

**Antioxidative Wirkungen von
schwefelhaltigen Aminosäuren und bioaktiven Peptiden:
Hämoxygenase-1 und Ferritin als Mediatoren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Pharm. Kati Erdmann
geb. 7. Januar 1979 in Lutherstadt-Wittenberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Henning Schröder, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. Wolfgang Sippl, Halle (Saale)
3. Prof. Dr. Sönke Behrends, Braunschweig

Halle (Saale), 16. Oktober 2006 (Tag der Verteidigung)

urn:nbn:de:gbv:3-000010824

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010824>]

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	6
1.1 Atherosklerose	6
1.1.1 Atherogenese	6
1.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress	7
1.1.3 Endogene und exogene antioxidative Schutzmechanismen	8
1.1.4 Sekundärprävention durch mediterrane Diät	9
1.2 Schwefelhaltige Aminosäuren und deren Derivate	10
1.2.1 L-Methionin	10
1.2.2 S-Adenosylmethionin	12
1.2.3 L-Cystein	13
1.3 Bioaktive Peptide	14
1.3.1 Vorkommen	14
1.3.2 Wirkungen in biologischen Systemen	14
1.3.3 Ausblick	16
1.4 Das Hämoxxygenase-1/Ferritin-System	17
1.4.1 Die induzierbare Hämoxxygenase (HO-1)	17
1.4.1.1 Die HO-1 als protektives Protein	19
1.4.1.2 Regulierung der HO-1	20
1.4.2 Ferritin als antioxidatives Protein	20
2 PROBLEMSTELLUNG	22
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Zellkultur	24
3.2 Western-Blot-Analyse	24
3.2.1 Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse	24
3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford	24
3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
3.2.4 Proteintransfer durch Western-Blot	25
3.2.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern	25
3.3 Northern-Blot-Analyse	26
3.3.1 Plasmidgewinnung und -isolierung	26
3.3.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	26
3.3.3 DNA-Gelelektrophorese und Fragmentisolierung	26
3.3.4 Inkubationsprotokoll zur Northern-Blot-Analyse	27
3.3.5 RNA-Isolierung	27
3.3.6 RNA-Gelelektrophorese	27
3.3.7 RNA-Fixierung auf Nylon-Membranen durch Vakuum-Blotting	27
3.3.8 Markierung von DNA-Sonden mit ³² P-Desoxycytidin-Triphosphat	28
3.3.9 Vor- und Haupthybridisierung	28

3.3.10	Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle	28
3.4	Genreporter-Assay	29
3.4.1	Plasmidgewinnung und -isolierung	29
3.4.2	Transfektion	30
3.4.3	Inkubationsprotokoll zum Luciferase-Assay	30
3.4.4	Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay	30
3.5	Bestimmung der Hämoxxygenase-Aktivität	31
3.5.1	Inkubationsprotokoll zur Aktivitätsmessung	31
3.5.2	Probenaufarbeitung	31
3.5.3	HO-Aktivitätsbestimmung	31
3.6	Bestimmung freier Sauerstoffradikale	32
3.6.1	Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung	32
3.6.2	Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz	32
3.7	Material	33
3.8	Puffer, Lösungen und Medien	35
3.8.1	Puffer	35
3.8.2	Lösungen	35
3.8.2.1	Substanzlösungen	36
3.8.3	Medien	36
3.9	Statistik	36
4	ERGEBNISSE	37
4.1	Induktion der HO-1 auf Proteinebene	37
4.1.1	Konzentrationsabhängige Effekte auf die HO-1-Proteinexpression	37
4.1.2	Zeitabhängige Effekte auf die HO-1-Proteinexpression	41
4.1.3	Effekte der freien Aminosäuren L-Methionin und L-Tyrosin im mikromolaren Konzentrationsbereich	42
4.1.4	Effekte von Captopril, Methionyl-Phenylalanin und Methionyl-Methionin im mikromolaren Konzentrationsbereich	43
4.1.5	Zusammenfassung	43
4.2	Induktion des Ferritinproteins	44
4.2.1	Konzentrationsabhängige Induktion des Ferritinproteins	44
4.2.2	Zeitabhängige Induktion des Ferritinproteins	47
4.2.3	Zusammenfassung	48
4.3	Induktion der HO-1 auf mRNA-Ebene	49
4.3.1	Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch L-Cystein und S-Adenosylmethionin	49
4.3.2	Zeitabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch L-Cystein und S-Adenosylmethionin	51
4.3.3	Zusammenfassung	53
4.4	Stabilisierung der HO-1-mRNA	54
4.4.1	Effekt von L-Methionin auf HO-1-mRNA-Stabilität	54
4.4.2	Effekt von Methionyl-Tyrosin auf HO-1-mRNA-Stabilität	55
4.4.3	Effekt von L-Cystein auf HO-1-mRNA-Stabilität	57

4.4.4	Zusammenfassung	57
4.5	HO-1-Genregulation	58
4.5.1	Einfluss von Sauerstoffradikalen	58
4.5.2	Einfluss von NO-abhängigen Stoffwechselwegen	59
4.5.3	Einfluss von cGMP-abhängigen Stoffwechselwegen	60
4.5.4	Einfluss des Transkriptionsblockers Actinomycin D	61
4.5.5	Einfluss des Translationsblockers Cycloheximid	62
4.5.6	Zusammenfassung	63
4.6	Genreporter-Assay	64
4.6.1	Effekte am humanen HO-1-Promotor	64
4.6.2	Effekte am Maus-HO-1-Promotor	65
4.6.3	Zusammenfassung	65
4.7	Bestimmung der HO-Aktivität	66
4.7.1	Effekt von L-Methionin auf die HO-Aktivität	66
4.7.2	Effekt von L-Cystein auf die HO-Aktivität	67
4.7.3	Zusammenfassung	67
4.8	Untersuchungen zur Cytoprotektion in einem Modell für oxidativen Stress	68
4.8.1	Antioxidative Effekte von Aminosäuren und deren Derivaten in Endothelzellen	68
4.8.2	Einfluss des HO-1-Metaboliten Bilirubin	71
4.8.3	Einfluss eines Hämoxygenase-Inhibitors auf die antioxidative Wirkung der getesteten Substanzen	72
4.8.4	Einfluss eines NO-Synthase-Inhibitors auf die antioxidative Wirkung der getesteten Substanzen	74
4.8.5	Zusammenfassung	74
5	DISKUSSION	75
6	ZUSAMMENFASSUNG	86
7	LITERATURVERZEICHNIS	88
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	105
8.1	Originalarbeiten	105
8.2	In Kurzform publizierte Vorträge und Poster (<i>Abstracts</i>)	105
9	DANKSAGUNG	107
1		

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin I-konvertierendes Enzym
Act D	Actinomycin D
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BVR	Biliverdinreduktase
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CHX	Cycloheximid
CO	Kohlenstoffmonoxid
CPPs	Caseinophosphopeptide
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDRF	<i>Endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HO-1	Hämoxygenase-1
HSP	Hitzeschockprotein
kb	Kilobase
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginin-methylester
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-arginin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
Met-Met	Methionyl-Methionin
Met-Phe	Methionyl-Phenylalanin
Met-Tyr	Methionyl-Tyrosin
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NSAIDs	nichtsteroidale antiphlogistische Analgetika
ODQ	1-H-(1,2,4)-Oxadiazol-(4,3a)quinoxalin-1-on
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Pyrophosphat
PTIO	2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
RLU	<i>Relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of mean</i>

SOD	Superoxiddismutase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ZnBG	Zink-Bisglykolporphyrin

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronisch fortschreitende Gefäßerkrankung, die durch Ablagerungen von Lipiden und fibrösen Elementen in den großen Arterien charakterisiert ist. Dies führt zu Wandverhärtungen und -deformierungen mit Elastizitätsverlust und Verengung der Gefäße. Atherosklerotisch bedingte Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen in den westlichen Industrieländern zu den Haupttodesursachen. Als Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose gelten neben Bluthochdruck und Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus, Gicht, Übergewicht, körperliche Inaktivität und Rauchen (Ross 1995). Die genaue Ätiologie und der pathogenetische Verlauf dieser komplexen Stoffwechselstörung sind noch nicht endgültig geklärt.

1.1.1 Atherogenese

Nach der *Response-to-injury*-Theorie steht eine Schädigung des Endothels am Ausgangspunkt einer Atherosklerose (Ross et al. 1973). Die Endothelschäden, deren Ursachen metabolischer, entzündlicher oder mechanischer Natur sein können, führen zur so genannten endothelialen Dysfunktion. Die endotheliale Dysfunktion ist durch eine verminderte Aktivität oder Bioverfügbarkeit des endogenen Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) gekennzeichnet. NO beeinflusst unter anderem die Adhäsion und Infiltration von Leukozyten, die Aktivität von Thrombozyten und die Proliferation der glatten Muskelzellen (Nakaki et al. 1990; Kubes et al. 1991; de Graaf et al. 1992). Als Folge der Verletzung der Endothelzellschicht kommt es zu einer durch Wachstumsfaktoren bzw. Cytokine ausgelösten Wucherung (Proliferation) und Wanderung (Migration) von glatten Muskelzellen aus der mehrschichtigen Media in die Intima. Aufgrund der verringerten NO-Verfügbarkeit werden zusätzlich die Einwanderung und Einlagerung von Leukozyten und Thrombozyten begünstigt. Der allmähliche Gewebeumbau führt zu einer Gefäßlumenverengung. Einlagerungen von oxidiertem LDL verursachen die Bildung von so genannten Schaumzellen (*foam cells*), die im weiteren Verlauf Entzündungsreaktionen auslösen. Infolge dessen kommt es zur Bildung herdförmiger Gewebeveränderungen (Plaques), die charakteristisch für das mikroskopische Bild der Atherosklerose sind. Zusätzlich zur Stimulierung des entzündlichen Prozesses beeinflusst oxidiertes LDL die Vulnerabilität der atherosklerotischen Plaques in Richtung Ruptur. Aufgrund der initialen Schädigung der Endothelzellen wird der endotheliale Protektion bei der Prävention der Atherosklerose eine große Bedeutung beigemessen.

Neuere Theorien gehen jedoch davon aus, dass ein endothelialer Defekt nicht zwingend vorhanden sein muss, sondern dass schon eine Aktivierung des Endothels ausreicht, um den nachfolgenden Sklerotisierungsprozess in Gang zu setzen. Bei der *Lipoprotein-induced-atherosclerosis*-Hypothese wird in der oxidativen Modifizierung von LDL die eigentliche Ursache für die Initiierung des atherosklerotischen Geschehens gesehen (Witztum 1994).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) scheinen jedoch bei beiden Theorien eine zentrale Rolle zu spielen. So wirken ROS direkt endothelschädigend und begünstigen das Entstehen einer endothelialen Dysfunktion (Harrison 1997). Weiterhin fördert die Sauerstoffradikal-vermittelte Lipidperoxidation durch Bildung von oxidiertem LDL die Atherogenese (Steinbrecher et al. 1990; Witztum et al. 1991).

1.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Sauerstoffderivate, die sich durch eine extrem hohe Reaktivität auszeichnen (Halliwell et al. 1990). Die exzessive Produktion von ROS unter Ausschöpfung aller endogenen antioxidativen Mechanismen wird als oxidativer Stress bezeichnet. ROS und deren Nebenprodukte können zelltoxisch wirken, indem sie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide oftmals irreversibel oxidieren (Stadtman et al. 1997). Oxidativer Stress wird mit der Pathogenese vieler Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer (Good et al. 1996; Smith et al. 1996), Bluthochdruck (Kumar et al. 1993), Atherosklerose (Steinbrecher et al. 1990; Witztum et al. 1991), Diabetes mellitus (Kubisch et al. 1994), Morbus Parkinson (Adams et al. 1991) und verschiedenen Krebsarten (Babbs 1990; Sun 1990) assoziiert.

ROS können bei verschiedenen enzymatischen Reaktionen, z.B. durch die Xanthin-Oxidase, die NAD(P)H-Oxidase, die NO-Synthase oder durch Peroxidasen in der Zelle gebildet werden. Dabei stellt die NAD(P)H-Oxidase die Hauptquelle der ROS-Bildung in den Gefäßen dar (Morita 2005). Eine weitere Quelle ist die mitochondriale Atmungskette (Shigenaga et al. 1994).

Zu den Sauerstoffverbindungen mit ungepaarten Elektronen, den so genannten freien Radikalen, zählen das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxylradikal (HO^{\cdot}), das Stickstoffmonoxidradikal (NO^{\cdot}) und Lipidradikale. Weitere Sauerstoffderivate wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) oder hypochlorige Säure ($HOCl$) sind zwar keine freien Radikale, werden aufgrund ihrer oxidierenden Eigenschaften dennoch zu den ROS gezählt (Cai et al. 2000). Das äußerst reaktive Superoxidradikal findet sich in allen Sauerstoff-verbrauchenden Zellen. Durch Umsetzung mit Wasserstoffperoxid wird im Verlauf der Haber-Weiss-Reaktion das stärker reaktive Hydroxylradikal gebildet:



Diese Reaktion wird hauptsächlich durch zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) katalysiert (Leibovitz et al. 1980). Klinische Studien, die einen Zusammenhang zwischen hohen zellulären Eisenspiegeln und oxidativem Stress zeigen, unterstreichen die *In-vivo*-Relevanz der Haber-Weiss-Reaktion (Salonen et al. 1992; Kadiiska et al. 1995).

Sauerstoffradikale sind in der Lage, physiologische Aufgaben im Organismus zu übernehmen. So spielen die in Macrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildeten ROS eine wichtige Rolle innerhalb der unspezifischen zellulären Immunabwehr (Bellavite 1988). In anderen Zelltypen (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen) wirken ROS in geringen Konzentrationen als Signalmoleküle (Finkel 1998; Kunsch et al. 1999).

Reaktive Sauerstoffspezies sind aber auch an einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse beteiligt. So werden z.B. proatherogene Vorgänge wie Lipoproteinoxidation und endotheliale Apoptose durch ROS beeinflusst. Über eine Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren können sie außerdem proinflammatorische Entwicklungen initiieren (Morita 2005). Darüber hinaus begünstigen sie die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion. Superoxidradikale sind in der Lage, den endogenen Vasodilatator NO unter Bildung von Peroxynitrit zu inaktivieren. Eine verminderte NO-Verfügbarkeit bzw. -Aktivität ist kennzeichnend für eine endotheliale Dysfunktion und scheint ein frühes Ereignis in der Atherogenese zu sein (Harrison 1997).

Einige der Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose wie z.B. Hyperglykämie, Bluthochdruck und Hyperlipidämie sind mit einer erhöhten ROS-Bildung assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass erhöhte Glucose- und Angiotensin II-Konzentrationen zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen führen (Rajagopalan et al. 1996; Christ et al. 2002). Oxidiertes LDL kann den Redoxstatus der Zelle teilweise durch ROS-Bildung ändern und stellt daher ein wichtiges prooxidatives Signalmolekül in der Pathogenese der Atherosklerose dar (Steinberg et al. 1989; Steinbrecher et al. 1990). So bewirkt oxidiertes LDL etwa eine Anlagerung von

Monozyten und glatten Muskelzellen an das Endothel, wodurch wiederum zahlreiche Mediatoren wie Cytokine und Wachstumsfaktoren sezerniert werden. Die erhebliche Beeinflussung des Stoffwechselgeschehens der Gefäßwand resultiert in einer Verdickung und Verhärtung der Arterienwand.

Da oxidativer Stress im Allgemeinen und die Bildung von oxidiertem LDL im Besonderen wichtige Faktoren bei der Atherogenese darstellen, kommt der Gefäßadaptation bzw. -protektion gegenüber diesen schädigenden Einflüssen eine bedeutende Funktion bei der Prävention atherosklerotischer Veränderungen zu.

1.1.3 Endogene und exogene antioxidative Schutzmechanismen

Aufgrund der hohen unspezifischen Reaktivität der Sauerstoffradikale sind aerobe Organismen auf antioxidative Schutzsysteme angewiesen.

Der Organismus verfügt über verschiedene enzymatische Schutzmechanismen. Die Superoxiddismutase katalysiert die Disproportionierung von Superoxid zu Sauerstoff und dem weniger schädlichen Wasserstoffperoxid (Fridovich 1983):



Der Abbau von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser erfolgt durch die hämhaltige Katalase:



Weiterhin zählen auch die Proteine des Hämoxygenase-1/Ferritin-Systems zu den wichtigen antioxidativen Proteinen (siehe Kapitel 1.4).

Nicht nur Enzyme, sondern auch Stoffe mit geringem Molekulargewicht können auf oxidierende Spezies einwirken und diese durch Interaktionen entgiften (Machlin et al. 1987; Fang et al. 2002; Blokhina et al. 2003). Diese Verbindungen reagieren als Reduktionsmittel leicht mit oxidierenden Substanzen und schützen dadurch andere Moleküle vor Oxidation. Zu den niedermolekularen endogenen Antioxidanzien gehören Harnsäure, Coenzym Q, Liponsäure, Bilirubin, Glutathion und Carnosin.

Zu den exogenen Antioxidanzien, die dem menschlichen Körper mit der Nahrung zugeführt werden müssen, zählen z.B. Vitamin C (Ascorbinsäure) und Vitamin E (Tocopherol) sowie Carotinoide und phenolische Verbindungen (z.B. Flavonoide). Vitamin C und E sind in der Lage, die Lipidperoxidation zu beeinflussen (Sato et al. 1990; Harris 1992). Zusätzlich ist Vitamin C am Abbau von Cholesterol zu Gallensäuren beteiligt und wirkt daher cholesterolsenkend (Ginter 1975). Aufgrund ihres antioxidativen Potenzials wird für beide Vitamine ein Einsatz zur Prophylaxe der Atherosklerose diskutiert.

In den letzten Jahren gab es jedoch vermehrt Hinweise darauf, dass neben den „klassischen“ Antioxidanzien wie Vitamin C und Vitamin E auch andere Nahrungsbestandteile eine entscheidende Rolle bei der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen spielen.

1.1.4 Sekundärprävention durch mediterrane Diät

Neben der medikamentösen Therapie der Atherosklerose und ihrer klinischen Konsequenzen gewinnen diätetische Maßnahmen zunehmend an Bedeutung. Eine ungünstige Konstellation der Lipidwerte ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung einer Atherosklerose und einer koronaren Herzkrankheit. Die klassische kardioprotektive Diät ist daher fettarm und darauf ausgerichtet, den Cholesterolspiegel zu senken. Nach Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) soll der Fettanteil 30% der Energiezufuhr und der Anteil an gesättigten Fettsäuren 10% nicht überschreiten. Die Cholesterolaufnahme soll unter 300 mg/Tag liegen. Eine Verbesserung der Prognose nach einem kardiovaskulären Ereignis konnte damit jedoch nicht erreicht werden (de Lorgeril et al. 1997; Van Horn et al. 1997). Nach neueren Erkenntnissen scheint der Zusammenhang zwischen Ernährung und kardiovaskulären Erkrankungen komplexer zu sein, als bisher angenommen (Ulbricht et al. 1991). Die Beschränkung der diätetischen Maßnahmen auf die drei genannten Faktoren ist daher nicht ausreichend.

Studien zur Sekundärprävention nach Myokardinfarkt konnten z.B. eine 70%ige Reduktion der Rückfallrate unter mediterraner Diät zeigen (*Lyon Diet Heart Study*) (de Lorgeril et al. 1994; Renaud et al. 1995; de Lorgeril et al. 1999). Die traditionelle mediterrane Ernährung beinhaltet viel Obst und Gemüse, viel Ballaststoffe, viel Fisch, dagegen aber wenig rotes Fleisch. Aufgrund der erhöhten Aufnahme von Obst und Gemüse werden dem Organismus unter anderem mehr Antioxidanzien wie Vitamin C und E sowie Polyphenole zugeführt. Polyphenole zeigen neben antioxidativen auch antithrombotische und entzündungshemmende Effekte. Sie vermindern die Plaquebildung in den Blutgefäßen und beugen damit der Atherosklerose vor (de Whalley et al. 1990; Fuhrman et al. 2001). Ballaststoffe dagegen haben direkt cholesterolsenkende Wirkungen und können somit die Plasma-Lipidwerte günstig beeinflussen (Glore et al. 1994; Anderson et al. 2000). Zusätzlich besitzen sie einen geringen blutdrucksenkenden Effekt (Streppel et al. 2005). Die in Pflanzensamen und Nüssen vorkommenden Phytosterine (z.B. Sitosterin), ebenfalls vermehrt aufgenommen unter mediterraner Diät, hemmen im Darm die Aufnahme des Nahrungscholesterols und senken dadurch den Cholesterolspiegel im Blut (Ling et al. 1995). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Diät ist der regelmäßige Verzehr von Seefisch. Mehrere Studien belegen, dass eine Diät reich an Seefisch das Risiko für plötzlichen Herztod signifikant senkt (Burr et al. 1989; Albert et al. 1998). Verantwortlich dafür könnte der hohe Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Omega-3-Fettsäuren, sein. Omega-3-Fettsäuren sind in der Lage, den Serumgehalt an Triglyceriden zu verringern. Außerdem beeinflussen sie die Prostaglandinsynthese, hemmen die Thrombozytenaggregation und zeigen antiarrhythmische Effekte (Covington 2004). Möglicherweise sind auch Fischproteine bzw. kleinere Peptide an den protektiven Effekten beteiligt (Daviglus et al. 1997). So scheint eine erhöhte Proteinaufnahme den Blutdruck in hypertensiven Individuen günstig zu beeinflussen (Stamler et al. 1996; Appel et al. 2005). Als Mechanismus für die Blutdrucksenkung und dem daraus resultierenden verringerten Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten wird die gesteigerte Zufuhr von biologisch aktiven Aminosäuren und Peptiden diskutiert (Appel 2003; Elliott 2003).

1.2 Schwefelhaltige Aminosäuren und deren Derivate

Aminosäuren gehören als Bausteine der Proteine und Peptide zu den wichtigsten organischen Stoffen der lebenden Zelle. Sie machen 70% der Trockenmasse aller Zellen aus. Neben dem Aufbau von Proteinen sind Aminosäuren auch an der Synthese anderer wichtiger Stoffe (z.B. Coenzyme, Gallensalze) beteiligt. Einige Aminosäuren besitzen eine große Bedeutung als Signalmolekül bzw. dessen Vorstufe oder als Metabolit im Zellstoffwechsel.

Insbesondere die schwefelhaltigen Aminosäuren haben an der Regulierung und Aufrechterhaltung von verschiedenen zellulären Funktionen teil. Schwefelhaltige Aminosäuren nehmen aufgrund ihrer entscheidenden Rolle im Methylgruppen-metabolismus Einfluss auf die Genregulation und die Zelldifferenzierung. Als niedermolekulare Thiole bzw. Thioether wirken sie in biologischen Systemen als Reduktionsmittel und sind somit direkt an der Homöostase des zellulären Redoxstatus beteiligt. Hinsichtlich ihrer zellprotektiven Eigenschaften sind sie daher von besonderem Interesse. So können sie aufgrund ihrer chelatierenden und radikalfangenden Eigenschaften antioxidativ wirken oder als Präkursor für antioxidativ wirksame Verbindungen fungieren. Die reaktiven Schwefelgruppen dieser Aminosäuren sind als konstitutive Bestandteile von Proteinen daher von wichtiger funktioneller Relevanz (Calabrese et al. 1998; Dickinson et al. 2002).

1.2.1 L-Methionin

L-Methionin gehört zu den für den Menschen essentiellen Aminosäuren und muss daher dem Körper mit der Nahrung zugeführt werden. Es stellt die Hauptquelle für Schwefel im Organismus dar. Beim L-Methionin ist im Gegensatz zum L-Cystein die Thiolgruppe methyliert und deswegen weniger reaktiv.

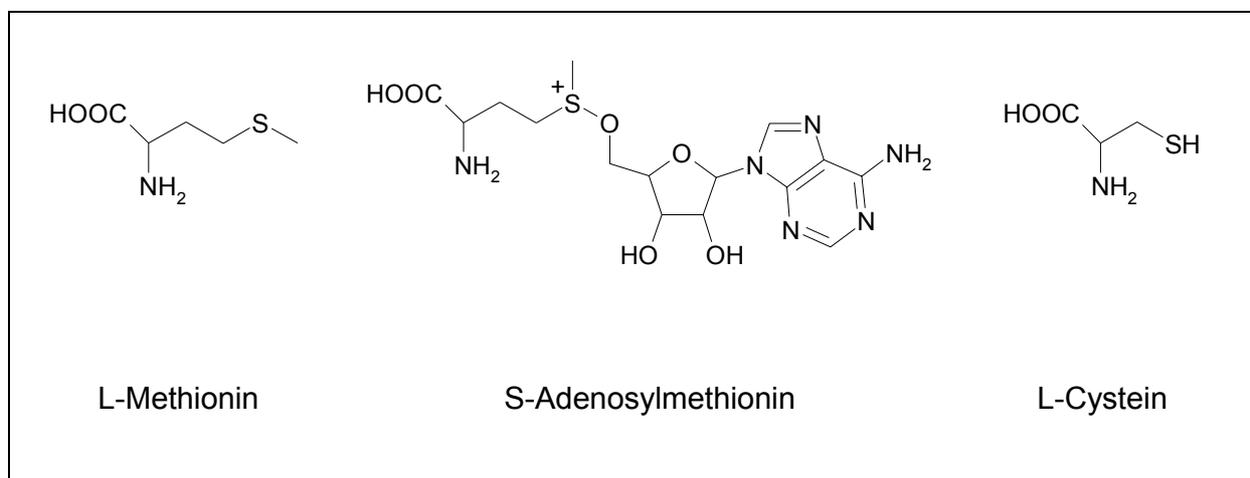


Abbildung 1: Strukturen schwefelhaltiger Aminosäuren bzw. deren Derivate.

L-Methionin ist als Methylgruppen-Donor unter anderem wichtig für die Biosynthese von Cholin, Adrenalin, Carnitin, Nukleinsäuren, Liponsäure und Taurin. Die stoffwechselaktive Form von L-Methionin ist S-Adenosylmethionin (SAM). Im Verlauf des Metabolismus wird L-Methionin durch Übertragung einer Methylgruppe auf Homocystein regeneriert (Transmethylierung). Über den Weg der Transsulfuration ist L-Methionin eine wichtige Vorstufe für L-Cystein sowie für die endogenen Antioxidanzien Glutathion und Taurin (Abb. 2).

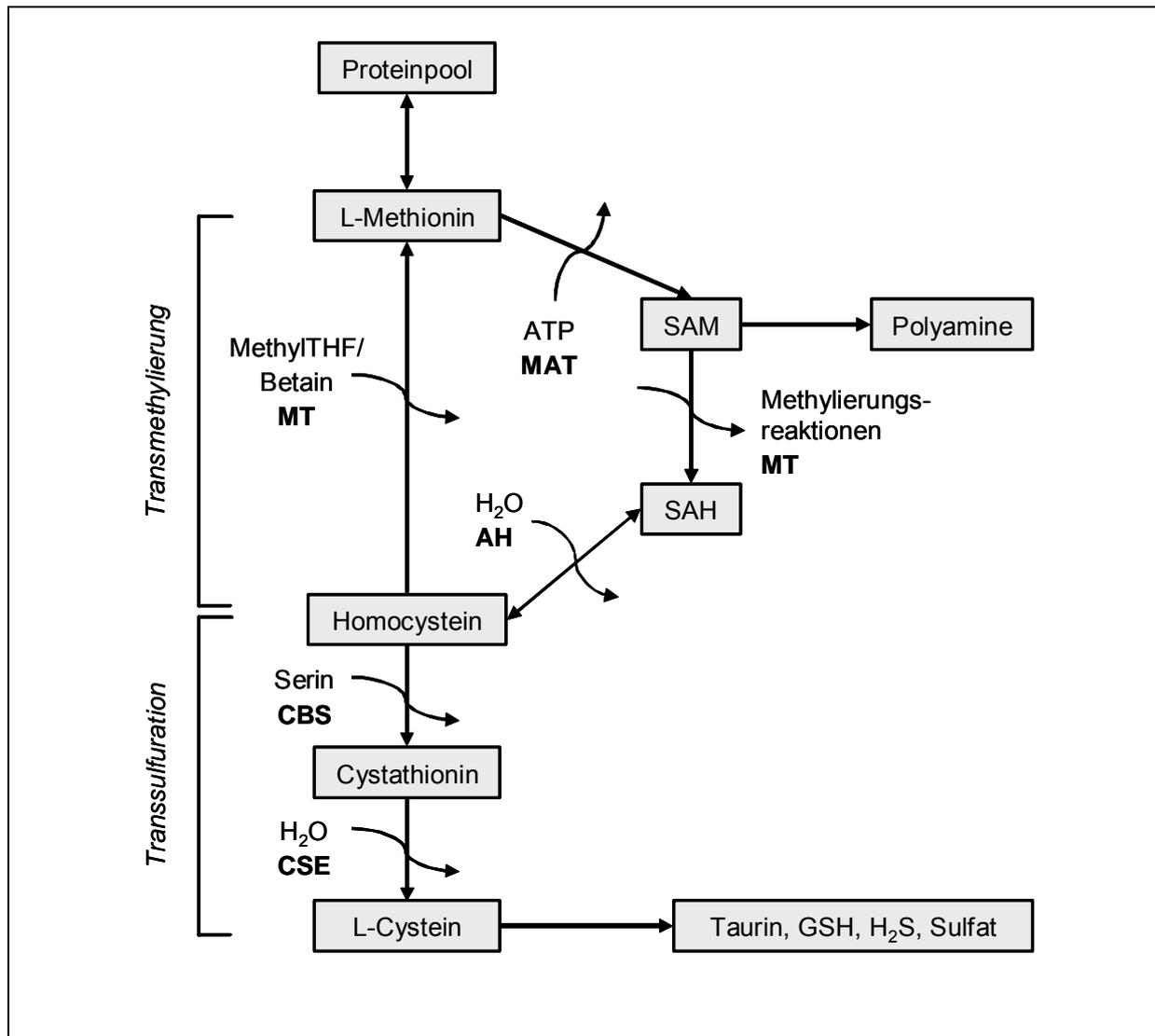


Abbildung 2: Metabolismus der schwefelhaltigen Aminosäuren in der Leber. Die Remethylierung des Homocysteins zu L-Methionin durch MethylTHF wird durch ein Coenzym vermittelt, das sich vom Vitamin B₁₂ ableitet. Alternativ zu MethylTHF kann auch Betain als Methylgruppendonor fungieren; diese Reaktion verläuft dann Vitamin B₁₂-unabhängig. Die Enzyme des Transsulfurationsweges sind Vitamin B₆-abhängig. Unter physiologischen Bedingungen ist die Bildung von Cystathionin aus Homocystein irreversibel. Mit der Nahrung aufgenommenes L-Cystein kann L-Methionin nur im Transsulfurationsweg ersetzen, für alle anderen Reaktionen ist L-Methionin essentiell.

AH Adenosylhomocysteinase, CBS Cystathionin-β-Synthase, CSE Cystathionin-γ-Lyase, MAT Methionin-Adenosyltransferase, MethylTHF N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat, MT Methyltransferase, SAH S-Adenosylhomocystein, SAM S-Adenosylmethionin

Mangel an L-Methionin führt zu schweren Leberschäden (Leberzirrhose, -verfettung). Es wird daher zur Behandlung von Lebererkrankungen und Vergiftungen mit hepatotoxisch wirkenden Substanzen (z.B. Paracetamol, Blei) eingesetzt (Kroger et al. 1997; Patra et al. 2001). Zur Ansäuerung des Harns verwendet, soll L-Methionin vor Harnwegsinfektionen schützen. In Humanstudien konnte L-Methionin die schädlichen Wirkungen von Alkohol verringern, indem es den Acetaldehydspiegel senkte (Tabakoff et al. 1989).

Bei Entzündungsprozessen trägt L-Methionin vermutlich über den aktiven Metaboliten SAM zur Modulation des Immunsystems durch Downregulation präinflammatorischer Cytokine bei (Grimble 1994; McClain et al. 2002). Innerhalb von Proteinen wirken Methioninreste als starke Antioxidanzien und schützen das Gesamtprotein somit vor den

schädigenden Einflüssen freier Sauerstoffradikale (Levine et al. 1996; Levine et al. 2000; Stadtman et al. 2002). In verschiedenen Modellen für oxidativen Stress konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch die freie Aminosäure antioxidative Eigenschaften besitzt. So konnte L-Methionin die Lipidperoxidation verringern, den Glutathionspeicher wiederherstellen und Zellen vor Membranschäden schützen (Selvam et al. 1991; Slyshenkov et al. 2002). Tierversuche lassen ein antiatherosklerotisches Potenzial für L-Methionin vermuten (Seneviratne et al. 1999).

1.2.2 S-Adenosylmethionin

S-Adenosylmethionin (SAM) stellt als reaktive Sulfoniumverbindung einen der wichtigsten Methylgruppendonoren im Zellstoffwechsel dar. Es wird aus L-Methionin durch Übertragung eines Adenosylrestes von einem Molekül ATP gebildet und kommt in praktisch allen Körpergeweben und -flüssigkeiten vor. SAM ist daher an vielen Methylierungsreaktionen beteiligt, z.B. an der Umwandlung von Noradrenalin zu Adrenalin, an der Inaktivierung von Noradrenalin durch Methylierung einer phenolischen OH-Gruppe, an der Synthese von Phospholipiden oder an der Bildung der aktiven Form des Zytostatikums 6-Mercaptopurin. Nach Abgabe der aktivierten Methylgruppe bleibt S-Adenosylhomocystein (SAH) zurück. Innerhalb von zwei Schritten kann SAH wieder in L-Methionin umgewandelt werden. Zunächst wird der Adenosinrest abgespalten, wodurch Homocystein entsteht. Mit Hilfe von N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat wird die Thiolgruppe methyliert und somit L-Methionin regeneriert. Alternativ kann auch Betain als Methylgruppendorer fungieren (Abb. 2) (Finkelstein et al. 1988).

SAM ist eine wichtige Vorstufe für die Bildung von L-Cystein. Außerdem ist es an der Biosynthese von Polyaminen (z.B. Spermin, Spermidin) beteiligt, die unter anderem eine essentielle Rolle in der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese sowie der Zellentwicklung spielen (Luk 1986; Higaki et al. 1994).

Eine verminderte Fähigkeit zur Methylierung ist oftmals mit psychischen Erkrankungen wie Depressionen assoziiert. Für eine SAM-Supplementierung konnte ein antidepressiver Effekt gezeigt werden, der dem unter konventioneller Therapie vergleichbar ist. Durch Steigerung der Serotonin- und Dopaminaktivität im Gehirn kann SAM die Stimmung beeinflussen (Kagan et al. 1990). Weiterhin wird ein positiver Effekt von SAM bei entzündlichen, degenerativen Gelenkerkrankungen (Arthrosen) diskutiert. Es stimuliert die Synthese von Proteoglykanen in den Chondrozyten und wirkt analgetisch. Die durch SAM hervorgerufenen Effekte sind denen von nichtsteroidalen Antirheumatika ähnlich, werden jedoch besser toleriert, da SAM kaum gastrointestinale Nebenwirkungen zeigt (di Padova 1987). Ähnlich wie L-Methionin kann SAM die schädlichen Wirkungen von Alkohol verringern und wirkt präventiv gegen Leberzirrhose (Mato et al. 1999).

In verschiedenen Studien konnten für SAM antioxidative und zellprotektive Effekte nachgewiesen werden. So ist es in der Lage, die Oxidation von LDL zu inhibieren. Als Mechanismen für die Zellprotektion werden die Stimulation der Glutathionsynthese und die Chelatierung von prooxidativen Fe²⁺-Ionen diskutiert (Evans et al. 1997; Mato et al. 2002; Caro et al. 2004).

1.2.3 L-Cystein

L-Cystein ist eine unentbehrliche Schwefelquelle für den Organismus und zählt zu den semiessentiellen Aminosäuren. Im Kindesalter ist eine Aufnahme mit der Nahrung notwendig. Später kann L-Cystein aus der essentiellen Aminosäure L-Methionin über Homocystein, das die SH-Gruppe beiträgt, und aus L-Serin, welches das Grundgerüst liefert, gebildet werden (Transsulfurationsweg). Dazu sind die Enzyme Cystathionin- β -Synthase und Cystathionin- γ -Lyase erforderlich (Abb. 2). Serin- oder Methioninmangel hemmen folglich die Cysteinsynthese. Eine Inaktivität der Cystathionin- β -Synthase führt zu einer Hyperhomocysteinämie, einem unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung einer Atherosklerose. Erhöhte Homocysteinkonzentrationen ($> 15 \mu\text{M}$) werden mit einer direkten toxischen Schädigung der Gefäßwand und einer gesteigerten Thromboseneigung in Verbindung gebracht (Harker et al. 1976; O et al. 1998).

Aufgrund der freien Thiolgruppe können sich so genannte Disulfidbrücken zwischen den Schwefelatomen von zwei verschiedenen Cystein-Resten ausbilden. Diese Fähigkeit zur Bildung von Disulfidbrücken spielt eine wichtige Rolle bei der Faltung und Stabilisierung von Proteinen.

L-Cystein ist der limitierende Faktor für die Synthese von Taurin und Glutathion (Abb. 2). Durch Oxidation der SH-Gruppe und anschließender Decarboxylierung entsteht die Aminosulfonsäure Taurin, die in hohen Konzentrationen in den meisten Geweben präsent ist. Taurin ist an der Konjugation der Gallensäuren, an Entgiftungsreaktionen, Membranstabilisierung und Osmoregulierung beteiligt (Chesney 1985). Als endogenes Antioxidans schützt es den Organismus vor den schädigenden Einflüssen reaktiver Sauerstoffspezies (Balkan et al. 2002).

