

Aus dem Med. Zentrum für Kinder - und Jugendmedizin
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Klinik für Allgemeine Kinderheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Professor Dr. med. R.F. Maier

Kopplung der Cyclooxygenase 2 an sekundäre Enzyme

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich der Medizin der
Philipps - Universität Marburg
vorgelegt

von

Elizabeth Pilgramm, geb. Chelangattucherry
aus Cochin
Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 17.02.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: PD Dr. med. M. Kömhoff

1.Korreferent: Prof. Dr, J. Koolman



meinen Eltern
Mariam und Joseph Chelangattucherry
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Geschichtliche Daten zur Entdeckung der Eikosanoide	6
1.2	Das Eikosanoid-System	7
1.3	Prostanoidsynthese	8
1.4	Prostaglandin Rezeptoren	10
1.5	Prostazyklin und Thromboxan A ₂	11
1.6	Metabolisierung von Prostazyklin und Thromboxan A ₂	11
1.7	Struktur der Gene	12
1.8	Regulation der Cyclooxygenasen	13
1.8.1	Regulation der Cox-1 Expression	14
1.8.2	Regulation der Cox-2 Expression	15
1.9	Struktur der Cox-1 und Cox-2	16
1.10	Funktionen der Cyclooxygenasen	18
1.10.1	Cox-1	18
1.10.2	Cox-2	18
1.10.3	Cox-1 und Cox-2	19
1.11	Unterschiede der Cox-1 und der Cox-2	20
1.12	Nicht steroidale Antirheumatika	21
1.13	Selektive Cox-2 Hemmer und die kardio-vaskulären Probleme	23
1.14	Cox-2 und die Präferenz zu sekundären Enzymen	24
1.15	Prostazyklin-Synthase	24
1.16	Fragestellung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Chemikalien	26
2.1.2	Lösungen, Puffer und Medien	27
2.1.3	Antikörper	27
2.1.4	Oligonukleotide	28
2.1.5	Verwendete Kitsysteme	29
2.1.6	Geräte	29
2.1.7	Bakterienstämme	30
2.1.8	Zellkulturmaterialien	30
2.1.9	Zelllinie HEK 293	31
2.1.10	Verwendete Vektoren	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Polymerasekettenreaktion	33
2.2.2	Mutagenese	34
2.2.3	Gel-Elektrophorese	35
2.2.4	DpN I – Verdau	35
2.2.5	Klonierungstechniken	36
2.2.6	Zellkultur	38
2.2.7	Arachidonsäure – Stimulation	40
2.2.8	Prostaglandinanalytik	40
2.2.9	Proteinnachweis	41
2.2.10	Statistik	45

3	Ergebnisse	46
3.1	Ergebnisse der Mutagenese	46
3.2	Mutantenbeschreibung	47
3.3	Prostaglandin-Bestimmung	50
3.3.1	Cox-1 und Cox-2 bei basaler Arachidonsäure (AA)	50
3.3.2	Cox-1 und Cox-2 bei supramaximaler AA	52
3.3.3	PGE ₂ -Bildung bei basaler und supramaximaler AA	53
3.3.4	6-keto-PGF _{1α} -Bildung bei basaler und supramaximaler AA	54
3.3.5	Prostaglandinbildung der Mutanten	55
3.4	Western-Blot	58
3.4.1	Kontroll-Western-Blot	58
3.4.2	Mutanten Western-Blot	59
4	Diskussion	60
4.1	Bewertung der Ergebnisse	61
4.1.1	Prostanoidsynthese der Cox-2 verglichen mit der mutierten Cox-2	61
4.1.2	Ergebnisse der Prostaglandinproduktion	62
4.1.3	Western-Blot Ergebnisse	63
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	64
4.2	Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen	65
4.3	Klinische Relevanz	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	69
7	Abkürzungverzeichnis	80
8	Abbildungsverzeichnis	82
9	Tabellenverzeichnis	83
10	Anhang	84
10.1	Danksagung	84
10.2	Meine akademischen Lehrer	85

1 Einleitung

Acetylsalicylsäure, bekannt als Aspirin, ist weltweit eines der am häufigsten eingenommenen Schmerzmittel und gehört zur Gruppe der nicht steroidalen Antirheumatika. Der Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung zweier Enzyme, der Cyclooxygenasen 1 und 2 (Cox-1 und Cox-2), welche auch als Prostaglandin-Endoperoxid-H-Synthasen bezeichnet werden. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Bildung von Prostaglandinen, welche Schmerzmediatoren sind.

Allerdings werden durch diese Hemmung in nicht unerheblichem Maße physiologische Wechselwirkungen gestört, so dass es zu Nebenwirkungen, wie zum Beispiel (z.B.) Magenschleimhautblutungen, kommen kann. In den letzten Jahren sind daher Medikamente entwickelt worden, die zwar die Schmerzen lindern, die bekannten Nebenwirkungen aber nicht mehr hervorrufen sollen (GIERSE et al. 1996). Das Resultat war eine Gruppe von Cox-2 selektiven Schmerzmedikamenten.

Das erhoffte Ergebnis, die Nebenwirkungen senken zu können, wurde erreicht; dass aber eine jahrelange Einnahme dieser Medikamente ganz andere Wechselwirkungen hervorruft, wurde erst sehr viel später entdeckt.

1.1 Geschichtliche Daten zur Entdeckung der Eikosanoide

Prostaglandine wurden 1930 von Kurzrock und Lieb in der Samenflüssigkeit entdeckt und 1940 von v. Euler als aktive Metabolite, welche die Kontraktilität des Uterus fördern, klassifiziert (FITZGERALD UND LOLL 2001).

Damals vermutete man, dass es sich um ein Sekret der Prostata handelt, worauf die Bezeichnung Prostaglandine zurückzuführen ist.

30 Jahre später gelang es Bergström und Samuelsson, die Struktur der ersten Prostaglandine aufzudecken. 1964 wurde die Biosynthese der Prostaglandine, die die Fettsäure Arachidonsäure als gemeinsamen Ursprung haben, von Bergström, Samuelsson und Van Dorp aufgeklärt (BERGSTROEM et al. 1964).

1971 beschrieben Vane et al. erstmals die Hemmung der Cyclooxygenase, des Schlüsselenzyms der Prostaglandinbiosynthese durch nicht-steroidale Antirheumatika und die daraus resultierenden antiinflammatorischen, analgetischen und antipyretischen Wirkungen (VANE 1971).

Nachdem 1969 das Thromboxan A₂ entdeckt wurde, konnte wenige Jahre später Prostazyklin durch Hamberg et al. (1975) sowie Moncado (1976) isoliert werden. Von 1975 bis 1980 konnte der vollständige Biosyntheseweg der Leukotriene dargestellt werden (FUNK 2001). Für die Entdeckung und Forschung an den Prostaglandinen und den damit verbundenen biologisch aktiven Substanzen erhielten Bengt I. Samuelsson, Sune K. Bergström und John R. Vane im Jahre 1982 den Nobel-Preis (OATES 1982).

Die Cox-1 wurde im Jahre 1976 zum ersten Mal aufgereinigt und im Jahre 1988 geklont (DEWITT UND SMITH 1988; MERLIE et al. 1988; YOKOYAMA et al. 1988).

1990 wurden erste Hinweise auf die Existenz einer zweiten Cox-Isoform durch die Gruppe um Philip Needleman publiziert (FU et al. 1990; MASFERRER et al. 1990).

Bereits ein Jahr später gelang es, ein neues Gen zu identifizieren, die Cox-2 (KUJUBU et al. 1991; XIE et al. 1991; KUJUBU UND HERSCHMAN 1992; VANE et al. 1998).

1.2 Das Eikosanoid-System

Eikosanoide sind Derivate der Arachidonsäure, einer reaktionsfreudigen, vierfach ungesättigten C₂₀-Fettsäure (von eikosi, gr: zwanzig), die in den Zellen zum größten Teil in veresterter Form als Membranphospholipiden vorliegt. Die Konzentration von freier Arachidonsäure ist daher sehr gering.

Die Eikosanoid-Biosynthese (Abbildung 1-1) beginnt mit der Freisetzung von Arachidonsäure aus Zellmembranphospholipiden durch Phospholipasen, hauptsächlich durch Aktivierung der zellulären Phospholipase A₂ (cPLA₂, Typ IV) und verschiedenen sekretorischen Phospholipasen (sPLA₂, Typ IIA, IID, V und X). Neben diesen aktiviert die Phospholipase C Diacylglyceridlipasen, die ebenfalls an der Freisetzung von Arachidonsäure beteiligt sind. Die Aktivität dieser Enzyme kann durch chemische, physiologische, pathophysiologische und pharmakologische Stimuli erfolgen, wie z.B. Histamin, Bradykinin, endotheliale Scherkräfte, Gefäßschäden oder auch die Arachidonsäure selbst, indem sie die Nachbarzelle zu vermehrter Prostaglandinherstellung anregt (SMITH et al. 1991).

Aus der freigesetzten Arachidonsäure werden verschiedene Metabolite synthetisiert: die Prostaglandine, Prostazyklin und Thromboxane auf der einen, die Hydroxyeicosatetraensäure (HETEs) und Leukotriene auf der anderen Seite.

Zusammen werden sie als Eikosanoide bezeichnet. Weiterhin wird die freigesetzte Arachidonsäure von verschiedenen Cytochrom P450-Enzymen metabolisiert. Eines dieser Enzyme ist eine Epoxygenase, die die Arachidonsäure in vier verschiedene Epoxyeicosatrienoicssäuren (EETs) umwandelt (ZELDIN 2001). Prostaglandine, Prostazyklin und Thromboxane werden über die Cyclooxygenase synthetisiert und zu Prostanoiden zusammengefasst. Die Leukotriene hingegen werden über den Lipoxygenase-Weg gebildet.

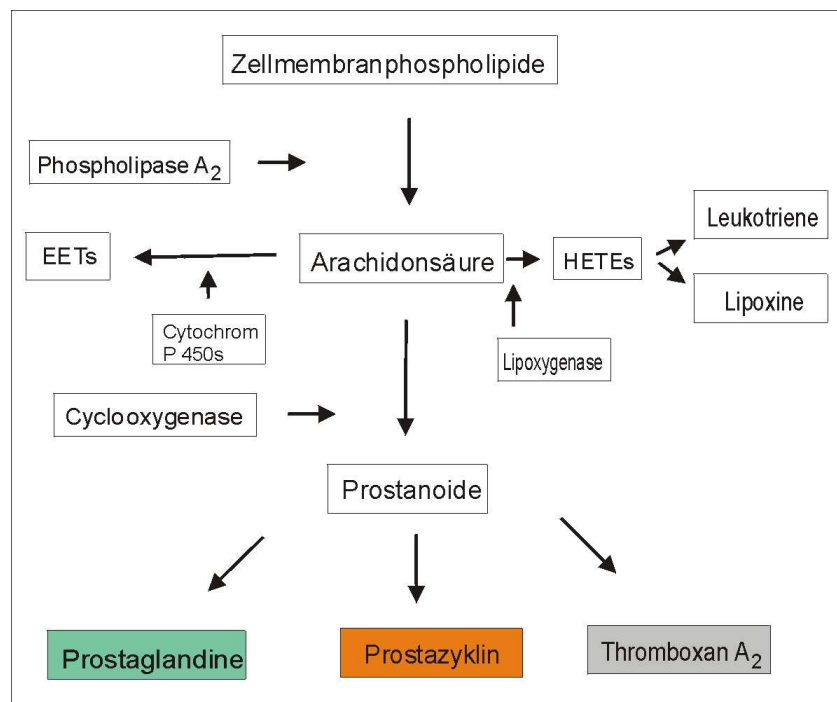


Abbildung 1-1: Die Eikosanoide

Die Eikosanoide sind Abkömmlinge der Arachidonsäure. Aufgeteilt werden sie in Leukotriene, Lipoxine, Prostazyklin, Prostaglandine und Thromboxan.

1.3 Prostanoidsynthese

Nachdem die Arachidonsäure durch Phospholipasen mobilisiert wurde, wird diese in zwei Schritten in das Prostaglandin H₂ (PGH₂), die Vorstufe aller Prostaglandine, umgewandelt.

Im ersten Schritt (Cyclooxygenasereaktion, s. Abbildung 1-2) vermittelt die Cyclooxygenase eine Dioxygenierung und Zyklisierung der freien Arachidonsäure in das Endoperoxid Prostaglandin G₂ (PGG₂). Anschließend wird über ihre Peroxidasefunktion das PGG₂ zu PGH₂ reduziert („Peroxidasereaktion“, GOLDEN

UND ABRAMSON 1999). Zellspezifische PG-Synthasen katalysieren nun die Umwandlung von PGH_2 in die einzelnen Prostanoiden.

