR) der Ferritin-mRNA zu binden und initiieren so eine

Translationsrepression (posttranslationelle Regulation). Freie Eisenionen sowie ROS modulieren die Aktivität der IRPs, wobei niedrige Eisenspiegel die IRPs stimulieren und so eine Translationsinhibition von Ferritin bewirken (Tsuji et al. 2000)

1.4 Regulationsmechanismen der HO-1-Induktion

1.4.1 Genregulatorische Proteine

Die HO-1-Transkription kann von einer großen Anzahl an Stimuli aktiviert werden. Dies zeigt sich u.a. in dem Vorhandensein einer Vielzahl verschiedener *response elements* im Bereich des HO-1 Promotors, welche die entsprechenden aktivierten Transkriptionsfaktoren binden (Abb. 5) (Maines et al. 2005). Obwohl die Induktion der HO-1 durch strukturell sehr unterschiedliche Agenzien erfolgen kann sowie gewebe- und zellspezifisch auftritt, lässt sich doch als allgemeiner Stimulus für eine HO-1-Induktion eine Änderung im zellulären Redoxstatus festlegen (Sikorski et al. 2004). Alam und Cook definieren im Säugetierorganismus so genannte *Stress-Response-Elements* (StREs oder auch AREs), die u.a. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (Aktivator-Protein-1) (z.B. c-Jun, c-Fos), der Cap'n'Collar (CNC)-Familie (z.B. Nrf2) sowie für NFκB und HSF-1 (*heat shock-factor*) aufweisen (Alam et al. 2007).

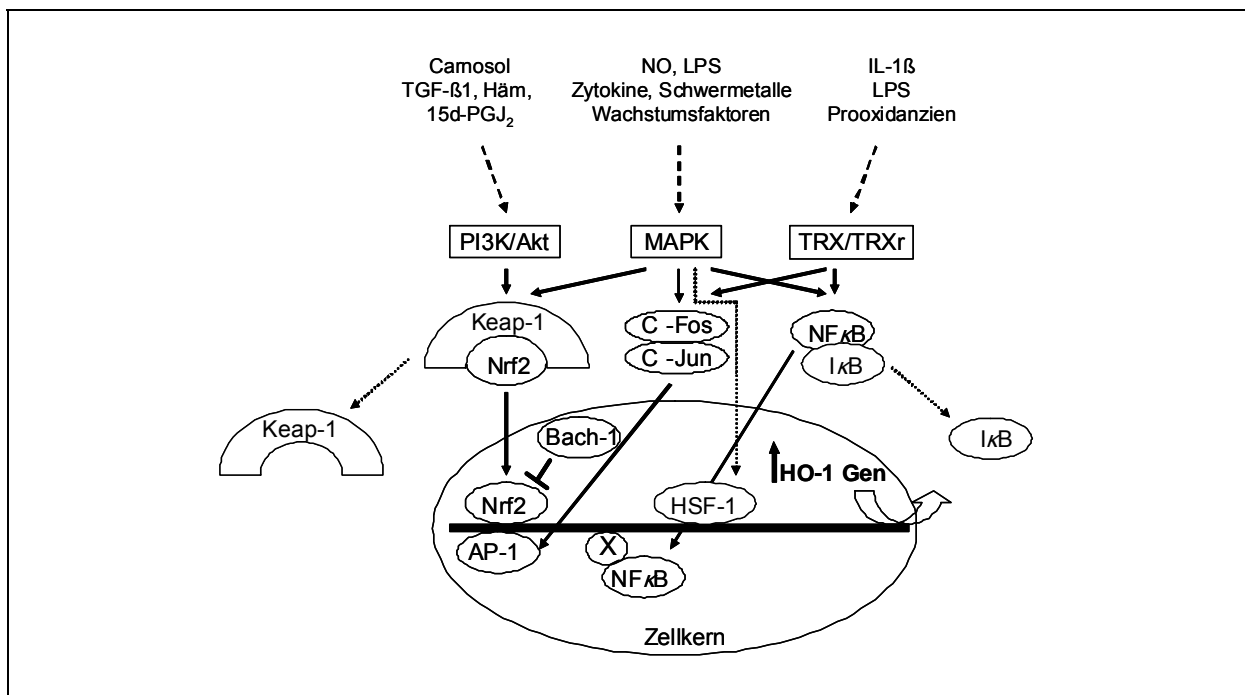


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung möglicher Regulationsmechanismen der HO-1-Genexpression. Nähere Erläuterungen finden sich in Kapitel 1.4. (AP-1: Aktivator-Protein 1, HSF-1: *Heat shock-factor 1*, IL-1β: Interleukin 1β, Keap-1: *Kelch-like erythroid-derived CNC homology-associated protein 1*, LPS: Lipopolysaccharid, MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, NFκB: *Nuclear Factor κB*, NO: Stickstoffmonoxid, Nrf2: *NF-E2-related factor 2*, 15d-PGJ₂: 15-Deoxy-Delta-12,14-Prostaglandin J₂, PI3K/Akt: Phosphatidylinositol-3-Kinasen/Akt, TGF-β1: *Transforming growth factor β 1*, TRX: Thredoxin, TRXr: Thioredoxin-Reduktase)

Bei Untersuchungen des (murinen) mHO-1-Promotors mit Luciferase-Reporter-Konstrukten wurden zwei 5`distale *Enhancer*-Regionen, E1 und E2 identifiziert. In jeder dieser *Enhancer*-Region wurden StREs mit Bindungsstellen für AP-1 und Nrf2 klassifiziert (Alam 1994; Alam et al. 1995; Huang et al. 2000). Der humane HO-1-Promotor enthält darüber hinaus Sequenzen für NFκB, AP-2 und IL-6 (Lavrovsky et al. 1994; Choi et al. 1996).

Der Transkriptionsfaktor HSF-1 hat eine untergeordnete Bedeutung, da die HO-1 zwar in Ratten als Hitzeschockprotein (HsP32) identifiziert werden konnte, die HO-1-Protein- bzw. -mRNA-Menge in verschiedenen humanen und murinen Zellkulturmodellen jedoch keine Abhängigkeit gegenüber Temperaturerhöhung zeigte (Shibahara 1988; Shibahara et al. 1989). Einzig in humanen Hep3B Hepatomazellen sowie in einer murinen Hepa-Zelllinie konnte eine temperaturabhängige Adaption der HO-1-Expression gefunden werden (Mitani et al. 1989; Alam et al. 2007).

NFκB ist ein induzierbarer, ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der unter physiologischen Bedingungen ein wichtiger Regulator bei Immun- und Entzündungsreaktionen ist. Das dimerische Protein besteht aus Proteinen der Rel-Familie (RelA (p65), RelB, c-Rel, p52 und p50), die als Homo- oder Heterodimere den funktionsfähigen Transkriptionsfaktor bilden. Die größte Relevanz besitzt das Heterodimer p50/p65. Unter Bedingungen der zellulären Homöostase liegt NFκB im Zytoplasma in einer inaktiven, an seinen Inhibitor IκB assoziierten Form vor. Entsprechende Stimulationen durch z.B. Zytokine, Stress, TNF-α oder UV-Licht können die Degradation des IκB-Komplexes bewirken. Hierdurch wird NFκB freigesetzt, in den Zellkern transloziert und kann dadurch zur Expression einer Vielzahl von Genen führen (Abb. 5). Somit werden grundlegende zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Zellwachstum und -differenzierung maßgeblich von NFκB reguliert und beeinflusst (Thanos et al. 1995). Verschiedene Studien in unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen konnten einen Zusammenhang zwischen Aktivierung von NFκB z.B. durch LPS oder IL-1β und einer HO-1-Stimulierung zeigen (Kurata et al. 1996; Bauer et al. 2000).

Nrf2 (*NF-E2-Related Factor 2*) gehört zur CNC-Familie von Transkriptionsfaktoren und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation antioxidativer Gene (Moi et al. 1994). Unstimuliert ist Nrf2 im Zytosol an Keap1 (*Kelch-like erythroid-derived CNC homology-associating protein 1*), ein aktinbindendes Protein, komplexiert und somit inaktiv (Itoh et al. 1999). Anregung durch oxidativen Stress oder Ungleichgewicht der Redoxhomöostase zerstört den Komplex und gibt Nrf2 zur Translokation in den Zellkern frei (Abb. 5). Dort dimerisiert Nrf2 mit einer kleinen Familie von Proteinen, bekannt als Mafs (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*) und bildet an der DNA basische Leucin-Zipper-Strukturen (bZIP) aus (Marini et al. 1997). Neben einer direkten Überexpression von Nrf2, die zur Translokation in den Zellkern führt (Kataoka et al. 2001), kann eine Aktivierung von Nrf2 auch durch Interaktion mit CBP (*cAMP-responsive element binding protein*)-Proteinen erfolgen (Kato et al. 2001).

Verschiedene Studien bringen eine Aktivierung von Nrf2 in Zusammenhang mit einer erhöhten HO-1-Expression. So konnten Alam und Mitarbeiter zeigen, dass Häm die Transkription des HO-1-Gens in renalen Epithelzellen (IRPTCs) durch Stabilisierung von Nrf2 vermittelt (Alam et al. 2003). Curcumin, ein pflanzliches Antioxidans, erhöht durch

Destruktion des Nrf2-Keap1-Komplexes die Bindungsfähigkeit von Nrf2 an die entsprechende HO-1-Promotorregion (Balogun et al. 2003). Ein weiteres pflanzliches Antioxidans, Carnosol, scheint die Expression des mHO-1-Promotors durch den Phosphatidylinositol-3-Kinasen/Akt (PI3K/Akt) Signalweg und den Nrf2-Transkriptionsfaktor zu regulieren (Martin et al. 2004).

Interessanterweise besitzt Nrf2 einen transkriptionellen Antagonisten. Der ebenfalls zu den bZIP-Proteinen gehörende Transkriptionsfaktor Bach-1 interagiert als Repressorprotein mit der Maf-Familie (MafK), bindet als Heterodimer an bestimmte Maf-Regionen (MARES) im HO-1-Promotor und inhibiert so dessen Genexpression (Sun et al. 2002). Das Wechselspiel zwischen Transkriptionsaktivierung durch Nrf2 und die Repression durch Bach-1 scheint einen wichtigen Stellenwert bei der Genregulation der HO-1 einzunehmen und bedarf weiterer Untersuchungen (Abate et al. 2007).

Wie NF κ B wurde AP-1 ursprünglich als ein bestimmter Transkriptionsfaktor definiert. Heute klassifiziert man damit ein Kollektiv dimerer Proteine, die durch intra- und interfamiliäre Assoziation zwischen Proteinen der Jun- und Fos-Familien gebildet werden (Alam et al. 2007). Die AP-1-Proteine Jun und Fos sind Produkte so genannter *immediate-early-response* Gene, die ebenfalls bZIP-Strukturen mit der DNA des Zielenzym ausbilden und regulatorisch in zellulären Stresssituationen wirken (Bebien et al. 2003). Im HO-1-Gen konnten mehrere AP-1-Bindungsstellen in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. Eine funktionelle Abhängigkeit der HO-1-Transkription von AP-1 ist naheliegend und wurde für einige HO-1-induzierende Agenzien wie Arsen, inflammatorische Mediatoren und andere Stimuli gezeigt. Z.B. konnte eine LPS induzierte HO-1-Transkription in Makrophagen (RAW 264.7) in Zusammenhang mit vorheriger AP-1-Aktivierung gebracht werden (Camhi et al. 1998). In einem weiteren Zellmodell konnte gezeigt werden, dass in dominant-negativen Mutanten von c-Jun im Gegensatz zum Wildtyp keine Induktion der HO-1 durch Arsenit möglich war (Elbirt et al. 1998). Darüber hinaus hatte eine Hemmung der AP-1-Aktivität in humanen Endothelzellen eine verminderte HO-1-Induktion durch IL-1 α , TNF- α und ANP zur Folge (Terry et al. 1998; Kierner et al. 2003).

1.4.2 Signaltransduktion der HO-1

Die unterschiedlichen HO-1-Induktoren regulieren die jeweiligen Transkriptionsfaktoren häufig indirekt durch Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden. Diese Signalwege stehen meist im Zusammenhang mit Phosphorylierungsprozessen oder Redoxreaktionen bzw. beiden. Verschiedene Proteinkinasen wie z.B. die Kinasen A, G und C sowie Tyrosinkinasen und Enzyme des PI3K/Akt-Signalweges scheinen u.a. bei der HO-1-Genregulation von Bedeutung zu sein. Verschiedene Studien zeigten, dass v.a. die MAP-Kinasen eine entscheidende Rolle dabei einnehmen (Ryter et al. 2006).

1.4.2.1 MAP-Kinasen

MAP-Kinasen gehören zur Superfamilie der Serin/Threonin-Proteinkinasen. Durch Phosphorylierung von Proteinen an spezifischen Serin/Threonin-Resten regulieren sie im Organismus Zellwachstum, -differenzierung, -proliferation und -apoptose. Darüber hinaus reagieren sie auf verschiedene Umwelteinflüsse wie z.B. Stress.

Die MAP-Kinasen-Kaskade ist in drei verschiedene Signalwege unterteilt, die jeweils nach ihrer terminalen Kinase benannt werden. Dazu zählen die extrazellulär regulierte Kinase (ERK), die c-Jun NH₂-terminale bzw. stressaktivierte Kinase (JNK, SAPK) sowie die p38 MAP-Kinase. Mediatoren für die Anregung der ERK-Kaskade sind v.a. Wachstumsfaktoren und IL-5. JNK und die p38 Kinase werden v.a. durch stressabhängige Faktoren wie Hitzeschock, Entzündungen, Hyperosmolarität und UV-Strahlung induziert (Kietzmann et al. 2003).

Die Signalkaskade umfasst nach heutigen Kenntnissen drei "in Serie" geschaltete Kinasen: Eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP-3K, auch: MAPKKK), eine MAP-Kinase-Kinase (MAP-2K, auch MAPKK) und eine MAP-Kinase (MAPK). Die Aktivierung erfolgt in dieser Reihenfolge durch Phosphorylierung von Tyrosin- und Threoninresten, die sich in struktureller Nähe zueinander befinden. Man spricht hier auch von einer Phosphorylierungskaskade. Wenn die MAP-Kinasen aktiviert sind, akkumulieren sie im Zellkern, wo sie kerneigene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen regulieren.

Interessanterweise dienen Transkriptionsfaktoren wie AP-1, CNC-bZIP-Proteine (Nrf2) und NFκB, welche in die Genregulation der HO-1 involviert sind, gleichzeitig als Targets für den MAP-Kinasen-Kaskadeweg (Alam et al. 2007). Außerdem konnte für viele HO-1-Stimulanzen gezeigt werden, dass sie auch eine oder mehrere MAP-Kinasen anregen. Chemische Induktoren wie Arsen, Cadmium oder LPS können alle drei Kaskaden aktivieren (Ryter et al. 2007). Prinzipiell scheint der jeweilige MAP-Kinasenweg zur HO-1-Induktion jedoch stark gewebe-, zell- und induktorspezifisch zu sein. Die Stimulierung der HO-1-Expression durch Cadmium in humanen gastralen Krebszellen (MKN) zeigte eine Abhängigkeit vom p38- und ERK-Weg (Liu et al. 2004). In humanen Brustkrebszellen (MCF-7) hingegen war einzig p38 in die Aktivierungskaskade involviert (Alam et al. 2000). Darüber hinaus induzierte Arsen in Leberzellen vom Huhn (LMH) die HO-1-Transkription über den ERK und p38 Signalweg (Elbirt et al. 1998). Kietzmann und Mitarbeiter zeigten andererseits, dass die sonst für eine HO-1-Induktion weniger relevante JNK-Kinase eine Rolle bei der Arsen-vermittelten HO-1-Induktion in primären Rattenhepatozyten spielt (Kietzmann et al. 2003). Neben Schwermetallen gibt es eine Vielzahl anderer Induktoren, die ihre Wirkung auf das HO-1-Gen via MAP-Kinasen vermitteln, wobei sich ein Präferenz für die Kinase p38 heraus kristallisiert. Dazu gehören u.a. NO-Donoren, 15d-PGJ₂, TGF-β, Hypoxie, Curcumin, Quercetin und Carnosol (Ryter et al. 2006).

1.4.2.2 PI3K-Signalweg

PI3K ist eine ubiquitär vorkommende Phospholipidkinase, die aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Untereinheit besteht. Diverse Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Insulin induzieren die Aktivierung der PI3K (Lawlor et al. 2001). Die Effekte der PI3K sind vielfältig. Durch Phosphorylierungen von Membranphosphatidylinositol an der 3'-OH-Position des Inositolringes können Phosphatidylinositol-Phosphat (PtdInsP, PIP), Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat (PtdIns(3,4)P₂, PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃, PIP₃) entstehen (Cantrell 2001). PIP₃ kann u.a. die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Phosphat-abhängigen Kinase 1 (*phosphatidylinositol 3-phosphate dependend kinase 1* (PDK1)) initiieren, die dann die Serin-/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) aktiviert (Anderson et al. 1998). Weitere PI3K-vermittelte Kaskaden sind u.a. die Stimulierung der atypischen Proteinkinase C (PKC ζ), der p70-S6-Kinase und der *cytokine independent survival kinase* (CISK) sowie die Phosphorylierung der zu den *rho-related 37 proteins* gehörenden GTPase Rac. Die Phosphorylierung der *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) wirkt inhibierend auf diese Kinase und führt zur Aktivierung von Signalwegen, die normalerweise durch GSK3 unterdrückt werden (Überall et al. 1999; Cantrell 2001; Cantley 2002).

Folge der verschiedenen Kaskadenwege ist die Induktion einer Vielzahl von Proteinen, die eine Relevanz bei zellulären Schlüsselfunktionen wie Wachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Adhäsion aufweisen („*Survival Pathway*“) (Abb. 6).

Als mögliche Zielstruktur des PI3K-Signalweges (v.a. PI3K/Akt) wird u.a. die HO-1 diskutiert (Abb. 5). Mit Inhibitoren der p38 MAP-Kinase sowie der PI3K konnte die Induktion der HO-1 durch 15d-PGJ₂ in humanen Lymphozyten unterbunden werden (Alvarez-Maqueda et al. 2004). Stimulierung der PI3K/Akt-Signalkaskade durch NGF (*nerve growth factor*) und Häm in neuronalen Zellen (PC12, SH-SY5Y) führte zu einer Nrf2-abhängigen Expression des HO-1-Gens (Nakaso et al. 2003; Salinas et al. 2003). In einer Studie von Martin und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass die antioxidativen Effekte von Carnosol z.T. über die Aktivierung des PI3K-Signalweges vermittelt werden, in dessen Folge es zur Aktivierung von Akt und Überexpression der HO-1 kommt (Martin et al. 2004). Abgesehen von der Wirkung auf die HO-1-Genregulation, scheint die PI3-Kinase in ihrem Kaskadeweg auch andere Phase-II-Enzyme wie NADPH-Quinon-Oxireduktase in ihrer Expression zu beeinflussen (Lee et al. 2001). Verschiedene Studien verdeutlichen außerdem eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Nrf2 (Nakaso et al. 2003; Salinas et al. 2003; Martin et al. 2004) und NF κ B (Lin et al. 2007) an der PI3K-abhängigen HO-1-Induktion. Wahrscheinlich dienen Nrf2 bzw. NF κ B dabei als Schaltstellen zwischen der PI3K-Kaskade und der Transkription der HO-1.

In den humanen Karzinom-Zelllinien HeLa und T24 ging einer HO-1-Induktion durch PDT (*Photodynamic therapy*) eine Akkumulation von Nrf2 im Zellkern voraus. Dabei konnte der Effekt der HO-1-Überexpression durch parallele Inhibition der p38 MAP-Kinase sowie der PI3K aufgehoben werden. Interessanterweise hatte Akt in diesem Versuchsmodell keinen Einfluss auf die HO-1-Genregulation (Kocanova et al. 2007).

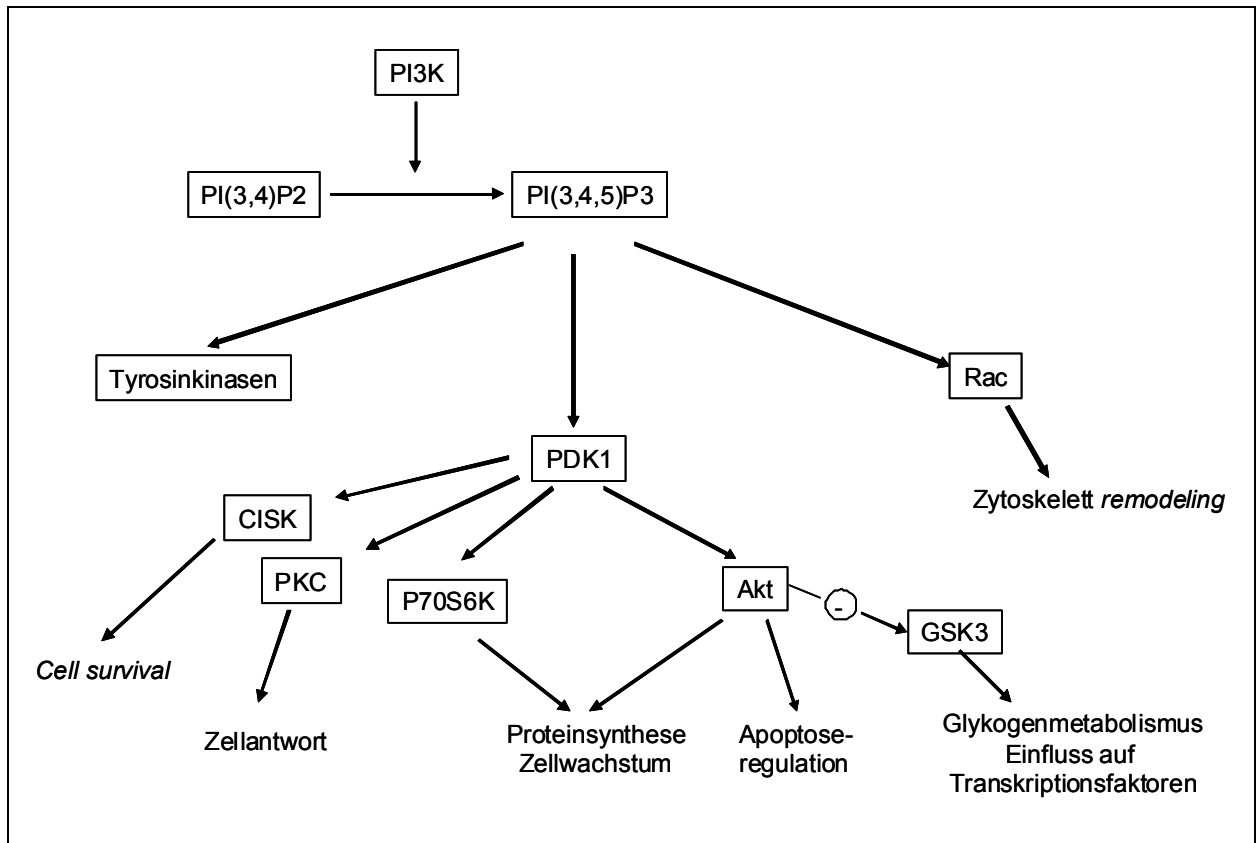


Abbildung 6: Zusammenfassung der durch PI3K initiierten Hauptsignalwege. Modifiziert nach Cantley et al. und Cantrell et al. (Cantrell 2001; Cantley 2002). Nähere Erläuterungen finden sich im Kapitel 1.4.2.2. (CISK: *cytokine independent survival kinase*, GSK3: *glycogen synthase kinase 3*, PDK1: *phosphatidylinositol 3-phosphate dependend kinase 1*, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PI(3,4)P2: Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat, PI(3,4,5)P3: Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat, PKC: Proteinkinase C, p70S6K: p70-S6-Kinase)

1.4.2.3 Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase

Thioredoxin (TRX) ist ein Schlüsselenzym für die zelluläre Redoxhomöostase und für das Zellüberleben. Es ist entscheidend an der Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und AP-1 beteiligt. Wenn TRX durch die TRX-Reduktase und NADPH in die reduzierte Form überführt wird, kann es inaktive Transkriptionsfaktoren wie Jun oder Fos oxidieren (Watson et al. 2004). Dabei interagiert TRX nicht direkt mit AP-1, sondern assoziiert vielmehr mit Ref-1 (*redox effector factor 1*), welcher im weiteren Verlauf Cysteinreste von Jun und Fos oxidiert und somit ihre DNA-Bindungsaktivität an die entsprechenden *response elements* in der Promotorregion des Zielenzym erhöht (Xanthoudakis et al. 1992; Hirota et al. 1997). Andere Studien belegen, dass die Assoziation von TRX und Ref-1 im Zellkern auch eine erhöhte Bindungsaktivität von NF κ B und in der weiteren Signalkaskade eine Phosphorylierung von Akt bewirken kann (Malik et al. 2006). TRX ist im Zytosol lokalisiert, kann jedoch als Antwort auf unterschiedliche prooxidative Stimuli in den Nukleus translozieren. Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den vergangenen Jahren einen kausalen Zusammenhang zwischen TRX-Stimulation und HO-1-Induktion postuliert. Z.B. resultierte eine Inhibition der TRX-Reduktase in einer dosisabhängigen Minderung der

durch die Entzündungsmediatoren IL-1 β - und LPS-induzierten HO-1-Expression in Ratten-Makrophagen (RAW) und glatten Aortenmuskelzellen der Ratte (RASMC) (Wiesel et al. 2000). Andere Studien belegen, dass eine erhöhte TRX-Reduktase-Aktivität in Makrophagen redoxsensitive Transkriptionsfaktoren (AP-1, NF κ B) der HO-1 und somit eine vermehrte HO-1-Expression anregt (Ejima et al. 2002; Mostert et al. 2003). Trigona und Mitarbeiter konnten einen Zusammenhang zwischen dem TRX/TRX-Reduktasesystem und der HO-1-Expression in Endothelzellen (BAEC) während prooxidativer Belastung aufzeigen (Trigona et al. 2006). Zusammenfassend scheint eine Vernetzung beider Systeme (TRX/HO-1) gegeben. Inwieweit und in welchem Ausmaß diese Interaktion besteht, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

2 Problemstellung

PPIs wie Omeprazol und Lansoprazol stellen eine moderne Arzneistoffklasse zur Behandlung von Ulkuskrankheiten, zur Eradikation von *H. pylori* sowie zur Prävention und Therapie NSAID-bedingter Mukosaschädigungen dar. Verschiedene Studien zeigen, dass PPIs nicht nur eine lang anhaltende Senkung der Säureproduktion im Magen erzielen, sondern darüber hinaus auch direkt die Regeneration und den Schutz der Magenschleimhaut fördern (Lapenna et al. 1996; Suzuki et al. 1996; Blandizzi et al. 1999). Oxidativem Stress wird in der Pathogenese von gastroduodenalen Ulzerationen zunehmend eine entscheidende Bedeutung beigemessen (Rainsford 1999; Wolfe et al. 1999; Jung et al. 2001; Pohle et al. 2001; Kwiecien et al. 2003). Zusätzlich zu ihrer effektiven antisekretorischen Wirkung könnten die antiapoptotischen, antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften der PPIs (Biswas et al. 2003; Blandizzi et al. 2005) deren Überlegenheit in der Ulkus- und Gastritistherapie bedingen. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser PPI-Effekte sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden u.a. eine erhöhte Verfügbarkeit von reduziertem Glutathion, erhöhte NO-Spiegel sowie direkte und indirekte antioxidative Effekte (Murakami et al. 1996; Koch et al. 2002; Natale et al. 2004; Blandizzi et al. 2005). Ein potenzieller Mechanismus könnte die Induktion antioxidativer Signalwege sein. In der Literatur finden sich Hinweise, dass eine Gastroprotektion u.a. durch die Aktivierung des zellprotektiv wirksamen HO-1-Gens vermittelt werden kann (Barton et al. 2003; Guo et al. 2003; Berndt et al. 2005).

Ziel der Arbeit war daher die Charakterisierung des HO-1/Ferritinsystems als Targetstruktur und Mediator der zytoprotektiven Effekte von PPIs. Beispielhaft wurden die PPIs Omeprazol und Lansoprazol ausgewählt.

1. Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, ob PPIs den HO-1-Stoffwechselweg in verschiedenen Zellsystemen stimulieren. Dabei wurden Untersuchungen am mHO-1-Promotor sowie auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Endothelzellen und Makrophagen dienten als geeignete Modelle, um zu zeigen, dass die Gastroprotektion unabhängig von der antisekretorischen Wirkung ist. Sie verfügen nicht über eine H^+/K^+ -ATPase (van Driel et al. 1995; Jaisser et al. 1999; Franic et al. 2001), sind aber im Magengewebe für die Blut- und Nährstoffversorgung sowie als zirkulierende Blutzellen für die Immunabwehr und bei Entzündungsprozessen von entscheidender Relevanz.
2. Gekoppelt an die Freisetzung des Häm-Eisens durch eine vermehrte HO-Aktivität ist die Expression eines zweiten antioxidativ wirksamen Stressproteins, das Eisenspeicherprotein Ferritin (Theil 1987; White et al. 1988). Deshalb sollte untersucht werden, ob eine Induktion der Ferritinsynthese durch PPIs in Endothelzellen und Makrophagen möglich ist.

3. Experimente mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D und dem Translationshemmer Cycloheximid sollten Aufschluss über die transkriptionelle bzw. translationelle Regulation der HO-1-Induktion geben. In der Literatur werden als mögliche Signaltransduktionswege für eine Aktivierung des HO-1-Gens u.a. der NO-, TRX-, MAPK- sowie der PI3K-Stoffwechselweg beschrieben (Motterlini et al. 1996; Durante et al. 1997; Elbirt et al. 1998; Ejima et al. 2002; Salinas et al. 2004; Ryter et al. 2006; Trigona et al. 2006). Durch Untersuchungen mit verschiedenen Hemmstoffen dieser Signalkaskaden sollten erste Aussagen über genregulatorische Mechanismen im Zusammenhang mit einer HO-1-Stimulierung durch PPIs getroffen werden.
4. Ein weiteres Ziel der Arbeit war außerdem die Charakterisierung möglicher funktioneller Konsequenzen der HO-1-Aktivierung. Dazu wurden radikalensenkende Eigenschaften von PPIs in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress betrachtet. Ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen einer HO-1-Stimulierung und einer Senkung des ROS-Spiegels sollte durch zeitabhängige Betrachtung der antioxidativen Effekte von Omeprazol sowie mit Hilfe des HO-1-Produktes Bilirubin und eines spezifischen HO-Inhibitors untersucht werden.
5. Abschließend sollte in einer *in vivo* Studie geprüft werden, inwieweit eine im Zellkulturmodell erzielte HO-1-Stimulierung *in vivo* reproduzierbar ist. Nach intraperitonealer Injektion von Omeprazol wurde dazu die CO-Produktion in verschiedenen Geweben der Versuchstiere als Indiz für die *in vivo* HO-Aktivität bestimmt.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und 95% relativer Luftfeuchte in einem Inkubator.

3.1.1 Kultivierung der Endothelzellen

Als etabliertes Modell für Untersuchungen am Endothel (Suda et al. 2001) wurde die humane Endothelzelllinie ECV 304 (ECACC 92091712) in den Passagen 3-14 verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Medium 199 unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Zweimal wöchentlich wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

3.1.2 Kultivierung der Makrophagen

Zur Untersuchung der Zytoprotektion gegenüber oxidativem Stress sowie für *Real time* RT-PCR, Western-Blot-Analysen und Aktivitätsuntersuchungen wurde die Maus-Makrophagen-Zelllinie J774 (ATCC TIB 67) in den Passagen 3-20 verwendet. Die Zellen wurden in DMEM unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt.

3.1.3 Kultivierung der Mausfibroblasten

Zur *in vivo* Biolumineszenzmessung wurde die Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3-HO-1-*luc* in den Passagen 63-74 verwendet. Die mit dem vollständigen 15kb mHO-1-Promotor, welcher als Reportergen die *Firefly*-Luciferase enthält, stabil transfizierten Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Christopher H. Contag (Stanford University, Stanford, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Zweimal wöchentlich wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

3.1.4 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 Versuchstiere

Zur Bestimmung der HO-Aktivität *in vivo* wurden 6-8 Wochen alte, weibliche FVB-Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington, DE, USA) mit einem Körpergewicht zwischen 20-26 g verwendet. Die Durchführung der Tierversuche wurde durch das *Institutional Animal Care and Use Committee at Stanford University* zugelassen und entsprach dem *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* herausgegeben von der *National Academy Press* (Washington D.C., USA, 1996) zur Tierhaltung und zum Tierschutz. Nahrung stand bis 12 Stunden vor Versuchsbeginn und Wasser ganzzzeitiglich *ad libitum* zur Verfügung.

3.3 Western-Blot-Analyse

Das Western-Blot-Verfahren ist eine immunochemische Methode zur Detektion von Proteinen (Towbin et al. 1979). Dazu werden die Zellen nach der Inkubation lysiert und das Gesamtprotein unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli 1970). Anschließend transferiert man die Proteine mit Hilfe eines Tank-Blot-Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran. Die Detektion der Proteine erfolgt mit spezifischen Antikörpern unter Nutzung eines Chemilumineszenz-Systems.

3.3.1 Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse

Die jeweiligen Zelllinien wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium für 12-24 Stunden und eine Inkubation mit den Substanzen über die jeweils angegebenen Zeiträume. Im Anschluss wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet, in Lysispuffer resuspendiert und bei -20°C bis zur Bestimmung des Proteingehaltes aufbewahrt.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits der Firma Roth (Karlsruhe) und basiert auf der Methode nach Bradford (Bradford 1976). Dieser Methode liegt eine Farbreaktion der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau zugrunde, wobei Komplexe mit einem Absorptionsmaximum von 595 nm entstehen. Parallel zu den Proben wurde eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (12,5-200 µg/ml) erstellt und mit deren Hilfe der jeweilige Proteingehalt der Probe errechnet.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses von SDS und Denaturierungsreagenzien ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch Bindung der denaturierten Proteine an SDS in konstantem Gewichtsverhältnis erhalten diese eine negative Ladung. Da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix entsprechend ihrer Molmasse aufgetrennt.

Bei dem verwendeten Gelelektrophorese-System nach Laemmli (Laemmli 1970) werden die Proben zunächst in einer Sammelgelschicht konzentriert und anschließend im Trenngel aufgetrennt. In der vorliegenden Arbeit wurden Polyacrylamid-Konzentrationen von 5% im Sammelgel und 15% im Trenngel verwendet.

Die Proteinproben (100 µg Protein für HO-1, 20 µg für Ferritin) wurden mit 5fach konzentriertem Ladepuffer und 2,5 M DTT versetzt und über 10 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in mit Laufpuffer gefüllten, vertikalen Minigel-Elektrophoresekammern von Biometra (Göttingen) bei 40V über 3-4 Stunden.

Als Marker diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgrößen (Peqlab, Erlangen).

3.3.4 Protein-Transfer (Western-Blot)

Mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-ECL, GE Healthcare, Freiburg) übertragen. Der Transfer erfolgte in einem vertikalen Puffertank (Eigenbau) bei 80 mA und 5°C über Nacht. Anhand des Molekulargewichtsmarkers wurde die Transfereffizienz überprüft. Um eine gleichmäßige Beladung der Gele zu kontrollieren, wurden diese nach dem Transfer mit Coomassie-Brillantblau angefärbt und mit dem Image System FlexiE1500P (Eagle Eye II, Stratagene, Heidelberg) fotografiert.

3.3.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Transfer der Proteine wurden die Membranen zur Maskierung unbesetzter Bindungsstellen eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung (Tris-Puffer mit 4% fettfreiem Trockenmilchpulver) versetzt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über die angegebenen Zeiten.

Antikörper	Inkubationszeit	Inkubationslösung	Hersteller
HO-1	2 Stunden	1:1000 in 25% Blockierungslösung, 65% Tris/Tween	Axxora, Grünberg
Ferritin	2 Stunden	1:500 in 25% Blockierungslösung, 75% Tris/Tween	Sigma, Taufkirchen

Tabelle 1: Primärantikörper

Nach zweimaligem 5minütigen Waschen mit Blockierungslösung wurden die Membranen 30 Minuten mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG-HRP; Sigma, Taufkirchen) inkubiert. Der Sekundärantikörper für das HO-1-Protein wurde 1:5000 in Blockierungslösung verdünnt. Für das Ferritinprotein betrug die Verdünnung 1:2000. Es folgten verschiedene Waschschriffe der Membranen mit Blockierungslösung für dreimal 5 Minuten und mit Tris/Tween-Puffer für zweimal 10 Minuten.

Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde der ECL-Plus-Detektions-Kit der Firma GE Healthcare (Freiburg) eingesetzt. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers oxidiert das Substrat Luminol zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm. Diese kann durch Exposition eines Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL; GE Healthcare, Freiburg) mit der Membran nachgewiesen werden. Die Expositionszeit lag bei 1-10 Minuten. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms *Quantity One Basic* (Bio-Rad, USA).

3.4 Northern-Blot-Analyse

Die Northern-Blot-Analyse beschreibt ein Verfahren zur Übertragung und Fixierung der in einer Gelelektrophorese aufgetrennten RNA auf eine geeignete Trägerschicht (z.B. Nylonmembran). Durch anschließende Hybridisierung mit geeigneten, markierten Gensonden können spezifische RNA-Sequenzen qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden (Alwine et al. 1977). Als Sonden wurden Fragmente der kodierenden Region des jeweiligen Gens verwendet. Diese lagen als Plasmid-DNA in *Escherichia coli* DH5- α -Kulturen vor.

3.4.1 Gewinnung und Isolierung von Plasmid-DNA

Zunächst erfolgte die Anzucht der entsprechenden Bakterien-Dauerkultur auf LB-Ampicillin-Agarplatten (100 μ g/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C. In allen verwendeten Plasmiden war ein Resistenzgen gegen Ampicillin vorhanden. Mit den gewachsenen Kulturen wurden 50 ml Hauptkultur (LB-Medium, 100 μ g/ml Ampicillin) angeimpft und bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Replikationsaktivierung des Plasmids erfolgte nach 10-12 Stunden eine Zugabe von Chloramphenicol (170 μ g/ml). Nach weiteren 10-12 Stunden wurden die Bakterienkulturen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C geerntet.

Die Pellets wurden entweder bei -20°C gelagert oder direkt zur DNA-Isolierung mittels des *Plasmid-Midi-Isolations-Kits* der Firma Qiagen (Hilden) eingesetzt. Dieses System beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim et al. 1979), gefolgt von einer spezifischen DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. Die Isolation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Das verwendete EcoR I-Restriktionsfragment der HO-1-cDNA (Klon 2/10) wurde freundlicherweise von Dr. Rex Tyrrell (School of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath, Bath, UK) zur Verfügung gestellt. Für die Analyse des *House-*

keeping-Gens β -Aktin fand das Fragment der Firma Boehringer (Mannheim) Verwendung.

3.4.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Gensonde	Größe	Restriktionsendonuklease
HO-1 (human)	1000 bp	EcoR I
β -Aktin	450 bp	Nco I, Pst I

Tabelle 2: Gensonden und Restriktionsenzyme

Die benötigten DNA-Fragmente wurden mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen (siehe Tabelle 2) aus den Plasmiden geschnitten. Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte über 2 Stunden bei 37°C gemäß den Produktinformationen der Firma Roche (Mannheim).

3.4.3 DNA-Gelelektrophorese und Fragmentisolierung

Zur Isolation wurde die DNA nach der Restriktion in einem 8%-igen TAE-Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Als Referenz diente ein Standard mit DNA-Fragmenten definierter Größe (Invitrogen, Karlsruhe). Des Weiteren enthielt das Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA, dadurch wird sein Anregungsspektrum verändert und die Fluoreszenz bei Anregung im ultravioletten Bereich stark erhöht. Nach der Visualisierung im UV-Licht wurden die entsprechenden DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Mit dem *Gel-Extraction-Kit* der Firma Qiagen (Hilden) wurde die jeweilige DNA aus den Gelstücken isoliert. Die Extraktion folgte den Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde am UV-Spektrometer (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt.

3.4.4 Inkubationsprotokoll zur Northern-Blot-Analyse

ECV 304 Zellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach Inkubation mit Medium ohne Serum für 24 Stunden erfolgte die Inkubation der Endothelzellen mit den jeweiligen Substanzen über einen Zeitraum von 8 Stunden. Bei Hemmstoffexperimenten wurden die Zellen 20 Minuten mit den verschiedenen Inhibitoren vorbehandelt. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA geerntet und die Pellets bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

3.4.5 RNA-Isolierung

Basierend auf der *Single-Step*-Methode (Chomczynski et al. 1987) wurde die Gesamt-RNA aus den Pellets mit Hilfe des peqGOLD TriFast-Reagenz (Peqlab, Erlangen) isoliert. Das Reagenz besteht aus einem Phenol-Guanidinisothiocyanat-Gemisch. Durch Aufschluss der Zellen werden die Zellkomponenten lysiert bzw. inaktiviert, ohne dass die

RNA gespalten wird. Es folgt die Zugabe von Chloroform mit anschließender Zentrifugation. Die Lösung trennt sich in eine organische und eine wässrige Phase. Die RNA verbleibt ausschließlich in der wässrigen Phase und kann aus dieser durch Zugabe von Isopropanol gefällt werden. Die Präparation der RNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

3.4.6 RNA-Gelelektrophorese

Zunächst wurde die RNA-Konzentration am UV-Spektrometer (GE Healthcare, Freiburg) bestimmt. Im Anschluss wurden je 25 µg RNA mit 4fach konzentriertem Ladepuffer (Formamid, Formaldehyd, 10× MOPS, 0,01 µg/ml Ethidiumbromid) versetzt und 10 Minuten bei 60°C denaturiert. Die Migration der RNA erfolgte in 1%-igen Formaldehyd-Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen bei 16 V über Nacht (Rave et al. 1979). Zur Kontrolle der Lauffront diente ein Gemisch aus Bromphenolblau (0,25% m/V) und Xylencyanol FF (0,25% m/V) als Farbmarker (Sigma, Taufkirchen).

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

Die Methode des Vakuum-Blottens ist gekennzeichnet durch eine vakuumverstärkte Diffusion der RNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran.

Zur Überprüfung der Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst mit dem Image System FlexiE1500P (Eagle Eye II, Stratagene, Heidelberg) fotografiert. Es folgten verschiedene Waschschrte (20 Minuten in DEPC-Wasser mit 0,05 N NaOH, 5 Minuten mit DEPC-Wasser, zweimal 15 Minuten mit konzentriertem Transferpuffer (20×SSC)). Mit Hilfe eines Vakuum-Blotters (Biometra, Göttingen) wurde die RNA auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond N⁺; GE Healthcare, Feiburg) transferiert (Transferzeit 1,5-2 Stunden). Anschließend erfolgte das so genannte *baking* durch 30minütige Lagerung der Membranen im Trockenschrank bei 80°C. Hierbei werden die RNA-Moleküle durch Ausbildung von Bindungen zwischen den Basen der RNA und den positiv geladenen Aminogruppen der Nylonmembran auf der Membran fixiert.

3.4.8 Markierung von DNA-Sonden mit ³²P-Desoxycitidin-Triphosphat

Die Sondenmarkierung wurde mit Hilfe des *Random Primed DNA Labeling Kits* der Firma (Roche) durchgeführt. Diese von Feinberg und Vogelstein entwickelte Methode basiert auf der Hybridisierung eines Gemisches aller möglichen Hexanukleotid-Kombinationen mit dem zu markierenden Fragment (Feinberg et al. 1983).

Zunächst wird die als Sonde einzusetzende doppelsträngige DNA (45 ng) für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend mit dem Reaktionsansatz versetzt. Die Abläufe sind wie folgt: Sobald ein Hexanukleotid aus dem Reaktionsgemisch als Primer an den DNA-Strang binden kann, kommt es durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase zur Synthese des Komplementärstranges. Durch Zugabe von ³²P-Desoxycitidin-Triphosphat (Hartmann Analytic, Braunschweig) und einer Mischung der übrigen Nukleotide wird der komplementäre DNA-Strang als radioaktiv markierte Sonde gebildet.

Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA (0,2 M, pH 8) gestoppt und die nicht inkorporierten Nukleotide durch Zentrifugation des Reaktionsansatzes auf *Quick Spin*-Säulen/Sephadex G50 (GE Healthcare, Freiburg) abgetrennt. Abschließend erfolgt eine 5minütige Denaturierung der doppelsträngigen Sonde bei 95°C.