Weiterhin ist L-Cystein für die Biosynthese des Tripeptids Glutathion (GSH), das in der Leber aus L-Glutaminsäure, L-Cystein und L-Glycin gebildet wird, nötig. GSH kommt in fast allen lebenden Zellen in hoher Konzentration vor und stellt ein wichtiges endogenes Antioxidans dar (Bray et al. 1993). In Anwesenheit der Glutathionperoxidase wirkt GSH als Reduktionsmittel gegenüber zellschädigenden Peroxiden. Ferner bildet GSH unter dem Einfluss der Glutathion-S-transferase Konjugate mit elektrophilen Substanzen (z.B. Alkylantien) und trägt auf diese Weise zu deren Inaktivierung bei. Die entstandenen Konjugate werden teilweise hydrolysiert und können daher eliminiert werden.

Genau wie L-Methionin zeigen L-Cystein, Taurin und Glutathion eine lipotrope Wirkung. Sie beschleunigen den Fettabbau in der Leber durch Cholinbildung, welches in der Lage ist, einer Leberverfettung durch Phosphatidsynthese vorzubeugen.

L-Cystein kann Schwermetall-Ionen komplexieren, weshalb es unter anderem als Therapeutikum bei Kupfer-Vergiftungen eingesetzt wird. Aufgrund der Thiolgruppe ist die Aminosäure in der Lage, freie Radikale zu binden und wird daher zur Vorbeugung von Strahlenschäden verwendet. Sie wird normalerweise in der Form von N-Acetylcystein (NAC) verabreicht, da NAC stabiler ist und besser resorbiert wird. NAC wird auch zur symptomatischen Therapie von Husten eingesetzt. Durch Spaltung von Disulfidbindungen in den Mucoproteinen wird die Viskosität des Bronchialsekrets vermindert, welches dadurch leichter abgehustet werden kann.

Verschiedene Studien belegen, dass L-Cystein ebenfalls wie L-Methionin sowohl eigenständig als auch in gebundener Form antioxidativ wirken kann (Chen et al. 2000; Rasilainen et al. 2002; Carageorgiou et al. 2004; Bourdon et al. 2005). In Versuchen mit hyperlipidämischen Ratten wirkte sich eine Verabreichung von L-Cystein positiv auf den Triglycerid- und Cholesterolspiegel aus (Kawasaki et al. 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass L-Cystein die Lipidperoxidation hemmt (Patterson et al. 1998). Diese Befunde deuten auf ein antiatherogenes Potenzial dieser Aminosäure hin.

Die Mechanismen der zellprotektiven Wirkungen von schwefelhaltigen Aminosäuren und deren Derivate sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die chelatierende Funktion des

Schwefelrests oder ein direkter Radikalfang bieten nur teilweise eine Erklärung. So könnten indirekte, bislang unbekannte Prozesse an den antioxidativen Wirkungen von schwefelhaltigen Aminosäuren und deren Derivate beteiligt sein.

1.3 Bioaktive Peptide

Bioaktive Peptide entstehen durch enzymatische Proteolyse, z.B. während der Verdauung oder der Lebensmittelverarbeitung. Sie bestehen üblicherweise aus 2-20 Aminosäuren und können in physiologisch relevanten Konzentrationen resorbiert werden. Als biologisch aktive Verbindungen, die innerhalb ihres Präkursorproteins inaktiv sind, können sie daher, ähnlich wie Hormone, verschiedene Körperfunktionen beeinflussen und regulieren.

Zur Übersicht auch für die folgenden Kapitel siehe: Meisel 1997; Kitts et al. 2003; Korhonen et al. 2003; Meisel et al. 2003; FitzGerald et al. 2004; Vercruyse et al. 2005.

1.3.1 Vorkommen

Bioaktive Peptide sind sowohl in pflanzlicher als auch in tierischer Nahrung präsent. Milchproteine stellen zurzeit die Hauptquelle für diese bioaktiven Verbindungen dar. Da die biologisch aktiven Peptide auch während der Lebensmittelherstellung entstehen, sind sie ebenfalls in verschiedenen Milchprodukten wie z.B. Käse, Joghurt, Quark oder Molke zu finden. Aus Muskelproteinen von Nutztieren (Huhn, Schwein) konnten einige Peptide mit biologischer Aktivität gewonnen werden. Eine weitere wichtige Quelle sind Fischproteine. Viele bioaktive Peptide wurden z.B. aus Proteinhydrolysaten von Thunfisch, Sardinen oder Lachs isoliert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Invertebratenproteine (z.B. von der Auster) in der Lage sind, bioaktive Peptide zu liefern. Auch in pflanzlichen Proteinhydrolysaten (Reis, Soja, Getreide) waren einige biologisch aktive Peptidverbindungen enthalten.

1.3.2 Wirkungen in biologischen Systemen

Bioaktive Peptide können *in vivo* abhängig von ihrer Aminosäuresequenz unterschiedliche Effekte vorweisen. Oftmals zeigen sie dabei multifunktionelle Eigenschaften, indem sie mehr als eine der folgend aufgeführten Wirkungen initiieren (Korhonen et al. 2003).

Die ersten bioaktiven Peptide wurden 1950 von Mellander erwähnt (Mellander 1950). Die so genannten Caseinophosphopeptide (CPPs) werden aus dem Casein der Milch gewonnen und sind in der Lage, lösliche Organophosphatsalze zu bilden. Diese können als Carrier für verschiedene Minerale wie z.B. Calcium und Magnesium sowie verschiedene Spurenelemente fungieren. In Form von löslichen Komplexen ist die Bioverfügbarkeit der Minerale deutlich verbessert, was in einer erhöhten Resorptionsrate resultiert.

Peptide mit opioider Wirkung konnten unter anderem aus Milchprotein und Weizengluten isoliert werden. Sie werden aufgrund ihres exogenen Ursprungs und ihrer morphinartigen Wirkung als Exorphine bezeichnet. Sie können an Opioidrezeptoren als Agonisten oder Antagonisten wirken. Im Vordergrund steht natürlich die analgetische Wirkung. Nachgewiesen ist auch ein Effekt auf den Gastrointestinaltrakt: Durch Beeinflussung des intestinalen Elektrolyttransportes hemmen sie die Sekretion von Verdauungsenzymen. Außerdem reduzieren sie die Motilität des Magen-Darm-Trakts und wirken dadurch antidiarrhoisch. Ferner zeigen opioide Peptide Wirkungen auf das Nervensystem.

Immunmodulierende Peptide stimulieren die Proliferation von Lymphozyten und die Phagozytose-Aktivität von Macrophagen. Außerdem regen sie die ROS-Bildung an, was zu einer Triggerung der unspezifischen Immunantwort führt. Diese Peptide werden vor

allem aus Casein, Reis- oder Sojaproteinen gewonnen.

Weiterhin konnten Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften isoliert werden. Als Wirkmechanismus wird eine Veränderung der Bakterienmembran diskutiert, wodurch ein bakterizider Effekt zustande kommt. Die meist kationischen Peptide interagieren mit der negativ geladenen Phospholipidmembran und initiieren dadurch die Zellyse. Diese Gruppe der bioaktiven Peptide sind in Fisch-, Milch- und Getreideproteinhydrolysaten zu finden.

Vor einigen Jahren wurden antioxidativ wirksame Peptide aus Soja- und Milchproteinen isoliert. Diese Peptide können als direkte Radikalfänger, Chelatoren von Metallionen oder Sauerstoffquencher fungieren. Sie sind in der Lage sowohl die enzymatische als auch die nicht-enzymatische Lipidperoxidation zu hemmen.

ACE-inhibitorische Peptide zeigen blutdrucksenkende Effekte, indem sie das Angiotensin I-konvertierende Enzym (ACE) hemmen. Sie sind bisher die am meisten untersuchte Klasse der bioaktiven Peptide und konnten unter anderem aus Milch-, Soja- und Getreideproteinen isoliert werden. Die wichtigste Quelle für ACE-hemmende Peptide stellen jedoch Fischproteine dar.

Klassische ACE-Inhibitoren wie Captopril werden in der Literatur oftmals als antioxidativ beschrieben (Chopra et al. 1992; Hayek et al. 1998; van der Giet et al. 2002). Sowohl experimentelle als auch erste klinische (indirekte) Hinweise deuten darauf hin, dass ACE-Hemmer durch Reduktion der Angiotensin II-vermittelten Bildung von Sauerstoffradikalen langfristig zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führen (Griendling et al. 1994; Rajagopalan et al. 1996). Ob einzig die Hemmung der Angiotensin II-Bildung an der antioxidativen Wirkung beteiligt ist, bleibt zu beweisen. Denkbar wäre, dass unter ACE-Hemmer-Therapie Proteine mit antioxidativer Stoffwechsellistung induziert werden, die die Zellen vor Schädigungen durch Sauerstoffradikale schützen. Da bioaktive Peptide oftmals pleiotrope Effekte zeigen (Korhonen et al. 2003), wäre eine Induktion antioxidativer Stoffwechselwege auch für ACE-inhibitorische Peptide durchaus denkbar.

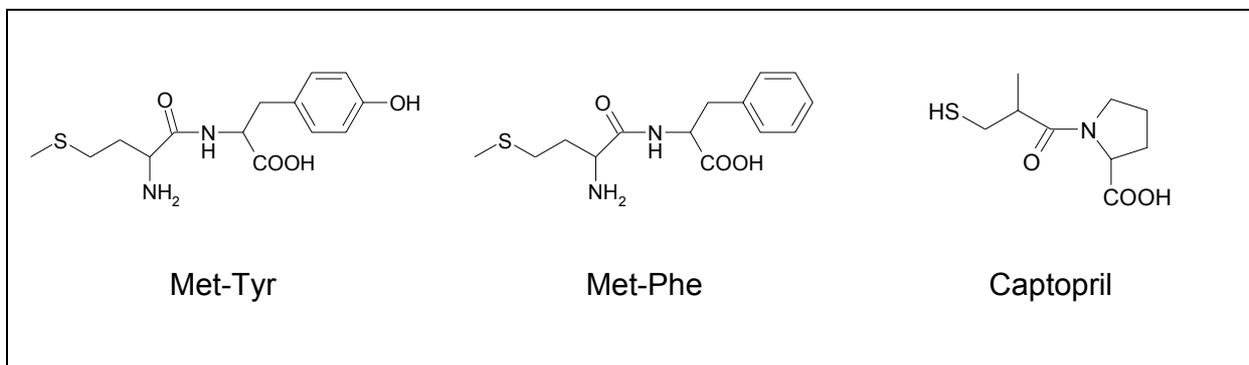


Abbildung 3: Strukturen ACE-inhibitorischer Dipeptide im Vergleich zum klassischen ACE-Inhibitor Captopril. Methionyl-Tyrosin (Met-Tyr) und Methionyl-Penylalanin (Met-Phe) wurden aus dem Muskelfleisch von Sardinen isoliert (Matsufuji et al. 1994).

In Abbildung 3 sind beispielhaft ACE-inhibitorische Dipeptide im Vergleich zum klassischen ACE-Inhibitor Captopril dargestellt. Captopril ist ein Kondensationsprodukt aus 3-Mercapto-2-methylpropionsäure und der Aminosäure L-Prolin.

1.3.3 Ausblick

Die potenziellen Anwendungsgebiete der bioaktiven Peptide ergeben sich aus ihren jeweiligen Wirkungen. Als Inhaltsstoffe in so genannten *Functional Foods* könnten sie aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften von großem Nutzen sein. Für einige Verbindungen wäre sogar ein Einsatz als Arzneistoff mit definiertem pharmakologischem Effekt denkbar. Besonders für CPPs und ACE-inhibitorische Peptide scheint eine Verwendung in naher Zukunft nicht ausgeschlossen.

Als diätetisches Supplement könnten CPPs zur Behandlung von Osteoporose verwendet werden. Verschiedene Studien zeigten, dass CPPs nicht nur die Calciumresorption verbessern, sondern auch die Knochenremineralisierung stimulieren. Daraus lässt sich auch die Antikaries-Wirkung der CPPs ableiten. Eine Anreicherung von Zahnpflegeprodukten mit CPPs wird daher als sinnvoll erachtet. Auf dem Gebiet der Säuglingsernährung werden CPPs bereits zur Humanisierung von Kuhmilch eingesetzt.

Die Behandlung einer Hypertonie ist indiziert, um Folgeerkrankungen wie z.B. Atherosklerose zu verhindern. Neben den klassischen Behandlungsmethoden gewinnen in letzter Zeit auch bioaktive Verbindungen mit antihypertensiven Effekten zunehmend an Interesse. Für einige ACE-inhibitorische Peptide konnten sowohl in Tier- als auch Humanstudien signifikante blutdrucksenkende Effekte nachgewiesen werden (Matsufuji et al. 1995; Kawasaki et al. 2000; Sipola et al. 2001). ACE-inhibitorische Peptide stellen daher eine mögliche Alternative für die oftmals mit schweren Nebenwirkungen verbundenen konventionellen Therapieregime dar.

Besonders die so genannten Zivilisationskrankheiten, zu denen unter anderem kardiovaskuläre Komplikationen, Krebs, Übergewicht und Osteoporose zählen, werden als Haupteinsatzgebiet von biologisch aktiven Peptiden gesehen. Bioaktive Peptide stellen daher einen viel versprechenden Ansatz zur Vorbeugung und Behandlung der genannten Krankheiten dar. Sie scheinen die Theorie, dass die Beziehung zwischen Ernährung und bestimmten Erkrankungen komplexer ist, zu bestätigen.

1.4 Das Hämoxigenase-1/Ferritin-System

Die Hämoxigenase gehört zur Familie der Monooxygenasen. Das Enzym katalysiert mit Hilfe von NADPH und Sauerstoff die oxidative Spaltung des Protoporphyrins Häm. Häm ist der nach Abtrennung des Proteinanteils (Globin) verbleibende toxische Anteil des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin. Die Funktion des Hämoglobins besteht darin, in den Erythrozyten molekularen Sauerstoff reversibel zu binden und zu transportieren. Auch am Transport von Kohlendioxid von den Geweben zur Lunge ist das Hämoglobin maßgeblich beteiligt. Täglich müssen 8-9 g Hämoglobin abgebaut und ersetzt werden. Dabei entstehen unter Katalyse der Hämoxigenasen Biliverdin sowie äquimolare Mengen an Kohlenmonoxid (CO) und freiem Eisen. Während Biliverdin sofort durch die Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin reduziert wird, steht das Eisen für eine Wiederverwendung zur Verfügung.

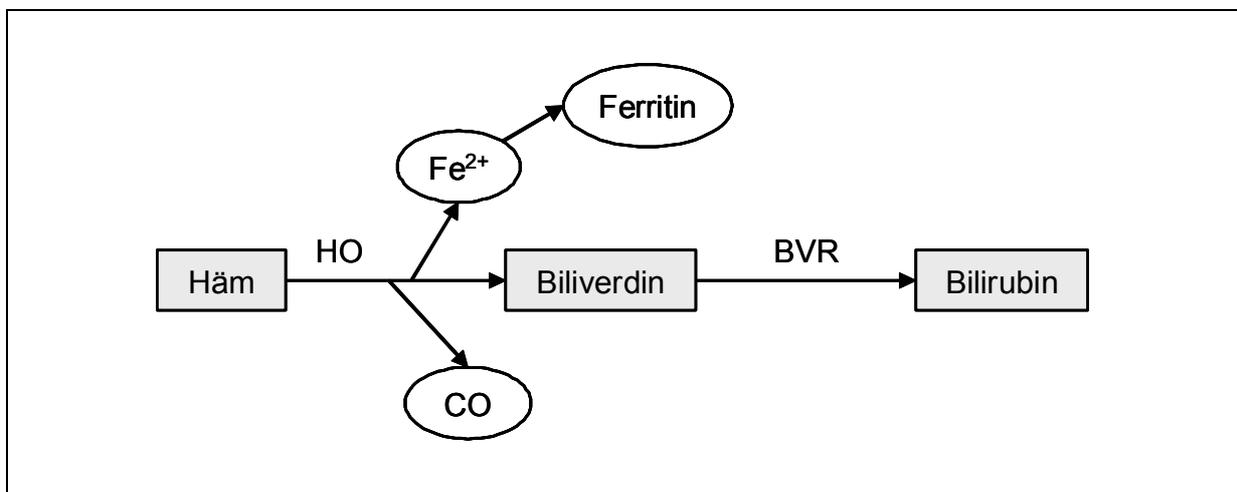


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Häm-Abbaus durch die Hämoxigenase.

Bis jetzt wurden drei Isoformen, Produkte unterschiedlicher Gene, der Hämoxigenase identifiziert. Die Hämoxigenase Typ 2 (HO-2, 36 kDa) wird konstitutiv exprimiert und ist vor allem im zentralen Nervensystem sowie in den Testis zu finden. Die Hämoxigenase Typ 3 (HO-3, 33 kDa) besitzt geringe katalytische Aktivität. Ihre physiologische Funktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber eine Beteiligung an der Bindung von Häm wird vermutet. Die induzierbare Hämoxigenase Typ 1 (HO-1, 32 kDa) kommt ubiquitär im Organismus vor und zählt zu den Hitzeschockproteinen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivität der Hämoxigenasen in der Milz am größten, da dort der Abbau der Erythrozyten stattfindet (Otterbein et al. 2000b; Morita 2005).

1.4.1 Die induzierbare Hämoxigenase (HO-1)

Die HO-1 wird nicht nur durch das natürliche Substrat Häm induziert, sondern auch durch eine Vielzahl strukturell stark unterschiedlicher Agenzien. Neben Hitzeschock und oxidativem Stress zählen UV-Licht, Schwermetalle, Endotoxine, Prostaglandine und inflammatorische Cytokine zu den wichtigsten Induktoren. Den genannten Induktoren ist gemein, dass sie in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies zu generieren. Die HO-1 scheint daher ein Enzym zu sein, das Zellen vor oxidativem Stress schützt. Aufgrund der unterschiedlichen Art der Induktoren wird spekuliert, dass die HO-1 auch eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase spielt. Die Hämoxigenase wurde sowohl aus Bakterien als auch aus Pflanzen und Pilzen isoliert.

Sie stellt daher ein hochkonserviertes Enzym dar. Diese Befunde unterstreichen die Wichtigkeit der Hämooxygenase dahingehend, kritische Zellprozesse zu regulieren (Keyse et al. 1989; Choi et al. 1996; Otterbein et al. 2000b).

Neben Stressfaktoren sind bisher nur wenige benigne Induktoren der HO-1 identifiziert worden. So kann eine Stimulierung der HO-1 ebenfalls zusätzliche therapeutische Effekte von verschiedenen Arzneistoffen wie z.B. Acetylsalicylsäure (ASS), Protonenpumpenhemmern (PPIs), NO-Donoren und Statinen vermitteln oder verstärken (Grosser et al. 2003; Grosser et al. 2004a; Grosser et al. 2004b; Lee et al. 2004; Berndt et al. 2005; Nascimento-Silva et al. 2005; Schröder 2005; Becker et al. 2006; Schröder 2006). Die Induktion der HO-1 ist dabei in Abhängigkeit vom Zelltyp an der therapeutischen Wirkung des Arzneistoffs beteiligt. Die Metaboliten der HO-1 sind verantwortlich für die Vermittlung der Arzneistoffwirkungen und reproduzieren diese auch in dessen Abwesenheit. Bach bezeichnet die HO-1 daher als „*therapeutic amplification funnel*“, als einen therapeutischen Mediator und Verstärker antioxidativer, antiproliferativer und antiinflammatorischer Wirkungen von verschiedenen Substanzen (Bach 2005).

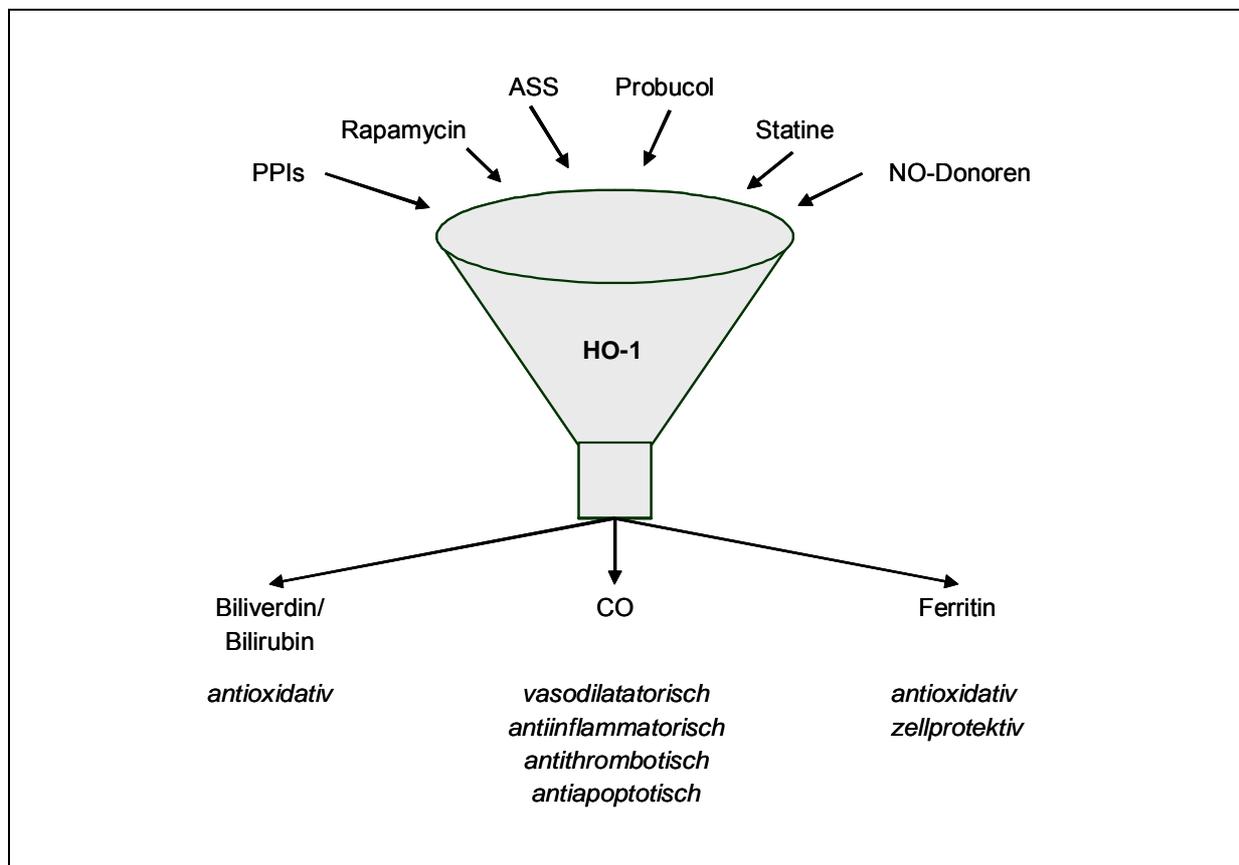


Abbildung 5: Die HO-1 als therapeutischer Mediator und Verstärker antioxidativer, antiproliferativer und antiinflammatorischer Wirkungen von verschiedenen Substanzen nach Bach (Bach 2005).

1.4.1.1 Die HO-1 als protektives Protein

Die induzierbare Hämoxigenase zählt aufgrund ihrer antiinflammatorischen, antiapoptotischen, antioxidativen und antiproliferativen Eigenschaften zu den wichtigsten protektiven Proteinen des Organismus. Der Schutz vor prooxidativen Agenzien durch Induktion oder Überexpression der HO-1 konnte in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden (Choi et al. 1996; Motterlini et al. 1996). So führte eine Inhibierung der HO-1 zu einer vermehrten Lipidperoxidation (Ishikawa et al. 2001). Das HO-1-Protein konnte die durch TNF α -hervorgerufene Apoptose in Fibroblasten und Endothelzellen verhindern (Petrache et al. 2000; Soares et al. 2002; Sass et al. 2003). *In vivo* schütze es vor Transplantatabstoßung (Soares et al. 1998). Weitere Studien zeigten, dass die HO-1 die Zellproliferation regulieren und kontrollieren kann (Duckers et al. 2001; Durante 2003). Darüber hinaus wirkt das Protein modulierend auf inflammatorische Prozesse (Willis et al. 1996). Die zellprotektive Wirkung der HO-1 manifestiert sich dabei vor allem in vaskulärem Gewebe (Balla et al. 2003; Perrella et al. 2003).

Eine Defizienz der HO-1 ist mit starken Wachstumsstörungen sowie hoher Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress verbunden. Darüber hinaus zählen Anämie, Gerinnungsstörungen, Leuko- und Thrombozytose zum klinischen Erscheinungsbild. Es kommt zu Eisenablagerungen in Leber und Niere, die zur chronischen Entzündung der Organe führen. Verringerte Bilirubinspiegel und eine Hyperlipidämie begünstigen das Entstehen von Endothelschäden und einer schweren Atherosklerose (Yachie et al. 1999; Kawashima et al. 2002).

Zusätzlich zum Abbau des prooxidativen und cytotoxischen Häms werden die protektiven Effekte der HO-1 hauptsächlich durch ihre Metaboliten vermittelt.

Kohlenmonoxid ist ein potenter Vasodilatator und spielt neben NO eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Gefäßmuskeltonus und der Plättchenaggregation. Es ist ebenso wie NO in der Lage, die lösliche Guanylatcyclase zu aktivieren und im zentralen Nervensystem als Neurotransmitter zu fungieren. Darüber hinaus zeigt CO antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften, indem es die Bildung proinflammatorischer Cytokine hemmt (Otterbein et al. 2000a; Sass et al. 2003). *In vivo* wirkt CO schützend gegen Hyperoxie-verursachte Lungenschäden und beugt atherosklerotischen Läsionen vor (Otterbein et al. 1999; Otterbein et al. 2003). Die genannten Effekte werden durch die antithrombotischen und antiproliferativen Eigenschaften von CO unterstützt (Maines 1997).

Bilirubin wirkt in hohen Konzentrationen neurotoxisch und verursacht bei gestörtem Metabolismus Gelbsucht (Ikterus). Im physiologischen Konzentrationsbereich stehen jedoch die cytoprotektiven Eigenschaften des Bilirubins im Vordergrund, da es eines der stärksten endogenen Antioxidanzien darstellt. Die antioxidative Wirkung des Bilirubins manifestiert sich in einer direkten Neutralisierung von Sauerstoffradikalen sowie in einer Hemmung der Lipidperoxidation (McDonagh 1990). Nach neuesten epidemiologischen und klinischen Befunden kommt dem Bilirubin eine besondere Bedeutung als invers korreliertem, kardiovaskulärem Risikofaktor zu. Patienten, deren Plasma-Bilirubinspiegel im oberen Bereich des physiologischen Referenzintervalls liegen („*high normal bilirubin levels*“), haben im Vergleich zu Patienten mit „niedrig-normalen“ Bilirubinwerten ein signifikant verringertes koronares Risiko (Schwertner et al. 1994; Hopkins et al. 1996; Djousse et al. 2001).

Die beim Häm-Abbau freigesetzten Eisenionen können als Katalysator für die Haber-Weiss-Reaktion fungieren und somit die Bildung von Sauerstoffradikalen begünstigen. Die freien Eisenionen werden jedoch sofort vom Eisenspeicherprotein Ferritin gebunden, das simultan mit der HO-1 bzw. infolge einer HO-1-Induktion exprimiert wird (Eisenstein et al. 1991; Fogg et al. 1999). Ferritin zeigt demzufolge ebenfalls antioxidative Eigenschaften (Balla et al. 1992; Juckett et al. 1995).

In der Gesamtheit ist davon auszugehen, dass die genannten cytoprotektiven Effekte der

HO-1-Metaboliten zu einer antiatherosklerotischen Wirkung beitragen und eine bestehende Atherosklerose positiv beeinflussen (Siow et al. 1999; Morita 2005).

1.4.1.2 Regulierung der HO-1

Die an der Regulierung des HO-1-Gens beteiligten Stoffwechselwege sind sehr komplex und bisher nur zum Teil identifiziert. Die meisten Induktoren der HO-1 stimulieren die Transkriptionsrate des HO-1-Gens.

So kann NO cGMP-unabhängig die HO-1-Synthese auf transkriptioneller Ebene induzieren (Motterlini et al. 1996; Durante et al. 1997). Durch Freisetzung von Häm aus Hämoproteinen kann NO die HO-1 über erhöhte Substratspiegel stimulieren (Lipton et al. 1993). Weitere Studien mit verschiedenen NO-Donoren zeigten jedoch, dass eine Stabilisierung der HO-1-mRNA durch NO ebenfalls zur Induktion der HO-1-Proteinsynthese beiträgt (Hartsfield et al. 1997; Bouton et al. 2000). Teilweise wird die Induktion der HO-1 aber auch durch die *second messenger* cGMP und cAMP vermittelt (Immenschuh et al. 1998; Polte et al. 2000). Außerdem wurde eine Beteiligung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) an der Induktion der HO-1 nachgewiesen (Elbirt et al. 1998; Kietzmann et al. 2003). MAP-Kinasen sind z.B. an der NO-abhängigen HO-1-Induktion involviert (Buckley et al. 2003). Durch einen Stimulus aktivierte MAP-Kinasen können die Genexpression modulieren, indem sie Transkriptionsfaktoren aktivieren. Es konnten verschiedene regulatorische Elemente innerhalb der Promotorregion der HO-1 identifiziert werden, an die die aktivierten Transkriptionsfaktoren binden können. So existieren unterschiedliche Bindungsstellen („*responsive elements*“) für Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFκB, Nrf2 und Aktivatorprotein-1 (AP-1) (Elbirt et al. 1999; Morita 2005). Zusammenhänge zwischen den einzelnen Signalwegen werden durch verschiedene Studien belegt (Ryter et al. 2006).

Zudem ist die Stärke der HO-1-Induktion nach Stimulation abhängig vom GT-Längen-Polymorphismus im HO-1-Promotor. Bei Individuen mit kurzen GT-Wiederholungen wird die HO-1 stärker induziert. So konnten bei Patienten mit langen GT-Wiederholungen vermehrt Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen aufgrund atherosklerotischer Veränderungen beobachtet werden. Dies wird in Zusammenhang mit der verminderten Fähigkeit zur HO-1-Synthese gebracht (Exner et al. 2004).

1.4.2 Ferritin als antioxidatives Protein

Gekoppelt an die Freisetzung des Häm-Eisens durch die HO-1 ist die Expression eines zweiten antioxidativ wirksamen Stressproteins, des Eisenspeicherproteins Ferritin (Eisenstein et al. 1991; Fogg et al. 1999). Ferritin kommt ubiquitär im Körper vor und besteht aus 24 Polypeptiduntereinheiten, den so genannten H- und L-Untereinheiten. Die genaue Zusammensetzung variiert je nach Gewebetyp und Zellstatus. Die H-Untereinheit besitzt eine Ferroxidaseaktivität, so dass Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert und dadurch in eine speicherungsfähige Form überführt wird. Die L-Untereinheit spielt eine entscheidende Rolle bei der Strukturgebung des Ferritinmoleküls und für den Aufbau des Eisenkerns (Levi et al. 1992). Als neu gebildetes Apoferritin bindet das Protein freie intrazelluläre Eisenionen. Dadurch wird dem Prozess der Sauerstoffradikalbildung ein essentieller Katalysator entzogen und die Entstehung der aggressiven Hydroxylradikale unterdrückt (Balla et al. 1992). Die antioxidativen und cytoprotektiven Eigenschaften des Ferritins sind auf diesen Wirkmechanismus zurückzuführen. Versuche mit dem Eisenchelator Desferoxamin zeigten, dass die Ferritininduktion Eisen-abhängig ist (Oberle et al. 1998; Oberle et al. 1999).

Während an der HO-1-Synthese hauptsächlich transkriptionelle Mechanismen beteiligt sind, wird Ferritin vorwiegend translational reguliert (Zahring et al. 1976; Aziz et al.

1986). Unter bestimmten Voraussetzungen kann auch eine Stimulierung der Transkription der Ferritin-mRNA stattfinden (Cairo et al. 1985). Die Induktion der Ferritinproteinsynthese kann in Abhängigkeit vom Zelltyp durch NO aktiviert werden, möglicherweise über eine Interaktion mit cytosolischem Eisen (Oberle et al. 1997; Oberle et al. 1999). Weiterhin kann die Induktion des Ferritinproteins durch oxidativen Stress, Cytokine und *second messenger* wie cAMP reguliert werden (Torti et al. 2002).

2 Problemstellung

Verschiedenen Nahrungsbestandteilen wird neben der nutritiven Bedeutung zunehmend eine funktionelle Relevanz bei der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen wie Atherosklerose, Herzinfarkt oder Schlaganfall zugesprochen. Neben den bekannten Risikofaktoren (z.B. Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Übergewicht, Rauchen usw.) gilt oxidativer Stress als einer der kritischen Faktoren für eine chronische Schädigung des Endothels und damit für die Entstehung atherosklerotischer Gefäßerkrankungen (Ross 1995; Lusis 2000). In den letzten Jahren gab es vermehrt Hinweise darauf, dass neben den „klassischen“ Antioxidanzien wie Vitamin C (Asplund 2002) und Vitamin E (Stephens et al. 1996) auch andere Nahrungsbestandteile wie Proteine oder freie Aminosäuren eine entscheidende Rolle bei der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen spielen. Von besonderem Interesse im Hinblick auf ihre potenziellen antiatherogenen Eigenschaften sind kleinere Einheiten der Nahrungsproteine wie Di-/Tripeptide oder freie Aminosäuren, die über spezifische Transportsysteme in Endothelzellen gelangen können. Studien haben gezeigt, dass vor allem schwefelhaltige Aminosäuren und deren Stoffwechselprodukte wie z. B. L-Cystein, L-Methionin und S-Adenosylmethionin die Toleranz von verschiedenen Geweben gegenüber Sauerstoffradikalen und anderen proatherogenen Faktoren signifikant erhöhen (Selvam et al. 1991; Pisarenko 1996; Rasilainen et al. 2002; Slyshenkov et al. 2002; Caro et al. 2004). Hinsichtlich möglicher antiatherogener Effekte treten zunehmend auch bioaktive Peptide in den Fokus der Forschung. Insbesondere ACE-inhibitorische Peptide könnten zusätzlich zur Blutdrucksenkung, ähnlich wie klassische ACE-Inhibitoren, antioxidative Wirkungen zeigen (Korhonen et al. 2003; Vermeirssen et al. 2004). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Cytoprotektion durch Aminosäuren und deren Derivate sind noch nicht geklärt. Neben einem direkten Radikalfang wird auch die gezielte Aktivierung antioxidativ wirksamer Proteine als potenzieller Mechanismus diskutiert. Als eines dieser antioxidativ wirksamen Proteine konnte die Hämoxxygenase-1 (HO-1) identifiziert werden (Polte et al. 2002; Grosser et al. 2004c).

Ziel der Arbeit war die Identifizierung von antioxidativ wirksamen Aminosäuren und Aminosäurederivaten und die Charakterisierung ihrer zellprotektiven Effekte.

Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, ob schwefelhaltige Aminosäuren und deren Derivate die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen steigern und dabei ein katalytisch aktives Protein generieren. Unter Zuhilfenahme der Northern-Blot-Technik wurde weiterhin untersucht, ob eine vermehrte mRNA-Bildung der HO-1-Proteinexpression vorausgeht. Von Interesse war außerdem, ob sich eine Stimulierung der Transkription anhand von Genreporter-Versuchen bestätigen lässt. Durch Einsatz von Antioxidanzien und Hemmstoffen sollten erste Aussagen zur genregulatorischen Wirkung von Aminosäuren und deren Derivaten getroffen werden.

Gekoppelt an die Freisetzung des Häm-Eisens durch die HO-1 ist die Expression eines zweiten antioxidativ wirksamen Stressproteins, dem Eisenspeicherprotein Ferritin. Der wichtigste physiologische Stimulus der Ferritinsynthese ist freies Eisen (Theil 1987; White et al. 1988). Substanzen, die den Eisenstoffwechsel beeinflussen (z.B. über eine HO-1-Induktion), sind daher als potenzielle Stimulatoren der Ferritinsynthese anzusehen. Da Ferritin hauptsächlich auf translationaler Ebene reguliert wird, sollte untersucht werden, ob die Aminosäuren und deren Derivate auch die Proteinsynthese des Ferritins in Endothelzellen stimulieren.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung möglicher funktioneller Konsequenzen einer Induktion von Stressproteinen durch Aminosäuren und

deren Derivaten. Da reaktive Sauerstoffspezies in der Pathogenese der Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielen (Ross 1995; Lusis 2000), sollten die verwendeten Substanzen hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirkungen in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress untersucht werden.

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

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Als Modell für Untersuchungen am Endothel wurde die humane Endothel-Zelllinie ECV304 (ECACC 92091712) in den Passagen 3-15 verwendet (Suda et al. 2001). Die Zellen wurden in Medium 199 unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte in einem Inkubator kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

3.2 Western-Blot-Analyse

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

3.2.1 Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse

Die Endothelzellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen über die jeweils angegebenen Zeiträume. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet und in Lysispuffer resuspendiert.

3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

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

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

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

Die Proben (100 µg Protein für HO-1, 20 µg Protein für Ferritin) wurden mit 5fach konzentriertem Ladepuffer und 2,5 M Dithiotreitol versetzt und über 10 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 V über 3-4 Stunden in den mit Laufpuffer gefüllten Gelkammern. Als Molekulargewichtsmarker diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgrößen (Peqlab, Erlangen).

3.2.4 Proteintransfer durch Western-Blot

Das Proteinmuster des Gels wurde mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens in einem vertikalen Puffertank (Eigenbau) auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-ECL; GE Healthcare, Freiburg) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 80 mA und 5°C über Nacht. Hierbei diente der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker zur Kontrolle der Transfereffizienz. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurden die Gele nach dem Transfer mit Coomassie-Brillantblau angefärbt und fotografiert.

3.2.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über die angegebenen Zeiten.

Antikörper	Hersteller	Inkubationszeit	Lösung
HO-1	Axxora, Grünberg	2 Stunden	1:1000 in 25% Blockierungslösung, 65% Tris/Tween, 10% BSA (0,1 mg/ml)
Ferritin	Sigma, Taufkirchen	1 Stunde	1:500 in 25% Blockierungslösung, 75% Tris/Tween

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper.