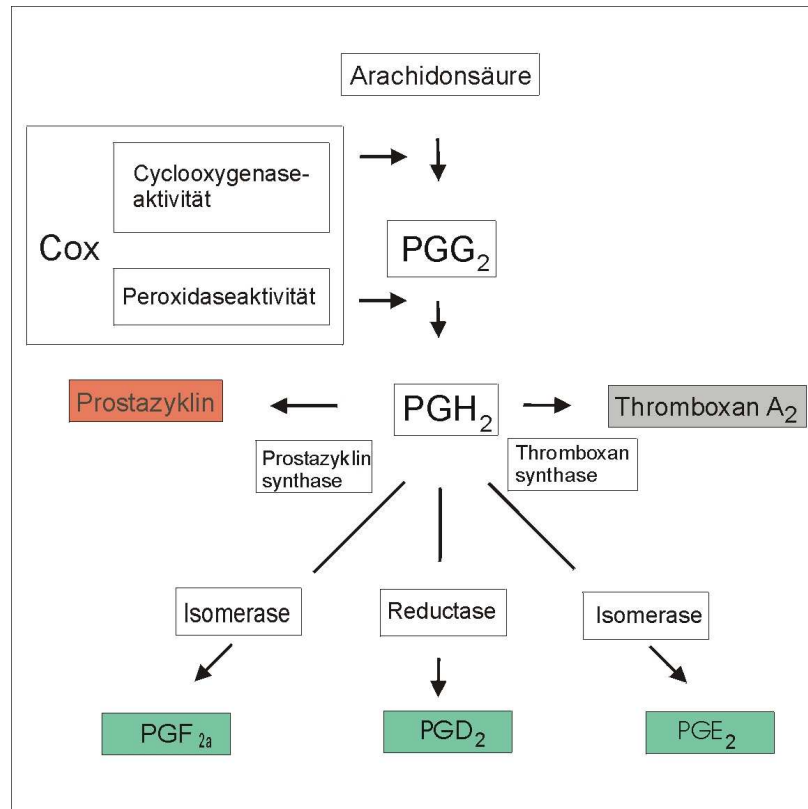


Abbildung 1-2: Der Biosyntheseweg der Eikosanoide

Der Ausgangspunkt der Biosynthese der Eikosanoide ist die Arachidonsäure, die über PGG_2 und PGH_2 zu den verschiedenen Eikosanoiden umgesetzt wird.

Mit Hilfe der Thromboxan-Synthase wird aus PGH_2 Thromboxan A_2 (TXA_2), ein Metabolit, welcher vor allem in den Thrombozyten vorhanden ist und einen starken Stimulus zur Plättchenaggregation und zur Vasokonstriktion darstellt.

Die Prostazyklin-Synthase (PCS), ein 50-kd Protein, welches im endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran der meisten Endothelzellen gefunden wird, katalysiert die Biosynthese von Prostazyklin (PGI_2). PGI_2 wirkt vasodilatierend und ist ein starker Gegenspieler der durch Thromboxan vermittelten Plättchenaggregation und Vasokonstriktion (WANG UND CHEN 1996).

Prostaglandin D_2 (PGD_2) ist das Hauptprodukt der Prostaglandine in Mastzellen und basophilen Zellen und trägt zu allergischen Reaktionen, wie z.B. zur Kontraktion der bronchialen Luftwege bei asthmatischen Patienten, bei (MONCADA et al. 1976).

1.4 Prostaglandin Rezeptoren

Prostaglandine üben ihre Wirkung sowohl autokrin als auch parakrin auf ihre Zielzelle aus (BREYER et al. 2001).

Zur Zeit sind fünf Haupttypen der Membranrezeptoren bekannt: der PGD₂-Rezeptor (DP), vier Subtypen (EP₁-EP₄) des PGE₂-Rezeptors (EP), der PGF₂-Rezeptor (FP), der PGI₂-Rezeptor (IP) und der TXA₂-Rezeptor (TP) (HIRAI et al. 2001; MONNERET et al. 2001). Dazu kommen noch weitere Untergruppen des EP₃-, FP- und TP-Rezeptors, welche sich in deren carboxylterminalen Enden unterscheiden (RAYCHOWDHURY et al. 1995; NARUMIYA UND FITZGERALD 2001).

Mit Ausnahme des DP₂ Rezeptors sind alle Rezeptoren G-Protein-gekoppelte Rhodopsin-Typ Rezeptoren mit sieben transmembranen α -Helices. Jedes für sich wird von einem anderen Gen kodiert (NARUMIYA UND FITZGERALD 2001). Der DP Rezeptor gehört zu einer Untergruppe der chemoattraktiven Rezeptoren (FUNK 2001). Unterschiedlich sind die Rezeptoren bezüglich der verwendeten sekundären Botenstoffe. So erhöhen die Rezeptoren IP, DP, EP₂ und EP₄ das cAMP-Angebot der Zelle durch Aktivierung der Adenylatzyklase, wohingegen die TP-, FP- und EP₁-Rezeptoren Kalzium mobilisieren (NARUMIYA UND FITZGERALD 2001). Der in der Auflistung fehlende EP₃ senkt im Gegensatz zu den anderen den cAMP Gehalt.

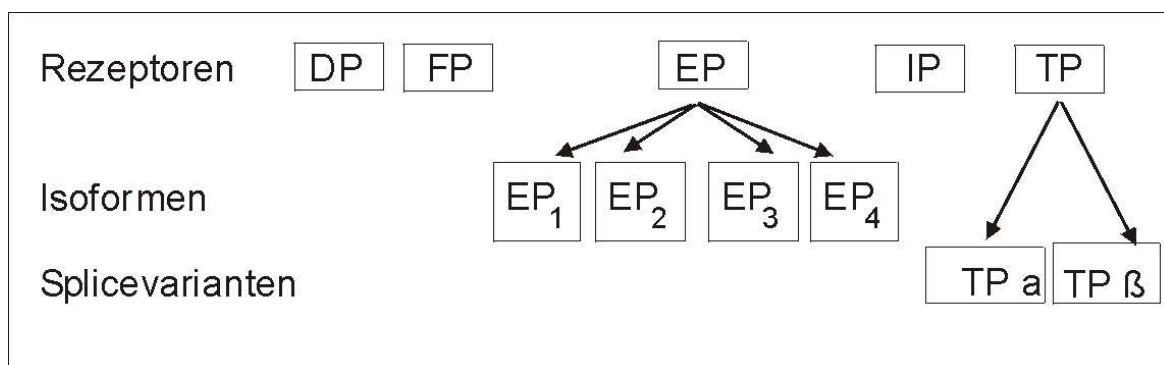


Abbildung 1-3: Prostaglandin-Rezeptoren

Derzeit sind fünf Haupt- mit weiteren Subtypen der Membranrezeptoren bekannt, über die die verschiedenen Prostaglandine wirken.

Neben den membranständigen Rezeptoren wirken Prostaglandine vermutlich auch als Liganden für die Peroxisom Proliferator Aktivierten Rezeptoren (PPAR), die zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren gehören und von denen bisher

drei Isoformen bekannt sind: α , β und γ . Sie liegen im Zytoplasma vor und können von verschiedenen Liganden, unter anderen (u.a.) den Prostanoiden, aktiviert werden, um anschließend eine Regulation der Transkription der entsprechenden Gene zu bewirken (HLA et al. 1999).

1.5 Prostazyklin und Thromboxan A₂

PGI₂ wird mit Hilfe der Prostazyklin-Synthase aus PGH₂ gebildet. Es ist zusammen mit dem PGE₂ das Hauptprostaglandin bei Entzündungsreaktionen. Es erhöht die Gefäßpermeabilität und somit die Durchblutung und die Rötung der Entzündung. Ebenfalls verstärkt es den Schmerz, indem es nozizeptive Nervenendigungen sensibilisiert (HIGGS et al. 1978). In der Lunge fungiert Prostazyklin als Bronchodilatator. Zudem erweitert es vor allem die Lungengefäße und verhindert die Bildung von Mikrothromben (SIMMONS et al. 2004).

Prostazyklin und Thromboxan A₂ sind für das kardiovaskuläre System und die Regulation des Gefäßtonus sowie die Thrombozytenaggregation von besonderer Bedeutung.

Prostazyklin ist ein vaskulär-protectives Eikosanoid und wird hauptsächlich von den Endothelzellen produziert (DUBOIS et al. 1998). Neben der Hemmung von Thrombozytenaggregationen hat es ebenfalls vasodilatierende Wirkung (FITZGERALD et al. 1984; CLARKE et al. 1991; BELTON et al. 2000; CHENG et al. 2002; HINZ UND BRUNE 2002). Die Wirkung des Prostazyklins wird über einen Anstieg von cAMP vermittelt.

Ihm gegenüber steht das Thromboxan A₂, welches hauptsächlich in Thrombozyten produziert wird (HERSCHMAN 1996; DUBOIS et al. 1998). Es ist ein potenter Vasokonstriktor und fördert die Thrombozytenaggregation. Die Hemmung der Thromboxan-Synthese führt *in vitro* zu einer Reduktion von Plättchenaggregation und *in vivo* zu einer Verlängerung der Blutungszeit.

1.6 Metabolisierung von Prostazyklin und Thromboxan A₂

Prostazyklin hydrolysiert bei neutralem pH-Wert mit einer Halbwertszeit von ca. drei Minuten zum biologisch inaktiven 6-keto-PGF_{1 α} . Da PGI₂, im Gegensatz zu Prostaglandin E₂ (PGE₂) oder Prostaglandin F₂ (PGF₂), nicht in der Lunge

metabolisiert wird, ist der vasodilatorische Effekt in venösen und arteriellen Gefäßen annähernd gleich.

Thromboxan A_2 hydrolysiert nichtenzymatisch mit einer Halbwertszeit von ca. 30 Sekunden zum biologisch inaktiven Thromboxan B_2 .

Die Hauptmetaboliten von PGI_2 und TXA_2 im Urin sind 2,3-Dinor-6-keto- $PGF_{1\alpha}$ bzw. 2,3-Dinor- TXB_2 . Ihre Messung wird zur Bestimmung der Gesamtkörperproduktion der biologisch aktiven Substanzen PGI_2 und TXA_2 herangezogen (SCHWEER et al. 1994).

1.7 Struktur der Gene

Das Gen der Cox-1 (Abbildung 1-4) befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 9, das der Cox-2 auf dem Chromosom 1 (FUNK et al. 1991; JONES et al. 1993). Beide Gene zeigen große Ähnlichkeit in ihren Strukturen (SMITH UND DEWITT 1996).

So ist die Größe der Exons bei beiden identisch, mit der Ausnahme, dass die ersten beiden Exons des Cox-1-Gens zu einem einzigen Exon im Cox-2-Gen verschmelzen (SMITH UND DEWITT 1996). Eine Betrachtung der hohen Übereinstimmungen der Primärsequenz der Gene weist auf einen gemeinsamen Ursprung des Cox-1- und Cox-2-Gens hin (OTTO UND SMITH 1995). Auffällige Unterschiede finden sich lediglich bei den Größen der Introns (SMITH UND DEWITT 1996).

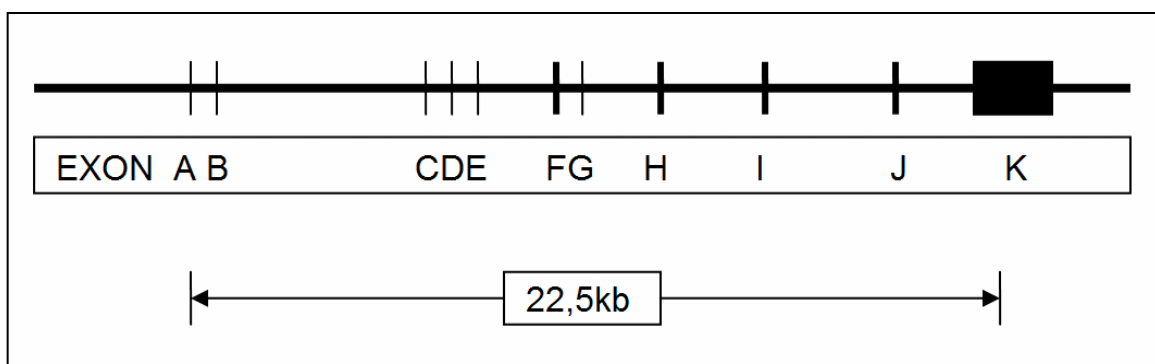


Abbildung 1-4: Cox-1 Gen

Die Zeichnung verdeutlicht die Struktur des Cox-1 Gens, welche 22,5 kb lang ist und 11 Exons aufweist (SMITH UND DEWITT 1996).