3.4.9 Vor- und Haupthybridisierung

Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen über 2 Stunden bei 65°C mit 100 µg/ml Fisch-DNA enthaltender Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Im Anschluss folgte die Haupthybridisierung mit der jeweiligen Sonde über 24 Stunden bei 65°C.

3.4.10 Detektion und Quantifizierung

Nach der Hybridisierung über Nacht wurden die Membranen jeweils zweimal 15 Minuten mit 2×SSC in DEPC-Wasser bei Raumtemperatur und 0,5×SSC in DEPC-Wasser bei 65°C gewaschen. Zur Vorauswertung der markierten Membranen erfolgte eine 2stündige Exposition einer Bildplatte des Fuji *Bio-Imaging-Analysers* BAS 1500 (Fujifilm, Japan). Anschließend wurde ein Autoradiographiefilm (Kodak BioMax MS Film; Sigma, Taufkirchen) über 24-72 Stunden mit Hilfe eines Hyperscreens bei -80°C exponiert. Dieser Schirm absorbiert die Strahlung starker β-Strahler und gibt sie in Form von Licht, welches den Film schwärzt, wieder ab. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms *Quantity One Basic* (Bio-Rad, USA).

3.5 *Real time* RT-PCR

Die *Real time* RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) ist ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung von mRNA-Expressionsmengen. Dabei erfolgt im geschlossenen System die Amplifikation und Produktdetektion sowie dessen Quantifizierung in einem Schritt (Higuchi et al. 1993; Gibson et al. 1996; Heid et al. 1996). Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenz-markierte Sonden ermöglichen eine direkte Detektion der PCR-Produktakkumulation. Innerhalb des PCR-Zyklus binden die Farbstoffe bzw. Sonden an die Ziel-DNA, wobei ein durch eine Lichtquelle angeregtes Fluoreszenzsignal erzeugt wird. Dieses Signal korreliert quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit (*real time*) dargestellt werden. Bei der RT-PCR wird eine mRNA-Matrize mit Hilfe der Reversen Transkriptase zunächst in cDNA umgeschrieben, bevor die PCR-Amplifikation erfolgen kann. Während sich die *Two step* PCR durch räumliche Trennung von Transkription und Amplifikation auszeichnet, erfolgen bei der *One Step* PCR beide Reaktionen in einem Ansatz.

3.5.1 Inkubationsprotokoll zur *Real time* RT-PCR

J774 Zellen wurden in Kulturschalen mit 6 Vertiefungen ausgesät und bis zum Erreichen 80%iger Konfluenz kultiviert. Im Anschluss erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium für den Zeitraum von 12 Stunden sowie eine 6stündige Inkubation mit Lansoprazol. Bei Hemmstoffexperimenten erfolgte eine 20minütige Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor. Danach wurden die Zellen abgeschabt und die nach Zentrifugation erhaltenen Pellets bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

3.5.2 RNA-Isolierung

Mit Hilfe des *RNAeasy Plus Mini Kits* (Qiagen, Valencia, CA, USA) erfolgte die Extraktion der Gesamt-RNA-Menge nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der RNA-Isolierung beruht hierbei auf der Kombination von *microspin* Technologie und einer Siliciagel-Membran, welche sich durch spezifische, selektive Bindungseigenschaften für RNA auszeichnet. Die Zellen wurden zunächst mit einem Guanidinisothiocyanat enthaltenden Puffer lysiert und homogenisiert sowie RNasen und andere Zellkomponenten inaktiviert. Die Zugabe von Ethanol gewährleistet dabei eine angemessene Bindungsfähigkeit der RNA an die RNA-bindende Membran und verhindert Kontaminationen. Die hochreine RNA wurde schließlich mit 30 µl RNase-freiem Wasser aus der Membran eluiert.

3.5.3 Probenauftragung und *Real time* RT-PCR

Nach Gewinnung der RNA und spektrometrischer RNA-Konzentrationsbestimmung jeder einzelnen Probe erfolgte die *One step* RT-PCR mit einem *Quanti Tect SYBR Green RT-PCR Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) in einer Platte mit 96 Vertiefungen (*well*), wobei jede Vertiefung eine Gesamtmenge von 40 ng RNA enthielt. Der verwendete Cyaninfarbstoff *SYBR Green 1* besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu dsDNA. Durch Interkalation zwischen die Basenpaare wird die Fluoreszenz des Cyaninfarbstoffs 1000fach verstärkt, was die Bestimmung der gebildeten DNA während der PCR ermöglicht (Wittwer et al. 1997; Morrison et al. 1998). Das Ansetzen der PCR erfolgte auf Eis, um vorzeitige Reaktionen der Polymerase zu verhindern. Die Durchführung der einzelnen Schritte (Vorbereitung des Gemisches, Zugabe des Templates, Amplifizierung) wurden räumlich getrennt durchgeführt, um die Entstehung falsch-positiver Ergebnisse zu verhindern.

Komponenten	Volumen pro Vertiefung (µl)
RNase-freies Wasser	3,25
HO-1 Primer (F)	2,5
HO-1 Primer (R)	2,5
2× <i>Quanti Tect SYBR Green</i>	12,5
RT-PCR Master Mix	0,25

Tabelle 3: Reaktionsansatz PCR

Zu dem in Tabelle 3 angegebenen Reaktionsansatz wurden im Anschluss 4 μ l Negativkontrolle (RNase-freies Wasser), HO-1 Standard (HO-1-mRNA) oder die jeweiligen Proben pipettiert. Der HO-1-mRNA-Standard wurde mit *Riboprobe® In Vitro Transcription System* (Promega Corp., Madison, WI, USA) in dem Plasmidvektor pRC-CMV-HO-1 synthetisiert und freundlicherweise von Dr. Hui Zhao (Department of Pediatrics, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Das Endvolumen pro Vertiefung betrug 25 μ l. Nach der Beladung der 96-well-Platte und kurzer Zentrifugation (1 Minute) bei 1000 rpm erfolgte die Amplifizierung im Thermozykler (Mx3005P QPCR System, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Zyklusbedingungen und verwendete Primer siehe Tabellen 4 und 5.

cDNA Synthese	30 Minuten bei 50°C
RT-Inaktivierung	15 Minuten bei 95°C
PCR-Zyklen (40×)	15 Sekunden bei 95°C
	15 Minuten bei 60°C
	30 Sekunden bei 72°C
Schmelzkurvenanalyse	30 Sekunden 65°C
	30 Sekunden 95°C

Tabelle 4: Thermozyklen bei der PCR

Primer	Sequenz	bp
HO-1 (F)	5'-CCTTCCCGAACATCGACAGCC 3'	150
HO-1 (R)	5'-GCAGCTCCTCAAACAGCTCAA-3'	150
β -Aktin (F)	5'-AAGGAGATTACTGCTCTGGCTCCTA-3'	149
β -Aktin (R)	5'-ACTCATCGTACTCCTGCTTGCTGAT-3'	149

Tabelle 5: Verwendete Primer

Die verwendeten Primer wurden freundlicherweise von Dr. Stacy Burns-Guydish und Dr. Hui Zhao (Department of Pediatrics, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der *Opticon Software* (MJ Research, Waltham, MA, USA).

Die Anzahl an Kopien für die HO-1-mRNA je Probe wurde anhand der Kalibriergeraden des HO-1-mRNA-Standards (Kopie/ μ g RNA) kalkuliert, auf β -Aktin normiert und dargestellt als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle.

3.6 Bestimmung der HO-Aktivität durch spektrometrische Vermessung von Bilirubin

Im Zellsystem beruht die Bestimmung der totalen HO-Aktivität auf dem enzymatischen Abbau von Häm über die Zwischenstufe Biliverdin zu Bilirubin. Um eine vollständige Freisetzung der HO zu gewährleisten, werden die Zellen nach Inkubation und Ernte zunächst aufgeschlossen. Durch Zugabe der entsprechenden Substrate sowie der Biliverdinreduktase wird im zellfreien System NADPH-abhängig Bilirubin gebildet und extrahiert. Die Menge an gebildetem, gelbfarbenem Bilirubin wird schließlich

spektrometrisch vermessen und korreliert mit der enzymatischen Aktivität aller HO-Isoenzyme.

3.6.1 Inkubationsprotokoll zur Aktivitätsbestimmung

Die jeweiligen Zelllinien (ECV 304, J774) wurden in Kulturschalen von 150 mm Durchmesser ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend folgte ein Wechsel zu serumfreien Medium für 12-24 Stunden sowie die Inkubation der Zellen für 12 Stunden mit den jeweiligen Substanzen. Danach wurden die Zellen in kaltem PBS abgeschabt, in PBS-Mg-Puffer resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.6.2 Aufarbeitung der Proben

Das schonende Aufschließen der Zellen erfolgte durch dreimaliges Auftauen bei 37°C und wieder Einfrieren mit Flüssigstickstoff, sowie einer 15sekündigen Nachbehandlung im Ultraschallbad. Danach wurden die zellulären Bestandteile (10 Minuten bei 5000 rpm und 4°C) abzentrifugiert und definierte Mengen des wässrigen Überstandes für den Reaktionsansatz sowie zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

3.6.3 HO-Aktivitätsbestimmung

Hämin, ein Analogon des körpereigenen Häms, diente als Substrat für die HO-Isoenzyme. Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Glucose-6-phosphat sowie NADPH stellen ein NADPH-generierendes System dar, welches als Reduktionsmittel beim enzymatischen Abbau des Häms zu Biliverdin wirksam wird. Als Quelle für die Biliverdinreduktase wurde der ultrazentrifugierte Überstand von Rattenlebercytosol verwendet.

	µl je Reaktionsansatz	Endkonzentration
PBS-Mg-Puffer	290	MgCl ₂ (0,2 mM), PBS (100 mM)
Lebercytosol	110	
Glucose-6-phosphatdehydrogenase (50 U/ml)	15	0,2 mM
Glucose-6-phosphat (20 mM)	50	2 mM
Probe	400	
Hämin (1 mM)	25	20 µM
β-NADPH (40 mM)	25	0,8 mM

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die HO-Aktivitätsbestimmung

Entsprechend der Reihenfolge in Tabelle 6 wurde der Reaktionsansatz zusammengegeben, gut gemischt und für 1 Stunde im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion des gebildeten Bilirubins wurden die Proben mit 800 µl Chloroform stark gevortext. Um die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase zu trennen,

wurde nacheinander je 5 Minuten bei 3000 rpm und 5000 rpm zentrifugiert. Nach Separation der organischen Phase mit dem extrahierten Bilirubin erfolgte die Vermessung am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bei den Wellenlängen 464 nm und 530 nm (Referenzwellenlänge).

Die gebildete Menge an Bilirubin (Extinktionskoeffizient $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde über die Differenz der Absorption bei 464 nm und 530 nm errechnet (Motterlini et al. 1996) und auf den Proteingehalt der Proben normiert. Die totale HO-Aktivität je Probe wurde als prozentuale Bilirubinbildung (pro mg Protein und pro Stunde) angegeben.

3.7 Bestimmung der HO-Aktivität durch gaschromatographische CO-Messung

Neben der spektrometrischen Vermessung des gebildeten Bilirubins kann die Aktivität der Hämoxxygenasen auch über die gaschromatographische Bestimmung des freigesetzten CO erfolgen (Vreman et al. 1988; Vreman et al. 2000). Die zugrunde liegende Gleichung lautet wie folgt:



Die spektrometrische Bestimmung von Bilirubin ist z.T. problematisch. Zum Einen ist es unter Verwendung eines Multienzymassays schwierig einheitliche Standardbedingungen zu schaffen. Zum Anderen ist der Extinktionskoeffizient von Bilirubin abhängig vom verwendeten Auszugsmittel (Tenhunen et al. 1968; Lodola et al. 1979). Die gaschromatographische Quantifizierung von CO bietet hier eine deutlich sensitivere und besser reproduzierbare Methode (Vreman et al. 1999).

Nach der Tötung der Versuchstiere sowie der schnellen Gewebeentnahme werden die Gewebeproben entsprechend aufgearbeitet, mit Substrat (Methämalbumin, NADPH) versetzt und das gebildete CO im Luftraum der jeweiligen Probenfläschchen gaschromatographisch bestimmt. Das freigesetzte CO, berechnet als nmol CO/h/mg Nassgewicht Gewebe und normiert auf % HO-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, korreliert mit der HO-Aktivität aller Isoenzyme.

3.7.1 Applikation der Substanzen

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere einer 12stündigen Nahrungskarenz unterzogen, erhielten jedoch freien Zugang zu Trinkwasser. Zunächst erfolgte die randomisierte Aufteilung der Versuchstiere in zwei Gruppen (2 Vehikel-behandelte Tiere und 3 Omeprazol-behandelte Tiere pro Versuchsreihe). Im Anschluss wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt und Vehikel (15%ige (V/V) Tween-20-Lösung bei oraler Applikation bzw. 45%ige (m/V) Cyclodextrinlösung bei intraperitonealer Applikation) oder Omeprazol 120 $\mu\text{mol/kg}$ KG orale bzw. intraperitoneale appliziert. Zugang zu Nahrung wurde danach wieder *ad libitum* gewährt. Nach 24 Stunden erfolgte die Tötung der Tiere sowie die schnelle Gewebeentnahme, -aufarbeitung und Vermessung der Proben.

3.7.2 Gewebepreparation

Nach 24 Stunden wurden die Tiere getötet, Leber, Magen und Niere entnommen, mit eiskaltem KPO_4 -Puffer gespült und wie folgt aufgearbeitet: 100-150 mg (Nassgewicht) Gewebe wurde 1:10 mit KPO_4 -Puffer verdünnt und zerschnitten. Im Anschluss wurden die Gewebeproben zum Aufschluss der Zellen sowie zum homogenisieren der Probe mit einer eisgekühlten Mikrosonde (Modell XL2000, Misonics, Farmingdale, NY, USA) für einige Sekunden unter ständiger Kühlung ultraschallbehandelt. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis gelagert und innerhalb einer Stunde vermessen.

3.7.3 HO-Reaktion

Pro Versuchstier und Gewebe wurden 5 Probenfläschchen (2 ml Braunglasgefäße) angefertigt, je 3 zur Bestimmung der totalen CO-Freisetzung sowie 2 zur Bestimmung der CO-Freisetzung aus HO-unabhängigen Quellen. Diese basale CO-Produktion kann u.a. durch Fotooxidation organischer Verbindungen oder Lipidperoxidation entstehen. Mit einer 1,0 ml Hamilton-Pipette wurde in alle Probenfläschchen 20 μl des aufgearbeiteten Gewebes (2 mg Nassgewicht) und 20 μl Methämalbumin (150 μM) sowie 20 μl NADPH (4,5 mM) zum Start der Enzymreaktion oder 20 μl KPO_4 -Puffer zur Kontrolle der basalen CO-Produktion pipettiert und die Probenfläschchen luftdicht verschlossen. Zunächst erfolgte eine 5minütige Inkubation im Wasserbad bei 37°C unter Ausschluss von Licht und eine anschließende Reinigung der Proben für 2 Sekunden mit CO-freier Luft, um einheitliche Startbedingungen in jedem Probenfläschchen zu schaffen. Die CO-freie Luft entstand mit Hilfe eines Hopcalite-Katalysators (CuO/MnO_2) (Trace Analytical, Muskegon, MI, USA) bei 120°C und wurde über ein 2-Kanülensystem mit einer Flußrate von 200-300 ml/Minute durch den Gummistopfen in das Reaktionsgefäß transportiert. Nach weiterer Inkubation der Proben im Wasserbad für 15 Minuten wurde die HO-Enzymreaktion schließlich durch Zugabe von 5 μl 60%iger (m/V) Sulfosalicylsäure gestoppt. Die Probenfläschchen wurden im Dunkeln auf Eis, bis zur Quantifizierung des bei der Reaktion freigesetzten CO, aufbewahrt (Vreman et al. 1999).

3.7.4 CO-Quantifizierung

Die gaschromatographische Trennung des gebildeten CO erfolgte mit Hilfe eines Molekularsiebes vom Typ 13X (40-60 Mesh) (Alltec Associates, Deerfield, IL, USA). Das Molekularsieb war in eine Edelstahlsäule (68×0,53 cm) integriert und wurde vom Trägergas (synthetische Luft) mit einer Durchflußrate von 30 ml/min bei einer Arbeitstemperatur von 140°C durchströmt. Die Injektionszeit des Trägergases betrug 15 Sekunden, die Elutionszeit für CO 90 Sekunden. Die Bestimmungsgrenze für CO lag bei 1 pmol. Das freigesetzte CO wurde mit einem reduzierenden Gasetektor (*Reduction Gas Analyser* (RGA2, Peak Laboratories, Mountain View, CA, USA)) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgt dabei durch die photometrische Bestimmung von Quecksilberdampf, welches bei der Reduktion von Quecksilberoxid durch CO entsteht. Die Menge an Quecksilberdampf ist der CO-Freisetzung der Gewebeproben proportional.



Die entsprechenden CO-peaks wurden in ein elektrisches Signal umgewandelt und als Integrationsfläche mit einem 10 mV Rekorder in mV*s aufgezeichnet. Mit Hilfe einer Kalibriergerade konnte die CO-Produktion in pmol ermittelt werden.

In der praktischen Durchführung wurde zunächst vor jeder Gaschromatographie, durch die Vermessung definierter CO-Volumen (50-250 µl entspricht 24-120 pmol CO), eine CO-Standardgerade erstellt. Im Anschluss wurden die einzelnen Proben vermessen und schließlich die Menge an freigesetztem CO als nmol/h/mg Nassgewicht Gewebe nach folgender Gleichung berechnet.

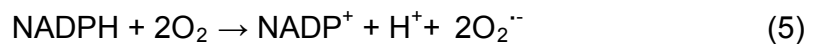
HO-Aktivität (nmol/h/mg Nassgewicht Gewebe) =

$$\text{Total} - \text{Basaler CO-Gehalt (pmol CO)} \times \frac{\text{nmol}}{1000 \text{ pmol}} \times \frac{60 \text{ min/h}}{15 \text{ min}} \times \frac{\text{ml}}{\text{mg Gewebe}} \times \frac{1}{0,02 \text{ ml}} \quad (4)$$

Die HO-Aktivität wurde schließlich dargestellt als % HO-Aktivität, wobei die mit Vehikel behandelten Kontrolltiere zu 100% gesetzt wurden.

3.8 Bestimmung freier Sauerstoffradikale

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



Die Konzentration von Superoxidradikalen ist der mit Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz proportional und kann am Luminometer vermessen werden (Li et al. 1998; Tarpey et al. 1999). Somit können v.a. extrazelluläre Konzentrationen an Superoxidradikalen bestimmt und Rückschlüsse auf potenziell antioxidativ wirkende Substanzen gezogen werden (Kopprasch et al. 2003).

3.8.1 Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung

Zur Bestimmung freier Sauerstoffradikale wurden Endothelzellen sowie Makrophagen in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde für 12-24 Stunden mit Medium ohne Serum inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den verschiedenen Substanzen über die jeweiligen Zeiträume, mit einer maximalen Inkubationszeit von 24 Stunden. Zur Ernte wurde das Zellkulturmedium entfernt und mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen trypsinisiert (ECV 304) bzw. abgeschabt (J774). Das Trypsin wurde nach kurzer Einwirkzeit entfernt und die Zellen in PBS resuspendiert. Nach Zugabe von NADPH (100 µM bei ECV 304, 10 µM bei J774) und Lucigenin (50 µM bei ECV 304, 5 µM bei J774) zur Zellsuspension wurde der Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 20 Minuten am Luminometer vermessen. Die Bestimmung der direkten

radikalfangenden Eigenschaften von Bilirubin erfolgte ohne Vorinkubation durch direkte Zugabe von Bilirubin und den Reagenzien zu den resuspendierten Zellen.

3.8.2 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 ($\text{Luc}^{\cdot+}$) (6). 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 (7) (Vasquez-Vivar et al. 1997; Tarpey et al. 1999).



Mit Hilfe eines Photomultipliers können die Photonen gezählt werden. Als Rohdaten erhält man so genannte relative Lichteinheiten ($\text{RLU} = \text{relative light units}$), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden. Die Stimulation der ROS-Bildung durch NADPH in unbehandelten Kontrollzellen wurde als maximal erreichbarer RLU-Wert (RLU_{max}) zu 100% gesetzt.

Durchgeführt wurde die Messung mit dem Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold, Bad Wildbad) entsprechend den Herstellerangaben.

3.9 Untersuchungen zur Viabilität – LDH-Assay

Zur Bestimmung der zytotoxischen Sensitivität der Zellen wurde ein Viabilitätstest durchgeführt. Die Zerstörung der Zytoplasmamembran der Zellen ist ein morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose. Sie führt zu einer Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteilen, wie z.B. Enzymen, in das Zellkulturmedium von denen die meisten schnell abgebaut werden. Eine Ausnahme bildet die Lactatdehydrogenase (LDH), die auch außerhalb der Zelle sehr stabil ist. Im LDH-Assay wird die Aktivität des Enzyms durch die Umsetzung eines Formazansalzes nachgewiesen. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag des gelösten Salzes, der photometrisch quantifiziert werden kann (Parks et al. 1979; Szekeres et al. 1981; Murphy et al. 1993).

3.9.1 Inkubationsprotokoll

Zur Bestimmung des nekrotischen Zelltodes wurden Endothelzellen oder Makrophagen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach 12stündiger Inkubation mit serumfreien Medium erfolgte die Inkubation mit den verschiedenen Substanzen über die jeweiligen Zeiträume, wobei das Maximum bei 24 Stunden lag. Nach 24 Stunden wurden 100 μl des Zellüberstandes abgenommen und in eine 96-well-Platte überführt.

3.9.2 Enzymreaktion

Es folgte eine Inkubation mit Natriumlactat, NAD^+ , Jodtetrazolchlorid und Diaphorase. Die aus den Zellen freigesetzte LDH setzt Natriumlactat mit NAD^+ als Coenzym zu Pyruvat um. Dabei entsteht $\text{NADH}+\text{H}^+$, wobei die Wasserstoffatome von der Diaphorase zur Reduktion des Jodtetrazolchlorids eingesetzt werden. Die Extinktion des Formazansalzes wurde nach 30minütiger Inkubation bei 490 nm und bei 630 nm als Referenzwellenlänge gemessen. Dabei ist die Intensität der Rotfärbung proportional zu der Zahl der lysierten Zellen (Szekeres et al. 1981).

3.10 Bestimmung der HO-1-Promotoraktivität

Die HO-1-Promotoraktivität wurde mit Hilfe von *in vivo* Biolumineszenzmessung (BLI = *bioluminescent imaging*) in NIH3T3–HO-1-*luc*-Zellen bestimmt. Die NIH3T3-Zellen sind mit dem 15kb mHO-1-Promotor, in dessen *downstream* Region die *Firefly*-Luciferase als Reporter gen lokalisiert ist, stabil transfiziert. Die NIH-3T3-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Christopher H. Contag (Stanford University, Stanford, CA; USA) zur Verfügung gestellt.



Abbildung 7: HO-1-*luc*-Expressionsvektor bestehend aus der vollständigen 15kb 5'-*upstream* Regulationseinheit des mHO-1-Gens sowie des *Firefly*-Luciferase-Gens. (DE: distaler Enhancer, PE: proximaler Enhancer, P: Promotor) (Hajdena-Dawson et al. 2003).

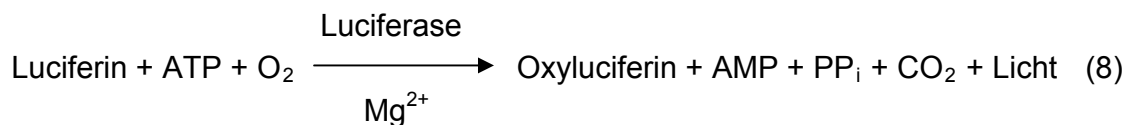
Die Aktivität des Proteins, der Luciferase, gilt dabei als Index für die Promotoraktivität des HO-1-Gens und kann nach Zugabe des Substrates Luciferin als Lichtemission gemessen und quantifiziert werden (Hajdena-Dawson et al. 2003).

3.10.1 Inkubationsprotokoll BLI

Die NIH3T3-HO-1-*luc*-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für 8 Stunden mit Medium ohne Serum inkubiert. Daran schloss sich die Inkubation mit den jeweiligen Substanzen über die angegebenen Zeiträume an. Für Versuche mit potenziellen Hemmstoffen wurde 20 Minuten mit den Inhibitoren vorinkubiert.

3.10.2 Probenaufarbeitung und *in vivo* BLI

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium von der Zellkulturschale entfernt. Nach 5minütiger Inkubation der Zellen mit Luciferin (300 µg/ml) erfolgte die Bestimmung der Biolumineszenz über einen Zeitraum von 5 Minuten mit dem *In Vivo Imaging System* (IVIS™, Xenogen Corp., Alameda, CA, USA). Dabei dient das Luciferase-Gen als „Reporter-gen“. Durch das Enzym, die *Firefly*-Luciferase, wird Luciferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesium-Ionen oxidiert. Unter Bildung von Oxyluciferin wird dabei Licht der Wellenlänge 562 nm frei.



Die gebildeten Photonen werden mittels der *LivingImage* Software (Xenogen, Alameda, CA, USA) in entsprechenden Farbintensitäten visualisiert und sind der Promotoraktivität der HO-1 proportional. Als Rohdaten erhält man die Anzahl an Photonen/5 Minuten (Zhang 2002).

3.11 Material

American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, (USA)	J774 (ATCC TIB 67), AGS (ATCC CRL 1739), KATO-III (ATCC CL 101)
Axxora, Grünberg, (Deutschland)	LDH-Zytotoxizität-Kit (TaKaRa), HO-1-Antikörper, Ultra Pure Water, Wortmannin
BioSynth, Naperville, IL, (USA)	Luciferin
Charles River Laboratories, Wilmington, DE, (USA)	FVB-Mäuse
DIFCO Laboratories, Detroit, MI, (USA)	Trypton
European Collection of Cell Cultures (ECACC), Wiltshire, (UK)	ECV304 (ECACC 92091712)
Frontier Scientific, Carnforth, (UK)	CrMP
GE Healthcare, Freiburg, (Deutschland)	Dextransulfat, ECL Plus Detektionsreagenz, Hyperfilm ECL, Nitrocellulosemembran Hybond-ECL, Nylonmembran Hybond N+, Quick Spin Säulen
Hartmann Analytic, Braunschweig, (Deutschland)	³² P-dCTP

Invitrogen, Karlsruhe, (Deutschland)	Agarose, DNA-Standard, fetales Kälberserum, Ethidiumbromid, Fisch-DNA, PBS, Penicillin/Streptomycin, Trypsin/EDTA, Tris, Zellkulturmedien
Merck, Darmstadt, (Deutschland)	DMSO, Ethanol, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Methanol, Natriumhydrogenphosphat
Peqlab, Erlangen, (Deutschland)	Protein-Marker, TriFast-Reagenz
Qiagen, Hilden, (Deutschland), Qiagen, Valencia, CA, (USA)	Plasmid Midi Isolation Kit, Gel Extraction Kit, RNAeasy Plus Mini Kit, Quanti-Tect SYBR Green RT-PCR Kit
Roche, Mannheim, (Deutschland)	Random Primed DNA Labeling Kit, Restriktionsenzyme
Roth, Karlsruhe, (Deutschland)	Bradford-Reagenz, Chloroform, Coomassie-Brillantblau, DEPC, DMSO, EDTA, Essigsäure, Formaldehyd, Formamid, Glycin, Hefeextrakt, LB-Agar, MOPS, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumhydroxid, SDS
Serva, Heidelberg, (Deutschland)	Acrylamid
Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (Deutschland)	Actinomycin D, Ampicillin, APS, Bilirubin, Blaumarker, BSA, Cadmiumchlorid, Chloramphenicol, Cycloheximid, DNCB, DTT, Ferritin-Antikörper, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, Glutamin, Glycerol, Hämin, Lansoprazol, L-NAME, Lucigenin, LY 294002, NADPH, Omeprazol, PD 098059, Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper, PMSF, Ranitidin, SB 203580, SDS, SOD, SP 600125, TEMED, Triton-X 100
Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, (USA)	BSA, Cyclodextrin (2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin), Hämin, LY 294002, NADPH, PD 098059, SB 203580, SB 202190, SP 600125, Tween 20, Wortmannin
Stanford University, Stanford, CA, (USA)	NIH3T3-HO-1-luc-Zellen (Dr. Christopher H. Contag) HO-1-Primer, β -Aktin-Primer, HO-1-

Standard (Dr. Stacy Burns-Guydish und Dr. Hui Zhao)

TSI GmbH, Zeven, (Deutschland) Trockenmilchpulver

3.12 Puffer, Lösungen und Medien

3.12.1 Puffer

PBS: 138 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: 150 mM Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0 bei 37°C

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

Tris/Tween-Puffer: 0,5% Tween, 20 M Tris, pH 7,4 bei 37°C

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 % Essigsäure, pH 8,0 bei 37°C

Laufpuffer für DNA-Agarose-Gelelektrophorese: 1x TAE

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

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

Sammelgelpuffer: 334 mM Tris, 17 mM SDS, pH 6,8 bei 37°C

Trenngelpuffer: 1 M Tris, 17 mM SDS, pH 8,8 bei 37°C

Ladepuffer für SDS-PAGE: 100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2% SDS, 20% Glycerol, 2,5 M DTT frisch zugeben

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

Transferpuffer für Western Blot: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol

PBS-Mg-Puffer: 100 mM Kaliumhydrogenphosphat, 4,3 mM Magnesiumchlorid, pH 7,4 bei 37°C

3.12.2 Lösungen

0,8%-iges TAE-Agarosegel: 8 g/l Agarose in 1x TAE

1%-iges Formaldehyd-Agarosegel: 10 g/l Agarose, 10% 10x MOPS in DEPC-Wasser, vor dem Gießen 17% Formaldehyd zugeben

Hybridisierungslösung für Northern-Blot-Analyse: 10% Dextransulfat, 1 M NaCl, 1% SDS in DEPC-Wasser, 100 µg/ml Fisch-DNA frisch zugeben

Sammelgel für SDS-PAGE: 5% Acrylamid, 20% Sammelgelpuffer, 1% APS (0,1 g/ml), 0,1% TEMED in bidestilliertem Wasser

Trenngel für SDS-PAGE: 15% Acrylamid, 20% Trenngelpuffer, 1% APS (0,1 g/ml), 0,1% TEMED in bidestilliertem Wasser

Coomassie-Brillantblau-Lösung: 2,5 g/l Coomassie-Brillantblau, 10% Essigsäure, 45% Methanol in demineralisiertem Wasser

Entfärber: 10% Essigsäure, 45% Methanol in demineralisiertem Wasser

Blockierungslösung: 4% fettfreies Trockenmilchpulver in Tris-Puffer

3.12.3 Substanzlösungen

Lansoprazol, Omeprazol, Ranitidin, Actinomycin D, LY 294002, Wortmannin, PD 098059, SB 203580, SB 202190, SP 600125 und DNCB wurden in entsprechenden Mengen DMSO gelöst und als Stammlösungen bei -20°C gelagert. Zur weiteren Verdünnung der DMSO-Lösung wurde PBS verwendet. Alle Lösungen wurden am Versuchstag frisch hergestellt.

Bei den *in vivo*-Studien zur gaschromatographischen HO-Aktivitätsbestimmung wurde Omeprazol in einer 45%igen (m/V) Cyclodextrinlösung (0,45 g 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin in 1 ml sterilem Wasser) gelöst.

CHX wurde als *Ready-Made*-Lösung (100 mg/ml) gekauft. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

Bilirubin (10 mM), CrMP-Stammlösung (10 mM) und Hämin (1 mM) wurden mit 50 µl 2N NaOH angelöst und mit PBS, sterilem Wasser bzw. PBS-Mg-Puffer verdünnt.

Chloramphenicol wurde in reinem Ethanol gelöst und als Stammlösung (34 mg/ml) bei -20°C gelagert.

Luciferin (30 mg/ml) wurde in sterilem Wasser gelöst.

Methämalbumin (1,5 mM Hämin/0,15 mM BSA): 9,9 mg Hämin wurden in 2,5 ml 0,4 M Na₃PO₄ gelöst. Anschließend wurden 100 mg BSA zugegeben und das Volumen zu 8 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Letztlich erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf einen Wert von 7,4 mit 1 M HCl und das Volumen wurde zu 10,0 ml mit destilliertem Wasser ergänzt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Substanzen in den entsprechenden Mengen PBS gelöst. Alle Lösungen wurden am Versuchstag frisch hergestellt.

3.12.4 Medien

LB-Ampicillin-Agar: 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 170 mM Natriumchlorid, 15 g/l Agar, 100 mg/l Ampicillin, pH 7,5 bei 37°C

LB-Medium: 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 170 mM Natriumchlorid, 100 mg/l Ampicillin, pH 7,5 bei 37°C

3.13 Statistik

Alle Daten der Biolumineszenz- und Chemilumineszenzmessung sowie der *Real time* RT-PCR und der spektrometrischen HO-Aktivitätsbestimmung sind jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von n=2-6 unabhängigen Experimenten angegeben. Die densitometrischen Daten der Northern- und Western-Blot-Analysen basieren auf n=3-6 unabhängigen Experimenten. Bei den gaschromatographischen CO-Messungen zur Bestimmung der HO-Aktivität erfolgten 3 unabhängige Experimente mit je 2 Kontroll- (Vehikelapplikation) und 3 Versuchstieren (Substanzapplikation).

Eine Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni's multipler Vergleichstest sowie der *Student's unpaired t-test* wurden angewendet zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3.14 Kooperationen

Die *Real time* RT-PCR Messungen in J774, die HO-1-Promotoraktivitätsbestimmung in NIH-3T3-Zellen sowie die gaschromatographische CO-Detektion in Mausgeweben wurden in einem zeitlich begrenzten Rahmen von insgesamt 5 Monaten an der Stanford University (Stanford, CA, USA) durchgeführt. Die entsprechenden Materialien, Zelllinien und Geräte wurden freundlicherweise von Prof. David K. Stevenson (Department of Pediatrics, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

Erste Untersuchungen zur Induktion der HO-1 auf mRNA-Ebene in Magenzellen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Thorsten Pohle (Universitätsklinikum Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster).

4 Ergebnisse

4.1 Effekte auf die Transkription des HO-1 Gens

Aktuelle Studien zeigen protektive, antioxidative sowie antiinflammatorische Eigenschaften für PPIs (Biswas et al. 2003; Blandizzi et al. 2005). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht vollständig geklärt. Direkte radikalfangende Eigenschaften sowie indirekte zellprotektive Wirkungen durch Induktion antioxidativer Proteine sind denkbar. Eine Vielzahl von Studien belegt eine protektive Wirkung der induzierbaren HO-1 sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Abgesehen von Studien mit Antisense- und Knock-out-Modellen verdeutlichen Untersuchungen von Patienten mit entsprechenden Gendefekten die zentrale Rolle der HO-1 bei der Abwehr von oxidativem Stress (Immenschuh et al. 2000; Otterbein et al. 2000b; Ono et al. 2003; Funk et al. 2004; Ono et al. 2004; Lo et al. 2007).

Da die Genaktivierung der HO-1 hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (Maines et al. 2005; Ryter et al. 2006; Alam et al. 2007), sollte zunächst untersucht werden, ob PPIs die Synthese der HO-1-mRNA sowie die HO-1-Promotoraktivität in unterschiedlichen Zellsystemen stimulieren.

Für die Northern-Blot-Analyse wurden gastrale Epithelzellen und humane Endothelzellen über einen Zeitraum von 8 Stunden mit Lansoprazol oder Omeprazol inkubiert. Als Positivkontrolle diente der potente HO-1-Induktor Cadmiumchlorid (CdCl_2) (10 μM). Zum Erstellen der Stammlösungen von Lansoprazol und Omeprazol wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel verwendet. DMSO hatte eine maximale Konzentration von 1,67 $\mu\text{l/ml}$ im Reaktionsansatz und zeigte in den eingesetzten Konzentrationen keine Eigeneffekte. Zur Kontrolle einer einheitlichen Gelbeladung wurde ein Abgleich mit β -Aktin vorgenommen.

Mit Hilfe der *Real time* RT-PCR wurden Untersuchungen zur Stimulation der Transkription des HO-1-Gens durch Lansoprazol in Makrophagen durchgeführt. Hier wurde zur Positivkontrolle an Albumin gebundenes Hämin (30 μM Methämoglobin, nicht dargestellt) als natürliches Substrat eingesetzt. Das verwendete Lösungsmittel DMSO hatte eine maximale Konzentration von 0,3 $\mu\text{l/ml}$ im Reaktionsansatz und zeigte keine Eigeneffekte. Die Ergebnisse wurden ebenfalls auf β -Aktin normiert.

Mit der nicht invasiven BLI-Methode wurden in stabil transfizierten Mausfibroblasten Untersuchungen zur HO-1-Promotoraktivität durchgeführt. Das BLI-Verfahren ermöglicht eine Bestimmung der Promotoraktivität ohne das Zellsystem durch Aufarbeitungsprozesse zu zerstören sowie die Gewinnung einer Vielzahl von Daten in kurzen Zeiträumen. Als Positivkontrolle diente ebenfalls Methämoglobin (30 μM , nicht dargestellt). Das verwendete Lösungsmittel DMSO hatte eine maximale Konzentration von 0,3 $\mu\text{l/ml}$ im Reaktionsansatz und zeigte keine Eigeneffekte.

4.1.1 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol in gastralen Epithelzellen

Die Integrität der Epithelschicht des Magens ist maßgeblich an der Barrierefunktion der Mukosa gegen aggressive Faktoren, wie z.B. ROS, beteiligt. Deswegen wurde zunächst in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Thorsten Pohle (Universitätsklinikum Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) untersucht, ob PPIs die HO-1 im gastralen Epithel induzieren. Als Modell für die Epithelzellschicht der Magenschleimhaut dienten die humanen gastralen Zelllinien AGS und KATO-III. Diese wurden 8 Stunden mit Lansoprazol (30-300 μM) inkubiert. Sowohl Lansoprazol (30-300 μM) als auch Omeprazol (Daten nicht dargestellt) zeigten sich als potente Stimulatoren des HO-1-Gens in gastralen Epithelzellen (Abb. 8) (Becker et al. 2006).

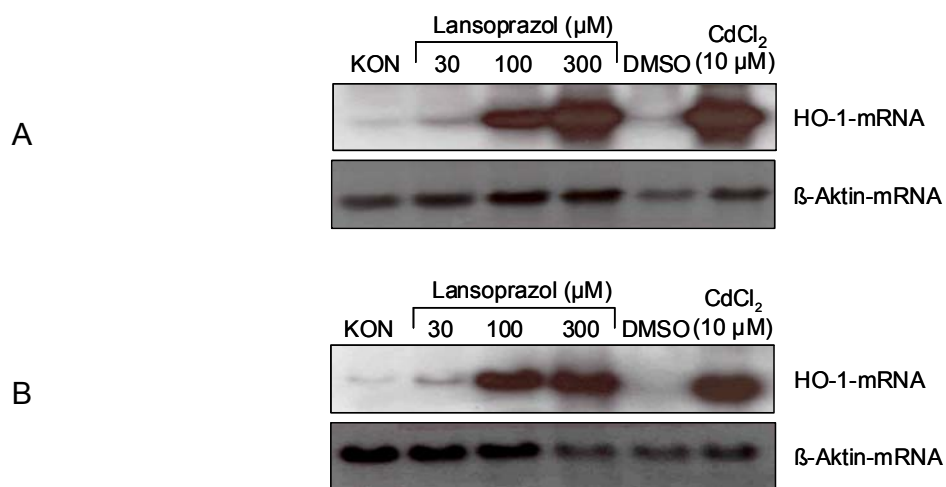


Abbildung 8: Effekt von Lansoprazol auf die Induktion der HO-1-mRNA in gastralen Epithelzellen.

Repräsentative Northern-Blots aus $n=3$ Einzelerperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. AGS-Zellen (A) und KATO-III-Zellen (B) wurden 8 Stunden mit Lansoprazol (30–300 μM) oder CdCl_2 (10 μM) inkubiert.

4.1.2 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol und Omeprazol in Endothelzellen

Im Weiteren sollte die Unabhängigkeit der gastroprotektiven Eigenschaften von der antisekretorischen Wirkung durch die Inkubation von Zellsystemen, die keinen Einfluss auf die Magensäureproduktion nehmen, geprüft werden. Endothelzellen und Makrophagen dienten dafür als geeignete Modelle, da sie einerseits im Magengewebe für die Blut- und Nährstoffversorgung sowie als zirkulierende Blutzellen für die Immunabwehr und bei Entzündungsprozessen von entscheidender Bedeutung sind, andererseits jedoch nicht über eine H^+/K^+ -ATPase verfügen (Jaisser et al. 1999).

Beide PPIs führten in Endothelzellen zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der HO-1-mRNA (Abb. 9). Dabei stimulierten Lansoprazol (5.6fach) und Omeprazol (6.9fach) die HO-1-mRNA-Bildung ähnlich stark wie die Positivkontrolle CdCl_2 (5,3fach). Lansoprazol zeigte bereits in geringerer Konzentration (30 μM signifikant) eine stärkere Aktivierung der mRNA-Bildung als Omeprazol (100 μM signifikant). Ähnliche Ergebnisse

konnten in einer weiteren humanen Endothelzelllinie (EAhy 926) detektiert werden (nicht dargestellt).

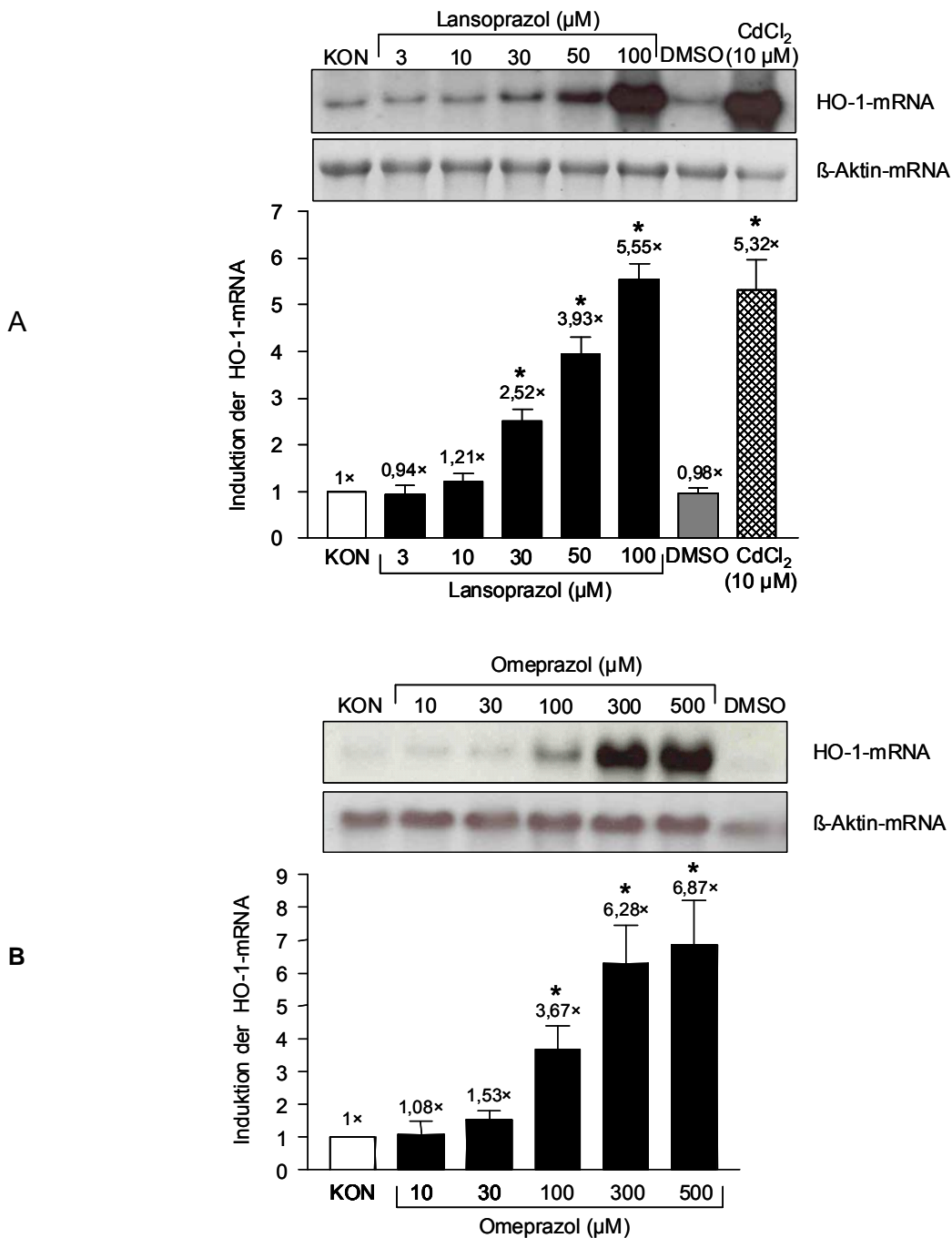


Abbildung 9: Effekt von Lansoprazol (A) und Omeprazol (B) auf die Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentative Northern-Blots mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 8 Stunden mit Lansoprazol (3–100 μM), Omeprazol (10–500 μM) oder CdCl₂ (10 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3–6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.3 Effekte von Ranitidin und Lansoprazol auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen

Prazole sind Mittel der 1. Wahl zur Therapie von säurebedingten Erkrankungen und zeigen u.a. bei der Abheilung von NSAID-induzierten Ulzerationen deutliche Vorteile gegenüber H₂-Antihistaminika (Singh et al. 2005). Die Induktion antioxidativer Gene, wie die HO-1, könnten die gastroprotektiven, säureunabhängigen Effekte begründen. Diese These sollte in einem direkten Vergleich zwischen Lansoprazol und Ranitidin zur Induktion der HO-1-mRNA geprüft werden. Das H₂-Antihistaminikum Ranitidin hatte in den Konzentrationsbereichen von 30 µM bis 300 µM im Unterschied zu Lansoprazol keinen Effekt auf die Transkription des HO-1-Gens (Abb. 10). Ähnliche Befunde konnten auch auf Proteinebene und für die HO-1-Promotoraktivität gezeigt werden (nicht dargestellt). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die gastroprotektiven Effekte der PPIs im Zusammenhang mit einer Induktion der HO-1 stehen könnten.