Nach zweimaligem Waschen der Membranen für 5 Minuten mit Blockierungslösung folgte eine 30minütige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG-HRP; Sigma, Taufkirchen). Die Verdünnung des Sekundärantikörpers betrug 1:5000 für das HO-1-Protein bzw. 1:2000 für das Ferritinprotein in Blockierungslösung. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal 5 Minuten mit Blockierungslösung und zweimal 10 Minuten mit Tris/Tween-Puffer gewaschen.

Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde das ECL-Plus-Detektions-Kit der Firma GE Healthcare (Freiburg) eingesetzt. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm. Diese kann durch die Exposition eines Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL; GE Healthcare, Freiburg) mit der Membran nachgewiesen werden. Die Expositionszeit lag bei 1-10 Minuten. Die densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms *Quantity One Basic* (Bio-Rad, USA) durchgeführt.

3.3 Northern-Blot-Analyse

Für das Northern-Blot-Verfahren wird aus Proben isolierte RNA zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden die RNA-Moleküle aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägerschicht (z.B. Nylonmembran) übertragen und fixiert. Durch Hybridisierung mit geeigneten, markierten Sonden können spezifische RNA-Moleküle sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden (Alwine et al. 1977). Als Sonden dienten Fragmente der kodierenden Regionen der entsprechenden Gene. Diese lagen als Plasmid-DNA in *Escherichia coli* DH5- α -Kulturen vor.

3.3.1 Plasmidgewinnung und -isolierung

Zunächst wurde ein Teil der entsprechenden Dauerkultur auf LB-Ampicillin-Agarplatten (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Die verwendeten Plasmide enthielten alle ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Mit den gewachsenen Kolonien wurden 50 ml Hauptkultur (LB-Medium, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) angeimpft. Nach ca. 10-12 Stunden bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator erfolgte eine Zugabe von Chloramphenicol (170 $\mu\text{g/ml}$), um die Replikation des Plasmids zu aktivieren. Die Ernte der Bakterien erfolgte am nächsten Tag durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C. Die Pellets wurden entweder bei -20°C gelagert oder sofort aufgeschlossen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *Plasmid-Midi-Isolations-Kits* der Firma Qiagen (Hilden). Dieses System basiert auf einer modifizierten alkalischen Zelllyse (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.

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

Tabelle 2: Verwendete Sonden.

Für die Analyse der HO-1-RNA wurde ein EcoR I-Restriktionsfragment der HO-1 cDNA (Klon 2/10) verwendet, welche freundlicherweise von Dr. Rex Tyrrell (School of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath, Bath, UK) zur Verfügung gestellt wurde. Für die Analyse des *House-keeping*-Gens β -Aktin wurde ein kommerzielles Fragment der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet.

3.3.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die benötigten DNA-Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (s. Tabelle 1) aus den Plasmiden geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde entsprechend den Produktinformationen über 2 Stunden bei 37°C inkubiert (Roche, Mannheim).

3.3.3 DNA-Gelelektrophorese und Fragmentisolierung

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

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

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

Die DNA-Konzentration wurde am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bestimmt.

3.3.4 Inkubationsprotokoll zur Northern-Blot-Analyse

Die Endothelzellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen über die jeweils angegebenen Zeiträume. Bei Hemmstoffexperimenten erfolgte eine Vorbehandlung für 15 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor, bevor die Inkubation mit den Substanzen für 8 Stunden fortgesetzt wurde.

Für die Versuche zur RNA-Stabilität wurden die Zellen für 4 Stunden mit Cadmiumchlorid (10 μ M) vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gespült und frisches Medium ohne Serum zugegeben. Nach einer 15minütigen Vorbehandlung mit dem Transkriptionshemmstoff Actinomycin D (1 μ g/ml) wurde die Inkubation mit den angegebenen Substanzen für 2 bis 6 Stunden fortgesetzt.

Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA geerntet und die Pellets bei -80°C gelagert.

3.3.5 RNA-Isolierung

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

3.3.6 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Konzentration wurde am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bestimmt. Anschließend wurden je 25 μ g RNA mit 4fach konzentriertem Ladepuffer versetzt und 10 Minuten bei 60°C denaturiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1%-igen Formaldehyd-Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen bei 16 V über Nacht (Rave et al. 1979).

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

Mit der Methode des Vakuum-Blottens kann RNA aus einem Agarosegel über Vakuum-verstärkte Diffusion auf eine Nylonmembran transferiert werden.

Zur Dokumentation der Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst photographiert. Anschließend wurden sie 20 Minuten in DEPC-Wasser mit 0,05 N NaOH, 5 Minuten in reinem DEPC-Wasser und zweimal 15 Minuten in konzentriertem Transferpuffer (20x SSC) gewaschen. Mit Hilfe eines Vakuum-Blotters (Biometra, Göttingen) erfolgte der 90minütige Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺; GE Healthcare, Freiburg). Danach wurden die Membranen für 30 Minuten bei 80°C in einem Trockenschrank gelagert. Dieses so genannte *baking* fixiert die RNA-Moleküle auf

der Nylonmembran durch Ausbildung von Bindungen zwischen den Basen der RNA und den positiv geladenen Aminogruppen der Nylonmembran.

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

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

Die als Sonde einzusetzende doppelsträngige DNA (45 ng) wird zunächst für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend mit dem Reaktionsgemisch versetzt. Sobald ein Hexanukleotid aus dem Reaktionsgemisch als Primer an den DNA-Strang binden kann, wird der komplementäre Strang durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase synthetisiert. Durch Zugabe von ^{32}P -Desoxycytidin-Triphosphat (Hartmann Analytic, Braunschweig) und einer Mischung der übrigen Nukleotide wird der komplementäre DNA-Strang als radioaktiv markierte Sonde gebildet.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten 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.

3.3.9 Vor- und Haupthybridisierung

Die Membranen wurden zunächst über 2 Stunden bei 65°C mit 100 µg/ml Fisch-DNA enthaltender Hybridisierungslösung vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen der Sonde zu minimieren. Anschließend wurde die Haupthybridisierung über 24 Stunden bei 65°C mit der jeweiligen Sonde in Hybridisierungslösung durchgeführt.

3.3.10 Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle

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

Anschließend wurde ein Autoradiographiefilm (Kodak BioMax MS Film; Sigma, Taufkirchen) über 24 Stunden mit Hilfe eines so genannten *Hyperscreens* bei -80°C exponiert. Dieser Schirm absorbiert die Strahlung starker β -Strahler und gibt sie in Form von Licht wieder ab, das den Film schwärzt. Die densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms *Quantity One Basic* (Bio-Rad, USA) durchgeführt.

3.4 Genreporter-Assay

Beim Genreporter-Assay können Untersuchungen zur Expression von Genen und deren Regulation durchgeführt werden. Man kloniert dazu den zu untersuchenden Promotor vor ein so genanntes „Reporter-gen“ (z.B. *Firefly*-Luciferase), dessen Proteinaktivität leicht nachzuweisen ist. Die Aktivität des Proteins ist dabei proportional zur Aktivität des Promotors. Die „Reporter-gen“-Konstrukte (z.B. HO-1-Promotor + Luciferase-Gen) werden zunächst durch Transfektion in die Zellen gebracht.

3.4.1 Plasmidgewinnung und -isolierung

Die verwendeten Konstrukte lagen als Plasmid-DNA in *Escherichia coli* DH5- α -Kulturen vor. Zunächst wurden 50 ml LB-Medium (100 μ g/ml Ampicillin) mit den entsprechenden Dauerkulturen angeimpft und über Nacht bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator aufbewahrt. Die verwendeten Plasmide enthielten alle ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Die Ernte der Bakterien erfolgte am nächsten Tag durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C. Die Pellets wurden entweder bei -20°C gelagert oder sofort aufgeschlossen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *HiSpeed Plasmid-Midi-Isolations-Kits* der Firma Qiagen (Hilden). Die Isolation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Die DNA-Konzentration wurde am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bestimmt.

Promotor	Herkunft	Größe
hHO-1	Mensch	4,5 kb
mHO-1	Maus	4,045 kb

Tabelle 3: Promotoren.

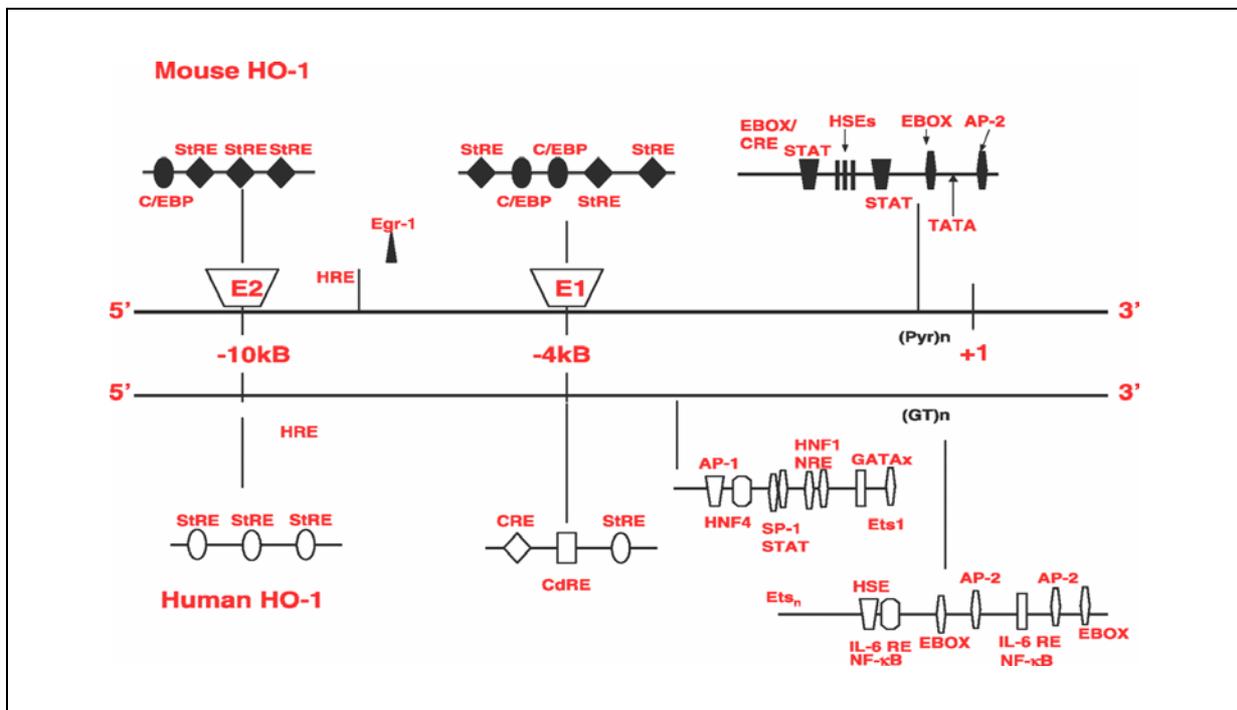


Abbildung 6: Schematische Darstellung der regulatorischen Domänen des Maus- und des humanen HO-1-Gens (Ryter et al. 2006).

Die Konstrukte für die HO-1-Promotorstudien wurden freundlicherweise von PD Dr. Stephan Immenschuh (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

3.4.2 Transfektion

Die Endothelzellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Die Transfektion wurde entsprechend den Herstellerangaben nach der Liposomen-Methode mit dem FuGene 6-Transfektionsreagenz (3 µl pro Vertiefung; Roche, Mannheim) durchgeführt. Dabei wurden 1,5 µg Promotorplasmid pro Vertiefung eingesetzt. Aus den negativ geladenen Nukleinsäuren und den synthetisch hergestellten, positiv geladenen Liposomen bildet sich ein Komplex, der auf die Zellen gebracht wird und mit der Zellmembran fusioniert. Der Komplexinhalt gelangt durch Endocytose in das Zellinnere.

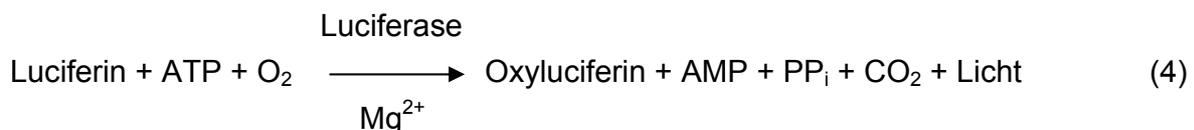
3.4.3 Inkubationsprotokoll zum Luciferase-Assay

Nach einer 24stündigen Transfektion wurden die Zellen für 6 bis 8 Stunden mit Medium ohne Serum inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen über 24 Stunden mit den angegebenen Substanzen.

3.4.4 Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit kaltem PBS gespült, mit 500 µl PLB (Promega, Mannheim; 1:5-Verdünnung in *Ultra Pure Water*) pro Vertiefung versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das erhaltene Zelllysate wurde in Eppis überführt und für 1 Minute bei 20000 rpm und 4°C zentrifugiert. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 µl des Zelllysate-Überstandes in 100 µl Luciferase-Assay-Puffer (Promega, Mannheim) gegeben und in direktem Anschluss im Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold, Bad Wildbad) für 10 Sekunden vermessen.

Das Luciferase-Gen dient als „Reporter-gen“. Durch die *Firefly*-Luciferase wird Luciferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesium-Ionen oxidiert (4). Unter Bildung von Oxyluciferin wird dabei Licht der Wellenlänge 562 nm frei.



Die Photonen können mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt werden. Als Rohdaten erhält man so genannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden. Die so gemessene Luciferase-Aktivität wurde auf den Proteingehalt der Proben normiert (Proteinbestimmung 3.4.2) und korreliert mit der Aktivität des HO-1-Promotors.

3.5 Bestimmung der Hämoxxygenase-Aktivität

Der Assay zur Bestimmung der totalen HO-Aktivität beruht auf der enzymatischen Umwandlung von Häm über Biliverdin zu Bilirubin. Dazu werden die Zellen nach der Inkubation aufgeschlossen, um eine vollständige Freisetzung der HO zu erreichen. Im zellfreien System wird dann NADPH-abhängig Bilirubin gebildet und anschließend extrahiert. Die Menge des extrahierten, gelbfarbenen Bilirubins wird am UV-Spektrometer bestimmt und korreliert mit der enzymatischen Aktivität der HO.

3.5.1 Inkubationsprotokoll zur Aktivitätsmessung

Die Endothelzellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 150 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen über 24 Stunden. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS abgeschabt, in PBS-Mg-Puffer resuspendiert und bei -80°C gelagert.

3.5.2 Probenaufarbeitung

Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren schonend aufgeschlossen. Nach einer 15sekündigen Nachbehandlung im Ultraschallbad wurde der Zellschrott durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C) abgetrennt. Für den Reaktionsansatz wurden 400 µl des Überstandes verwendet. Anschließend folgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (3.4.2).

3.5.3 HO-Aktivitätsbestimmung

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

	Pro Probe
PBS-Mg-Puffer	290 µl
Lebercytosol	110 µl
Glucose-6-phosphatdehydrogenase (50 U/ml)	15 µl
Glucose-6-phosphat (20 mM)	50 µl
Probe	400 µl
Hämin (1 mM)	25 µl
β-NADPH (40 mM)	25 µl

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die HO-Aktivitätsbestimmung.

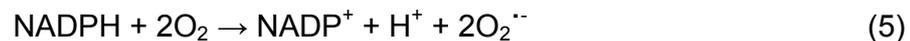
Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Um das gebildete Bilirubin zu extrahieren, wurden 800 µl Chloroform zu den Proben gegeben und anschließend stark gevortext. Nach mehrmaliger Zentrifugation (5 Minuten bei 3000 rpm bzw. 5000 rpm, Raumtemperatur) trennt sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Die Vermessung der organischen Phase mit dem extrahierten Bilirubin erfolgte am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bei den Wellenlängen 464 nm und 530 nm (Referenzwellenlänge).

Die gebildete Menge an Bilirubin (Extinktionskoeffizient 40 mM⁻¹ cm⁻¹) wurde über die

Differenz der Absorptionen bei 464 nm und 530 nm errechnet und auf den Proteingehalt der Proben normiert. Die totale HO-Aktivität für jede Probe wurde als prozentuale Bilirubinbildung (pro mg Protein und pro Stunde) angegeben.

3.6 Bestimmung freier Sauerstoffradikale

Durch Inkubation von Zellen mit NADPH wird die NADPH-abhängige Oxidase stimuliert, Superoxidradikale zu bilden (5) (Griendling et al. 2000; Guzik et al. 2000).



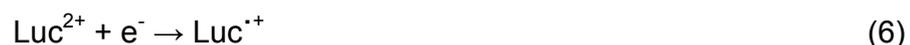
Die Konzentration an Superoxidradikalen kann mit Hilfe von Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz am Luminometer gemessen werden (Li et al. 1998; Tarpey et al. 1999). Durch Vorbehandlung oder direkte Inkubation der Zellen mit potenziell antioxidativ wirkenden Substanzen lässt sich an diesem Modell deren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

3.6.1 Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung

Für die Messung wurden die Endothelzellen in Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit serumfreiem Medium wurde zur Bestimmung genomischer Effekte anschließend über 24 Stunden mit den Substanzen vorinkubiert. Die Hemmstoffe ZnBG und L-NMMA wurden 15 Minuten vor den jeweiligen Substanzen zugesetzt. Zur Ernte wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für eine Minute mit Trypsin/EDTA versetzt. Durch Spülen mit PBS wurden die Zellen von den Zellkulturplatten gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 100 μM NADPH und 50 μM Lucigenin für 20 Minuten inkubiert. Die Bestimmung der direkten radikalfangenden Eigenschaften von Bilirubin erfolgte ohne Vorinkubation durch simultane Zugabe von Bilirubin und den Reagenzien zu den resuspendierten Zellen.

3.6.2 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).



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

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

3.7 Material

Axxora, Grünberg	HO-1-Antikörper, L-NMMA, NADPH, ODQ, PTIO, <i>Ultra Pure Water</i>
Bachem, Weil am Rhein	Methionyl-Methionin, Methionyl-Phenylalanin, Methionyl-Tyrosin
DIFCO Laboratories, Detroit (USA)	Trypton
European collection of Cell Cultures (ECACC), Wiltshire (UK)	ECV304 (ECACC 92091712)
Frontier Scientific, Carnforth (UK)	ZnBG
GE Healthcare, Freiburg	Dextransulfat, ECL Plus Detektionsreagenz, Hyperfilm ECL, Nitrocellulosemembran Hybond-ECL, Nylonmembran Hybond N ⁺ , <i>Quick Spin Säulen</i>
Hartmann Analytic, Braunschweig	³² P-dCTP
Invitrogen, Karlsruhe	Agarose, DNA-Standard, fetales Kälberserum, Ethidiumbromid, Fisch-DNA, PBS, Penicillin/Streptomycin, SDS, Trypsin/EDTA, Tris, Zellkulturmedien
Merck, Darmstadt	Ethanol, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Methanol, Natriumhydrogenphosphat
Peqlab, Erlangen	Protein-Marker, TriFast-Reagenz
Promega, Mannheim	Luciferase-Assay-Puffer, PLB
Qiagen, Hilden	<i>HiSpeed Plasmid Midi Isolation Kit, Plasmid Midi Isolation Kit, Gel Extraction Kit</i>
Roche, Mannheim	FuGene 6, <i>Random Primed DNA Labeling Kit</i> , Restriktionsenzyme
Roth, Karlsruhe	Bradford-Reagenz, Chloroform, Coomassie-Brillantblau, DEPC, DMSO, EDTA, Essigsäure, Formaldehyd, Formamid, Glycin, Hefeextrakt, LB-Agar, MOPS, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumhydroxid, Tween 20
Serva, Heidelberg	Acrylamid

Sigma, Taufkirchen

Actinomycin D, Ampicillin, APS, Bilirubin, BSA, Cadmiumchlorid, Captopril, Chloramphenicol, Cycloheximid, DTT, Ferritin-Antikörper, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Glycerol, Hämin, L-Cystein, L-Methionin, L-NAME, Lucigenin, Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper, PMSF, SAM, SOD, TEMED, Triton-X 100

TSI GmbH, Zeven

Trockenmilchpulver

3.8 Puffer, Lösungen und Medien

3.8.1 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

3.8.2 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

3.8.2.1 Substanzlösungen

Methionyl-Tyrosin und Methionyl-Phenylalanin wurden in entsprechenden Mengen 50%-iger Essigsäure gelöst und so verdünnt, dass die Endkonzentration an Essigsäure bei 0,05% im Inkubationsansatz lag. Zur weiteren Verdünnung der Essigsäurelösungen wurde PBS verwendet.

Actinomycin D (1 mg/ml), ODQ (50 mM) und ZnBG (100 mM) wurden als Stammlösungen in DMSO bei -20°C gelagert. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

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

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

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

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

3.8.3 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

3.9 Statistik

Bei den Messungen der HO-1-Promotor-Stimulation und der HO-Aktivität sowie der Chemilumineszenz sind alle Messdaten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von n=3-6 unabhängigen Experimenten angegeben. Die densitometrischen Daten der Northern- und Western-Blot-Analysen basieren auf n=3-6 unabhängigen Experimenten.

Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni's multipler Vergleichstest angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Induktion der HO-1 auf Proteinebene

Schwefelhaltige Aminosäuren und deren Derivate zeigen in oxidativen Stresssituationen protektive Eigenschaften. Neben direkten radikalfangenden oder chelatierenden Effekten könnten auch indirekte intrazelluläre Prozesse wie die Induktion von antioxidativen Proteinen an den zellprotektiven Wirkungen beteiligt sein. Als eines dieser antioxidativen Proteine konnte die Hämoxxygenase-1 (HO-1) identifiziert werden. Eine Vielzahl von Studien belegt eine protektive Wirkung der induzierbaren Hämoxxygenase sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Foresti et al. 1999).

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik sollte der Frage nachgegangen werden, ob schwefelhaltige Aminosäuren und deren Derivate zu einer vermehrten Proteinsynthese der HO-1 in der humanen Endothelzelllinie ECV304 führen. Dazu wurden die Endothelzellen mit den angegebenen Substanzen für 24 Stunden inkubiert und anschließend eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Als Positivkontrolle diente der HO-1-Induktor Cadmiumchlorid (10 μ M, nicht dargestellt).

4.1.1 Konzentrationsabhängige Effekte auf die HO-1-Proteinexpression

Zunächst wurden die Endothelzellen mit L-Methionin (0,3-10 mM) inkubiert, was zu einer konzentrationsabhängigen Induktion des HO-1-Proteins führte (Abb. 7). Mit einer Konzentration von 1 mM war eine signifikante, etwa 5fache Induktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle detektierbar. Die maximale Stimulation von durchschnittlich 9,5fach wurde mit einer Konzentration von 5 mM erreicht. Eine Konzentration von 10 mM erbrachte keinen stärkeren Effekt.

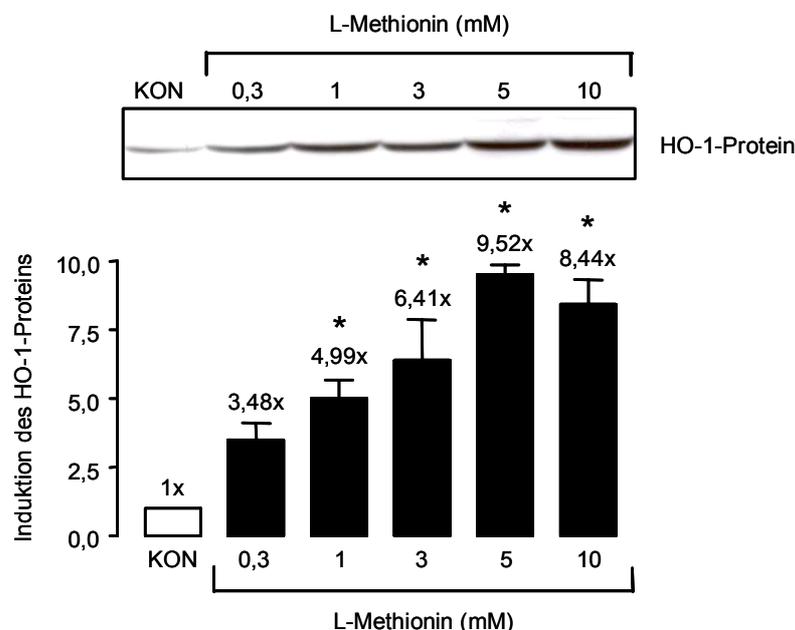


Abbildung 7: Effekt von L-Methionin auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit L-Methionin (0,3-10 mM) 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.

Darüber hinaus wurde der aktive Metabolit von L-Methionin, S-Adenosylmethionin (SAM), untersucht.

SAM aktivierte die Expression des HO-1-Proteins konzentrationsabhängig (Abb. 8). Interessanterweise führten im Vergleich zu L-Methionin schon geringere Konzentrationen im Bereich von 10-500 μM zu einer Induktion des HO-1-Proteins. Die maximal erreichbare, durchschnittlich 4,3fache Stimulation zeigte sich bei einer Inkubation mit 500 μM SAM.

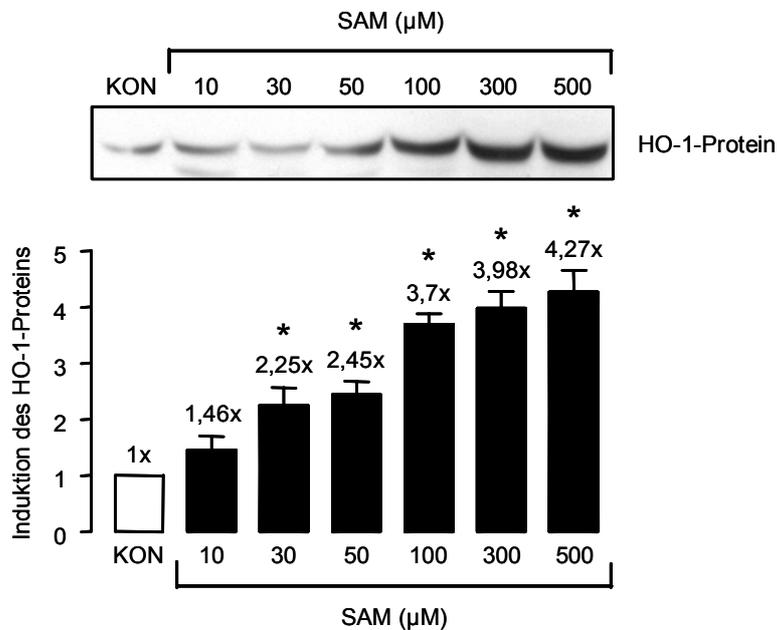


Abbildung 8: Effekt von SAM auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit SAM (10-500 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.

Als weitere schwefelhaltige Aminosäure wurde L-Cystein hinsichtlich eines stimulatorischen Effekts auf die HO-1-Proteinexpression untersucht.

Eine Inkubation von Endothelzellen mit L-Cystein (0,1-5 mM) führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion des HO-1-Proteins (Abb. 9). Dabei führte L-Cystein ab einer Konzentration von 1 mM zu einer signifikanten Steigerung der HO-1-Proteinexpression. Die maximale Stimulation von durchschnittlich 8,7fach wurde mit 5 mM L-Cystein erreicht.

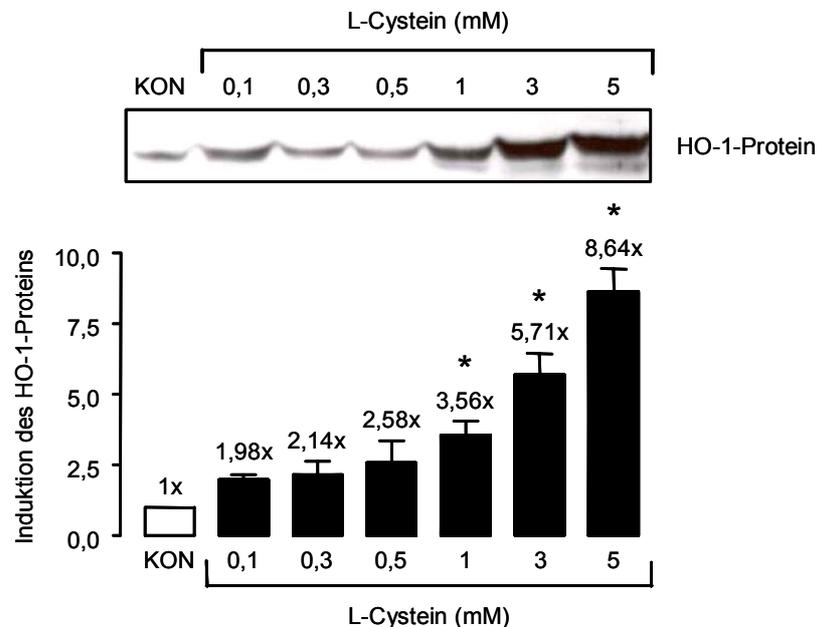


Abbildung 9: Effekt von L-Cystein auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit L-Cystein (0,1-5 mM) 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.

Klassische ACE-Inhibitoren werden in der Literatur auch als antioxidativ beschrieben (Chopra et al. 1992; Hayek et al. 1998; van der Giet et al. 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. Möglicherweise könnte eine Induktion antioxidativ wirksamer Proteine wie der HO-1 beteiligt sein. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine Inkubation mit dem ACE-inhibitorischen Dipeptid Methionyl-Tyrosin (Met-Tyr) in Endothelzellen die Proteinexpression der HO-1 stimuliert.

Eine Inkubation mit Met-Tyr (30-300 μM) über 24 Stunden stimulierte die Proteinexpression konzentrationsabhängig (Abb. 10). Bereits ab einer Konzentration von 100 μM war eine signifikante, 4,3fache Induktion des HO-1-Proteins zu beobachten. Für die freie Aminosäure L-Methionin war eine zehnfach höhere Konzentration nötig, um einen in etwa gleich starken Effekt zu erzielen. Die maximale, 7,3fache Stimulation wurde mit einer Konzentration von 300 μM Met-Tyr erreicht.

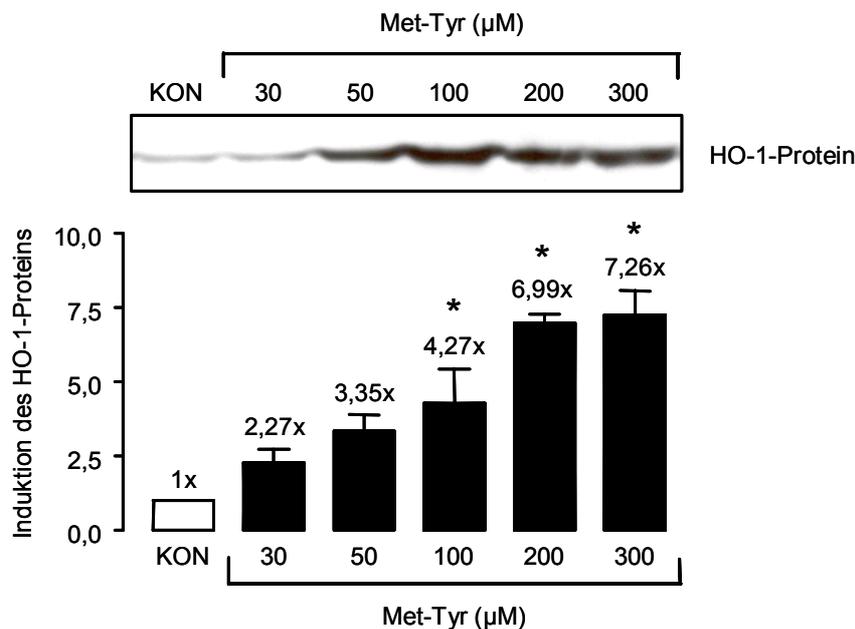


Abbildung 10: Effekt von Met-Tyr auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit Met-Tyr (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.

Das Dipeptid Met-Tyr scheint im Gegensatz zur freien Aminosäure L-Methionin die potentere Verbindung zu sein.

4.1.2 Zeitabhängige Effekte auf die HO-1-Proteinexpression

Weiterhin wurde die Expression des HO-1-Proteins in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die Endothelzellen wurden mit L-Methionin (10 mM), SAM (500 μ M), L-Cystein (5 mM) bzw. Met-Tyr (300 μ M) für 2 bis 24 Stunden inkubiert.

Bereits nach 8stündiger Inkubation mit SAM, L-Cystein und Met-Tyr war eine signifikante Induktion der HO-1-Proteinexpression detektierbar. Eine signifikante Stimulation durch Inkubation mit L-Methionin war hingegen erst nach 10 Stunden zu beobachten. Für alle getesteten Substanzen erhöhte sich die Menge an gebildetem HO-1-Protein mit zunehmender Inkubationsdauer und erreichte ihr Maximum im betrachteten Zeitraum nach 24 Stunden (Abb. 11).

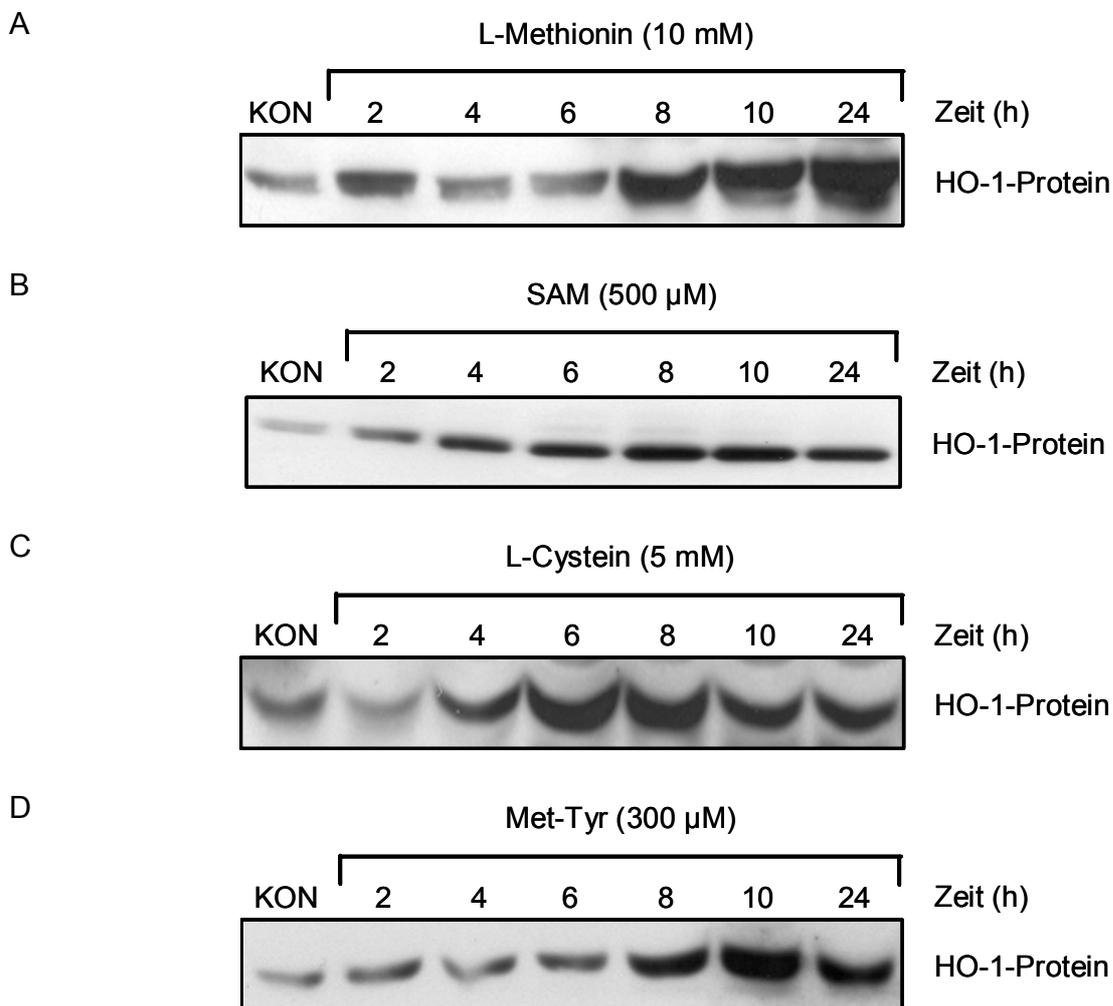


Abbildung 11: Zeitabhängiger Effekt von L-Methionin (A), SAM (B), L-Cystein (C) und Met-Tyr (D) auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentative Western-Blots aus n=3-6 Einzelerperimenten. ECV304-Zellen wurden 2-24 Stunden mit L-Methionin (10 mM), SAM (500 μ M), L-Cystein (5 mM) oder Met-Tyr (300 μ M) inkubiert.

In Tabelle 5 sind die densitometrischen Daten der zeitabhängigen Induktion des HO-1-Proteins zusammengefasst.

	KON	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h
L-Met (10 mM)	1	1,85 ± 0,36	1,98 ± 0,6	2,42 ± 1,01	3,33 ± 0,71	4,55 ± 0,87*	6,93 ± 0,88*
SAM (500 µM)	1	1,12 ± 0,3	1,55 ± 0,17	2,54 ± 0,04	2,73 ± 0,39*	2,81 ± 0,49*	3,91 ± 0,42*
L-Cys (5 mM)	1	1,22 ± 0,15	1,57 ± 0,12	2,49 ± 0,3	2,53 ± 0,4*	2,65 ± 0,32*	6,07 ± 0,88*
Met-Tyr (300 µM)	1	1,51 ± 0,24	1,83 ± 0,31	2,54 ± 0,52	4,17 ± 0,7*	4,69 ± 0,91*	5,3 ± 0,79*

Tabelle 5: Zusammenfassung der densitometrischen Daten der zeitabhängigen Induktion des HO-1-Proteins.

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 der freien Aminosäuren L-Methionin und L-Tyrosin im mikromolaren Konzentrationsbereich

Um zu untersuchen, ob die Stimulation der HO-1-Proteinexpression durch das Dipeptid Met-Tyr auf einer Umwandlung zu den freien Aminosäuren beruht, wurden Endothelzellen über 24 Stunden mit L-Methionin (300 µM) und L-Tyrosin (300 µM) einzeln und in Kombination inkubiert.