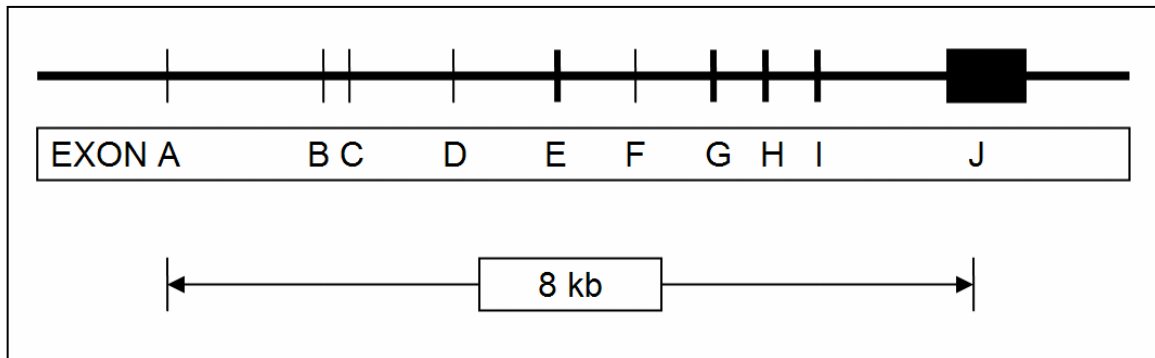


Abbildung 1-5: Cox-2 Gen

Die Abbildung zeigt die Struktur des Cox-2 Gens. Das Gen hat eine Länge von 8kb und besitzt 10 Exons (SMITH UND DEWITT 1996).

Das Cox-1 Gen ist ca. 22 kb, das Cox-2 Gen (Abbildung 1-5) ca. 8 kb lang (FLETCHER et al. 1992; KRAEMER et al. 1992). Das Cox-2 Gen gehört zu den „immediate early response genes“, die rasch und vorübergehend aktiviert werden können (HERSCHMAN 1991).

1.8 Regulation der Cyclooxygenasen

Obwohl Cox-1 und Cox-2 strukturell eine große Ähnlichkeit aufweisen und auch eine ähnliche Kinetik besitzen, sind sie dennoch in ihren Funktionen und in ihrer Gewebeverteilung unterschiedlich (FRÖLICH 1997).

Tabelle 1-1: Unterschiede der Cox-1 gegenüber der Cox-2 nach SMITH et al. 1996; VANE et al. 1998; SMITH et al. 2000; SMITH UND LANGENBACH 2001.

	Cox-1	Cox-2
Chromosomale Lokalisation	9q32-q33.3 (human)	1q25.2-q25.3 (human)
Kodierende Gene	22 kb, 11 Exone (human)	8 kb, 10 Exone (human)
mRNA	2,9 kb	4.0 kb
Enzymatische Aktivität	~5 μ M (in vitro) ~10 μ M (in vivo)	~5 μ M (in vitro) ~2 μ M (in vivo)

Fortsetzung Tabelle 1-1:

Regulation	permanent exprimiert Expression aktiviert während Zellentwicklung und Zelldifferenzierung	Induzierbar Expression aktiviert um das 10 bis 80- fache bei Wachstumsfaktoren, Cytokinen und tPA (ein gewebespezif. Plasminogenaktivator)
Effekte der Glucokortikoide	kein oder wenig Einfluss auf die Expression	blockiert die Expression in aktivierten Zellen
Expremiertes Gewebe	erhöht in Samenbläschen, Endothelzellen, Niere; Magen; gefunden in den meisten Gewebe	erhöhtes Vorkommen in ent- zündetem Gewebe und prä- ovulatorischen Follikeln kaum Vorkommen im unstimulierten Gewebe
Physiologische Funktionen	produziert Prostaglandine für die physiologische Funktion der Niere, des Magens und der Homeostase	Produziert Prostaglandine bei Entzündungen, Ovulation und Mitogenese

1.8.1 Regulation der Cox-1 Expression

Die Cox-1 wird konstitutiv in den meisten Organen exprimiert und produziert als so genanntes „house-keeping enzyme“ Prostaglandine, die weitreichende physiologische Funktionen wie den Schutz der Magenmukosa, die Blutgerinnung oder den renalen Wasser- und Elektrolythaushalt haben. Unterschiedlich sind allerdings die Expressionslevel von Cox-1 in den verschiedenen Organen (GARAVITO UND DEWITT 1999; BELTON UND FITZGERALD 2003).

Auch wenn Cox-1 in den meisten Zellen und Geweben konstitutiv vorhanden ist, so zeigt das Enzym in einigen Zellen besonders hohe Expressionslevel, wie z.B. den Endothelzellen, den Makrophagen und den Sammelröhren der Niere (SMITH UND DEWITT 1996; SMITH et al. 2000).

Bei der Erforschung der Transkriptionsregulation des Cox-1-Gens zeigte sich, dass diesem die TATA-Box in der Promotorregion fehlt (DEWITT et al. 1983). Die Bezeichnung TATA stammt von der Abkürzung für die Basen-Sequenz Thymin-Adenin-Thymin-Adenin. Die Sequenzen der TATA-Box dienen als Bindungspunkte für Genregulatorproteine, die wiederum die Geschwindigkeit der Induktion der RNA-Polymerase auf der DNA beeinflussen. Diese fehlende TATA Promotorregion ist für konstitutiv exprimierte Proteine, wie die Cox-1, üblich (OTTO UND SMITH 1995). Zwei Elemente wurden entdeckt, die zu der kontinuierlichen Expression einen erheblichen Teil beisteuern: die Sp 1 cis-regulierten Elemente in der Cox-1-Promotor-Region an Position -111/-105 und -610/-604, welche das trans-aktive Sp 1 Protein binden. Fehlen diese beiden Elemente, so kommt es zu einer Verringerung der Expression der Cox-1 um bis zu 75% (SMITH et al. 2000).

1.8.2 Regulation der Cox-2 Expression

Die Cox-2 ist dagegen nur in einer geringen Anzahl von Organen, wie der Macula Densa der Niere und Teilen des Gehirns konstitutiv vorhanden (ANDREASSON ET AL, 1993; KRAMER et al. 2004). Durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zellstress und Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 (IL-1) und Lipopolysaccharide (LPS), kann Cox-2 induziert und u.a. in Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten exprimiert werden (MAIER et al. 1990; O'BANION et al. 1992; JONES et al. 1993; XIE UND HERSCHMAN 1996; GARAVITO UND DEWITT 1999).

Während die Cox-2 mRNA und ihre Proteinkonzentration in unstimulierten Zellen niedrig sind, steigt die Expression unter Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor, dem gewebespezifischen Plasminogenaktivator, Entzündungsmediatoren, wie IL-1 und Tumornekrosefaktor α (TNF α) sowie LPS und Scherkräften erheblich an. Glucocorticoide und anti-inflammatorische Zytokine unterdrücken die Expression (MAIER et al. 1990; KUJUBU et al. 1991; O'SULLIVAN et al. 1992A; O'SULLIVAN et al. 1992B; DEWITT UND MEADE 1993).

1.9 Struktur der Cox-1 und Cox-2

Die Primärstruktur der Cox-1 und Cox-2 ist von zahlreichen Spezies bekannt. Beide Isoformen besitzen Signalpeptide von unterschiedlichen Längen (SMITH et al. 2000). Die Cox-1 besteht aus 576 Aminosäuren. Die Cox-2 besteht dagegen aus 587 Aminosäuren (SMITH et al. 2000). Beide weisen jeweils eine molekulare Masse von ungefähr 67-72 kd auf (GARAVITO UND DEWITT 1999).

Drei Kristallstrukturen der Cyclooxygenasen wurden veröffentlicht:

Schaf-Cox-1, rekombinante humane Cox-2 und rekombinante Maus-Cox-2 (PICOT et al. 1994; KURUMBAIL et al. 1996; LUONG et al. 1996).

Angesichts der stark übereinstimmenden Sequenzen von Cox-1 und Cox-2 war es nicht verwunderlich, dass die tertiäre und quartäre Strukturen der Enzyme ebenfalls stark homolog sind (KURUMBAIL et al. 1996; LUONG et al. 1996).

Ebenso sind die Sequenzen von Cox-1 und Cox-2 innerhalb einer Spezies zu 60 - 65% homolog; speziesübergreifend findet man eine Homologie von 85 - 90% (SMITH et al. 2000).

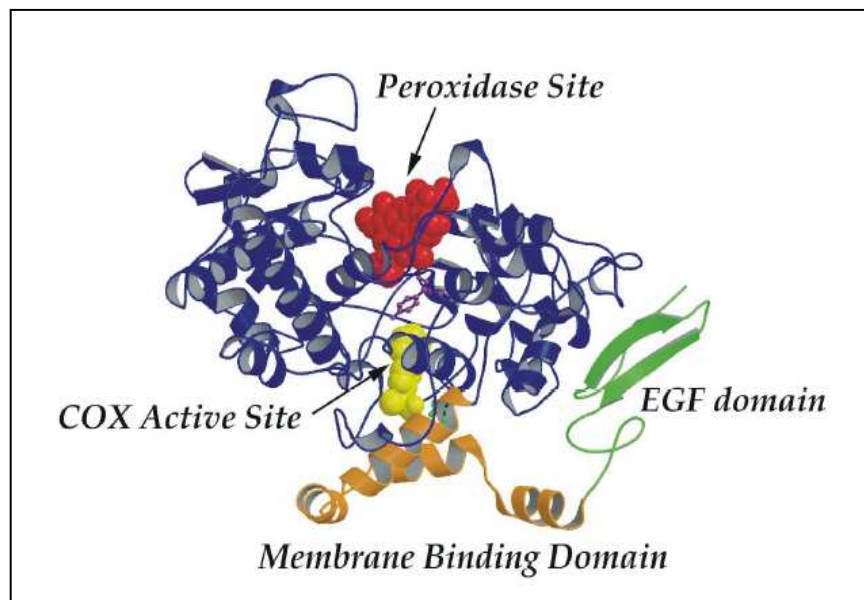


Abbildung 1-6: Struktur der Cox – 1 (nach Garavito et al., 1999)

Die Abbildung 1-6 zeigt die Struktur der Cox-Monomere, bestehend aus drei Domänen:

Zum einen eine aus 50 Aminosäuren bestehende N-terminale Domäne, die strukturell dem epidermalen Wachstumsfaktor (englisch: Epidermal Growth Factor, EGF) ähnelt und zum anderen eine kleine benachbarte Membran-Bindungs-Domäne (MBD). Als dritte Domäne ist die lange C-terminalen Domäne („globular catalytic domain“) mit ca. 460 Aminosäuren abgebildet. Diese beinhaltet die aktiven Zentren für die Cyclooxygenase- und Peroxidase-Reaktion (PICOT et al. 1994; KURUMBAIL et al. 1996; LUONG et al. 1996; GARAVITO UND DEWITT 1999).

Die EGF-Domäne stellt einen Teil der Dimer-Oberfläche dar und ist wichtig für die „Faltung“ des Enzyms. Bei Mutationen derselben ist eine verminderte Aktivität zu erkennen (SMITH et al. 2000).

Die MBD besteht aus vier kurzen, aufeinander folgenden amphipathischen α -Helices, mit der die Cyclooxygenase in der Membran verankert ist. Die Helix D stellt eine Verbindung zu der katalytischen Domäne her (SMITH et al. 2000). Hydrophobische und aromatische Reste ragen von diesen Helices heraus und gleichzeitig weg von der hydrophilen Oberfläche der katalytischen Domäne. Sie agieren als Bindeglied zwischen den Helices und dem hydrophoben Teil der bilipiden Membran (PICOT et al. 1994). Die Helices umfassen eine Öffnung, durch die Substrate der Fettsäuren und nicht steroidale Antirheumatika (NSAR) ihren Eingang zum aktiven Zentrum der Cyclooxygenase finden (SMITH et al. 2000).

Die katalytische Domäne ähnelt der der Myeloperoxidase, aber mit einem hydrophoben Kanal, der in den inneren Kern dieser Domäne zeigt (SMITH et al. 2000).

Die Cox-1 und Cox-2 werden gebildet, gefaltet und in der Phospholipiddoppelmembran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert (GARAVITO UND DEWITT 1999). Von dort werden die Enzyme über das ganze ER und innerhalb der Kernhülle verteilt (GARAVITO UND DEWITT 1999). Relativ gesehen scheint Cox-2 innerhalb der Kernhülle höher konzentriert zu sein (SMITH et al. 2000).

1.10 Funktionen der Cyclooxygenasen

1.10.1 Cox-1

Plättchenaggregation

Ausdifferenzierte Plättchen sind kernlose Zellen zur Erhaltung der Homeostase bei Gefäßverletzungen. Sie exprimieren nur Cox-1 und nicht Cox-2, so dass TXA₂ in diesen Zellen nur über die Cox-1 gebildet wird (PATRIGNANI et al. 1994). Ergebnisse von Cox-1-knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass hier die Plättchenaggregation eingeschränkt stattfindet (LANGENBACH et al. 1995). Hierdurch wird verdeutlicht, dass die Cox-2-Isoform diese Aufgabe nicht kompensieren kann (SMITH UND LANGENBACH 2001).