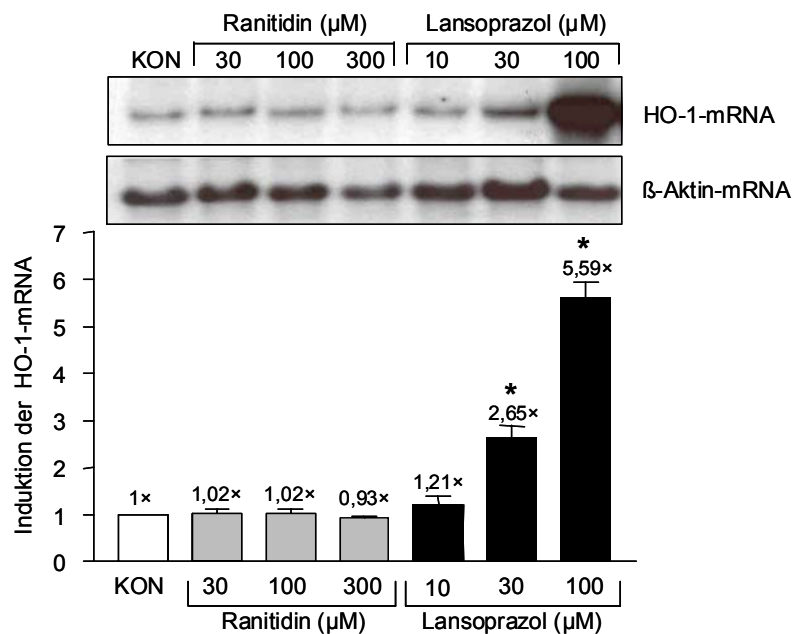


Abbildung 10: Effekt von Lansoprazol und Ranitidin auf die Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 8 Stunden mit Lansoprazol (10–100 µM) oder Ranitidin (30–300 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3–6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.4 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA in Makrophagen

Die Bestimmung der Lansoprazol-induzierten HO-1-mRNA-Synthese in J774-Zellen wurde mit Hilfe der *Real time* RT-PCR durchgeführt. Eine Inkubation von murinen Makrophagen mit Lansoprazol (3-100 μ M) über einen Zeitraum von 6 Stunden führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der HO-1-mRNA (Abb. 11). Dabei waren die Konzentrationsbereiche für signifikante Effekte mit denen in Endothelzellen identisch. Allerdings blieb die Stimulierung mit einer maximalen 3fachen Induktion der HO-1-mRNA unter den in Endothelzellen erzielten Effekten. Dies könnte sowohl in der geringeren Inkubationszeit als auch in den verschiedenen Zellmodellen begründet liegen.

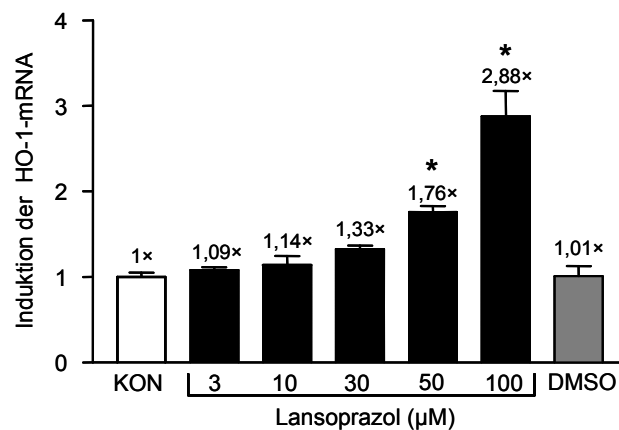


Abbildung 11: Effekt von Lansoprazol auf die Induktion der HO-1-mRNA in Makrophagen.

Real-time RT-PCR abgeglichen auf β -Aktin. J774-Zellen wurden 6 Stunden mit Lansoprazol (3–100 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.5 Effekte von Lansoprazol und Omeprazol am murinen HO-1-Promotor

Nach einer Inkubation der NIH3T3-HO-1-*luc*-Zellen mit Lansoprazol (10, 50 μ M) oder Omeprazol (30, 100 μ M) über einen Zeitraum von 2-24 Stunden erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität, welche mit der Aktivität des mHO-1-Promotors korreliert. Dabei wurde sowohl eine zeit- als auch eine konzentrationsabhängige Steigerung der Promotoraktivität mit beiden PPIs erzielt (Abb. 12, Tab. 7). Das Maximum einer 2fachen Stimulierung zeigte sich für 100 μ M Omeprazol im betrachteten Zeitraum nach 24 Stunden (Abb. 12B, Tab. 7). Mit Lansoprazol konnten ähnlich starke Effekte bereits in einer Konzentration von 50 μ M beobachtet werden (Abb. 12A, Tab. 7).

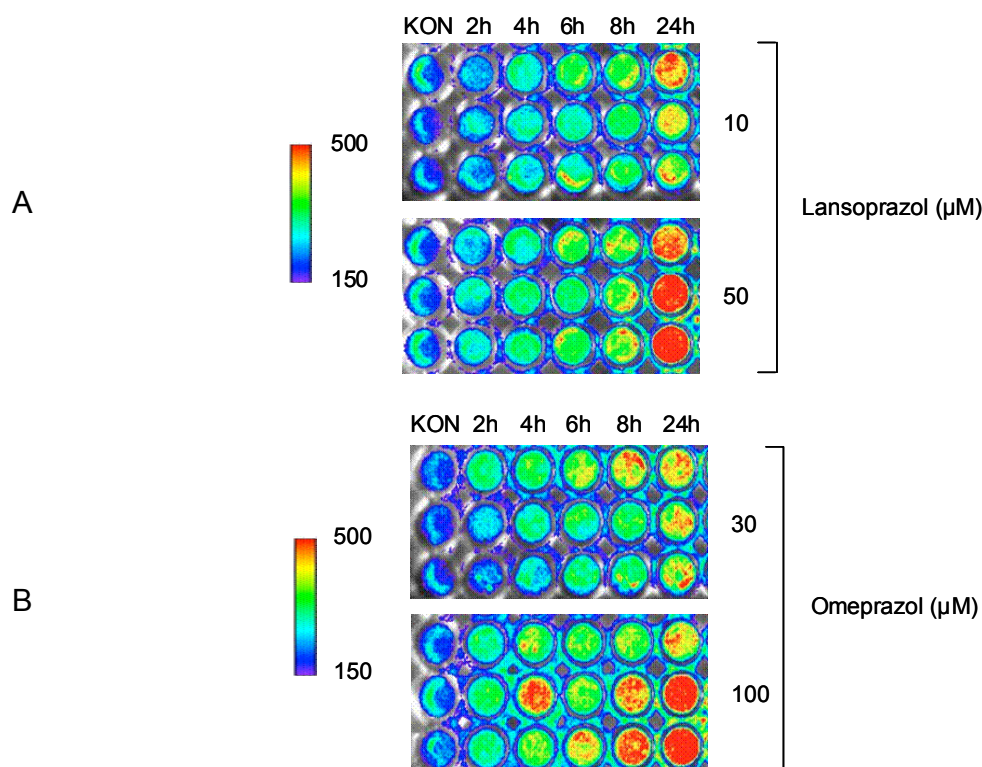


Abbildung 12: Repräsentative BL-Aufnahmen von Lansoprazol (A) und Omeprazol (B) in stabil transfizierten Mausfibroblasten.

NIH3T3-Zellen, stabil transfiziert mit dem 15kb mHO-1-*luc*-Promotor, wurden mit Lansoprazol (10, 50 μM) oder Omeprazol (30; 100 μM) 2-24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der *Firefly*-Luciferase nach Zugabe von Luciferin mittels *in vivo Imaging* bestimmt. Gezeigt sind repräsentative BL-Aufnahmen von n=3 Versuchsreihen pro Einzelexperiment. Alle BL-Aufnahmen wurden gemessen als Photonen/5 Minuten.

	2h	4h	6h	8h	24h
KON	-	-	-	-	1,00± 0,02
Lansoprazol (10 μM)	0,99± 0,03	1,14± 0,04	1,25± 0,06	1,44± 0,05*	1,68± 0,07*
Lansoprazol (50 μM)	1,12± 0,04	1,28± 0,05*	1,41± 0,05*	1,54± 0,03*	2,22± 0,06*
Omeprazol (30 μM)	1,07± 0,05	1,28± 0,06	1,34± 0,07*	1,42± 0,07*	1,69± 0,08*
Omeprazol (100 μM)	1,21± 0,06	1,33± 0,11*	1,44± 0,07*	1,51± 0,09*	1,99± 0,09*

Tabelle 7: Zeitabhängiger Effekt von Lansoprazol und Omeprazol auf die HO-1-Transkriptionsrate in stabil transfizierten Mausfibroblasten.

NIH3T3-Zellen, stabil transfiziert mit dem 15kb mHO-1-*luc*-Promotor, wurden mit Lansoprazol (10; 50 μM) oder Omeprazol (30; 100 μM) 2-24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der *Firefly*-Luciferase nach Zugabe von Luciferin mittels *in vivo Imaging* bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.6 Zusammenfassung

Eine Stimulierung des HO-1-Gens durch PPIs konnte in unterschiedlichen Zellsystemen sowie mit unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der HO-1-Transkriptionsaktivierung beobachtet werden. Lansoprazol und Omeprazol waren in der Lage, die mRNA-Menge durchschnittlich auf das 5,6 bzw. 6,9fache in Endothelzellen zu steigern. Ranitidin zeigte im Unterschied zu Lansoprazol keinen Einfluss auf die Stimulierung der HO-1-mRNA. Dieser Befund unterstützt die These, dass eine Induktion der HO-1 den gastroprotektiven Effekten der PPIs zugrunde liegen könnte. Da die PCR-Experimente in einem zeitlich begrenzten Rahmen durchgeführt wurden, konnte eine Erhöhung der HO-1-mRNA hier nur für Lansoprazol gezeigt werden. Allerdings führte die Inkubation von NIH3T3-HO-1-*Luc*-Zellen mit Omeprazol und Lansoprazol zur Aktivierung des mHO-1-Promotors in Mausfibroblasten, was darauf deutet, dass auch Omeprazol in der Lage ist, die HO-1-mRNA-Menge in anderen murinen Zelllinien zu erhöhen. Mit Hilfe der Promotoraktivitätsbestimmung über einen Zeitraum von 2-24 Stunden konnte neben einer Konzentrationsabhängigkeit ein zeitabhängiger Effekt auf die Transkription der HO-1 verdeutlicht werden (Abb. 12, Tab. 7). Lansoprazol zeigte sich in allen Untersuchungen zur HO-1-Transkription als das potentere der beiden Prazole.

4.2 HO-1-Induktion auf Proteinebene

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik sollte der Frage nachgegangen werden, ob die erhöhte Transkription der HO-1 durch PPIs auch eine vermehrte HO-1-Proteinsynthese zur Folge hat. Dazu wurden humane Endothelzellen (ECV 304) und murine Makrophagen (J774) mit den angegebenen Substanzen in verschiedenen Konzentrationen bzw. zu unterschiedlichen Zeitpunkten inkubiert und anschließend wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Als Positivkontrolle diente in jedem Experiment der bekannte HO-1-Induktor CdCl₂ (10 µM, nicht dargestellt).

4.2.1 Konzentrationsabhängige Effekte auf die Induktion des HO-1-Proteins in Endothelzellen

Humane Endothelzellen wurden zunächst mit Lansoprazol (10-100 µM) und Omeprazol (30-300 µM) inkubiert. Dabei war sowohl für Lansoprazol als auch für Omeprazol eine konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-Proteinexpression detektierbar (Abb. 13). Mit beiden PPIs konnte eine maximale knapp 3fache Stimulation der HO-1-Proteinsynthese gegenüber den unbehandelten Kontrollen erreicht werden. Lansoprazol zeigte jedoch insgesamt eine stärkere Potenz zur Induktion des HO-1-Proteins, da das Maximum der Stimulation bereits bei 100 µM erreicht wurde. Höhere Substanzkonzentrationen konnten die Proteinbildung nicht steigern (nicht dargestellt). Signifikante Effekte von Lansoprazol waren ab einer Konzentration von 50 µM zu beobachten (Abb. 13A). Bei Omeprazol hingegen konnten signifikante Effekte erst in einer Konzentration von 100 µM sowie eine maximale Stimulation erst mit 300 µM erzielt werden (Abb. 13B).

Das verwendete Lösungsmittel DMSO hatte eine maximale Konzentration von 1 $\mu\text{l/ml}$ im Reaktionsansatz und zeigte in diesem und den folgenden Experimenten zur HO-1-Proteininduktion keine Eigeneffekte (Abb. 13B).

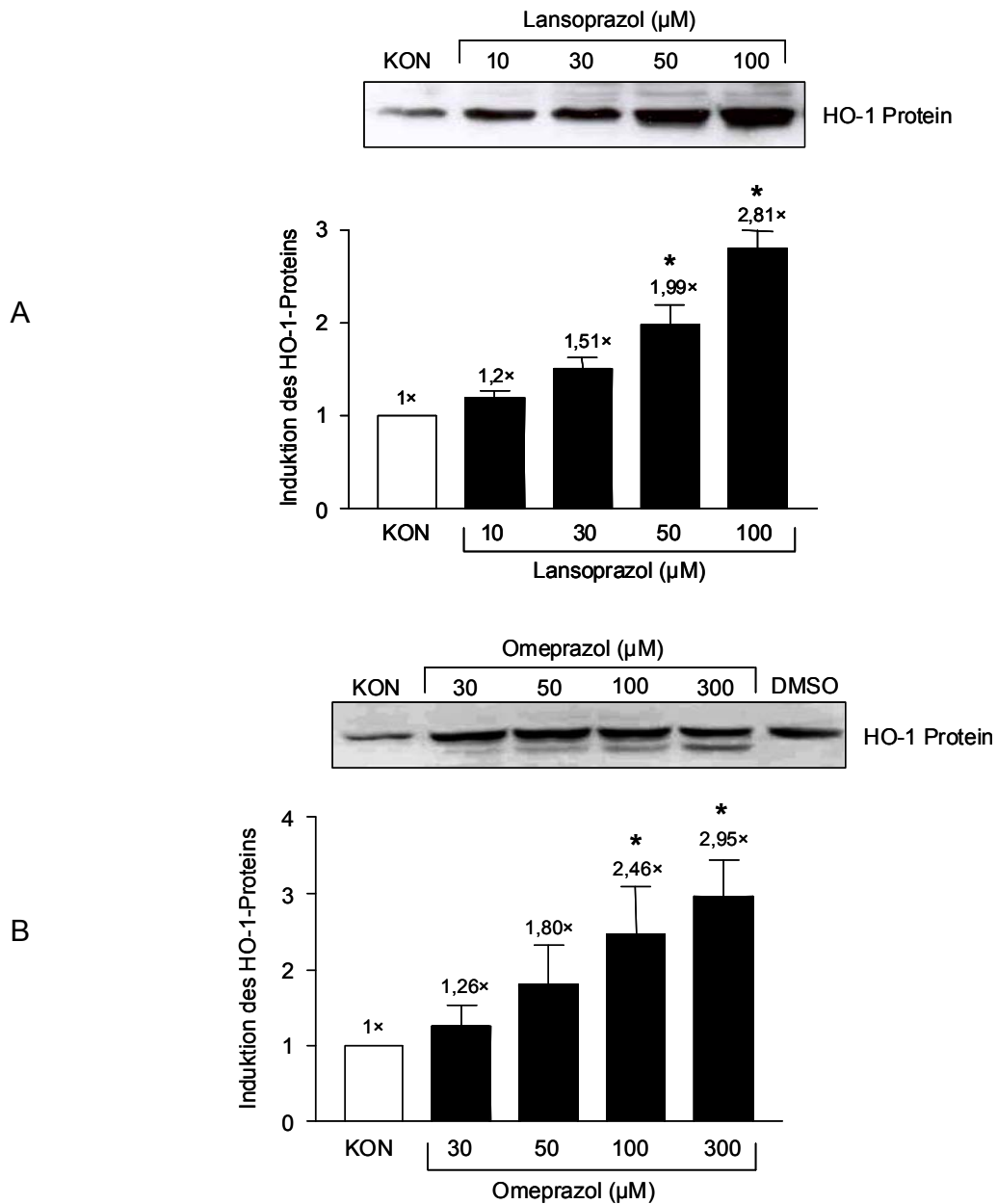


Abbildung 13: Effekt von Lansoprazol (A) und Omeprazol (B) auf die Induktion des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentative Western-Blots mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 8 Stunden mit Lansoprazol (10-100 μM) oder Omeprazol (30-300 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.2.2 Zeitabhängige Effekte auf die Induktion des HO-1-Proteins in Endothelzellen

Weiterhin wurde der Effekt von Lansoprazol und Omeprazol auf die HO-1-Proteininduktion in Endothelzellen in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dazu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 4-24 Stunden mit der jeweiligen Substanz inkubiert. Als Kontrolle (KON) dienten Zellen, die über 24 Stunden anstelle von PPIs mit Nüchternmedium behandelt wurden. Für beide PPIs konnte eine zeitabhängige Stimulierung der Proteinexpression gezeigt werden (Abb. 14). Eine signifikante Aktivierung der Proteinsynthese konnte für 100 μM Lansoprazol und 300 μM Omeprazol nach einer 8stündigen Inkubationszeit detektiert werden. Interessanterweise sind für Lansoprazol und Omeprazol unterschiedliche Effekte bei der zeitabhängigen HO-1-Proteininduktion zu beobachten. Während Lansoprazol im Vergleich zu Omeprazol in einer geringeren Konzentration bis zu 12 Stunden stärkere Effekte erzielte, führte eine längere Inkubationszeit (24 Stunden) bei Lansoprazol zu keiner weiteren Steigerung der HO-1-Proteinsynthese (Abb. 14A und C). Omeprazol (300 μM) erreichte hingegen erst nach 24stündiger Inkubation das Maximum an Stimulation im betrachteten Zeitraum (Abb. 14B und C).

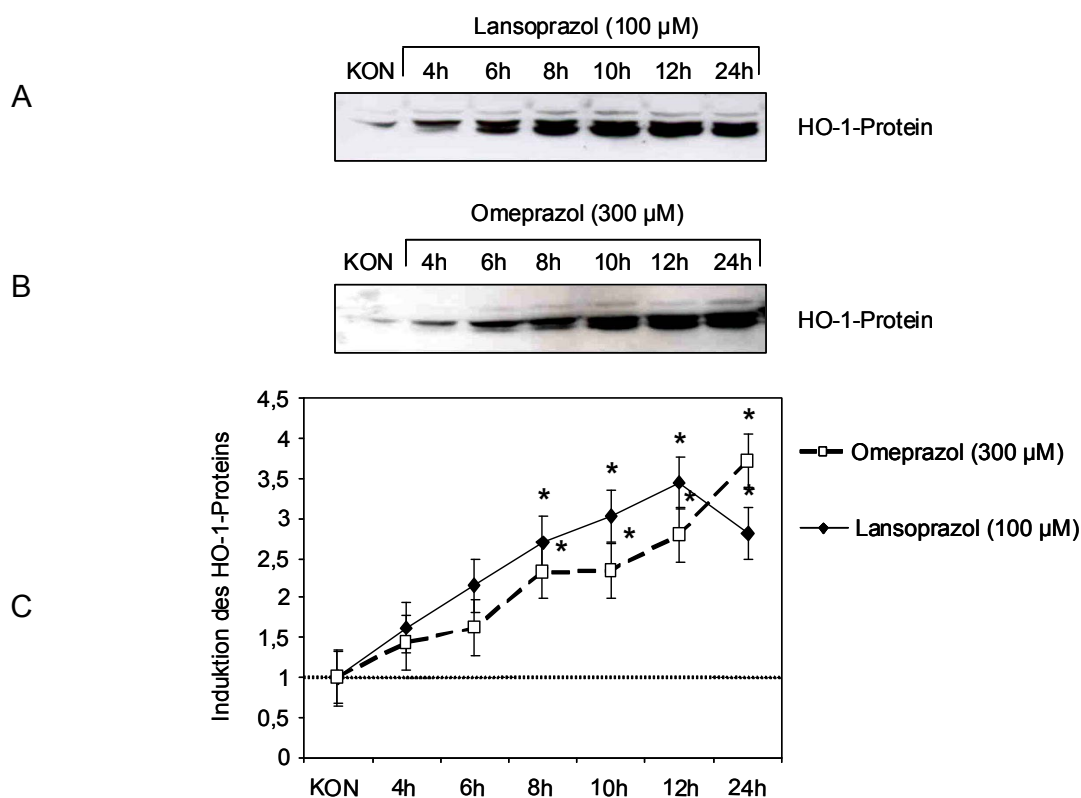
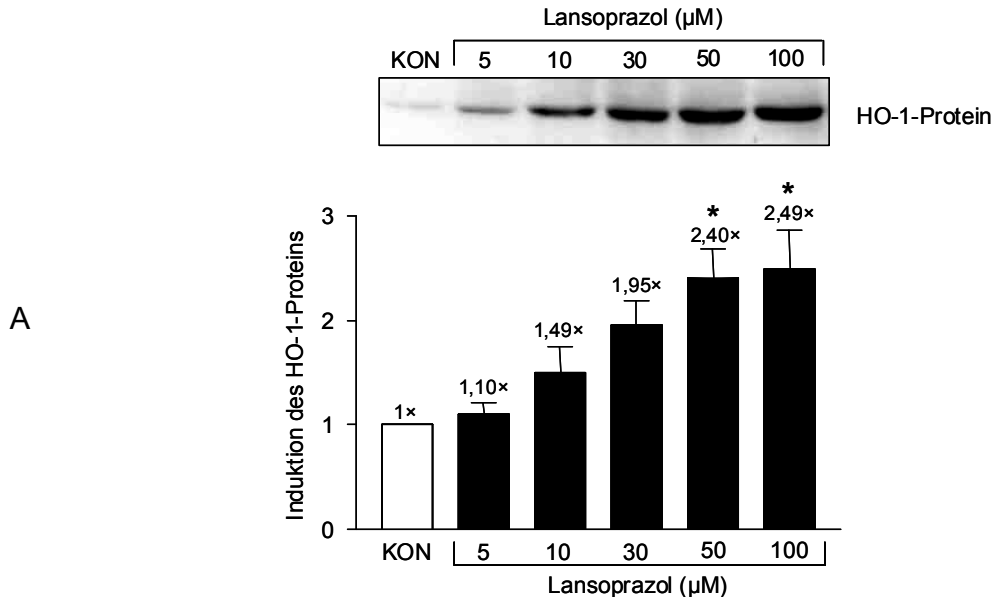


Abbildung 14: Effekt von Lansoprazol und Omeprazol auf die Induktion des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentative Western-Blots (A, B) mit densitometrische Auswertung (C). ECV304-Zellen wurden 4-24 Stunden mit 100 μM Lansoprazol oder 300 μM Omeprazol inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelerperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.2.3 Konzentrationsabhängige Effekte auf die Induktion des HO-1-Proteins in Makrophagen

Makrophagen zeigen eine hohe NADPH-Oxidase-Aktivität und gelten daher als eine Hauptquelle für ROS im Organismus (Griendling et al. 2000; Jankov et al. 2003; Cathcart 2004). Darüber hinaus spielen sie als Funktionseinheit des mukosalen Immunsystems eine entscheidende Rolle im Entzündungsgeschehen und scheinen besonders bei inflammatorischen Prozessen bedeutende Produzenten der HO-1 zu sein (Kampfer et al. 2001; Yachie et al. 2003). Vor diesem Hintergrund sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Induktion des antioxidativen HO-1-Proteins durch PPIs auch in Makrophagen möglich ist. Dazu wurden murine Makrophagen (J774) über einen Zeitraum von 8 Stunden mit Lansoprazol (5-100 μM) und Omeprazol (10-300 μM) inkubiert. Lansoprazol konnte eine signifikante Steigerung der HO-1-Proteinexpression bereits ab einer Konzentration von 50 μM erzielen (Abb. 15A). Als Maximum wurde eine 2,5fache Steigerung der HO-1-Expression gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen mit 100 μM Lansoprazol detektiert. Stärkere Effekte konnten auch mit höheren Substanzkonzentrationen nicht erreicht werden (300 μM , nicht dargestellt). Omeprazol konnte in einer Konzentration von 100 μM die HO-1-Proteinsynthese ähnlich stark induzieren (2,2fach), bei geringeren Konzentrationen waren allerdings keine signifikanten Effekte zu beobachten. Im Gegensatz zu Lansoprazol konnte mit 300 μM Omeprazol eine weitere Steigerung der HO-1-Expressionsrate provoziert werden (Abb. 15B).



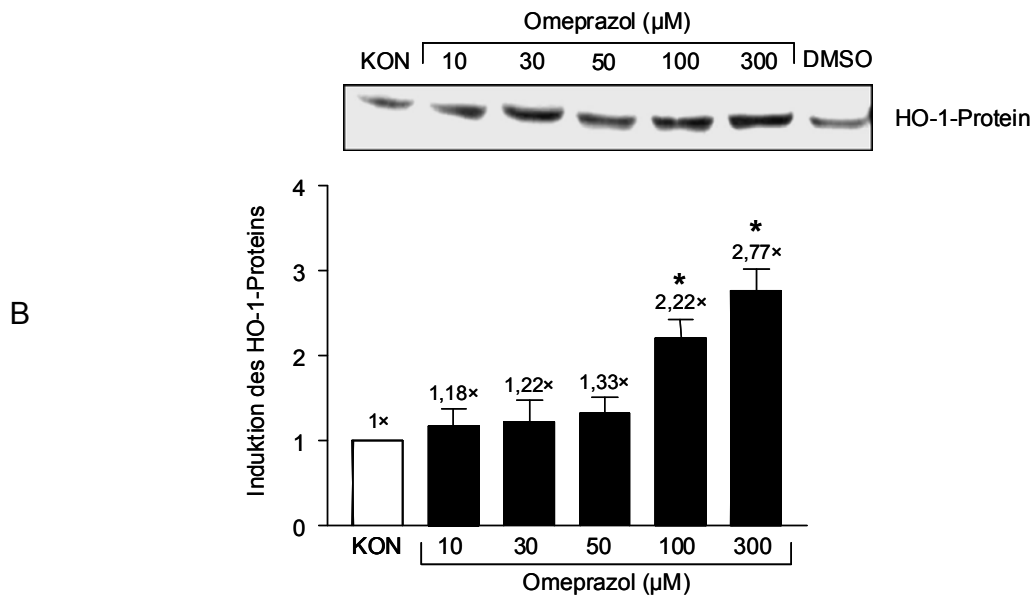


Abbildung 15: Effekt von Lansoprazol (A) und Omeprazol (B) auf die Induktion des HO-1-Proteins in Makrophagen.

Repräsentative Western-Blots mit densitometrischer Auswertung. J774-Zellen wurden 8 Stunden mit Lansoprazol (5–100 μM) oder Omeprazol (10–300 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.2.4 Zusammenfassung

Lansoprazol und Omeprazol aktivieren die HO-1-Proteinexpression konzentrations- und zeitabhängig in humanen Endothelzellen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Makrophagen und gastralen Epithelzellen (Becker et al. 2006) erzielt werden. Lansoprazol zeigte sich dabei als das potentere der beiden Prazole. Hinsichtlich der Effektivität und Intensität zur Proteininduktion traten in den verschiedenen Zellmodellen kaum Unterschiede auf.

4.3 Untersuchungen zur Viabilität

Höhere Substanzkonzentrationen oder längere Inkubationszeiten könnten möglicherweise eine toxische Wirkung haben. Um nekrotische Zellprozesse auszuschließen, wurde ein LDH-Assay durchgeführt. Die LDH-Freisetzung gilt als Marker für den nekrotischen Zelltod (Decker et al. 1988). Nach Inkubation der Zellen für 2-24 Stunden mit beiden PPIs, erfolgte die Bestimmung der LDH-Freisetzung im Zellüberstand durch photometrische Vermessung des gebildeten Formazansalzes. Die Intensität der Rotfärbung ist dabei proportional zu der Zahl der lysierten Zellen (Szekeres et al. 1981). Die Absorption der unbehandelten Kontrollzellen wurde 1 gesetzt.

4.3.1 Effekte von Omeprazol und Lansoprazol auf die Viabilität von Endothelzellen

Bis zu einer Inkubationszeit von 10 Stunden zeigten beide PPIs in der maximal verwendeten Konzentration von 500 μM in Endothelzellen keine erhöhte LDH-Freisetzung (Abb. 16). Nach 24 Stunden Inkubationszeit ist bei Lansoprazol eine signifikante LDH-Freisetzung zu beobachten. Deshalb wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit eine maximale Inkubationszeit von 12 Stunden mit 500 μM Lansoprazol in Endothelzellen nicht überschritten.

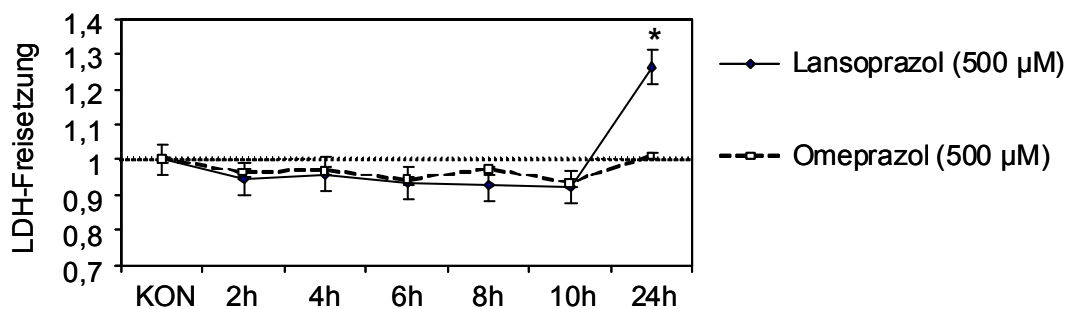
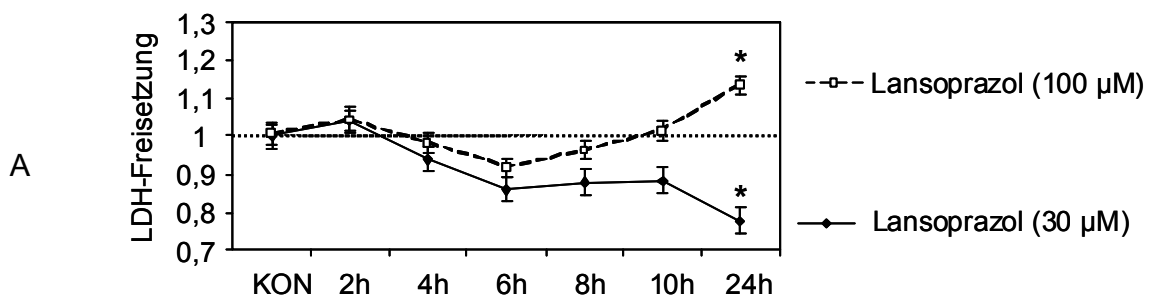


Abbildung 16: Effekt von Lansoprazol (A) und Omeprazol (B) auf die LDH-Freisetzung in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 2-24 Stunden mit Omeprazol (500 μM) oder Lansoprazol (500 μM) behandelt. Nach 24 Stunden wurde im Zellüberstand die LDH-Freisetzung gemessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p<0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.3.2 Effekte von Omeprazol und Lansoprazol auf die Viabilität von Makrophagen

Bei Lansoprazol wurde nach 24stündiger Inkubation mit 100 μM ein signifikanter Anstieg der LDH-Freisetzung in Makrophagen beobachtet (Abb. 17A). Aus diesem Grund wurden Makrophagen in der vorliegenden Arbeit maximal über einen Zeitraum von 12 Stunden mit 100 μM Lansoprazol inkubiert. Omeprazol zeigte in den verwendeten Konzentrationen (100, 300 μM) keine vermehrte LDH-Freisetzung in Makrophagen (Abb. 17B).



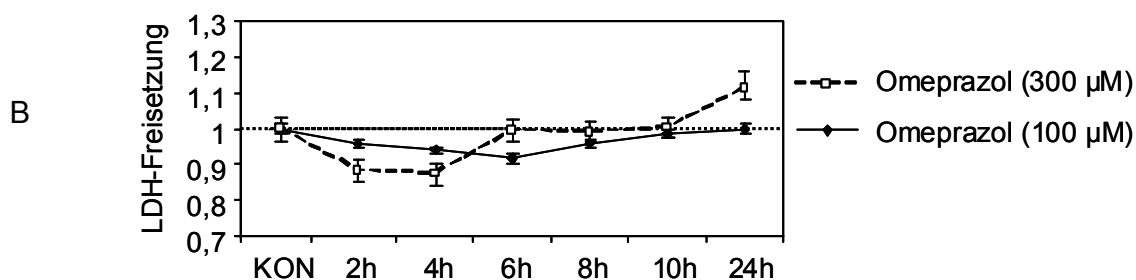


Abbildung 17: Effekt von Lansoprazol (A) oder Omeprazol (B) auf die LDH-Freisetzung in Makrophagen.

J774-Zellen wurden 2-24 Stunden mit Omeprazol (100-300 µM) und Lansoprazol (30-100 µM) behandelt. Nach 24 Stunden wurde im Zellüberstand die LDH-Freisetzung gemessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.3.3 Zusammenfassung

Sowohl in Makrophagen als auch in Endothelzellen zeigte sich bis zu einer Inkubationszeit von 12 Stunden für die maximal verwendeten Konzentrationen von Lansoprazol und Omeprazol keine Zellnekrose. Eine signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung wurde für Lansoprazol nach einer 24stündigen Inkubationszeit beobachtet. In Makrophagen wurde eine erhöhte LDH-Freisetzung durch Lansoprazol bereits in geringeren Konzentrationen (100 µM) im Vergleich zu den Endothelzellen (500 µM) detektiert. Dies lässt darauf schließen, dass Makrophagen ein, im Hinblick auf toxische Substanzeffekte, sensibleres Zellsystem sind. Aufgrund dieser Ergebnisse kann Zellnekrose durch mögliche toxische Effekte der PPIs in hohen Konzentrationen für die, in dieser Arbeit gewählten Untersuchungsbedingungen ausgeschlossen werden.

4.4 HO-Aktivität im Zellsystem

Mittels spektrometrischer Bestimmung der gebildeten Bilirubinmenge sollte untersucht werden, ob die Induktion der HO-1-Transkription und -Translation durch PPIs auch zu einem katalytisch aktiven Enzym führt. Nach einer 12stündigen Inkubation in Endothelzellen oder in Makrophagen wurde die enzymatische Aktivität der HO durch Bilirubinmessung im zellfreien System bestimmt. Hierbei wird die Gesamtaktivität der Isoenzyme ermittelt. Allerdings stellt die HO-1 das einzig induzierbare Isoenzym dar. Als Positivkontrolle diente Hämin (10 µM, nicht dargestellt), welches als Häm-Analogen ähnlich dem natürlichen Substrat in der Lage ist, die HO zu aktivieren. Das verwendete Lösungsmittel DMSO hatte eine maximale Konzentration von 1,67 µl/ml im Reaktionsansatz und zeigte in den eingesetzten Konzentrationen keine Eigeneffekte.

4.4.1 Effekt auf die HO-Aktivität in Endothelzellen

Die Inkubation der Endothelzellen mit Lansoprazol (50-500 μM) und Omeprazol (30-500 μM) führte mit zunehmender Konzentration zu einer Steigerung der HO-Aktivität (Abb. 18). Lansoprazol konnte die Bilirubinmenge um bis zu 66% gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen erhöhen. Signifikante Effekte zeigten sich im Unterschied zur Proteininduktion jedoch erst bei Konzentrationen ab 300 μM (Abb 18A). Interessanterweise konnte mit Omeprazol eine signifikante Aktivitätserhöhung bereits bei einer Konzentration von 100 μM erzielt werden. Im Unterschied zur Transkriptions- und Translationsebene führte Omeprazol im Vergleich zu Lansoprazol bereits in geringeren Konzentrationen (300 μM) zu einer stärkeren HO-Aktivitätssteigerung (Abb. 18B).

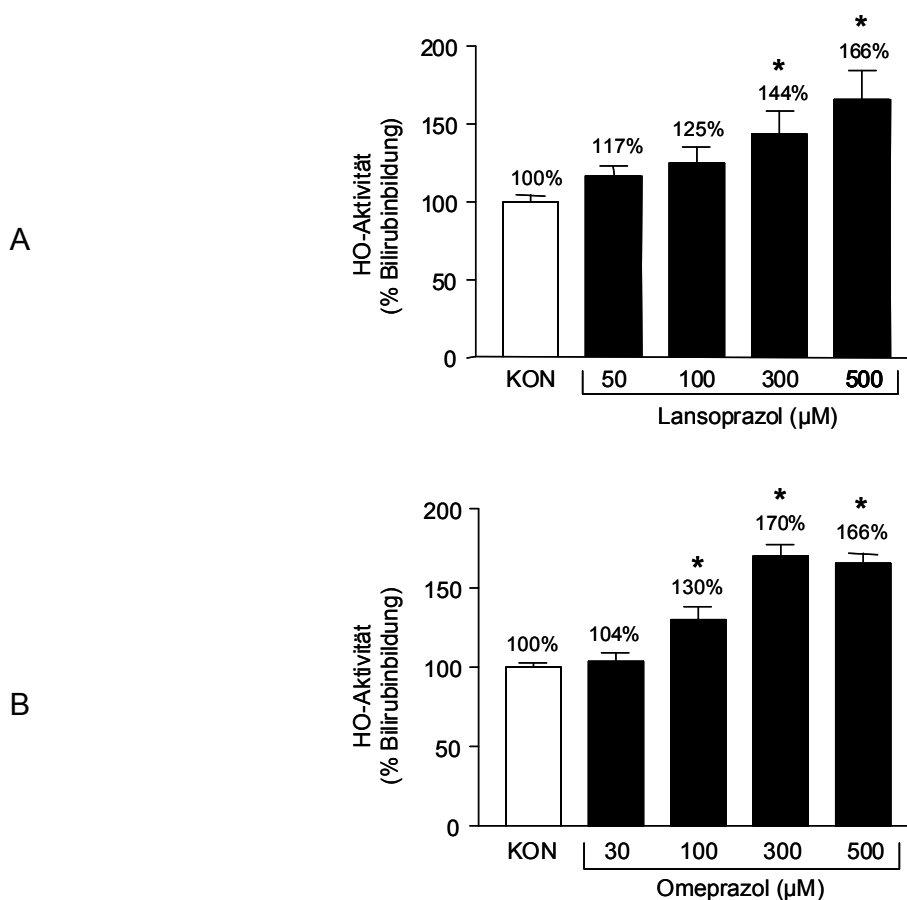


Abbildung 18: Effekt von Lansoprazol (A) und Omeprazol (B) auf die HO-Aktivität in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 12 Stunden mit Lansoprazol (50-500 μM) oder Omeprazol (30-500 μM) inkubiert. Nach anschließender Ernte und enzymatischer Reaktion wurde die Menge an gebildetem Bilirubin bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.2 Effekt auf die HO-Aktivität in Makrophagen

Die Inkubation von Makrophagen mit Lansoprazol (10-100 μM) über einen Zeitraum von 12 Stunden führte zu einer signifikanten Stimulierung der Bilirubinbildung (Abb. 19). Die Aktivität der HO konnte bei einer Substanzkonzentration von 100 μM maximal um 54% gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen gesteigert werden. Die Ergebnisse von LDH-Tests (Abb. 16 und 17) verdeutlichen, dass es sich bei Makrophagen im Vergleich zu Endothelzellen um ein sensibleres Zellsystem handelt. Um eine mögliche Stressinduktion auszuschließen, wurden keine höheren Substanzkonzentrationen verwendet.

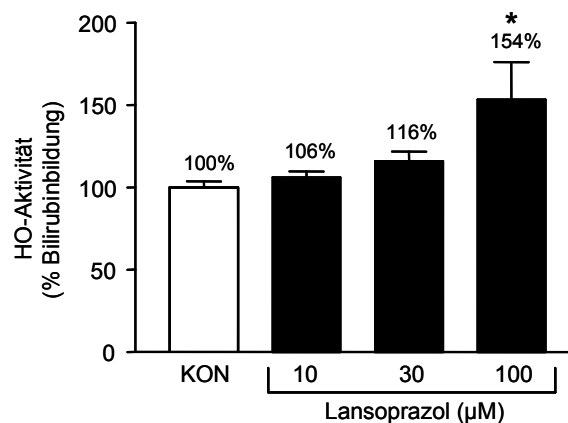


Abbildung 19: Effekt von Lansoprazol auf die HO-Aktivität in Makrophagen.

J774-Zellen wurden 12 Stunden mit Lansoprazol (10-100 μM) inkubiert. Nach anschließender Ernte und enzymatischer Reaktion wurde die Menge an gebildetem Bilirubin bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten.* $p<0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.3 Zusammenfassung

Die Induktion der HO-1-Proteinsynthese durch Lansoprazol und Omeprazol führte in Endothelzellen und Makrophagen zu einem katalytisch aktiven Enzym. Im Unterschied zu den Effekten auf die Transkription und Translation zeigte sich Lansoprazol hier nicht als das potentere Prazol.

4.5 Ferritininduktion auf Proteinebene

Das Eisenspeicherprotein Ferritin gilt neben der als antioxidativ beschriebenen HO-1 als weiteres induzierbares zytoprotektives Enzym. Die Synthese von Ferritin ist u.a. abhängig vom Gehalt an freiem Eisen (Fe^{2+}). Da zweiwertiges Eisen ein Abbauprodukt des Häm-katabolismus darstellt, ist an eine HO-1-Induktion meist eine erhöhte Ferritinexpression gekoppelt (Tsuji et al. 2000; Balla et al. 2007b). Unter diesem Aspekt sollte sowohl in Endothelzellen als auch in Makrophagen untersucht werden, ob eine Induktion des Ferritinproteins durch PPIs möglich ist. Dazu wurden die Zellen über

verschiedene Zeiträume inkubiert und mit Hilfe der Western-Blot-Analyse auf eine konzentrations- und zeitabhängige Induktion der Ferritinsynthese geprüft.