Eine Inkubation mit den freien Aminosäuren L-Methionin und L-Tyrosin sowohl einzeln als auch in Kombination zeigte im mikromolaren Bereich keinen induktiven Effekt auf die HO-1-Proteinexpression (Tab. 6). L-Methionin bewirkte zwar in einer Konzentration von 300 µM einen deutlichen Anstieg der HO-1-Proteinmenge, welcher aber nicht signifikant war.

KON	Met-Tyr (300 µM)	L-Met (300 µM)	L-Tyr (300 µM)	L-Met (300 µM) + L-Tyr (300 µM)
1	7,26 ± 0,81*	2,37 ± 0,55	1,14 ± 0,31	0,91 ± 0,18

Tabelle 6: Effekt von L-Methionin und L-Tyrosin sowohl einzeln als auch in Kombination im mikromolaren Konzentrationsbereich auf die HO-1-Proteininduktion im Vergleich zu Met-Tyr.

Densitometrische Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Substanzen (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.

Diese Ergebnisse unterstreichen das bessere Dosis-Wirkungsverhältnis des Dipeptids Met-Tyr im Vergleich zur freien Aminosäure L-Methionin. Ein Synergieeffekt von L-Methionin und L-Tyrosin scheint ausgeschlossen zu sein. Die Befunde sprechen für eine verstärkte Wirkung von Aminosäuren, wenn sie in einer peptidischen Verbindung vorliegen, und decken sich mit ähnlichen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Alabovskiy et al. 1997; Kitts et al. 2003). Möglicherweise führen auch spezifische strukturelle Merkmale innerhalb des Dipeptids zu einer Verbesserung der Wirksamkeit.

4.1.4 Effekte von Captopril, Methionyl-Phenylalanin und Methionyl-Methionin im mikromolaren Konzentrationsbereich

Da Met-Tyr zu den als ACE-inhibitorisch charakterisierten bioaktiven Peptiden gehört, sollte untersucht werden, ob die Induktion der HO-1 ein Gruppeneffekt für ACE-Inhibitoren darstellt. Im Vergleich zu L-Methionin erwies sich Met-Tyr als deutlich potenterer Induktor der HO-1, weshalb weitere Methionin-haltige Dipeptide in Bezug auf eine mögliche HO-1-Induktion getestet werden sollten.

Eine 24stündige Inkubation von Endothelzellen mit dem klassischen ACE-Inhibitor Captopril und dem ACE-inhibitorischen Peptid Methionyl-Phenylalanin (Met-Phe) sowie dem Dipeptid Methionyl-Methionin (Met-Met) führte im mikromolaren Konzentrationsbereich zu keiner signifikanten Induktion des HO-1-Proteins (Tab. 7).

KON	Met-Tyr (300 μ M)	Captopril (300 μ M)	Met-Phe (300 μ M)	Met-Met (300 μ M)
1	7,26 \pm 0,81*	1,74 \pm 0,22	1,15 \pm 0,22	1,21 \pm 0,19

Tabelle 7: Effekt des ACE-Hemmers Captopril, des ACE-inhibitorischen Dipeptids Met-Phe und des Dipeptids Met-Met im mikromolaren Konzentrationsbereich auf die Induktion des HO-1-Proteins im Vergleich zu Met-Tyr.

Densitometrische Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Substanzen (300 μ M) 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.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die HO-1-Induktion durch Met-Tyr vermutlich unabhängig von der ACE-inhibitorischen Wirkung auftritt und für Met-Tyr spezifisch ist.

4.1.5 Zusammenfassung

L-Methionin, SAM, L-Cystein und Met-Tyr aktivieren die Expression des HO-1-Proteins in einer konzentrations- und zeitabhängigen Weise. Dabei sind die Verbindungen unterschiedlich starke Induktoren. Die Induktion durch SAM und Met-Tyr war schon bei deutlich geringeren Konzentrationen im mikromolaren Bereich detektierbar.

Im Gegensatz dazu hatte eine Inkubation mit den freien Aminosäuren L-Methionin und L-Tyrosin (einzeln und in Kombination) im mikromolaren Bereich keinen induktiven Effekt auf die HO-1-Proteinexpression. Dieser Befund spricht für eine verstärkte Wirkung von Aminosäuren, wenn sie in einer peptidischen Bindung vorliegen, und deutet auf spezifische strukturelle Merkmale des Dipeptids hin. Diese Ergebnisse charakterisieren Met-Tyr in Konzentrationen, die im Bereich des IC₅₀-Wertes (193 μ M) für eine ACE-Hemmung liegen, als den stärkeren Induktor der HO-1-Proteinexpression im Vergleich zur freien Aminosäure L-Methionin.

Weitere ACE-inhibitorische Substanzen zeigten keine Effekte auf die HO-1-Proteinbildung. Ebenso unwirksam waren andere Methionin-haltige Dipeptide. Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivierung der HO-1-Proteinexpression durch Met-Tyr nicht auf eine ACE-Hemmung zurückzuführen und für Met-Tyr spezifisch ist.

4.2 Induktion des Ferritinproteins

Gekoppelt an die Freisetzung des Häm-Eisens durch die HO-1 ist die Expression eines zweiten antioxidativ wirksamen Stressproteins, des Eisenspeicherproteins Ferritin (Immenschuh et al. 2000).

Daher sollte der Frage nachgegangen werden, ob die getesteten Aminosäuren und deren Derivate neben einer vermehrten Expression des HO-1-Proteins auch zu einer Induktion des Eisenspeicherproteins Ferritin führen. Endothelzellen wurden mit den angegebenen Substanzen für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine Western-Blot-Analyse.

4.2.1 Konzentrationsabhängige Induktion des Ferritinproteins

Eine Inkubation von Endothelzellen mit L-Methionin (0,3-10 mM) führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion des Ferritinproteins (Abb. 12). Ab einer Konzentration von 3 mM war eine signifikante Induktion zu beobachten. Die maximale, 3,9fache Stimulation wurde mit einer Konzentration von 10 mM L-Methionin erreicht.

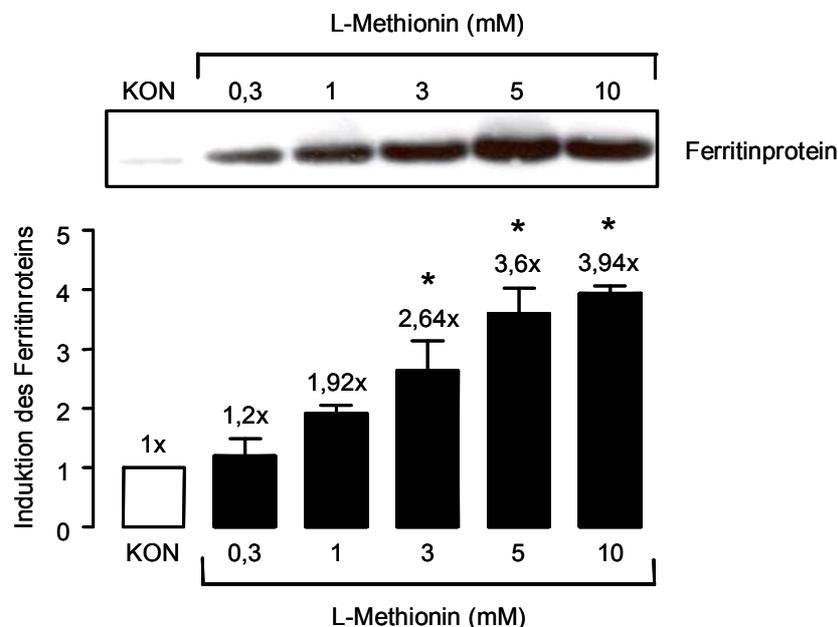


Abbildung 12: Effekt von L-Methionin auf die Expression des Ferritinproteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit L-Methionin (0,3-10 mM) 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 Aminosäure L-Cystein (0,1-5 mM) zeigte ebenfalls nach 24 Stunden Inkubation einen induktiven Effekt auf die Ferritinproteinexpression (Abb. 13). Ab 1 mM L-Cystein war ein signifikanter Effekt detektierbar. Die höchste verwendete Konzentration von 5 mM stimulierte die Ferritinproteinbildung durchschnittlich 4,6fach.

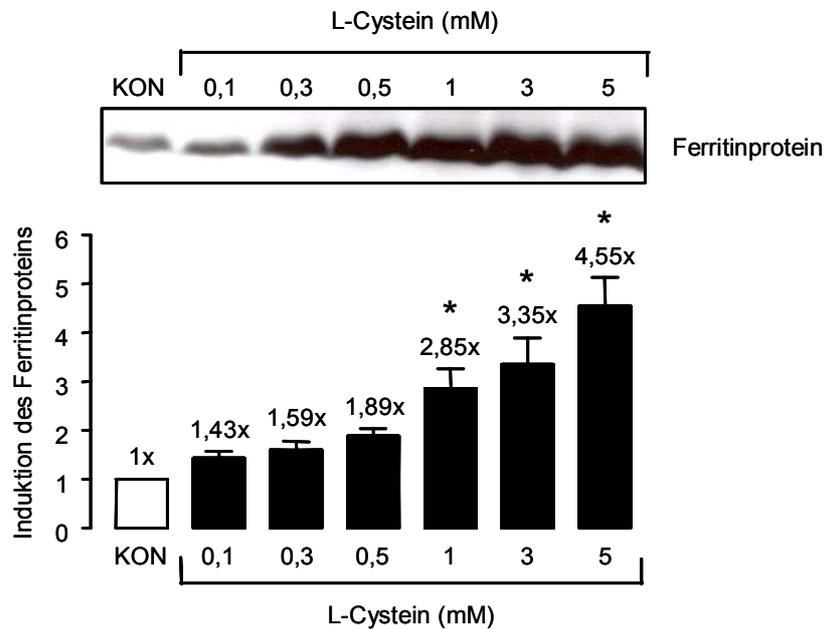


Abbildung 13: Effekt von L-Cystein auf die Expression des Ferritinproteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit L-Cystein (0,1-5 mM) 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.

Das Dipeptid Met-Tyr erwies sich auch in Bezug auf die Induktion des Ferritinproteins im Vergleich zu L-Methionin als potentere der beiden Verbindungen. Bereits in einer Konzentration von 100 μM führte eine 24stündige Inkubation mit dem Dipeptid zu einer signifikanten Stimulation der Ferritinproteinexpression. Die mit 300 μM Met-Tyr maximal erreichbare, etwa 7,5fache Ferritinproteinbildung ist dabei deutlich stärker ausgeprägt als mit 10 mM L-Methionin (Abb. 14). Diese Ergebnisse unterstreichen die Befunde zur Induktion der HO-1-Proteinexpression.

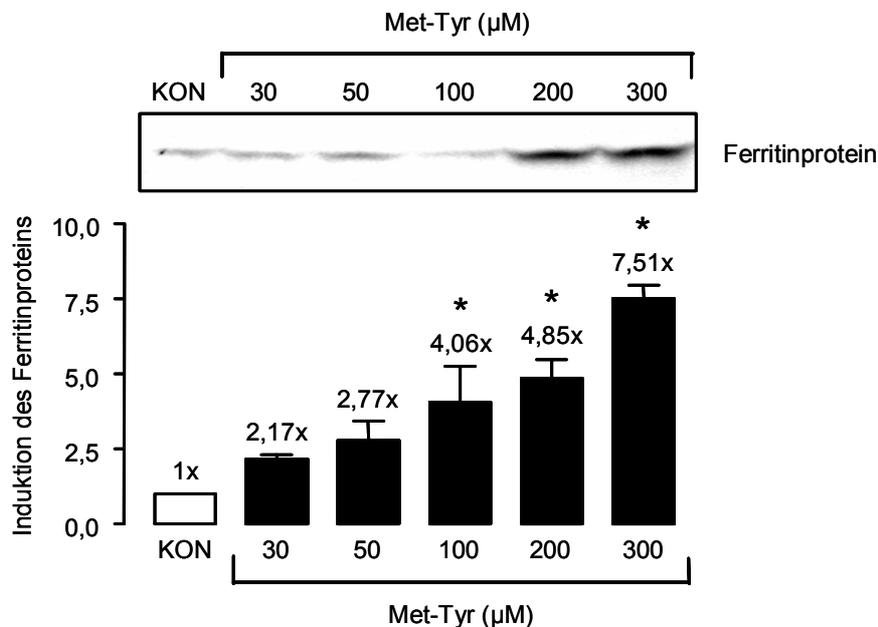


Abbildung 14: Effekt von Met-Tyr auf die Expression des Ferritinproteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit Met-Tyr (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 Induktion des Ferritinproteins

Für Ferritin wurde analog zur HO-1 die Proteinexpression in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die Endothelzellen wurden für 4-24 Stunden mit L-Methionin (10 mM), L-Cystein (5 mM) oder Met-Tyr (300 μ M) inkubiert.

Bereits nach 8 Stunden war eine deutliche Induktion des Ferritinproteins zu erkennen. Die Menge an gebildetem Ferritinprotein erhöhte sich mit zunehmender Inkubationsdauer und erreichte ihr Maximum im betrachteten Zeitraum nach 24 Stunden. Eine signifikante Induktion des Ferritinproteins wurde bei allen Substanzen jedoch erst nach 24stündiger Inkubation erreicht (Abb. 15).

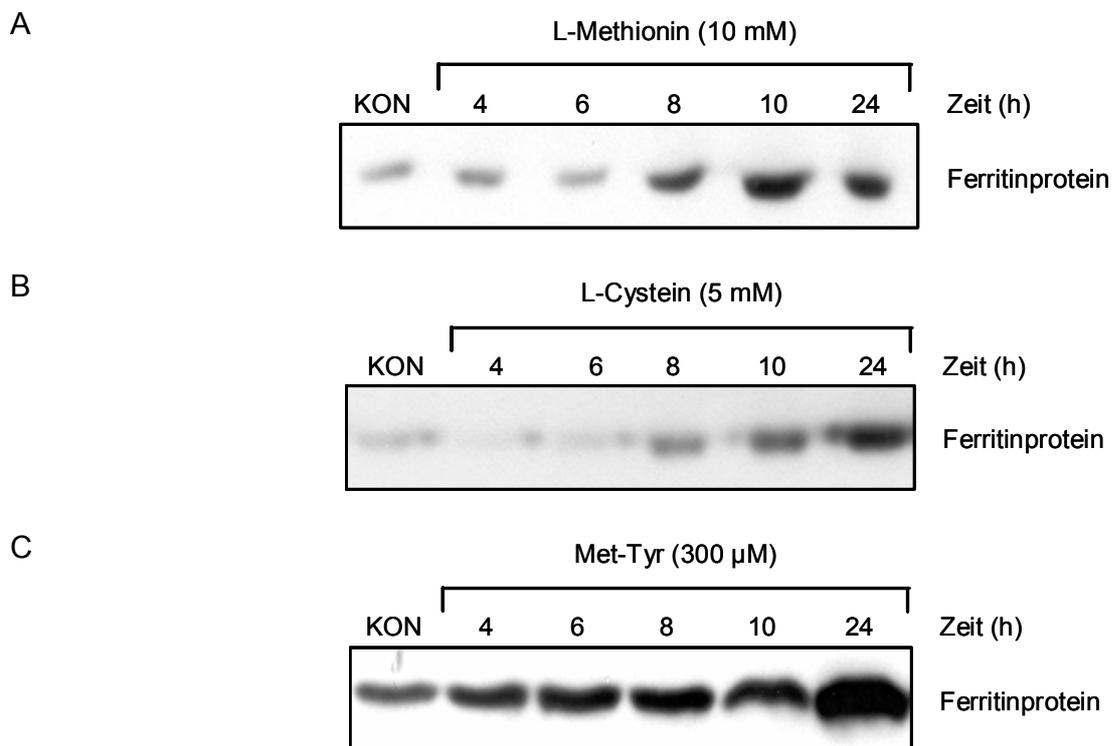


Abbildung 15: Zeitabhängiger Effekt von L-Methionin (A), L-Cystein (B) und Met-Tyr (C) auf die Expression des Ferritinproteins in Endothelzellen.

Repräsentative Western-Blots aus n=3-6 Einzelexperimenten. ECV304-Zellen wurden 2-24 Stunden mit L-Methionin (10 mM), L-Cystein (5 mM) oder Met-Tyr (300 μ M) inkubiert.

In Tabelle 8 sind die densitometrischen Daten der zeitabhängigen Induktion des Ferritinproteins zusammengefasst.

	KON	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h
L-Met (10 mM)	1	2,22 ± 1,15	2,37± 1,52	2,39 ± 0,35	3,8 ± 0,61	3,86 ± 0,49*
L-Cys (5 mM)	1	0,76 ± 0,16	1,48 ± 0,69	2,43 ± 0,42	3,49 ± 0	3,96 ± 0,55*
Met-Tyr (300 µM)	1	1,7 ± 0,24	2,42 ± 0,4	3,18 ± 0,6	3,6 ± 1,55	5,15 ± 1,27*

Tabelle 8: Zusammenfassung der densitometrischen Daten der zeitabhängigen Induktion des Ferritinproteins.

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.

4.2.3 Zusammenfassung

L-Methionin, L-Cystein und Met-Tyr induzieren die Ferritinproteinexpression sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig. Die Induktion von Ferritin erfolgte dabei im gleichen Konzentrationsbereich wie die HO-1-Induktion. Bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen erfolgte eine signifikante Proteinbildung jedoch erst nach 24stündiger Inkubation. Das spricht für eine HO-1-abhängige Induktion des Ferritinproteins.

Met-Tyr scheint auch in Bezug auf die Ferritinprotein-Bildung deutlich potenter als L-Methionin zu sein.

4.3 Induktion der HO-1 auf mRNA-Ebene

Die HO-1 wird nicht nur durch ihr Substrat Häm induziert, sondern auch durch verschiedene andere Stimuli wie z.B. UV-Licht, Schwermetalle oder Hitzeschock. Die Stimulation des HO-1-Gens durch die meisten Induktoren wird dabei primär auf transkriptioneller Ebene reguliert (Shibahara et al. 1987; Alam et al. 1989; Takeda et al. 1994).

Mittels Northern-Blot-Analyse sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Stimulation der mRNA-Bildung die Grundlage der vermehrten HO-1-Proteinsynthese ist. Dazu wurden die Endothelzellen 8 Stunden mit den angegebenen Substanzen inkubiert. Als Positivkontrolle diente eine Inkubation mit dem potenten HO-1-Induktor Cadmiumchlorid (10 μ M, nicht dargestellt).

4.3.1 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch L-Cystein und S-Adenosylmethionin

Die Aminosäure L-Methionin (10 mM) sowie das bioaktive Dipeptid Met-Tyr (300 μ M) zeigten in ihren höchsten eingesetzten Konzentrationen nach 8 Stunden Inkubation keinen induktiven Effekt auf die HO-1-mRNA-Bildung (Tab. 9).

KON	L-Met (10 mM)	Met-Tyr (300 μ M)
1	1,14 \pm 0,13	1,34 \pm 0,25

Tabelle 9: Effekt von L-Methionin und Met-Tyr auf die Expression der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Densitometrische Auswertung. ECV304-Zellen wurden 8 Stunden mit L-Methionin (10 mM) oder Met-Tyr (300 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten.

Dagegen führte eine Inkubation der Endothelzellen mit L-Cystein zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der HO-1mRNA im Bereich von 0,1-5 mM (Abb. 16). Mit einer L-Cystein-Konzentration von 1 mM war eine signifikante, 1,5fache Induktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle feststellbar. Mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 5 mM war im Durchschnitt eine 2,9fache Stimulation der mRNA-Bildung zu erkennen. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen zur Induktion der HO-1-Proteinexpression.

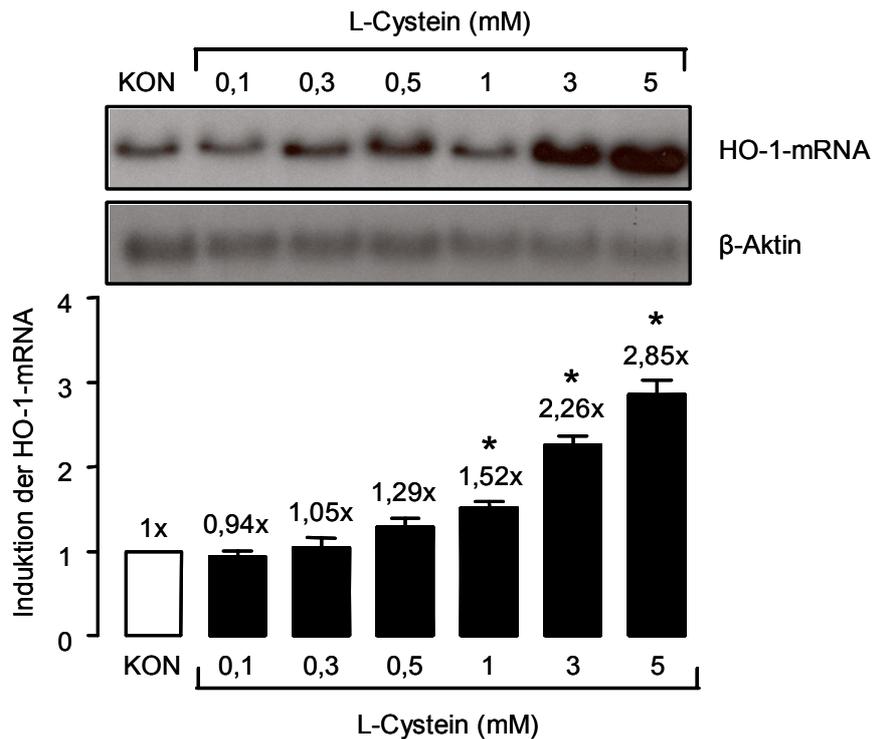


Abbildung 16: Effekt von L-Cystein auf die Expression der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot mit densitometrischer Auswertung und β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 8 Stunden mit L-Cystein (0,1-5 mM) 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.

Darüber hinaus wurden die Endothelzellen mit SAM im Konzentrationsbereich von 10-500 μ M inkubiert. Schon ab 50 μ M SAM wurde eine signifikante, durchschnittlich 2,5fache Induktion der HO-1-mRNA gegenüber der unbehandelten Kontrolle detektiert. Die höchste verwendete Konzentration von 500 μ M stimulierte die HO-1-mRNA-Bildung durchschnittlich 4,2fach (Abb. 17). Dieses Resultat steht im Einklang mit den Ergebnissen auf Proteinebene.

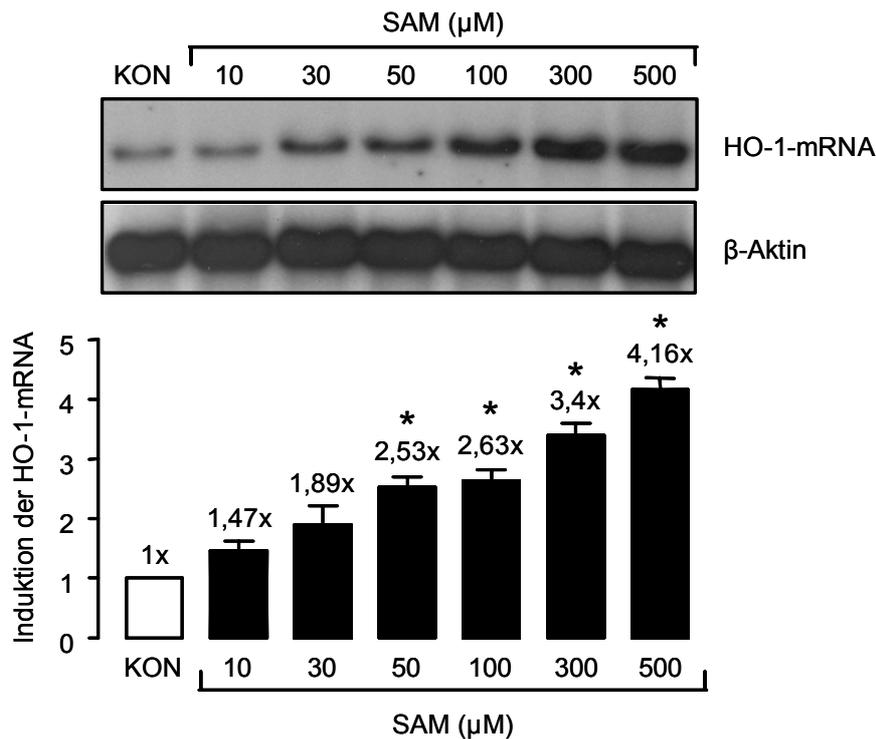


Abbildung 17: Effekt von SAM auf die Expression der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot mit densitometrischer Auswertung und β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 8 Stunden mit SAM (10-500 μ M) 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.

4.3.2 Zeitabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch L-Cystein und S-Adenosylmethionin

Weiterhin wurde die Bildung der HO-1-mRNA in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die Endothelzellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit den jeweiligen Substanzen inkubiert.

L-Methionin (10 mM) und Met-Tyr (300 μ M) zeigten im betrachteten Zeitraum (2-8 Stunden) keinen induktiven Effekt auf die HO-1-mRNA-Bildung (Tab. 10).

	KON	2 h	4 h	6 h	8 h
L-Met (10 mM)	1	0,6 \pm 0,19	0,58 \pm 0,17	0,74 \pm 0,22	1,14 \pm 0,13
Met-Tyr (300 μ M)	1	0,87 \pm 0,07	1,12 \pm 0,16	1,35 \pm 0,24	1,54 \pm 0,31

Tabelle 10: Zeitabhängiger Effekt von L-Methionin und Met-Tyr auf die Expression der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Densitometrische Auswertung. ECV304-Zellen wurden 2-8 Stunden mit L-Methionin (10 mM) oder Met-Tyr (300 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten.

Im Gegensatz dazu war nach 4stündiger Inkubation mit 3 mM L-Cystein eine 1,63fache signifikante HO-1-mRNA-Bildung im Northern-Blot-Experiment detektierbar. Die mRNA-Konzentration erhöhte sich mit zunehmender Inkubationsdauer und erreichte ihr Maximum im betrachteten Zeitraum nach 8 Stunden (Abb. 18).

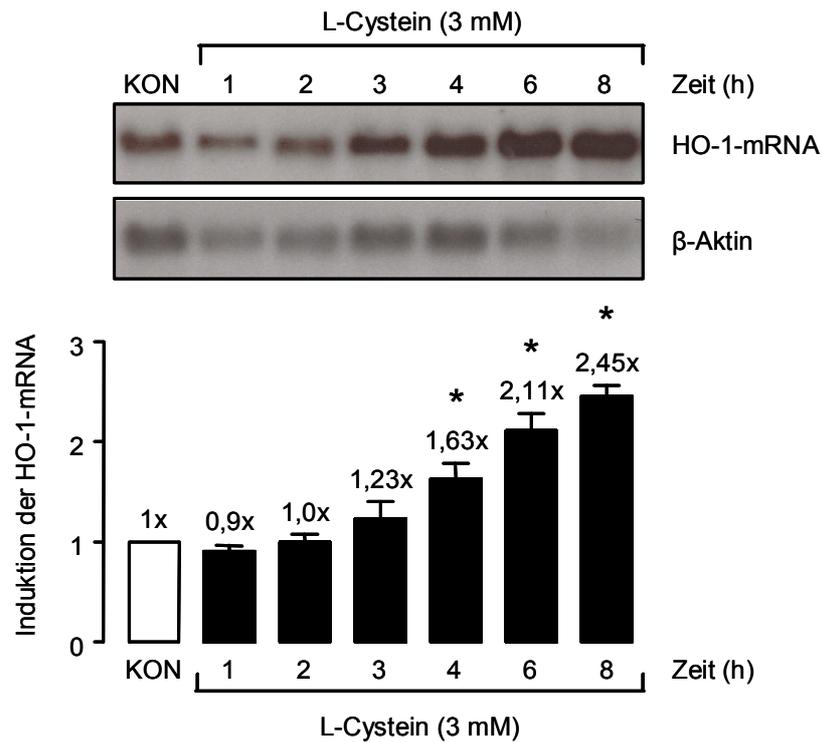


Abbildung 18: Zeitabhängiger Effekt von L-Cystein auf die Expression der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot mit densitometrischer Auswertung und β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 1-8 Stunden mit L-Cystein (3 mM) 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.

Bereits nach einer 3stündigen Inkubation mit 500 μ M SAM war eine signifikante, 2,41fache Steigerung der HO-1-mRNA-Bildung zu beobachten. Die maximale mRNA-Konzentration wurde im betrachteten Zeitraum ebenfalls nach 8 Stunden erreicht (Abb. 19).

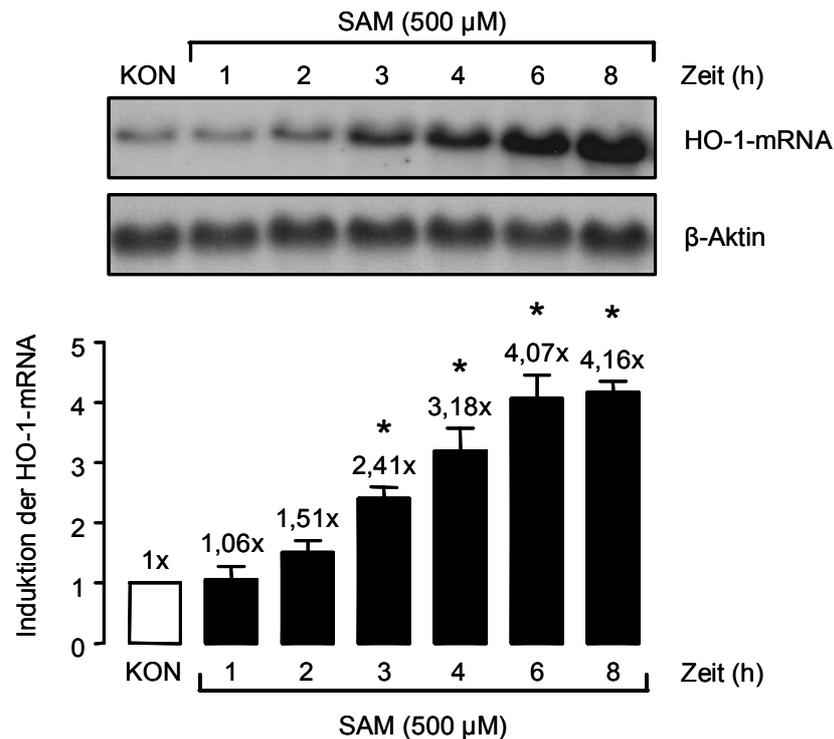


Abbildung 19: Zeitabhängiger Effekt von SAM auf die Expression der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot mit densitometrischer Auswertung und β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 1-8 Stunden mit SAM (500 μ M) 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.

4.3.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die freie Aminosäure L-Cystein als auch der Methylgruppendonator SAM in der Lage sind, die Transkription des HO-1-Gens in Endothelzellen konzentrations- und zeitabhängig zu aktivieren. Dabei sind die Verbindungen unterschiedlich potent. Bereits die Inkubation mit 50 μ M SAM führte zu einer signifikanten Induktion der HO-1-mRNA-Bildung. L-Cystein zeigte erst in einer Konzentration von 3 mM eine vergleichbar starke Stimulation. Die maximale Stimulation von durchschnittlich 4,2fach war mit 500 μ M SAM zu erreichen. Dagegen fiel die maximale 2,9fache Induktion durch L-Cystein bei einer Konzentration von 5 mM deutlich geringer aus. Diese Ergebnisse charakterisieren SAM in physiologisch relevanter Konzentration von 500 μ M als den stärkeren Induktor der HO-1-mRNA im Vergleich zu L-Cystein.

Die freie Aminosäure L-Methionin und das ACE-inhibitorische Dipeptid Met-Tyr zeigten keine Effekte auf die HO-1-mRNA-Bildung. Das bedeutet, dass die L-Methionin- und Met-Tyr-vermittelte HO-1-Induktion anders reguliert wird als die Induktion durch L-Cystein und SAM.

4.4 Stabilisierung der HO-1-mRNA

Trotz der deutlichen Proteininduktion bewirkten sowohl L-Methionin als auch Met-Tyr keine Induktion der HO-1 auf mRNA-Ebene (Tab. 9 und 10). Daher sollten die Effekte der beiden Substanzen auf die Stabilität der HO-1-mRNA untersucht werden.

Einige Studien belegen, dass Aminosäuren bestimmte Säugetier-Gene post-transkriptionell über eine Stabilisierung der mRNA regulieren (Rinehart et al. 1985; Kanamoto et al. 1987; Chen et al. 1992). Auch für endogenes NO, einem bekannten Induktor der HO-1, konnte eine solche post-transkriptionelle Komponente bei der Induktion der HO-1-Expression festgestellt werden (Hartsfield et al. 1997; Bouton et al. 2000).

4.4.1 Effekt von L-Methionin auf HO-1-mRNA-Stabilität

Für den Versuch zur RNA-Stabilität wurden die Zellen für 4 Stunden mit Cadmiumchlorid (10 μ M) vorinkubiert. Dadurch wurde ausreichend HO-1-mRNA gebildet. Anschließend erfolgte ein Wechsel des Mediums und die Endothelzellen wurden zeitgleich mit Aktinomycin D und L-Methionin (10 mM) für 2 bis 6 Stunden inkubiert. Aktinomycin D hemmt die Transkription, so dass keine neue mRNA nachgebildet werden kann. Die Induktion der HO-1-mRNA durch Cadmiumchlorid wurde zum Zeitpunkt Null als eins definiert.

In den L-Methionin-behandelten Zellen ist der HO-1-mRNA-Gehalt im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Aktinomycin D-Kontrollen höher. Der Abbau der HO-1-mRNA war für die Zeitpunkte 2 und 4 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Aktinomycin D-Kontrollen signifikant verringert (Abb. 20). Dies lässt auf eine Stabilisierung der HO-1-mRNA durch L-Methionin schließen.

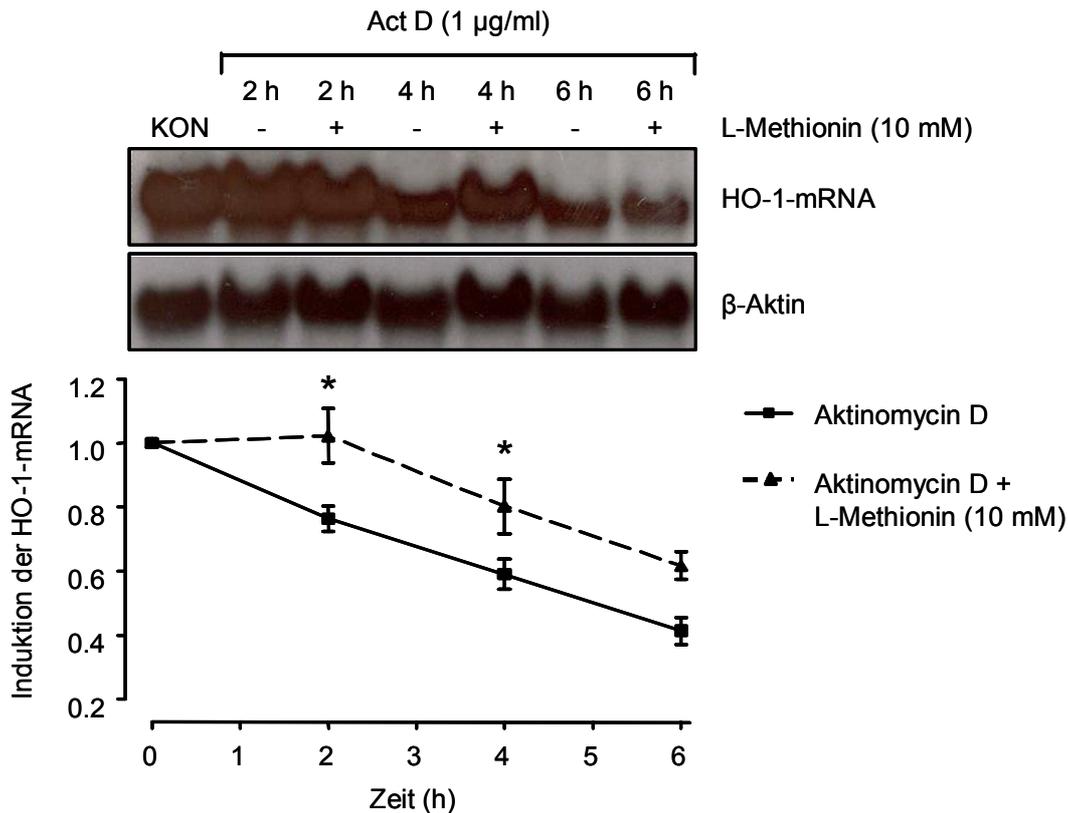


Abbildung 20: Effekt von L-Methionin auf HO-1-mRNA-Stabilität in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot mit densitometrischer Auswertung und β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 4 Stunden mit CdCl_2 (10 μM) vorbehandelt. Nach Auswaschen mit PBS wurde 15 Minuten mit Actinomycin D-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit L-Methionin (10 mM) für 2-6 Stunden. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.2 Effekt von Methionyl-Tyrosin auf HO-1-mRNA-Stabilität

Der Effekt von Met-Tyr (300 μM) auf die HO-1-mRNA-Stabilität wurde ebenfalls untersucht. Die Inkubation erfolgte analog zu der mit L-Methionin.

Auch Met-Tyr bewirkte unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Verlängerung der Halbwertszeit der HO-1-mRNA. Nach 4 und 6 Stunden war der HO-1-mRNA-Gehalt gegenüber den unbehandelten Aktinomycin D-Kontrollen signifikant höher (Abb. 21). Der Effekt der HO-1-mRNA-Stabilisierung trat schon bei Vorbehandlung der Endothelzellen mit 300 μM ein. Hingegen wurden 10 mM L-Methionin benötigt, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen. Generell war nach einer 6stündigen Vorbehandlung mit Met-Tyr die Menge an detektierter HO-1-mRNA größer als bei L-Methionin.