Geburt

Die Aufgaben der Cox-Isoenzyme sind beim Geburtsvorgang unterschiedlich. Während frühere Studien gezeigt haben, dass Cox-1-knock-out-Mäuse Schwierigkeiten während des Geburtsvorganges haben, wurde in späteren Studien demonstriert, dass nach Zugabe von LPS, welches Cox-2 induziert, die Geburt fortgesetzt werden konnte (LANGENBACH et al. 1995; SMITH UND LANGENBACH 2001). Dieses Beispiel zeigt, dass die Cox-2 die Aufgaben der Cox-1 in diesem Kontext übernehmen kann (SMITH UND LANGENBACH 2001).

1.10.2 Cox-2

Ovulation und Einnistung

Cox-2-knock-out-Mäuse sind unfruchtbar, da das von Cox-2 gebildete ovarielle PGE₂ essentiell für die Ovulation ist (DINCHUK et al. 1995; SMITH UND LANGENBACH 2001). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Ovulation bei Cox-2-knock-out-Mäusen bei Zugabe von PGE₂ wieder einsetzt. Dies unterstreicht die Bedeutung der Cox-2.

Ebenso ist das via Cox-2 gebildete PGI₂ mitverantwortlich für die Einnistung der befruchteten Eizelle (LIM et al. 1999).

Neonatale Entwicklung

Obwohl die Bedeutung der Cox-1 bei der Entwicklung gut bekannt ist, sah man in einigen neueren Untersuchungen, dass auch die Cox-2 eine wichtige Rolle v.a. in

der Nierenentwicklung übernimmt (KOMHOFF et al. 2000; LOFTIN et al. 2001). So zeigten Morham et al., dass Cox-2-knock-out-Mäuse schwere Nierenschäden entwickelten (MORHAM et al. 1995). Komhoff et al. stellten dar, dass Mäuse, die postnatal mit einem Cox-2-selektiven Inhibitor behandelt wurden, eine deutliche Verminderung des glomerulären Durchmessers aufwiesen (KOMHOFF et al. 2000). Eine weitere wichtige Aufgabe übernimmt Cox-2 beim Verschluss des Duktus arteriosus (LOFTIN et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass 35% der Cox-2-knock-out-Mäuse, welche einen offenen Duktus arteriosus hatten, innerhalb der ersten 48h verstarben, wohingegen sich dieser bei Cox-1-knock-out-Mäusen normal verschloss (SMITH UND LANGENBACH 2001).

1.10.3 Cox-1 und Cox-2

Entzündung und Wundheilung

Der Beitrag der beiden Isoformen zu Entzündungen ist noch nicht vollständig erforscht. Obwohl man nach der Entdeckung der Cox-2 glaubte, dass diese für die Bildung der Prostanoiden in der Entzündungsphase alleine verantwortlich sei, zeigte sich in neueren Studien, dass auch die Cox-1 hierbei eine Rolle spielt (LANGENBACH et al. 1995). Die Cox-2 ist interessanterweise nicht nur in den Beginn einer Entzündung involviert, sondern auch beim Heilungsprozess (SMITH UND LANGENBACH 2001). Es konnte nachgewiesen werden, dass sich bei späterer Gabe von selektiven Cox-2-Inhibitoren der Entzündungsprozess weiter fortsetzt (SMITH UND LANGENBACH 2001).

Magengeschwüre

Viele Jahre lang wurde vermutet, dass die Hemmung der Cox-1 durch NSAR für die Bildung von Magengeschwüren verantwortlich sei (SMITH UND LANGENBACH 2001). Umso verwunderlicher war es, dass Cox-1-knock-out-Mäuse eine 99%ige Reduktion des PGE₂-Levels im Magen aufwiesen und doch keine spontanen Magengeschwüre bildeten. Dieses Ergebnis führte man auf Kompensationsmechanismen zurück.

Erst bei Blockade beider Isoformen der Cyclooxygenase kommt es zu Magenschädigungen (WALLACE et al. 2000).

Karzinogenese

Nicht nur die Cox-2, sondern auch die Cox-1 spielen bei der intestinalen Tumorgenese eine Rolle (SMITH UND LANGENBACH 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von selektiven Cox-1-Hemmern zu einer äquivalenten Reduktion von Polypenbildung führt (CHULADA et al. 2000).

Welche Aufgaben die Enzyme genau übernehmen, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt.

1.11 Unterschiede der Cox-1 und der Cox-2

Ein Unterschied der beiden Isoenzyme besteht in dem aktiven Zentrum für die Cyclooxygenase-Reaktion der Cox-2, die um ca. 20% größer ist und eine leicht unterschiedliche räumliche Form annimmt als die der Cox-1 (LUONG et al. 1996). Ursächlich dafür sind drei unterschiedliche Aminosäuren: Isoleucin der Cox-1 statt Valin der Cox-2 an Position 434 und 523 sowie Histidin der Cox-1 statt Arginin der Cox-2 an Position 513. (SMITH et al. 2000). Dieser Unterschied ist die Grundlage der Entwicklung der Cox-2 spezifischen NSAR (SMITH et al. 2000).

Ein weiterer auffallender Unterschied in der Struktur der beiden Isoformen ist das Fehlen einer Sequenz von 17 Aminosäuren im N-terminalen Teil der Cox-2 und eine Ergänzung von 18 Aminosäuren im C-terminalen Ende (Carboxylterminus) der Cox-2 (OTTO UND SMITH 1995; HERSCHMAN 1996).

Eine genauere Funktion des C-terminalen Einschubs ist noch nicht bekannt. Auffällig ist allerdings, dass diese eine hochkonservierte Abfolge darstellt, die in allen Spezies vorhanden ist.

Der zweite Unterschied besteht im kinetischen Verhältnis (z.B. K_M , V_{MAX}) zwischen Cox-1 und Cox-2. Die Cox-2 kann, im Gegensatz zur Cox-1, schon bei niedriger Arachidonsäurekonzentration arbeiten (SMITH et al. 2000). Dies erlaubt der Cox-2 eine effektivere Arbeit, auch wenn beide Isoenzyme in einer Zelle exprimiert werden (SMITH et al. 2000).

Außerdem akzeptiert die Cox-2 eine breitere Auswahl an Fettsäuren als Substrat (OTTO UND SMITH 1995). Während beide Enzyme mit der Arachidonsäure und der Dihomogammalinolensäure arbeiten können, ist es der Cox-2 darüber hinaus noch möglich, weitere Fettsäuren, wie z.B. die Eicosapentaensäure, effizient zu nutzen (VANE et al. 1998).

Auch bezüglich der Sekundärenzyme wurden unterschiedliche Präferenzen entdeckt. So konnte die Arbeitsgruppe um FitzGerald zeigen, dass eine selektive Hemmung der Cox-2 zu einer signifikanten Abnahme des Prostazyklins führte. Dies konnte man ebenso bei der Hemmung beider Enzyme sehen; das heißt (d.h.), das Verhältnis von Prostazyklin zu Thromboxan verschiebt sich zu Gunsten des Thromboxans.

1.12 Nicht steroidale Antirheumatika

Nicht steroidale Antirheumatika weisen antiphlogistische, analgetische und antipyretische Wirkungen auf. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Hemmung der Cyclooxygenase-Funktion, jedoch nicht der Peroxidase-Funktion der Cox-Enzyme (GOLDEN UND ABRAMSON 1999). Hierbei wird die Eintrittsstelle der Arachidonsäure verlegt und somit das aktive Zentrum der Cyclooxygenase gehemmt.

Gängige unselektive NSAR sind Ibuprofen, Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Indometacin und Naproxen. Sie haben eine analgetische, antiinflammatorische und antipyretische Wirkung.

Viele NSAR bewirken nur eine vorübergehende Hemmung der Prostaglandinsynthese, während dagegen der bekannteste Vertreter der NSAR, die Acetylsalicylsäure, eine irreversible Funktionseinschränkung der Cox-1 und Cox-2 bewirkt. Aspirin, der Handelsname der Acetylsalicylsäure, hemmt die Cyclooxygenase-Funktion durch Acetylierung eines Serins (Serin 530 in Cox-1 und 516 in Cox-2) und verhindert somit sterisch den Zutritt der Arachidonsäure zum aktiven Zentrum. Die Cox-1 wird durch Acetylsalicylsäure etwa 10-100-mal stärker gehemmt als die Cox-2.

Da die unselektiven NSAR nicht zwischen den beiden Isoformen der Cyclooxygenase unterscheiden, ergeben sich bei Einnahme der NSAR diverse Nebenwirkungen wie z.B. Magenschleimhautblutungen, Ulzera oder Nierenfunktionsstörungen sowie Blutdruckerhöhung.

Diese führte man zum größten Teil auf die Hemmung der physiologischen Funktionen der Cox-1 zurück (s.1.8).

Die Erforschung der Cox-2-Isoform führte zur Hypothese, dass eine selektive Blockade derselben zur Hemmung von Entzündung und Schmerz bei geringeren Nebeneffekten führen könnte (GIERSE et al. 1996).

Selektive Cox-2-Inhibitoren wie Celecoxib (Celebrex[®]) und Rofecoxib (Vioxx[®]) sind 1999 auf den Markt gekommen.

Ihr Grundprinzip beruht auf einem Strukturunterschied der beiden Cyclooxygenase-Isoformen (VANE et al. 1998):

Die Cox-2 bildet durch eine kleinere Aminosäure (Valin) eine Seitentasche, in die der selektive Inhibitor greifen kann. Bei der Cox-1 befindet sich an dieser Stelle die Aminosäure Isoleucin, die größer ist und somit die Seitentasche verschließt.

Dieser scheinbar geringe strukturelle Unterschied, der in Abbildung 1-7 dargestellt ist, ist die Basis der Cox-2-selektiven Hemmung.

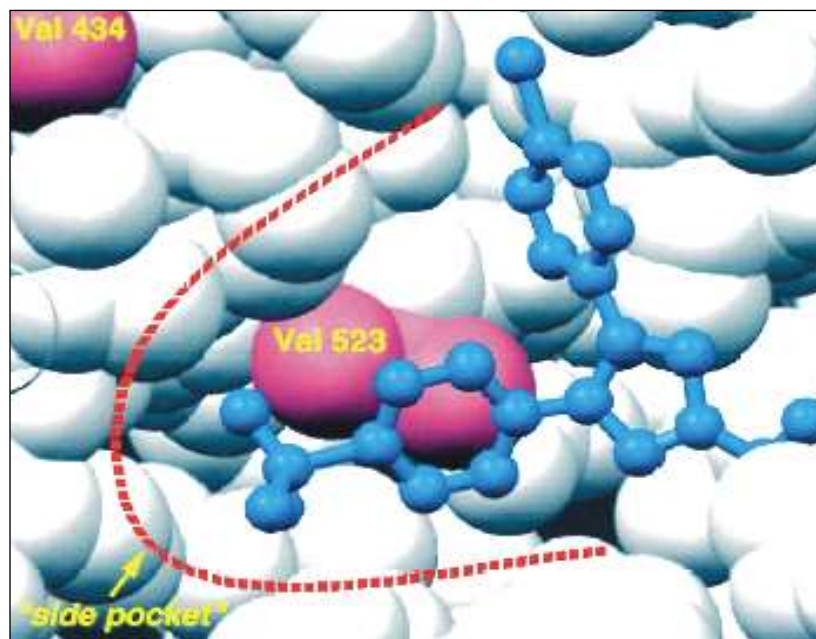


Abbildung 1-7: Cox-2-selektiver Inhibitor

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Cox-2 (weiße Figuren). In violett hervorgehoben ist die für die Selektivität der Cox-2-Inhibitoren entscheidende Aminosäure Valin. Wegen ihres geringen Durchmessers bildet sich eine Seitentasche, rot eingezeichnet, in die der selektive Inhibitor greifen kann (FITZGERALD et al., 2001).

1.13 Selektive Cox-2 Hemmer und die kardio-vaskulären Probleme

Man vermutete, dass bei der Einnahme von selektiven Inhibitoren gezielt nur die Schmerzen bekämpft werden. Da die Cox-1 in ihrer Eigenschaft als „house-keeping-enzyme“ hierbei nicht gehemmt wird, erhoffte man sich ein Ausbleiben der unerwünschten Nebenwirkungen (DRAZEN 2005).

In den letzten Jahren zeigte sich aber bei Einnahme der selektiven Cox-2 Inhibitoren ein erhöhtes Risiko für thrombembolische Komplikationen (MCADAM et al. 1999). Einen ersten Hinweis lieferte die VIGOR-Studie, in der 8076 Patienten mit rheumatoiden Erkrankungen für 9 Monate mit Rofecoxib (50mg/d) bzw. mit Naproxen (1000mg/d) behandelt wurden (VIOXX GASTROINTESTINAL OUTCOMES RESEARCH, 2000, BOMBARDIER et al. 2000). Dabei zeigte sich ein fünffach erhöhtes Risiko für einen Herzinfarkt und ein zweifach erhöhtes Risiko für einen Schlaganfall. Da das Studienkonzept aber keine Placebo-Kontroll-Gruppe einbezogen hatte, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt werden, ob die Einnahme des selektiven Cox-2-Inhibitors Rofecoxib das kardiale Risiko erhöht oder ob die Einnahme des unselektiven Inhibitors Naproxen eine kardioprotektive Wirkung zeigt (DRAZEN 2005). Eine weitere Studie unterstrich den Hinweis des kardiovaskulären Risikos der selektiven Cox-2 Inhibitoren (APPROVE, Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx). Hier kam es zu einem zweifachen Anstieg der kardialen Probleme bei den Patienten, die Rofecoxib einnahmen, im Gegensatz zu den Placebo einnehmenden Probanden (PAUL E. LANGTON et al. 2004).