4.5.1 Zeitabhängige Induktion des Ferritinproteins in Endothelzellen

Eine vermehrte Ferritinsynthese erscheint häufig im Tandem mit einer HO-1-Induktion. Deshalb sollte zunächst der Einfluss von PPIs auf die Ferritinbildung in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden. Mit 100 μM Lansoprazol und 300 μM Omeprazol konnte im Inkubationszeitraum von 24 Stunden eine deutliche Zeitabhängigkeit der Ferritinexpression aufgezeigt werden (Abb. 20). Als Kontrolle dienten Zellen, die über 24 Stunden anstelle von PPIs mit Nüchternmedium behandelt wurden. Die Menge an gebildetem Ferritinprotein erhöhte sich im Gegensatz zur HO-1-Proteininduktion bei beiden PPIs mit zunehmender Inkubationsdauer und erreichte im betrachteten Zeitraum nach 24 Stunden ihr Maximum (Abb. 20C).

In der maximalen Konzentration von 1 $\mu\text{l/ml}$ im Reaktionsansatz zeigte DMSO in diesem und den folgenden Experimenten zur Ferritinproteininduktion keine Eigeneffekte (Abb. 21B).

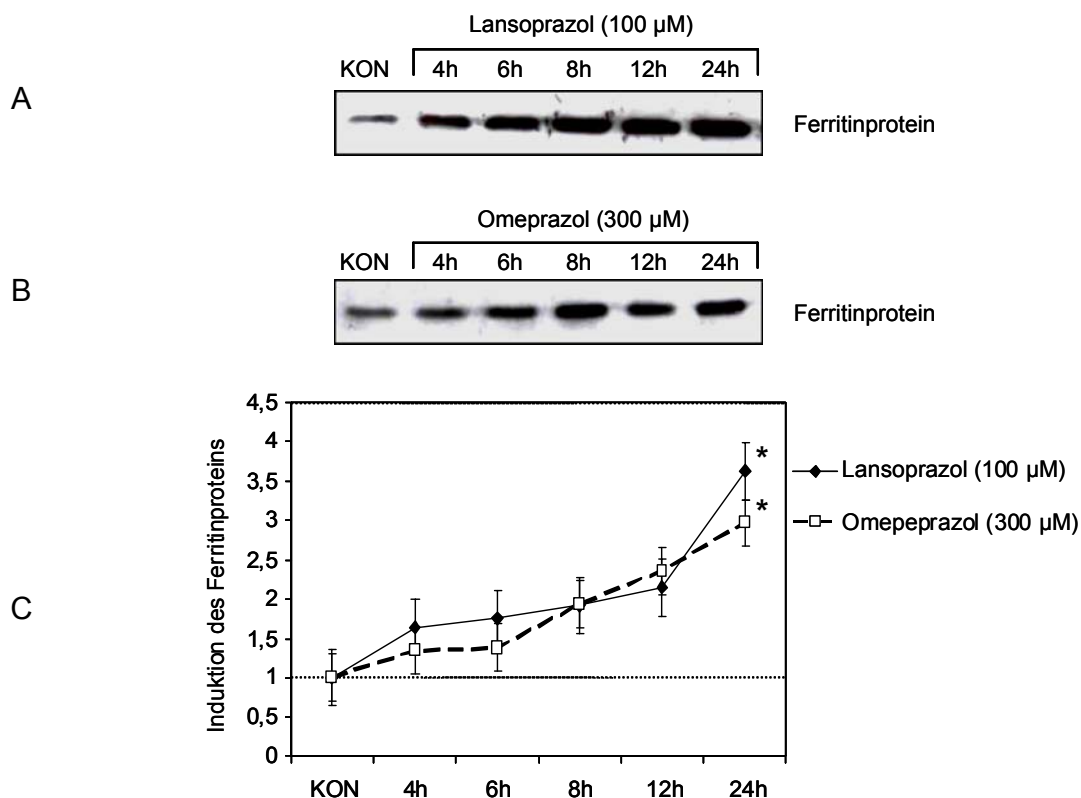


Abbildung 20: Effekt von Lansoprazol und Omeprazol auf die zeitabhängige Induktion des Ferritinproteins in Endothelzellen.

Repräsentative Western-Blots mit densitometrische Auswertung. ECV304-Zellen wurden 4-24 Stunden mit Lansoprazol (100 μM) oder Omeprazol (300 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelerperimenten. * $p<0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.5.2 Konzentrationsabhängige Induktion des Ferritinproteins in Endothelzellen

Aufgrund der Daten zur zeitabhängigen Ferritininduktion wurden für die Endothelzellen längere Inkubationszeiten gewählt. Eine 24stündige Inkubation der Zellen mit Lansoprazol (10-100 μM) und Omeprazol (10-300 μM) führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion des Ferritinproteins (Abb. 21). Lansoprazol (100 μM) (Abb. 21A) zeigte mit einer maximalen 3,6fachen Stimulation eine etwas höhere Effektivität auf die Ferritinsynthese als Omeprazol, welches die Expression in einer Konzentration von 300 μM im Durchschnitt um das 3fache steigern konnte (Abb. 21B).

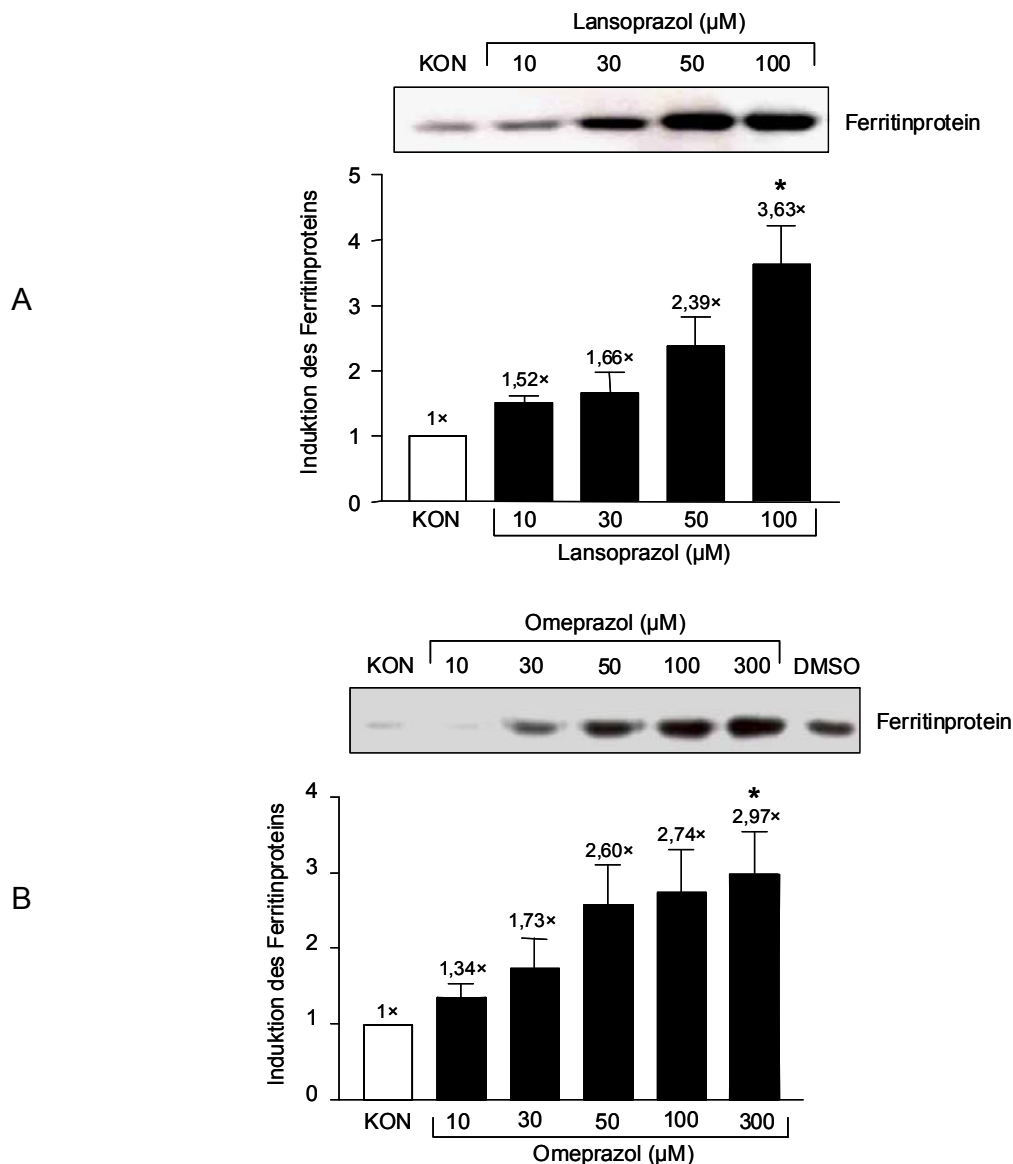


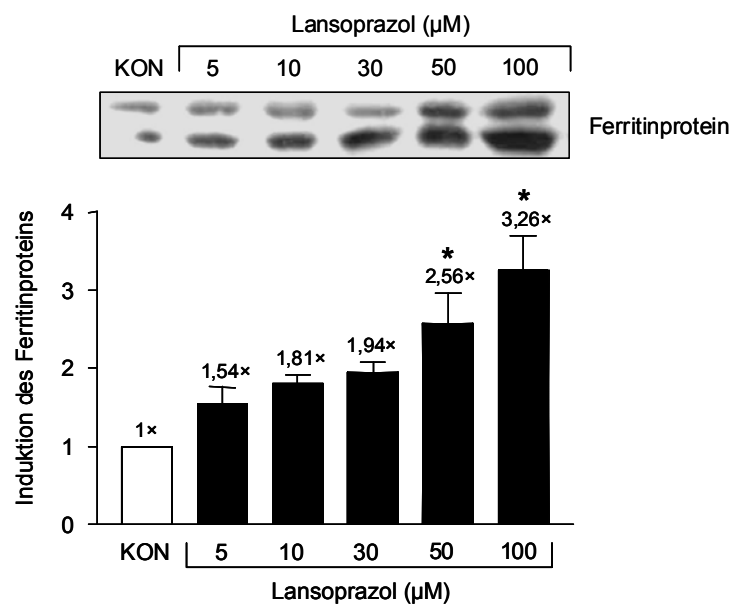
Abbildung 21: Effekt von Lansoprazol (A) und Omeprazol (B) auf die Induktion des Ferritinproteins in Endothelzellen.

Repräsentative Western-Blots mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit Lansoprazol (10–100 μM) oder Omeprazol (10-300 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.5.3 Induktion des Ferritinproteins in Makrophagen

Analog zum HO-1-Protein wurde die Ferritininduktion durch PPIs in einem zweiten Zellkulturmodell untersucht. Für beide PPIs konnten auch in Makrophagen eine konzentrationsabhängige Induktion der Ferritinsynthese beobachtet werden. Lansoprazol zeigte sich hier ebenfalls als stärkerer Induktor und konnte die Expressionsrate in einer Konzentration von 100 μM durchschnittlich auf das 3fache steigern (Abb. 22A). Mit 300 μM Omeprazol konnte maximal eine Verdopplung der Proteinsynthese erzielt werden (Abb. 22B). Aufgrund von Viabilitätsuntersuchungen (Abb. 17) betrug die Inkubationszeit in Makrophagen allerdings nur 12 Stunden. Dies könnte die leicht geringeren Expressionsraten im Vergleich zu Endothelzellen erklären.

A



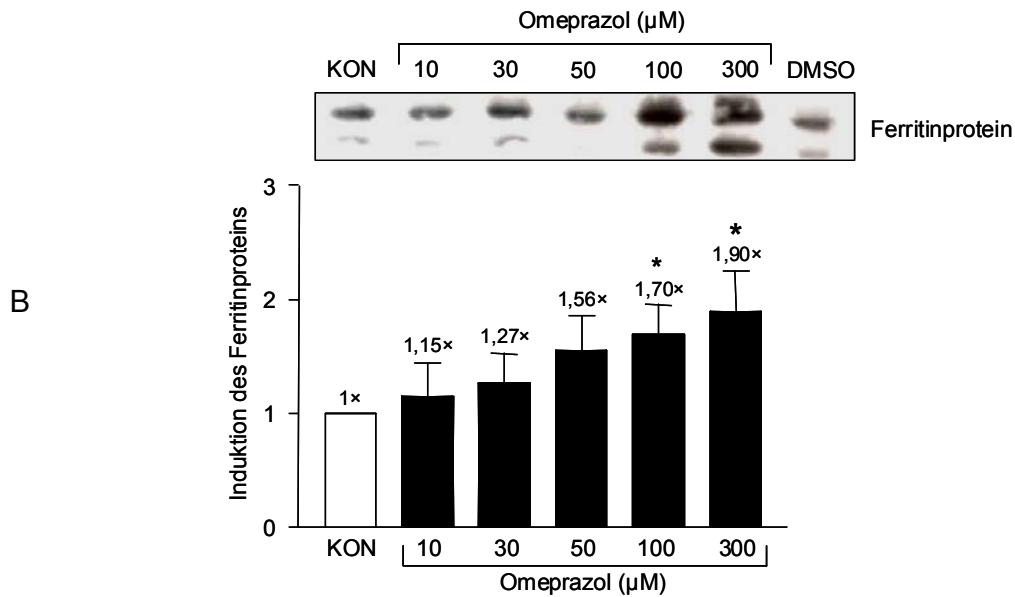


Abbildung 22: Effekt von Lansoprazol (A) und Omeprazol (B) auf die Induktion des Ferritinproteins in Makrophagen.

Repräsentative Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. J774 wurden 12 Stunden mit Lansoprazol (5–100 µM) oder Omeprazol (10–300 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p<0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.5.4 Zusammenfassung

Lansoprazol und Omeprazol führen zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Induktion des Ferritinproteins in Endothelzellen. Dabei waren die für die Stimulierung der Ferritinproteinbildung erforderlichen Konzentrationen mit denen der HO-1-Proteinbildung identisch. Dass eine signifikante Erhöhung der Ferritinsynthese erst nach 24 Stunden erreicht wird, belegt eine HO-1-abhängige Ferritininduktion. In Makrophagen konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Aktivierung der Ferritinsynthese durch Lansoprazol und Omeprazol erzielt werden. Als Maximum der Inkubationszeit wurden 12 Stunden gewählt, da in Makrophagen bei längeren Inkubationszeiten eine Stressinduktion nicht auszuschließen war (Abb. 17). Die geringere Inkubationszeit erklärt die etwas schwächeren Effekte auf die Ferritinproteinbildung im Vergleich zu Endothelzellen, welche v.a. für Omeprazol beobachtet wurden. Lansoprazol induziert die Expression des Ferritinproteins ähnlich stark wie in Endothelzellen und scheint somit auch bei der Ferritininduktion etwas potenter als Omeprazol zu sein.

4.6 HO-1-Genregulation

Die Induktion der HO-1 wird durch die meisten Induktoren primär auf transkriptioneller Ebene reguliert (Sikorski et al. 2004; Alam et al. 2007). Welche Regulationsmechanismen bei der Stimulation des HO-1-Gens durch PPIs möglicherweise von Bedeutung sind, sollte mit verschiedenen Hemmstoffexperimenten geklärt werden. Die Untersuchungen zur HO-1-Genregulation wurden, abgesehen vom Einfluss durch ROS, exemplarisch mit Lansoprazol durchgeführt.

4.6.1 Einfluss des Transkriptionsblockers Actinomycin D und des Translationblockers Cycloheximid

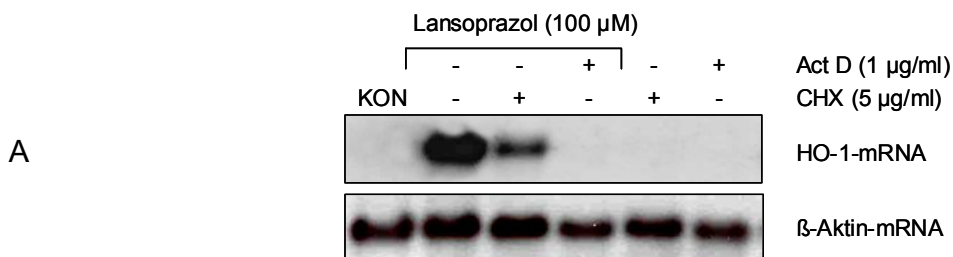
Actinomycin D (Act D) inhibiert durch Interkalation in die DNA die Transkription zu RNA. Versuche mit Act D sollten klären, ob für die Lansoprazol-vermittelte HO-1-mRNA-Induktion eine *De-novo*-RNA-Synthese erforderlich ist. Dazu wurden die Endothelzellen einer 20minütigen Vorinkubation mit Act D (1 µg/ml) unterzogen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 100 µM Lansoprazol über einen Zeitraum von 8 Stunden.

Die Lansoprazol-vermittelte HO-1-mRNA-Bildung konnte mit dem Transkriptioninhibitor Act D fast vollständig aufgehoben werden. In Anwesenheit von Act D war die durch Lansoprazol stimulierte HO-1-mRNA-Synthese gegenüber unbehandelten Kontrollzellen im Durchschnitt um 90% herabgesetzt (Abb. 23).

Abgesehen von einer *De-novo*-RNA-Synthese könnte auch eine *De-novo*-Synthese von Proteinen Einfluss auf die Stimulierung des HO-1-Gens durch Lansoprazol nehmen. Diese Frage sollte mit Hilfe von Cycloheximid (CHX) beantwortet werden. CHX ist ein Proteinsynthese-Hemmstoff, der die Translation von mRNA an Ribosomen blockiert.

Die Endothelzellen wurden 20 Minuten mit CHX (5 µg/ml) vorbehandelt. Im Anschluss daran folgte die Inkubation mit 100 µM Lansoprazol für 8 Stunden.

Eine Vorinkubation mit CHX verminderte die Lansoprazol-vermittelte mRNA-Bildung im Durchschnitt um 55% (Abb. 23). Act D und CHX zeigten keine Eigeneffekte.



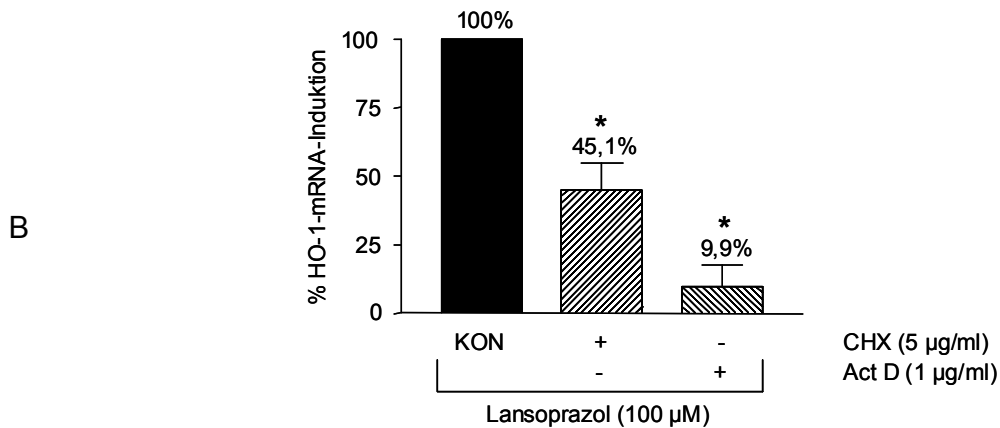


Abbildung 23: Effekt des Transkriptionsblockers Actinomycin D (Act D) und des Translationsblockers Cycloheximid (CHX) auf die HO-1-mRNA-Induktion durch Lansoprazol in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot aus $n=3-6$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle (A) und densitometrischer Auswertung (B). ECV304-Zellen wurden 20 Minuten mit Akt D (1 $\mu\text{g/ml}$) oder CHX (5 $\mu\text{g/ml}$) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit Lansoprazol (100 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p<0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Die Ergebnisse zeigen, dass die HO-1-mRNA-Induktion durch Lansoprazol von einer *De-novo*-mRNA-Synthese abhängt und vermutlich transkriptionell reguliert wird. Darüber hinaus sprechen die Befunde mit dem Translationsinhibitor CHX für die Beteiligung von neu gebildeten Proteinen an der Genaktivierung durch Lansoprazol. Die Abhängigkeit einer HO-1-Stimulierung von einer *De-novo*-Proteinsynthese lässt die Beteiligung von kurzlebigen Peptiden mit einer schnellen *turn over* Rate vermuten. Monomere der Transkriptionsfaktoren AP-1 (Jun und Fos) zählen z.B. zu diesen *Immediate-early-response*-Genen. Ihre Bedeutung bei der HO-1-Induktion wurde bereits in einer Reihe von Studien diskutiert (Camhi et al. 1998; Elbirt et al. 1998; Terry et al. 1998; Kierner et al. 2003).

4.6.2 Einfluss von ROS

Die Expression der induzierbaren HO-1 wird im Organismus u.a. als Reaktion auf oxidativen Stress angeregt (Choi et al. 1996; Otterbein et al. 2000b). Da die PPIs im Zellmodell z.T. in relativ hohen Substanzkonzentrationen verwendet wurden, sollte überprüft werden, ob die Induktion der HO-1 unabhängig von oxidativem Stress erfolgt. Dies wurde mit Hilfe der Superoxiddismutase (SOD) untersucht.

Die SOD katalysiert in eukaryotischen Zellen die Umwandlung von Superoxidradikalen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Das gebildete Wasserstoffperoxid wird über Katalasen zu Sauerstoff und Wasser disproportioniert. Im Anschluss an eine 20minütige Vorinkubation der Endothelzellen mit SOD (15 U/ml) erfolgte die Hauptinkubation mit Lansoprazol (30-100 μM) oder Omeprazol (100-500 μM) über einen Zeitraum von 8 Stunden. Die ausschließlich mit PPIs und nicht mit SOD-behandelten Zellen wurden für die Auswertung jeweils 100% gesetzt.

Die Vorbehandlung mit SOD zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion der HO-1-mRNA durch PPIs (Abb. 24). Eigeneffekte von SOD wurden nicht detektiert. Diese Befunde verdeutlichen, dass Superoxidradikale bei der Stimulierung des HO-1-Gens durch Lansoprazol und Omeprazol in den verwendeten Konzentrationsbereichen keine Bedeutung haben.

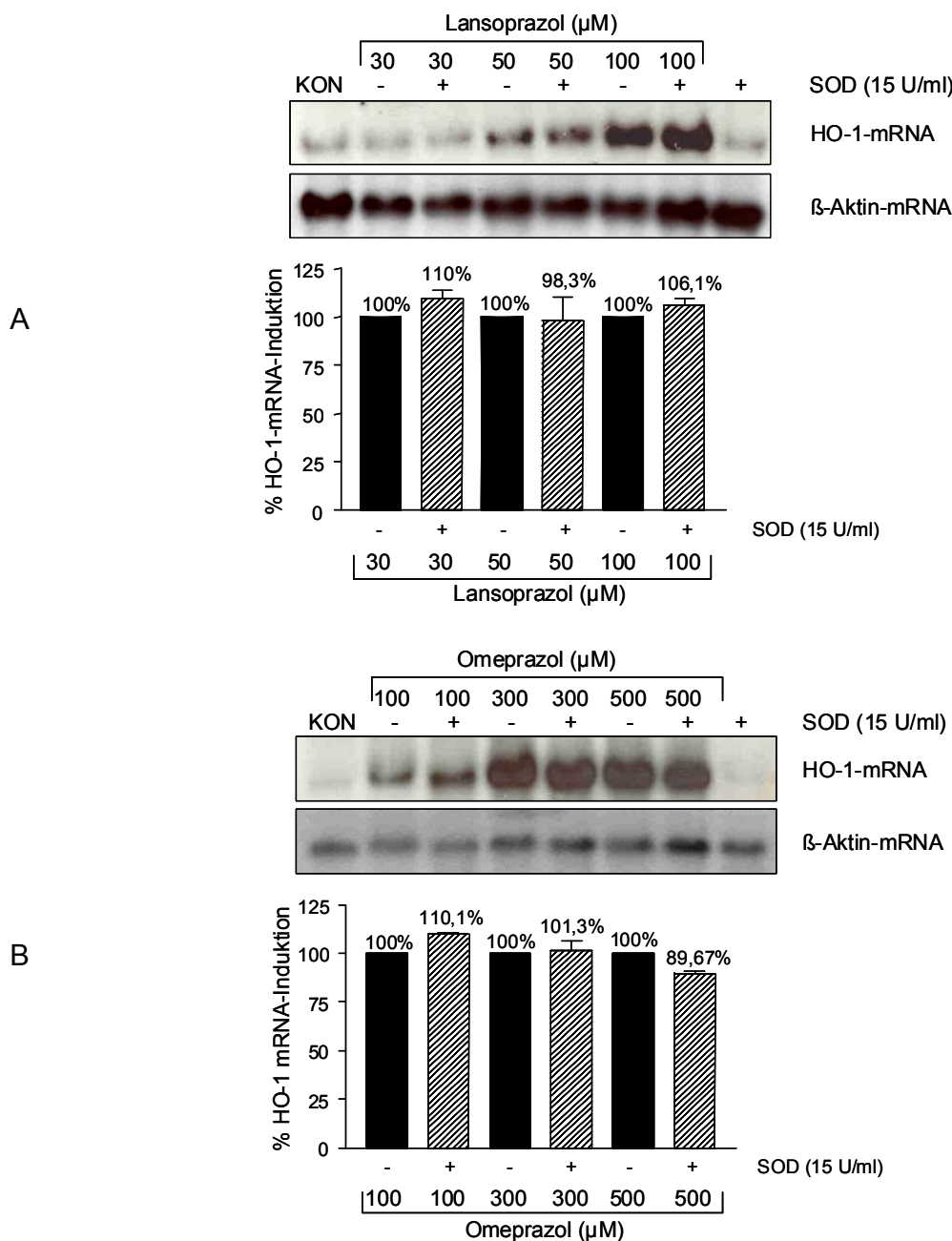


Abbildung 24: Effekt der SOD auf die HO-1-mRNA-Induktion durch Lansoprazol (A) und Omeprazol (B) in Endothelzellen.

Repräsentative Northern-Blots mit densitometrischer Auswertung und β -Aktin-Kontrolle. ECV 304-Zellen wurden 20 Minuten mit SOD (15 U/ml) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit Lansoprazol (30-100 μM) oder Omeprazol (100-500 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.6.3 Einfluss des TRX/TRX-Reduktasesystems und NO-abhängiger Stoffwechselwege

TRX hat sich in jüngster Zeit ebenso wie die HO-1 als antioxidatives Protein etabliert. Als intrazellulärer Redoxregulator kontrolliert TRX u.a. den Redoxstatus von AP-1 und NF- κ B (Watson et al. 2004; Malik et al. 2006), welche relevante Transkriptionsfaktoren der HO-1-Genaktivierung darstellen (Alam et al. 2007). Neuere Studien deuten auf einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen TRX-Stimulation und HO-1-Induktion (Wiesel et al. 2000; Ejima et al. 2002; Mostert et al. 2003; Trigona et al. 2006).

Der Einfluss des TRX/TRX-Reduktasesystems auf die HO-1-Genaktivierung durch PPIs sollte am Beispiel von Lansoprazol mit dem TRX-Reduktase Inhibitor DNCB (1-Chlor-2,4-Dinitrobenzen) untersucht werden. DNCB ist ein potenter und irreversibler Inhibitor der TRX-Reduktase, welcher die SH-Gruppe der TRX-Reduktase alkyliert (Arner et al. 1995).

Die Endothelzellen wurden zunächst 20 Minuten mit DNCB (0,1 μ M) vorbehandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Lansoprazol (30-100 μ M) für 8 Stunden. DNCB zeigte keinen Einfluss auf die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol (Abb. 25 und 27).

Die Ergebnisse lassen keine Beteiligung des TRX/TRX-Reduktasesystems an der PPI-vermittelten HO-1-Genaktivierung vermuten. Eigeneffekte von DNCB wurden nicht detektiert.

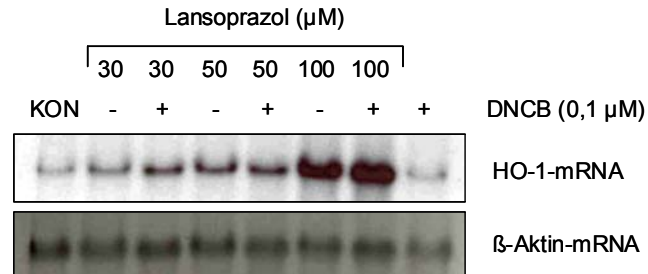


Abbildung 25: Einfluss des TRX-Reduktase Inhibitors DNCB auf die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot aus n=3-6 Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 20 Minuten mit DNCB (0,1 μ M) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit Lansoprazol (30-100 μ M) inkubiert.

NO ist ein potenter Induktor der HO-1 (Lipton et al. 1993; Motterlini et al. 1996). Die Genaktivierung kann sowohl in Abhängigkeit von cGMP als auch cGMP unabhängig verlaufen (Motterlini et al. 1996; Durante et al. 1997; Polte et al. 2000b). Abgesehen von einer Induktion der HO-1 durch direkte NO-Donatoren (SIN-1, PETN) ist eine Aktivierung der endogenen NO-Bildung z.B. durch ASS möglich (Durante et al. 1997; Oberle et al. 2002; Grosser et al. 2003a).

Um eine Beteiligung NO-abhängiger Stoffwechselwege an der PPI-vermittelten HO-1-Stimulierung zu prüfen, wurde der irreversible NO-Synthaseninhibitor N^G-Nitro-L-argininmethylester (L-NAME) verwendet (Moncada et al. 1993; Knowles et al. 1994).

Zunächst erfolgte eine 20minütige Vorinkubation mit L-NAME (0,5; 1 mM), an die sich eine 8stündige Inkubation der Endothelzellen mit Lansoprazol (30; 50 μM) anschloss. Ein signifikanter Effekt auf die mit Lansoprazol erhöhte HO-1-mRNA-Expression durch Vorbehandlung mit L-NAME war nicht detektierbar (Abb. 26 und 27). L-NAME zeigte keine Eigeneffekte.

Dieser Versuch demonstriert, dass sich die PPI-vermittelte HO-1-Stimulierung nicht durch eine Aktivierung endogener NO-Synthasen begründen lässt.

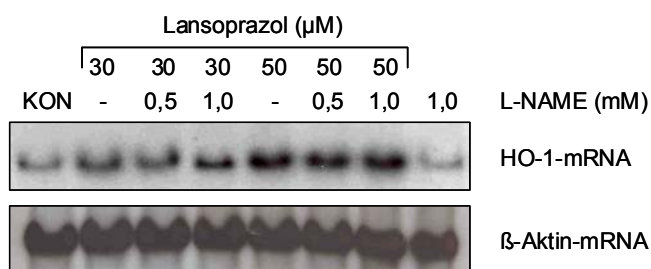


Abbildung 26: Einfluss des NO-Synthaseninhibitors L-NAME auf die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot aus n=3-6 Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 20 Minuten mit L-NAME (0,5-1 mM) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit Lansoprazol (30, 50 μM) inkubiert.

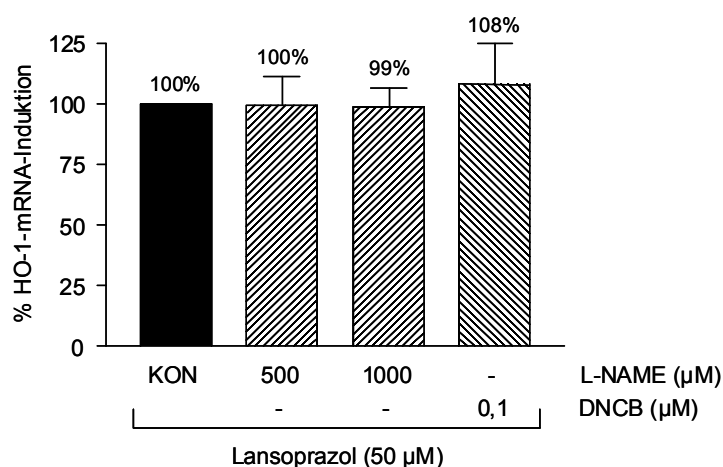


Abbildung 27: Effekte der eingesetzten Modulatoren auf die Lansoprazol-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

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

4.6.4 Einfluss des PI3K-Stoffwechselweges

Der PI3K-Signalweg wird in letzter Zeit zunehmend mit der transkriptionellen Regulierung der antioxidativen HO-1 in Zusammenhang gebracht (Martin et al. 2004; Salinas et al. 2004; Kocanova et al. 2007; Lin et al. 2007). Anhand unterschiedlicher Methoden sowie in verschiedenen Zellsystemen sollte untersucht werden, ob der PI3K-Stoffwechselweg bei der HO-1-Genaktivierung durch PPIs eine Rolle spielt.

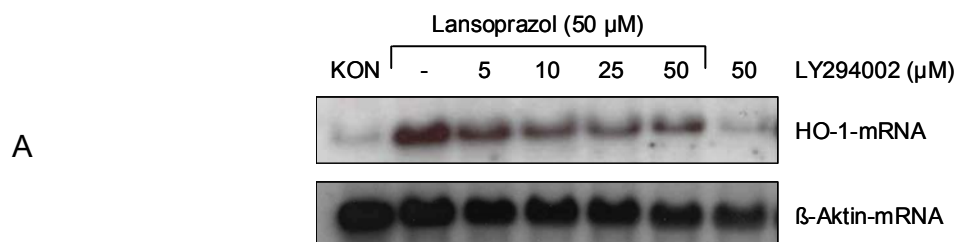
In der Literatur werden mit LY294002 und Wortmannin zwei selektive und zellpermeable Inhibitoren der PI3K beschrieben (Arcaro et al. 1993; Vlahos et al. 1994). Beide Hemmstoffe unterbinden die Kinaseaktivität der PI3K und verhindern somit die intrazelluläre Akkumulation von PI(3,4)P2 bzw. PI(3,4,5)P3 (Adi et al. 2001). LY294002 ist ein synthetisches Derivat des Flavonoids Quercetin. Wortmannin kann als mikrobielles Produkt aus verschiedenen *Penicillium* Arten gewonnen werden. Beide inhibieren die PI3K spezifisch an der ATP-Bindungsposition der Kinase. Wortmannin hemmt das Enzym irreversibel, während bei LY294002 eine kompetitive Enzymhemmung vorliegt.

4.6.4.1 Northern-Blot-Analyse

Zunächst sollte der Einfluss des PI3K-Signalweges auf die PPI-vermittelte HO-1-Genaktivierung mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens untersucht werden. Dazu wurden die Endothelzellen 20 Minuten mit LY294002 (5-50 μM) oder Wortmannin (0,01-0,1 μM) vorbehandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 50 μM Lansoprazol über 8 Stunden.

Die Vorinkubation mit LY294002 führte in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration zu einer Inhibition der HO-1-mRNA-Induktion durch 50 μM Lansoprazol (Abb. 28A und C). Eine signifikante Minderung der HO-1-mRNA-Menge konnte bereits mit 5 μM LY294002 erzielt werden. Eine maximale Inhibition um durchschnittlich 49% konnte mit 50 μM LY294002 erreicht werden (Abb. 28C). Im Gegensatz zu LY294002 zeigte Wortmannin in den Konzentrationen von 0,01 μM und 0,1 μM keinen Einfluss auf die Lansoprazol-vermittelte HO-1-mRNA-Synthese (Abb. 28B und C). Eine Steigerung der Wortmanninkonzentration erbrachte ebenfalls keinen Effekt auf die HO-1-Induktion durch Lansoprazol (nicht dargestellt).

Eigeneffekte von LY294002 und Wortmannin wurden in diesem und den folgenden Experimenten nicht detektiert.



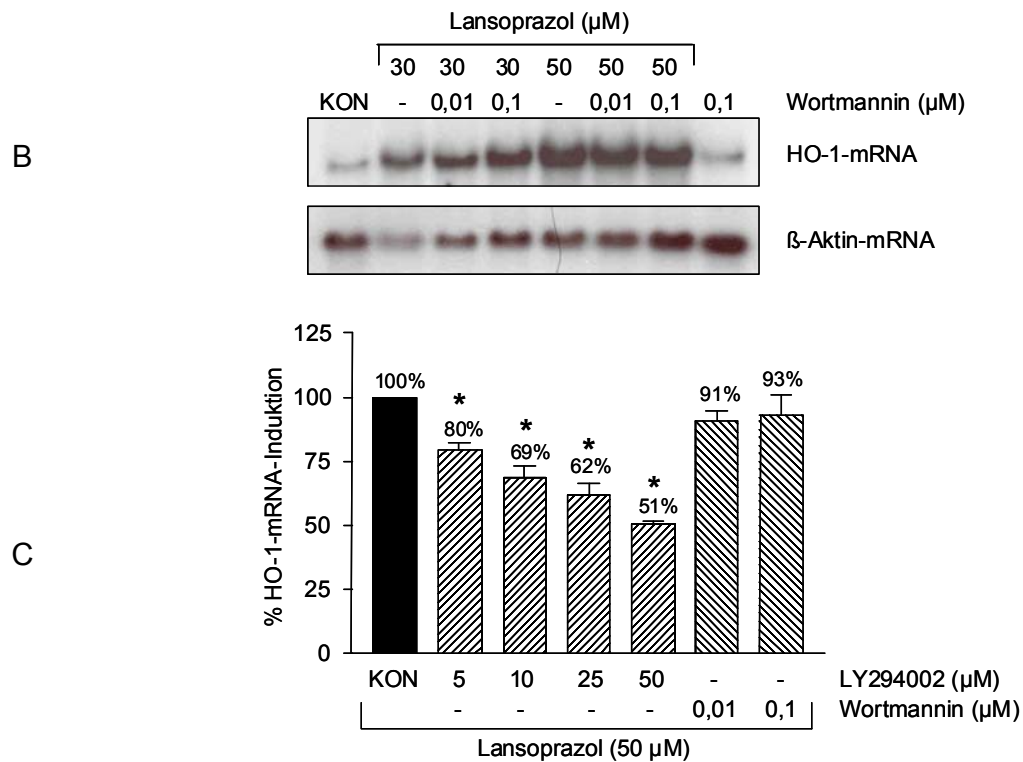


Abbildung 28: Einfluss der PI3K-Inhibitoren LY294002 (A) und Wortmannin (B) auf die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol in Endothelzellen.

Repräsentative Northern-Blots aus $n=3-6$ Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle (A und B) und densitometrischer Auswertung (C). ECV304-Zellen wurden 20 Minuten mit LY294002 (5-50 μM) oder Wortmannin (0,01-0,1 μM) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit Lansoprazol (50 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p<0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.6.4.2 *Real time* RT-PCR

Da der PI3K-Hemmstoff LY294002 im Northern-Blot-Verfahren einen signifikanten Einfluss auf die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol in Endothelzellen zeigte, sollte der Effekt des Inhibitors zusätzlich auch in Makrophagen mittels *Real time* RT-PCR untersucht werden. Die Makrophagen wurden nach einer Vorinkubation mit 25 μM LY294002 für 6 Stunden mit 50 μM Lansoprazol behandelt.

Mittels *Real time* RT-PCR konnte auch in Makrophagen ein signifikanter Einfluss des PI3K-Inhibitors LY294002 (25 μM) auf die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol gezeigt werden (Abb. 29).

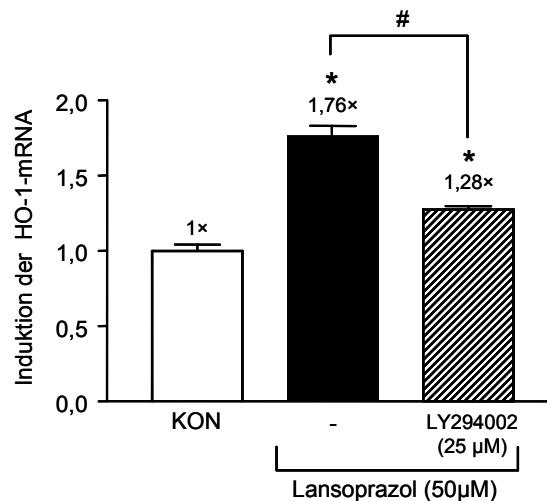


Abbildung 29: Einfluss des PI3K-Inhibitors LY294002 auf die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol in Makrophagen.

Real time RT-PCR abgeglichen auf β -Aktin. J774-Zellen wurden 20 Minuten mit LY294002 (25 μ M) vorbehandelt und anschließend 6 Stunden mit Lansoprazol (50 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=2 Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); # $p < 0,05$ Inkubation vs. Inkubation + Hemmstoff; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.6.4.3 HO-1-Promotoraktivität

Mit Hilfe von BL-Messungen sollte der Einfluss der PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 auf die Lansoprazol-vermittelte HO-1-Promotoraktivität bestimmt werden. Die NIH3T3-HO-1-*luc*-Zellen wurden 20 Minuten mit LY294002 (5-25 μ M) oder Wortmannin (0,01-0,1 μ M) vorbehandelt und anschließend für 24 Stunden mit 30 μ M Lansoprazol inkubiert. Vergleichbar mit den Ergebnissen im Northern-Blot-Verfahren konnte ein signifikanter Einfluss von LY294002 (5-25 μ M) auf die Aktivierung des mHO-1-Promotors durch Lansoprazol detektiert werden. Dabei inhibierte LY294002 die HO-1-Promotoraktivität mit fast identischer Wirkstärke wie im Northern-Blot-Verfahren. Wortmannin zeigte, wie schon bei der Northern-Blot-Analyse, keinen Effekt auf die Lansoprazol-vermittelte HO-1-Promotoraktivität (Abb. 30). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei kürzerer Inkubationszeit (8 Stunden) bzw. höherer Lansoprazolkonzentration (50 μ M) erzielt (nicht dargestellt).

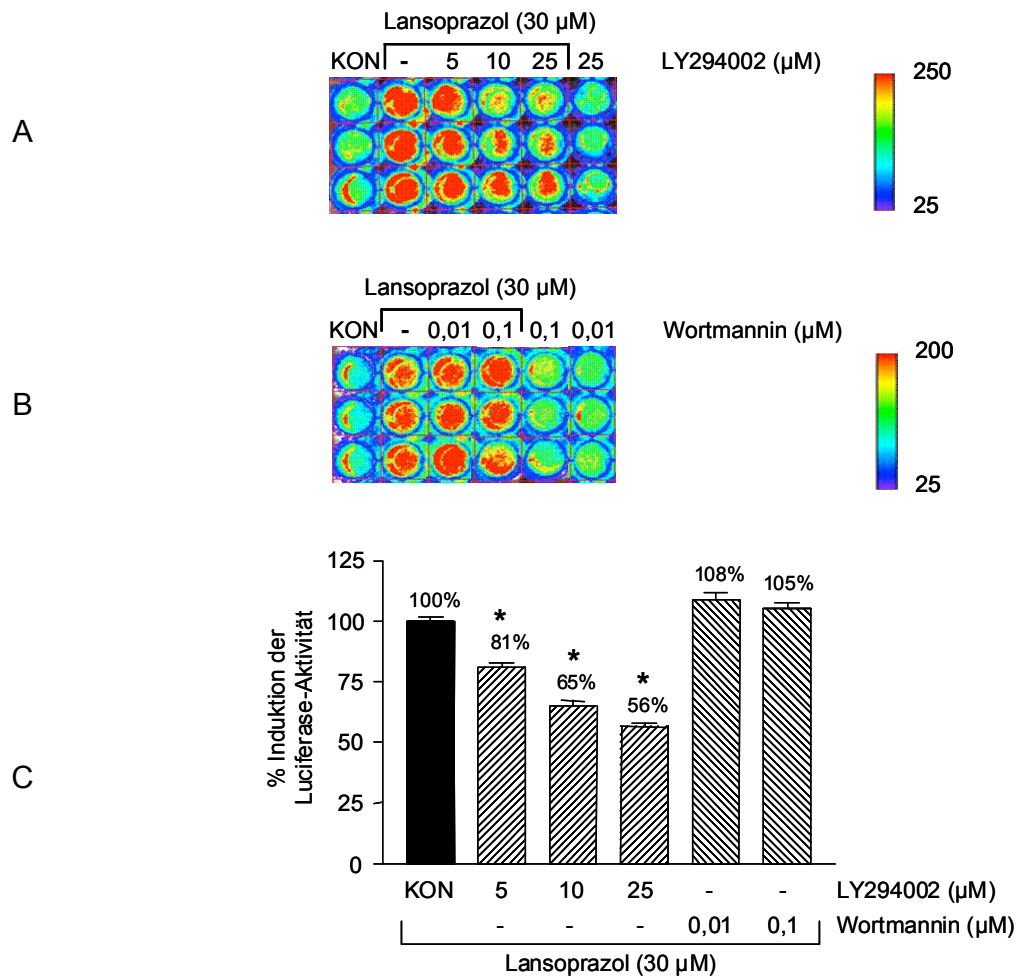


Abbildung 30: Einfluss der PI3K-Inhibitoren LY294002 (A) und Wortmannin (B) auf die durch Lansoprazol erhöhte Luciferase-Aktivität in stabil transfizierten Mausfibroblasten mit zusammenfassender Auswertung der BL-Daten (C).