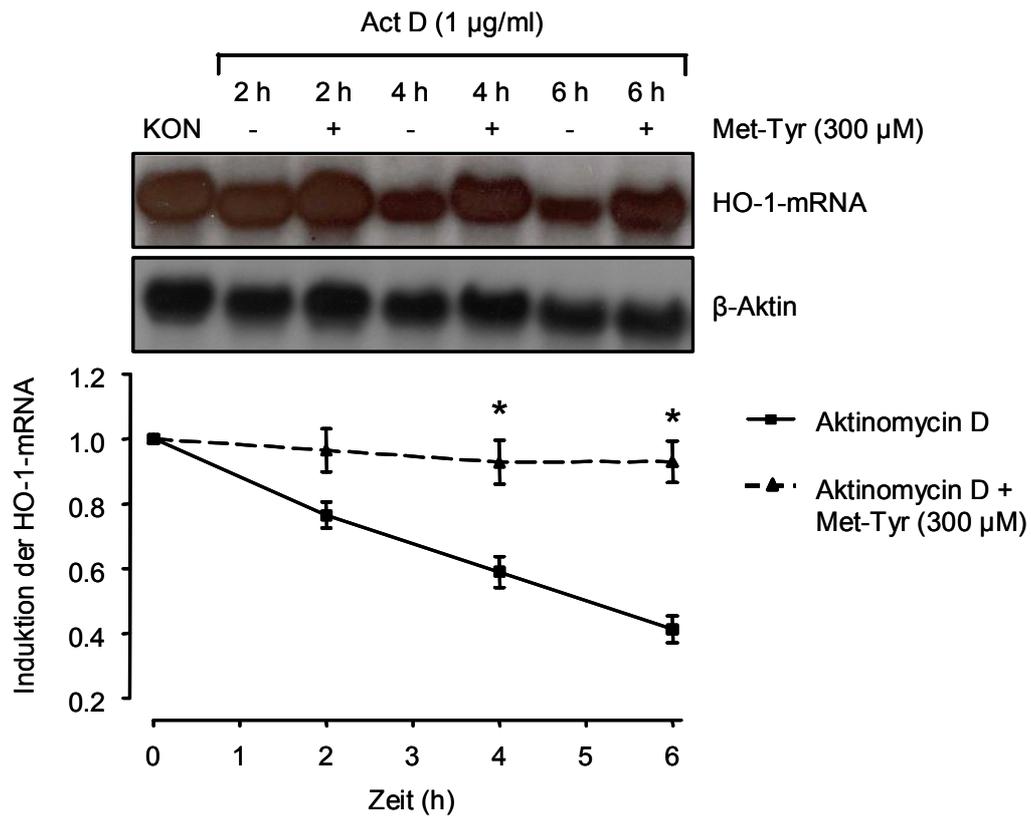


Abbildung 21: Effekt von Met-Tyr auf HO-1-mRNA-Stabilität in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot mit densitometrischer Auswertung und β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 4 Stunden mit CdCl_2 (10 μ M) vorbehandelt. Nach Auswaschen mit PBS wurde 15 Minuten mit Actinomycin D-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit Met-Tyr (300 μ M) für 2-6 Stunden. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation vs. Kontrolle; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.3 Effekt von L-Cystein auf HO-1-mRNA-Stabilität

Obwohl die bisherigen Ergebnisse auf eine transkriptionelle Regulierung der HO-1-Induktion durch L-Cystein deuten, sollte dennoch der Effekt von L-Cystein auf den HO-1-mRNA-Gehalt nach Hemmung der Transkription untersucht werden. Die Inkubation mit L-Cystein (5 mM) erfolgte analog zu der mit L-Methionin.

Eine Vorbehandlung der Endothelzellen mit L-Cystein bewirkte zwar eine geringe verlängerte Halbwertszeit der HO-1-mRNA im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Actinomycin D-Kontrollen, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant (Tab. 11).

Diese Versuche demonstrieren, dass die L-Cystein-induzierte Genaktivierung der HO-1 hauptsächlich transkriptionell und nicht post-transkriptionell reguliert wird.

KON	2 h -	2 h L-Cys	4 h -	4 h L-Cys	6 h -	6 h L-Cys
1	0,64 ± 0,09	0,75 ± 0,09	0,36 ± 0,06	0,48 ± 0,14	0,33 ± 0,12	0,36 ± 0,18

Tabelle 11: Effekt von L-Cystein auf die Stabilität der HO-1-mRNA.

Densitometrische Auswertung. ECV304-Zellen wurden 4 Stunden mit CdCl₂ (10 µM) vorbehandelt. Nach Auswaschen mit PBS wurde 15 Minuten mit Actinomycin D-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit L-Cystein (5 mM) für 2-6 Stunden. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten.

4.4.4 Zusammenfassung

Sowohl L-Methionin als auch Met-Tyr waren in der Lage, die durch Cadmiumchlorid induzierte HO-1-mRNA nach Hemmung der Transkription durch Actinomycin D zu stabilisieren. Eine Stabilisierung der HO-1-mRNA zeigte sich bereits mit 300 µM Met-Tyr, während ein ähnlicher Effekt erst mit 10 mM L-Methionin erreicht wurde. Diese Ergebnisse unterstreichen das bessere Dosis-Wirkungsverhältnis des Dipeptids Met-Tyr im Vergleich zur freien Aminosäure L-Methionin.

Die Aminosäure L-Cystein hatte keine signifikanten Auswirkungen auf den HO-1-mRNA-Gehalt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Induktion der HO-1 durch L-Cystein hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird.

4.5 HO-1-Genregulation

Die folgenden Versuche zur HO-1-Genregulation auf transkriptioneller Ebene wurden am Beispiel der Aminosäure L-Cystein durchgeführt. Weitere Hemmstoffexperimente finden sich in Kapitel 4.8.4.

4.5.1 Einfluss von Sauerstoffradikalen

Die HO-1 wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Agenzien induziert. Viele dieser Substanzen verursachen direkt oder indirekt oxidativen Stress (Choi et al. 1996; Foresti et al. 1999).

Am Beispiel von L-Cystein wurde untersucht, ob die Genaktivierung der HO-1 von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) abhängig ist. Die Superoxiddismutase (SOD) baut das Superoxidradikal zu Sauerstoff und dem weniger schädlichen Wasserstoffperoxid ab.

Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit SOD (15 U/ml) vorinkubiert. Im Anschluss wurde die Inkubation mit L-Cystein (1-5 mM) über 8 Stunden fortgesetzt.

Aus Abbildung 22 ist ersichtlich, dass eine Vorbehandlung mit SOD nur einen geringen Einfluss auf die HO-1-Induktion durch L-Cystein hatte. SOD zeigte keine Eigeneffekte.

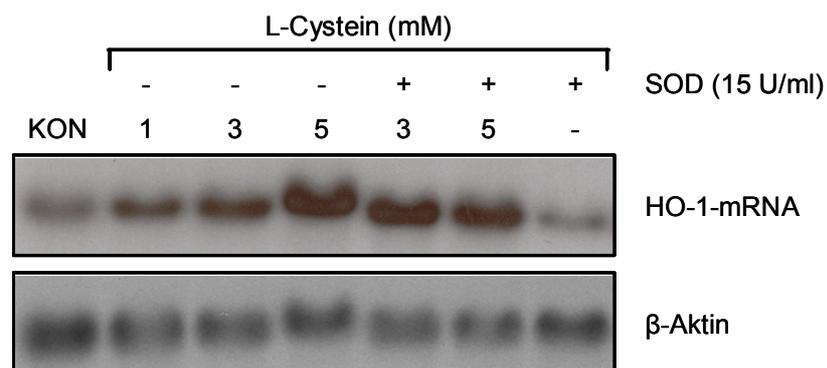


Abbildung 22: Effekt der SOD auf die L-Cystein-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot aus n=3-6 Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit SOD (15 U/ml) vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden mit L-Cystein (1-5 mM) inkubiert.

Diese Versuche demonstrieren, dass die L-Cystein-induzierte Genaktivierung der HO-1 nicht durch ROS vermittelt wird.

4.5.2 Einfluss von NO-abhängigen Stoffwechselwegen

In verschiedenen Zellmodellen für oxidativen Stress konnte für NO eine protektive Wirkung gezeigt werden (Yates et al. 1992; Wink et al. 1993; Struck et al. 1995). So ist NO nicht nur an der Inaktivierung von freien Sauerstoffradikalen beteiligt, sondern auch ein wesentlicher Induktor antioxidativer und antiapoptotischer Proteine wie z.B. der HO-1 und des Ferritins (Motterlini et al. 1996; Oberle et al. 1997; Polte et al. 2000; Grosser et al. 2003). Die Induktion der HO-1 kann sowohl in Abhängigkeit von cGMP als auch cGMP-unabhängig geschehen (Motterlini et al. 1996; Durante et al. 1997; Polte et al. 2000).

Zunächst wurde mit Hilfe des direkten NO-Radikalfängers 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (PTIO) eine mögliche NO-Abhängigkeit der L-Cystein-vermittelten HO-1-mRNA-Induktion untersucht. Durch PTIO wird NO zu Stickstoffdioxid oxidiert, welches sofort mit einem weiteren NO-Radikal zu Dinitrogentrioxid reagiert (Akaike et al. 1996). Dadurch wird dem System NO entzogen.

Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit PTIO (100 μ M) vorbehandelt. Anschließend wurde 8 Stunden mit L-Cystein (1-5 mM) inkubiert.

Bei Vorbehandlung der Endothelzellen mit PTIO war keine signifikante Hemmung der HO-1-Induktion zu beobachten (Abb. 23). PTIO besaß bei der angegebenen Konzentration keine Eigeneffekte auf die HO-1-mRNA-Bildung.

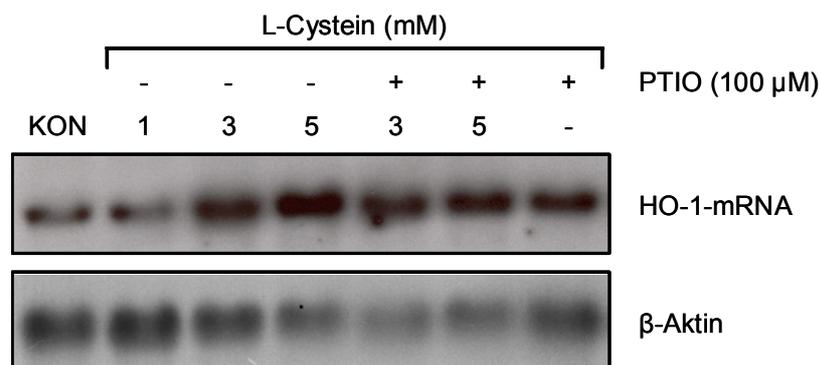


Abbildung 23: Effekt von PTIO auf die L-Cystein-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot aus n=3-6 Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit PTIO (100 μ M) vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden mit L-Cystein (1-5 mM) inkubiert.

Um eine Beteiligung von NO-Synthasen an der L-Cystein-abhängigen HO-1-mRNA-Induktion zu untersuchen, wurde ein Inhibitor der NO-Synthase verwendet. Derivate des L-Arginin, die wie der N^G-Nitro-L-arginin-methylester (L-NAME) am terminalen Guanidin-Stickstoff substituiert sind, können die NO-Synthasen reversibel oder irreversibel inhibieren. L-NAME ist ein irreversibler Hemmer der NO-Synthasen (Moncada et al. 1993; Knowles et al. 1994).

L-NAME (500 μ M) wurde 15 Minuten vor der 8stündigen Inkubation mit L-Cystein (1-5 mM) zu den Endothelzellen gegeben.

Bei Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem NOS-Inhibitor L-NAME war ebenfalls keine signifikante Hemmung der HO-1-Induktion erkennbar (Abb. 24). L-NAME zeigte in der verwendeten Konzentration keine Eigeneffekte.

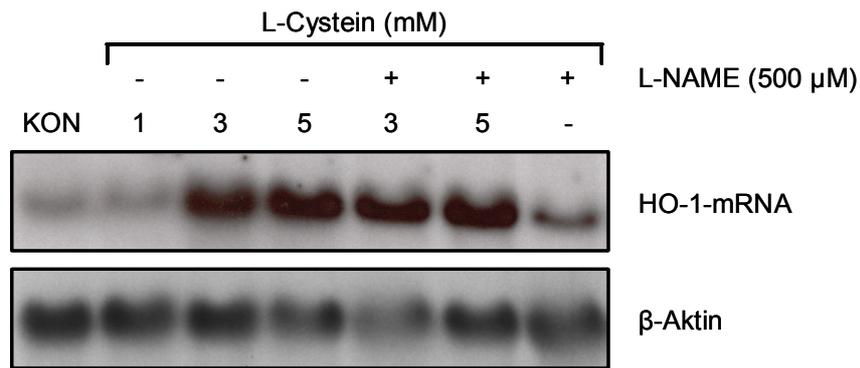


Abbildung 24: Effekt von L-NAME auf die L-Cystein-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot aus n=3-6 Einzelerperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit L-NAME (500 μ M) vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden mit L-Cystein (1-5 mM) inkubiert.

4.5.3 Einfluss von cGMP-abhängigen Stoffwechselwegen

Einige Studien zeigen, dass der *second messenger* cGMP an der NO-abhängigen Induktion der HO-1 beteiligt ist. So konnte eine Involvierung von cGMP über eine Aktivierung der Guanylatcyclase und der cGMP-abhängigen Proteinkinase G nachgewiesen werden (Immenschuh et al. 1998; Polte et al. 2000).

Um den Einfluss von cGMP auf die HO-1-Induktion durch L-Cystein zu untersuchen, wurde ein Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase verwendet. Der Hemmstoff 1-H-(1,2,4)-Oxadiazol-(4,3a)quinoxalin-1-on (ODQ) ist selektiv für die durch NO aktivierbare lösliche Guanylatcyclase. Andere Nukleotid-Synthasen wie die membranständige Guanylatcyclase oder die Adenylatcyclase werden nicht beeinflusst (Brunner et al. 1996; Olson et al. 1997).

Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit ODQ (10 μ M) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit L-Cystein (3-5 mM) inkubiert.

Aus Abbildung 25 ist ersichtlich, dass ODQ keinen Einfluss auf die L-Cystein-vermittelte HO-1-Induktion ausübte. ODQ zeigte keine Eigeneffekte. Das verwendete Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) hatte eine maximale Konzentration von 0,2 μ l/ml im Inkubationsansatz. In dieser Konzentration zeigte DMSO keine Eigeneffekte.

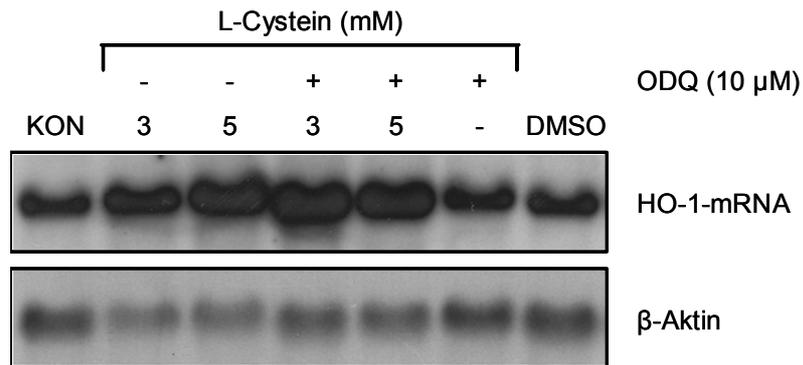


Abbildung 25: Effekt von ODQ auf die L-Cystein-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot aus n=3-6 Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit ODQ (10 μ M) vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden mit L-Cystein (3-5 mM) inkubiert.

4.5.4 Einfluss des Transkriptionsblockers Actinomycin D

Der Transkriptionshemmstoff Actinomycin D inhibiert die DNA-abhängige RNA-Synthese durch Interkalation in die DNA. Actinomycin D wurde eingesetzt, um zu untersuchen, ob für die L-Cystein-vermittelte HO-1-mRNA-Induktion eine *De-novo*-RNA-Synthese erforderlich ist.

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit Actinomycin D (1 μ g/ml) vorbehandelt. Im Anschluss folgte eine Inkubation mit L-Cystein (1-5 mM) über 8 Stunden.

Der Transkriptionsblocker hob die HO-1-Induktion durch L-Cystein nahezu vollständig auf (Abb. 26). Im Durchschnitt waren nur 10,7% der mRNA-Bildung feststellbar, die eine L-Cystein-Konzentration von 5 mM in nicht vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 28).

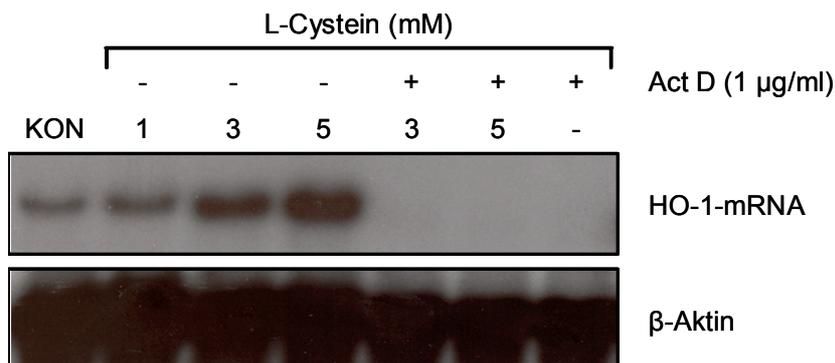


Abbildung 26: Effekt des Transkriptionsblockers Actinomycin D (Act D) auf die L-Cystein-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot aus n=3-6 Einzelexperimenten mit β -Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit Act D (1 μ g/ml) vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden mit L-Cystein (1-5 mM) inkubiert.

Dieses Ergebnis belegt, dass die HO-1-mRNA-Induktion durch L-Cystein abhängig von einer *De-novo*-RNA-Synthese ist und vermutlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird.

4.5.5 Einfluss des Translationsblockers Cycloheximid

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

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit CHX (5 µg/ml) vorbehandelt. Anschließend folgte eine 8stündige Inkubation mit L-Cystein (1-5 mM).

Bei Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem Translationsblocker Cycloheximid war ebenfalls eine signifikante Hemmung der HO-1-Induktion durch L-Cystein erkennbar, welche aber deutlich geringer ausgeprägt war als bei Verwendung des Transkriptioneninhibitors Actinomycin D (Abb. 27). Im Durchschnitt wurden nur noch 50,7% der HO-1-mRNA gebildet, die L-Cystein in einer Konzentration von 5 mM in nicht vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 28).

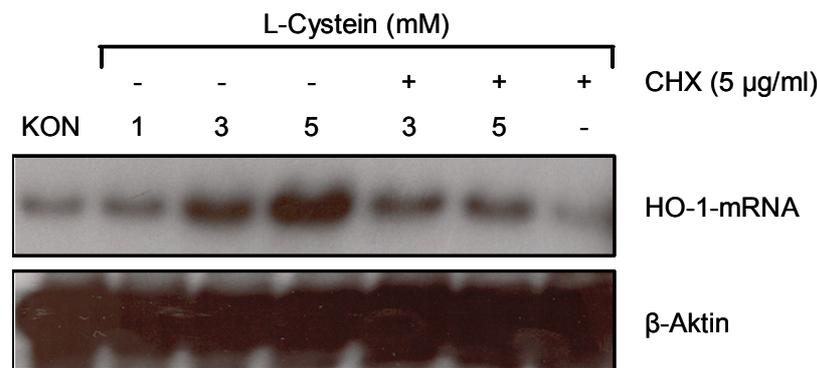


Abbildung 27: Effekt des Translationsblockers Cycloheximid (CHX) auf die L-Cystein-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern-Blot aus n=3-6 Einzelexperimenten mit β-Aktin-Kontrolle. ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit CHX (5 µg/ml) vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden mit L-Cystein (1-5 mM) inkubiert.

Dieses Ergebnis spricht für die Beteiligung von neu gebildeten Proteinen an der Genaktivierung der HO-1 durch L-Cystein. Die Notwendigkeit einer *De-novo*-Synthese lässt die Beteiligung so genannter *Immediate-early-response*-Gene vermuten. Dazu zählen beispielsweise Monomere des Transkriptionsfaktors AP-1, dessen Involvierung in die HO-1-Genaktivierung eine Reihe von Studien postuliert (Camhi et al. 1998; Elbirt et al. 1998; Terry et al. 1998; Kiemer et al. 2003).

4.5.6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genaktivierung der HO-1 durch L-Cystein in Endothelzellen zeigen, dass die Transkription weder über den L-Arginin-NO-Stoffwechsel noch durch ROS vermittelt wird. Der *second messenger* cGMP scheint bei der Induktion der HO-1-mRNA durch L-Cystein ebenfalls keine Rolle zu spielen.

Die L-Cystein-vermittelte HO-1-mRNA-Induktion wurde nahezu komplett durch den Transkriptionsblocker Actinomycin D inhibiert. Der Proteinsynthese-Hemmstoff Cycloheximid blockierte ebenfalls die HO-1-mRNA-Expression, jedoch in einem geringeren Ausmaß als Actinomycin D. Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung von neu gebildeten Proteinen an der Genaktivierung der HO-1 durch L-Cystein schließen sowie eine transkriptionelle Regulierung der HO-1-mRNA-Expression vermuten.

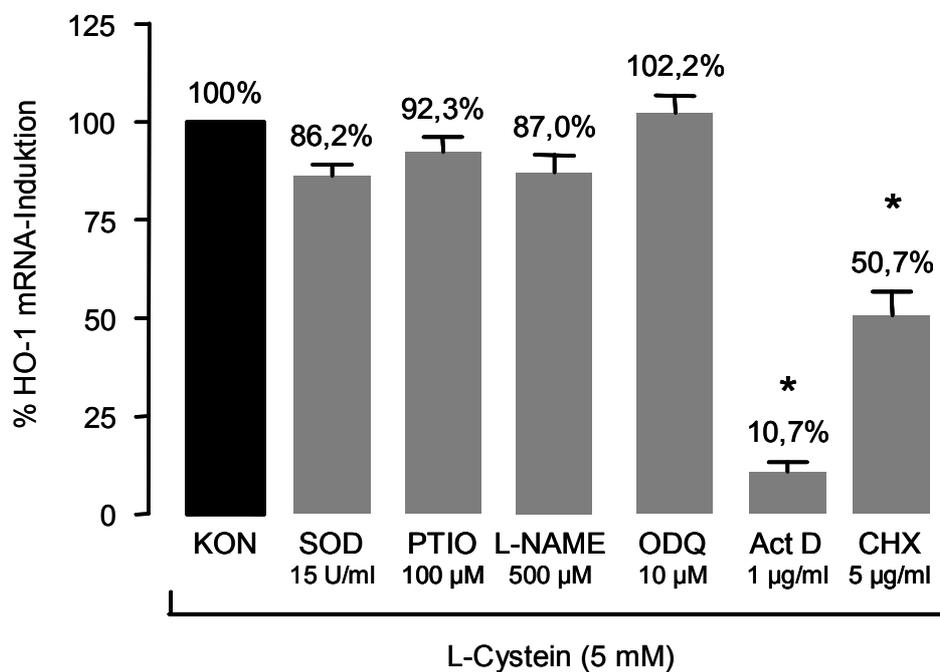


Abbildung 28: Effekte der eingesetzten Modulatoren auf die L-Cystein-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA in Endothelzellen.

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 Genreporter-Assay

Da die Genaktivierung der HO-1 hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (Shibahara et al. 1987; Alam et al. 1989; Takeda et al. 1994), wurde der Einfluss von L-Cystein und SAM auf die Aktivität von HO-1-Reportergergen-Konstrukten untersucht. Diese Konstrukte enthielten als Reportergergen die *Firefly*-Luciferase und wurden zunächst transient in Endothelzellen transfiziert.

4.6.1 Effekte am humanen HO-1-Promotor

Auf die Transfektion der Endothelzellen mit dem hHO-1-Reportergergen-Konstrukt folgte nach einer kurzen Nüchternphase die Inkubation mit L-Cystein (1-5 mM) oder SAM (100-500 μ M) über 24 Stunden. Die im Anschluss gemessene Luciferase-Aktivität korreliert mit der Aktivität des hHO-1-Promotors.

Sowohl die Inkubation mit L-Cystein als auch mit SAM führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der hHO-1-Promotor-Aktivität (Abb. 29). Für 5 mM L-Cystein konnte eine maximale 1,76fache Stimulation des hHO-1-Promotors im Vergleich zur basalen hHO-1-Promotor-Aktivität unbehandelter Zellen bestimmt werden. SAM führte bereits in einer Konzentration von 500 μ M zu einer vergleichbar starken Stimulation (1,85fach).

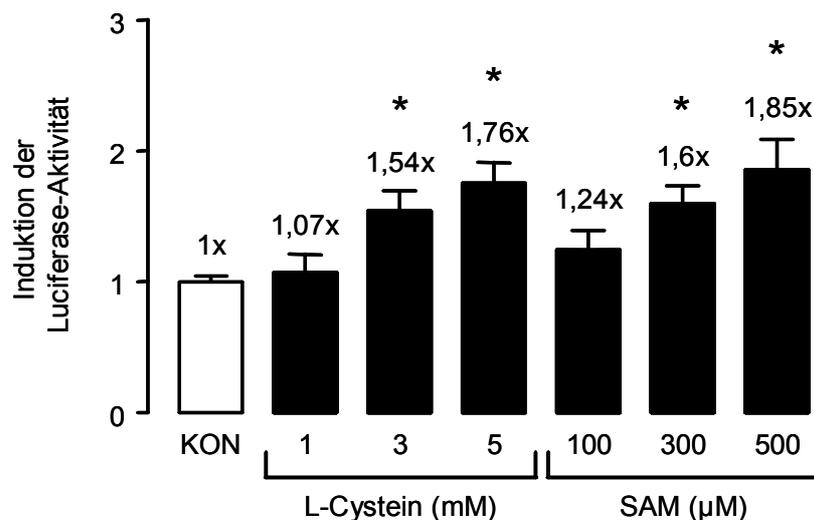


Abbildung 29: Effekt von L-Cystein und SAM auf die Luciferase-Aktivität in hHO-1-Reportergergen-transfizierten Endothelzellen.

Nach Transfektion und kurzer Nüchternphase wurden die ECV304-Zellen 24 Stunden mit L-Cystein (1-5 mM) und SAM (100-500 μ M) 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.

4.6.2 Effekte am Maus-HO-1-Promotor

Der Einfluss von L-Cystein und SAM auf die HO-1-Promotoraktivität wurde auch für einen HO-1-Promotor murinen Ursprungs untersucht. Die Transfektion, die Inkubation und die anschließende Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgten analog zu denen mit dem humanen HO-1- Reporter-gen-Konstrukt.

Eine Inkubation mit L-Cystein bzw. SAM führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der mHO-1-Promotor-Aktivität (Abb. 30). Bei der höchsten eingesetzten L-Cystein-Konzentration von 5 mM zeigte sich eine 1,98fache Aktivierung des mHO-1-Promotors. Bereits bei einer Konzentration von 500 μ M SAM war der signifikante Effekt einer 1,97fachen Stimulation der mHO-1-Promotor-Aktivität mit dem von L-Cystein (5 mM) vergleichbar stark ausgeprägt.

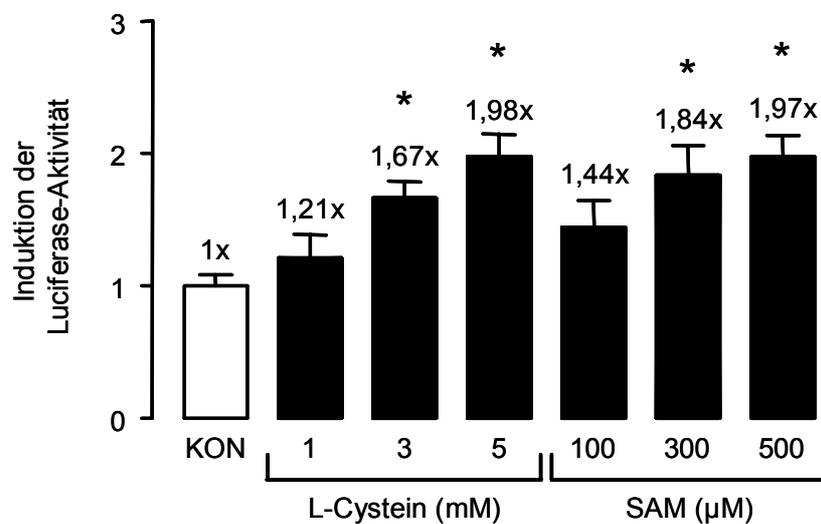


Abbildung 30: Effekt von L-Cystein und SAM auf die Luciferase-Aktivität in mHO-1-Reporter-gen-transfizierten Endothelzellen.

Nach Transfektion und kurzer Nüchternphase wurden die ECV304-Zellen 24 Stunden mit L-Cystein (1-5 mM) und SAM (100-500 μ M) 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 Zusammenfassung

Sowohl L-Cystein als auch SAM waren in der Lage, die Luciferase-Aktivität und somit auch die HO-1-Promotor-Aktivität für Reporter-gen-Konstrukte, die einen HO-1-Promotor enthielten, konzentrationsabhängig zu steigern. SAM erwies sich wiederum als potentere der beiden Verbindungen. Die Stärke der durchschnittlichen Induktion des humanen und murinen HO-1-Promotors durch 500 μ M SAM war in etwa der durch 5 mM L-Cystein vergleichbar.

Die Erhöhung der HO-1-Promotor-Aktivität unterstreicht die bisherigen Ergebnisse hinsichtlich der Induktion des HO-1-Gens auf Transkriptionsebene durch L-Cystein und SAM.

4.7 Bestimmung der HO-Aktivität

Durch die Bestimmung der HO-Aktivität sollte untersucht werden, ob eine 24stündige Inkubation mit Aminosäuren neben der HO-1-Proteininduktion auch zu einem katalytisch aktiven Enzym in Endothelzellen führen kann. Am Beispiel von L-Methionin und L-Cystein wurde die enzymatische Aktivität der HO im zellfreien System durch Messung der Bilirubin-Bildung bestimmt.

4.7.1 Effekt von L-Methionin auf die HO-Aktivität

Die Endothelzellen wurden 24 Stunden mit L-Methionin vorinkubiert und anschließend geerntet. Die Aufarbeitung und Bestimmung der Bilirubin-Menge erfolgte wie unter 3.5.2/3 beschrieben. Als Positivkontrolle des Systems wurde bei jeder Aktivitätsbestimmung auch Hämin (10 μ M) getestet. Als Häm-Analogon ist Hämin in der Lage, die HO zu aktivieren (Ergebnisse nicht dargestellt).

Zunehmende Konzentrationen von L-Methionin (5-20 mM) führten zu einer gesteigerten HO-Aktivität (Abb. 31). Eine signifikante Erhöhung der Bilirubin-Menge um ca. 40% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen war jedoch erst bei einer L-Methionin-Konzentration von 20 mM zu beobachten.

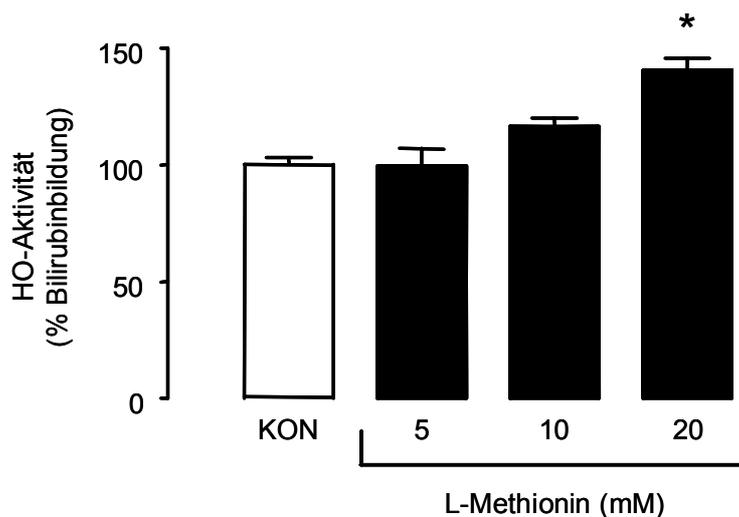


Abbildung 31: Effekt von L-Methionin auf die HO-Aktivität.

ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit L-Methionin (5-20 mM) 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.

Das eine signifikante Aktivierung der HO erst bei sehr hohen L-Methionin-Konzentrationen detektierbar war, liegt vermutlich an dem unvermeidlichen Sensitivitätsverlust der *Ex-vivo*-Messung im zellfreien System. Die durch L-Methionin induzierte HO wird während der komplexen Aufarbeitung des Zelllysats möglicherweise nicht vollständig wiedergewonnen.

4.7.2 Effekt von L-Cystein auf die HO-Aktivität

Als weitere Aminosäure wurde L-Cystein untersucht. Die Endothelzellen wurden mit L-Cystein (1-5 mM) über 24 Stunden inkubiert. Die Aufarbeitung und Inkubation zur Messung der Bilirubin-Spiegel wurde wie bei dem vorausgegangenen Versuch mit L-Methionin durchgeführt.

Auch eine 24stündige Vorbehandlung mit L-Cystein führte konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der HO-Aktivität (Abb. 32). Bereits bei einer Konzentration von 3 mM war eine signifikante Erhöhung der Bilirubin-Menge im Vergleich zu den Kontrollzellen detektierbar. Interessanterweise war die Stimulation der Bilirubin-Bildung durch 3 mM L-Cystein vergleichbar stark ausgeprägt wie durch 20 mM L-Methionin (40%ige Steigerung der HO-Aktivität). Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 5 mM L-Cystein war eine durchschnittlich 68%ige Steigerung der Bilirubin-Bildung und somit der HO-Aktivität messbar.

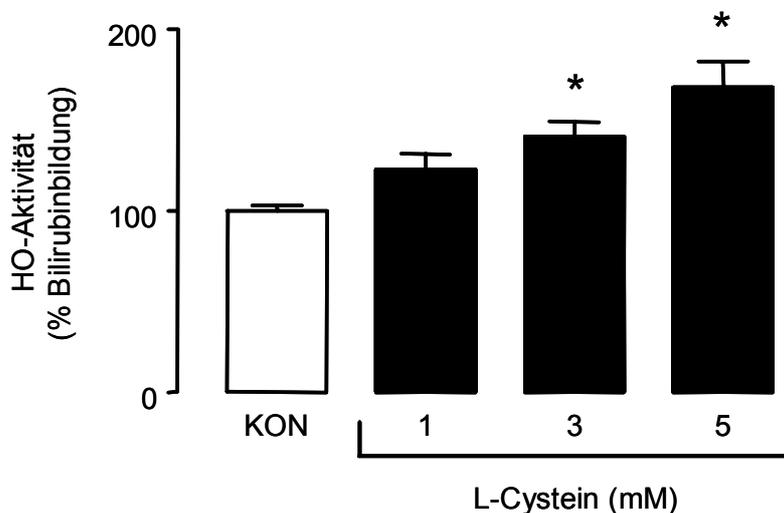


Abbildung 32: Effekt von L-Cystein auf die HO-Aktivität.

ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit L-Cystein (1-5 mM) 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.

4.7.3 Zusammenfassung

L-Methionin und L-Cystein führten in Endothelzellen zu einer Steigerung der HO-Aktivität. Die Effekte waren konzentrationsabhängig, wobei L-Cystein als der stärkere Aktivator der HO auftrat. Bereits mit 3 mM L-Cystein zeigte sich eine signifikante Aktivierung der HO, die erst mit 20 mM L-Methionin vergleichbar stark ausfiel. Die maximale HO-Aktivierung von durchschnittlich 168% war mit 5 mM L-Cystein zu erreichen.

4.8 Untersuchungen zur Cytoprotektion in einem Modell für oxidativen Stress

Parallel zur Charakterisierung der genomischen Effekte der Aminosäuren und deren Derivate wurden auch die möglichen funktionellen Konsequenzen einer Induktion von Stressproteinen untersucht. Dabei wurden die antioxidativen Eigenschaften der Testsubstanzen in einem Modell für oxidativen Stress bestimmt.

Die pathophysiologische Situation erhöhter Sauerstoffradikal-Spiegel wurde durch Inkubation von Endothelzellen mit NADPH hervorgerufen. Dadurch wird die NADPH-abhängige Oxidase zur Superoxid-Bildung angeregt (Griendling et al. 2000; Guzik et al. 2000). Die NADPH-abhängige Oxidase zählt neben der Xanthin-Oxidase zu den im Entzündungsgeschehen hochregulierten Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren (Terry et al. 1998).

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

4.8.1 Antioxidative Effekte von Aminosäuren und deren Derivaten in Endothelzellen

Um den Einfluss der Induktion antioxidativer Proteine wie der HO-1 durch Aminosäuren und deren Derivate zu untersuchen, wurden die Endothelzellen mit L-Methionin sowie dessen biologisch aktive Form SAM 24 Stunden vorinkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, um eventuelle direkte, radikalfangende Substanzeffekte auszuschließen. Anschließend wurden die resuspendierten Zellen mit NADPH (100 μ M) und Lucigenin (50 μ M) 20 Minuten inkubiert und vermessen.

Nach 24stündiger Vorinkubation der Endothelzellen reduzierte L-Methionin den ROS-Spiegel konzentrationsabhängig (Abb. 33). Mit einer L-Methionin-Konzentration von 10 mM zeigte sich eine signifikante Reduktion detektierbarer ROS um etwa 20% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Mit 20 mM L-Methionin waren nur noch etwa 70% des ROS-Spiegels detektierbar, den NADPH in nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte.