Nachdem weitere Studien ähnliche Ergebnisse erbrachten und die kardiovaskuläre Problematik auf die selektive Senkung des vasodilatatorisch wirkenden Prostazyklins zurückgeführt wurde, während das Thromboxan A₂ unberührt blieb, nahm die Firma Merck im September 2004 Rofecoxib vom Markt. Die gleichzeitige Hemmung von Cox-1 und Cox-2 bei den nicht selektiven NSAR ist bei den selektiven Cox-2-Hemmern nicht gegeben und scheint durch die unbeeinflusste prothrombotische Wirkung des Thromboxans kardiovaskuläre Konsequenzen zu haben (FITZGERALD 2004). Eine abschließende Beurteilung des kardiovaskulären Risikos von selektiven Cox-2-Inhibitoren im Vergleich zu nicht selektiven Inhibitoren ist allerdings noch nicht möglich, da letztere nicht

systematisch in randomisierten, placebo-kontrollierten Studien untersucht worden sind.

1.14 Cox-2 und die Präferenz zu sekundären Enzymen

Auch wenn die Cyclooxygenasen mit verschiedenen sekundären Enzymen in einer Zelle arbeiten können, gibt es viele Hinweise darauf, dass die Isoformen der Cyclooxygenase eine Präferenz zu bestimmten sekundären Enzymen zeigen (CAUGHEY et al. 2001; UENO et al. 2001). Z.B. produzieren Peritoneal-Makrophagen der Ratten TXA_2 und PGD_2 über die Cox-1 und PGE_2 und PGI_2 über die Cox-2 (HARADA et al. 1996; NARABA et al. 1998; BROCK et al. 1999). Die PGE_2 Produktion der Osteoblasten findet vorrangig über die Cox-2 statt, auch wenn die Cox-1 ebenfalls präsent ist (CHEN et al. 1997; MURAKAMI et al. 1997). Ein weiteres Beispiel ist die biphasische Produktion von PGD_2 in aktivierten Maus-Mastzellen, bei der in der ersten, schnellen Phase vorrangig mit Cox-1, in der zweiten Phase vorrangig mit Cox-2 gearbeitet wird (MURAKAMI et al. 1994; MURAKAMI et al. 1995A; MURAKAMI et al. 1995B; REDDY UND HERSCHMAN 1997).

Ebenso konnten Ueno et al. in einem in vitro Experiment mit HEK 293 Zellen zeigen, dass die PCS der Cox-2 den Vorrang gibt (UENO et al. 2001). Auch in den Makrophagen wird PGI_2 vorrangig über die Cox-2 produziert (BROCK et al. 1999). Die Cox-2 stellt ebenso die Hauptquelle der systemischen PGI_2 -Biosynthese im Menschen dar (MCADAM et al. 1999). So ist verständlich, dass bei Gabe eines selektiven Cox-2-Hemmers sich die PGI_2 -Bildung reduziert (CULLEN et al. 1998; MCADAM et al. 1999).

1.15 Prostazyklin-Synthase

Die Prostazyklin-Synthase setzt PGH_2 zu Prostazyklin um (s. Abbildung 1-2). Das Enzym wurde in den 80er Jahren das erste Mal aus Rinderaorta aufgereinigt und ist ein Hämoprotein mit einem molekularen Gewicht von ca. 52 kiloDalton (kDa) (DEWITT UND SMITH 1983; WU UND LIU 2005). Als membrangebundenes Protein ist es im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (HARA et al. 1994). Die cDNS (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) der PCS wurde von Wang et al. aus Rinderaorta, von Hara et al. aus Endothelzellen des Rindes und schließlich von

Tanabe et al. aus menschlichen Endothelzellen aufgereinigt, wobei gezeigt werden konnte, dass in den Sequenzen eine hohe Übereinstimmung lag. Die PCS cDNS fasst ein 1500 Basenpaare (bp) großes offenes Leseraster, welches ein 500 Aminosäuren großes Protein von 56 kDa codiert (PEREIRA et al. 1993; HARA et al. 1994; MIYATA et al. 1994; WU UND LIOU 2005).

2002 konnte die Arbeitsgruppe um Yokoyama darstellen, dass bei PCS-knock-out-Mäusen verständlicherweise die PGI₂-Produktion im Plasma, der Niere und der Lunge nicht messbar war und die Thromboxan- und PGE₂-Produktion anstieg. Gleichzeitig traten aber auch ein erhöhter Blutdruck sowie Abnormalitäten in der Niere, wie z.B. Atrophie, Fibrose und Arteriosklerose, auf. Das bestätigte, dass PGI₂ wichtig für die Entwicklung der Blutgefäße sowie der Homeostase ist (YOKOYAMA et al. 2002).

1.16 Fragestellung

Wie bereits oben erläutert (s. 1.9), weisen die beiden Cyclooxygenasen zwar viele Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Sequenz, Struktur und Kinetik auf, besitzen aber auch einige Unterschiede.

Ein wesentlicher Unterschied liegt in den Strukturen der beiden Isoenzyme und hier ganz besonders im C-terminalen Ende. Hier befindet sich bei der Cox-2 eine hoch konservierte Sequenz von 18 Aminosäuren, welche die Cox-1 nicht aufweist. Eine weitere Differenz liegt in den Präferenzen der Enzyme zu den sekundären Synthesen. So arbeitet die Cox-2 bevorzugt mit der Prostazyklin-Synthase zusammen.

Zu klären wäre, ob diese beiden Unterschiede zwischen Cox-2 und Cox-1 miteinander zusammenhängen.

Daher bearbeitet diese Dissertation die Frage, ob der Carboxylterminus der Cyclooxygenase 2 eine selektive Kopplung zwischen dieser und der Prostazyklin-Synthase ermöglicht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen alle den Reinheitsgrad p.a. (pro analysis) und sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet:

Tabelle 2-1: verwendete Chemikalien, aufgelistet in alphabetischer Reihenfolge nach Substanz, Hersteller und Bestellnummer

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Agarose	Hybaid-AGS, Heidelberg, Deutschland	AGR 500
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland	A9393
Basenpaarleiter (1kbp)	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland	15615-016
Bromphenol-Blau	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland	Art: A512.1
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	K20380715535
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Sigma Aldrich Chemie	D-5758
Dinatriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck	1. 06586. 0500
Ethidumbromid	Sigma Aldrich Chemie	E – 8751
Full range Rainbow Molecular weight marker RPN 800	Sigma Aldrich Chemie	M9057
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	1. 04936. 1000
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck	1. 04936. 1000
MQ	Kobe, Marburg, Deutschland	
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel de Haen, Laborchemikalien GmbH + Co, Seelze, Deutschland	31 434
Select Peptone 140	Life Technologies GIBCOBRL	30392-039
Sucrose	Sigma Aldrich Chemie	S-9378
SOC-Medium	Invitrogen GmbH Karlsruhe, Deutschland	440 301
TrisBase	Carl Roth GmbH + Co,	4855.2
Yeast Extract	Becton Dickinson and Company, USA	21 270

2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 2-2: verwendete Lösungen, Puffer und Medien und deren Zusammensetzungen

Lösungen, Puffer und Medien	
PBS	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 136 mM NaCl 2,6 KCL pH 7,2
TAE-Puffer (50x)	242 g 2 M Tris-Base 57,1 ml 100% CH ₃ COOH 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 1000 ml MQ-H ₂ O
LB-Medium	10 g Peptone 2,5 g Yeast Extract 2,5 g NaCl 10 g Agar-Agar
LB-Agar-Platten	5 g Peptone 140 2,5 g Yeast Extract 2,5 g NaCl 10 g Agar-Agar 5 ml Ampicillin (5 mg/ml) 500 ml MQ-H ₂ O
SOC-Medium	20 g Tryptone 5 g Yeast Extract 0,5 g NaCl 1000 ml DEPC-H ₂ O
Gelladepuffer für Agarosegel	0,25 % Bromphenol Blau 40 % Sucrose in H ₂ O
5x TBE	5 mM Tris pH 8,5 445 mM Borsäure 10 mM EDTA

2.1.3 Antikörper

Der für die Western-Blot benötigte Cox-2 Antikörper (C-20) wurde von der Firma Santa Cruz Biotechnology bezogen. Der entsprechende Zweitantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, wurde von der Firma Dianova (Hamburg) geliefert.

2.1.4 Oligonukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma „Amersham pharmacia biotech“ aus Freiburg synthetisiert:

Tabelle 2-3: Sequenzen der Cox-2 und der Mutanten

	Sequenz 5' → 3'
Cox-2	ACG ATA GAC GCG AGC GCG AGC CAC AGC AGG CTG CAG AAC ATA GAC CCG ACG GTG CTG CTG AAG GGG AGG
Mut 1	ACG ATA GAC GCG AGC GCG AGC CAC AGC AGG CTG CAG GTT ATA GAC CCG ACG GTG CTG CTG AAG GGG AGG
Mut 2	ACG ATA GAC GCG AGC GCG AGC CAC AGC AGG CTG CAG AAC ATA GAC AAG ACG GTG CTG CTG AAG GGG AGG
Mut 3	ACG ATA GAC GCG AGC GCG AGC CAC AGC AGG CTG CAG AAC ATA GAC CTG ATA GTG CTG CTG AAG GGG AGG
Mut 4	ACG ATA GAC GCG AGC GCG AGC CAC AGC AGG CTG CAG AAC ATA GAC CCG ACG GTG AAG CTG AAG GGG AGG
Mut 5	ACG ATA GAC GCG AGC GCG AGC CAC AGC AGG CTG CAG ATA ATA GAC CCG ACG GTG CTG CTG AAG GGG AGG
Mut 6	ACG ATA GAC GCG AGC GCG AGG CAC AGC AGG CTG CAG AAC ATA GAC CCG ACG GTG CTG CTG AAG GGG AGG
Mut 7	ACG ATA CTG GCG AGC GCG AGC CAC AGC AGG CTG CAG AAC ATA GAC CCG ACG GTG CTG CTG AAG GGG AGG
Mut 8	ACG ATA GAC GCG AGC GCG AGC CAC AGC AGG CTG CAG AAC ATA GAC CCG ACG GTG CTG CTG AAG GGG AGG
Mut 9	ACG ATA GAC GCG AGC GCG AGC CAC AGC AGG CTG CAG AAC ATA GAC CCG ACG GTG CTG CTG AAG GGG AGG

2.1.5 Verwendete Kitsysteme

Tabelle 2-4: verwendete Kitsysteme

Verwendete Kitsysteme	Firmen
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Fa. Stratagene, La Jolla Californien
QIAprep® spin Miniprep Kit (250)	Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland
HiSpeed™ Plasmid Midi Kit (25)	Fa. Qiagen
TransFast™ Transfection Reagent	Fa. Promega, Mannheim, Deutschland

2.1.6 Geräte

Tabelle 2-5: Geräte und Hersteller, in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet

Geräte	Hersteller
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Blotapparatur Modell No. Mini-PROTEAN 3 cell Blotkammer Fastblot B43	Biorad, München, Deutschland Biometra, Göttingen, Deutschland
Cleanbench	Heraeus Instruments
Elektrophoresekammer	Hoefler, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Bensheim, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus Instruments
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Economy
Magnetumrührer Modell MR 3001 K	Heidolph Industrietechnik GmbH, Frankfurt a.Main, Deutschland
Milli-Q-Anlage	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Netzgeräte Consort Modell E321 Consort Modell E432 Standard Power Pack P25	Fröbel, Wasserburg, Deutschland Fröbel Biometria
PCR-Maschine, GeneAmp PCR, System 9700	Perkin Elmer, Analytical Instruments, Norwalk, USA

Fortsetzung Tabelle 2-5:

pH-Meter Mettler Delta 340	Mettler-Toledo, Halstead, England
Pipettierhilfe Pipettus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius Research, Göttingen, Deutschland
Schüttler Modell Tirtamax100	Heidolph Industrietechnik GmbH
Thermomixer 5436	Eppendorf
UV-Transluminator	Fröbel
Vortex Modell MS2 Minishaker	IKA Works, Wilmington, NC, USA
Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Waage Typ 510-33	Kern, Albstadt, Deutschland
Zentrifugen	
Tischzentrifuge	Heraeus Instruments
Kühlzentrifuge	Heraeus Instruments
Trocknungszentrifuge Speed vac	Kobe

2.1.7 Bakterienstämme

Bei den eingesetzten „One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E.coli“ handelt es sich um kompetente E.Coli-Zellen der Firma Invitrogen mit folgendem Genotyp:

$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 deoR araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$.