NIH3T3-Zellen, stabil transfiziert mit dem 15kb mHO-1-*luc*-Promotor, wurden nach 20minütiger Vorinkubation mit LY294002 (5-25 μM) oder Wortmannin (0,01; 0,1 μM) für 24 Stunden mit Lansoprazol (30 μM) behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der *Firefly*-Luciferase nach Zugabe von Luciferin mittels *in vivo Imaging* bestimmt. Gezeigt sind repräsentative BL-Aufnahmen von n=3 Versuchsreihen pro Einzelexperiment. Alle BL-Aufnahmen wurden gemessen als Photonen/5 Minuten. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Sowohl in Endothelzellen als auch in Makrophagen zeigte sich ein signifikanter Einfluss des PI3K-Hemmstoffes LY294002 auf die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol. Darüber hinaus wurde die Lansoprazol-vermittelte HO-1-Promotoraktivität in NIH3T3-Zellen vergleichbar stark durch LY294002 inhibiert. Interessanterweise konnte mit einem zweiten PI3K-Hemmstoff, Wortmannin, keine Inhibition der HO-1-Transkription bzw. der HO-1-Promotoraktivität detektiert werden. Die Ergebnisse mit LY294002 lassen eine Beteiligung des PI3K-Signalweges an der PPI-vermittelten HO-1-Induktion vermuten. Die gegensätzlichen Effekte der beiden Hemmstoffe könnten auf Unterschiede hinsichtlich des Signalweges *downstream* von PI3K deuten (Adi et al. 2001).

4.6.5 Einfluss des MAP-Kinasen-Stoffwechselweges

Der MAP-Kinasen-Signalweg hat als Schaltstelle zwischen extrazellulären Stimuli und der Induktion der HO-1 besondere Bedeutung erlangt (Maines et al. 2005). Zahlreiche Studien dokumentieren eine Aktivierung der HO-1 über den MAP-Kinasen-Stoffwechselweg (Elbirt et al. 1998; Alam et al. 2000; Kietzmann et al. 2003; Liu et al. 2004). Welcher der drei Hauptwege die HO-1-Expression vermittelt, scheint sowohl zell- als auch induktorabhängig zu sein (Ryter et al. 2006). Während der zu p38 und JNK führende Signalweg v.a. durch inflammatorische Zytokine und diverse Stressfaktoren stimuliert wird, sind an der Aktivierung der ERK vorwiegend Wachstumsfaktoren beteiligt. Um den Einfluss von MAP-Kinasen auf die HO-1-Genaktivierung durch PPIs zu untersuchen, wurden für die Kinasen p38, JNK und ERK jeweils spezifische, zellpermeable Inhibitoren verwendet.

4.6.5.1 Northern-Blot-Analyse

Mittels Northern-Blot-Analyse wurde zunächst der Einfluss des ERK-Inhibitors PD098059 auf die durch Lansoprazol induzierte HO-1-mRNA-Bildung bestimmt. PD098059 verhindert die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der MAP-Kinase ERK durch spezifische Inhibition der vorgeschalteten MAP-Kinase-Kinase (Alessi et al. 1995).

Die Endothelzellen wurden 20 Minuten mit 10 μM PD098059 vorbehandelt und anschließend mit Lansoprazol (30-100 μM) inkubiert. Die Konzentration von 10 μM PD098059 wurde von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich zur Inhibition der Phosphorylierung von ERK verwendet und schien daher als geeignet (Dudley et al. 1995; Langlois et al. 1995; Zhang et al. 2002). PD098059 zeigte keinen Einfluss auf die HO-1-mRNA-Bildung durch Lansoprazol (Abb. 31A und 32). Höhere PD098059-Konzentrationen (45 μM) konnten die Lansoprazol-vermittelte HO-1-Induktion ebenfalls nicht vermindern (nicht dargestellt). Eigeneffekte von PD098059 traten nicht auf. Die Versuche lassen vermuten, dass die MAP-Kinase ERK bei der HO-1-Genaktivierung durch PPIs keine Bedeutung hat.

Darüber hinaus sollte eine mögliche Beteiligung der Kinase JNK an der HO-1-Induktion durch PPIs mittels Northern-Blot-Verfahren untersucht werden. Das Anthrapyrazolon-Derivat SP600125 ist ein selektiver Hemmstoff der Kinase JNK. Er inhibiert ATP-kompetitiv und reversibel die JNK-Kinasen 1 und 2 mit deutlich geringerer inhibitorischer Potenz (300fach) für ERK2, p38b und einigen weiteren Kinasen (Bennett et al. 2001).

Nach einer 20minütigen Vorinkubation der Endothelzellen mit 10 μM SP600125 erfolgte eine Inkubation mit Lansoprazol (30-100 μM) über 8 Stunden. Mit einer Konzentration von 10 μM SP600125 konnte in anderen Studien eine selektive JNK-Hemmung gezeigt werden (Davies et al. 2000; Bennett et al. 2001; Kiemer et al. 2002; Heo et al. 2004). Die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol konnte mit SP600125 nicht gemindert werden (Abb. 31B und 32). Eine höhere Hemmstoffkonzentration (45 μM) zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Lansoprazol-vermittelte HO-1-Genaktivierung (nicht dargestellt). Eigeneffekte für SP600125 wurden nicht detektiert.

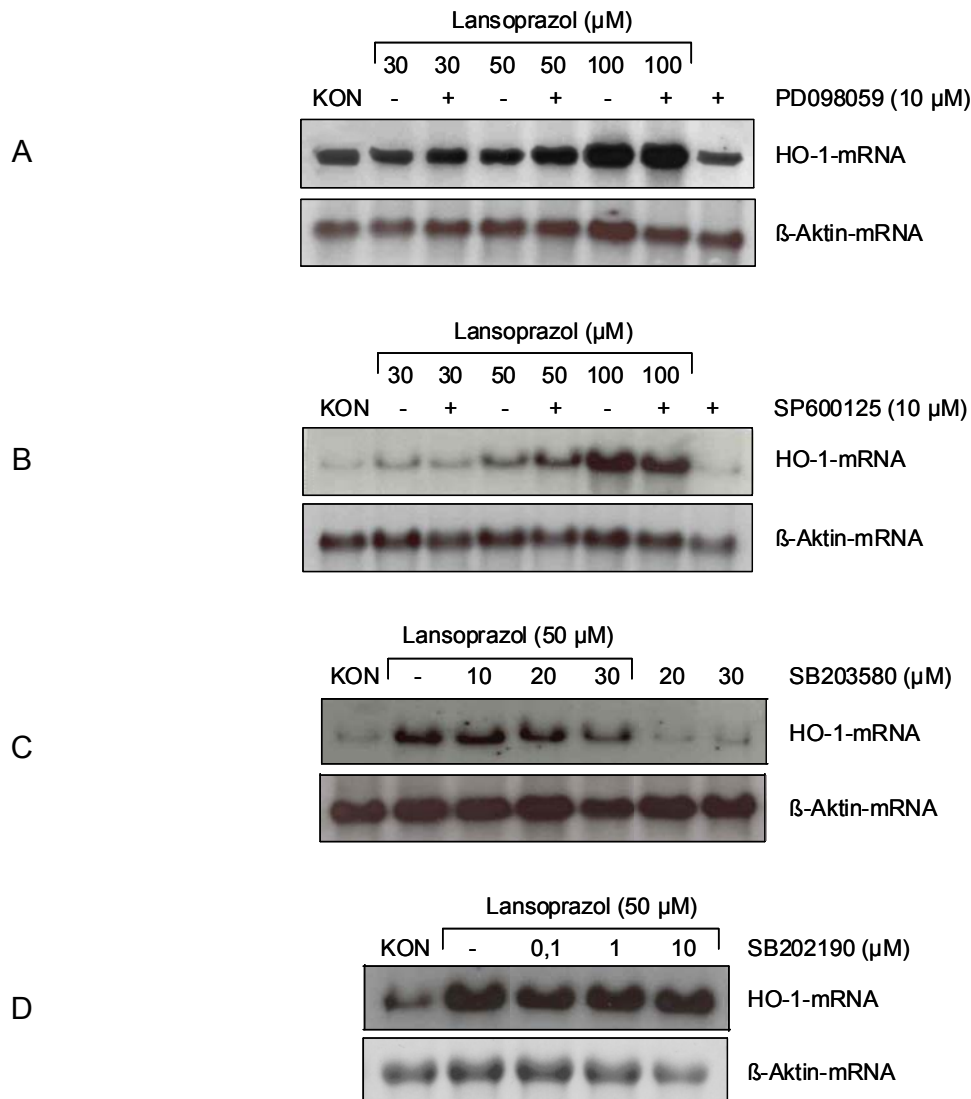


Abbildung 31: Einfluss des ERK-Inhibitors PD098059, des JNK-Inhibitors SP600125, sowie der p38-Inhibitoren SB203580 und SB202190 auf die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol in Endothelzellen.

Repräsentative Northern-Blots aus n=3-6 Einzelerperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 20 Minuten mit den verschiedenen Inhibitoren vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit Lansoprazol (30-100 μM) inkubiert.

Eine bedeutende Rolle bei der HO-1-Genaktivierung scheint v.a. die terminale MAP-Kinase p38 einzunehmen (Ryter et al. 2006). Unter diesem Aspekt sollte mit den spezifischen p38 Kinase-Hemmstoffen SB203580 und SB202190 ein eventueller Einfluss auf die Lansoprazol-vermittelte HO-1-Induktion untersucht werden. Die Pyridinylimidazol-Derivate hemmen die katalytische Aktivität der α - und β -Isoformen ebenfalls durch kompetitive Bindung an die ATP-Bindungsstelle (Frantz et al. 1998; Kankaanranta et al. 1999).

Die Endothelzellen wurden zunächst für 20 Minuten mit SB203580 (10-30 μM) oder SB202190 (0,1-10 μM) vorbehandelt. Die verwendeten Konzentrationsbereiche schienen aufgrund verschiedener Studien mit ähnlichen Hemmstoffkonzentrationen geeignet zu sein (Kankaanranta et al. 1999; Alam et al. 2000; Chen et al. 2000; Liu et al. 2004).

Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 μM Lansoprazol über 8 Stunden. Eine signifikante Verminderung der HO-1-mRNA-Menge zeigte sich bei einer Hemmstoffkonzentration von 30 μM SB203580, geringere SB203580-Konzentrationen konnten die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol nur geringfügig herabsetzen (Abb. 31C und 32). SB202190 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Lansoprazol-vermittelte HO-1-Genaktivierung (Abb. 31D und 32). Beide MAP-Kinasen-Hemmstoffe zeigten keine Eigeneffekte.

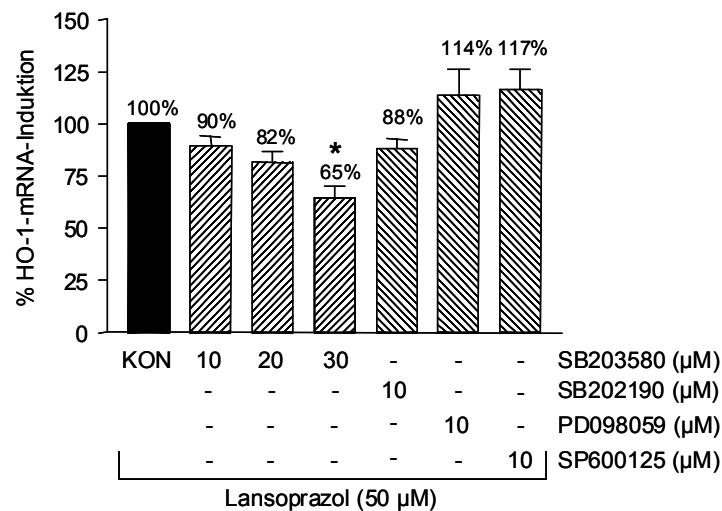


Abbildung 32: Effekte der eingesetzten MAP-Kinasen-Inhibitoren auf die Lansoprazol-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen (densitometrische Auswertung).

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

4.6.5.2 HO-1-Promotoraktivität

Zusätzlich sollte der Einfluss der MAP-Kinase p38 auf die HO-1-Promotoraktivierung durch Lansoprazol mit Hilfe von BL-Messungen geprüft werden. Dazu wurden wie bei der Northern-Blot-Analyse die beiden MAP-Kinasen-Hemmstoffe SB203580 und SB202190 verwendet.

Die NIH3T3-HO-1-*luc*-Zellen wurden zunächst 20 Minuten mit SB203580 (10-30 μM) und SB202190 (0,1-1 μM) vorbehandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 30 μM Lansoprazol über 24 Stunden.

Im Unterschied zu den Ergebnissen der Northern-Blot-Analyse in Endothelzellen konnten beide p38-Kinase-Hemmstoffe in NIH3T3-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die durch Lansoprazol gesteigerte HO-1-Promotoraktivität nehmen (Abb. 33).

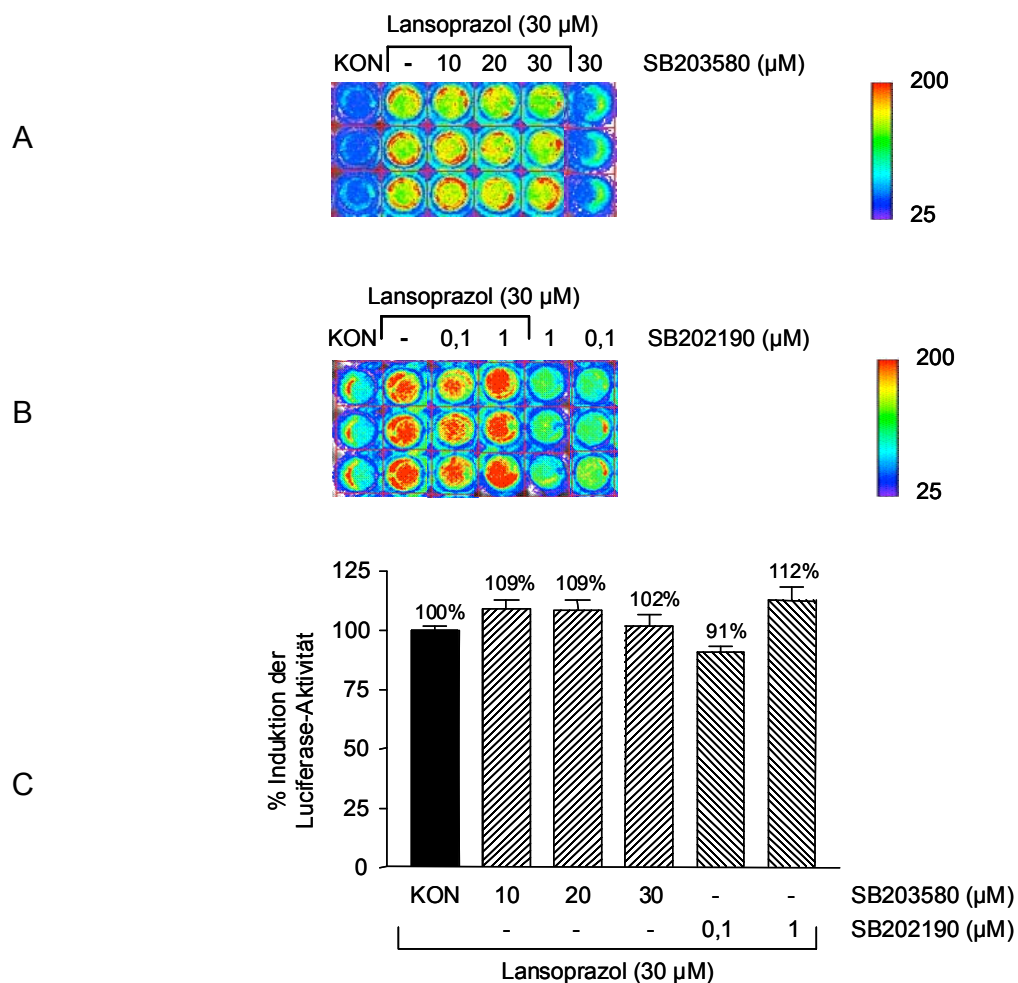


Abbildung 33: Einfluss der MAP-Kinase p38-Inhibitoren SB203580 (A) und SB202190 (B) auf die durch Lansoprazol erhöhte Luciferase-Aktivität in stabil transfizierten Mausfibroblasten mit zusammenfassender Auswertung der BL-Daten (C).

NIH3T3-Zellen, stabil transfiziert mit dem 15kb mHO-1-*luc*-Promotor, wurden nach 20minütiger Vorinkubation mit SB203580 (10-30 μM) oder SB202190 (0,1; 1 μM) für 24 Stunden mit Lansoprazol (30 μM) behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der *Firefly*-Luciferase nach Zugabe von Luciferin mittels *in vivo Imaging* bestimmt. Gezeigt sind repräsentative BL-Aufnahmen von n=3 Versuchsreihen pro Einzelexperiment. Alle BL-Aufnahmen wurden gemessen als Photonen/5 Minuten. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Inwieweit der p38-MAP-Kinase-Signalweg an der Lansoprazol-vermittelten Aktivierung des HO-1-Gens beteiligt ist, konnte mit den bisher durchgeführten Versuchen nicht zufriedenstellend geklärt werden. Zwar führte eine Vorinkubation der Endothelzellen mit dem p38-Hemmstoff SB203580 in einer Konzentration von 30 μM zu einer signifikanten Senkung der HO-1-mRNA-Menge, allerdings ist die Spezifität des Inhibitors in dieser Konzentration bereits eingeschränkt. (Cuenda et al. 1995; Davies et al. 2000). Eine zumindest partielle Involvierung anderer Stoffwechselwege kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden. Gegen eine Beteiligung der stressaktiven Kinase p38 sprechen die Ergebnisse der HO-1-Promotoraktivität in Mausfibroblasten sowie die Ergebnisse mit einem weiteren p38-Kinasehemmstoff SB202190.

4.6.6 Zusammenfassung

Die Induktion der HO-1-mRNA durch Lansoprazol konnte durch den Transkriptionsinhibitor Act D fast vollständig aufgehoben werden. Der Translationsblocker CHX führte ebenfalls zu einer signifikanten Inhibition der HO-1-mRNA-Synthese. Dies beweist eine transkriptionelle Regulierung der HO-1-Genaktivierung durch Lansoprazol. Darüber hinaus lassen die Ergebnisse mit dem Translationshemmer CHX auf die Notwendigkeit einer *De-novo*-Proteinsynthese schließen.

Die Untersuchungen mit der SOD zeigen, dass die HO-1-Induktion durch Lansoprazol bzw. Omeprazol nicht über Superoxidradikale vermittelt wird.

Die Aktivierung endogener NO-Synthasen bei der Lansoprazol-vermittelten HO-1-Induktion sowie eine Beteiligung des TRX/TRX-Reduktasesignalweges sind ebenfalls unwahrscheinlich.

Die Experimente mit spezifischen MAP-Kinasen-Inhibitoren schließen einen Einfluss der p38-MAP-Kinase auf die Lansoprazol-vermittelte HO-1-Genaktivierung nicht aus. Die MAP-Kinasen JNK und ERK scheinen im Gegensatz dazu, keine Bedeutung für die PPI-aktivierte HO-1-mRNA-Synthese zu haben.

Die Untersuchungen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 lassen eine Involvierung des PI3K-Signalweges bei der Lansoprazol-vermittelten HO-1-Induktion vermuten. Kontrovers sind die Ergebnisse mit einem zweiten PI3K-Inhibitor, Wortmannin, welcher keinen Einfluss auf die HO-1-Genaktivierung durch Lansoprazol zeigte. Dies lässt Mechanismen zur HO-1-Stimulierung durch Lansoprazol weiter *downstream* von PI3K vermuten (Adi et al. 2001).

4.7 Charakterisierung antioxidativer Effekte von PPIs in einem Modell für oxidativen Stress

Die Bestimmung der Chemilumineszenz ist eine mögliche Methode, um die Produktion von ROS in verschiedenen Zellsystemen zu untersuchen (Li et al. 1998). Verantwortlich für die Entstehung von ROS in vaskulären Zellen und Monozyten ist v.a. die NADPH-Oxidase (Griendling et al. 2000). Während die intrazelluläre ROS-Bildung einen endogenen Schutzmechanismus gegenüber infektiösen Keimen darstellt, ist die extrazelluläre ROS-Freisetzung an Gewebeschädigungen bzw. an inflammatorischen Prozessen beteiligt (Kopprasch et al. 2003).

Inwieweit die PPIs als funktionelle Konsequenz der HO-1-Induktion antioxidative Eigenschaften aufweisen, sollte in einem Modell für oxidativen Stress untersucht werden. Dazu wurde die ROS-Konzentration nach Stimulation mit NADPH durch die Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz am Luminometer bestimmt (Li et al. 1998; Tarpey et al. 1999; Li et al. 2001). Die Chemilumineszenz wurde als RLU gemessen. Die ROS-Freisetzung in NADPH-stimulierten unbehandelten Kontrollzellen wurde als maximal erreichbarer RLU-Wert (%RLU_{max}) zu 100% gesetzt.

4.7.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von Lansoprazol und Omeprazol in Endothelzellen

Zunächst sollte der Einfluss von PPIs auf die ROS-Bildung in Endothelzellen untersucht werden. Nach 8stündiger Inkubation der Endothelzellen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um direkte, radikalsenkende Substanzeffekte auszuschließen. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) und die anschließende Bestimmung der Chemilumineszenz in vier Zyklen (zu je 5 Minuten) über einen Zeitraum von 20 Minuten. Das Maximum an ROS-Bildung der 20minütigen Messung wurde zu 100% gesetzt.

Lansoprazol und Omeprazol konnten die Menge an ROS in Endothelzellen konzentrationsabhängig und signifikant vermindern (Abb. 34). Eine Lansoprazolkonzentration von 100 μM erbrachte eine ca. 20%ige Senkung des ROS-Spiegels im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Omeprazol erzielte ähnliche radikalsenkende Effekte erst in einer höheren Konzentration von 300 μM . Das verwendete Lösungsmittel DMSO hatte eine maximale Konzentration von 0,3 $\mu\text{l/ml}$ im Reaktionsansatz und zeigte keine Eigeneffekte.

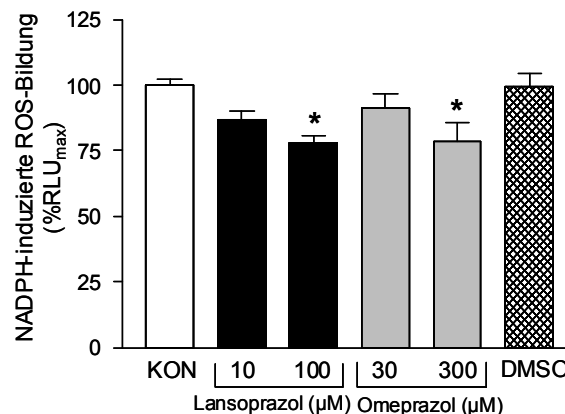


Abbildung 34: Effekt von Lansoprazol und Omeprazol auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 8 Stunden mit Lansoprazol (10-100 μM) oder Omeprazol (30-100 μM) inkubiert. Nach anschließender Ernte wurden die Zellen mit PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) versetzt. Die Chemilumineszenz, gemessen als RLU, wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten.* $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.7.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von Lansoprazol und Omeprazol in Makrophagen

Da Makrophagen besonders im angeregten Zustand eine hohe NADPH-Oxidase-Aktivität aufweisen und somit zu den wichtigsten ROS-Produzenten (v.a. Superoxid-Anion) im Organismus zählen (Splettstoesser et al. 2002; Jankov et al. 2003; Cathcart 2004), eignen sie sich hervorragend für Untersuchungen im oxidativen Stressmodell. Darüber hinaus lässt sich eine Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz in Makrophagen bereits bei einer Lucigeninkonzentration von 5 μM detektieren. Dies konnte in eigenen Experimenten signifikant gezeigt werden und wird in der Literatur bestätigt (Kopprasch et al. 2003). Die geringere Lucigeninkonzentration hat den Vorteil, dass ein durch Lucigenin verursachter Redoxzyklus und damit eine zusätzlich Superoxidanionen-Produktion ausgeschlossen werden kann (Li et al. 1998; Kopprasch et al. 2003).

Beide Prazole führten nach einer Inkubation über 8 Stunden zu einer signifikanten Reduktion detektierbarer ROS in Makrophagen (Abb. 35). Interessanterweise treten signifikante Effekte für beide PPIs in deutlich geringeren Konzentrationen als in Endothelzellen auf. Bereits bei einer Konzentration von 3 μM Lansoprazol ist die stärkste Verminderung der ROS-Bildung detektierbar. Konzentrationen über 10 μM führten zu keiner weiteren Senkung des ROS-Spiegels (Abb. 35A).

Omeprazol folgte im Gegensatz zu Lansoprazol einer konzentrationsabhängigen Reduktion der ROS-Bildung im untersuchten Konzentrationsbereich. Signifikante Effekte zeigten sich bereits bei einer Konzentration von 10 μM (Abb. 35B). Allerdings wurde bei höheren Omeprazolkonzentration (300 μM , nicht dargestellt) ebenfalls ein leichter Anstieg der ROS-Freisetzung beobachtet. Die maximale Radikalsenkung um durchschnittlich 30% wurde mit 100 μM Omeprazol erreicht.

Da das verwendete Lösungsmittel DMSO als Hydroxylradikalfänger und damit als direktes Antioxidans fungieren kann (Yu et al. 1994; Bruck et al. 1999; Wakata et al. 2001), wurde in diesem Assay der Effekt des Lösungsmittels in allen verwendeten Verdünnungen untersucht. DMSO zeigte keine Eigeneffekte auf die NADPH-induzierte Radikalbildung (Abb. 35C).

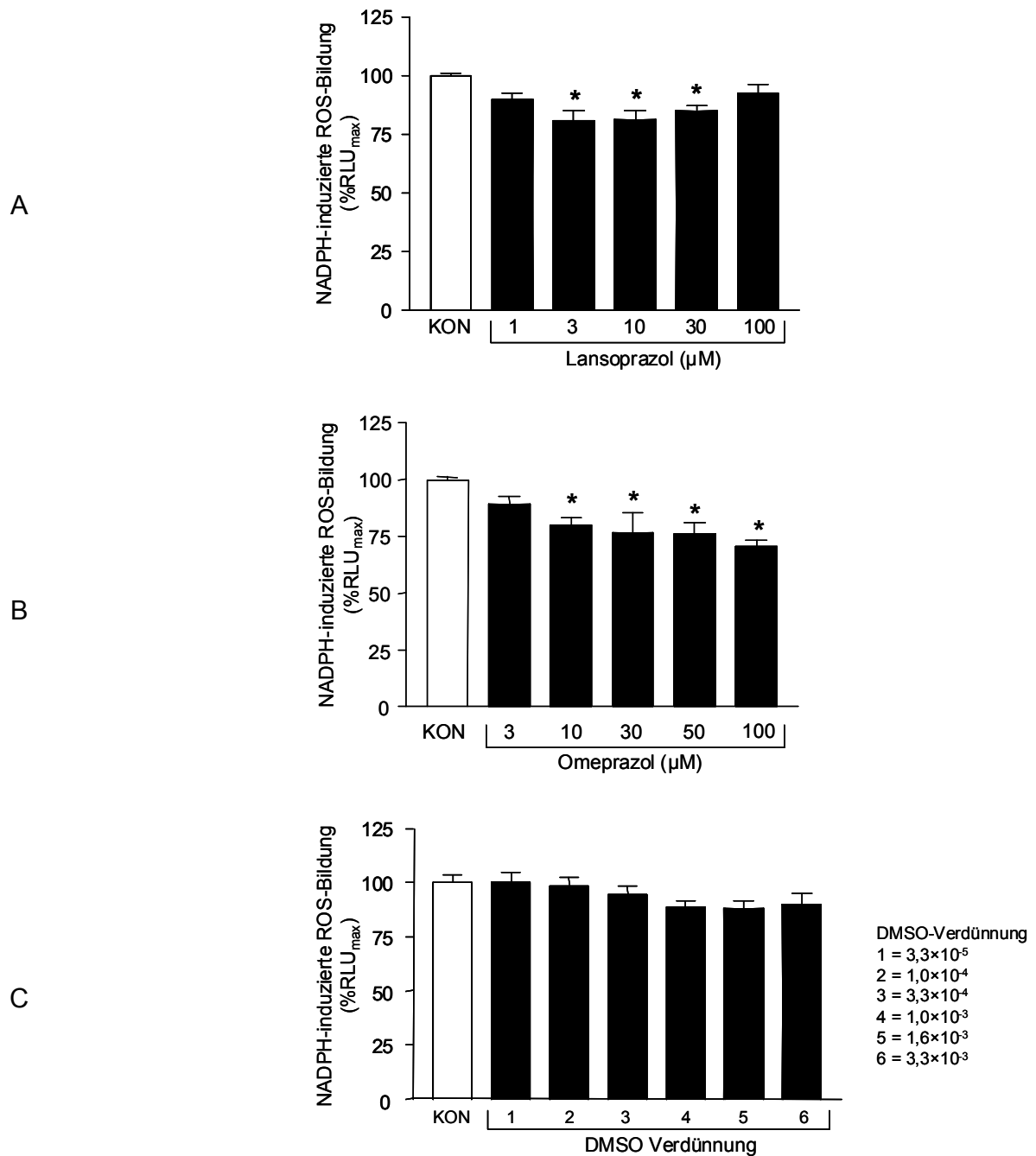


Abbildung 35 Effekt von Lansoprazol (A), Omperazol (B) und dem verwendeten Lösungsmittel DMSO (C) auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Makrophagen.

J774-Zellen wurden 8 Stunden mit Lansoprazol (1-100 µM), Omeprazol (3-100 µM) oder DMSO in den entsprechenden Verdünnungen ($3,3 \times 10^{-3}$ - $3,3 \times 10^{-5}$) inkubiert. Nach anschließender Ernte wurden die Zellen mit PBS resuspendiert und mit NADPH (10 µM) und Lucigenin (5 µM) versetzt. Die Chemilumineszenz, gemessen als RLU, wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelerperimenten. * p<0,05 Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.7.3 Zeitabhängiger Effekt von Omeprazol in Makrophagen

Um direkte antioxidative Effekte der Substanzen auszuschließen, wurden die Zellen bei der Ernte mit PBS gewaschen. Außerdem sollte durch die Inkubation der Makrophagen über einen Zeitraum von 0-24 Stunden eine Zeitabhängigkeit der Radikalsenkung untersucht werden. Zum Zeitpunkt 0 wurde Omeprazol direkt zur Zellsuspension gegeben. Als Kontrolle dienten Zellen, die über 24 Stunden anstelle von PPIs mit Nüchternmedium behandelt wurden. Bis zu einer Inkubationszeit von 10 Stunden war eine zeitabhängige Abnahme der ROS-Bildung durch 100 μ M Omeprazol gegenüber den unbehandelten Zellen detektierbar (Abb. 36). Eine direkte Zugabe von Omeprazol zur Zellsuspension hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ROS-Bildung. Nach 6stündiger Inkubation war eine signifikante Senkung des ROS-Spiegels detektierbar. Das Auftreten von radikalsenkenden Effekten nach längeren Inkubationszeiten spricht für eine vorausgegangene Synthese antioxidativer Gene. Nach 24 Stunden wurde ein Anstieg im ROS-Spiegel verzeichnet. Dies könnte eventuell durch eine Stresssituation für die Makrophagen bei längeren Inkubationszeiten und einer damit vermehrten Superoxidanion-Produktion bedingt sein. Nekrotische Zellschädigungen aufgrund möglicher toxischer Substanzeffekte konnten mit Hilfe von Viabilitätsuntersuchungen allerdings ausgeschlossen werden (Abb. 17B)

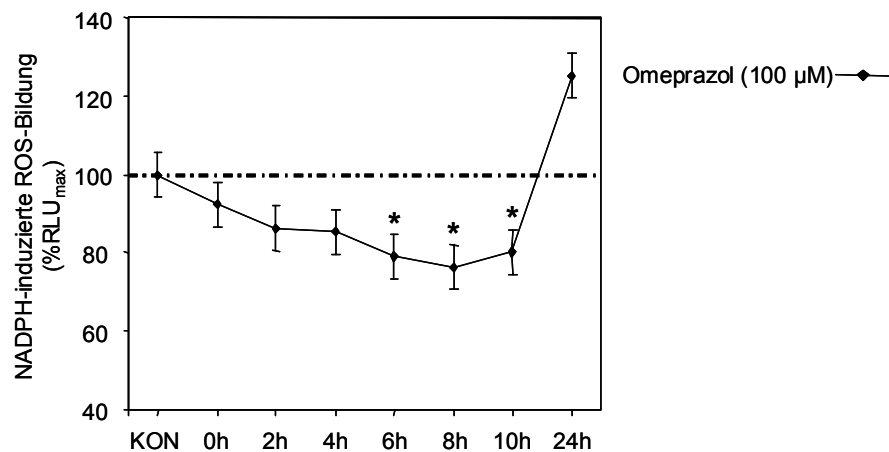


Abbildung 36: Zeitabhängiger Effekt von Omeprazol auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Makrophagen.

J774-Zellen wurden 0-24 Stunden mit Omeprazol (100 μ M) inkubiert. Nach anschließender Ernte wurden die Zellen mit PBS resuspendiert und mit NADPH (10 μ M) und Lucigenin (5 μ M) versetzt. Die Chemilumineszenz, gemessen als RLU, wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.7.4 Einfluss des HO-1-Produktes Bilirubin in Makrophagen

Das HO-Produkt Bilirubin ist in besonderem Maße für die antioxidativen Effekte der HO-1 verantwortlich (Stocker et al. 1987b; Stocker et al. 1990). Deshalb sollte mit Hilfe von Bilirubin analysiert werden, ob eine HO-1-Überexpression die zytoprotektiven Eigenschaften der PPIs erklären könnte.

Dazu wurden die Makrophagen bis zur Konfluenz kultiviert und wie unter 3.8.1 beschrieben geerntet. Anschließend erfolgte eine direkte Zugabe von Bilirubin (0,1-30 μM), NADPH (10 μM) und Lucigenin (5 μM) und die Messung der Chemilumineszenz über einen Zeitraum von 20 Minuten.

Bilirubin führte in Makrophagen zu einer direkten, konzentrationsabhängigen Verminderung des ROS-Spiegels (Abb. 37). Signifikante Effekte wurden bereits in einer Konzentration von 0,1 μM erzielt. In einer Konzentration von 30 μM konnte der ROS-Spiegel fast vollständig gesenkt werden.

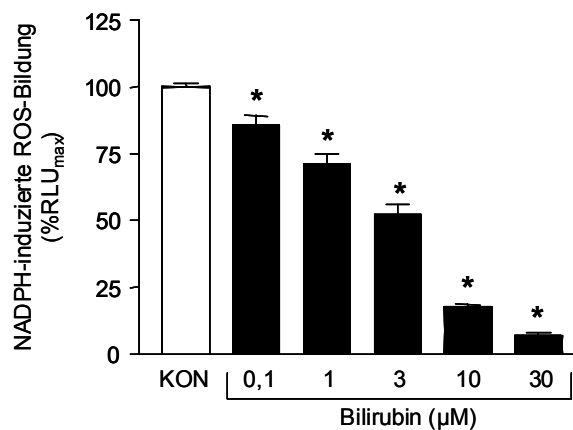


Abbildung 37: Effekt von Bilirubin auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Makrophagen.

J774-Zellen wurden geerntet, mit PBS resuspendiert und mit Bilirubin (0,1-30 μM), NADPH (10 μM) und Lucigenin (5 μM) versetzt. Die Chemilumineszenz, gemessen als RLU, wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.7.5 Einfluss eines HO-Inhibitors auf die antioxidativen Effekte der PPIs in Makrophagen

Das Auftreten von radikalsenkenden Effekten erst nach mehrstündiger Inkubation mit anschließendem Auswaschen der Substanzen deutet auf die Aktivierung antioxidativer Stoffwechselwege hin. Ob eine HO-1-Induktion für die indirekten, antioxidativen Effekte der PPIs verantwortlich sein könnte, sollte in weiteren Versuchen mit dem HO-Aktivitätsinhibitor Chrom-Mesoporphyrin IX (CrMP) untersucht werden. CrMP hat gegenüber anderen HO-Aktivitätsinhibitoren den Vorteil, dass es unter einer Konzentration von 5 μM keinen Einfluss auf die NO-Synthasen oder die lösliche Guanylatzyklase hat und somit selektiv auf die HO wirkt. Darüber hinaus zeigt es im

Vergleich zu anderen HO-Aktivitätsinhibitoren keine photochemische Eigenaktivität (Appleton et al. 1999).

Um zu prüfen, ob die PPIs ihre antioxidativen Effekte über eine HO-1-Induktion vermitteln, wurden die Makrophagen 20 Minuten mit CrMP vorbehandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Lansoprazol oder Omeprazol über 8 Stunden und die Vermessung der Proben wie bereits beschrieben.

Mit CrMP (3 μM) konnten die antioxidativen Effekte von Lansoprazol und Omeprazol signifikant und vollständig inhibiert werden (Abb. 38A und B). CrMP zeigte in der verwendeten Konzentration keine Eigeneffekte. Diese Ergebnisse bestätigen den vermuteten kausalen Zusammenhang zwischen den antioxidativen Effekten der eingesetzten PPIs und einer HO-1-Aktivierung.

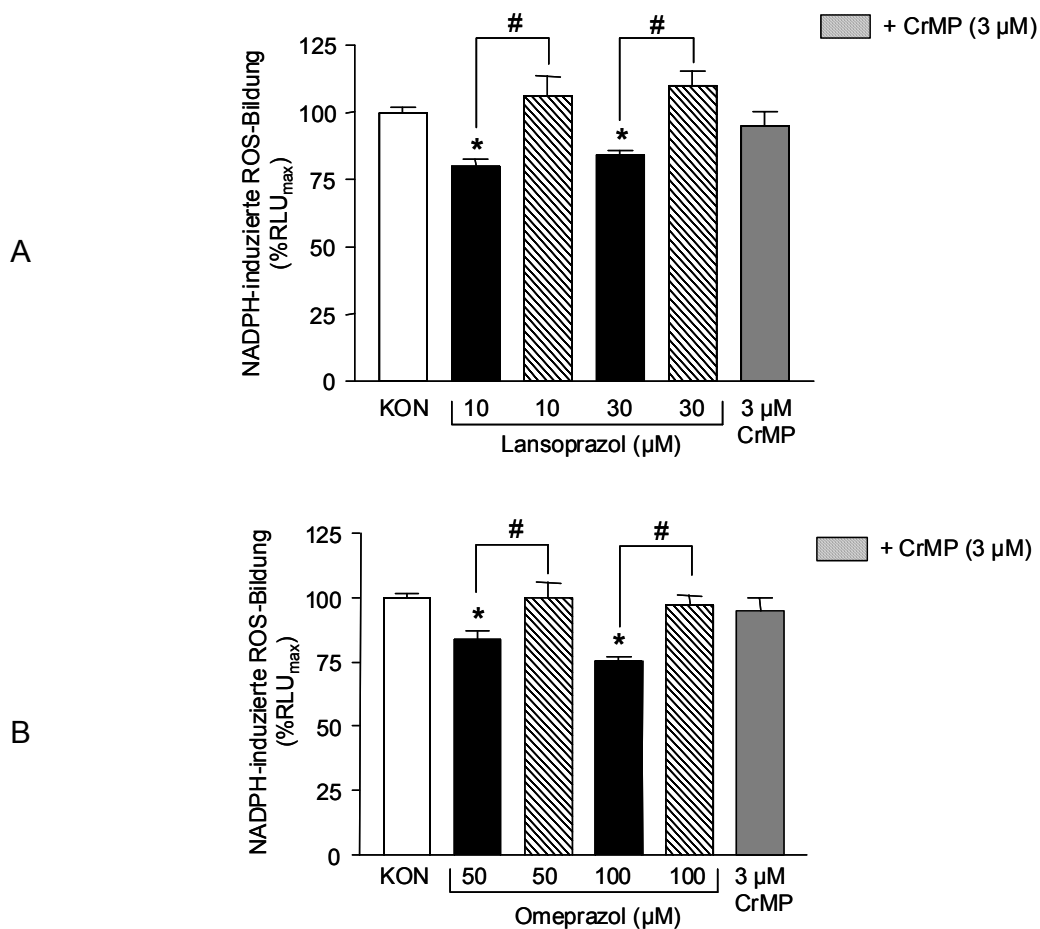


Abbildung 38: Einfluss des HO-Inhibitors CrMP auf die Reduktion der NADPH-induzierten ROS-Bildung durch Lansoprazol (A) und Omeprazol (B).

J774-Zellen wurden 20 Minuten mit CrMP (3 μM) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit Lansoprazol (10-30 μM) oder Omeprazol (50-100 μM) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, mit PBS resuspendiert und mit NADPH (10 μM) und Lucigenin (5 μM) versetzt. Die Chemilumineszenz, gemessen als RLU, wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p<0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); # $p<0,05$ Inkubation vs. Inkubation + Hemmstoff; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.7.6 Zusammenfassung

Lansoprazol und Omeprazol zeigten in einem Modell für oxidativen Stress eine Verminderung der Sauerstoffradikal-Konzentration gegenüber unbehandelten Kontrollen. Diese Befunde wurden sowohl in Endothelzellen als auch in Makrophagen detektiert. Dass die antioxidativen Effekte erst nach längeren Inkubationszeiten sowie nach Auswaschen der Substanzen auftraten, unterstreicht eine Beteiligung indirekter, antioxidativer Stoffwechselwege bei der Vermittlung der radikalsenkenden Eigenschaften der PPIs.

Das HO-Produkt Bilirubin wirkte im Modell für oxidativen Stress als starkes, direktes Antioxidans und war in der Lage, die ROS-Bildung fast vollständig zu hemmen. Das Ergebnis bestätigt, dass dieses HO-Produkt unter den gewählten Bedingungen als Mediator der radikalsenkenden Effekte fungieren kann.

Versuche mit dem selektiven HO-Aktivitätsinhibitor CrMP dokumentieren einen kausalen Zusammenhang zwischen der HO-1-Induktion durch Lansoprazol und Omeprazol und deren antioxidative Wirkung im Zellmodell.

4.8 CO-Produktion in verschiedenen Geweben der Maus nach Omeprazolapplikation

In einem *in vivo* Modell zur HO-Aktivität sollte der Frage nachgegangen werden, ob die *in vitro* Ergebnisse mit PPIs *in vivo* reproduzierbar sind. Die gaschromatographische Vermessung des durch die HO freigesetzten CO bietet eine spezifische und sensitive Methode zur Bestimmung der HO-Aktivität. Die Unabhängigkeit von entsprechenden Enzymsystemen stellt gegenüber der spektrometrischen Vermessung des Bilirubins einen großen Vorteil dar (Vreman et al. 1988).

Wie unter 3.7.1 beschrieben, wurden die Versuchstiere (FVB Mäuse) randomisiert in Kontrollgruppe und PPI-Gruppe unterteilt. Anschließend erfolgte die dem Körpergewicht (KG) angepasste Omeprazol- bzw. Vehikelgabe als Einmaldosis für den Zeitraum von 24 Stunden. Nach Gewebeentnahme und -präparation sowie Zugabe der Substrate Methämoglobin und NADPH, wurde die HO-Aktivität in den entsprechenden Geweben anhand der gebildeten CO-Menge in einem dicht verschlossenen Reaktionsgefäß gaschromatographisch bestimmt. Die HO-Aktivität wurde bestimmt als nmol/h/mg Nassgewicht Gewebe und dargestellt als %HO-Aktivität, wobei die mit Vehikel behandelten Kontrolltiere zu 100% gesetzt wurden (siehe Kapitel 3.7.).