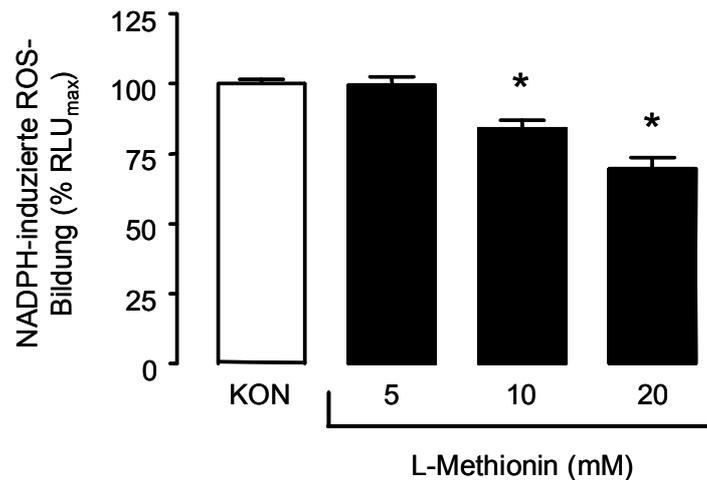


Abbildung 33: Effekt von L-Methionin auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit L-Methionin (5-20 mM) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μ M) und Lucigenin (50 μ M) 20 Minuten inkubiert und vermessen. 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.

Interessanterweise führte eine 24stündige Vorinkubation mit SAM (10-50 μ M) schon im mikromolaren Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Reduktion der Superoxidbildung. Erste Effekte waren ab 10 μ M SAM sichtbar. Die maximal erreichbare Radikalsenkung um durchschnittlich 33% wurde mit 50 μ M SAM erreicht (Abb. 34). Höhere Konzentrationen erbrachten keine weitere Reduktion der ROS-Spiegel (ohne Abbildung).

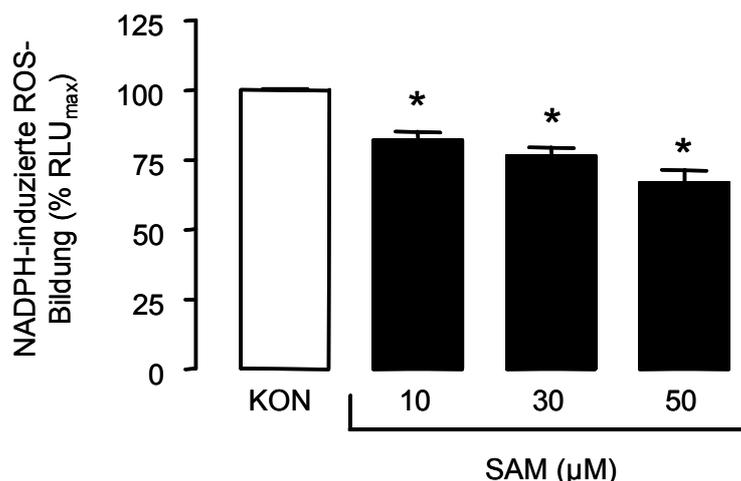


Abbildung 34: Effekt von SAM auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit SAM (10-50 μ M) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μ M) und Lucigenin (50 μ M) 20 Minuten inkubiert und vermessen. 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.

Eine 24stündige Vorinkubation mit dem bioaktiven Peptid Met-Tyr senkte die ROS-Spiegel in Endothelzellen ebenfalls konzentrationsabhängig nach Stimulation der Superoxidbildung mit NADPH (Abb. 35). Im Vergleich zur freien Aminosäure L-Methionin führten schon geringere Konzentrationen im Bereich von 30-300 μM zu einer signifikanten Reduktion der ROS-Spiegel. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 300 μM Met-Tyr war eine etwa 35%ige Reduktion des ROS-Spiegels zu beobachten.

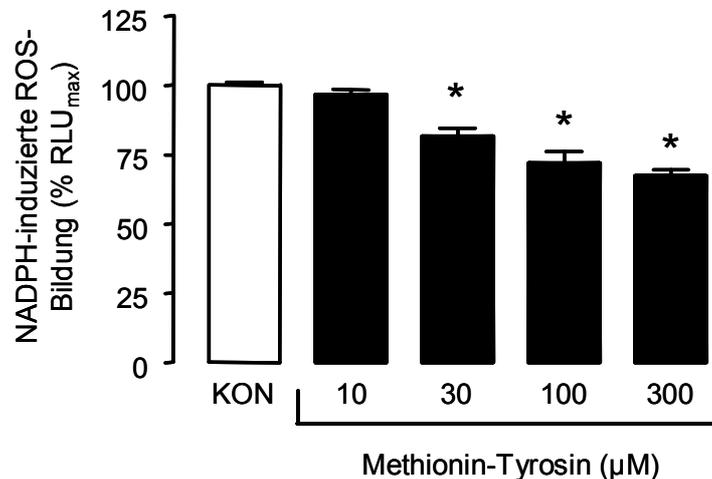


Abbildung 35: Effekt von Met-Tyr auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit Met-Tyr (10-300 μM) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 20 Minuten inkubiert und vermessen. 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.

Auch im Modell für oxidativen Stress zeigten die freien Aminosäuren L-Methionin und L-Tyrosin allein oder in Kombination im mikromolaren Konzentrationsbereich (300 μM) keine signifikanten Effekte (Tab. 12). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen zur HO-1-Proteinexpression. Sie heben die Bedeutung der peptidischen Bindung bei der spezifischen Wirkung von Met-Tyr hervor bzw. deuten auf bestimmte strukturelle Merkmale des Dipeptids hin.

NADPH-KON	Met-Tyr (300 μM)	L-Met (300 μM)	L-Tyr (300 μM)	L-Met (300 μM) + L-Tyr (300 μM)
100,0 \pm 0,82	71,52 \pm 1,86*	100,3 \pm 3,03	98,34 \pm 2,38	96,7 \pm 3,17

Tabelle 12: Effekt von L-Methionin und L-Tyrosin einzeln und in Kombination im mikromolaren Konzentrationsbereich auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen im Vergleich zu Met-Tyr.

ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Substanzen (300 μM) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 20 Minuten inkubiert und vermessen. 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.

Nach einer Vorinkubation der Endothelzellen mit dem klassischen ACE-Inhibitor Captopril (300 μM) und dem ACE-inhibitorischen Peptid Met-Phe (300 μM) sowie dem Dipeptid Met-Met (300 μM) konnten keine signifikanten Effekte auf die ROS-Konzentration beobachtet werden (Tab. 13). Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen zur Induktion des HO-1-Proteins und unterstreicht die spezifische Wirkung von Met-Tyr unabhängig von einer ACE-Hemmung.

NADPH-KON	Met-Tyr (300 μM)	Captopril (300 μM)	Met-Phe (300 μM)	Met-Met (300 μM)
100,0 \pm 0,82	72,41 \pm 1,83*	95,17 \pm 4,91	97,05 \pm 1,55	96,98 \pm 1,89

Tabelle 13: Effekt des ACE-Hemmers Captopril, des ACE-inhibitorischen Dipeptids Met-Phe und des Dipeptids Met-Met im mikromolaren Konzentrationsbereich auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen im Vergleich zu Met-Tyr.

ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Substanzen (300 μM) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 20 Minuten inkubiert und vermessen. 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.

4.8.2 Einfluss des HO-1-Metaboliten Bilirubin

Um eine mögliche Beteiligung der HO-1 an den antioxidativen Effekten der getesteten Substanzen zu analysieren, wurde der Einfluss des HO-1-Metaboliten Bilirubin auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen untersucht.

Die für die HO-1 beschriebene antioxidative Wirkung wird vor allem dem Metaboliten Bilirubin zugeschrieben. Eine Reihe von Studien charakterisieren Bilirubin *in vitro* und *in vivo* als direktes Antioxidans (Stocker et al. 1987; Dore et al. 1999; Clark et al. 2000).

Die Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und wie unter 3.6.1 beschrieben geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit NADPH (100 μM), Lucigenin (50 μM) und Bilirubin (1-100 μM) 20 Minuten inkubiert und vermessen.

Bilirubin wirkte in Endothelzellen konzentrationsabhängig antioxidativ. Ab 10 μM eingesetzter Konzentration war eine signifikante Reduktion des ROS-Spiegels festzustellen. Eine Bilirubin-Konzentration von 100 μM reduzierte die ROS-Bildung nahezu vollständig. Der ROS-Spiegel wurde um 85% im Vergleich zu unbehandelten, NADPH-stimulierten Zellen annähernd auf das Niveau nicht-stimulierter Kontrollzellen gesenkt (Abb. 36).

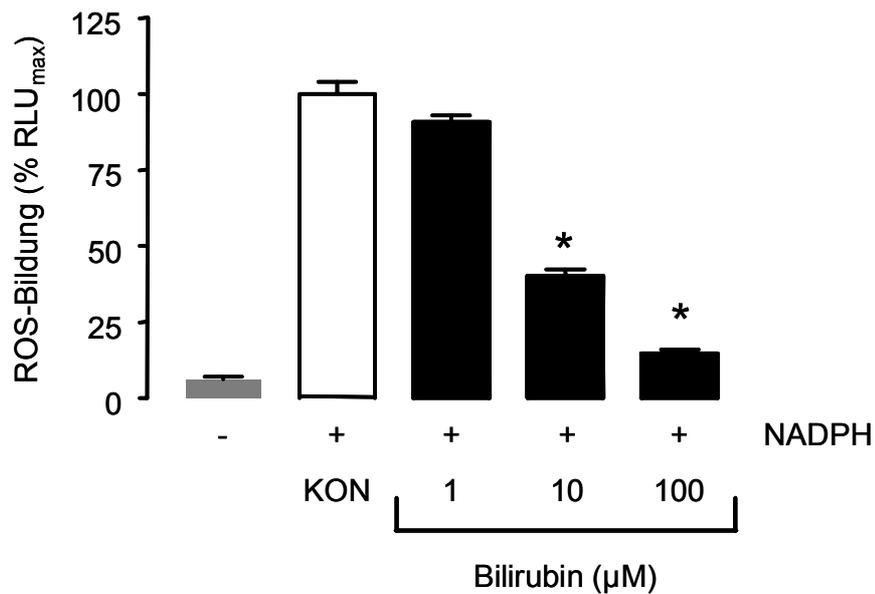


Abbildung 36: Direkter Effekt von Bilirubin auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit Bilirubin (1-100 μM), NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 20 Minuten inkubiert und vermessen. 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.

4.8.3 Einfluss eines Hämoxigenase-Inhibitors auf die antioxidative Wirkung der getesteten Substanzen

Da die antioxidative Wirkung bei allen getesteten Substanzen erst nach einer 24stündigen Inkubation mit anschließendem Auswaschen auftrat, kann die Radikalsenkung nicht allein auf einem direkten radikalfangenden Substanzeffekt beruhen. Die Ergebnisse sprechen für eine Stimulation antioxidativer Stoffwechselwege.

Mit Zink-Bisglykolporphyrin (ZnBG) steht ein selektiver Hemmstoff der Hämoxigenase zur Verfügung (Appleton et al. 1999). Durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit ZnBG sollte der Frage nachgegangen werden, ob die antioxidativen Effekte der unter 4.8.1 getesteten Substanzen ursächlich auf eine Induktion der HO-1 zurückzuführen sind. Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit ZnBG (1 μM) vorbehandelt und anschließend mit L-Methionin (20 mM), SAM (500 μM) oder Met-Tyr (300 μM) über 24 Stunden inkubiert.

Die Versuche mit ZnBG zeigen eine signifikante Aufhebung der antioxidativen Effekte von L-Methionin, SAM und Met-Tyr in Endothelzellen durch Hemmung der HO-Aktivität (Abb. 37). Diese Ergebnisse belegen eindeutig einen kausalen Zusammenhang zwischen der HO-1-Induktion und den beobachteten antioxidativen Effekten von Aminosäuren bzw. bioaktiven Peptiden.

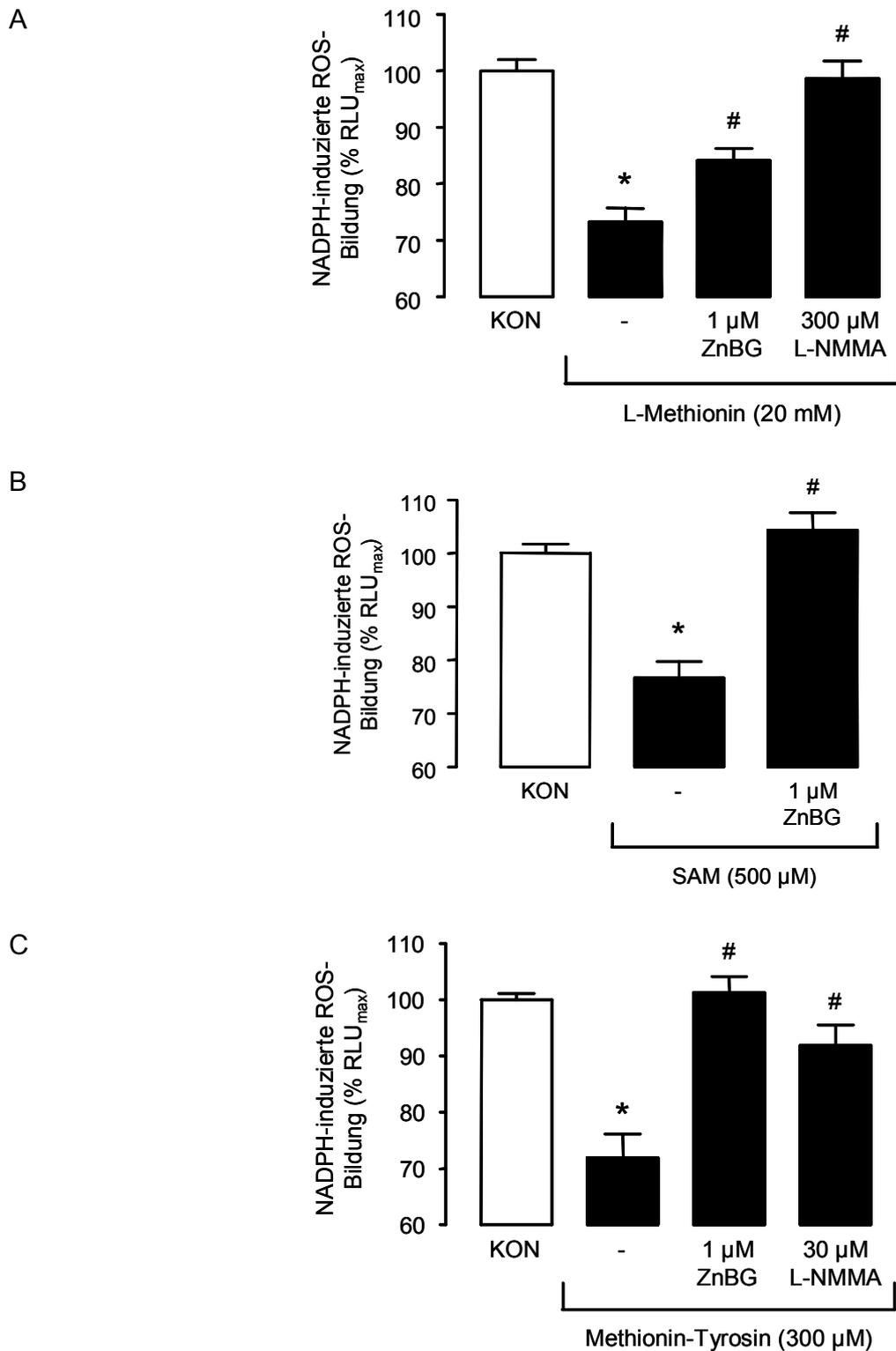


Abbildung 37: Einfluss des HO-Inhibitors ZnBG und des NOS-Inhibitors L-NMMA auf die Reduktion der NADPH-induzierten ROS-Bildung durch L-Methionin (A), SAM (B) und Met-Tyr (C).

ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit ZnBG (1 μM) bzw. L-NMMA (30-300 μM) vorbehandelt und anschließend 24 Stunden mit L-Methionin (20 mM), SAM (500 μM) oder Met-Tyr (300 μM) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 20 Minuten inkubiert und vermessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± 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.

4.8.4 Einfluss eines NO-Synthase-Inhibitors auf die antioxidative Wirkung der getesteten Substanzen

Weiterhin wurde der Einfluss von NO, einem potenten Induktor der HO-1, an der L-Methionin- und Met-Tyr-vermittelten zellprotektiven Wirkung untersucht. Ein reversibler Inhibitor der NO-Synthase (L-NMMA) wurde eingesetzt, um eine Beteiligung von NO-Synthasen an der antioxidativen Wirkung von L-Methionin und Met-Tyr zu prüfen.

L-NMMA (30-300 μ M) wurde 15 Minuten vor der 24stündigen Inkubation mit L-Methionin (20 mM) bzw. Met-Tyr (300 μ M) zu den Endothelzellen gegeben.

Der radikalsenkende Effekt von L-Methionin und Met-Tyr wurde durch NOS-Hemmung mit L-NMMA komplett aufgehoben (Abb. 37). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid an der L-Methionin- und Met-Tyr-abhängigen Radikalsenkung hin.

4.8.5 Zusammenfassung

Sowohl L-Methionin und dessen biologisch aktive Form SAM als auch das bioaktive Dipeptid Met-Tyr zeigten in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress indirekte antioxidative Wirkungen. Nach 24stündiger Vorinkubation mit anschließendem Auswaschen reduzierten die Aminosäuren und deren Derivate den Anstieg der Sauerstoffradikal-Konzentration bei Stimulation der NADPH-Oxidase. Wiederum erwiesen sich SAM und Met-Tyr als die potenteren der getesteten Verbindungen.

Eine Inkubation mit den freien Aminosäuren L-Methionin und L-Tyrosin (einzeln und in Kombination) im mikromolaren Bereich zeigte keinen Effekt im Zellkulturmodell für oxidativen Stress. Diese Befunde unterstreichen die bisherigen Ergebnisse für das bioaktive Dipeptid Met-Tyr.

Eine 24stündige Inkubation von Endothelzellen mit dem klassischen ACE-Inhibitor Captopril und dem ACE-inhibitorischen Peptid Met-Phe sowie dem Dipeptid Met-Met führte zu keiner signifikanten Reduktion der ROS-Spiegel in NADPH-stimulierten Zellen. Der antioxidative Effekt von Met-Tyr scheint unabhängig von seiner ACE-inhibitorischen Wirkung aufzutreten und für dieses Dipeptid spezifisch zu sein.

Der HO-1-Metabolit Bilirubin zeigte im Modell für oxidativen Stress konzentrationsabhängige antioxidative Effekte. Dieser Befund dokumentiert, dass HO-1-Metaboliten unter den gewählten Bedingungen als Mediatoren der erzielten Effekte in Frage kommen.

Mit Hilfe des Hämoxxygenase-Inhibitors ZnBG konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der HO-1-Induktion durch Aminosäuren bzw. deren Derivate und deren antioxidative Wirkungen festgestellt werden.

Versuche mit dem NOS-Inhibitor L-NMMA lassen vermuten, dass die HO-1-induzierten antioxidativen Wirkungen von L-Methionin und Met-Tyr über eine Aktivierung des L-Arginin-NO-Stoffwechselwegs vermittelt werden.

5 Diskussion

Reaktive Sauerstoffspezies sind an der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems beteiligt. Neben Atherosklerose, myokardialer Ischämie und Herzinsuffizienz, wird oxidativer Stress heute als pathogener Faktor bei verschiedenen Krebsarten, Autoimmun- und neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. Einigen Nahrungsbestandteilen wird zusätzlich zur nutritiven Bedeutung zunehmend eine funktionelle Relevanz bei der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen zugesprochen. Insbesondere in den Mittelmeerländern kommen aufgrund der dort vorherrschenden Ernährungsweise im Vergleich zu Nord- und Mitteleuropa Herz-Kreislauf-Erkrankungen bedeutend seltener vor. Die traditionelle mediterrane Kost ist besonders reich an Seefisch und an pflanzlichen Lebensmitteln wie Brot, Teigwaren, Gemüse, Salat, Hülsenfrüchte, Obst und Nüssen. Dem gegenüber steht ein geringer Verzehr von rotem Fleisch. Ein moderater Genuss von Wein ist ebenfalls ein Charakteristikum der mediterranen Lebensweise. Im Rahmen der *Lyon Diet Heart Study* konnte unter mediterraner Diät eine ca. 70%ige Reduktion der Todesrate bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit gezeigt werden (de Lorgeril et al. 1994; Renaud et al. 1995; de Lorgeril et al. 1999). Die kardio- und gefäßprotective Wirkung der Diät wird der erhöhten Zufuhr von Vitaminen, Ballaststoffen, ungesättigten Fettsäuren und sekundären Pflanzenstoffen zugeschrieben. Auch Proteine bzw. kleinere Peptide können an den protectiven Effekten beteiligt sein (Davignus et al. 1997).

Freie Aminosäuren, bioaktive Peptide ebenso wie Proteinhydrolysate tierischen und pflanzlichen Ursprungs haben in einer Vielzahl von Testsystemen antioxidative und damit potenziell antiatherogene Eigenschaften gezeigt (FitzGerald et al. 2000; Rival et al. 2001; Takenaka et al. 2003). Insbesondere schwefelhaltige Aminosäuren und deren Stoffwechselprodukte üben über bisher nicht vollständig identifizierte Mechanismen zellprotective Effekte aus (Selvam et al. 1991; Pisarenko 1996; Rasilainen et al. 2002; Slyshenkov et al. 2002; Caro et al. 2004).

Im Hinblick auf mögliche zellschützende Eigenschaften gewinnen auch bioaktive Peptide zunehmend an Interesse. Bioaktive Peptide sind sowohl in pflanzlicher als auch in tierischer Nahrung zu finden. Sie entstehen während der Verdauung oder der Lebensmittelherstellung, können resorbiert werden und *in vivo* unterschiedlichste Wirkungen zeigen. In Abhängigkeit von ihrer Aminosäuresequenz können sie z.B. opioidartig, immunmodulatorisch, antioxidativ oder antihypertensiv wirken (Meisel 1997; Kitts et al. 2003; Korhonen et al. 2003; Meisel et al. 2003; FitzGerald et al. 2004; Vercruyse et al. 2005). Oftmals zeigen bioaktive Peptide dabei pleiotrope Eigenschaften. Peptide, die z.B. aus dem Casein gewonnen wurden, zeigten immunmodulatorische, opioidartige und ACE-inhibitorische Effekte. Einige Peptide mit opioidder Wirkung konnten zusätzlich über eine ACE-Hemmung antihypertensiv wirken (Korhonen et al. 2003). Auch für endogene Antioxidanzien wie Glutathion (Glutamyl-cysteinyl-glycin) und Carnosin (β -Alanyl-histidin) konnten zumindest *in vitro* ACE-inhibitorische Effekte nachgewiesen werden (Hou et al. 2003). Umgekehrt werden klassische ACE-Inhibitoren in der Literatur auch als antioxidativ beschrieben (Chopra et al. 1992; Hayek et al. 1998; van der Giet et al. 2002).

Über die genauen Mechanismen der antioxidativen Wirkungen von Aminosäuren und ihren Derivaten sowie von Oligopeptiden ist bislang nur wenig bekannt. Neben einem direkten Radikalfang und einer Chelatierung von Metallionen wird auch die gezielte Aktivierung endogener antioxidativer Mechanismen als potenzielles Wirkprinzip diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die protectiven Wirkungen der schwefelhaltigen Aminosäuren L-Methionin, S-Adenosylmethionin (SAM) und L-Cystein in Abhängigkeit von der Induktion und Aktivierung zellschützender Proteine untersucht werden. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf die antioxidativ wirksamen Proteine

Hämoxygenase-1 (HO-1) und Ferritin.

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse wurde die Induktion der HO-1- und Ferritin-Proteinsynthese untersucht. Die Aminosäuren L-Methionin, L-Cystein und SAM stimulierten die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig. Die getesteten Aminosäuren waren dabei unterschiedlich potent. SAM zeigte bereits im mikromolaren Konzentrationsbereich signifikante Induktionen des HO-1-Proteins.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Befunden, die belegen, dass die HO-1 eine mögliche Zielstruktur für Aminosäuren bzw. kleinere Peptide darstellt. Das atriale natriuretische Peptid (ANP), bestehend aus 28 Aminosäuren, konnte cGMP-abhängig das HO-1-Protein in Epithelzellen induzieren. Als Folge dessen kam es zu einer Verminderung der cytotoxischen Wirkung von Cyclosporin A (Polte et al. 2002). Die Aminosäure L-Alanin stimulierte die HO-1-Proteinexpression in Endothelzellen. Als mögliche funktionelle Konsequenz der vermehrten HO-1-Bildung reduzierte L-Alanin die endotheltoxische Wirkung von Wasserstoffperoxid (Grosser et al. 2004c). Weitere Ergebnisse belegen, dass die Aminosäurederivate Acetylcarnitin (Calabrese et al. 2005) und Betain (Lordnejad et al. 2001) sowie verschiedene Taurin-Derivate (Olszanecki et al. 2004) ebenfalls die Expression des HO-1-Gens beeinflussen können. In Tierversuchen induzierte die Aminosäure Glutamin die HO-1 im Darm von Ratten, was mit einer Protektion des intestinalen Gewebes gegenüber endotoxischen bzw. Strahlenschäden einherging (Uehara et al. 2005; Giris et al. 2006).

Jüngere Studien zeigen, dass auch andere Naturstoffe in der Lage sind, die HO-1 zu induzieren. Zu den bekannten Verbindungen gehören vorwiegend Polyphenole pflanzlichen Ursprungs wie z.B. Kaffeesäurephenylester (Scapagnini et al. 2002), Curcumin (Motterlini et al. 2000; Hill-Kapturczak et al. 2001; Balogun et al. 2003), Carnosol (Martin et al. 2004) und Resveratrol (Juan et al. 2005). Weiterhin konnten Allylsulfide (Chen et al. 2004; Gong et al. 2004), die charakteristischen Inhaltsstoffe der Allium-Arten (Knoblauch, Bärlauch usw.), sowie Gerbstoffe (Choi et al. 2002) als natürlich vorkommende Induktoren der HO-1 identifiziert werden. Einige der genannten Verbindungen werden unter mediterraner Diät vermehrt zugeführt.

In der HOPE-Studie konnte gezeigt werden, dass eine Langzeittherapie mit einem ACE-Hemmer die Prognose von Patienten verbessert, bei denen kardiovaskuläre Riskofaktoren oder eine manifeste Atherosklerose vorlagen (Yusuf et al. 2000). Als zugrunde liegender Mechanismus wird eine Verbesserung der Endothelfunktion diskutiert. ACE-Hemmer inhibieren nicht nur die Bildung des Vasokonstriktors Angiotensin II, sondern auch den Abbau des Vasodilatators Bradykinin. Bradykinin entfaltet seine vasodilatatorische Wirkung über die endotheliale Freisetzung von NO, EDHF (*endothelium derived hyperpolarisation factor*) und Prostacyclin (Zhang et al. 1997; Chen et al. 2003). Neben ihrer blutdrucksenkenden Wirkung weisen klassische ACE-Inhibitoren auch ein antioxidatives Potenzial auf (Chopra et al. 1992; Hayek et al. 1998; van der Giet et al. 2002). So hemmen sie die Angiotensin II-induzierte Aktivierung der gefäßständigen NAD(P)H-Oxidase. Dadurch wird die Inaktivierung von NO durch Sauerstoffradikale verhindert und so dessen Bioverfügbarkeit gesteigert. Ob auch eine Induktion von Proteinen wie HO-1 und Ferritin, die die Zellen vor Schädigungen durch Sauerstoffradikale schützen, zur antioxidativen Wirkung von ACE-Hemmern beiträgt, ist noch ungeklärt.

Viele Studien belegen, dass ACE-inhibitorische Peptide nach oraler Gabe resorbiert werden und anschließend signifikant den Blutdruck senken (Matsufuji et al. 1995; Kawasaki et al. 2000; Sipola et al. 2001). Ähnlich wie klassische ACE-Inhibitoren könnten sie antioxidative Wirkungen zeigen.

Das ACE-inhibitorische Dipeptid Methionyl-Tyrosin (Met-Tyr), das aus dem Muskelfleisch von Sardinen isoliert wurde (Matsufuji et al. 1994), erwies sich als potenter Induktor der

HO-1 in Endothelzellen. Bereits eine Konzentration von 100 μM führte nach 24stündiger Vorinkubation zu einer signifikanten, 4,3fachen Induktion des HO-1-Proteins. Im Gegensatz dazu war eine zehnfach höhere Konzentration von L-Methionin nötig, um einen in etwa gleich starken Effekt zu erzielen. Die maximale Stimulation der HO-1-Proteinexpression wurde mit einer Konzentration von 300 μM erreicht. Im Vergleich zur freien Aminosäure L-Methionin zeigte Met-Tyr ein deutlich besseres Dosis-Wirkungsverhältnis. Eine Inkubation der Endothelzellen mit den freien Aminosäuren L-Methionin und L-Tyrosin sowohl einzeln als auch in Kombination zeigte in Konzentrationen von 300 μM keinen signifikanten induktiven Effekt auf die HO-1-Proteinbildung. Eine Metabolisierung des Dipeptids zu den freien Aminosäuren und ein anschließender Synergieeffekt von L-Methionin und L-Tyrosin scheinen daher ausgeschlossen zu sein.

Die Befunde sprechen für eine verstärkte Wirkung von Aminosäuren, wenn sie in einer peptidischen Verbindung vorliegen, und decken sich mit ähnlichen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Alabovskiy et al. 1997; Ririe et al. 2000; Takenaka et al. 2003). Das antioxidativ wirkende Dipeptid Carnosin beispielsweise kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Lipidperoxidation und die oxidative Modifizierung von Proteinen hemmen. Die freien Aminosäuren β -Alanin und L-Histidin hingegen zeigten keine antioxidativen Wirkungen. Die Autoren dieser Studie wiesen daher der Peptidbindung eine relevante Funktion für die antioxidative Aktivität von Carnosin zu (Nagasawa et al. 2001). Möglicherweise tragen auch spezifische strukturelle Merkmale innerhalb des Dipeptids Met-Tyr zu einer Verbesserung der Wirksamkeit bei.

Freie Aminosäuren werden durch gruppenspezifische Aminosäure-Transporter im Darm resorbiert. Als eine der essentiellen Aminosäuren wird L-Methionin üblicherweise im größten Ausmaß aufgenommen (Webb 1990). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mengen von L-Methionin stimmen mit Plasmaspiegeln überein, die nach erhöhter Aufnahme von L-Methionin bzw. Methionin-reichen Diäten erzielt werden können (van Guldener et al. 1999). Ein Teil des L-Methionins aus der Nahrung wird in L-Cystein umgewandelt (Transsulfuration, Abb. 2). Die Versorgung des Körpers mit adäquaten Mengen an schwefelhaltigen Aminosäuren ist für eine normale Funktion besonders wichtig. Ratten, die mit proteinarmer Diät gefüttert wurden, zeigten einen verringerten Glutathion-Gehalt in Lunge und Leber sowie eine größere Anfälligkeit gegenüber oxidativen Einflüssen. Eine Anreicherung der proteinarmen Diät mit L-Methionin oder L-Cystein wirkte vorbeugend gegen oxidative Schäden. Es kam zu einer Normalisierung der Glutathionmengen (Deneke et al. 1983; Fanburg et al. 1988; Hunter et al. 1994). Glutathion, das in bestimmten Zellkompartimenten in Konzentrationen von bis zu 10 mM vorliegen kann (Schafer et al. 2001), übernimmt im Körper auch die Funktion eines Cystein-Speichers. Extrazelluläres L-Cystein ist relativ instabil und wird daher von den meisten Zellen schnell aufgenommen, um entweder in Form von Glutathion gespeichert oder in Proteine eingebaut zu werden. Die in den Versuchen verwendeten L-Cystein-Mengen liegen im Bereich der intrazellulären L-Cystein-Konzentrationen, die für den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glutathionsynthese erforderlich sind (Lu 1999).

Exogen zugeführtes SAM ist stabil gegenüber den Verdauungsenzymen und kann daher intakt resorbiert werden. Jedoch ist die Bioverfügbarkeit verringert, da SAM einem großen *First-pass*-Effekt unterliegt (Kaye et al. 1990). Ungeachtet dessen belegen Studien, dass SAM nach oraler Gabe antiinflammatorische und analgetische Wirkungen zeigt (Stramentinoli 1987). Die SAM-Konzentrationen, die in der vorgelegten Arbeit in den Versuchen verwendet wurden, stimmen mit Konzentrationen überein, die unter physiologischen Bedingungen die Cystathionin- β -Synthase aktivieren (Finkelstein et al. 1975).

Peptide können im Darm parazellulär oder transzellulär resorbiert werden. So werden 30-50% des Stickstoffbedarfs durch Resorption von kleinen Peptiden gedeckt. Dabei ist

die Resorbierbarkeit umgekehrt proportional zur Kettenlänge (Roberts et al. 1999). Dennoch werden kleine Peptide schneller aufgenommen als freie Aminosäuren (Gardner 1982; Webb 1990). Große wasserlösliche Peptide werden parazellulär durch die *tight junctions* zwischen den Enterozyten resorbiert. Eher fettlösliche Peptide sind in der Lage, durch transzelluläre Diffusion die Darmbarriere zu überwinden. Für größere Proteinfragmente besteht weiterhin die Möglichkeit der Endocytose. Für Di- und Tripeptide stehen außerdem spezifische Peptidtransporter (z.B. PepT1 und PepT2) zur Verfügung (Leibach et al. 1996; Yang et al. 1999). Sowohl Tier- als auch Humanstudien belegen, dass ACE-inhibitorische Peptide nach oraler Gabe intakt resorbiert werden können. Anschließend entfalten sie *in vivo* ihre blutdrucksenkenden Effekte (Matsufuji et al. 1995; Kawasaki et al. 2000; Sipola et al. 2001). Die verwendeten Met-Tyr-Konzentrationen lagen im Bereich des IC₅₀-Wertes (193 µM) für eine ACE-Hemmung (Matsufuji et al. 1994).

Parallel zur Charakterisierung der genomischen Effekte von Aminosäuren und deren Derivaten wurden auch die möglichen funktionellen Konsequenzen einer Induktion von Stressproteinen untersucht. Dabei wurden die cytoprotektiven Eigenschaften am Beispiel von L-Methionin, SAM und Met-Tyr in einem Modell für oxidativen Stress bestimmt. Unter Verwendung eines Lucigenin-vermittelten Chemilumineszenz-Assays wurde die Wirkung der Testsubstanzen auf die NADPH-induzierte Sauerstoffradikalbildung gemessen. Die radikal mindernde Wirkung wurde erst nach mehrstündiger Vorinkubation und Auswaschen der Substanzen beobachtet und kann daher nicht die Folge eines direkten radikalfangenden Effekts der Substanzen sein. Dies deutet darauf hin, dass indirekte intrazelluläre Prozesse an der antioxidativen Wirkung beteiligt sind.

Eine Minderung der Radikalbildung wurde ebenfalls erzielt, wenn eine direkte Inkubation mit dem HO-1-Produkt Bilirubin durchgeführt wurde. Daher könnten unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Metaboliten der HO-1, insbesondere jedoch Bilirubin, als Mediatoren der antioxidativen Wirkungen der Aminosäuren und deren Derivate fungieren. Der protektive Effekt Bilirubins im gewählten Testsystem zeigte sich im Bereich physiologischer Konzentrationen. Die eingesetzten Konzentrationen lagen dabei im oberen Referenzintervall für Bilirubin-Plasmaspiegel, die sich in Humanstudien als präventiver Faktor für die koronare Herzkrankheit zeigte (Mayer 2000).

Mit Hilfe des selektiven HO-Hemmstoffs ZnBG konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der antioxidativen Wirkung von L-Methionin, SAM und Met-Tyr und der HO-1-Induktion durch diese Substanzen festgestellt werden. Zumindest ein Teil der radikalsenkenden Wirkungen von L-Methionin, SAM und Met-Tyr wurde durch den Hemmstoff aufgehoben. Zudem war in allen untersuchten Testsystemen (HO-1-/Ferritinexpression, HO-Aktivität, Radikalreduktion) die Konzentrationsabhängigkeit der Substanzeffekte nahezu identisch, was ebenfalls eine kausale Verknüpfung vermuten lässt.

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der beobachteten Radikalsenkung wurden Experimente mit einem spezifischen Hemmstoff des L-Arginin-NO-Stoffwechselwegs durchgeführt. Sowohl die L-Methionin- als auch die Met-Tyr-abhängige Radikalsenkung wurden durch den NOS-Inhibitor L-NMMA nahezu vollständig inhibiert. Da die HO-1 und auch Ferritin als funktionell relevante Zielstrukturen von NO identifiziert werden konnten (Durante et al. 1997; Oberle et al. 1997), ist es wahrscheinlich, dass die antioxidativen Effekte von L-Methionin und Met-Tyr auf einer NO-abhängigen Induktion des HO-1/Ferritin-Systems beruhen.

Im Modell für oxidativen Stress erwies sich Met-Tyr im Vergleich zu L-Methionin ebenfalls als potentere Verbindung. Die freien Aminosäuren L-Methionin und L-Tyrosin (einzeln und in Kombination) zeigten unter den Versuchsbedingungen keinen Effekt auf die NADPH-vermittelte ROS-Bildung.

Da L-Methionin alleine ein schwacher Induktor der HO-1 und in peptidischer Verbindung

deutlich potenter ist, wurden neben Met-Tyr weitere Methionin-haltige Dipeptide wie Methionyl-Methionin (Met-Met) und Methionyl-Phenylalanin (Met-Phe) untersucht. Außerdem sollte getestet werden, ob die Induktion der HO-1 ein Gruppeneffekt für ACE-Inhibitoren darstellt. Eine Inkubation von Endothelzellen mit dem ACE-inhibitorischen Peptid Met-Phe, welches ebenfalls aus Sardinen isoliert wurde (Matsufuji et al. 1994), und dem klassischen ACE-Inhibitor Captopril sowie dem Dipeptid Met-Met führte zu keiner Reduktion der NADPH-vermittelten Radikalbildung im Vergleich zu Met-Tyr. Ein vergleichbar negatives Ergebnis zeigte sich auch in Bezug auf die Induktion des HO-1-Proteins.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die HO-1-Induktion durch Met-Tyr unabhängig von der ACE-inhibitorischen Wirkung auftritt und für dieses Dipeptid spezifisch ist.