2.1.8 Zellkulturmaterialien

Tabelle 2-6: benötigte Zellkulturmaterialien, geordnet nach Material, Typ und Firma

Material	Typ	Firma
Zellkulturflaschen	200 ml Modell Nunclon TM D Surface	Fa. Nalge Europe Ltd, Neerijse, Belgium
Medien	EARL'S MEM (1x)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

Fortsetzung Tabelle 2-6:

Zusätze	Penicillin/Streptomycin (100x) L-Glutamin (100x) FCS MEM Non Essential Amino Acids (100 ×) Trypsin/EDTA (10x) Geneticin (G-418 Sulphate)	Fa. PAA Laboratories GmbH Fa. PAA Laboratories GmbH Fa. Bio Whittaker, Belgien Fa. PAA Laboratories GmbH Fa. PAA Laboratories GmbH Fa. Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Platten	2 well 24-well-Platten Modell Cellstar 60 mm Gewebekulturschalen Modell 10 cm Gewebekulturschalen Modell Cellstar	Fa. Nalge Europe Ltd Fa. Greiner Bio-one GmbH Frickenhausen, Deutschland Fa. Greiner Bio-one GmbH Fa. Greiner Bio-one GmbH
Objektträger	Modell Lab-Tek Chamber Slide System	Fa. Nalge Nunc International, Dänemark
Sonstiges	Thermanox® Plastic Coverslips Collagene Solution	Fa. Nalge Europe Ltd Sigma Aldrich Chemie

2.1.9 Zelllinie HEK 293

Bei der Zelllinie HEK 293 (human embryonic kidney cells) handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, die durch einen Adenovirus transformiert wurden. Nach der Zentralen Kommission für biologische Sicherheit (ZKBS) sind sie in die Risikokategorie eins eingeordnet (Quelle: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

Die Zellen wurden in EARL'S MEM (1x) Medium mit Zusatz von 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 100 µg/ml Glutamin, 10% hitzeinaktiviertem FCS (Vollmedium) und 100 µg/ml NEAA (non-essential amino acids) kultiviert.

2.1.10 Verwendete Vektoren

Folgender Vektor wurde zur Expression und Klonierung verwendet:

Expressionsvektor pcDNA 3.1+ / Neomycin (Fa. Invitrogen; Groningen; Holland)

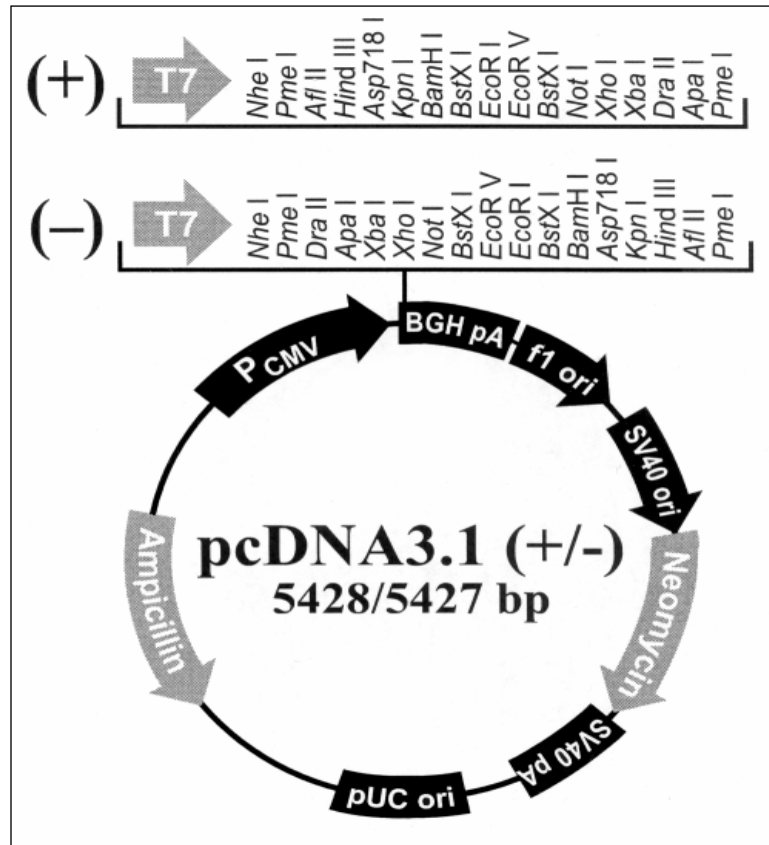


Abbildung 2-1: Expressionsvektor pcDNA 3.1 + / -

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) besteht aus einer Vervielfältigung von DNA-Sequenzen ohne die Hilfe eines lebenden Organismus, wie z.B. Bakterien. Das Verfahren wurde 1983 von Kary Banks Mullis entwickelt. Hierbei lagern sich Oligonukleotid-Primer an die denaturierten Einzelstränge an und werden mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase zu komplementären Doppelsträngen vervollständigt (MULLIS UND FALOONA 1987; SAIKI et al. 1988).

Das PCR-Verfahren wurde von uns im Zusammenhang mit der Mutagenese verwendet, bei der die Primer vorgefertigte Mutation enthielten und nur der restliche Strang komplementär zum ursprünglichen Vektor vervollständigt wurde.

Der folgende Ansatz wurde von uns gewählt:

Tabelle 2-7: PCR-Ansatz der Mutagenese

5 µl	10 fach Reaktionspuffer
1 µl	dNTP
2 µl	DMSO
1 µl	F-Primer
1 µl	R-Primer
1 µl	5 ng DNA
38 µl	Aqua dest.
1 µl	Pfu-Polymerase
50 µl	Gesamtvolumen

Der PCR-Prozess besteht im Allgemeinen aus 20 bis 30 Zyklen, wobei jeder Zyklus drei Schritte beinhaltet. Zu Beginn findet die Denaturierung statt, bei der die doppelsträngige DNA (dsDNA) auf 96° erhitzt wird, um die Stränge zu trennen.

Anschließend wird die Temperatur gesenkt, damit sich die Primer an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Dieser Schritt wird als Annealing (engl.: anlagern) bezeichnet. Im letzten Schritt (Elongation, Verlängerung) füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit Nukleotiden wieder auf. Sie beginnt am angelagerten Primer und folgt dann dem restlichen DNA-Strang.

In diesem Fall bestand ein Zyklus aus 30 Sekunden Denaturierung der dsDNA bei 95°C, die Anlagerung der Primer erfolgte für eine Minute bei 55 °C und die anschließende Synthese der dsDNA durch die DNA-Polymerase wurde für 11 Minuten bei 68°C angesetzt. Die Zyklenanzahl lag bei 17.

2.2.2 Mutagenese

Mit dem „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene ist es möglich, verschiedene Mutationen an DNA-Vektoren vorzunehmen.

In diesem Fall war der Ausgangsvektor ein Expressionsvektor, der für die wildtypische Cox-2 des Kaninchens kodiert. Dieser wurde durch vorher angefertigte mutagene Primer (Tabelle 2-3) mittels Polymerasekettenreaktion (s. 2.2.1) amplifiziert. Anschließend wurde das nun nicht mehr benötigte ursprüngliche Wildtyp-Plasmid durch Zugabe von Dpn 1 verdaut (s. 2.2.4). Durch eine Transformation (s. 2.2.5) in XL1-Blue SuperCompetent Cells wurden die freien Enden der mutierten Stränge wieder religiert. Nachdem die Klone über Nacht bei 37° C gewachsen waren, wurden Einzelkolonien isoliert (s. 2.5.5). Diese wurden mit dem Mini-Präp-Kit (Fa. Quiagen) aufgereinigt und anschließend sequenziert, um die Richtigkeit der Mutagenese zu überprüfen.

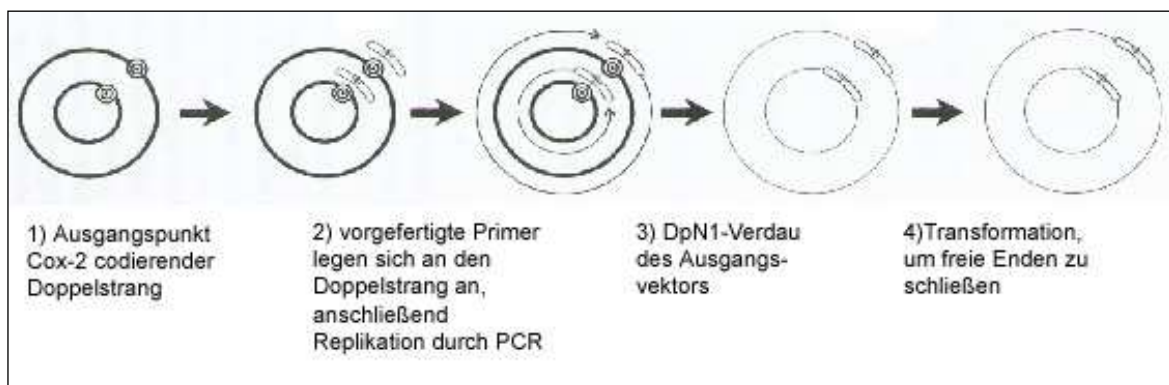


Abbildung 2-2: Mutageneseverfahren

(nach QuickChange™ Site-Directed Mutageneses Kit, Instructions, Stratagene)

2.2.3 Gel-Elektrophorese

Mit der horizontalen Gel-Elektrophorese ist eine Überprüfung von Größe und Reinheit der PCR-Produkte möglich. Das Prinzip beruht auf einer Auftrennung der DNA-Proben in unterschiedliche Längen.

Als Matrix wurde ein 1,5% iges Gel hergestellt, indem 0,9 g Agarose mit einem einfach TBE-Puffer in der Mikrowelle für ca. zwei Minuten erhitzt und so verflüssigt wurde. Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1% (10mg/ml) wurde das Gel in einen Schlitten gegossen, in den bereits Taschenkämme eingebracht waren.

Danach wurden jeweils 10 µl DNA-Proben mit 2 µl eines 6fachen Probenpuffers vermischt und in die vorgefertigten Kammern des polymerisierten Gels aufgetragen. 5 µl eines 1 kbp-Basenleiters wurde als Größenmarker ebenfalls mit aufgetragen.

Die Laufzeit betrug 45-60 Minuten bei 120 Volt und offenem Ampere. Mit einem UV-Transluminator (312 nm) wurden die Banden im Gel sichtbar gemacht und mit einem Photodokumentationssystem festgehalten.

2.2.4 DpN I – Verdau

Um den nun nicht mehr benötigten Wildtyp zu verdauen, wurden die verbliebenen 40 µl des PCR-Produktes mit 0,8 µl Restriktionsenzym DpN I versetzt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Restriktionsenzym DpN I schneidet nur die methylierte Ausgangs-DNA, so dass die nichtmethylierte mutagenisierte DNA für die Weiterverwendung verbleibt. Anschließend wurden auch hiervon wieder 10 µl entnommen und nach dem oben geschilderten Verfahren mittels Elektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe der Ultraviolettlampe sichtbar gemacht.

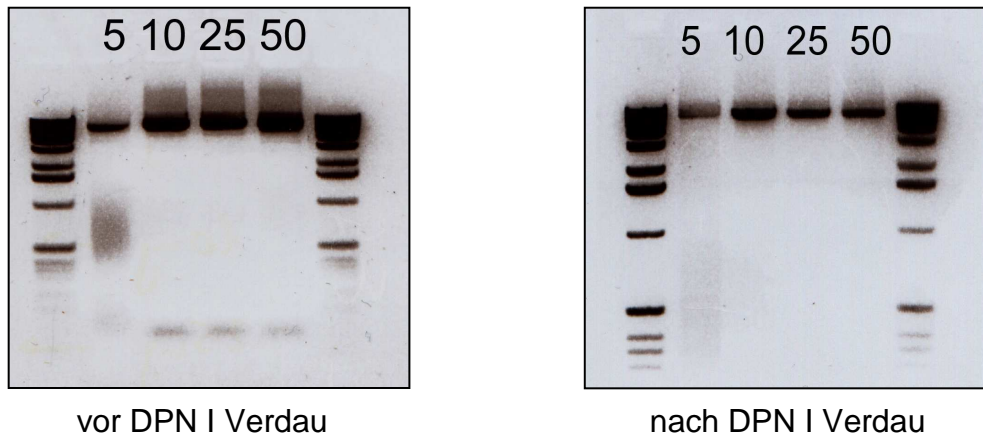


Abbildung 2-3: DPN I Verdau

2.2.5 Klonierungstechniken

Transformation

Die Transformation dient der Vervielfältigung von Vektoren in Bakterien (One shot Cells, Invitrogen).