4.8.1 Orale Applikation von Omeprazol

Zunächst wurde ein oraler Applikationsweg getestet, wobei Omeprazol mit Hilfe eines Lösungsvermittlers (Tween-20) in 0.9% Kochsalzlösung gelöst wurde. In verschiedenen Organen (Leber, Niere, Magen und Lunge) erfolgte die gaschromatographische Bestimmung der CO-Freisetzung als Indiz für die Aktivität der HO. Durch orale Gabe von Omeprazol wurde statt der erwarteten Erhöhung der HO-Aktivität eine signifikante Verminderung der HO-Aktivität in der Leber gemessen. Tendenziell zeichnete sich ein

ähnlicher Verlauf auch im Magen und Gehirn ab. In der Niere dagegen konnte eine marginale, nicht signifikante Erhöhung der CO-Produktion detektiert werden (Abb. 39). Ursache für den unerwarteten Effekt ist möglicherweise die vorzeitige protonenkatalysierte Umlagerung von Omeprazol bei der ersten Magenpassage, wobei verschiedene Nebenprodukte entstehen. Diese Nebenprodukte könnten die HO-1 inhibieren. Denkbar ist außerdem, dass bestimmte Biotransformationsprodukte eine Inhibition der HO bewirken. Diese These wird durch die Tatsache gestützt, dass v.a. im Biotransformationsorgan, der Leber, eine signifikante Inhibition detektierbar war.

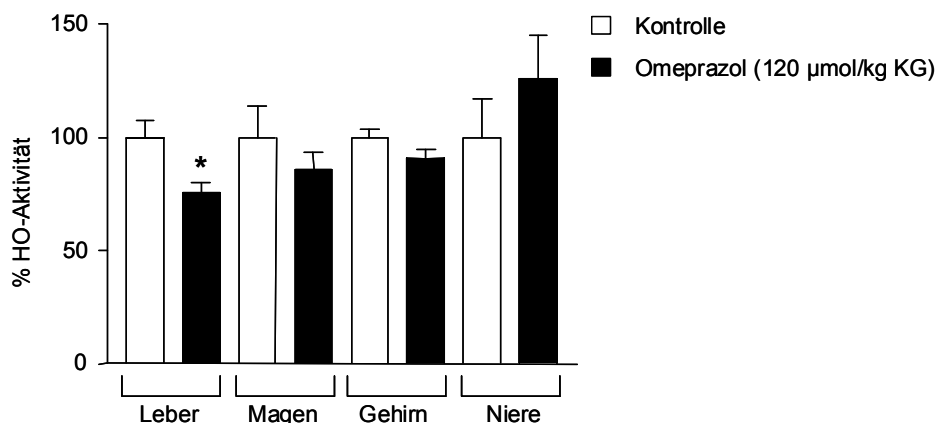


Abbildung 39: Effekt von Omeprazol auf die Gewebe-HO-Aktivität nach oraler Gabe.

Omeprazol (120 µmol/kg KG) oder Vehikel (15%ige (V/V) Tween-20-Lösung) wurden oral appliziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Gewebeentnahme und -aufarbeitung. Im Anschluss wurde die totale HO-Aktivität in Leber, Magen, Gehirn und Niere durch Messung der CO-Freisetzung (nmol/h/mg Nassgewicht Gewebe) bestimmt und dargestellt als Änderung der HO-Aktivität im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Kontrolltieren. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 (Kontrolltieren) bzw. n=4 (Leber), n=3 (Magen), n=4 (Gehirn) und n=4 (Niere) mit Omeprazol (120 µmol/kg KG) behandelten Versuchstieren. * $p < 0,05$ Omeprazol behandelt vs. Kontrolle; *Student's unpaired t-test*.

4.8.2 Intraperitoneale Applikation von Omeprazol

In den Experimenten zur intraperitonealen Omeprazol-Applikation wurde eine 45%ige (m/V) Cyclodextrinlösung als Lösungsvermittler verwendet. Die reine Cyclodextrinlösung (Kontrolltiere) sowie die Omeprazolösung wurden den Mäusen in die Bauchhöhle appliziert. Dieser Applikationsweg erschien im Hinblick auf das Unterbinden einer vorzeitigen protonenkatalysierten Umlagerung von Omeprazol zum zyklischen Sulfenamid als sinnvoll.

Im veränderten Versuchsmodell konnte eine signifikante Erhöhung der HO-Aktivität im Magen festgestellt werden (Abb. 40). Die bei oraler Omeprazol-Gabe gemessene Hemmung der HO-Aktivität in der Leber, konnte nach intraperitonealer Gabe nicht beobachtet werden. Alle weiteren getesteten Organe zeigten keine signifikanten Veränderungen der HO-Aktivität, wobei sich in der Niere jedoch die Tendenz einer HO-Hemmung abzeichnete.

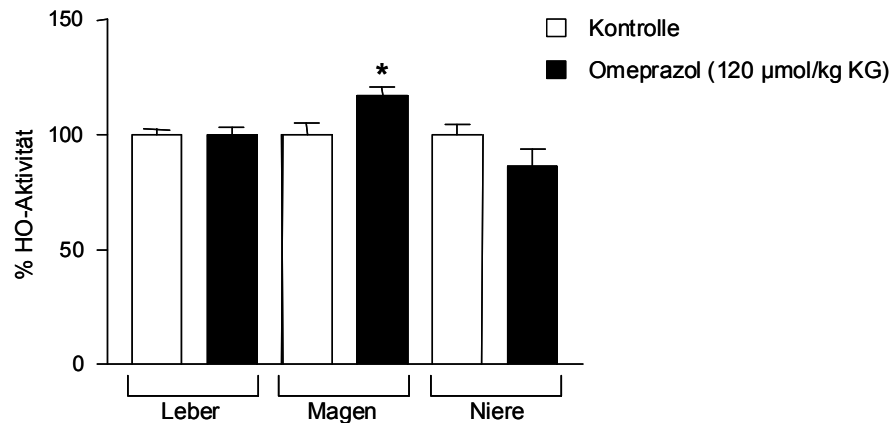


Abbildung 40: Effekt von Omeprazol auf die Gewebe-HO-Aktivität nach intraperitonealer Gabe.

Omeprazol (120 µmol/kg KG) oder Vehikel (45%ige (m/V) Cyclodextrinlösung) wurden intraperitoneal appliziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Gewebeentnahme und -aufarbeitung. Im Anschluss wurde die totale HO-Aktivität in Leber, Magen und Niere durch Messung der CO-Freisetzung (nmol/h/mg Nassgewicht Gewebe) bestimmt und dargestellt als Änderung der HO-Aktivität im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Kontrolltieren. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=6 (Kontrolltieren) bzw. n=9 (Leber), n=7 (Magen) und n=8 (Niere) mit Omeprazol (120 µmol/kg KG) behandelten Versuchstieren. * $p < 0,05$ Omeprazol behandelt vs. Kontrolle; *Student's unpaired t-test*.

4.8.3 Zusammenfassung

Die bereits im Zellsystem gezeigte Induktion der HO-1 konnte im Zielorgan der PPIs, dem Magen, in mehreren unabhängigen *in vivo* Experimenten nach intraperitonealer Gabe bestätigt werden. Nach 24stündiger Omeprazolapplikation erfolgte ein signifikanter 17%iger Anstieg der HO-Aktivität gegenüber den mit Vehikel behandelten Kontrolltieren. In anderen Geweben wurden keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren detektiert. In der Niere zeigte sich eine Tendenz zur Verminderung der HO-Aktivität. Anlass zur Diskussion gibt ebenfalls die signifikante Senkung der CO-Produktion in der Leber bei oraler Arzneistoffgabe. Da diverse Metabolite von Omeprazol starke Inhibitoren von CYP2C19 darstellen (Ko et al. 1997), wäre eine HO-Inhibition durch bestimmte Biotransformationsprodukte ebenfalls denkbar.

5 Diskussion

Entzündliche und peptische Erkrankungen des Magens sind in der Bevölkerung weit verbreitet. Stress, Rauchen, Übergewicht und übermäßige, fettreiche Ernährung bei gleichzeitiger Unterbindung von physiologischen Regenerationsmechanismen des gereizten Magenepithels führen zur Schädigung und zum Funktionsverlust der Mukosa (Kato et al. 1992; Johnsen et al. 1994; Rosenstock et al. 2003). Als wichtigste pathogenetische Faktoren für die Ausbildung von Entzündungen und Geschwüren des Magens gelten heute Infektionen mit dem Bakterium *H. pylori* sowie eine NSAID-Dauertherapie (Arroyo et al. 2004). Asymptomatische endoskopische Magen-Darm-Ulzera sind bei bis zu 40% der Patienten, die regelmäßig NSAIDs einnehmen, dokumentiert. Dyspeptische Beschwerden im oberen Gastrointestinaltrakt treten bei bis zu 60% der NSAID-Anwender auf (Stalnikowicz et al. 1993; Singh et al. 1996; Wolfe et al. 1999). *H. pylori*-Infektionen finden sich in 70% aller Fälle eines Magengeschwürs (*Ulcus ventriculi*) und 95% aller Fälle eines Zwölffingerdarmgeschwürs (*Ulcus duodeni*) (Casparly et al. 1996; Howden et al. 1998).

Besonders die durch NSAIDs induzierten gastralen Schleimhautschädigungen werden neben der Hemmung der Prostaglandinsynthese auch auf prostaglandinunabhängige Prozesse wie Entkopplung oxidativer Phosphorylierungen, Veränderungen mukosaler Zellum- und -abbauprozesse sowie Aktivierung von Neutrophilen und deren erhöhte endotheliale Adhäsion zurückgeführt (Wallace 2001; Hawkey et al. 2003). Zunehmend wird der Involvierung von ROS bei der Entstehung gastrointestinaler Erkrankungen, im Besonderen bedingt durch *H. pylori*-Infektionen, Stress oder einer Dauermedikation mit NSAIDs, eine entscheidende Bedeutung beigemessen (Blandizzi et al. 1999; Halliwell et al. 2000; Jung et al. 2001; Oh et al. 2001a; Kwiecien et al. 2003). Ein ungehinderter Angriff von aggressiven Sauerstoffradikalen auf die Magenschleimhaut forciert die Entstehung oxidativer Gewebeschädigungen. Bei gleichzeitiger Störung der Mukosabarriere, z.B. durch den Mangel an protektiven Prostaglandinen, kommt es zu oberflächlichen Erosionen, wodurch die Magensäure ungehindert wirken kann. Im weiteren Verlauf entstehen tiefere Läsionen, die zu subepithelialen Blutungen, Entzündungen der Mukosa und Ulzerationen führen (Rainsford 1999; Wolfe et al. 1999; Pohle et al. 2001; Hawkey et al. 2003; Whittle 2003).

Eine antioxidative Intervention zur Behandlung von Ulkuserkrankungen sowie zur Protektion der Mukosa bei einer Dauermedikation mit NSAIDs könnte additiv zu einer Säurereduktion und der Minderung aggressiver Faktoren für die Magenmukosa einen möglichen Therapievorteil bringen. Denkbare Strategien wären sowohl der Einsatz direkter Antioxidantien als auch die Stimulierung endogener, antioxidativer Stoffwechselwege.

In der vorliegenden Arbeit konnten die PPIs Lansoprazol und Omeprazol als potente Aktivatoren der antioxidativen HO-1 in gastralen Epithelzellen sowie in Endothelzellen und Makrophagen charakterisiert werden. Endothelzellen und Makrophagen gelten als Zellsysteme mit hoher HO-1-Expression und -Aktivität (Wang et al. 1998; Orozco et al. 2007). Die PPIs werden nach oraler Gabe zunächst im Darm resorbiert und dann mit

dem Blutkreislauf an ihren Wirkort, die Protonenpumpe in den Parietalzellen des Magens, transportiert. Der Magen ist mit einer Vielzahl von Blutgefäßen innerviert, die v.a. für die gastrale Mikrozirkulation von Bedeutung sind. Makrophagen sind im Entzündungsgeschehen und bei der ersten Immunabwehr sowohl in der Magenmukosa als auch im systemischen Kreislauf von entscheidender Relevanz. Die untersuchten Zellsysteme sind somit neben den gastralen Zellen mögliche physiologische Targets von PPIs. Darüber hinaus sollte die Unabhängigkeit der gastroprotektiven Eigenschaften von der antisekretorischen Wirkung durch Untersuchung von Zellmodellen, die nicht über eine H^+/K^+ -ATPase verfügen (Jaisser et al. 1999), gezeigt werden.

Lansoprazol und Omeprazol stimulierten im mikromolaren Konzentrationsbereich die Promotoraktivität des mHO-1-Promotors in NIH3T3-Zellen konzentrations- und zeitabhängig. In gastralen Epithelzellen, Endothelzellen und Makrophagen induzierten sie eine konzentrationsabhängige Steigerung der HO-1-mRNA. Die Aktivierung der HO-1-Transkription bewirkte eine vermehrte Expression des HO-1-Proteins. Untersuchungen zur HO-Aktivität beweisen, dass diese erhöhten Transkriptions- und Translationsprozesse schließlich zu einem katalytisch aktiven Enzym führen.

Die betrachteten PPIs waren hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Induktion des HO-1-Gens unterschiedlich potent. Besonders auf transkriptioneller Ebene zeigte sich Lansoprazol als der stärkere Induktor. Eine signifikante Stimulierung der mHO-1-Promotoraktivität um das 1,4fache konnte bereits in einer Konzentration von 10 μ M Lansoprazol und bei einer Inkubationszeit von 8 Stunden erreicht werden. Diese Konzentration befindet sich im oberen Bereich der physiologischen Plasmakonzentration, welche abhängig ist von der Applikationsform, der Dosis und den unterschiedlichen Metabolisierungstypen. In einer Studie von Andersson und Mitarbeitern betrug die physiologische Plasmakonzentration nach einwöchiger oraler Lansoprazol-Einnahme (30mg/Tag), je nachdem ob es sich um einen *poor* oder *extensive* Metabolisierer handelte, zwischen 2,2 -5,6 μ M (Andersson et al. 1998). Höhere Plasmakonzentrationen, bei einer Gabe von 60 mg Lansoprazol am Tag oder nach intravenöser Applikation, sind denkbar (Yacyszyn et al. 2002). Für Omeprazol konnte z.B. nach intravenöser Gabe eine Plasmakonzentration von bis zu 20 μ M detektiert werden (Cederberg et al. 1993). Omeprazol aktivierte den mHO-1-Promotor mit vergleichbarer Stärke in einer Konzentration von 30 μ M. Längere Inkubationszeiten bewirkten bei beiden PPIs eine weitere Steigerung der HO-1-Promotoraktivität. Eine Verdopplung der Aktivitätsrate konnte mit 50 μ M Lansoprazol und 100 μ M Omeprazol nach 24 Stunden erreicht werden. Ähnliche Befunde wurden mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens in humanen Endothelzellen detektiert. Signifikante Induktionen konnten mit 30 μ M Lansoprazol und 100 μ M Omeprazol erreicht werden. Insgesamt bewirkten beide PPIs eine deutliche Steigerung der HO-1-mRNA-Menge in Endothelzellen auf das 5,6 bis 6,9fache. Die Potenz von PPIs zur HO-1-Induktion verdeutlicht auch der Vergleich mit der internen Positivkontrolle, dem Schwermetall $CdCl_2$, welches die HO-1-mRNA-Bildung auf das 5,3fache steigerte. In Makrophagen erhöhte 100 μ M Lansoprazol die HO-1-mRNA-Menge, quantifiziert mit Hilfe der *Real time* RT-PCR, um das 3fache. Da bei der Aktivierung des mHO-1-Promotors eine deutliche Zeitabhängigkeit detektiert wurde, könnten die etwas schwächeren Induktionen der HO-1-mRNA in Makrophagen

zumindest z.T. in der kürzeren Inkubationszeit von 6 Stunden bei der *Real time* RT-PCR begründet liegen.

Die HO-1-Proteinmenge konnte mit 100 μ M Lansoprazol und 300 μ M Omeprazol in Endothelzellen im Durchschnitt um das 3fache gesteigert werden. Die identische Steigerung der Proteinmenge bei geringerer Substanzkonzentration bestätigt Lansoprazol auch bei der HO-1-Proteinexpression als das potentere der beiden Prazole. Die Effekte in Makrophagen waren mit denen in Endothelzellen vergleichbar.

Die Induktion der HO-1 durch Lansoprazol und Omeprazol resultierte in einem katalytisch aktiven Enzym, gemessen als erhöhte Bilirubinspiegel im Zellysat. Die nach Stimulation erzeugte Bilirubinmenge betrug das 1,7fache des basal gebildeten Bilirubins in unstimulierten Zellen. Im Gegensatz zur mRNA- und Proteinebene, waren mit 300 μ M Omeprazol (170%) höhere Bilirubinspiegel detektierbar als mit 300 μ M Lansoprazol (144%). Möglicherweise erschwert die Verwendung von exogen zugegebenen Enzymsystemen bei dieser Methode (Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Biliverdinreduktase isoliert aus Rattenleberzytosol) die Gewährleistung einheitlicher Standardbedingungen im Vergleich zu Protein-, mRNA- und Promotoraktivitätsbestimmungen. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Enzyme könnte eventuell zu Aktivitätsverlusten führen.

Darüber hinaus zeigte sich Lansoprazol besonders auf transkriptioneller Ebene deutlich potenter. Lansoprazol besitzt durch die Einführung einer Trifluorethoxy-Gruppe an Position C-4 des Pyridinringes eine höhere Lipophilie als Omeprazol. Dies spiegelt sich in einem schlechteren Lösungsverhalten von Lansoprazol in hydrophilen Lösungsmitteln wider (Wasserlöslichkeit nach Firmenangaben: Lansoprazol 0,97 mg/l; Omeprazol 82,3 mg/l). Im Zellsystem liegt bei einem pH-Wert von 7,4 die unprotonierte, membrangängige Arzneiform vor, eine Dissoziation beginnt erst bei pH-Werten zwischen 4-6 (Stedman et al. 2000). Durch die höhere Lipophilie besitzt Lansoprazol eine bessere Membrangängigkeit, was zu einem schnelleren intrazellulären Anfluten von Lansoprazol führen könnte. Bei längeren Inkubationszeiten (12 Stunden für HO-Aktivität) könnte die beschleunigte Passage durch Zellmembranen von Lansoprazol gegenüber Omeprazol einen geringeren Einfluss auf die Intensität der HO-1-Induktion im Vergleich zu den kürzeren Inkubationszeiten bei Western- und Northern-Blot-Analysen haben. Diese Vermutung bestätigen die Daten zur zeitabhängigen Induktion des HO-1-Proteins. Während Lansoprazol das Maximum der Stimulation bereits nach 12 Stunden erreichte, nach 24 Stunden allerdings einen sinkenden HO-1-Proteinspiegel aufzeigte, konnte Omeprazol die Proteinsynthese kontinuierlich über einen Zeitraum von 24 Stunden steigern. Eine weitere denkbare Erklärung der kontroversen Effekte von Lansoprazol und Omeprazol hinsichtlich HO-1-mRNA-Menge und -Enzymaktivität wäre eine Interaktion zwischen dem HO-1 und HO-2-Protein, wodurch es insgesamt zu einer verminderten HO-Aktivität kommt. Die beiden Isoformen der HO sind Produkte unterschiedlicher Gene. Obwohl die HO-1 vornehmlich in der Milz und die HO-2 im Gehirn exprimiert wird, sind in den meisten Geweben beide Isoenzyme vorzufinden (Vincent et al. 1994; Barlow et al. 1999; Dennerly et al. 2003). Weng und Mitarbeiter konnten eine Komplexbildung zwischen beiden HO-Isoformen zeigen, wodurch es zur Blockierung der Häm-Bindungstasche und infolgedessen zu einer verminderten HO-Aktivität kommt. Die Autoren vermuten hinter diesem Mechanismus eine Art negative Rückkopplung zur

Limitierung der HO-Aktivität (Weng et al. 2003). Während für eine moderate HO-Aktivitätserhöhung protektive Effekte gezeigt werden konnten (Vile et al. 1994), gilt eine Aktivitätserhöhung um das 5fache als schädigend für den Organismus (Suttner et al. 1999a; Suttner et al. 1999b). Da auch in Endothelzellen beide HO-Isoformen exprimiert werden (Marks et al. 1997), könnte eine Induktion der HO-1 durch die potenten PPIs in höheren Substanzkonzentration eine HO-Komplexbildung bewirken.

Prinzipiell deuten die Ergebnisse zur Induktion der HO-1 auf mRNA- und Proteinebene sowie die Anwesenheit eines katalytisch aktiven Enzyms auf einen Klasseneffekt der PPIs. Ergebnisse mit Pantoprazol, die ebenfalls eine vermehrte HO-1-Proteinsynthese zeigen (Daten nicht dargestellt), unterstützen diese Vermutung. Die Untersuchungen in verschiedenen Zellsystemen demonstrieren außerdem, dass die PPI-vermittelte HO-1-Stimulierung auf transkriptioneller, translationeller und katalytischer Ebene nicht zelllinienspezifisch ist.

Nach wie vor führt die gastrointestinale Toxizität von NSAIDs bei zahlreichen Patienten mit chronischen Schmerzzuständen, welche eine Dauertherapie mit COX-Inhibitoren benötigen, zu Magenschleimhautschädigungen (Hawkey et al. 2003).

Mit der Entwicklung selektiver Inhibitoren der bei Schmerz und Entzündungen vermehrt exprimierten COX-2, sollte der gastroprotektive Effekt der konstitutiven COX-1 erhalten bleiben. Die sogenannten Coxibe beeinflussen die Thromboxan-Biosynthese in den Thrombozyten nicht, führen allerdings zu einer Hemmung der COX-2-vermittelten Prostazyklin-Biosynthese im Endothel. Das sensible Gleichgewicht wird zugunsten des Thromboxan A₂ verschoben, was ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bedingt (Cheng et al. 2002). Nach der Marktrücknahme von Rofecoxib und Valdecoxib ist heute die Sicherheit und Unbedenklichkeit von Coxiben, in jüngerer Zeit auch von konventionellen NSAIDs, hinsichtlich kardiovaskulärer Risiken umstritten (McGettigan et al. 2006; Motsko et al. 2006; Hennekens et al. 2008).

PPIs wie Pantoprazol, Lansoprazol oder Omeprazol gelten als effektive und gut tolerierte Arzneistoffe, um den Magen und das Duodenum bei einer NSAID-Medikation vor Schädigungen zu schützen. Dabei zeichnen sie sich sowohl in der Primär- und Sekundärprävention als auch bei der Therapie NSAID-induzierter Ulzerationen durch antisekretorische Effizienz sowie durch eine deutliche Überlegenheit gegenüber anderen Behandlungs- bzw. Präventionsstrategien aus (Chan 2007; Chan et al. 2007). In verschiedenen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Omeprazol-Gabe von 20 mg/Tag Patienten unter einer NSAID-Dauermedikation im Vergleich zu Placebo effektiv und signifikant vor gastralen oder duodenalen Ulzerationen schützt (Ekstrom et al. 1996; Cullen et al. 1998). Andere Studien vergleichen die Gabe von PPIs mit Misoprostol bei NSAID-Dauertherapie. Dabei zeigten sich mit Pantoprazol endoskopisch signifikant weniger gastrointestinale Läsionen im Vergleich zu Misoprostol 400µg/Tag (Stupnicki et al. 2003). Bei der Abheilung von Ulzerationen schien das PG-Derivat in einer höheren Dosierung (800 µg/Tag) ähnlich erfolgreich wie Omeprazol (20 oder 40 mg/Tag), allerdings ist eine Langzeitanwendung von Misoprostol 800 µg/Tag aufgrund erhöhter Nebenwirkungen kritisch zu betrachten (Hawkey et al. 1998). Ranitidin (300 mg/Tag) blieb im Rahmen der ASTRONAUT-Studie („*Acid Supression Trial: Ranitidine vs. Omeprazol for NSAID-Associated Ulcer Treatment*“) hinter der Effektivität von

Omeprazol (20 oder 40 mg/Tag) bezüglich der Abheilung von Ulzerationen zurück (Yeomans et al. 1998).

Diese Studien weisen darauf hin, dass der Vorteil von PPIs bei NSAID-induzierten Mukosaschädigungen nicht ausschließlich in einer effizienten antisekretorischen Wirkung begründet liegt. Sowohl mit einem potenziell protektiven PG-Derivat als auch mit konventionellen, antisekretorischen Arzneistoffen konnte die Effektivität der PPIs nicht erreicht werden. Blandizzi und Mitarbeiter konnten unter einer NSAID-Therapie erhöhte Malondialdehyd- und verminderte Glutathionspiegel als Indiz für oxidative Gewebeschädigungen nachweisen. Sie begründen die Überlegenheit der PPIs mit der Induktion protektiver Mechanismen, die unabhängig von der Säureinhibition sind (Blandizzi et al. 2005). Andere Arbeitsgruppen postulieren für PPIs ebenfalls antioxidative, antiapoptotische und antiinflammatorische Eigenschaften (Suzuki et al. 1995; Natale et al. 2004; Agnihotri et al. 2007; Pozzoli et al. 2007).

Die in dieser Arbeit gezeigte Induktion, der als antioxidativ, antiproliferativ, antiapoptotisch und antiinflammatorisch beschriebenen HO-1 (Stocker et al. 1987b; Otterbein et al. 2003a; Maines et al. 2005; Ryter et al. 2007), könnte die beobachteten Eigenschaften der PPIs teilweise erklären. Eine Gastroprotektion durch PPIs könnte zumindest z.T. durch die Eigenschaften der HO-1-Produkte vermittelt werden und scheint unabhängig von der antisekretorischen Wirkung zu sein. Dafür sprechen die Ergebnisse zur Stimulierung der HO-1 in Zellsystemen, welche nicht über eine H^+/K^+ -ATPase verfügen.

Die physiologischen Plasmakonzentrationen von Lansoprazol und Omeprazol betragen je nach Applikationsweg und Metabolisierer (*extensive* oder *poor*) $2-3 \times 10^{-6}$ bis $1-2 \times 10^{-5}$ mol/l (Lind et al. 1986; Aoki et al. 1991; Cederberg et al. 1993; Li et al. 2004). In der Literatur ist die Datenlage hinsichtlich der Konzentrationsbereiche, bei denen eine säureunabhängige Gastroprotektion im Vordergrund steht, z.T. kontrovers. Während Biswas und Mitarbeiter protektive PPI-Effekte für geringere, als die zur Säurehemmung erforderlichen Konzentrationen postulieren (Biswas et al. 2003), zeigten Blandizzi und Mitarbeiter, dass für die PPI-vermittelte Gastroprotektion im Durchschnitt ED_{50} -Werte erforderlich sind, die das 3-4fache der ED_{50} -Werte für eine entsprechende Säurehemmung betragen (Blandizzi et al. 1999). Kurzfristig erhöhte Gewebekonzentrationen durch Arzneistoff-Anreicherung in der Magenmukosa sind ebenfalls denkbar. Eine HO-1-Induktion durch Lansoprazol oder Omeprazol in den untersuchten Konzentrationsbereichen könnte somit eine klinische Relevanz aufweisen. Der H_2 -Antagonist Ranitidin zeigte in Humanstudien keinen signifikanten Einfluss auf NSAID-bedingte gastrale Ulzerationen (Yeomans et al. 1998). Das Ausbleiben einer HO-1-Aktivierung durch Ranitidin deutet ebenfalls auf die Involvierung der HO-1 als Mediator der pleiotropen PPI-Eigenschaften hin.

Eine Störung der Mukosaintegrität, verursacht durch ein Ungleichgewicht zwischen aggressiven Faktoren und Protektionsmechanismen, kann zu einer akuten Entzündungssituation führen. Wichtigste Mediatoren einer akuten Inflammation sind IL-1 β und TNF α . Diese bedingen die Infiltration von Neutrophilen in das entzündete Gewebe. Die Neutrophilen bilden vermehrt Superoxidanionen, welche mit

Membranproteinen und –lipiden interagieren (Wallace et al. 2001). Die ROS schädigen die Zellmembran, führen im weiteren Verlauf zu einer Destruktion der zellulären Proteine und schließlich zum Absterben der nicht mehr funktionsfähigen Zellen.

Das HO-1-Produkt CO gilt als Modulator inflammatorischer Prozesse. CO kann durch eine verminderte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1 β bei gleichzeitiger vermehrter Produktion des antiinflammatorischen IL-10 erfolgreich in die Entzündungskaskade intervenieren (Willis et al. 1996; Otterbein et al. 2000a; Ryter et al. 2007). Die Eigenschaften von CO, eine Plättchenaktivierung und –aggregation sowie die Expression von PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) in Makrophagen zu unterbinden, unterstützen zusätzlich dessen antiinflammatorische Wirkung (Otterbein et al. 2003a).

Neben oberflächlichen Membranschädigungen und Störungen der intrazellulären Homöostase bedingt der Angriff von ROS DNA-Fragmentationen und somit die Induktion apoptotischer Prozesse in den mukosalen Zellen. Das HO-1-Produkt CO vermittelt neben antiinflammatorischen und vasodilatatorischen auch antiproliferative und antiapoptotische Effekte (Otterbein et al. 2003a). Exogenes CO inhibierte die TNF α -initiierte Apoptose in Mausfibroblasten und Endothelzellen (Brouard et al. 2000; Petrache et al. 2000). Abgesehen von einer antioxidativ bedingten Mukosaprotektion, scheint v.a. die antiapoptotische und antiinflammatorische Wirkung der PPIs von entscheidender Relevanz bei der Heilung und Prävention gastraler Läsion (Wallace et al. 2001; Biswas et al. 2003; Handa et al. 2006).

Kritischer Aspekt für eine Mukosaschädigung ist außerdem eine inflammatorisch-bedingte Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten. Deren Aggregation bewirkt Thrombenbildung und ischämische Zustände in der gastralen Mikrozirkulation. Das vasodilatierende CO kann diesem Prozess durch Regulation des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und Hemmung der Plättchenaggregation entgegen wirken. Ähnlich wie NO entfaltet CO seine gefäßrelaxierende Wirkung über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (Ryter et al. 2007). In einer Arbeit von Naseri und Mitarbeitern konnten Omeprazol und Lansoprazol in einer Konzentration von 30 – 300 μ M eine Relaxation isolierter humaner Arterien induzieren. Mechanismen zur Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration werden vermutet (Naseri et al. 2006). Die in dieser Studie verwendeten Substanzkonzentrationen konnten in der vorliegenden Arbeit eine HO-1-Induktion bewirken. Denkbar wäre somit auch CO als Mediator der vasodilatierenden Wirkung.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die antioxidativen Effekte von Omeprazol zu einer Hemmung der Lipid- und Proteinperoxidation führen und somit die Membranstruktur stabilisieren und eine funktionell aktive Zelle aufrechterhalten (Biswas et al. 2003; Kuroda et al. 2006; Pozzoli et al. 2007). Eine Mukosaprotektion wird auch für zahlreiche andere antioxidative Substanzen wie Melatonin, Vitamin E, PBN oder Desferroxamin beschrieben (Das et al. 1997; Bandyopadhyay et al. 2000). Bilirubin ist ein potentes endogenes Antioxidans (Stocker et al. 1987b; Ryter et al. 2007). Zahlreiche *in vitro* Studien demonstrieren den direkten protektiven Effekt von Bilirubin gegenüber oxidativ-induzierter Zytotoxizität (Wu et al. 1991; Clark et al. 2000; Baranano et al. 2002).

Der Nutzen einer HO-1-Induktion bei gastraler Gewebeschädigung konnte bereits für NO-NSAIDs, die eine magenschonendere Alternative gegenüber konventionellen NSAIDs darstellen, im Zellkulturmodell gezeigt werden (Berndt et al. 2005).

Des Weiteren finden sich in der Literatur Hinweise auf eine vermehrte Expression der HO-1 bei *H. pylori*-Infektionen, Gastriden und Ulzerationen. Die Aktivierung der HO-1 könnte dabei einen endogenen Protektionsmechanismus gegenüber den zytotoxischen und inflammatorischen Schädigungen der Mukosa darstellen (Barton et al. 2003; Guo et al. 2003; Ameriso et al. 2005). So konnte in einer *in vivo* Studie an Ratten von Guo und Mitarbeitern gezeigt werden, dass die HO-1- und COX-2-Expression in der Phase des Heilungsprozesses, die ca. 3 Tage nach der Induktion des Ulkus einsetzte, signifikant erhöht war (Guo et al. 2003). Die Wundheilung könnte zum einen durch die antiinflammatorische und antioxidative Wirkung der HO-1-Metabolite und zum anderen durch die HO-1-induzierte Endothelzellaktivierung, -proliferation und -angiogenese, gefördert werden (Deramaudt et al. 1998; Brouard et al. 2000; Guo et al. 2003). Zu ähnlichen Beobachtungen kamen Barton und Mitarbeiter bei einer Humanstudie von Patienten mit *H. pylori* positiver oder negativer Gastritis, sowie aktiver oder inaktiver Colitis ulcerosa bzw. Morbus Chron. Eine erhöhte HO-1-Expression konnte v.a. in den entzündeten Bereichen des Magengewebes und Kolons beobachtet werden (Barton et al. 2003). Auch eine Studie von Ameriso und Mitarbeitern belegt eine vermehrte HO-1-Expression in *H. pylori* positiven Patienten. Die erhöhte HO-1-Expression wird von den Autoren v.a. hinsichtlich einer möglichen Stabilisierung von *H. pylori*-assoziierten atherosklerotischen Plaques diskutiert (Ameriso et al. 2005). Eine jüngere Studie von Lo und Mitarbeitern lässt darüber hinaus einen möglichen protektiven Effekt einer vermehrten HO-1-Expression im Hinblick auf die Entstehung von Magenkarzinomen vermuten (Lo et al. 2007).

Häufig ist eine vermehrte Expression der HO-1 an die Aktivierung eines weiteren antioxidativ wirksamen Stressproteins, das Ferritin, gekoppelt (Eisenstein et al. 1991; Fogg et al. 1999). Lansoprazol und Omeprazol führten zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Induktion des Ferritinproteins in Endothelzellen und Makrophagen. Die Konzentrationsbereiche für eine vermehrte Ferritinexpression korrelierten mit den Substanzkonzentrationen für eine HO-1-Induktion. Allerdings waren für signifikante Stimulationen des Ferritinproteins im Vergleich zum HO-1-Protein längere Inkubationszeiten erforderlich. Maximale Syntheseraten konnten in Endothelzellen nach 24 Stunden und in Makrophagen nach 12 Stunden erzielt werden. Zur signifikanten Induktion des HO-1-Proteins kam es in beiden Zellsystemen bereits nach 8 Stunden. Die längeren Inkubationszeiten für die Ferritininduktion sprechen für eine Kopplung des HO-1-/Ferritinsystems unter den gewählten Bedingungen. Begründet wird dies in der Literatur damit, dass die Induktion von Ferritin v.a. die Folge einer HO-1-Aktivierung und einer damit verbundenen Beeinflussung des Eisenstoffwechsels ist. Die Freisetzung des Häm-Eisens durch die katalytisch aktive HO-1 wirkt dabei als Stimulus für die Synthese des Eisenspeicherproteins Ferritin (Balla et al. 1992b).

Zusammenfassend könnte eine Aktivierung des HO-1/Ferritinsystems Bestandteil des Wirkprofils der PPIs sein und einen bislang unbekanntem Wirkmechanismus,

gekennzeichnet durch antioxidative, antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte, darstellen.

Zahlreiche Studien belegen ein antioxidatives Potenzial der PPIs (Suzuki et al. 1995; Lapenna et al. 1996; Koch et al. 2002; Fornai et al. 2005; Simon et al. 2006). Direkte (Lapenna et al. 1996; Biswas et al. 2003) sowie indirekte (Koch et al. 2004; Blandizzi et al. 2005; Agnihotri et al. 2007) radikalfangende Eigenschaften scheinen dabei eine Rolle zu spielen. Von Interesse in der vorliegenden Arbeit waren, neben der Charakterisierung der HO-1 als Zielstruktur der PPIs, mögliche funktionelle Konsequenzen einer PPI-vermittelten HO-1-Aktivierung. Inwieweit sich die genomischen Effekte von Lansoprazol und Omeprazol als antioxidative Schutzwirkung manifestieren, wurde in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress untersucht. Monozyten sowie die Zellen des vaskulären Systems reagieren auf die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei inflammatorischen Prozessen u.a. mit der Aktivierung der NADPH-abhängigen Oxidase, wodurch vermehrt Superoxidanionen gebildet werden (Griendling et al. 2000).

Mittels eines Chemilumineszenz-Assays wurden die Wirkungen von Lansoprazol und Omeprazol auf die NADPH-induzierte Sauerstoffradikalbildung in Endothelzellen und Makrophagen bestimmt. Dabei wurde die pathophysiologische Situation des oxidativen Stresses durch direkte Zugabe von NADPH, welches die NADPH-abhängige Oxidase zur Superoxidradikalbildung stimuliert, hervorgerufen. Signifikante radikalsenkende Effekte konnten für Lansoprazol und Omeprazol in beiden Zellsystemen nach mehrstündigen Inkubationen detektiert werden.

Da Makrophagen zu den wichtigsten ROS-Produzenten (v.a. Superoxid-Anion) im Organismus zählen und eine antioxidative Intervention bei inflammatorischen sowie atherosklerotischen Erkrankungen von therapeutischem Nutzen sein könnte (Gerrity 1981b; Gerrity 1981a; Lessner et al. 2002; Splettstoesser et al. 2002; Tiwari et al. 2007), galten sie besonders im Modell für oxidativen Stress als geeignetes Zellsystem. Eine signifikante Reduktion der NADPH-induzierten Radikalbildung konnte in Makrophagen im Vergleich zu Endothelzellen bereits in geringeren Konzentrationen erzielt werden. Sowohl Omeprazol als auch Lansoprazol vermittelten signifikant-radikalsenkende Effekte in Makrophagen bereits in physiologisch relevanten Konzentrationenbereichen (3-10 μM), ähnliche Effekte konnten in Endothelzellen erst in höheren Substanzkonzentrationen (100-300 μM) beobachtet werden. Eine antioxidative Wirkung nach mehrstündigen Vorinkubationen und Auswaschen der Substanzen spricht gegen einen direkten Radikalfang durch PPIs und deutet auf indirekte signaltransduzierende Prozesse, wie die Aktivierung von Stressproteinen, hin. Obwohl eine geringfügige Abnahme der Radikalbildung bereits nach direkter Zugabe von Omeprazol zu verzeichnen war, konnten signifikante Senkungen erst nach 6stündiger Inkubationszeit detektiert werden. Das Maximum der Radikalsenkung bei einer Inkubationszeit von 8 Stunden spricht ebenfalls für die Stimulierung antioxidativer Stoffwechselwege. Kontrovers ist allerdings der Radikalanstieg in Makrophagen nach 24 Stunden. Mit Hilfe eines LDH-Assays konnten nekrotische Zellprozesse durch mögliche toxische Effekte von 100 μM Omeprazol im betrachteten Zeitraum ausgeschlossen werden.

Eine Kausalität zwischen einer HO-1-Induktion und der beobachteten antioxidativen Wirkung von PPIs verdeutlichen Untersuchungen mit dem HO-1-Produkt Bilirubin sowie mit dem selektiven HO-Aktivitätsinhibitor CrMP. Bilirubin wird als eines der stärksten endogenen Antioxidantien beschrieben. So konnten Stocker und Mitarbeiter zeigen, dass Bilirubin das antioxidative Potenzial von Vitamin E gegenüber Lipidperoxidation überschreitet (Stocker et al. 1987a; Stocker et al. 1987b). In der vorliegenden Arbeit konnte die direkte Inkubation der Makrophagen mit Bilirubin die NADPH-induzierte Radikalbildung fast vollständig aufheben. Bilirubin könnte somit im gewählten Untersuchungsmodell Mediator der mit PPIs detektierten antioxidativen Effekte sein. Eine signifikante Radikalsenkung wurde bereits im Bereich physiologischer Bilirubinspiegel erzielt (Normwerte für Serumbilirubin $\sim 5\text{-}17\ \mu\text{M}$ (Stocker et al. 1987a)). Wobei allerdings beachtet werden muss, dass der Großteil des Bilirubins im Serum an Albumin konjugiert vorliegt (Sedlak et al. 2004). In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise, dass moderat erhöhte Serumbilirubinspiegel positive Auswirkungen auf Krankheiten haben, die im Zusammenhang mit oxidativen Stress stehen. In einer Humanstudie von Hopkins und Mitarbeitern zeigte sich ein leicht erhöhter Bilirubinspiegel von $12,4 \pm 8,1\ \mu\text{M}$ im Vergleich zu $8,9 \pm 6,1\ \mu\text{M}$ als präventiv gegenüber dem Auftreten von koronarer Herzerkrankungen (Hopkins et al. 1996). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Djousse und Mitarbeiter bei der Auswertung der *Framingham Offspring Study* (Djousse et al. 2001; Djousse et al. 2003). Erhöhte Bilirubinspiegel von $\sim 15,4\ \mu\text{M}$ gegenüber Patienten mit Bilirubinspiegeln von $\sim 8,6\ \mu\text{M}$ waren assoziiert mit einem verminderten Risiko für Herzinfarkt und andere kardiovaskuläre Ereignisse. Andere Studien lassen auch einen positiven Effekt von erhöhten Bilirubinwerten bei Krebserkrankungen vermuten (Vitek 2005). Zum Beispiel wurden bei Patienten mit einem Kolonkarzinom verminderte Bilirubinspiegel ($11,5\ \mu\text{M}$) gegenüber gesunden Kontrollpatienten ($13,3\ \mu\text{M}$) beobachtet (Ko et al. 1994).

Neben den Ergebnissen mit dem HO-1-Produkt Bilirubin, zeigen Versuche mit dem selektiven HO-Aktivitätsinhibitor CrMP einen direkten Zusammenhang zwischen der PPI-vermittelten HO-1-Induktion und der antioxidativen Wirkung der Substanzen. Mit dem spezifischen Hemmstoff konnte die Lansoprazol- bzw. Omeprazol-vermittelte Radikalsenkung vollständig aufgehoben werden. Dies bestätigt eine Verknüpfung zwischen HO-1-Aktivierung und den indirekten antioxidativen Effekten der getesteten Prazole.

Die HO-1-Induktion durch PPIs ließ sich mittels gaschromatographischer Bestimmung der CO-Produktion in verschiedenen Geweben auch *in vivo* nachweisen. Die Menge an freigesetztem CO korreliert bei dieser Methode mit der HO-Aktivität der jeweiligen Gewebe. Eine erhöhte HO-Aktivität konnte nach intraperitonealer Omeprazolapplikation ($120\ \mu\text{mol/kg KG}$) im Magenkorpus beobachtet werden.

Die intraperitoneal verabreichte Dosis von $120\ \mu\text{mol/kg KG}$ orientierte sich an anderen *in vivo* Studien, in denen antioxidative Effekte für Omeprazol gezeigt werden konnten (Blandizzi et al. 1995; Koch et al. 2002; Naseri et al. 2006). Im Magengewebe kam es zu einer signifikanten Steigerung der HO-Aktivität. Diese Ergebnisse bestätigten die HO-1 als möglichen Mediator der gastroprotektiven Effekte von PPIs *in vivo*. In weiteren getesteten Geweben hatte Omeprazol keinen signifikanten Einfluss auf die HO-Aktivität.

Interessant ist allerdings eine tendenzielle Minderung der HO-Aktivität in der Niere. In Kombination mit den aktivitätssenkenden Effekten in der Leber, die nach einer oralen Applikation von Omeprazol erzielt wurden, ist auch eine Inhibition der HO durch bestimmte Omeprazolmetabolite denkbar. Durch orale Gabe von Omeprazol in einer nicht-magensaftresistenten Formulierung erfolgt bereits bei der ersten Magenpassage die Zerstörung der *Prodrug*-Struktur. Die Metabolisierung in der Leber über CYP3A4 und CYP2C19 führt zu den entsprechenden Desmethyl-, Hydroxymethyl- und Sulfonderivaten (Abb. 41). DeNagel und Mitarbeiter konnten Azalanstat, ein Imidazoldioxolan, als Inhibitor der HO-1-Aktivität identifizieren (Denagel et al. 1998). Untersuchungen von Kinobe und Mitarbeitern konnten weitere Imidazoldioxolane als HO-Inhibitoren mit z.T. unterschiedlicher Präferenz für HO-1 oder HO-2 klassifizieren (Abb. 41) (Kinobe et al. 2006). Strukturelle Gemeinsamkeiten von diversen HO-Inhibitoren und dem Omeprazolmolekül, welche sich u.a. in der Umsetzung durch CYP3A-Enzyme zeigen, lässt eine mögliche Inhibition der HO durch bestimmte Omeprazolmetabolite vermuten. Weitere *in vivo* Experimente mit verschiedenen Applikationswegen und Omeprazolmetaboliten wären vor dem Hintergrund interessant, dass mit Omeprazol bzw. bestimmten Metabolisierungsprodukten sowohl eine Inhibition als auch eine Stimulierung der HO-1 erzielt werden könnte.