Da sich die C-terminalen Aminosäuren der beiden getesteten ACE-inhibitorischen Dipeptide nur durch eine phenolische OH-Gruppe unterscheiden, stellt sich die Frage, warum Met-Tyr im Gegensatz zu Met-Phe in der Lage ist, die Proteinexpression der HO-1 zu induzieren. Hinsichtlich der ACE-inhibitorischen Aktivität postulierten Cheung und Mitarbeiter, dass Dipeptide mit C-terminalem Tyrosin-Rest effektiver als Dipeptide mit C-terminalem Phenylalanin-Rest sind (Cheung et al. 1980). Dies trifft für die in dieser Arbeit untersuchten Dipeptide nicht zu. Die *in vitro* für eine ACE-Hemmung bestimmte IC_{50} -Konzentration von Met-Phe ist mit 44,7 μM geringer als die von Met-Tyr (193 μM) (Matsufuji et al. 1994). Oftmals korrelieren die *in vitro* bestimmte ACE-inhibitorische Aktivität (als IC_{50}) und die *in vivo* gezeigten antihypertensiven Effekte jedoch nicht miteinander. Diese Diskrepanz kann zunächst durch eine unterschiedliche Bioverfügbarkeit der bioaktiven Peptide nach oraler Gabe erklärt werden. Um *in vivo* wirken zu können, müssen die ACE-inhibitorischen Peptide intakt resorbiert werden. Suetsuna und Mitarbeiter fanden heraus, dass Dipeptide mit C-terminalem Tyrosin-Rest nach oraler Gabe den systolischen Blutdruck in hypertensiven Ratten länger anhaltend senkten als Dipeptide mit C-terminalem Phenylalanin-Rest. Dipeptide mit C-terminalem Phenylalanin-Rest führten zwar zu einer schnellen Blutdrucksenkung, welche aber von kürzerer Dauer war (Suetsuna 1998). Viele Verbindungen zeigen *in vivo* eine stärkere blutdrucksenkende Wirkung, als ihre *in vitro* bestimmte ACE-inhibitorische Aktivität vermuten lässt (Fujita et al. 1999; Vermeirssen et al. 2004). Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass bioaktive Peptide zusätzlich zur ACE-Hemmung auch durch andere Effekte antihypertensiv wirken können, wie z.B. durch Inhibierung der Chymase (Yamamoto et al. 1999) oder durch Stimulierung der Prostaglandin-Synthese (Furushiro et al. 1993). Durch eine HO-1-Induktion gebildetes CO könnte ebenfalls zur Vasodilatation und somit zur Blutdrucksenkung beitragen (Coceani 2000). Die HO-1-Induktion durch Met-Tyr scheint aufgrund der vorliegenden Daten unabhängig von der ACE-inhibitorischen Wirkung aufzutreten. Dennoch könnten spezifische strukturelle Merkmale innerhalb des Dipeptids, die relevant für eine ACE-Hemmung sind, auch für die zusätzliche antioxidative und zellprotektive Wirkung verantwortlich sein.

Im Vergleich zu synthetischen ACE-Inhibitoren wie Captopril ($IC_{50} = 6 \text{ nM}$) sind die bioaktiven Peptide trotz geringerer ACE-inhibitorischer Aktivität *in vivo* ebenso potent hinsichtlich ihrer blutdrucksenkenden Effekte (Suetsuna 1998; Vermeirssen et al. 2004). Als mögliche Gründe werden eine höhere Gewebeaffinität und eine langsamere Eliminierung der Peptide im Gegensatz zu synthetischen Verbindungen diskutiert (Fujita et al. 1999). Außerdem könnten wie bereits erwähnt auch andere Mechanismen neben einer ACE-Hemmung zur Blutdrucksenkung beitragen (Furushiro et al. 1993; Yamamoto et al. 1999; Wu et al. 2001).

Trotz ihrer effektiven blutdrucksenkenden Wirkung zeigen die bioaktiven Peptide keine Nebenwirkungen (FitzGerald et al. 2000). Da im Gegensatz dazu die Therapie mit ACE-Hemmern oftmals mit schweren Nebenwirkungen verbunden ist (Reizhusten, Hautausschläge, Angioödem usw.), eröffnen ACE-inhibitorische Peptide möglicherweise Alternativen bei der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen.

Die Induktion der HO-1 war für L-Methionin und L-Cystein auch auf der Ebene der katalytischen Aktivität messbar. Nach Inkubation mit den Testsubstanzen kam es im Zelllysats zur vermehrten Bildung von Bilirubin, einem HO-Produkt mit nachgewiesener antioxidativer Wirkung. Allerdings waren signifikante Effekte erst mit höheren Konzentrationen erreichbar. L-Methionin zeigte sogar erst ab 20 mM einen signifikanten Anstieg der HO-Aktivität. Verantwortlich dafür könnte der unvermeidliche Verlust der Sensitivität bei dieser *Ex-vivo*-Messung der spezifischen Enzymaktivität im zellfreien System sein. Die induzierte HO kann nicht vollständig während der komplexen Aufarbeitung des Lysats aus den intakten Zellen isoliert werden (Motterlini et al. 1996).

Die Freisetzung von CO ist ein weiterer Stoffwechselweg - neben Bilirubin-Bildung und Ferritin-Induktion - über den die HO-1 zellprotektive Effekte vermitteln kann. CO kommt aufgrund seiner vasodilatierenden, antiinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften eine zentrale Bedeutung bei der Vermittlung vasoprotektiver Effekte zu (Maines 1997; Coceani 2000; Otterbein et al. 2000b).

Unnikrishnan und Mitarbeiter konnten für L-Methionin eine antiinflammatorische Aktivität nachweisen (Unnikrishnan et al. 1990). Die zugrunde liegenden Mechanismen waren jedoch nicht bekannt. Eine vermehrte CO-Bildung aufgrund einer L-Methionin-vermittelten HO-1-Induktion könnte daher die antiinflammatorische Wirkung erklären.

Durch HO-1 endogen gebildetes CO entfaltete im Tiermodell eine schmerzhemmende Wirkung (Steiner et al. 2001). Eine Stimulation der HO-1 in Endothelzellen, die mit dem HO-1-Gen transfiziert waren, bewirkte eine Abnahme der Cyclooxygenase-Aktivität. Infolge dessen wurde die Bildung von Schmerz-vermittelnden Prostaglandinen verringert (Haider et al. 2002). SAM stimuliert die Synthese von Proteoglykanen in den Chondrozyten und wirkt analgetisch. Es könnte daher bei entzündlichen, degenerativen Gelenkerkrankungen (Arthrosen) eingesetzt werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Analgesie sind bisher noch nicht geklärt. Die HO-1-vermittelte Bildung von CO könnte für die analgetische Wirkung von SAM verantwortlich sein. Die Induktion der HO-1 durch SAM könnte auch eine Erklärung für die bessere Verträglichkeit von SAM im Vergleich zu den nichtsteroidalen Antirheumatika bieten. SAM zeigte im Gegensatz zu den nichtsteroidalen Antirheumatika kaum gastrointestinale Nebenwirkungen (di Padova 1987; König 1987; Maccagno et al. 1987; Soeken et al. 2002).

Im Vergleich zu L-Methionin ist SAM die potentere Verbindung sowohl in Bezug auf die Induktion des HO-1-Proteins als auch in Bezug auf die radikalsenkenden Eigenschaften. Die SAM-vermittelten Effekte waren bereits im mikromolaren Konzentrationsbereich detektierbar. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass SAM als Sulfoniumverbindung reaktiver als L-Methionin ist. Möglicherweise trägt auch der Adenosinrest zur verstärkten Wirkung von SAM bei. In der Medizin wird Adenosin als Antiarrhythmikum eingesetzt (Nagelhout 1992; Wilbur et al. 1997). Es wirkt vasodilatatorisch, vermutlich über eine gesteigerte NO- und Prostaglandin-Synthese (Marshall 2000; Ray et al. 2002; Wierema et al. 2005), und hemmt die Thrombozytenaggregation (Paul et al. 1990; Kitakaze et al. 1991). Bei Entzündungen wird Adenosin vermehrt freigesetzt und kann über Purinozeptoren antiinflammatorisch wirken (Kowaluk 1998; Linden 2006; Rogachev et al. 2006). Adenosin scheint die entzündungshemmenden Wirkungen von Ketamin und Methotrexat zu vermitteln (Cronstein et al. 1994; Mazar et al. 2005). Außerdem gibt es erste Hinweise darauf, dass Adenosin in der Lage ist, eine HO-1-Induktion in Macrophagen zu bewirken. Dadurch könnte Adenosin ebenfalls zur Regulierung von Entzündungsprozessen beitragen (Haschemi et al. 2005).

Die in vielen biologischen Systemen beschriebene Kopplung von HO-1- und Ferritinexpression konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. L-Methionin, L-Cystein und Met-Tyr führten sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig zu einer Stimulierung der Ferritinsynthese. Die Induktion des Ferritinproteins erfolgte dabei im

gleichen Konzentrationsbereich wie die Induktion des HO-1-Proteins. Allerdings war eine signifikante Stimulation erst nach 24stündiger Vorbehandlung mit den jeweiligen Substanzen zu beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass die Stimulierung der Ferritinsynthese durch L-Methionin, L-Cystein und Met-Tyr hauptsächlich die Folge einer HO-1-Induktion sowie der daraus resultierenden Beeinflussung des Eisenstoffwechsels ist.

Das Dipeptid Met-Tyr war auch in Bezug auf die Ferritinprotein-Bildung deutlich potenter als die freie Aminosäure L-Methionin.

Ferritin wird vorwiegend auf translationaler Ebene reguliert (Zahringer et al. 1976), wobei der wichtigste physiologische Stimulus der Ferritinsynthese freies Eisen ist (Theil 1987; White et al. 1988). In Anwesenheit von Eisen wird die in Monosomen gespeicherte Ferritin-mRNA in Form von Polysomen gebunden und verstärkt translatiert (Rogers et al. 1987). Die Translation wird ermöglicht, indem freies cytosolisches Eisen an das endogene Repressorprotein (*iron responsive protein*, IRP) bindet. Das IRP dissoziiert daraufhin von der Ferritin-mRNA und führt somit zur Initiation der Translation (Leibold et al. 1992).

Neben einer Aktivierung eisengenerierender Prozesse (HO-1-Induktion) können aber auch andere Mechanismen an der Ferritin-Induktion beteiligt sein. So kann die Induktion der Ferritinproteinsynthese in Abhängigkeit vom Zelltyp durch NO aktiviert werden (Kim et al. 1995; Yee et al. 1996). Dabei wird eine Interaktion von NO mit cytosolischem Eisen diskutiert. NO ist in der Lage freies und proteingebundenes Eisen zu binden (Henry et al. 1991; Cooper 1999). Darüber hinaus kann es den Eisenmetabolismus und die zelluläre Eisenaufnahme beeinflussen (Mulero et al. 1999). Über eine Erhöhung des freien zellulären Eisenspiegels könnte NO daher die Ferritintranslation stimulieren. In der vorliegenden Arbeit konnte zumindest für L-Methionin und Met-Tyr eine NO-Beteiligung an den protektiven Effekten nachgewiesen werden. Daher könnten die zuvor genannten Mechanismen zumindest teilweise zur L-Methionin-/Met-Tyr-induzierten Ferritinsynthese beitragen.

Weiterhin sind L-Methionin und L-Cystein in der Lage, Metallionen zu chelatieren (Quinlan et al. 1998; Bourdon et al. 2005). Es wäre daher denkbar, das L-Methionin und L-Cystein als Eisenkomplexe mit dem Repressorprotein interagieren und so die Dissoziation des IRP von der Ferritin-mRNA beschleunigen.

Als wichtige Signaltransmitter, insbesondere im kardiovaskulären System, gelten die beiden endogen gebildeten Gase NO und CO. Es gibt jedoch vermehrt Hinweise darauf, dass außer NO und CO auch Schwefelwasserstoff (H_2S) zur Gruppe der gasförmigen Botenstoffe zu zählen ist (Abe et al. 1996; Navarra et al. 2000; Beltowski 2004). Endogenes H_2S wird aus L-Cystein in Abhängigkeit von Vitamin B_6 durch die Enzyme Cystathionin- β -Synthase (CBS) und Cystathionin- γ -Lyase (CSE) gebildet (Abb. 2). CBS ist für die H_2S -Bildung im Gehirn verantwortlich, CSE generiert H_2S vorwiegend im kardiovaskulären System. Unter physiologischen Bedingungen wird H_2S kaum akkumuliert und zeigt daher auch keine toxischen Effekte. Die physiologischen H_2S -Konzentrationen im Gehirn werden mit 50-160 μM angegeben, aber auch im vaskulären Gewebe kann H_2S in messbaren Mengen (ca. 46 μM) produziert werden (Wang 2002). H_2S scheint eine funktionelle Rolle im kardiovaskulären System einzunehmen.

H_2S interagiert direkt mit den glatten Gefäßmuskelzellen, indem es cGMP-unabhängig K_{ATP} -Kanäle öffnet. Es kommt zur Vasorelaxation und somit zur Blutdrucksenkung (Zhao et al. 2001). Außerdem hemmt es die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (Leffler et al. 2006). Verringerte H_2S -Level in Patienten mit Hyperhomocysteinämie könnten an der Entstehung einer Atherosklerose beteiligt sein. Erhöhte Homocystein-Spiegel werden oftmals durch Mutationen im CBS-Gen hervorgerufen, welches unter anderem für die Bildung von H_2S verantwortlich ist (Wang 2002; Beltowski 2004).

H_2S interagiert auch mit den anderen Gastransmittern. So war der H_2S -Gehalt nach Gabe von NO-Donoren erhöht, da NO die CSE-Expression induziert (Zhao et al. 2001).

In den glatten Gefäßmuskelzellen der Lunge war H₂S in der Lage, die Expression der HO-1 zu induzieren und dadurch die CO-Bildung zu steigern (Qingyou et al. 2004). Neben L-Cystein dient SAM ebenfalls als Präkursor für die H₂S-Bildung (Wang 2002). Auch L-Methionin könnte über den Weg der Transsulfuration als Vorstufe für H₂S fungieren. In Zusammenhang mit den Ergebnissen von Qingyou und Mitarbeitern wäre es daher denkbar, dass L-Methionin, L-Cystein und SAM H₂S-abhängig die HO-1 induzieren. Ob H₂S an endothelprotektiven Wirkungen durch Induktion der HO-1 beteiligt ist, müsste durch Experimente z.B. mit CBS/CSE-Hemmstoffen eingehender untersucht werden.

Neben gefäßschützenden Wirkungen könnten L-Cystein und SAM auch gastroprotektive Effekte vermitteln. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass L-Cystein die Heilung von Wunden und bestehenden Magengeschwüren beschleunigt (Szabo 1984; Salim 1992a; Salim 1992b). SAM minderte in Tierversuchen eine Ethanol-induzierte Magenschädigung (Gutierrez-Cabano 1989). Die molekularen Wirkmechanismen der Gastroprotektion durch L-Cystein und SAM sind allerdings noch nicht vollständig geklärt. Die Induktion der HO-1 wird nicht nur mit endothelprotektiven, sondern auch mit gastroprotektiven Effekten in Zusammenhang gebracht (Becker et al. 2003; Berndt et al. 2005; Becker et al. 2006). Daher könnte eine Induktion der HO-1 zur gastroprotektiven Wirkung von L-Cystein und SAM beitragen.

15-35% aller Ulkus-Krankheiten werden durch nichtsteroidale antiphlogistische Analgetika (NSAIDs) verursacht (Tenenbaum 1999). NSAIDs werden zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen eingesetzt. Die Blockade der Prostaglandinsynthese durch Hemmung der Cyclooxygenasen (COX-1/2) führt zur analgetischen und antiinflammatorischen Wirkung der NSAIDs. Eine Langzeiteinnahme wird jedoch mit erhöhter gastrointestinaler Blutungsneigung und/oder der Entwicklung von Magen-Darm-Ulcera assoziiert. Die gastrotoxischen Wirkungen der NSAIDs werden unter anderem der verringerten Synthese von magenschützenden Prostaglandinen zugeschrieben (Schoen et al. 1989; Soll et al. 1991; Wolfe et al. 1999). Die Entwicklung von magenschonenden, dennoch effektiven NSAIDs ist daher von besonderem Interesse. NO-NSAIDs, die sowohl NO freisetzen als auch die COX inhibieren, stellen eine Alternative zu den konventionellen NSAIDs dar. NO fungiert als Mediator von gastroprotektiven Effekten, indem es die Durchblutung der Mukosa aufrechterhält, die Aggregation der Leukozyten und Thrombozyten hemmt sowie die Sekretion von Schleim, Flüssigkeit und Bicarbonat stimuliert. Darüber hinaus beschleunigt NO die Heilung von Ulcera und schützt die Epithelzellen vor direkter Schädigung durch prooxidative Agenzien (Wallace et al. 2000). Außerdem ist NO ein wichtiger endogener Induktor des zellprotektiven Enzyms HO-1 (Yee et al. 1996; Polte et al. 2000). Im Zellkulturmodell induzierte aus NO-Naproxen freigesetztes NO die HO-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Die NO-freie Muttersubstanz bewirkte keinen induktiven Effekt auf die HO-1 (Berndt et al. 2005). Galanakis und Mitarbeiter zeigten, dass Amidderivate konventioneller NSAIDs (wie z.B. Diclofenac, Indometacin) mit L-Cysteinethylester antiinflammatorisch und antioxidativ wirkten. Diese kombinierte Wirkung resultierte in einer verringerten gastrointestinalen Toxizität. Teilweise wirkten die derivatisierten Verbindungen sogar stärker antiinflammatorisch als die Muttersubstanzen. Die Autoren schrieben die verstärkte entzündungshemmende Aktivität der antioxidativen Wirkung der freien Thiolgruppe des L-Cysteinrests zu (Galanakis et al. 2004). In Verbindung mit den hier präsentierten Daten, könnte auch eine Induktion des HO-1/Ferritin-Systems, vermittelt durch den L-Cysteinrest, für die antioxidativen sowie die stärkeren antiinflammatorischen Wirkungen der derivatisierten NSAIDs verantwortlich sein. Unerivatisierte NSAIDs wie Diclofenac und Indometacin beispielsweise sind nicht in der Lage, das HO-1/Ferritin-System zu induzieren (Oberle et al. 1998; Grosser et al. 2003).

L-Cystein und SAM waren in der Lage zusätzlich zur Proteinexpression auch die

Transkription des HO-1-Gens sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig zu stimulieren.

Im Gegensatz dazu bewirkten L-Methionin und Met-Tyr keine Induktion der HO-1 auf Transkriptionsebene. Dieser Befund lässt auf unterschiedliche Regulationsmechanismen der L-Methionin-/Met-Tyr-vermittelten HO-1-Induktion einerseits und der L-Cystein-/SAM-abhängigen HO-1-Induktion andererseits schließen. Untersuchungen mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D und L-Methionin bzw. Met-Tyr zeigten eine Stabilisierung der mRNA bei Vorstimulierung der HO-1 mit Cadmiumchlorid.

Die Induktion der HO-1 durch endogenes NO involviert auch post-transkriptionelle Prozesse wie z.B. die Stabilisierung der HO-1-mRNA (Hartsfield et al. 1997; Bouton et al. 2000). Sowohl für die L-Methionin- als auch für die Met-Tyr-vermittelte ROS-Senkung konnte eine NO-Abhängigkeit festgestellt werden. Eine NO-abhängige Stabilisierung der HO-1-mRNA könnte daher die L-Methionin- bzw. Met-Tyr-induzierte HO-1-Proteinexpression erklären. Außerdem gibt es bereits Hinweise darauf, dass einige Aminosäuren über eine Stabilisierung der mRNA an der Regulation von diversen Säugetiergenen beteiligt sind (Rinehart et al. 1985; Kanamoto et al. 1987; Chen et al. 1992). Einige Peptide und größere Proteine weisen ebenfalls mRNA-stabilisierende Effekte auf (Boado 1995; Tong et al. 1998; Brennan et al. 2001). Das RNA-bindende Protein HuR ist beispielsweise in der Lage, die mRNA der NOS, der COX-2 sowie der löslichen Guanylatcyclase zu stabilisieren (Rodriguez-Pascual et al. 2000; Kloss et al. 2003; Sengupta et al. 2003).

Die Aminosäure L-Cystein hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Stabilität der HO-1-mRNA. Die L-Cystein-induzierte Genaktivierung der HO-1 scheint daher hauptsächlich transkriptionell und nicht post-transkriptionell reguliert zu werden.

Eine Vielzahl der Induktoren der HO-1 verursachen direkt oder indirekt oxidativen Stress. Daher stellte sich die Frage, ob die L-Cystein vermittelte HO-1-Induktion auf einer vermehrten Bildung freier Sauerstoffradikale beruht. Durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit SOD konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Transkription des HO-1-Gens durch L-Cystein nicht durch Sauerstoffradikale stimuliert wird. Diese Ergebnisse lassen eine stressfreie Induktion der HO-1 durch L-Cystein vermuten.

Atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehen meist mit einem relativen Mangel an NO einher, entweder aufgrund einer verminderten Bioverfügbarkeit oder aufgrund einer eingeschränkten Biosynthese. Die endogene Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin wird durch die Enzymfamilie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert (Palmer et al. 1989). Als wichtiges Signalmolekül ist NO an vielen biochemischen Prozessen des Körpers beteiligt, insbesondere im kardiovaskulären System. Dabei existieren zwei prinzipielle Wirkmechanismen, durch die NO die Signaltransduktion steuern und seine Wirkungen entfalten kann. Durch Reaktion mit Metallionen in Molekülen (z.B. Guanylatcyclase) oder Nitrolyse von Thiolresten in Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren) kann NO die Aktivität dieser Verbindungen modulieren. NO ist die potenteste bekannte endogene gefäßerweiternde Substanz. Darüber hinaus hemmt es die Thrombozytenaggregation, die Leukozytenadhäsion, die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen sowie die endotheliale Apoptose (Nakaki et al. 1990; Kubes et al. 1991; de Graaf et al. 1992). Neben einer direkten Inaktivierung von ROS (Beckman et al. 1996), kann NO antioxidative Wirkungen auch durch Induktion cytoprotektiver Gene entfalten. Eine Vielzahl von Studien belegen, dass NO ein wesentlicher Induktor der HO-1-Transkription ist (Durante et al. 1997; Hartsfield et al. 1997). So konnte z.B. NO-Naproxen im Gegensatz zu Naproxen die Synthese der HO-1-mRNA in Endothelzellen induzieren. Als mögliche funktionelle Konsequenz der HO-1-Induktion reduzierte NO-Naproxen die NADPH-vermittelte Bildung von freien Sauerstoffradikalen nach mehrstündiger Vorinkubation (Berndt et al. 2005).

Der *second messenger* cGMP ist der Hauptmediator der physiologischen Effekte von NO.

Durch Anbindung von NO wird die lösliche Guanylatcyclase aktiviert und daraufhin vermehrt cGMP gebildet. Durch Aktivierung von Proteinkinasen ist cGMP in der Lage die vasodilatierenden Eigenschaften von NO zu vermitteln (Murad et al. 1987; Waldman et al. 1987).

Inwieweit die L-Cystein-induzierte HO-1-Transkription durch NO vermittelt wird, wurde mit Hilfe des NOS-Hemmstoffs L-NAME und des NO-Radikalfängers PTIO untersucht. Unter Verwendung von ODQ, einem selektiven Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase, wurde untersucht, ob die HO-1-Induktion durch L-Cystein cGMP-abhängig verläuft. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genaktivierung der HO-1 durch L-Cystein in Endothelzellen zeigen, dass die Transkription weder über den L-Arginin-NO-Stoffwechsel noch durch cGMP vermittelt wird.

Als weiterer möglicher Signaltransduktionsweg für eine HO-1-Induktion wird die MAP-Kinase-Kaskade diskutiert. MAP-Kinasen sind als Serin/Threonin-Proteinkinasen Bestandteil zahlreicher zellulärer Signalwege. Es werden drei MAPK-Familien beschrieben: die extrazellulär regulierte Kinase (ERK), die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und die p38-MAPK. JNK und p38 werden hauptsächlich durch Stressfaktoren aktiviert. Sie spielen eine Rolle im Entzündungsgeschehen, bei der Apoptose und bei der Zellproliferation. Im Gegensatz dazu wird die ERK überwiegend durch Wachstumsfaktoren stimuliert und ist daher an der Regulation von Zelldifferenzierungs- und Zellproliferationsvorgängen beteiligt. Durch Phosphorylierung können die MAP-Kinasen Transkriptionsfaktoren und regulatorische Proteine aktivieren (Kyriakis et al. 2001). Die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion des HO-1-Gens werden allgemein als *responsive elements* (RE) bezeichnet (siehe Abb. 6). So wurden unter anderem DNA-Sequenzen, an die AP-1, AP-2, Nrf2, NFκB, IL-6 und weitere Transkriptionsfaktoren binden können, in der Promotorregion der HO-1 gefunden (Lavrovsky et al. 1994; Choi et al. 1996; Ryter et al. 2006). Die MAP-Kinasen der einzelnen Familien können miteinander interagieren, so dass die Genregulierung über den MAPK-Weg oftmals sehr komplex ist. Interessanterweise sind bestimmte Stimuli, die die Transkription der HO-1 induzieren können, auch an der Aktivierung der MAP-Kinasen beteiligt. Dazu gehören vor allem Stressfaktoren wie UV-Licht, Hitzeschock, oxidativer Stress, proinflammatorische Cytokine und Wachstumsfaktoren (Elbirt et al. 1998; Ryter et al. 2006). Die Induktion der HO-1 in Endothelzellen durch Statine wird vermutlich ebenfalls durch MAP-Kinasen vermittelt (Chen et al. 2006). Das atriale natriuretische Peptid induzierte die HO-1 in Endothelzellen über JNK- und ERK-abhängige Signalwege (Kierner et al. 2003). Ob die L-Cystein-vermittelte HO-1-Induktion über die MAP-Kinase-Kaskade reguliert wird, müsste durch weiterführende Experimente z.B. mit spezifischen Hemmstoffen genauer untersucht werden.

Ergebnisse aus neueren Studien identifizieren H₂S als Mediator im kardiovaskulären System und als potenten Induktor der HO-1 (Wang 2002; Qingyou et al. 2004). H₂S wird unter physiologischen Bedingungen aus L-Cystein gebildet. Daher könnte ebenso H₂S an der Stimulierung der HO-1 durch L-Cystein beteiligt sein. Durch welche Mechanismen H₂S das HO-1-System modulieren könnte, ist allerdings noch unklar. Es besteht jedoch eine Verbindung zwischen H₂S-vermittelten Effekten, anderen als der HO-1-Induktion, und einer Aktivierung von MAP-Kinasen (Yang et al. 2004a; Yang et al. 2004b).

Die L-Cystein-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA wurde sowohl durch den Transkriptionsblocker Actinomycin D als auch durch den Translationshemmer Cycloheximid nahezu vollständig bzw. teilweise aufgehoben. Diese Beobachtungen demonstrieren, dass die HO-1-Genexpression auf der Ebene der Transkription reguliert wird, gleichzeitig aber auch eine *De-novo*-Synthese von Proteinen erfordert. Die Notwendigkeit von neu gebildeten Proteinen an der Genaktivierung der HO-1 lässt die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren oder anderer Peptide mit kurzer Halbwertszeit

vermuten. Verschiedene Studien postulieren z.B. die Involvierung von AP-1 (Kierner et al. 2003) und Nrf2 (Balogun et al. 2003) an der HO-1-Genaktivierung.

Sowohl L-Cystein als auch SAM waren in der Lage, die Aktivität des humanen HO-1-Promotors konzentrationsabhängig zu steigern. Die Erhöhung der HO-1-Promotor-Aktivität unterstreicht die bisherigen Ergebnisse hinsichtlich der Induktion des HO-1-Gens auf Transkriptionsebene durch L-Cystein und SAM. Die genauen Mechanismen sowie die verantwortlichen Mediatoren bzw. Transkriptionsfaktoren müssen jedoch noch festgestellt werden.

Die Steigerung der Promotoraktivität durch L-Cystein und SAM ist dabei nicht auf das humane HO-1-Gen beschränkt. Mit Hilfe eines Reporter-gen-Konstrukts, das einen Maus-HO-1-Promotor enthielt, konnte nachgewiesen werden, dass L-Cystein und SAM auch die HO-1-Promotor-Aktivität dieser Spezies steigern können.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass schwefelhaltige Aminosäuren, deren Derivate und bioaktive Dipeptide über eine Aktivierung des HO-1/Ferritin-Systems antioxidative und endothelprotektive Effekte induzieren können. Die Induktion des HO-1/Ferritin-Systems durch Nahrungsbestandteile wie Aminosäuren oder bioaktive Peptide stellt einen zellprotektiven Signalweg dar, der klinische Bedeutung bei der Prävention oder Therapie von Atherosklerose und anderen durch oxidativen Stress verursachten Erkrankungen erlangen könnte.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung genomischer Effekte von antioxidativ wirksamen Aminosäuren (insbesondere schwefelhaltigen Aminosäuren) und von Oligopeptiden mit ACE-inhibitorischen Eigenschaften. Dabei sollte die Expression von Genen mit zellprotektiver Funktion (Hämoxygenase-1, Ferritin) unter dem Einfluss der verwendeten Substanzen in Endothelzellen untersucht werden.

Die schwefelhaltigen Aminosäuren L-Methionin, L-Cystein und SAM konnten die HO-1 auf Proteinebene sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig induzieren. Die Induktion der HO-1 durch L-Methionin und L-Cystein war auch auf Ebene der katalytischen Aktivität messbar.

Das Dipeptid Methionyl-Tyrosin (Met-Tyr) induzierte die Proteinexpression der HO-1 in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit. Die freien Aminosäuren L-Methionin und L-Tyrosin waren unter diesen Bedingungen wirkungslos. Dieser Befund spricht für eine spezifische Funktion der peptidischen Bindung und struktureller Merkmale des Dipeptids bei der HO-1 Induktion. Andere ACE-inhibitorische Substanzen (Captopril, Methionyl-Phenylalanin) und Methionin-haltige Dipeptide (Methionyl-Methionin) ließen die Proteinexpression der HO-1 unbeeinflusst. Diese Ergebnisse dokumentieren, dass die Aktivierung der HO-1-Expression für Met-Tyr spezifisch ist und nicht mit den ACE-inhibitorischen Eigenschaften dieses Dipeptids zusammenhängt.

Gekoppelt an die Freisetzung des Häm-Eisens durch die HO-1 ist die Expression eines zweiten antioxidativ wirksamen Stressproteins, des Eisenspeicherproteins Ferritin. L-Methionin, L-Cystein und Met-Tyr führten zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Steigerung der Ferritinproteinsynthese.

L-Cystein und SAM waren in der Lage, die Transkription des HO-1-Gens ebenfalls konzentrations- und zeitabhängig zu stimulieren. L-Methionin und Met-Tyr bewirkten keine Induktion der HO-1-mRNA. Jedoch konnte für diese beiden Substanzen eine Stabilisierung der HO-1-mRNA nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur Genaktivierung der HO-1 durch L-Cystein ergaben, dass diese nicht über reaktive Sauerstoffspezies induziert wird. NO/cGMP-abhängige Signalwege sind ebenfalls nicht an der L-Cystein-abhängigen HO-1-Induktion beteiligt.

Unter Verwendung des Translationsblockers Cycloheximid und des Transkriptionsblockers Actinomycin D konnte die L-Cystein-vermittelte HO-1-mRNA-Induktion gehemmt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von neu gebildeten Proteinen an der Genaktivierung der HO-1 durch L-Cystein sowie auf eine transkriptionelle Regulierung der HO-1-mRNA-Expression hin. Diese Ergebnisse konnten anhand von Genreporter-Versuchen bestätigt werden. Sowohl L-Cystein als auch SAM waren in der Lage, die HO-1-Promotor-Aktivität konzentrationsabhängig zu steigern.

Funktionelle Konsequenzen der beobachteten genomischen Effekte wurden an einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress untersucht. Vorinkubationen mit L-Methionin, SAM und Met-Tyr führten nach mehreren Stunden und Auswaschen der Substanzen zu einer Hemmung der ROS-Bildung (indirekte antioxidative Wirkung). Der radikalfangende Effekt von Met-Tyr trat unabhängig von dessen ACE-inhibitorischer Wirkung auf und war für dieses Dipeptid spezifisch.

Im gleichen Modell zeigte der HO-1-Metabolit Bilirubin konzentrationsabhängige

antioxidative Effekte. Dieses Ergebnis zeigt, dass HO-1-Metaboliten unter den gewählten Bedingungen als Mediatoren der getesteten Substanzen fungieren können.

Mit Hilfe des HO-Inhibitors ZnBG konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der HO-1-Induktion durch L-Methionin, SAM und Met-Tyr und deren indirekten antioxidativen Wirkungen festgestellt werden.

Weitere Hemmstoffexperimente deuten auf eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid, einem bekannten Induktor der HO-1, an der L-Methionin- bzw. Met-Tyr-abhängigen Radikalsenkung hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen verschiedenen schwefelhaltigen Aminosäuren und dem ACE-inhibitorischen Dipeptid Met-Tyr eine Funktion als Aktivatoren antioxidativer und antiinflammatorischer Stoffwechselwege zu. Die Induktion des HO-1/Ferritin-Systems durch die getesteten Nahrungsbestandteile ist ein hier erstmalig beschriebener Signalweg, der ursächlich an den protektiven Effekten der einzelnen Substanzen im kardiovaskulären System beteiligt sein könnte. Die Befunde lassen auf ein antiatherogenes Potenzial der untersuchten Nahrungsbestandteile schließen und unterstreichen die Bedeutung diätetischer Maßnahmen bei der Prävention der Atherosklerose und anderer inflammatorischer Prozesse.