Zu diesem Zweck wurden 2 μ l des Vektors zu 40 μ l Bakterien gegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgten 30 Sek. Hitzeschock bei 42 $^{\circ}$ C und anschließend weitere zwei Minuten Inkubation auf Eis.

Danach wurden 250 μ l SOC-Medium zu dem Transformationsansatz hinzugegeben und dieser für 60 Minuten bei 37 $^{\circ}$ C in einem Bakterieneschüttler inkubiert. Anschließend wurden 150 μ l des Ansatzes auf eine LB-Platte ausgestrichen.

LB steht für Luria Broth, welches die Salze, Aminosäuren und Zucker enthält, die Bakterien zum Wachsen benötigen.

Die Platte verblieb über Nacht in einem Brutschrank mit 37 $^{\circ}$ C und wurde mit ausgewachsenen Kolonien in akzeptabler Dichte entnommen und bis zur weiteren Verwendung mit Parafilm abgeklebt und im Kühlschrank gelagert.

Sequenzierung

Die Sequenzierungsmethode, die Ende der siebziger Jahre von den Nobelpreisträgern A. M. Maxam and W. Gilbert entwickelt wurde, dient zur Bestimmung der DNA-Sequenz (MAXAM UND GILBERT 1977). Es gibt heute mehrere Verfahren zum Ablesen der Sequenzinformationen von einem DNA-Molekül, noch finden aber überwiegend Weiterentwicklungen der Methode nach Frederick Sanger Verwendung.

Die Mutanten wurden alle auswärts von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH sequenziert, um so zu verifizieren, dass die Mutagenese erfolgreich verlaufen ist.

Isolierung von Einzelklonen

Die aus der Transformation gewonnenen Einzelklone, die über Nacht auf der Platte gewachsen waren, wurden unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Einzelne Kolonien konnten mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in LB-Medium, welches vorher mit Antibiotikum versetzt worden war, gegeben werden.

Diese wurden bei 37 °C in einem Bakterieneschüttler bei ca. 220 Umdrehungen pro Minute (engl.: rotations per minutes, rpm) über Nacht inkubiert.

Plasmidisolierung aus Bakterien

Mit dem „Hi Speed Plasmid Mini Kit“ von Qiagen konnte auf einfachem Wege Plasmid-DNA aus Bakterien, die am Vortag gepickt wurden, isoliert werden.

Das Kit macht sich zwei Eigenschaften zunutze:

zum einen die modifizierte alkalische Lyse nach Birnboim und Doly und zum anderen die Tatsache, dass sich in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen Plasmid-DNA an eine Silikonmembran bindet und sich bei niedrigen Salzkonzentrationen wieder von dieser löst.

Dafür wurden zuerst die Bakterienzellen per Zentrifugation für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C pelletiert.

Das entstandene Pellet wurde in 250 µl Puffer P1, der mit RNase A versetzt wurde, resuspendiert, 250 µl Puffer P2 wurden hinzugegeben und das

entstandene Lysat inkubierte für fünf Minuten bei Raumtemperatur, damit sich die Zellmembran auflöste.

Nach der Inkubationszeit wurden 6 ml des Puffers P3 zur Neutralisation zupipettiert. Das Lysat wurde für weitere 10 Minuten zentrifugiert (13000 rpm), der Überstand auf die vorgegebenen Säulen aufgetragen und per Zentrifugation durch die Säule gezogen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration des Puffers P3 blieb als einziges die Plasmid-DNA an der Membran hängen. Anschließend wurden die Salze durch die Zugabe von 750 µl PE ausgewaschen und dann die Probe mit 50 µl Aqua dest. eluiert.

Die hergestellten Mutationsvektoren wurden in ein Zellsystem gesetzt, um die enzymatische Aktivität zu messen.

Als Zellsystem wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) verwendet.

2.2.6 Zellkultur

Zellaufzucht

Die benötigten Zelllinien wurden in 200 ml Kulturflaschen mit 20 ml des entsprechenden Mediums kultiviert und in einem Begasungsbrutschrank mit einem Kohlendioxidanteil von 5 % und einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

Zur Erhaltung der Zellen wurden diese bei Bedarf mit 5ml PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen und verbrauchtes Medium zu entfernen, und mit 5 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Mit weiteren 5 ml Medium zum Neutralisieren wurden die Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 960 rpm und 20 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 9 ml resuspendiert und dieses auf drei neue Flaschen aufgeteilt, die mit 17 ml Medium aufgefüllt wurden.

Transfektion

Mit der Transfektion wird die Einschleusung von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen möglich.

Transiente Transfektion:

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag ausgesät und konnten bei einer Dichte von ca. 80 % mit der gewünschten DNA nach Anleitung des TransFast™ Transfection Reagent-Protokolls (Fa.Promega) transfiziert werden.

Nachdem zu dem nach Tabelle 2-8 erforderlichen FCS-freien Medium (fetal calf serum) die benötigte Menge an zu transfizierender DNA und die bereits angefertigte entsprechende TransFast-Reagenz-Stocklösung hinzugegeben war, konnte dieses Transfektionsgemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend wurde eine angegebene Menge des Transfektionsgemisches auf die mit PBS gewaschenen Zellen pipettiert. Nach weiteren 60 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die Wells mit der noch benötigten Menge an FCS-haltigem Medium aufgefüllt.

Um die Effizienz der transienten Transfektion zu überprüfen, wurde eine mikroskopische Immunfluoreszenz-Kontrolle durchgeführt. Dafür wurde ein GFP-Vektor in Zellen der gleichen Zelllinie transfiziert, der für ein Protein kodiert, welches grün fluoresziert.

Mit einem Fluoreszenzmikroskop konnten die Zellen bei einer Wellenlänge von 450 bis 490 nm betrachtet und so die Quantität der Transfektion bewertet werden.

Tabelle 2-8: TransFast™ Transfektion Reagent-Protokoll (Fa.Promega)

Mengenangaben für die transiente Transfektion, alle Angaben beziehen sich auf ein well bzw. eine Gewebeschale.

	96-well- Platte	24-well- Platte	2-well- Objektträger	60mm Gewebe- schale	10cm Gewebe- schale
Zellkulturmedium (FCS-frei)	40µl	200µl	400µl	2,2µl	5,8µl
DNA-Menge	0,2µg	1µg	2µg	11µg	29µg

Fortsetzung Tabelle 2-8:

TransFast- Reagenz- Stocklösung	0,6µl	3µl	6µl	33µl	87µl
Aufzufüllendes Zellkulturmedium (FCS-frei)	200µl	1ml	2,5ml	5ml	10ml

2.2.7 Arachidonsäure – Stimulation

Durch die Arachidonsäure (AA) - Stimulation ist es möglich festzustellen, wie die Zellen auf exogene Zugabe von Arachidonsäure reagieren, indem man anschließend die Prostaglandine im Überstand misst.

48 Stunden nach der transienten Transfektion mit DNA, welche für prostaglandinbildende Enzyme codiert, wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und für 40 Minuten mit neuem Medium versetzt, welches die Arachidonsäure in der benötigten Konzentration enthielt.

Bei einer basalen Arachidonsäurekonzentration von 3 bis 4 µg/ml erhielt man bei Zugabe von 10 µg/ml eine maximale und bei Zugabe von 25 µg/ml eine supramaximale Stimulation.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellüberstände entnommen und die darin enthaltenen Prostaglandine bestimmt.

2.2.8 Prostaglandinanalytik

Die Prostaglandinanalytik erlaubt es mittels Zellüberstandsmessungen Prostaglandine, die in der Zelle produziert wurden, zu bestimmen und diese zu vergleichen.

Die hierfür benötigten Überstände wurden nach der transienten Transfektion der Zelle mit DNA, die für prostaglandinbildende Enzyme codiert, nach einer Inkubationszeit von 48 h entnommen.

In einem Isotopen-Dilutionsassay konnten die gebildeten Prostaglandine (Prostaglandin E₂, 6-keto-Prostaglandin F₁α, Thromboxan B₂, Prostaglandin D₂, Prostaglandin F₂α und Isoprostane) durch gas-chromatography-triple-stage-quadrupole-mass-spectrometry (GC-MS-MS) nachgewiesen werden.

Dieses Verfahren sieht vor, die Prostaglandine, nach Hinzufügen von deuterierten internen Standards, erstmals zu ihren Methoximen zu derivatisieren und mit Ethyl-Hexan zu extrahieren. Daran schlossen sich eine weitere Derivatisierung der Proben zu Pentafluorobenzylestern und eine Reinigung mit Dünnschichtchromographie an.

Nachdem die Prostaglandinderivate in ihre Trimethylsilyl-Ether umgewandelt wurden, konnten die Produkte per GC-MS-MS (s. vorherige Seite) quantifiziert werden. Hierzu wurde ein Finnigan MAT TSQ700 Tandem Massenspektrometer herangezogen, welcher mit einem Varian 3400 Gaschromatographen und einem CTC A200S Autosampler (Fa. Finnigan MAT, Bremen) ausgestattet war (SCHWEER et al., 1993).

2.2.9 Proteinnachweis

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe gewährleistet die quantitative Übereinstimmung der verwendeten Proben im Western-Blot.

Hierfür wurde das DC Protein Assay Protokoll der Firma Bio-Rad herangezogen.

Neben den benötigten BSA-Standards (zwischen 0,2 µg/ml und 1,2 µg/ml) wurden die Proben 1:10 in Lysepuffer verdünnt. Zugegeben wurden jeweils 250 µl Reagenz A', welches sich aus Reagenz S und Reagenz A in einem Verhältnis von 1:50 zusammensetzte. Nach kurzem Vortexen wurden jeweils 2 ml von Reagenz B dazugegeben und ebenfalls durch Vortexen gut durchmischt. Anschließend erfolgte eine Inkubationszeit von 15 Min. bei Raumtemperatur.

200µl jedes Ansatzes wurden in eine 96-well-plate pipettiert, um die optische Dichte bei 650nm mit einem Elisa-Reader zu messen.

Western-Blot

Das Western-Blot-Verfahren dient dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran, welche anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können.

Die benötigten Lösungen wurden wie folgt angesetzt:

Tabelle 2-9: Western-Blot-Lösungen

Western-Blot-Lösungen	
Laufpuffer	1,2 % Tris-Base 0,1 % SDS 0,8 % Glycin ad 1000 ml MQ-H ₂ O pH 8.8
Waschpuffer	1,6 % Tris-HCL 0,9 % NaCl 0,05 % Tween pH 8,0 1000 ml MQ-H ₂ O
Blotpuffer	200 ml Methanol 2,42 g Tris-Base 11,26 g Glycin ad 1000 ml MQ-H ₂ O
Stoppuffer	1,6 % Tris-HCL 0,9 % NaCl 0,005 % Tween 1 % BSA pH 7.5

Zur Herstellung des Trenn- bzw. Sammelgels wurden benötigt:

Tabelle 2-10: Trenn- und Sammelgel

Gele	
Trenngel 10%	2,3 ml 30 % Acrylamid 3,4 ml Tris-SDS pH 8.8 1,2 ml MQ-H ₂ O 40 µl 10 % APS 10 µl Temed

Fortsetzung 2-10:

Sammelgel 4%	0,3 ml 30 % Acrylamid 1,0 ml Tris-SDS ph 6.8 0,8 ml MQ-H ₂ O 10 µl 10 % APS 3 µl Temed
--------------	---

Tabelle 2-11: Probengewinnung

Probengewinnung	
Lysepuffer	1,5 g 0,125 M Tris-Base 4 g SDS 20 g Glycerol 1 % Bromphenolblau Ad 100 ml MQ-H ₂ O pH 6,8

Nach Aussaat von HEK 293 in 6er Loch Platten in einer Dichte von 700 000 Zellen und Transfektion der zu untersuchenden DNA wurden die Zellen nach 48 h einmalig mit PBS gewaschen und mit 500 µl Lysepuffer abgelöst.

Das Lysat wurde für fünf Min. bei 95 °C aufgekocht und mehrmals durch eine 24G-Nadel aufgezogen, um die Zellkerne zu zerstören.

Die Lagerung der Proben erfolgte vor der Zugabe von β-Mercaptoethanol bei - 20 °C.

Probenaufbereitung:

Zur Verwendung der Proben für den Western-Blot wurden die benötigten Mengen, die durch die vorangesetzte Proteinbestimmung eine quantitativ gleichwertige Menge an Proteinen aufwiesen, mit β-Mercaptoethanol (1 µl pro 50 µl Probe) versetzt und nochmals bei 95°C für fünf Min. aufgekocht.

Durchführung:

Neben 10 µl des Proteingrößenstandards „Full range Rainbow Molecular weight marker RPN 800“ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, England) wurden in jede Tasche 50 µg Protein aufgetragen.

Die sich daran anschließende gelelektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte für 75 Minuten bei 100 Volt.

Hierbei wird das Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix entsprechend ihrer Größe oder Ladung aufgetrennt. Dabei migrieren die zu untersuchenden Proteine zuerst innerhalb des halbfesten Trägermaterials, so dass sich ein charakteristisches Muster unterschiedlich großer Proteinbanden ergibt.