Chemische Struktur der HO-Inhibitoren	IC ₅₀ Milz	IC ₅₀ Gehirn	Struktur Omeprazolmetabolite
<p>Chemical structure of Azalanstat (2HCl), an imidazolidioxolan derivative with a 4-aminophenyl group and a 4-chlorophenyl group.</p>	5,8±1,0	28,0±8,2	<p>Chemical structure of Hydroxyomeprazole, a metabolite of omeprazole with a hydroxyl group and a methoxy group.</p>
<p>Chemical structure of Omeprazole HCl, an imidazolidioxolan derivative with a 4-chlorophenyl group and a methyl group.</p>	0,6±0,2	394,2±5,0	<p>Chemical structure of Omeprazole sulfone, a metabolite of omeprazole with a sulfone group and a methoxy group.</p>
<p>Chemical structure of 5-O-desmethyl omeprazole HCl, a metabolite of omeprazole with a hydroxyl group and a methoxy group.</p>	2,8±1,3	>100	<p>Chemical structure of 5-O-desmethyl omeprazole, a metabolite of omeprazole with a hydroxyl group and a methoxy group.</p>

Abbildung 41: Chemische Struktur und inhibitorische Potenz verschiedener HO-Inhibitoren nach Kinobe et al. (Kinobe et al. 2006) im Vergleich zur chemischen Struktur der drei identifizierten Omeprazolmetabolite (Äbelö et al. 2000).

Abgesehen von Häm als Substrat und somit klassischem Induktor der HO-1 haben unterschiedliche Studien gezeigt, dass das HO-Gen durch eine Vielzahl anderer Stimuli wie UV-Irradiation, Endotoxine, Schwermetalle und Oxidanzien wie Hydrogenperoxid induziert werden kann (Keyse et al. 1989; Vile et al. 1993; Maeshima et al. 1996). Als gemeinsamer Mechanismus der HO-1-Aktivierung dieser und einiger anderer Induktoren gilt die Fähigkeit, ROS zu generieren. Um direkten oder indirekten Stress bei der Aktivierung des HO-1-Gens durch PPIs auszuschließen, wurden Endothelzellen

gleichzeitig mit PPIs und SOD behandelt. Der Organismus besitzt verschiedene Enzymsysteme, welche ROS abfangen und ihre destruktive Wirkung auf Membranlipide, Proteine und Nukleinsäuren unterbinden. Ein solcher endogener Schutzmechanismus ist die Superoxiddismutase-reaktion. Die SOD katalysiert dabei den Abbau von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Eine Vorinkubation der Endothelzellen mit SOD konnte die PPI-vermittelte HO-1-mRNA-Synthese nicht signifikant vermindern. Die erzielten Ergebnisse deuten auf eine von oxidativem Stress unabhängige Induktion des HO-1-Gens durch Lansoprazol und Omeprazol hin.

Durch den Transkriptionsinhibitor Act D sowie den Translationshemmer CHX wurde die Lansoprazol-vermittelte Synthese der HO-1-mRNA nahezu vollständig bzw. teilweise inhibiert. Diese Befunde belegen eine transkriptionelle Regulierung der PPI-induzierten HO-1-Genexpression. Außerdem geben sie einen Hinweis darauf, dass die HO-1-Aktivierung nicht durch direkte Interaktion von Lansoprazol mit der DNA induziert wird. Vielmehr scheint eine innerhalb kurzer Zeit stimulierbare *De-novo*-Synthese von Proteinen für die PPI-vermittelte HO-1-Induktion von entscheidender Relevanz zu sein. Als Peptide mit kurzer Halbwertszeit, die Einfluss auf die Aktivierung des HO-1-Gens nehmen, wurden in den letzten Jahren v.a. die Transkriptionsfaktoren Nrf2 und AP-1 diskutiert (Alam 1994; Alam et al. 1995; Huang et al. 2000). Speziesabhängig wurden darüber hinaus in der Promotorregion des HO-1-Gens Bindungsstellen für AP-2, NF κ B sowie für Interleukin- und Prostaglandinderivate gefunden (Lavrovsky et al. 1994; Koizumi et al. 1995; Choi et al. 1996).

Die Beteiligung bestimmter Transkriptionsfaktoren an der HO-1-Genexpression durch PPIs lässt außerdem eine Involvierung intrazellulärer Signalkaskaden vermuten. Welche Signaltransduktionswege dabei in Frage kommen könnten, sollte mit verschiedenen Hemmstoffexperimenten untersucht werden.

Ein wichtiger Signaltransmitter im kardiovaskulären, neuronalen und gastralen System ist das endogen durch die NO-Synthasen aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Stickstoff gebildete Gas NO. Eine Vielzahl von Studien postuliert NO als potenten Induktor der HO-1 (Motterlini et al. 1996; Durante et al. 1997; Immenschuh et al. 1998; Polte et al. 2000a). Abgesehen von der HO-1-Induktion durch direkte NO-Donoren ist auch eine indirekte Stimulierung der HO-1 über die Aktivierung der endogenen NO-Synthasen möglich (Grosser et al. 2003b).

Die Familie der NO-Synthasen bilden drei verschiedene Isoenzyme, welche Produkte unterschiedlicher Gene sind. Vorwiegend in Endothelzellen und neuronalen Zellen werden die konstitutiven NO-Synthasen eNOS (endotheliale NO-Synthase) und nNOS (neuronale NO-Synthase) exprimiert. Die Bildung der iNOS (induzierbare NO-Synthase) wird nach exogener Stimulation v.a. in Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen initiiert (Forstermann et al. 1994). Die Epithelzellen der Magenschleimhaut sind ebenfalls zur NO-Bildung befähigt. NO ist ein essentieller Mediator mukosaler Sekretions- und Protektionsmechanismen, indem es die Durchblutung der Mukosa aufrecht erhält, die Aggregation von Leukozyten und Thrombozyten unterbindet sowie die Sekretion von Schleim, Flüssigkeit und Bikarbonat fördert (Wallace et al. 2001). Als Modulator der Wundheilung, von Entzündungsprozessen und der unspezifischen Immunabwehr kann NO die Heilung gastraler Ulzerationen beschleunigen (Elliott et al. 1995; Schaffer et al. 1997; Martin et al. 2001). Eine Gastroprotektion durch vermehrte

NO-Bildung konnte in einer Studie von Hsu und Mitarbeitern gezeigt werden (Hsu et al. 2005). Zytoprotektive Effekte von NO-Naproxen durch Induktion der antioxidativen HO-1 wurden von Berndt und Mitarbeitern im Zellkulturmodell nachgewiesen (Berndt et al. 2005). Die Studienlage hinsichtlich einer vermehrten NO-Bildung unter PPI-Gabe ist kontrovers. Agnihotri und Mitarbeiter beobachteten im Tiermodell nach Applikation von Lansoprazol (90 $\mu\text{mol/kg KG}$) zwar erhöhte Nitrit-Spiegel in der gastralen Mukosa, in der Leber konnten allerdings keine Änderungen der Nitrit-Spiegel detektiert werden (Agnihotri et al. 2007). In Tierstudien anderer Autoren ließen sich keine veränderten NO_x -Spiegel in der sekretorischen Flüssigkeit des Magenlumens feststellen (Natale et al. 2004). Blandizzi und Mitarbeiter konnten in ihren Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen den protektiven Effekten von Lansoprazol (90 $\mu\text{mol/kg KG}$) gegenüber einer Ethanol-HCl-induzierten Mukosaschädigung und einer möglichen NO-Bildung nachweisen (Blandizzi et al. 1999). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Murakami und Mitarbeitern, die nach Lansoprazolapplikation (10 und 30 mg/kg KG) erhöhte NO-Spiegel und einen erhöhten mukosalen Blutfluss sowie eine Unterbindung der Lansoprazol-vermittelten Gastroprotektion durch den NO-Syntheseninhibitor L-NAME beobachteten (Murakami et al. 1996).

Mit Hilfe des NOS-Hemmstoffes L-NAME sollte geklärt werden, ob die Lansoprazol-induzierte HO-1-Genexpression möglicherweise durch NO vermittelt wird. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen in Endothelzellen lassen keine Involvierung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels bei der Induktion des HO-1-Gens durch PPIs vermuten.

In den letzten Jahren wird in der Literatur zunehmend ein Zusammenhang zwischen den antioxidativen Enzymen HO-1 und TRX diskutiert (Wiesel et al. 2000; Ejima et al. 2002; Trigona et al. 2006). TRX ist als intrazellulärer Redoxregulator an Protektionsmechanismen, Zellwachstum und –proliferation (Mustacich et al. 2000) sowie der Aktivierung von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und $\text{NF}\kappa\text{B}$ beteiligt (Wiesel et al. 2000; Ejima et al. 2002; Mostert et al. 2003). Interessanterweise sind beide Transkriptionsfaktoren auch in die Transkriptionskontrolle des HO-1-Gens involviert (Alam et al. 2007). Das Glutathionreduktase-/Glutathionsystem stellt ein weiteres physiologisches Redoxsystem dar. Dabei sorgt die Reduktase, ähnlich dem TRX/TRX-Reduktasesystem, unter Verwendung von NADPH als Reduktionsmittel für die Regeneration der Thiolgruppe an den Cysteinresten, welche für das antioxidative Potenzial verantwortlich ist (Mustacich et al. 2000; Nkabyo et al. 2002). Eine erhöhte Verfügbarkeit von reduziertem Glutathion unter PPI-Gabe wurde in Tierexperimenten beobachtet (Koch et al. 2002; Natale et al. 2004; Blandizzi et al. 2005). Interaktionen mit der TRX/TRX-Reduktase als weiteres Thiol-Redoxsystem wären denkbar. Zur Prüfung dieser These wurde der spezifische TRX-Reduktasehemmstoff DNFB verwendet. Mit einer Konzentration von 0,1 μM kann eine völlige Inhibition der TRX-Reduktase erzielt werden (Arner et al. 1995). Auf die Lansoprazol-vermittelte Aktivierung der HO-1-Transkription hatte DNFB in dieser Konzentration jedoch keinen Einfluss. Eine Beteiligung des TRX/TRX-Reduktasesystems an der Lansoprazol-vermittelten HO-1-Induktion scheint aufgrund der vorliegenden Ergebnisse unwahrscheinlich.

Der MAP-Kinase-Signalweg wird in der Literatur als einer der ersten Signalwege in Zusammenhang mit einer Induktion der HO-1 durch verschiedene extrazelluläre Stimuli beschrieben. Die MAP-Kinasen bilden einen Ast der Insulin IGF-1 (*Insulin-like-growth factor 1*) Signalkaskaden, wobei die drei MAP-Kinasen-Familien JNK, ERK und p38 sowohl untereinander als auch mit anderen Serin/Threonin-Proteinkinasen in Wechselwirkung treten können (Maines et al. 2005). JNK und p38 werden hauptsächlich durch diverse Stressfaktoren aktiviert und nehmen Einfluss auf die Apoptose und die Zellproliferation sowie das Entzündungsgeschehen. Die Anregung der Kinase ERK erfolgt hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren und spielt eine Rolle bei der Regulation von Zelldifferenzierungs- und Zellproliferationsprozessen. Kürzlich wurde in einer Studie von Yeo und Mitarbeitern eine mögliche Interaktion von PPIs mit dem MAP-Kinasen-Signalweg beschrieben. In primären humanen Endothelzellen konnte die H. pylori-vermittelte Aktivierung der Kinase ERK durch PPIs gemindert bzw. die Phosphorylierung von ERK 1/2 inhibiert werden (Yeo et al. 2006). Die Aktivierung bzw. Inhibition der MAP-Kinasen ist stark gewebe-, zell- und induktorspezifisch. So können Mitglieder der MAP-Kinasen-Familie in verschiedenen Zelltypen durch den gleichen Stimulus sowohl aktiviert als auch inhibiert werden (Chen et al. 2000). Inwieweit die PPIs in der Lage sind, über die Anregung der MAP-Kinasen-Kaskade eine HO-1-Induktion zu vermitteln, sollte mit spezifischen Hemmstoffen der unterschiedlichen MAP-Kinasen untersucht werden. Die MAP-Kinasen ERK und JNK scheinen aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht an der HO-1-Genregulation durch PPIs beteiligt zu sein. Welchen Einfluss die terminale Kinase p38 auf die PPI-vermittelte HO-1-Aktivierung nimmt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht zufriedenstellend geklärt werden. Gegen eine Involvierung der p38 MAP-Kinasen sprechen die Ergebnisse in Mausfibroblasten. In diesem Zellsystem konnten beide p38 MAP-Kinaseinhibitoren die Stimulierung des mHO-1-Promotors durch PPIs nicht hemmen. Im Unterschied dazu, konnte mit dem Hemmstoff SB203580 in einer Konzentration von 30 μM eine signifikante Inhibition der HO-1-mRNA-Bildung in Endothelzellen erzielt werden. Allerdings ist die Spezifität von SB203580 für p38 in Konzentrationsbereichen über 10 μM bereits eingeschränkt. Die IC_{50} -Werte für die α - und β -Isoformen der p38-Kinase betragen 50 nM und 500 nM. Bei einer 10fach höheren Hemmstoffkonzentration können bereits Interaktionen mit PDK1 auftreten. Eine Minderung bzw. Hemmung der Aktivität von LCK (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), GSK3 β oder Akt ist in SB203580-Konzentrationsbereichen möglich, welche die IC_{50} -Werte für p38 um das 100-500fache überschreiten (Davies et al. 2000; Wang et al. 2007). Der zweite p38 Hemmstoff SB202190 wurde nur bis zu einer maximalen Konzentration von 10 μM verwendet. Wechselwirkungen mit anderen Kinasen sind in dieser Konzentration vernachlässigbar (Davies et al. 2000). Da sich allerdings in Endothelzellen auch bei geringeren Hemmstoffkonzentrationen von SB203580 eine tendenzielle Abnahme der Lansoprazol-induzierten HO-1-mRNA-Menge detektieren ließ, ist eine zumindest partielle Beteiligung des p38-MAP-Kinasen-Signalweges an der PPI-vermittelten HO-1-Aktivierung nicht ausgeschlossen. Eine signifikante Verminderung der Lansoprazol-vermittelten HO-1-Genaktivierung durch höhere Konzentrationen von SB203580 könnte eventuell in einem Verlust an Spezifität und damit in der Beeinflussung anderer Signalwege, wie z.B. der PI3K/Akt-Kaskade, begründet liegen. Diese These wird durch die Ergebnisse mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 gestützt. Eine

Interaktion beider Signalkaskaden wurde bereits von verschiedenen Autoren postuliert (Alvarez-Maqueda et al. 2004; Kocanova et al. 2007) und wäre daher denkbar. Ob andere Isoformen der p38 an der HO-1-Genaktivierung durch PPIs beteiligt sind, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

Abschließend wurden Untersuchungen zur möglichen Beteiligung des PI3K-Signalweges an der PPI-induzierten HO-1-Expression durchgeführt. Die PI3K vermittelt, v.a. über die Aktivierung der Serin-/Threoninkinase Akt, antiapoptische Effekte (Salinas et al. 2003; Arruda et al. 2004). Darüber hinaus führt die Aktivierung der PDK1 zur Phosphorylierung von p70S6, CISK und PKC ζ , welche an Zellwachstum, -überleben und verschiedenen zellulären Reaktionskaskaden beteiligt sind (siehe Kapitel 1.4.2.2 und Abb. 6) (Cantley 2002). Zunehmend finden sich in der Literatur Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen dem PI3K-Signalweg und der HO-1-Genexpression. Dabei wird sowohl eine PI3K-abhängige Stimulierung der HO-1-Expression (Martin et al. 2004; Kocanova et al. 2007; Lin et al. 2007) als auch eine gegenseitige positive Beeinflussung in der Vermittlung zytoprotektiver Effekte diskutiert (Brunt et al. 2006). Die Aktivierung der HO-1 über den PI3K-Weg ist durch verschiedene Stimuli möglich. Sowohl pro-oxidative (Kang et al. 2002; Brunt et al. 2006) als auch antioxidative Substanzen (Martin et al. 2004) sowie diverse andere Induktoren (Kocanova et al. 2007; Lin et al. 2007) wurden als Aktivatoren des PI3K-Signalweges in der Literatur beschrieben. In verschiedenen Studien wurde eine Interaktion der PI3K-Kaskade mit den Transkriptionsfaktoren Nrf2 (Martin et al. 2004; Brunt et al. 2006) und NF κ B (Kang et al. 2002; Lin et al. 2007) aufgezeigt. Dabei bewirkt deren Translokation in den Zellkern und Bindung an bestimmte AREs in der Promotorregion des HO-1-Gens eine vermehrte HO-1-Transkription.

Mit den spezifischen PI3K-Hemmstoffen LY294002 und Wortmannin wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Beteiligung der PI3K-Kaskade an der HO-1-Induktion durch Prazole untersucht. Eine signifikante Minderung der Lansoprazol-induzierten HO-1-mRNA-Synthese sowie der Promotoraktivität um 40-50% in Endothelzellen, Makrophagen und Mausfibroblasten durch LY294002 deutet auf eine Relevanz des PI3K-Signalweges bei der PPI-vermittelten HO-1-Expression hin. Im Gegensatz dazu zeigte Wortmannin keine Effekte auf die HO-1-mRNA-Menge bzw. -Promotoraktivität. Obwohl beide Hemmstoffe in den verwendeten maximalen Konzentrationen eine fast vollständige Inhibition der PI3K erzielen (Arcaro et al. 1993; Powis et al. 1994; Vlahos et al. 1994; Davies et al. 2000), unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Potenz, andere Kinasen bzw. *downstream* Mediatoren des PI3K-Weges (siehe Kapitel 1.4.2.2 und Abb. 6) zu beeinflussen (Davies et al. 2000; Adi et al. 2001). Adi und Mitarbeiter postulierten, dass LY294002 die p70S6K bereits in Konzentration von 10-25 μ M fast vollständig inhibiert, während zur Hemmung von Akt deutlich höhere Konzentrationen von 150-200 μ M erforderlich sind. Darüber hinaus scheinen der jeweilige Stimulus und der Zelltyp für die inhibitorische Potenz der beiden Hemmstoffe für Akt und p70S6K ebenfalls von Bedeutung zu sein (Davies et al. 2000; Adi et al. 2001). Eine Involvierung des PI3K-Signalweges ist somit trotz der ausbleibenden Inhibition durch Wortmannin denkbar, wobei v.a. *downstream*-Mediatoren der PI3K-Kaskade Einfluss auf die PPI-vermittelte HO-1-Expression nehmen könnten. Die Proteinkinase Akt wird in drei Isoformen exprimiert. Unterschiede hinsichtlich der Inhibition einzelner Isoformen wären daher ebenfalls denkbar. Untersuchungen von Davies und Mitarbeitern zeigten, dass

LY294002 in einer Konzentration von 50 μM auch mit anderen Kinasen wie der Casein-Kinase 2 (CK2) und GSK3 β sowie, im Unterschied zu Wortmannin, verstärkt mit Akt 1 interagieren kann. Interessanterweise zeigt der MAP-Kinase-Hemmstoff SB203580 ähnliche inhibitorische Potenz für GSK3 β wie LY294002 und führt außerdem bereits in geringeren Konzentrationen (10 μM) zur partiellen Inhibition von Akt 1 (Davies et al. 2000). Um die Frage nach möglichen Signaltransduktionswegen, welche die HO-1-Induktion durch PPIs vermitteln, abschließend zu klären, müssten weitere Experimente durchgeführt werden.

Zusammenfassend charakterisieren die Ergebnisse dieser Arbeit das HO-1/Ferritinsystem als Zielstruktur von PPIs *in vitro* und *in vivo*. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Induktion der protektiven HO-1 und antioxidativer Effekte von PPIs konnte in einem Modell für oxidativen Stress gezeigt werden. Dass sich eine vermehrte HO-1-Genexpression in einem katalytisch aktiven Enzym manifestiert, weist auf die HO-1 als Mediator der pleiotropen Effekte von PPIs hin. Dieser Mechanismus könnte neben der potenten Säurehemmung die Überlegenheit der Prazole bei Ulkuserkrankungen und Gastriden erklären. Es ist wahrscheinlich, dass die prophylaktische bzw. gleichzeitige Gabe von Prazolen das gastrointestinale Risiko einer Dauertherapie mit NSAIDs sowohl durch die stark antisekretorische Wirkung als auch durch die Induktion antioxidativer und antiinflammatorischer Stoffwechselwege mindert.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von PPIs als mögliche Aktivatoren des HO-1-/Ferritinsystems.

Omeprazol und Lansoprazol sind potente Induktoren der HO-1 in verschiedenen Zellsystemen. Die Aktivierung des HO-1-Stoffwechselweges ist unabhängig von der Protonenpumpenhemmung und zeigt sich auf transkriptioneller und translationeller Ebene sowie in Form eines katalytisch aktiven Enzyms.

Beide PPIs führen in Makrophagen und Endothelzellen zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Induktion des Eisenspeicherproteins Ferritin.

Die PPI-vermittelte HO-1-mRNA-Synthese wird transkriptionell reguliert. Dies zeigen Befunde mit dem Transkriptionsblocker Act D sowie die konzentrations- und zeitabhängige Stimulierung des mHO-1-Promotors durch PPIs in Mausfibroblasten.

Ergebnisse mit dem Proteinsynthesehemmer CHX deuten auf eine mögliche Beteiligung von neu gebildeten, kurzlebigen Proteinen an der PPI-vermittelten Genaktivierung der HO-1 hin.

Durch Verwendung von SOD konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Synthese der HO-1-mRNA durch PPIs nicht über ROS vermittelt wird.

Eine mögliche Involvierung von NO- oder TRX-abhängigen Stoffwechselwegen an der Aktivierung der HO-1-Expression durch PPIs kann aufgrund von Hemmstoffexperimenten mit L-NAME und DNCB ausgeschlossen werden.

Spezifische Inhibitoren der MAP-Kinasen JNK und ERK zeigen keine Effekte auf die Genaktivierung der HO-1 durch PPIs. Die Ergebnisse mit spezifischen p38-MAP-Kinase-Hemmstoffen schließen eine mögliche Bedeutung der p38 Kinase an der PPI-vermittelten HO-1-Induktion nicht aus. Eine alleinige Regulationskontrolle über den p38 MAP-Kinasen-Signalweg scheint allerdings unwahrscheinlich.

Der PI3K-Hemmstoff LY294002 hemmt die Lansoprazol-induzierte HO-1-mRNA-Synthese und -Promotoraktivität signifikant. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der PI3K-Signalkaskade an der HO-1-Genaktivierung durch PPIs hin. Untersuchungen mit Wortmannin, einem weiteren PI3K-Hemmstoff, lassen vermuten, dass dabei besonders Mediatoren *downstream* von PI3K von Bedeutung sind.

Omeprazol und Lansoprazol zeigen in einem Modell für oxidativen Stress indirekte antioxidative Effekte. Dass die radikalsenkende Wirkung der PPIs eine funktionelle Konsequenz der HO-1-Stimulierung darstellt, belegen die Ergebnisse mit dem HO-1-Produkt Bilirubin und dem HO-Aktivitätshemmer CrMP.

Im Tiermodell erhöht Omeprazol nach intraperitonealer Gabe die HO-Aktivität im Zielorgan, dem Magen, signifikant.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen die Aktivierung antioxidativer und antiinflammatorischer Stoffwechselwege durch PPIs *in vitro* und *in vivo*. Die Induktion des HO-1-/Ferritinsystems könnte die pleiotropen Effekte der PPIs erklären und neben der antisekretorischen Wirkung zu einer verstärkten Gastroprotektion beitragen.

Die vorliegenden Ergebnisse mit FVB-Mäusen belegen eine HO-1-Aktivierung *in vivo*. Interessant wären weiterführende Untersuchungen mit verschiedenen PPI-Metaboliten unter dem Aspekt, dass sowohl eine HO-1-Stimulierung als auch eine Inhibition in Abhängigkeit von der chemischen Struktur denkbar wäre. Da PPIs in der Therapie meist über einen Zeitraum von 4-6 Wochen eingesetzt werden, wäre eine *in vivo* Langzeitstudie sinnvoll.

Darüber hinaus kann die vorliegende Arbeit den Signalweg der HO-1-Aktivierung durch PPIs nicht vollständig klären. Weitere Experimente, wie z.B. die Detektion phosphorylierter Kinasen sowie Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen mRNA-Stabilisierung durch PPIs wären denkbar.

7 Literaturverzeichnis

- Abate A, Zhao H, Wong RJ and Stevenson DK** (2007). The role of Bach1 in the induction of heme oxygenase by tin mesoporphyrin. *Biochem Biophys Res Commun* 354(3): 757-63
- Äbelö A, Andersson TB, Antonsson M, Naudot AK, Skanberg I and Weidolf L** (2000). Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 28(8): 966-72
- Abraham NG, Lin JH, Schwartzman ML, Levere RD and Shibahara S** (1988). The physiological significance of heme oxygenase. *Int J Biochem* 20(6): 543-58
- Adi S, Wu NY and Rosenthal SM** (2001). Growth factor-stimulated phosphorylation of Akt and p70(S6K) is differentially inhibited by LY294002 and Wortmannin. *Endocrinology* 142(1): 498-501
- Agnihotri N, Kaur H, Kaur N and Sarotra P** (2007). Role of oxidative stress in lansoprazole-mediated gastric and hepatic protection in Wistar rats. *Indian J Gastroenterol* 26(3): 118-21
- Alam J** (1994). Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals. *J Biol Chem* 269(40): 25049-56
- Alam J, Camhi S and 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(20): 11977-84
- Alam J and Cook JL** (2007). How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(2): 166-74
- Alam J, Killeen E, Gong P, Naquin R, Hu B, Stewart D, Ingelfinger JR and Nath KA** (2003). Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(4): F743-52
- Alam J, Wicks C, Stewart D, Gong P, Touchard C, Otterbein S, Choi AM, Burow ME and 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(36): 27694-702
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT and 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(46): 27489-94
- Alvarez-Maqueda M, El Bekay R, Alba G, Monteseirin J, Chacon P, Vega A, Martin-Nieto J, Bedoya FJ, Pintado E and Sobrino F** (2004). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes. *J Biol Chem* 279(21): 21929-37
- Alwine JC, Kemp DJ and 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(12): 5350-4
- Ameriso SF, Villamil AR, Zedda C, Parodi JC, Garrido S, Sarchi MI, Schultz M, Boczkowski J and Sevlever GE** (2005). Heme oxygenase-1 is expressed in carotid atherosclerotic plaques infected by *Helicobacter pylori* and is more prevalent in asymptomatic subjects. *Stroke* 36(9): 1896-900
- Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR and Hawkins PT** (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* 8(12): 684-91
- Andersson T, Andren K, Cederberg C, Lagerstrom PO, Lundborg P and Skanberg I** (1990). Pharmacokinetics and bioavailability of omeprazole after

- single and repeated oral administration in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 29(5): 557-63
- Andersson T, Holmberg J, Rohss K and Walan A** (1998). Pharmacokinetics and effect on caffeine metabolism of the proton pump inhibitors, omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole. *Br J Clin Pharmacol* 45(4): 369-75
- Aoki I, Okumura M and Yashiki T** (1991). High-performance liquid chromatographic determination of lansoprazole and its metabolites in human serum and urine. *J Chromatogr* 571(1-2): 283-90
- Appleton SD, Chretien ML, McLaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, Brien JF, Nakatsu K, Maurice DH and Marks GS** (1999). Selective inhibition of heme oxygenase, without inhibition of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations. *Drug Metab Dispos* 27(10): 1214-9
- Arcaro A and Wymann MP** (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 296 (Pt 2): 297-301
- Armstrong CP and Blower AL** (1987). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and life threatening complications of peptic ulceration. *Gut* 28(5): 527-32
- Arner ES, Bjornstedt M and Holmgren A** (1995). 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. Loss of thioredoxin disulfide reductase activity is accompanied by a large increase in NADPH oxidase activity. *J Biol Chem* 270(8): 3479-82
- Arroyo MT, Forne M, de Argila CM, Feu F, Arenas J, de la Vega J, Garrigues V, Mora F, Castro M, Bujanda L, Cosme A, Castiella A, Gisbert JP, Hervas A and Lanas A** (2004). The prevalence of peptic ulcer not related to *Helicobacter pylori* or non-steroidal anti-inflammatory drug use is negligible in southern Europe. *Helicobacter* 9(3): 249-54
- Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C and Graca-Souza AV** (2004). Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol* 173(3): 2023-30
- Bach FH** (2005). Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel. *Faseb J* 19(10): 1216-9
- Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW and Vercellotti GM** (1992a). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267(25): 18148-53
- Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K and Vercellotti GM** (1992b). Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins: a possible mechanism limiting shock damage. *Trans Assoc Am Physicians* 105: 1-6
- Balla J, Jeney V, Varga Z, Komodi E, Nagy E and Balla G** (2007a). Iron homeostasis in chronic inflammation. *Acta Physiol Hung* 94(1-2): 95-106
- Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW and Balla G** (2005). Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res* 49(11): 1030-43
- Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Jacob HS, Eaton JW and Balla G** (2007b). Heme, Heme Oxygenase, and Ferritin: How the Vascular Endothelium Survives (and Dies) in an Iron-Rich Environment. *Antioxid Redox Signal*
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J and Motterlini R** (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via

- regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 371(Pt 3): 887-95
- Bandyopadhyay D, Biswas K, Bandyopadhyay U, Reiter RJ and Banerjee RK** (2000). Melatonin protects against stress-induced gastric lesions by scavenging the hydroxyl radical. *J Pineal Res* 29(3): 143-51
- Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ and Banerjee RK** (2001). Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. *Curr Mol Med* 1(4): 501-13
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD and Snyder SH** (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 16093-8
- Barlow C, Dennery PA, Shigenaga MK, Smith MA, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd, Wynshaw-Boris A and Levine RL** (1999). Loss of the ataxia-telangiectasia gene product causes oxidative damage in target organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17): 9915-9
- Barranco SC, Townsend CM, Jr., Casartelli C, Macik BG, Burger NL, Boerwinkle WR and Gourley WK** (1983). Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 43(4): 1703-9
- Barton SG, Rampton DS, Winrow VR, Domizio P and Feakins RM** (2003). Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress Chaperones* 8(4): 329-34
- Basivireddy J, Vasudevan A, Jacob M and Balasubramanian KA** (2002). Indomethacin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in villus enterocytes. *Biochem Pharmacol* 64(2): 339-49
- Bauer I, Vollmar B, Jaeschke H, Rensing H, Kraemer T, Larsen R and Bauer M** (2000). Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. *J Hepatol* 33(3): 395-406
- Beale SI and Cornejo J** (1984). Enzymatic heme oxygenase activity in soluble extracts of the unicellular red alga, *Cyanidium caldarium*. *Arch Biochem Biophys* 235(2): 371-84
- Bebien M, Salinas S, Becamel C, Richard V, Linares L and Hipskind RA** (2003). Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene* 22(12): 1836-47
- Becker JC, Grosser N, Waltke C, Schulz S, Erdmann K, Domschke W, Schröder H and Pohle T** (2006). Beyond gastric acid reduction: proton pump inhibitors induce heme oxygenase-1 in gastric and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345(3): 1014-21
- Bellavite P** (1988). The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic Biol Med* 4(4): 225-61
- 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 and Anderson DW** (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13681-6
- Berndt G, Grosser N, Hoogstraate J and Schröder H** (2005). AZD3582 increases heme oxygenase-1 expression and antioxidant activity in vascular endothelial and gastric mucosal cells. *Eur J Pharm Sci* 25(2-3): 229-35

- Besancon M, Simon A, Sachs G and Shin JM** (1997). Sites of reaction of the gastric H,K-ATPase with extracytoplasmic thiol reagents. *J Biol Chem* 272(36): 22438-46
- Bhattacharjee M, Bhattacharjee S, Gupta A and Banerjee RK** (2002). Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in H. pylori-mediated and nonmediated gastric ulcer. *Free Radic Biol Med* 32(8): 731-43
- Birnboim HC and Doly J** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23
- Biswas K, Bandyopadhyay U, Chattopadhyay I, Varadaraj A, Ali E and Banerjee RK** (2003). A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *J Biol Chem* 278(13): 10993-1001
- Blandizzi C, Fornai M, Colucci R, Natale G, Lubrano V, Vassalle C, Antonioli L, Lazzeri G and Del Tacca M** (2005). Lansoprazole prevents experimental gastric injury induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs through a reduction of mucosal oxidative damage. *World J Gastroenterol* 11(26): 4052-60
- Blandizzi C, Gherardi G, Marveggio C, Natale G, Carignani D and Del Tacca M** (1995). Mechanisms of protection by omeprazole against experimental gastric mucosal damage in rats. *Digestion* 56(3): 220-9
- Blandizzi C, Natale G, Gherardi G, Lazzeri G, Marveggio C, Colucci R, Carignani D and Del Tacca M** (1999). Acid-independent gastroprotective effects of lansoprazole in experimental mucosal injury. *Dig Dis Sci* 44(10): 2039-50
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK and 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(21): 1520-8, 2 p following 1528
- 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 and Soares MP** (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 192(7): 1015-26
- Brown JF, Keates AC, Hanson PJ and Whittle BJ** (1993). Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 265(3 Pt 1): G418-22
- Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y and Halpern Z** (1999). The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 31(1): 27-38
- Brunt KR, Fenrich KK, Kiani G, Tse MY, Pang SC, Ward CA and Melo LG** (2006). Protection of human vascular smooth muscle cells from H₂O₂-induced apoptosis through functional codependence between HO-1 and AKT. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(9): 2027-34
- Camhi SL, Alam J, Wiegand GW, Chin BY and 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(2): 226-34

- Cantley LC** (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573): 1655-7
- Cantrell DA** (2001). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 114(Pt 8): 1439-45
- Caspary WF, Arnold R, Bayerdorffer E, Behrens R, Birkner B, Braden B, Domschke W, Labenz J, Koletzko S, Malfertheiner P, Menge H, Rosch W, Schepp W, Strauch M and Stolte M** (1996). [Diagnosis and therapy of Helicobacter pylori infection. Guidelines of the German Society of Digestive and Metabolic Diseases]. *Z Gastroenterol* 34(6): 392-401
- Cathcart MK** (2004). Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(1): 23-8
- Cederberg C, Rohss K, Lundborg P and Olbe L** (1993). Effect of once daily intravenous and oral omeprazole on 24-hour intragastric acidity in healthy subjects. *Scand J Gastroenterol* 28(2): 179-84
- Chan FK** (2007). Proton-pump inhibitors as a protective treatment for high-risk patients receiving treatment with NSAIDs. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3(12): 694-5
- Chan FK, Wong VW, Suen BY, Wu JC, Ching JY, Hung LC, Hui AJ, Leung VK, Lee VW, Lai LH, Wong GL, Chow DK, To KF, Leung WK, Chiu PW, Lee YT, Lau JY, Chan HL, Ng EK and Sung JJ** (2007). Combination of a cyclooxygenase-2 inhibitor and a proton-pump inhibitor for prevention of recurrent ulcer bleeding in patients at very high risk: a double-blind, randomised trial. *Lancet* 369(9573): 1621-6
- Chen K and Maines MD** (2000). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46(3): 609-17
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA and FitzGerald GA** (2002). Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 296(5567): 539-41
- Cho CH and Ogle CW** (1979). Cholinergic-mediated gastric mast cell degranulation with subsequent histamine H₁- and H₂-receptor activation in stress ulceration in rats. *Eur J Pharmacol* 55(1): 23-33
- Choi AM and 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(1): 9-19
- Chomczynski P and Sacchi N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-9
- Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ and Motterlini R** (2000). Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(2): H643-51
- Cornejo J, Willows RD and Beale SI** (1998). Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J* 15(1): 99-107
- Cozzi A, Corsi B, Levi S, Santambrogio P, Albertini A and Arosio P** (2000). Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem* 275(33): 25122-9
- Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR and Lee JC** (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue

- which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364(2): 229-33
- Cullen D, Bardhan KD, Eisner M, Kogut DG, Peacock RA, Thomson JM and Hawkey CJ** (1998). Primary gastroduodenal prophylaxis with omeprazole for non-steroidal anti-inflammatory drug users. *Aliment Pharmacol Ther* 12(2): 135-40
- Das D, Bandyopadhyay D and Banerjee RK** (1998). Oxidative inactivation of gastric peroxidase by site-specific generation of hydroxyl radical and its role in stress-induced gastric ulceration. *Free Radic Biol Med* 24(3): 460-9
- Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M and Banerjee RK** (1997). Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radic Biol Med* 23(1): 8-18
- Das D and Banerjee RK** (1993). Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Mol Cell Biochem* 125(2): 115-25
- Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Sheaff MT, Banatvala N, Laurenson IF, Blake DR and Rampton DS** (1994). Helicobacter pylori stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut* 35(2): 179-85
- Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P** (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351(Pt 1): 95-105
- Davis SJ, Kurepa J and Vierstra RD** (1999). The Arabidopsis thaliana HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11): 6541-6
- Decker T and Lohmann-Matthes ML** (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115(1): 61-9
- Denagel DC, Verity AN, Madden FE, Yang CO, Sangameswaran L and Johnson RM** (1998). Identification of nonporphyrin inhibitors of heme oxygenase-1. *Neuroscience* 24: 2058
- Dennery PA, Lee CS, Ford BS, Weng YH, Yang G and Rodgers PA** (2003). Developmental expression of heme oxygenase in the rat lung. *Pediatr Res* 53(1): 42-7
- Deramandt BM, Braunstein S, Remy P and Abraham NG** (1998). Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 68(1): 121-7
- Djousse L, Levy D, Cupples LA, Evans JC, D'Agostino RB and Ellison RC** (2001). Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. *Am J Cardiol* 87(10): 1196-200; A4, 7
- Djousse L, Rothman KJ, Cupples LA, Levy D and Ellison RC** (2003). Effect of serum albumin and bilirubin on the risk of myocardial infarction (the Framingham Offspring Study). *Am J Cardiol* 91(4): 485-8
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ and Saltiel AR** (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17): 7686-9
- Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ and Schafer AI** (1997). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 80(4): 557-64
- Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W and Munro HN** (1991). Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(3): 688-92

- Ejima K, Layne MD, Carvajal IM, Nanri H, Ith B, Yet SF and Perrella MA** (2002). Modulation of the thioredoxin system during inflammatory responses and its effect on heme oxygenase-1 expression. *Antioxid Redox Signal* 4(4): 569-75
- Ekstrom P, Carling L, Wetterhus S, Wingren PE, Anker-Hansen O, Lundegardh G, Thorhallsson E and Unge P** (1996). Prevention of peptic ulcer and dyspeptic symptoms with omeprazole in patients receiving continuous non-steroidal anti-inflammatory drug therapy. A Nordic multicentre study. *Scand J Gastroenterol* 31(8): 753-8
- Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ and 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(15): 8922-31
- Elliott SN, McKnight W, Cirino G and Wallace JL** (1995). A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 109(2): 524-30
- Epsztejn S, Glickstein H, Picard V, Slotki IN, Breuer W, Beaumont C and Cabantchik ZI** (1999). H-ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood* 94(10): 3593-603
- Feinberg AP and Vogelstein B** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132(1): 6-13
- Florent C and Forestier S** (1997). Twenty-four-hour monitoring of intragastric acidity: comparison between lansoprazole 30mg and pantoprazole 40mg. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9(2): 195-200
- Fogg S, Agarwal A, Nick HS and Visner GA** (1999). Iron regulates hyperoxia-dependent human heme oxygenase 1 gene expression in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(4): 797-804
- Fornai M, Natale G, Colucci R, Tuccori M, Carazzina G, Antonioli L, Baldi S, Lubrano V, Abramo A, Blandizzi C and Del Tacca M** (2005). Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372(1): 79-87
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I and Kleinert H** (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23(6 Pt 2): 1121-31
- Franic TV, Judd LM, Robinson D, Barrett SP, Scarff KL, Gleeson PA, Samuelson LC and Van Driel IR** (2001). Regulation of gastric epithelial cell development revealed in H(+)/K(+)-ATPase beta-subunit- and gastrin-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(6): G1502-11
- Frantz B, Klatt T, Pang M, Parsons J, Rolando A, Williams H, Tocci MJ, O'Keefe SJ and O'Neill EA** (1998). The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry* 37(39): 13846-53
- Fuji Y, Matura T, Kai M, Kawasaki H and Yamada K** (2000). Protection by polaprezinc, an anti-ulcer drug, against indomethacin-induced apoptosis in rat gastric mucosal cells. *Jpn J Pharmacol* 84(1): 63-70
- Funk M, Endler G, Schillinger M, Mustafa S, Hsieh K, Exner M, Lalouschek W, Mannhalter C and Wagner O** (2004). The effect of a promoter polymorphism in the heme oxygenase-1 gene on the risk of ischaemic cerebrovascular events: the influence of other vascular risk factors. *Thromb Res* 113(3-4): 217-23

- Garcia Rodriguez LA, Mannino S, Wallander MA and Lindblom B** (1996). A cohort study of the ocular safety of anti-ulcer drugs. *Br J Clin Pharmacol* 42(2): 213-6
- Gerloff J, Mignot A, Barth H and Heintze K** (1996). Pharmacokinetics and absolute bioavailability of lansoprazole. *Eur J Clin Pharmacol* 50(4): 293-7
- Gerrity RG** (1981a). The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 103(2): 181-90
- Gerrity RG** (1981b). The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 103(2): 191-200
- Gibson UE, Heid CA and Williams PM** (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6(10): 995-1001
- Gisbert JP, Gonzalez L, Calvet X, Roque M, Gabriel R and Pajares JM** (2001). Proton pump inhibitors versus H₂-antagonists: a meta-analysis of their efficacy in treating bleeding peptic ulcer. *Aliment Pharmacol Ther* 15(7): 917-26
- Graham DY, Agrawal NM, Campbell DR, Haber MM, Collis C, Lukasik NL and Huang B** (2002). Ulcer prevention in long-term users of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: results of a double-blind, randomized, multicenter, active- and placebo-controlled study of misoprostol vs lansoprazole. *Arch Intern Med* 162(2): 169-75
- Griendling KK, Sorescu D and Ushio-Fukai M** (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86(5): 494-501
- Grosser N, Abate A, Oberle S, Vreman HJ, Dennery PA, Becker JC, Pohle T, Seidman DS and Schröder H** (2003a). Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin. *Biochem Biophys Res Commun* 308(4): 956-60
- Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Hinkelmann U, Smith G and Schröder H** (2004a). Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 325(3): 871-6
- Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, Erdmann K, Hinkelmann U, Schurger S, Wijayanti N, Immenschuh S and Schröder H** (2004b). The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 37(12): 2064-71
- Grosser N and Schröder H** (2003b). Aspirin protects endothelial cells from oxidant damage via the nitric oxide-cGMP pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(8): 1345-51
- Guo JS, Cho CH, Wang WP, Shen XZ, Cheng CL and Koo MW** (2003). Expression and activities of three inducible enzymes in the healing of gastric ulcers in rats. *World J Gastroenterol* 9(8): 1767-71
- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R and Channon KM** (2000). UltraRapid communications : vascular superoxide production by NAD(P)H Oxidase Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86(9): 1008
- Hajdena-Dawson M, Zhang W, Contag PR, Wong RJ, Vreman HJ, Stevenson DK and Contag CH** (2003). Effects of metalloporphyrins on heme oxygenase-1 transcription: correlative cell culture assays guide in vivo imaging. *Mol Imaging* 2(3): 138-49
- Halliwell B, Zhao K and Whiteman M** (2000). The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 33(6): 819-30