7 Literaturverzeichnis

- Abe K and Kimura H** (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16(3): 1066-71
- Adams JD, Jr. and Odunze IN** (1991). Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 10(2): 161-9
- Akaike T and Maeda H** (1996). Quantitation of nitric oxide using 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide (PTIO). *Methods Enzymol* 268: 211-21
- Alabovsky VV, Boldyrev AA, Vinokurov AA and Shchavratsky V** (1997). Effect of histidine-containing dipeptides on isolated heart under ischemia/reperfusion. *Biochemistry (Mosc)* 62(1): 77-87
- Alam J, Shibahara S and Smith A** (1989). Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *J Biol Chem* 264(11): 6371-5
- Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, Ruskin JN and Manson JE** (1998). Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *Jama* 279(1): 23-8
- 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
- Anderson JW, Allgood LD, Lawrence A, Altringer LA, Jerdack GR, Hengehold DA and Morel JG** (2000). Cholesterol-lowering effects of psyllium intake adjunctive to diet therapy in men and women with hypercholesterolemia: meta-analysis of 8 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 71(2): 472-9
- Appel LJ** (2003). The effects of protein intake on blood pressure and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 14(1): 55-9
- Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, Obarzanek E, Swain JF, Miller ER, 3rd, Conlin PR, Erlinger TP, Rosner BA, Laranjo NM, Charleston J, McCarron P and Bishop LM** (2005). Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. *Jama* 294(19): 2455-64
- 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
- Asplund K** (2002). Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *J Intern Med* 251(5): 372-92
- Aziz N and Munro HN** (1986). Both subunits of rat liver ferritin are regulated at a translational level by iron induction. *Nucleic Acids Res* 14(2): 915-27
- Babbs CF** (1990). Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic Biol Med* 8(2): 191-200
- Bach FH** (2005). Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel. *Faseb J* 19(10): 1216-9
- Balkan J, Kanbagli O, Aykac-Toker G and Uysal M** (2002). Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol-treated rats. *Biol Pharm Bull* 25(9): 1231-3
- Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW and Vercellotti GM** (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267(25): 18148-53
- Balla J, Vercellotti GM, Nath K, Yachie A, Nagy E, Eaton JW and Balla G** (2003). Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant* 18 Suppl 5: v8-12

- 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
- Becker JC, Grosser N, Boknik P, Schröder H, Domschke W and Pohle T** (2003). Gastroprotection by vitamin C--a heme oxygenase-1-dependent mechanism? *Biochem Biophys Res Commun* 312(2): 507-12
- 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
- Beckman JS and Koppenol WH** (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): C1424-37
- Bellavite P** (1988). The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic Biol Med* 4(4): 225-61
- Beltowski J** (2004). [Hydrogen sulfide as a biologically active mediator in the cardiovascular system]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 58: 285-91
- 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
- Birnboim HC and Doly J** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23
- Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV** (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 91 Spec No: 179-94
- Boado RJ** (1995). Brain-derived peptides regulate the steady state levels and increase stability of the blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter mRNA. *Neurosci Lett* 197(3): 179-82
- Bourdon E, Loreau N, Lagrost L and Blache D** (2005). Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radic Res* 39(1): 15-20
- Bouton C and Demple B** (2000). Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. Translation-independent stabilization of the mRNA and evidence for direct action of nitric oxide. *J Biol Chem* 275(42): 32688-93
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Bray TM and Taylor CG** (1993). Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol* 71(9): 746-51
- Brennan CM and Steitz JA** (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58(2): 266-77
- Brunner F, Schmidt K, Nielsen EB and Mayer B** (1996). Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 277(1): 48-53
- Buckley BJ, Marshall ZM and Whorton AR** (2003). Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 307(4): 973-9
- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC and Deadman NM** (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 2(8666): 757-61
- Cai H and Harrison DG** (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87(10): 840-4
- Cairo G, Bardella L, Schiaffonati L, Arosio P, Levi S and Bernelli-Zazzera A** (1985). Multiple mechanisms of iron-induced ferritin synthesis in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 133(1): 314-21

- Calabrese V, Ravagna A, Colombrita C, Scapagnini G, Guagliano E, Calvani M, Butterfield DA and Giuffrida Stella AM** (2005). Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. *J Neurosci Res* 79(4): 509-21
- Calabrese V, Renis M, Calderone A, Russo A, Reale S, Barcellona ML and Rizza V** (1998). Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat. *Free Radic Biol Med* 24(7-8): 1159-67
- 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
- Carageorgiou H, Tzotzes V, Pantos C, Mourouzis C, Zarros A and Tsakiris S** (2004). In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities: protection by L-cysteine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 94(3): 112-8
- Caro AA and Cederbaum AI** (2004). Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine in Fe(2⁺)-initiated oxidations. *Free Radic Biol Med* 36(10): 1303-16
- Chen C, Pung D, Leong V, Hebbar V, Shen G, Nair S, Li W and Kong AN** (2004). Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radic Biol Med* 37(10): 1578-90
- Chen JC, Huang KC and Lin WW** (2006). HMG-CoA reductase inhibitors upregulate heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 macrophages via ERK, p38 MAPK and protein kinase G pathways. *Cell Signal* 18(1): 32-9
- Chen R, Iwai M, Wu L, Suzuki J, Min LJ, Shiuchi T, Sugaya T, Liu HW, Cui TX and Horiuchi M** (2003). Important role of nitric oxide in the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor imidapril on vascular injury. *Hypertension* 42(4): 542-7
- Chen W, Kennedy DO, Kojima A and Matsui-Yuasa I** (2000). Polyamines and thiols in the cytoprotective effect of L-cysteine and L-methionine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Amino Acids* 18(4): 319-27
- Chen ZP and Chen KY** (1992). Mechanism of regulation of ornithine decarboxylase gene expression by asparagine in a variant mouse neuroblastoma cell line. *J Biol Chem* 267(10): 6946-51
- Chesney RW** (1985). Taurine: its biological role and clinical implications. *Adv Pediatr* 32: 1-42
- Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF and Cushman DW** (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J Biol Chem* 255(2): 401-7
- 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
- Choi BM, Kim HJ, Oh GS, Pae HO, Oh H, Jeong S, Kwon TO, Kim YM and Chung HT** (2002). 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. *Neurosci Lett* 328(2): 185-9
- 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
- Chopra M, Beswick H, Clapperton M, Dargie HJ, Smith WE and McMurray J** (1992). Antioxidant effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: free radical and oxidant scavenging are sulfhydryl dependent, but lipid peroxidation is inhibited by both sulfhydryl- and nonsulfhydryl-containing ACE inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 19(3): 330-40

- Christ M, Bauersachs J, Liebetrau C, Heck M, Gunther A and Wehling M** (2002). Glucose increases endothelial-dependent superoxide formation in coronary arteries by NAD(P)H oxidase activation: attenuation by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor atorvastatin. *Diabetes* 51(8): 2648-52
- 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
- Cocconi F** (2000). Carbon monoxide in vasoregulation: the promise and the challenge. *Circ Res* 86(12): 1184-6
- Cooper CE** (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 290-309
- Covington MB** (2004). Omega-3 fatty acids. *Am Fam Physician* 70(1): 133-40
- Cronstein BN, Naime D and Ostad E** (1994). The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. *Adv Exp Med Biol* 370: 411-6
- Daviglus ML, Stamler J, Orenca AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, Walsh MK, Morris D and Shekelle RB** (1997). Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med* 336(15): 1046-53
- de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG and Sixma JJ** (1992). Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85(6): 2284-90
- de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P and Delaye J** (1994). Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 343(8911): 1454-9
- de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J and Mamelle N** (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99(6): 779-85
- de Lorgeril M, Salen P, Monjaud I and Delaye J** (1997). The 'diet heart' hypothesis in secondary prevention of coronary heart disease. *Eur Heart J* 18(1): 13-8
- de Whalley CV, Rankin SM, Houtt JR, Jessup W and Leake DS** (1990). Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* 39(11): 1743-50
- Deneke SM, Gershoff SN and Fanburg BL** (1983). Potentiation of oxygen toxicity in rats by dietary protein or amino acid deficiency. *J Appl Physiol* 54(1): 147-51
- di Padova C** (1987). S-adenosylmethionine in the treatment of osteoarthritis. Review of the clinical studies. *Am J Med* 83(5A): 60-5
- Dickinson DA and Forman HJ** (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 1019-26
- 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
- Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D and Snyder SH** (1999). Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2445-50
- Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, Clinton Webb R, Lee ME, Nabel GJ and Nabel EG** (2001). Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat Med* 7(6): 693-8
- Durante W** (2003). Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease. *J Cell Physiol* 195(3): 373-82
- 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
- Elbirt KK and Bonkovsky HL** (1999). Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 111(5): 438-47
- 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 P** (2003). Protein intake and blood pressure in cardiovascular disease. *Proc Nutr Soc* 62(2): 495-504
- Evans PJ, Whiteman M, Tredger JM and Halliwell B** (1997). Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids. *Free Radic Biol Med* 23(7): 1002-8
- Exner M, Minar E, Wagner O and Schillinger M** (2004). The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 37(8): 1097-104
- Fanburg BL and Deneke SM** (1988). Protein deficiency potentiates oxygen toxicity. *Exp Lung Res* 14 Suppl: 911-9
- Fang YZ, Yang S and Wu G** (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18(10): 872-9
- Feinberg AP and Vogelstein B** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132(1): 6-13
- Finkel T** (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 248-53
- Finkelstein JD, Kyle WE, Martin JL and Pick AM** (1975). Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun* 66(1): 81-7
- Finkelstein JD, Martin JJ and Harris BJ** (1988). Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine. *J Biol Chem* 263(24): 11750-4
- FitzGerald RJ and Meisel H** (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr* 84 Suppl 1: S33-7
- FitzGerald RJ, Murray BA and Walsh DJ** (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 134(4): 980S-8S
- 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
- Foresti R and Motterlini R** (1999). The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic Res* 31(6): 459-75
- Fridovich I** (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23: 239-57
- Fuhrman B and Aviram M** (2001). Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 12(1): 41-8
- Fujita H and Yoshikawa M** (1999). LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology* 44(1-2): 123-7
- Furushiro M, Hashimoto S, Hamura M and Yokokura T** (1993). Mechanism for the antihypertensive effect of a polysaccharide-glycopeptide complex from *Lactobacillus casei* in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Biosci Biotechnol Biochem* 57(6): 978-81
- Galanakis D, Kourounakis AP, Tsiakitzis KC, Doulgkeris C, Rekka EA, Gavalas A, Kravaritou C, Charitos C and Kourounakis PN** (2004). Synthesis and pharmacological evaluation of amide conjugates of NSAIDs with L-cysteine ethyl ester, combining potent antiinflammatory and antioxidant properties with significantly reduced gastrointestinal toxicity. *Bioorg Med Chem Lett* 14(14): 3639-43

- Gardner ML** (1982). Absorption of intact peptides: studies on transport of protein digests and dipeptides across rat small intestine in vitro. *Q J Exp Physiol* 67(4): 629-37
- Ginter E** (1975). Ascorbic acid in cholesterol and bile acid metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 258: 410-21
- Giris M, Erbil Y, Oztezcan S, Olgac V, Barbaros U, Deveci U, Kirgiz B, Uysal M and Toker GA** (2006). The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamine on radiation-induced intestinal damage: the effect of heme oxygenase-1 on radiation enteritis. *Am J Surg* 191(4): 503-9
- Glore SR, Van Treeck D, Knehans AW and Guild M** (1994). Soluble fiber and serum lipids: a literature review. *J Am Diet Assoc* 94(4): 425-36
- Gong P, Hu B and Cederbaum AI** (2004). Diallyl sulfide induces heme oxygenase-1 through MAPK pathway. *Arch Biochem Biophys* 432(2): 252-60
- Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW and Perl DP** (1996). Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 149(1): 21-8
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD and Alexander RW** (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74(6): 1141-8
- 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
- Grimble RF** (1994). Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice. *New Horiz* 2(2): 175-85
- Grosser N, Abate A, Oberle S, Vreman HJ, Dennery PA, Becker JC, Pohle T, Seidman DS and Schröder H** (2003). 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, Schurgerc 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, Oberle S, Berndt G, Erdmann K, Hemmerle A and Schröder H** (2004c). Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Biochem Biophys Res Commun* 314(2): 351-5
- Gutierrez-Cabano CA** (1989). Probable role of both sulfhydryls and prostaglandins in gastric mucosal protection induced by S-adenosylmethionine. *Scand J Gastroenterol* 24(8): 982-6
- 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
- Haider A, Olszanecki R, Gryglewski R, Schwartzman ML, Lianos E, Kappas A, Nasjletti A and Abraham NG** (2002). Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 300(1): 188-94
- Halliwell B and Gutteridge JM** (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85
- Harker LA, Ross R, Slichter SJ and Scott CR** (1976). Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 58(3): 731-41
- Harris WS** (1992). The prevention of atherosclerosis with antioxidants. *Clin Cardiol* 15(9): 636-40
- Harrison DG** (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100(9): 2153-7

- Hartsfield CL, Alam J, Cook JL and Choi AM** (1997). Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 273(5 Pt 1): L980-8
- Haschemi A, Wagner O, Otterbein LE and Bach FH** (2005). Cooperative Regulation of Inflammation By Adenosine and HO-1. www.ho-conference.org
- Hayek T, Attias J, Smith J, Breslow JL and Keidar S** (1998). Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 31(4): 540-4
- Henry Y, Ducrocq C, Drapier JC, Servent D, Pellat C and Guissani A** (1991). Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur Biophys J* 20(1): 1-15
- Higaki I, Matsui-Yuasa I, Terakura M, Kinoshita H and Otani S** (1994). Increased spermidine or spermine level is essential for hepatocyte growth factor-induced DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *Gastroenterology* 106(4): 1024-31
- Hill-Kapturczak N, Thamilselvan V, Liu F, Nick HS and Agarwal A** (2001). Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by curcumin in human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281(5): F851-9
- 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
- Hou WC, Chen HJ and Lin YH** (2003). Antioxidant peptides with Angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for Angiotensin converting enzyme purification. *J Agric Food Chem* 51(6): 1706-9
- Hunter EA and Grimble RF** (1994). Cysteine and methionine supplementation modulate the effect of tumor necrosis factor alpha on protein synthesis, glutathione and zinc concentration of liver and lung in rats fed a low protein diet. *J Nutr* 124(12): 2319-28
- 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
- Ishikawa K, Sugawara D, Goto J, Watanabe Y, Kawamura K, Shiomi M, Itabe H and Maruyama Y** (2001). Heme oxygenase-1 inhibits atherogenesis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 104(15): 1831-6
- Juan SH, Cheng TH, Lin HC, Chu YL and Lee WS** (2005). Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 69(1): 41-8
- Juckett MB, Balla J, Balla G, Jessurun J, Jacob HS and Vercellotti GM** (1995). Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein in vitro. *Am J Pathol* 147(3): 782-9
- Kadiiska MB, Burkitt MJ, Xiang QH and Mason RP** (1995). Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. An ESR spin-trapping investigation. *J Clin Invest* 96(3): 1653-7
- Kagan BL, Sultzer DL, Rosenlicht N and Gerner RH** (1990). Oral S-adenosylmethionine in depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry* 147(5): 591-5
- Kanamoto R, Boyle SM, Oka T and Hayashi S** (1987). Molecular mechanisms of the synergistic induction of ornithine decarboxylase by asparagine and glucagon in primary cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 262(30): 14801-5
- Kawasaki M, Funabiki R and Yagasaki K** (1998). Effects of dietary methionine and cystine on lipid metabolism in hepatoma-bearing rats with hyperlipidemia. *Lipids* 33(9): 905-11

- Kawasaki T, Seki E, Osajima K, Yoshida M, Asada K, Matsui T and Osajima Y** (2000). Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 14(8): 519-23
- Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S and Nakanishi I** (2002). Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol* 33(1): 125-30
- Kaye GL, Blake JC and Burroughs AK** (1990). Metabolism of exogenous S-adenosyl-L-methionine in patients with liver disease. *Drugs* 40 Suppl 3: 124-8
- 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
- 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 YM, Bergonia H and Lancaster JR, Jr.** (1995). Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 374(2): 228-32
- Kitakaze M, Hori M, Sato H, Takashima S, Inoue M, Kitabatake A and Kamada T** (1991). Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. *Circ Res* 69(5): 1402-8
- Kitts DD and Weiler K** (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des* 9(16): 1309-23
- Kloss S, Furneaux H and Mulsch A** (2003). Post-transcriptional regulation of soluble guanylyl cyclase expression in rat aorta. *J Biol Chem* 278(4): 2377-83
- Knowles RG and Moncada S** (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 (Pt 2): 249-58
- Konig B** (1987). A long-term (two years) clinical trial with S-adenosylmethionine for the treatment of osteoarthritis. *Am J Med* 83(5A): 89-94
- Korhonen H and Pihlanto A** (2003). Food-derived bioactive peptides--opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des* 9(16): 1297-308
- Kowaluk EA** (1998). Adenosine modulation: a novel approach to analgesia and inflammation. *Expert Opin Investig Drugs* 7(4): 535-43
- Kroger H, Dietrich A, Ohde M, Lange R, Ehrlich W and Kurpisz M** (1997). Protection from acetaminophen-induced liver damage by the synergistic action of low doses of the poly(ADP-ribose) polymerase-inhibitor nicotinamide and the antioxidant N-acetylcysteine or the amino acid L-methionine. *Gen Pharmacol* 28(2): 257-63
- Kubes P, Suzuki M and Granger DN** (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11): 4651-5
- Kubisch HM, Wang J, Luche R, Carlson E, Bray TM, Epstein CJ and Phillips JP** (1994). Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21): 9956-9
- Kumar KV and Das UN** (1993). Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 19(1): 59-66
- Kunsch C and Medford RM** (1999). Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85(8): 753-66
- Kyriakis JM and Avruch J** (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2): 807-69
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5

- 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
- Lee TS, Chang CC, Zhu Y and Shyy JY** (2004). Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. *Circulation* 110(10): 1296-302
- Leffler CW, Parfenova H, Jaggar JH and Wang R** (2006). Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J Appl Physiol* 100(3): 1065-76
- Leibach FH and Ganapathy V** (1996). Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr* 16: 99-119
- Leibold EA and Guo B** (1992). Iron-dependent regulation of ferritin and transferrin receptor expression by the iron-responsive element binding protein. *Annu Rev Nutr* 12: 345-68
- Leibovitz BE and Siegel BV** (1980). Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *J Gerontol* 35(1): 45-56
- Levi S, Yewdall SJ, Harrison PM, Santambrogio P, Cozzi A, Rovida E, Albertini A and Arosio P** (1992). Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem J* 288 (Pt 2): 591-6
- Levine RL, Moskowitz J and Stadtman ER** (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* 50(4-5): 301-7
- Levine RL, Mosoni L, Berlett BS and Stadtman ER** (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26): 15036-40
- 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
- Linden J** (2006). New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* 116(7): 1835-7
- Ling WH and Jones PJ** (1995). Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 57(3): 195-206
- 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
- Lordnejad MR, Schliess F, Wettstein M and Haussinger D** (2001). Modulation of the heme oxygenase HO-1 expression by hyperosmolarity and betaine in primary rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 388(2): 285-92
- Lu SC** (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb J* 13(10): 1169-83
- Luk GD** (1986). Essential role of polyamine metabolism in hepatic regeneration. Inhibition of deoxyribonucleic acid and protein synthesis and tissue regeneration by difluoromethylornithine in the rat. *Gastroenterology* 90(5 Pt 1): 1261-7
- Lusis AJ** (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407(6801): 233-41
- Maccagno A, Di Giorgio EE, Caston OL and Sagasta CL** (1987). Double-blind controlled clinical trial of oral S-adenosylmethionine versus piroxicam in knee osteoarthritis. *Am J Med* 83(5A): 72-7
- Machlin LJ and Bendich A** (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* 1(6): 441-5
- Maines MD** (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-54
- Marshall JM** (2000). Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia. *Acta Physiol Scand* 168(4): 561-73

- 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
- Mato JM, Camara J, Fernandez de Paz J, Caballeria L, Coll S, Caballero A, Garcia-Buey L, Beltran J, Benita V, Caballeria J, Sola R, Moreno-Otero R, Barrao F, Martin-Duce A, Correa JA, Pares A, Barrao E, Garcia-Magaz I, Puerta JL, Moreno J, Boissard G, Ortiz P and Rodes J** (1999). S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol* 30(6): 1081-9
- Mato JM, Corrales FJ, Lu SC and Avila MA** (2002). S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb J* 16(1): 15-26
- Matsufuji H, Matsui T, Ohshige S, Kawasaki T, Osajima K and Osajima Y** (1995). Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Biosci Biotechnol Biochem* 59(8): 1398-401
- Matsufuji H, Matsui T, Seki E, Osajima K, Nakashima M and Osajima Y** (1994). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci Biotechnol Biochem* 58(12): 2244-5
- Mayer M** (2000). Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 46(11): 1723-7
- Mazar J, Rogachev B, Shaked G, Ziv NY, Czeiger D, Chaimovitz C, Zlotnik M, Mukmenev I, Byk G and Douvdevani A** (2005). Involvement of adenosine in the antiinflammatory action of ketamine. *Anesthesiology* 102(6): 1174-81
- McClain CJ, Hill DB, Song Z, Chawla R, Watson WH, Chen T and Barve S** (2002). S-Adenosylmethionine, cytokines, and alcoholic liver disease. *Alcohol* 27(3): 185-92
- McDonagh AF** (1990). Is bilirubin good for you? *Clin Perinatol* 17(2): 359-69
- Meisel H** (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43(2): 119-28
- Meisel H and FitzGerald RJ** (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des* 9(16): 1289-95
- Mellander O** (1950). The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Soc Med Ups* 55(5-6): 247-55
- 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
- Motterlini R, Foresti R, Bassi R and Green CJ** (2000). Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28(8): 1303-12
- 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
- Mulero V and Brock JH** (1999). Regulation of iron metabolism in murine J774 macrophages: role of nitric oxide-dependent and -independent pathways following activation with gamma interferon and lipopolysaccharide. *Blood* 94(7): 2383-9
- Murad F, Waldman S, Molina C, Bennett B and Leitman D** (1987). Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res* 249: 65-76
- Nagasawa T, Yonekura T, Nishizawa N and Kitts DD** (2001). In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. *Mol Cell Biochem* 225(1-): 29-34

- Nagelhout JJ** (1992). Adenosine: novel antiarrhythmic therapy for supraventricular tachycardia. *Aana J* 60(3): 287-92
- Nakaki T, Nakayama M and Kato R** (1990). Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 189(6): 347-53
- Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG and Fierro IM** (2005). Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 289(3): C557-63
- Navarra P, Dello Russo C, Mancuso C, Preziosi P and Grossman A** (2000). Gaseous neuromodulators in the control of neuroendocrine stress axis. *Ann N Y Acad Sci* 917: 638-46
- O K, Lynn EG, Chung YH, Siow YL, Man RY and Choy PC** (1998). Homocysteine stimulates the production and secretion of cholesterol in hepatic cells. *Biochim Biophys Acta* 1393(2-3): 317-24
- 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 and Schröder H** (1997). Ferritin may mediate SIN-1-induced protection against oxidative stress. *Nitric Oxide* 1(4): 308-14
- Oberle S, Schwartz P, Abate A and Schröder H** (1999). The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerithrityl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261(1): 28-34
- Olson LJ, Knych ET, Jr., Herzig TC and Drewett JG** (1997). Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation. *Hypertension* 29(1 Pt 2): 254-61
- Olszanecki R and Marcinkiewicz J** (2004). Taurine chloramine and taurine bromamine induce heme oxygenase-1 in resting and LPS-stimulated J774.2 macrophages. *Amino Acids* 27(1): 29-35
- 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, Mantell LL and Choi AM** (1999). Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 276(4 Pt 1): L688-94
- 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** (2003). Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med* 9(2): 183-90
- Palmer RM and Moncada S** (1989). A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158(1): 348-52
- Patra RC, Swarup D and Dwivedi SK** (2001). Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 162(2): 81-8
- Patterson RA and Leake DS** (1998). Human serum, cysteine and histidine inhibit the oxidation of low density lipoprotein less at acidic pH. *FEBS Lett* 434(3): 317-21
- Paul S, Feoktistov I, Hollister AS, Robertson D and Biaggioni I** (1990). Adenosine inhibits the rise in intracellular calcium and platelet aggregation produced by thrombin: evidence that both effects are coupled to adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 37(6): 870-5
- Perrella MA and Yet SF** (2003). Role of heme oxygenase-1 in cardiovascular function. *Curr Pharm Des* 9(30): 2479-87

- 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
- Pisarenko OI** (1996). Mechanisms of myocardial protection by amino acids: facts and hypotheses. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23(8): 627-33
- Polte T, Abate A, Dennery PA and Schröder H** (2000). Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1209-15
- Polte T, Hemmerle A, Berndt G, Grosser N, Abate A and Schröder H** (2002). Atrial natriuretic peptide reduces cyclosporin toxicity in renal cells: role of cGMP and heme oxygenase-1. *Free Radic Biol Med* 32(1): 56-63
- Qingyou Z, Junbao D, Weijin Z, Hui Y, Chaoshu T and Chunyu Z** (2004). Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 317(1): 30-7
- Quinlan GJ, Margaron MP, Mumby S, Evans TW and Gutteridge JM** (1998). Administration of albumin to patients with sepsis syndrome: a possible beneficial role in plasma thiol repletion. *Clin Sci (Lond)* 95(4): 459-65
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK and Harrison DG** (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97(8): 1916-23
- Rasilainen S, Nieminen JM, Levonen AL, Otonkoski T and Lapatto R** (2002). Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 63(7): 1297-304
- Rave N, Crkvenjakov R and Boedtke H** (1979). Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acids Res* 6(11): 3559-67
- Ray CJ, Abbas MR, Coney AM and Marshall JM** (2002). Interactions of adenosine, prostaglandins and nitric oxide in hypoxia-induced vasodilatation: in vivo and in vitro studies. *J Physiol* 544(Pt 1): 195-209
- Renaud S, de Lorgeril M, Delaye J, Guidollet J, Jacquard F, Mamelle N, Martin JL, Monjaud I, Salen P and Toubol P** (1995). Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 61(6 Suppl): 1360S-67S
- Rinehart CA, Jr. and Canellakis ES** (1985). Induction of ornithine decarboxylase activity by insulin and growth factors is mediated by amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(13): 4365-8
- Ririe DG, Roberts PR, Shouse MN and Zaloga GP** (2000). Vasodilatory actions of the dietary peptide carnosine. *Nutrition* 16(3): 168-72
- Rival SG, Boeriu CG and Wichers HJ** (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem* 49(1): 295-302
- Roberts PR, Burney JD, Black KW and Zaloga GP** (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* 60(4): 332-7
- Rodriguez-Pascual F, Hausding M, Ihrig-Biedert I, Furneaux H, Levy AP, Forstermann U and Kleinert H** (2000). Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 275(34): 26040-9
- Rogachev B, Ziv NY, Mazar J, Nakav S, Chaimovitz C, Zlotnik M and Douvdevani A** (2006). Adenosine is upregulated during peritonitis and is involved in downregulation of inflammation. *Kidney Int* 70(4): 675-81

- Rogers J and Munro H** (1987). Translation of ferritin light and heavy subunit mRNAs is regulated by intracellular chelatable iron levels in rat hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(8): 2277-81
- Ross R** (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 57: 791-804
- Ross R and Glomset JA** (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180(93): 1332-9
- 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
- Salim AS** (1992a). Protection against chronic gastric ulceration in the rat with sulfhydryl-containing agents. *J Pharm Sci* 81(7): 698-700
- Salim AS** (1992b). Role of sulphhydryl-containing agents in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis. A new approach. *Pharmacology* 45(6): 307-18
- Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R and Salonen R** (1992). High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 86(3): 803-11
- Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD and Tiegs G** (2003). Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 38(4): 909-18
- Sato K, Niki E and Shimasaki H** (1990). Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch Biochem Biophys* 279(2): 402-5
- Scapagnini G, Foresti R, Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Green CJ and Motterlini R** (2002). Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol* 61(3): 554-61
- Schafer FQ and Buettner GR** (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30(11): 1191-212
- Schoen RT and Vender RJ** (1989). Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am J Med* 86(4): 449-58
- Schröder H** (2005). New signaling routes for an old drug: lipoxin A4 might mediate heme oxygenase-1 induction by aspirin. Focus on "Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 in endothelial cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 289(3): C507-8
- Schröder H** (2006). No nitric oxide for HO-1 from sodium nitroprusside. *Mol Pharmacol* 69(5): 1507-9
- 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
- Selvam R and Ravichandran V** (1991). Effect of oral methionine and vitamin E on blood lipid peroxidation in vitamin B6 deficient rats. *Biochem Int* 23(6): 1007-17
- Seneviratne CK, Li T, Khaper N and Singal PK** (1999). Effects of methionine on endogenous antioxidants in the heart. *Am J Physiol* 277(6 Pt 2): H2124-8
- Sengupta S, Jang BC, Wu MT, Paik JH, Furneaux H and Hla T** (2003). The RNA-binding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 278(27): 25227-33
- Shibahara S, Muller RM and Taguchi H** (1987). Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262(27): 12889-92
- Shigenaga MK, Hagen TM and Ames BN** (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23): 10771-8
- Siow RC, Sato H and Mann GE** (1999). Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res* 41(2): 385-94

- Sipola M, Finckenberg P, Santisteban J, Korpela R, Vapaatalo H and Nurminen ML** (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 52(4 Pt 2): 745-54
- Slyshenkov VS, Shevalye AA, Liopo AV and Wojtczak L** (2002). Protective role of L-methionine against free radical damage of rat brain synaptosomes. *Acta Biochim Pol* 49(4): 907-16
- Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF and Kowall N** (1996). Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382(6587): 120-1
- Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD and Bach FH** (1998). Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 4(9): 1073-7
- Soares MP, Usheva A, Brouard S, Berberat PO, Gunther L, Tobiasch E and Bach FH** (2002). Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 4(2): 321-9
- Soeken KL, Lee WL, Bausell RB, Agelli M and Berman BM** (2002). Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAME) for osteoarthritis. *J Fam Pract* 51(5): 425-30
- 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
- Stadtman ER and Berlett BS** (1997). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10(5): 485-94
- Stadtman ER, Moskovitz J, Berlett BS and Levine RL** (2002). Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol Cell Biochem* 234-235(1-2): 3-9
- Stamler J, Elliott P, Kesteloot H, Nichols R, Claeys G, Dyer AR and Stamler R** (1996). Inverse relation of dietary protein markers with blood pressure. Findings for 10,020 men and women in the INTERSALT Study. INTERSALT Cooperative Research Group. INTERNational study of SALT and blood pressure. *Circulation* 94(7): 1629-34
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC and Witztum JL** (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320(14): 915-24
- Steinbrecher UP, Zhang HF and Loughheed M** (1990). Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 9(2): 155-68
- Steiner AA, Branco LG, Cunha FQ and Ferreira SH** (2001). Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. *Br J Pharmacol* 132(8): 1673-82
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K and Mitchinson MJ** (1996). Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347(9004): 781-6
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN and Ames BN** (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235(4792): 1043-6
- Stramentinoli G** (1987). Pharmacologic aspects of S-adenosylmethionine. Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Am J Med* 83(5A): 35-42
- Streppel MT, Arends LR, van 't Veer P, Grobbee DE and Geleijnse JM** (2005). Dietary fiber and blood pressure: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Arch Intern Med* 165(2): 150-6
- Struck AT, Hogg N, Thomas JP and Kalyanaraman B** (1995). Nitric oxide donor compounds inhibit the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to endothelial cells. *FEBS Lett* 361(2-3): 291-4
- 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

- Suetsuna K** (1998). Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from the red alga *Porphyra yezoensis*. *Journal of Marine Biotechnology* 6(3): 163-7
- Sun Y** (1990). Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 8(6): 583-99
- Szabo S** (1984). Role of sulfhydryls and early vascular lesions in gastric mucosal injury. *Acta Physiol Hung* 64(3-4): 203-14
- Tabakoff B, Eriksson CJ and von Wartburg JP** (1989). Methionine lowers circulating levels of acetaldehyde after ethanol ingestion. *Alcohol Clin Exp Res* 13(2): 164-71
- Takeda K, Ishizawa S, Sato M, Yoshida T and Shibahara S** (1994). Identification of a cis-acting element that is responsible for cadmium-mediated induction of the human heme oxygenase gene. *J Biol Chem* 269(36): 22858-67
- Takenaka A, Annaka H, Kimura Y, Aoki H and Igarashi K** (2003). Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(2): 278-83
- 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
- Tenenbaum J** (1999). The epidemiology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Can J Gastroenterol* 13(2): 119-22
- 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
- Theil EC** (1987). Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem* 56: 289-315
- Tong Z, Pitts GR, You S, Foster DN and El Halawani ME** (1998). Vasoactive intestinal peptide stimulates turkey prolactin gene expression by increasing transcription rate and enhancing mRNA stability. *J Mol Endocrinol* 21(3): 259-66
- Torti FM and Torti SV** (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99(10): 3505-16
- 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
- Uehara K, Takahashi T, Fujii H, Shimizu H, Omori E, Matsumi M, Yokoyama M, Morita K, Akagi R and Sassa S** (2005). The lower intestinal tract-specific induction of heme oxygenase-1 by glutamine protects against endotoxemic intestinal injury. *Crit Care Med* 33(2): 381-90
- Ulbricht TL and Southgate DA** (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338(8773): 985-92
- Unnikrishnan MK and Rao MN** (1990). Antiinflammatory activity of methionine, methionine sulfoxide and methionine sulfone. *Agents Actions* 31(1-2): 110-2
- van der Giet M, Erinola M, Zidek W and Tepel M** (2002). Captopril and quinapril reduce reactive oxygen species. *Eur J Clin Invest* 32(10): 732-7
- van Guldener C, Janssen MJ, de Meer K, Donker AJ and Stehouwer CD** (1999). Effect of folic acid and betaine on fasting and postmethionine-loading plasma homocysteine and methionine levels in chronic haemodialysis patients. *J Intern Med* 245(2): 175-83
- Van Horn L and Kavey RE** (1997). Diet and cardiovascular disease prevention: what works? *Ann Behav Med* 19(3): 197-212
- 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

- Vercruyse L, Van Camp J and Smagghe G** (2005). ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *J Agric Food Chem* 53(21): 8106-15
- Vermeirssen V, Van Camp J and Verstraete W** (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* 92(3): 357-66
- Waldman SA and Murad F** (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39(3): 163-96
- Wallace JL and Miller MJ** (2000). Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 119(2): 512-20
- Wang R** (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* 16(13): 1792-8
- Webb KE, Jr.** (1990). Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *J Anim Sci* 68(9): 3011-22
- 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
- Wierema TK, Houben AJ, Kroon AA, Postma CT, Koster D, van Engelshoven JM, Smits P and de Leeuw PW** (2005). Mechanisms of adenosine-induced renal vasodilatation in hypertensive patients. *J Hypertens* 23(9): 1731-6
- Wilbur SL and Marchlinski FE** (1997). Adenosine as an antiarrhythmic agent. *Am J Cardiol* 79(12A): 30-7
- 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
- Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J and Mitchell JB** (1993). Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21): 9813-7
- Witztum JL** (1994). The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 344(8925): 793-5
- Witztum JL and Steinberg D** (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88(6): 1785-92
- Wolfe MM, Lichtenstein DR and Singh G** (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 340(24): 1888-99
- Wu J and Ding X** (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 49(1): 501-6
- Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y and Koizumi S** (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103(1): 129-35
- Yamamoto N, Maeno M and Takano T** (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J Dairy Sci* 82(7): 1388-93
- Yang CY, Dantzig AH and Pidgeon C** (1999). Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm Res* 16(9): 1331-43
- Yang G, Cao K, Wu L and Wang R** (2004a). Cystathionine gamma-lyase overexpression inhibits cell proliferation via a H₂S-dependent modulation of ERK1/2 phosphorylation and p21^{Cip}/WAK-1. *J Biol Chem* 279(47): 49199-205
- Yang G, Sun X and Wang R** (2004b). Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *Faseb J* 18(14): 1782-4
- Yates MT, Lambert LE, Whitten JP, McDonald I, Mano M, Ku G and Mao SJ** (1992). A protective role for nitric oxide in the oxidative modification of low density lipoproteins by mouse macrophages. *FEBS Lett* 309(2): 135-8

- Yee EL, Pitt BR, Billiar TR and Kim YM** (1996). Effect of nitric oxide on heme metabolism in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 271(4 Pt 1): L512-8
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R and Dagenais G** (2000). Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342(3): 145-53
- Zahringer J, Baliga BS and Munro HN** (1976). Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(3): 857-61
- Zhang X, Scicli GA, Xu X, Nasjletti A and Hintze TH** (1997). Role of endothelial kinins in control of coronary nitric oxide production. *Hypertension* 30(5): 1105-11
- Zhao W, Zhang J, Lu Y and Wang R** (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *Embo J* 20(21): 6008-16

8 Veröffentlichungen

8.1 Originalarbeiten

Grosser N, Oberle S, Berndt G, Erdmann K, Hemmerle A and Schröder H (2004). Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Biochem Biophys Res Commun* 314:351-355

Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, Erdmann K, Hinkelmann U, Schürger S, Wijayanti N, Immenschuh S and Schröder H (2004). The antioxidant defense protein heme oxygenase-1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine* 37:2064-2071

Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Hinkelmann U, Smith G and Schröder H (2004). Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 325:871-876

Erdmann K, Grosser N and Schröder H (2005). L-methionine reduces oxidant stress in endothelial cells: role of heme oxygenase-1, ferritin, and nitric oxide. *AAPS Journal* 7:E195-E200

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: 1014-1021

Erdmann K, Grosser N, Schipporeit K and Schröder H (2006). The ACE Inhibitory Dipeptide Met-Tyr Diminishes Free Radical Formation in Human Endothelial Cells via Induction of Heme Oxygenase-1 and Ferritin. *J Nutr* 136: 2148-2152

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

Erdmann K, Berndt G, Grosser N and Schröder H (2004). Antioxidative Wirkung von Methionin in Endothelzellen: Hämoxygenase-1 und Ferritin als mögliche Mediatoren. *Proc Germ Nut Soc* 6:49-50

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

Erdmann K, Grosser N and Schröder H (2005). The ACE-inhibitory dipeptide met-tyr increases heme oxygenase-1 expression and antioxidant activity in endothelial cells. *DPhG-Doktorandentagung*, Leipzig

Erdmann K, Grosser N and Schröder H (2005). Antioxidant action of the ace-inhibitory dipeptide met-tyr in endothelial cells: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371 (Suppl 1):R12

Grosser N, Hemmerle A, Hinkelmann U, Erdmann K, Berndt G, Schürger S, Wijayanti N, Immenschuh S and Schröder H (2005). Statins activate transcriptional and translational expression of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 371 (Suppl 1):R7

Grosser N, Hemmerle A, Erdmann K, Hinkelmann U, Wijayanti N, Immenschuh S, Smith G and Schröder H (2005). Heme Oxygenase-1 and Ferritin Induction by Rosuvastatin: A Protective Antioxidant Stratagem in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:e69

Erdmann K, Grosser N and Schröder H (2005). The ACE-inhibitory dipeptide met-tyr reduces radical formation via induction of heme oxygenase-1. www.ho-conference.org, Boston, USA

Grosser N, Hinkelmann U, Hemmerle A, Erdmann K, Berndt G, Schürger S, Wijayanti N, Immenschuh S and Schröder H (2005). Heme oxygenase-1 as target and mediator of pleiotropic statin actions. www.ho-conference.org, Boston, 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. www.ho-conference.org, Boston, USA

Hinkelmann U, Grosser N, Hemmerle A, Erdmann K, Oberle-Plümpe S, Smith G and Schröder H (2005). Antioxidant actions of rosuvastatin: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. www.ho-conference.org, Boston, 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

Hinkelmann U, Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Schürger S, Wijayanti N, Immenschuh S and Schröder H (2006). Regulation of heme oxygenase-1 expression by statins via MAP-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:e75

Erdmann K, Grosser N and Schröder H (2006). The ACE-inhibitory dipeptide met-tyr reduces free radical formation: involvement of heme oxygenase-1 and ferritin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372 (Suppl 1): 23

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-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372 (Suppl 1): 24

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Henning Schröder für die produktive und vertrauensvolle Zusammenarbeit sowie für die motivierenden und anregenden Diskussionen. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit der Präsentation meiner Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen bedanken.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie danke ich ganz herzlich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und den vielen Spaß im Labor.

Bei Frau Dr. Nina Großer möchte ich mich für die vielen wertvollen Diskussionen und die kritische Durchsicht der Manuskripte dieser Arbeit bedanken. Ihre kontinuierliche Unterstützung hat wesentlich zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Georg Berndt für die Einweisung in die experimentellen Techniken. Herrn Stephan Schürger danke ich für die Unterstützung und Hilfe beim Genreporter-Assay.

Weiterhin möchte ich Frau Kathrin Schipporeit, Frau Petra Schwartz und Frau Astrid Nemitz erwähnen. Ihre Arbeit und ihre kleinen praktischen Hinweise haben den Laboralltag oftmals vereinfacht. Insbesondere jedoch danke ich Frau Kathrin Schipporeit für die Unterstützung im Zelllabor und ihre Hilfsbereitschaft beim experimentellen Arbeiten.

Frau Dr. Margret Köck und Frau Karin Klar bin ich für die Hilfe im Isotopenlabor zu großem Dank verpflichtet.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt von ganzem Herzen.

Erklärung

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

Halle (Saale), den 10.9.2006

Kati Erdmann

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kati Erdmann
Geburtsdatum: 7. Januar 1979
Geburtsort: Lutherstadt-Wittenberg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985 – 1991 Georg-Ewald-Oberschule, Jeber-Bergfrieden
1991 – 1997 Goethe-Gymnasium, Rosslau
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

Okt. 1997 – Sept. 2001 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Aug. 1999 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Sept. 2001 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Feb. 2003 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Approbation zur Apothekerin

Praktisches Jahr:

Okt. 2001 – März 2002 Diplom am Max-Planck-Institut für Enzymologie in Halle (Institut für Pharmazeutische Biologie und Pharmakologie, Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik), Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Juni 2002 – Nov. 2002 Galenus-Apotheke, Halle
März 2003 Erlangung des akademischen Grades Diplom-Pharmazeutin

Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit April 2003 Doktorandin am Institut für Pharmazeutische Biologie und Pharmakologie (Abt. Pharmakologie und Toxikologie), Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), den 10.9.2006