- Handa O, Yoshida N, Fujita N, Tanaka Y, Ueda M, Takagi T, Kokura S, Naito Y, Okanoue T and Yoshikawa T** (2006). Molecular mechanisms involved in anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors. *Inflamm Res* 55(11): 476-80
- Hartmann M, Theiss U, Huber R, Luhmann R, Bliesath H, Wurst W and Lucker PW** (1996). Twenty-four-hour intragastric pH profiles and pharmacokinetics following single and repeated oral administration of the proton pump inhibitor pantoprazole in comparison to omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 10(3): 359-66
- Hawkey CJ, Karrasch JA, Szczepanski L, Walker DG, Barkun A, Swannell AJ and Yeomans ND** (1998). Omeprazole compared with misoprostol for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Omeprazole versus Misoprostol for NSAID-induced Ulcer Management (OMNIUM) Study Group. *N Engl J Med* 338(11): 727-34
- Hawkey CJ and Langman MJ** (2003). Non-steroidal anti-inflammatory drugs: overall risks and management. Complementary roles for COX-2 inhibitors and proton pump inhibitors. *Gut* 52(4): 600-8
- Hawkey CJ, Long RG, Bardhan KD, Wormsley KG, Cochran KM, Christian J and Moules IK** (1993). Improved symptom relief and duodenal ulcer healing with lansoprazole, a new proton pump inhibitor, compared with ranitidine. *Gut* 34(10): 1458-62
- Hayase M and Takeuchi K** (1986). Gastric acid secretion and lesion formation in rats under water-immersion stress. *Dig Dis Sci* 31(2): 166-71
- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y and Noguchi M** (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 336(2): 241-50
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10): 986-94
- Hennekens CH and Borzak S** (2008). Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Most Traditional Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Cause Similar Moderately Increased Risks of Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 13(1): 41-50
- Heo YS, Kim SK, Seo CI, Kim YK, Sung BJ, Lee HS, Lee JI, Park SY, Kim JH, Hwang KY, Hyun YL, Jeon YH, Ro S, Cho JM, Lee TG and Yang CH** (2004). Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *Embo J* 23(11): 2185-95
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11(9): 1026-30
- Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K and Yodoi J** (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3633-8
- Holzer P and Sametz W** (1986). Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. *Gastroenterology* 91(4): 975-81
- Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vincent GM and Williams RR** (1996). Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(2): 250-5
- Howden CW and Hunt RH** (1998). Guidelines for the management of Helicobacter pylori infection. Ad Hoc Committee on Practice Parameters of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 93(12): 2330-8

- Hsu DZ, Wang ST, Deng JF and Liu MY** (2005). Epinephrine protects against severe acute gastric bleeding in rats: role of nitric oxide and glutathione. *Shock* 23(3): 253-7
- Huang HC, Nguyen T and 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(23): 12475-80
- Immenschuh S, Hinke V, Ohlmann A, Gifhorn-Katz S, Katz N, Jungermann K and 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 and Ramadori G** (2000). Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 60(8): 1121-8
- Immenschuh S and Schröder H** (2006). Heme oxygenase-1 and cardiovascular disease. *Histol Histopathol* 21(6): 679-85
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD and Yamamoto M** (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13(1): 76-86
- Jaisser F and Beggah AT** (1999). The nongastric H⁺-K⁺-ATPases: molecular and functional properties. *Am J Physiol* 276(6 Pt 2): F812-24
- Jankov RP, Johnstone L, Luo X, Robinson BH and Tanswell AK** (2003). Macrophages as a major source of oxygen radicals in the hyperoxic newborn rat lung. *Free Radic Biol Med* 35(2): 200-9
- Jensen RT** (2006). Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98(1): 4-19
- Johnsen R, Forde OH, Straume B and Burhol PG** (1994). Aetiology of peptic ulcer: a prospective population study in Norway. *J Epidemiol Community Health* 48(2): 156-60
- Jüni P, Rutjes AW and Dieppe PA** (2002). Are selective COX 2 inhibitors superior to traditional non steroidal anti-inflammatory drugs? *Bmj* 324(7349): 1287-8
- Jung HK, Lee KE, Chu SH and Yi SY** (2001). Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 16(12): 1336-40
- Kampfer H, Kolb N, Manderscheid M, Wetzler C, Pfeilschifter J and Frank S** (2001). Macrophage-derived heme-oxygenase-1: expression, regulation, and possible functions in skin repair. *Mol Med* 7(7): 488-98
- Kang KW, Lee SJ, Park JW and Kim SG** (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol* 62(5): 1001-10
- Kankaanranta H, De Souza PM, Barnes PJ, Salmon M, Giembycz MA and Lindsay MA** (1999). SB 203580, an inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, enhances constitutive apoptosis of cytokine-deprived human eosinophils. *J Pharmacol Exp Ther* 290(2): 621-8
- Kataoka K, Handa H and Nishizawa M** (2001). Induction of cellular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by antirheumatic gold(I) compounds. *J Biol Chem* 276(36): 34074-81
- Kato I, Nomura AM, Stemmermann GN and Chyou PH** (1992). A prospective study of gastric and duodenal ulcer and its relation to smoking, alcohol, and diet. *Am J Epidemiol* 135(5): 521-30

- Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A and Yamamoto M** (2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* 6(10): 857-68
- Katsuki H, Hamada A, Nakamura C, Arimori K and Nakano M** (2001). Role of CYP3A4 and CYP2C19 in the stereoselective metabolism of lansoprazole by human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* 57(10): 709-15
- Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR and Patrono C** (2006). Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *Bmj* 332(7553): 1302-8
- Keyse SM and Tyrrell RM** (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(1): 99-103
- Kiemer AK, Bildner N, Weber NC and Vollmar AM** (2003). Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells. *Endocrinology* 144(3): 802-12
- Kiemer AK, Weber NC, Furst R, Bildner N, Kulhanek-Heinze S and Vollmar AM** (2002). Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1: atrial natriuretic peptide reduces TNF-alpha-induced actin polymerization and endothelial permeability. *Circ Res* 90(8): 874-81
- Kietzmann T, Samoylenko A and 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(20): 17927-36
- Kim HP, Wang X, Nakao A, Kim SI, Murase N, Choi ME, Ryter SW and Choi AM** (2005). Caveolin-1 expression by means of p38beta mitogen-activated protein kinase mediates the antiproliferative effect of carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(32): 11319-24
- Kim KA, Kim MJ, Park JY, Shon JH, Yoon YR, Lee SS, Liu KH, Chun JH, Hyun MH and Shin JG** (2003). Stereoselective metabolism of lansoprazole by human liver cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 31(10): 1227-34
- Kinobe RT, Vlahakis JZ, Vreman HJ, Stevenson DK, Brien JF, Szarek WA and Nakatsu K** (2006). Selectivity of imidazole-dioxolane compounds for in vitro inhibition of microsomal haem oxygenase isoforms. *Br J Pharmacol* 147(3): 307-15
- Klok RM, Postma MJ, van Hout BA and Brouwers JR** (2003). Meta-analysis: comparing the efficacy of proton pump inhibitors in short-term use. *Aliment Pharmacol Ther* 17(10): 1237-45
- Klotz U** (2005). [Pharmacology of proton pump inhibitors]. *Pharm Unserer Zeit* 34(3): 200-4
- Knowles RG and Moncada S** (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 (Pt 2): 249-58
- Ko JW, Sukhova N, Thacker D, Chen P and Flockhart DA** (1997). Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos* 25(7): 853-62
- Ko WF, Helzlsouer KJ and Comstock GW** (1994). Serum albumin, bilirubin, and uric acid and the anatomic site-specific incidence of colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 86(24): 1874-5
- Kocanova S, Buytaert E, Matroule JY, Piette J, Golab J, de Witte P and Agostinis P** (2007). Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38MAPK

- and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy. *Apoptosis* 12(4): 731-41
- Koch TR, Petro A, Darrabie M and Opara EC** (2004). Effect of the H, K-ATPase inhibitor, esomeprazole magnesium, on gut total antioxidant capacity in mice. *J Nutr Biochem* 15(9): 522-6
- Koch TR, Yuan LX, Petro A and Opara EC** (2002). Effects of omeprazole and ascorbate on gastric emptying and antioxidant levels in a mouse model of glutathione depletion. *Dig Dis Sci* 47(11): 2486-92
- Koizumi T, Odani N, Okuyama T, Ichikawa A and 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(37): 21779-84
- Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Pajdo R, Konturek JE, Kwiecien S, Taut A and Hahn EG** (1999). Apoptosis in gastric mucosa with stress-induced gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol* 50(2): 211-25
- Kopprasch S, Pietzsch J and Graessler J** (2003). Validation of different chemiluminescent substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells. *Luminescence* 18(5): 268-73
- Kurata S, Matsumoto M, Tsuji Y and Nakajima H** (1996). Lipopolysaccharide activates transcription of the heme oxygenase gene in mouse M1 cells through oxidative activation of nuclear factor kappa B. *Eur J Biochem* 239(3): 566-71
- Kuroda M, Yoshida N, Ichikawa H, Takagi T, Okuda T, Naito Y, Okanoue T and Yoshikawa T** (2006). Lansoprazole, a proton pump inhibitor, reduces the severity of indomethacin-induced rat enteritis. *Int J Mol Med* 17(1): 89-93
- Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek PC, Pawlik MW, Pawlik WW, Kwiecien N and Konturek SJ** (2003). The role of reactive oxygen species and capsaicin-sensitive sensory nerves in the pathomechanisms of gastric ulcers induced by stress. *J Physiol Pharmacol* 54(3): 423-37
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5
- Lamberts R, Brunner G and Solcia E** (2001). Effects of very long (up to 10 years) proton pump blockade on human gastric mucosa. *Digestion* 64(4): 205-13
- Lanas A and Hunt R** (2006). Prevention of anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal damage: benefits and risks of therapeutic strategies. *Ann Med* 38(6): 415-28
- Landes BD, Petite JP and Flouvat B** (1995). Clinical pharmacokinetics of lansoprazole. *Clin Pharmacokinet* 28(6): 458-70
- Langlois WJ, Sasaoka T, Saltiel AR and Olefsky JM** (1995). Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation. *J Biol Chem* 270(43): 25320-3
- Langman MJ, Brooks P, Hawkey CJ, Silverstein F and Yeomans N** (1991). Non-steroid anti-inflammatory drug associated ulcer: epidemiology, causation and treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 6(5): 442-9
- Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Festi D and Cuccurullo F** (1996). Antioxidant properties of omeprazole. *FEBS Lett* 382(1-2): 189-92
- Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A and 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(13): 5987-91

- Lawlor MA and Alessi DR** (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114(Pt 16): 2903-10
- Lee JM, Hanson JM, Chu WA and Johnson JA** (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 276(23): 20011-6
- Leibovitz BE and Siegel BV** (1980). Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *J Gerontol* 35(1): 45-56
- Lessner SM, Prado HL, Waller EK and Galis ZS** (2002). Atherosclerotic lesions grow through recruitment and proliferation of circulating monocytes in a murine model. *Am J Pathol* 160(6): 2145-55
- Levi S, Santambrogio P, Cozzi A, Rovida E, Corsi B, Tamborini E, Spada S, Albertini A and Arosio P** (1994). The role of the L-chain in ferritin iron incorporation. Studies of homo and heteropolymers. *J Mol Biol* 238(5): 649-54
- Li JM and Shah AM** (2001). Differential NADPH- versus NADH-dependent superoxide production by phagocyte-type endothelial cell NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 52(3): 477-86
- Li XQ, Andersson TB, Ahlstrom M and Weidolf L** (2004). Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* 32(8): 821-7
- Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, Roubaud V, Zweier JL and 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(4): 2015-23
- Lin CC, Chiang LL, Lin CH, Shih CH, Liao YT, Hsu MJ and Chen BC** (2007). Transforming growth factor-beta1 stimulates heme oxygenase-1 expression via the PI3K/Akt and NF-kappaB pathways in human lung epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 560(2-3): 101-9
- Lin F and Girotti AW** (1996). Hyperresistance of leukemia cells to photodynamic inactivation after long-term exposure to hemin. *Cancer Res* 56(20): 4636-43
- Lin F and Girotti AW** (1997). Elevated ferritin production, iron containment, and oxidant resistance in hemin-treated leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* 346(1): 131-41
- Lin F and Girotti AW** (1998). Hemin-enhanced resistance of human leukemia cells to oxidative killing: antisense determination of ferritin involvement. *Arch Biochem Biophys* 352(1): 51-8
- Lind T, Moore M and Olbe L** (1986). Intravenous omeprazole: effect on 24-hour intragastric pH in duodenal ulcer patients. *Digestion* 34(2): 78-86
- Lippe IT and 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(3): 708-14
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ and Stamler JS** (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364(6438): 626-32
- Liu ZM, Chen GG, Ng EK, Leung WK, Sung JJ and Chung SC** (2004). Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* 23(2): 503-13
- Lo SS, Lin SC, Wu CW, Chen JH, Yeh WI, Chung MY and Lui WY** (2007). Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with risk of gastric

- adenocarcinoma and lymphovascular tumor invasion. *Ann Surg Oncol* 14(8): 2250-6
- Lodola A, Hendry GA and Jones OT** (1979). Haem oxygenase: a reappraisal of the stoichiometry. *FEBS Lett* 104(1): 45-50
- Maeshima H, Sato M, Ishikawa K, Katagata Y and Yoshida T** (1996). Participation of altered upstream stimulatory factor in the induction of rat heme oxygenase-1 by cadmium. *Nucleic Acids Res* 24(15): 2959-65
- Maines MD and Gibbs PE** (2005). 30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 568-77
- Malik G, Gorbounov N, Das S, Gurusamy N, Otani H, Maulik N, Goswami S and Das DK** (2006). Ischemic preconditioning triggers nuclear translocation of thioredoxin and its interaction with Ref-1 potentiating a survival signal through the PI-3-kinase-Akt pathway. *Antioxid Redox Signal* 8(11-12): 2101-9
- Marini MG, Chan K, Casula L, Kan YW, Cao A and Moi P** (1997). hMAF, a small human transcription factor that heterodimerizes specifically with Nrf1 and Nrf2. *J Biol Chem* 272(26): 16490-7
- Marks GS, McLaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, Nakatsu K, Brien JF and Pang SC** (1997). Heme oxygenase activity and immunohistochemical localization in bovine pulmonary artery and vein. *J Cardiovasc Pharmacol* 30(1): 1-6
- Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM and Cuadrado A** (2004). Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* 279(10): 8919-29
- Martin MJ, Jimenez MD and Motilva V** (2001). New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 7(10): 881-908
- McGettigan P and Henry D** (2006). Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *Jama* 296(13): 1633-44
- Mitani K, Fujita H, Sassa S and Kappas A** (1989). Heat shock induction of heme oxygenase mRNA in human Hep 3B hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 165(1): 437-41
- Miura M** (2006). Enantioselective disposition of lansoprazole and rabeprazole in human plasma. *Yakugaku Zasshi* 126(6): 395-402
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A and Kan YW** (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21): 9926-30
- Moncada S and Higgs A** (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329(27): 2002-12
- Morita T** (2005). Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(9): 1786-95
- Morita T, Perrella MA, Lee ME and Kourembanas S** (1995). Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1475-9
- Morrison TB, Weis JJ and Wittwer CT** (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24(6): 954-8, 960, 962

- Mostert V, Hill KE, Ferris CD and Burk RF** (2003). Selective induction of liver parenchymal cell heme oxygenase-1 in selenium-deficient rats. *Biol Chem* 384(4): 681-7
- Motsko SP, Rascati KL, Busti AJ, Wilson JP, Barner JC, Lawson KA and Worchel J** (2006). Temporal relationship between use of NSAIDs, including selective COX-2 inhibitors, and cardiovascular risk. *Drug Saf* 29(7): 621-32
- Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M and Winslow RM** (1996). NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 270(1 Pt 2): H107-14
- Mukherjee D, Nissen SE and Topol EJ** (2001). Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *Jama* 286(8): 954-9
- Murakami I, Satoh H, Asano S and Maeda R** (1996). Role of capsaicin-sensitive sensory neurons and nitric oxide in the protective effect of lansoprazole, a proton pump inhibitor, on the gastric mucosa in rats. *Jpn J Pharmacol* 72(2): 137-47
- Murphy EJ, Roberts E, Anderson DK and Horrocks LA** (1993). Cytotoxicity of aluminum silicates in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 57(2): 483-90
- Mustacich D and Powis G** (2000). Thioredoxin reductase. *Biochem J* 346 Pt 1: 1-8
- Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe K and Nakashima K** (2003). PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 546(2-3): 181-4
- Naseri E and Yenisehirli A** (2006). Proton pump inhibitors omeprazole and lansoprazole induce relaxation of isolated human arteries. *Eur J Pharmacol* 531(1-3): 226-31
- Natale G, Lazzeri G, Lubrano V, Colucci R, Vassalle C, Fornai M, Blandizzi C and Del Tacca M** (2004). Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 195(1): 62-72
- Nkabyo YS, Ziegler TR, Gu LH, Watson WH and Jones DP** (2002). Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(6): G1352-9
- Oberle S, Abate A, Grosser N, Vreman HJ, Dennery PA, Schneider HT, Stalleicken D and Schröder H** (2002). Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythrityl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun* 290(5): 1539-44
- Oberle S, Polte T, Abate A, Podhaisky HP and Schröder H** (1998). Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway. *Circ Res* 82(9): 1016-20
- Oberle S, Schwartz P, Abate A and Schröder H** (1999). The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythrityl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261(1): 28-34
- Oh TY, Lee JS, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, Surh YJ, Cho SW and Hahm KB** (2001a). Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. *Free Radic Biol Med* 30(8): 905-15
- Oh TY, Lee JS, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, Surh YJ, Cho SW, Lee KM and Hahm KB** (2001b). Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux oesophagitis in rats. *Gut* 49(3): 364-71

- Ono K, Goto Y, Takagi S, Baba S, Tago N, Nonogi H and Iwai N** (2004). A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis* 173(2): 315-9
- Ono K, Mannami T and Iwai N** (2003). Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women. *J Hypertens* 21(8): 1497-503
- Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV and Torti FM** (2001). Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 357(Pt 1): 241-7
- Orozco LD, Kapturczak MH, Barajas B, Wang X, Weinstein MM, Wong J, Deshane J, Bolisetty S, Shaposhnik Z, Shih DM, Agarwal A, Lusic AJ and Araujo JA** (2007). Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circ Res* 100(12): 1703-11
- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA and Choi AM** (2000a). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6(4): 422-8
- Otterbein LE and Choi AM** (2000b). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(6): L1029-37
- Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K and Bach FH** (2003a). Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24(8): 449-55
- 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 and Soares MP** (2003b). Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med* 9(2): 183-90
- Paimela H, Goddard PJ and Silen W** (1995). Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Dig Dis Sci* 40(11): 2495-6
- Parks DR, Bryan VM, Oi VT and Herzenberg LA** (1979). Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4): 1962-6
- Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW and Choi AM** (2000). Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(2): L312-9
- Pipkin GA, Williamson R and Wood JR** (1998). Review article: one-week clarithromycin triple therapy regimens for eradication of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 12(9): 823-37
- Pohle T, Brzozowski T, Becker JC, Van der Voort IR, Markmann A, Konturek SJ, Moniczewski A, Domschke W and Konturek JW** (2001). Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. *Aliment Pharmacol Ther* 15(5): 677-87
- Polte T, Abate A, Dennery PA and Schröder H** (2000a). Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1209-15
- Polte T, Abate A, Dennery PA and Schröder H** (2000b). Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1209-15
- Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G and et al.** (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 54(9): 2419-23
- Pozzoli C, Menozzi A, Grandi D, Solenghi E, Ossiprandi MC, Zullian C, Bertini S, Cavestro GM and Coruzzi G** (2007). Protective effects of proton pump

- inhibitors against indomethacin-induced lesions in the rat small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374(4): 283-91
- Rainsford KD** (1999). Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med* 107(6A): 27S-35S; discussion 35S-36S
- Rave N, Crkvenjakov R and Boedtke H** (1979). Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzoyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acids Res* 6(11): 3559-67
- Rosenstock S, Jorgensen T, Bonnevie O and Andersen L** (2003). Risk factors for peptic ulcer disease: a population based prospective cohort study comprising 2416 Danish adults. *Gut* 52(2): 186-93
- Ryter SW, Alam J and Choi AM** (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86(2): 583-650
- Ryter SW, Morse D and Choi AM** (2007). Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(2): 175-82
- Sachs G, Shin JM, Briving C, Wallmark B and Hersey S** (1995). The pharmacology of the gastric acid pump: the H⁺,K⁺ ATPase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 277-305
- Sachs G, Shin JM, Vagin O, Lambrecht N, Yakubov I and Munson K** (2007). The gastric H,K ATPase as a drug target: past, present, and future. *J Clin Gastroenterol* 41(6 Suppl 2): S226-42
- Salas M, Ward A and Caro J** (2002). Are proton pump inhibitors the first choice for acute treatment of gastric ulcers? A meta analysis of randomized clinical trials. *BMC Gastroenterol* 2: 17
- Salinas M, Diaz R, Abraham NG, Ruiz de Galarreta CM and Cuadrado A** (2003). Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 278(16): 13898-904
- Salinas M, Wang J, Rosa de Sagarra M, Martin D, Rojo AI, Martin-Perez J, Ortiz de Montellano PR and Cuadrado A** (2004). Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 578(1-2): 90-4
- Sanders MJ, Ayalon A, Roll M and Soll AH** (1985). The apical surface of canine chief cell monolayers resists H⁺ back-diffusion. *Nature* 313(5997): 52-4
- Schaffer MR, Efron PA, Thornton FJ, Klingel K, Gross SS and Barbul A** (1997). Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol* 158(5): 2375-81
- Schillinger M, Exner M, Minar E, Mlekusch W, Mullner M, Mannhalter C, Bach FH and Wagner O** (2004). Heme oxygenase-1 genotype and restenosis after balloon angioplasty: a novel vascular protective factor. *J Am Coll Cardiol* 43(6): 950-7
- Schoen RT and Vender RJ** (1989). Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am J Med* 86(4): 449-58
- Schröder H** (2006). No nitric oxide for HO-1 from sodium nitroprusside. *Mol Pharmacol* 69(5): 1507-9
- Schubert-Zsilavec M and Stark H** (2005). [Proton pump inhibitors]. *Pharm Unserer Zeit* 34(3): 194-9
- Schwertner HA, Jackson WG and Tolan G** (1994). Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 40(1): 18-23

- Sedlak TW and Snyder SH** (2004). Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics* 113(6): 1776-82
- Sekiguchi M, Sakakibara K and Fujii G** (1978). Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jpn J Exp Med* 48(1): 61-8
- Shibahara S** (1988). Regulation of heme oxygenase gene expression. *Semin Hematol* 25(4): 370-6
- Shibahara S, Sato M, Muller RM and Yoshida T** (1989). Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter. *Eur J Biochem* 179(3): 557-63
- Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N and Agarwal A** (2004). The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(3): F425-41
- 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, Lefkowitz JB, Verburg KM and 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(10): 1247-55
- Silverstein FE, Graham DY, Senior JR, Davies HW, Struthers BJ, Bittman RM and 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(4): 241-9
- Simon B and Muller P** (1994). Nizatidine in therapy and prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal ulcer in rheumatic patients. *Scand J Gastroenterol Suppl* 206: 25-8
- Simon WA, Sturm E, Hartmann HJ and Weser U** (2006). Hydroxyl radical scavenging reactivity of proton pump inhibitors. *Biochem Pharmacol* 71(9): 1337-41
- Singh G, Ramey DR, Morfeld D, Shi H, Hatoum HT and Fries JF** (1996). Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis. A prospective observational cohort study. *Arch Intern Med* 156(14): 1530-6
- Singh G and Triadafilopoulos G** (2005). Appropriate choice of proton pump inhibitor therapy in the prevention and management of NSAID-related gastrointestinal damage. *Int J Clin Pract* 59(10): 1210-7
- Snyder SH, Jaffrey SR and Zakhary R** (1998). Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3): 167-75
- Soll AH, Weinstein WM, Kurata J and McCarthy D** (1991). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcer disease. *Ann Intern Med* 114(4): 307-19
- Somasundaram S, Sigthorsson G, Simpson RJ, Watts J, Jacob M, Tavares IA, Rafi S, Roseth A, Foster R, Price AB, Wrigglesworth JM and Bjarnason I** (2000). Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 14(5): 639-50
- Spinzi GC, Bierti L, Bortoli A, Colombo E, Fertitta AM, Lanzi GL, Venturelli R and Minoli G** (1998). Comparison of omeprazole and lansoprazole in short-term triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 12(5): 433-8
- Splettstoesser WD and Schuff-Werner P** (2002). Oxidative stress in phagocytes--"the enemy within". *Microsc Res Tech* 57(6): 441-55

- Stadtman ER and Berlett BS** (1997). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10(5): 485-94
- Stalnikowicz R and Rachmilewitz D** (1993). NSAID-induced gastroduodenal damage: is prevention needed? A review and metaanalysis. *J Clin Gastroenterol* 17(3): 238-43
- Stedman CA and Barclay ML** (2000). Review article: comparison of the pharmacokinetics, acid suppression and efficacy of proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther* 14(8): 963-78
- Stocker R, Glazer AN and Ames BN** (1987a). Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16): 5918-22
- Stocker R, McDonagh AF, Glazer AN and Ames BN** (1990). Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. *Methods Enzymol* 186: 301-9
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN and Ames BN** (1987b). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235(4792): 1043-6
- Stupnicki T, Dietrich K, Gonzalez-Carro P, Straszak A, Terjung A, Thomas KB, Luhmann R and Fischer R** (2003). Efficacy and tolerability of pantoprazole compared with misoprostol for the prevention of NSAID-related gastrointestinal lesions and symptoms in rheumatic patients. *Digestion* 68(4): 198-208
- Suda K, Rothen-Rutishauser B, Gunthert M and Wunderli-Allenspach H** (2001). Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37(8): 505-14
- Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M and Igarashi K** (2002). Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *Embo J* 21(19): 5216-24
- Suttner DM and Dennery PA** (1999a). Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *Faseb J* 13(13): 1800-9
- Suttner DM, Sridhar K, Lee CS, Tomura T, Hansen TN and Dennery PA** (1999b). Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells. *Am J Physiol* 276(3 Pt 1): L443-51
- Suzuki M, Mori M, Miura S, Suematsu M, Fukumura D, Kimura H and Ishii H** (1996). Omeprazole attenuates oxygen-derived free radical production from human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 21(5): 727-31
- Suzuki M, Nakamura M, Mori M, Miura S, Tsuchiya M and Ishii H** (1995). Lansoprazole inhibits oxygen-derived free radical production from neutrophils activated by *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol* 20 Suppl 2: S93-6
- Swift GL, Heneghan M, Williams GT, Williams BD, O'Sullivan MM and Rhodes J** (1989). Effect of ranitidine on gastroduodenal mucosal damage in patients on long-term non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Digestion* 44(2): 86-94
- Syha Y, Popescu L, Wurglics M and Schubert-Zsilavecz M** (2005). [The history of ulcer treatment]. *Pharm Unserer Zeit* 34(3): 188-92
- Szekeres J, Pacsa AS and Pejtsik B** (1981). Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells. *J Immunol Methods* 40(2): 151-4
- Taha AS, Hudson N, Hawkey CJ, Swannell AJ, Trye PN, Cottrell J, Mann SG, Simon TJ, Sturrock RD and Russell RI** (1996). Famotidine for the prevention of gastric and duodenal ulcers caused by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 334(22): 1435-9

- Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R and Freeman BA** (1999). Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res* 84(10): 1203-11
- Tenhunen R, Marver HS and Schmid R** (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61(2): 748-55
- Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR and 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(3 Pt 2): H883-91
- Thanos D and Maniatis T** (1995). Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta interferon gene. *Mol Cell Biol* 15(1): 152-64
- Theil EC** (1987). Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem* 56: 289-315
- Theil EC** (1990). The ferritin family of iron storage proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 63: 421-49
- Theil EC** (2003). Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. *J Nutr* 133(5 Suppl 1): 1549S-53S
- Timmer W, Ripke H, Kleist P, Ehrlich A, Wieckhorst G, Lucker PW and Fuder H** (1995). Effect of four lansoprazole dose levels and one dosage regimen of omeprazole on 24-hour intragastric pH in healthy subjects. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 17(7): 489-95
- Tiwari RL, Singh V and Barthwal MK** (2007). Macrophages: An elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. *Med Res Rev*
- Tolman KG, Sanders SW, Buchi KN, Karol MD, Jennings DE and Ringham GL** (1997). The effects of oral doses of lansoprazole and omeprazole on gastric pH. *J Clin Gastroenterol* 24(2): 65-70
- Towbin H, Staehelin T and 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(9): 4350-4
- Trigona WL, Mullarky IK, Cao Y and Sordillo LM** (2006). Thioredoxin reductase regulates the induction of haem oxygenase-1 expression in aortic endothelial cells. *Biochem J* 394(Pt 1): 207-16
- Tsuji S, Sun WH, Tsujii M, Kawai N, Kimura A, Kakiuchi Y, Yasumaru S, Komori M, Murata H, Sasaki Y, Kawano S and Hori M** (2002). Lansoprazole induces mucosal protection through gastrin receptor-dependent up-regulation of cyclooxygenase-2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 303(3): 1301-8
- Tsuji Y, Ayaki H, Whitman SP, Morrow CS, Torti SV and Torti FM** (2000). Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 20(16): 5818-27
- Uberall F, Hellbert K, Kampfer S, Maly K, Villunger A, Spitaler M, Mwanjewe J, Baier-Bitterlich G, Baier G and Grunicke HH** (1999). Evidence that atypical protein kinase C-lambda and atypical protein kinase C-zeta participate in Ras-mediated reorganization of the F-actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 144(3): 413-25
- Unno M, Matsui T and Ikeda-Saito M** (2007). Structure and catalytic mechanism of heme oxygenase. *Nat Prod Rep* 24(3): 553-70
- Vaananen PM, Meddings JB and Wallace JL** (1991). Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. *Am J Physiol* 261(3 Pt 1): G470-5
- van Driel IR and Callaghan JM** (1995). Proton and potassium transport by H⁺/K⁺-ATPases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22(12): 952-60

- Vasquez-Vivar J, Hogg N, Pritchard KA, Jr., Martasek P and Kalyanaraman B** (1997). Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett* 403(2): 127-30
- Verdu E, Viani F, Armstrong D, Fraser R, Siegrist HH, Pignatelli B, Idstrom JP, Cederberg C, Blum AL and Fried M** (1994). Effect of omeprazole on intragastric bacterial counts, nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds. *Gut* 35(4): 455-60
- Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C and Tyrrell RM** (1994). Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7): 2607-10
- Vile GF and Tyrrell RM** (1993). Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 268(20): 14678-81
- Vincent SR, Das S and Maines MD** (1994). Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons. *Neuroscience* 63(1): 223-31
- Vitek L** (2005). Impact of serum bilirubin on human diseases. *Pediatrics* 115(5): 1411-2
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY and Brown RF** (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269(7): 5241-8
- Vreman HJ and Stevenson DK** (1988). Heme oxygenase activity as measured by carbon monoxide production. *Anal Biochem* 168(1): 31-8
- Vreman HJ and Stevenson DK** (1999). Detection of Heme Oxygenase Activity by Measurement of CO. Unit 9.2. In: *Current Protocols in Toxicology*, e.d. Maines, M.D., Costa, G., Reed, D.J., Sassa, S., Sipes, I.G. . pp. 9.2.1 - 9.2.10. John Wiley & Sons, New York
- Vreman HJ, Wong RJ, Kim EC, Nabseth DC, Marks GS and Stevenson DK** (2000). Haem oxygenase activity in human umbilical cord and rat vascular tissues. *Placenta* 21(4): 337-44
- Wakata N, Sugimoto H, Iguchi H, Nomoto N and Kinoshita M** (2001). Bupivacaine hydrochloride induces muscle fiber necrosis and hydroxyl radical formation-dimethyl sulphoxide reduces hydroxyl radical formation. *Neurochem Res* 26(7): 841-4
- 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(1A): 19S-23S
- Wallace JL and Granger DN** (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *Faseb J* 10(7): 731-40
- Wallace JL and Ma L** (2001). Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 226(11): 1003-15
- Wandall JH** (1992). Effects of omeprazole on neutrophil chemotaxis, super oxide production, degranulation, and translocation of cytochrome b-245. *Gut* 33(5): 617-21
- Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC and Chau LY** (1998). Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 152(3): 711-20
- Wang Y, Zeigler MM, Lam GK, Hunter MG, Eubank TD, Khrantsov VV, Tridandapani S, Sen CK and Marsh CB** (2007). The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(1): 68-77

- Watanabe S, Takagi A, Koga Y, Kamiya S and Miwa T** (2000). Helicobacter pylori induces apoptosis in gastric epithelial cells through inducible nitric oxide. *J Gastroenterol Hepatol* 15(2): 168-74
- Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP and Kehrer JP** (2004). Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci* 78(1): 3-14
- Weil J, Colin-Jones D, Langman M, Lawson D, Logan R, Murphy M, Rawlins M, Vessey M and Wainwright P** (1995). Prophylactic aspirin and risk of peptic ulcer bleeding. *Bmj* 310(6983): 827-30
- Weng YH, Yang G, Weiss S and Dennery PA** (2003). Interaction between heme oxygenase-1 and -2 proteins. *J Biol Chem* 278(51): 50999-1005
- Wetscher GJ, Hinder PR, Bagchi D, Perdikis G, Redmond EJ, Glaser K, Adrian TE and Hinder RA** (1995a). Free radical scavengers prevent reflux esophagitis in rats. *Dig Dis Sci* 40(6): 1292-6
- Wetscher GJ, Hinder RA, Bagchi D, Hinder PR, Bagchi M, Perdikis G and McGinn T** (1995b). Reflux esophagitis in humans is mediated by oxygen-derived free radicals. *Am J Surg* 170(6): 552-6; discussion 556-7
- Wetscher GJ, Perdikis G, Kretchmar DH, Stinson RG, Bagchi D, Redmond EJ, Adrian TE and Hinder RA** (1995c). Esophagitis in Sprague-Dawley rats is mediated by free radicals. *Dig Dis Sci* 40(6): 1297-305
- White K and Munro HN** (1988). Induction of ferritin subunit synthesis by iron is regulated at both the transcriptional and translational levels. *J Biol Chem* 263(18): 8938-42
- Whittle BJ** (2003). Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundam Clin Pharmacol* 17(3): 301-13
- Wiesel P, Foster LC, Pellacani A, Layne MD, Hsieh CM, Huggins GS, Strauss P, Yet SF and Perrella MA** (2000). Thioredoxin facilitates the induction of heme oxygenase-1 in response to inflammatory mediators. *J Biol Chem* 275(32): 24840-6
- Wilkinson Jt, Di X, Schonig K, Buss JL, Kock ND, Cline JM, Saunders TL, Bujard H, Torti SV and Torti FM** (2006). Tissue-specific expression of ferritin H regulates cellular iron homeostasis in vivo. *Biochem J* 395(3): 501-7
- Williams MP, Sercombe J, Hamilton MI and Pounder RE** (1998). A placebo-controlled trial to assess the effects of 8 days of dosing with rabeprazole versus omeprazole on 24-h intragastric acidity and plasma gastrin concentrations in young healthy male subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 12(11): 1079-89
- Willis D, Moore AR, Frederick R and Willoughby DA** (1996). Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2(1): 87-90
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA and Rasmussen RP** (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1): 130-1, 134-8
- Wolfe MM, Lichtenstein DR and Singh G** (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 340(24): 1888-99
- Wu TW, Fung KP and Yang CC** (1994). Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than Trolox. *Life Sci* 54(25): P477-81
- Wu TW, Wu J, Li RK, Mickle D and Carey D** (1991). Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem Cell Biol* 69(10-11): 683-8

- Xanthoudakis S, Miao G, Wang F, Pan YC and Curran T** (1992). Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *Embo J* 11(9): 3323-35
- Yachie A, Toma T, Mizuno K, Okamoto H, Shimura S, Ohta K, Kasahara Y and Koizumi S** (2003). Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(5): 550-6
- Yacyshyn BR and Thomson AB** (2002). The clinical importance of proton pump inhibitor pharmacokinetics. *Digestion* 66(2): 67-78
- Yamada T and Grisham MB** (1991). Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochenschr* 69(21-23): 988-94
- Yeo M, Kim DK, Han SU, Lee JE, Kim YB, Cho YK, Kim JH, Cho SW and Hahm KB** (2006). Novel action of gastric proton pump inhibitor on suppression of *Helicobacter pylori* induced angiogenesis. *Gut* 55(1): 26-33
- Yeomans ND and Dent J** (2000). Personal review: alarmism or legitimate concerns about long-term suppression of gastric acid secretion? *Aliment Pharmacol Ther* 14(3): 267-71
- Yeomans ND, Tulassay Z, Juhasz L, Racz I, Howard JM, van Rensburg CJ, Swannell AJ and Hawkey CJ** (1998). A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Acid Suppression Trial: Ranitidine versus Omeprazole for NSAID-associated Ulcer Treatment (ASTRONAUT) Study Group. *N Engl J Med* 338(11): 719-26
- Yet SF, Layne MD, Liu X, Chen YH, Ith B, Sibinga NE and Perrella MA** (2003). Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling. *Faseb J* 17(12): 1759-61
- Yoshida T, Ishikawa K and Sato M** (1991). Degradation of heme by a soluble peptide of heme oxygenase obtained from rat liver microsomes by mild trypsinization. *Eur J Biochem* 199(3): 729-33
- Yu ZW and Quinn PJ** (1994). Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci Rep* 14(6): 259-81
- Zhang X, Bedard EL, Potter R, Zhong R, Alam J, Choi AM and 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(4): L815-29
- Zhou Z, Song R, Fattman CL, Greenhill S, Alber S, Oury TD, Choi AM and Morse D** (2005). Carbon monoxide suppresses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* 166(1): 27-37

8 Veröffentlichungen

8.1 Originalarbeiten

Becker JC, Grosser N, Waltke C, Schulz S, Erdmann K, Domschke W, Schröder H and Pohle T (2006). Beyond gastric acid reduction: proton pump inhibitors induce heme oxygenase-1 in gastric and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345(3): 1014-21

8.2 In Kurzform publizierte Vorträge und Poster (*Abstracts*)

Schulz S, Oberle-Plümpe S, Grosser N, Abate A, Vreman HJ, Dennery PA, Stevenson DK and Schröder H (2005). Pentaerythritol tetranitrate reduces free radical formation in endothelial cells and macrophages - involvement of heme oxygenase-1. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 371 (Suppl 1): R40

Schulz S, Oberle-Plümpe S, Grosser N, Abate A, Vreman HJ, Wong RJ, Dennery PA, Stevenson DK and Schröder H (2005). Pentaerythritol tetranitrate increases heme oxygenase-1 in endothelial cells and macrophages. *4th International Congress Heme Oxygenase 2005*, Boston, MA, USA

Grosser N, Becker JC, Schulz S, Erdmann K, Schürger S, Waltke C, Domschke W, Pohle T and Schröder H (2005). Beyond gastric acid reduction: proton pump inhibitors induce heme oxygenase-1 in endothelial cells. *4th International Congress Heme Oxygenase 2005*, Boston, MA, USA

Grosser N, Schulz S, Becker JC, Erdmann K, Waltke C, Domschke W, Pohle T and Schröder H (2006). Novel pleiotropic actions of proton pump inhibitors: induction of heme oxygenase-1 and ferritin in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: E87

Schulz S, Grosser N, Becker JC, Erdmann K, Waltke C, Domschke W, Pohle T and Schröder H (2006). Antioxidant actions of proton pump inhibitors in gastric and endothelial cells: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 372 (Suppl 1): 24

Schulz S, Grosser N, Erdmann K, Hinkelmann U, Wong RJ, Stevenson DK and Schröder H (2008). Upregulation of the HO-1 Gene by proton pump inhibitors – molecular mechanisms and functional consequences. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 377 (Suppl 1): 60

Hinkelmann U, Schulz S, Grosser N, Wong RJ, Morisawa T, Stevenson DK, Muchova L and Schröder H (2008). Heme oxygenase-1 and simvastatin: molecular mechanisms and in vivo effects. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 377 (Suppl 1): 58

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Henning Schröder, für die produktive Zusammenarbeit sowie für die wertvollen und motivierenden Diskussionen. Durch seine Initiative war es mir möglich, einen Teil meiner Experimente an der Stanford University, School of Medicine durchzuführen sowie Ergebnisse dieser Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren.

Frau Dr. Nina Großer danke ich sehr für die Unterstützung des gesamten Projektes. Ihr Engagement und ihre Ratschläge waren mir sowohl im Labor als auch bei der Präsentation der Daten auf nationalen und internationalen Kongressen immer eine wertvolle Hilfe. Die vielen anregenden Diskussionen sowie ihre kritische und konstruktive Durchsicht der Manuskripte haben entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke meinen Freunden und Kollegen für all die wunderbaren Stunden im Labor. Die wertvollen Diskussionen, das konstruktive „troubleshooting“ und das gemeinsame Lachen habe die Promotionszeit zu etwas Besonderem gemacht. Unserem einzigen Mann im Team, Stephan Schürger, danke ich für die gemeinsame und schöne Zeit während des Studiums und der Promotion. Seine ausgeglichene und geduldige Art halfen mir, die kleinen Rückschläge des Forschens schnell zu vergessen. Dr. Kati Erdmann danke ich sehr für die Einarbeitung in die Northern-Blot-Methode sowie die kritische und hilfreiche Durchsicht der Manuskripte dieser Arbeit und für alles andere. Urte Hinkelmann danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente während des Forschungsaufenthaltes in den USA und die kritische Durchsicht von Teilen dieser Arbeit. Die gegenseitige Unterstützung in einem fremden Labor, die zahlreichen Gespräche am Rande und die gemeinsamen Erfahrungen des Auslandsaufenthaltes bleiben unvergessen.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie. Die Arbeit von Frau Petra Schwartz, Frau Kathrin Schipporeit und Frau Astrid Nemitz ermöglichten ein sorgenfreies Arbeiten im Labor. Insbesondere möchte ich Frau Petra Schwartz für ihre ausgezeichnete technische Assistenz herzlich danken. Ihre Hilfsbereitschaft bei den Zellkulturarbeiten und der Versuchsdurchführung haben mir den Laboralltag vielfach vereinfacht.

Ich danke Herrn Prof. Dr. David K. Stevenson für die Möglichkeit, Untersuchungen in seinem Labor an der Stanford University, School of Medicine durchzuführen. Seinen Mitarbeitern gilt mein Dank für die Geduld bei der Einweisung in die experimentellen Techniken, die wertvollen Diskussionen und den vielen Spaß. Insbesondere danke ich Herrn Ronald J. Wong für die intensive Unterstützung des Forschungsprojektes. Sein Bemühen und seine Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht waren nicht nur für das Arbeiten im dortigen Labor von besonderem Wert. Frau Dr. Lucie Muchova danke ich

sehr für die Einarbeitung in die HO-Aktivitätsmessung sowie Frau Dr. Hui Zhao und Frau Dr. Stacy Burns-Guydich für die Einarbeitung in die *Realtime* RT-PCR.

Herrn Dr. Hendrik J. Vreman danke ich im Besonderen für die kritische Durchsicht der Manuskripte dieser Arbeit. Seine konstruktiven Ratschläge waren mir eine große Hilfe und seine eigene Begeisterung für das Forschen und die Wissenschaft sind bewundernswert und motivierten mich sehr.

Bei Frau PD Dr. Krause bedanke ich mich, dass sie während der gesamten Promotionszeit immer als Ansprechpartner für mich da war. Darüber hinaus hat ihre finanzielle Unterstützung zum Abschluss der Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt weiterhin dem DAAD für die Förderung des Forschungsaufenthaltes in den USA.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Margret Köck und Frau Karin Klar für die Hilfe im Isotopenlabor.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht und ihren Rückhalt während all der Zeit.

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 13.05.2008

Stephanie Schulz

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stephanie Schulz
Geburtsdatum/ -ort: 13. Juni 1980, Jena
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1987 – 1991 Maxim-Gorki-Grundschule Salzwedel
1991 – 1999 Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium Salzwedel
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

Okt. 1999 – Sept. 2003 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Aug. 2001 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Sept. 2003 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Nov. 2004 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dez. 2004 Approbation zur Apothekerin

Praktisches Jahr:

Nov. 2003 – April 2004 Lilien Apotheke, Halle (Saale)
Mai 2004 – Nov. 2004 Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit Nov. 2004 Doktorandin am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Mai 2006 – Juni 2006 Stipendium des DAAD für einen Forschungsaufenthalt an der Stanford University, School of Medicine, Stanford, CA, USA
Nov. 2006 – Jan. 2007 Forschungsaufenthalt an der Stanford University, School of Medicine, Stanford, CA, USA

Halle (Saale), den 13.05.2008