Die nun aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Blotapparatur, die für weitere 75 Minuten bei 200 mA arbeitete, über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. An der Membranoberfläche bleiben diese aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten.

Anschließend wurden die Proteinbanden mit Ponceau-Rot angefärbt, um die Qualität und die Quantität des Western-Transfers zu überprüfen.

Um die Proteine zu visualisieren, schloss sich eine Immunodetektion an. Dabei bindet ein antigenspezifischer Primär-Antikörper an Epitope des gesuchten Proteins. An den primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, über welchen die Detektion erfolgt.

Das Verfahren erfolgt in mehreren Schritten:

Die Nitrozellulosemembran wurde zunächst dreimal für fünf Min. mit Waschpuffer gewaschen und dann für eine Stunde in 50 ml Stopppuffer gelegt, um die unspezifischen bzw. freien Bindungsstellen auf der Membran für den Primärantikörper zu blockieren. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgte mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein oder chemischen Polymer (Milchpulver oder bovine serum albumin, BSA).

Zur eigentlichen Detektion der Proteinbanden wurden zwei Antikörper verwendet. Der Erst-Antikörper bindet während der einstündigen Inkubationszeit an einen spezifischen Teil des Proteins. Um den ungebundenen bzw. unspezifisch gebundenen Antikörperüberrest zu entfernen, wurde die Membran dreimal für fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurde für eine weitere Stunde die Membran mit dem Sekundär-Antikörper bei RT inkubiert. Dieser mit Peroxidase konjugierte spezifische Zweit-Antikörper ist gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet und dient dazu, den gebundenen Erst-Antikörper zu

detektieren. Auch hier wurde zur Entfernung der unnötigen Reste ein Waschschrift von dreimal 20 Minuten angeschlossen.

Nun folgt die Visualisierung:

Eine enhanced chemiluminescent Lösung (ECL, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, England), wurde in einem 1:1 Verhältnis gemischt und für eine Minute auf die Membran gegeben. Die am zweiten Antikörper gebundene Peroxidase oxidiert das Luminol des ECL. Das durch die Oxidation angeregte Luminol fällt anschließend unter Lichtemission in den Grundzustand zurück. Das dabei ausgesandte Licht wurde mittels Röntgenfilmauflage (Typ Hyperfilm ECL, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, England) registriert.

2.2.10 Statistik

Die gesamten Daten der durchgeführten Statistik wurden mit SPSS 12.0 für Windows eingelesen und statistisch analysiert.

Die paarweise angelegten Vergleiche wurden mit Hilfe des T-Testes auf Signifikanz geprüft.

Bei einem T-Test handelt es sich um einen Mittelwertsvergleich. Hier wird anhand der (statistischen) t-Verteilung überprüft, ob sich die Mittelwerte zweier Testreihen signifikant unterscheiden. Vor Durchführung eines Signifikanztests muss festgelegt sein, bei welchem Signifikanzniveau die Nullhypothese abgelehnt wird (LANGE UND BENDER, 2001).

In diesem Fall besagte die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied bezüglich des Verhältnisses PGE/6-keto-PGF_{1α} zwischen der Cox-2 und den Mutanten gibt. Das Signifikanzniveau wurde für alle Versuche (n=3) mit $p < 0,05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

Wie bereits beschrieben, wurde der C-Terminus, der die Cox-2 von der Cox-1 unterscheidet, verändert, um so zu erforschen, ob dieser C-Terminus für die etwaige Bindung der Cox-2 an die Prostazyklin-Synthase verantwortlich ist.

3.1 Ergebnisse der Mutagenese

Mit Hilfe des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Erläuterung unter 2.2.2 Mutagenese) wurden 9 Mutanten (M1-M9) der Cox-2 konstruiert, bei der jeweils der C-Terminus in einer anderen Form verändert wurde. Wie man in Tab 3.1 erkennen kann, wurden bei den ersten sieben Mutanten entweder Punktmutationen durchgeführt und dabei nur einzelne Aminosäuren ausgetauscht oder mehrere aufeinander folgende Aminosäuren verändert. Bei den letzten beiden Mutanten wurde ein Teil des C-Terminus bzw. der komplette C-Terminus entfernt. Bei diesem handelt es sich um Deletionsmutationen. Zur besseren Übersicht sind die Aminosäuren in einem Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben, welcher in Tabelle 3-2 erläutert wird.

Tabelle 3-1: Mutantentabelle, dargestellt in einem Ein-Buchstaben-Code (zur Erläuterung s. Tabelle 3-2)

Mutanten					
Cox-2	TINASA	SHSRLE	DIN	PTV	LLKGR
M1	TINASA	SHSRLE	VIN	PTV	LLKGR
M2	TINASA	SHSRLE	DIN	KTV	LLKGR
M3	TINASA	SHSRLE	DIN	LIV	LLKGR
M4	TINASA	SHSRLE	DIN	PTV	KLKGR
M5	TINASA	SHSRLE	IIN	PTV	LLKGR
M6	TINASA	RHSRLE	DIN	PTV	LLKGR
M7	TILASA	SHSRLE	DIN	PTV	LLKGR
M8	TINASA	SHSRLE	DIN	PTV	LLKGR
M9	TINASA	SHSRLE	DIN	PTV	LLKGR

Tabelle 3-2: Ein-Buchstaben-Code

Die Tabelle zeigt die 20 Aminosäuren, unterteilt in ihre unterschiedlichen Eigenschaften wie Polarität, Säuregrad und Hydrophobizität. Zur besseren Übersicht wurden die Aminosäuren in einem Ein-Buchstaben-Code verschlüsselt (modifiziert aus biochemieonline)

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Polarität/Ladung	Säuregrad	Hydrophobizität
Alanin	A	unpolar	neutral	-0,4
Arginin	R	geladen polar	basisch	-0,59
Asparagin	N	ungeladen polar	neutral	-0,92
Asparaginsäure	D	geladen polar	sauer	-1,31
Cystein	C	ungeladen polar	neutral	0,17
Glutamin	Q	ungeladen polar	neutral	-1,22
Glutaminsäure	E	geladen polar	sauer	-0,91
Glycin	G	unpolar	neutral	-0,67
Histidin	H	geladen polar	basisch	-0,64
Isoleucin	I	unpolar	neutral	1,25
Leucin	L	unpolar	neutral	1,22
Lysin	K	geladen polar	basisch	-0,67
Methionin	M	unpolar	neutral	1,02
Phenylalanin	F	unpolar	neutral	1,92
Prolin	P	unpolar	neutral	-0,49
Serin	S	ungeladen polar	neutral	-0,55
Threonin	T	ungeladen polar	neutral	-0,28
Tryptophan	W	unpolar	neutral	0,5
Tyrosin	Y	ungeladen polar	neutral	1,67
Valin	V	unpolar	neutral	0,91

3.2 Mutantenbeschreibung

Durch die Mutation des Carboxylterminus der Cox-2 wurden verschiedene Veränderungen sowohl in ihrer Struktur, indem durch Deletionmutationen mehrere Aminosäuren fehlen, als auch in ihren physikochemischen Eigenschaften herbeigeführt. Letzteres betrifft die Hydrophobizität, den Säuregrad und die Polarität bzw. den Ladungszustand.

Mutante 1

Die Mutante 1 wurde dahingehend verändert, dass statt der Aminosäure Asparaginsäure die Aminosäure Valin eingebaut wurde.

Asparaginsäure ist eine saure, polar geladene Aminosäure. Valin ist eine neutrale, unpolare Aminosäure. So wurde in dieser Mutation nicht nur der Säuregrad, sondern auch die Polarität geändert. Verändert wurde ebenfalls die Hydrophobizität, die von - 0,92 in + 0,91 umgewandelt wurde.

Mutante 2

Bei der 2. Mutante wurde ebenfalls eine Punktmutation durchgeführt und die Aminosäure Prolin in die Aminosäure Lysin umgewandelt.

Dadurch wurde der ursprünglich neutrale Säuregrad in einen basischen verändert und die unpolare Eigenschaft in eine geladen polare verkehrt. Die Hydrophobizität veränderte sich nur schwach von - 0,49 auf - 0,67.

Mutante 3

Bei der Mutante 3 wurden zwei Punktmutationen durchgeführt. Zum einen wurde statt der Aminosäure Prolin die Aminosäure Leucin und zum anderen die Aminosäure Threonin in die Aminosäure Isoleucin umgewandelt. Auch wenn der Austausch der ersten Aminosäure keine Auswirkungen bezüglich des Säuregrades oder der Polarität zeigt, so ergibt sich doch eine umso stärkere Veränderung in der Hydrophobizität, nämlich von - 0,49 auf + 1,22.

Die Mutation der zweiten Aminosäure brachte eine Veränderung in der Polarität und Hydrophobizität. Die ungeladen polare Ladung des Threonin wurde durch die Mutation zu Isoleucin zu einer unpolaren Ladung. Die Hydrophobizität kehrt sich von - 0,28 in + 1,22 um. Der neutrale Säuregrad ist bei beiden gegeben.

Mutante 4

Die 4. Mutation wurde ebenfalls als eine Punktmutation durchgeführt. Die Aminosäure Leucin wurde mit ihrem neutralen Säuregrad und ihrer unpolaren Ladung in die Aminosäure Lysin mutiert. Letztere zeigt nun ein basisches

Verhalten mit einer geladenen Polarität. Die Hydrophobizität wurde ebenfalls verändert.

Die ursprüngliche Aminosäure Leucin hat eine Hydrophobizität von + 1,22, während die Aminosäure Lysin eine Hydrophobizität von - 0,67 aufweist.

Mutante 5

Hier wurde die Aminosäure Asparaginsäure in die Aminosäure Isoleucin verändert.

Weder der Säuregrad, die Polarität noch die Hydrophobizität wurden dabei beibehalten. Ersteres wechselte von einer sauren Eigenschaft in einen neutralen Säuregrad, die Polarität änderte sich von einer geladen polaren Ladung in eine unpolare und letztere wurde von - 0,92 in + 1,25 verändert.

Mutante 6

Die vorletzte Punktmutation wurde durchgeführt, indem die Aminosäure Serin in die Aminosäure Arginin mutiert wurde. Auch hier änderten sich die Aminosäureeigenschaften. So wurde aus dem ursprünglich neutralen Säuregrad der Aminosäure Serin durch die Umwandlung in die Aminosäure Arginin ein basischer Säuregrad. Genauso änderten sich die Polaritäten. Hier wurde die ungeladen polare Eigenschaft des Serins in die geladen polare Eigenschaft des Arginins umgewandelt. In der Hydrophobizität ergab sich zwischen den ursprünglichen - 0,55 der Aminosäure Serin und dem - 0,59 der Aminosäure Arginin kein großer Unterschied.

Mutante 7

Die Punktmutation der Mutante 7, bei der die Aminosäure Asparagin in die Aminosäure Leucin verändert wurde, hat als Konsequenz eine Wandlung der Polarität von polar zu unpolar. Ebenso änderte sich die Hydrophobizität von - 0,92 in nun + 1,22. Der Säuregrad wurde bei dieser Mutante beibehalten.

Mutante 8 und Mutante 9

Die beiden folgenden Mutanten 8 und 9 sind Deletionsmutanten, bei denen nicht nur einzelne Aminosäuren vertauscht wurden, sondern mehrere Aminosäureabfolgen entfernt wurden, ohne sie zu ersetzen.

Bei der Mutante 8 wurde der komplette Carboxylterminus entfernt. Bei der Mutante 9 wurden die ersten 9 Aminosäuren des Carboxylterminus gestrichen; hierbei handelt es sich um die Aminosäuren Serin, Histidin, Arginin, Leucin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Isoleucin und Asparagin.

Zusätzlich zu den aufgezählten Aminosäuren fehlen bei der Mutante 8 noch folgende Aminosäuren: Prolin, Threonin, Valin, Lysin und Glycin.

3.3 Prostaglandin-Bestimmung

3.3.1 Cox-1 und Cox-2 bei basaler Arachidonsäure (AA)

Zur Bestimmung und Bewertung der Prostaglandinbildung in den angefertigten Mutanten ist es notwendig, die Prostaglandinproduktion der nativen Cox-2 zu kennen.

Daher wird in Abbildung 3-1 ein HEK 293-Zellsystem (Erläuterung unter 2.1.9) unter basalen Arachidonsäure-Konzentrationen dargestellt, das jeweils mit Cox-1 + PCS (Prostazyklin-Synthase) und Cox-2 + PCS transfiziert wurde. Die PCS wird zur Bildung von Prostazyklin aus PGH_2 benötigt (s. Abbildung 1-2). Da Prostazyklin selbst aufgrund der geringen Halbwertszeit nicht bestimmt werden kann, wird das äquivalent vorhandene stabile Abbauprodukt 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ herangezogen. Ein Kontrollvektor (pcDNA 3.1 + Vektor) wurde immer mitbestimmt.

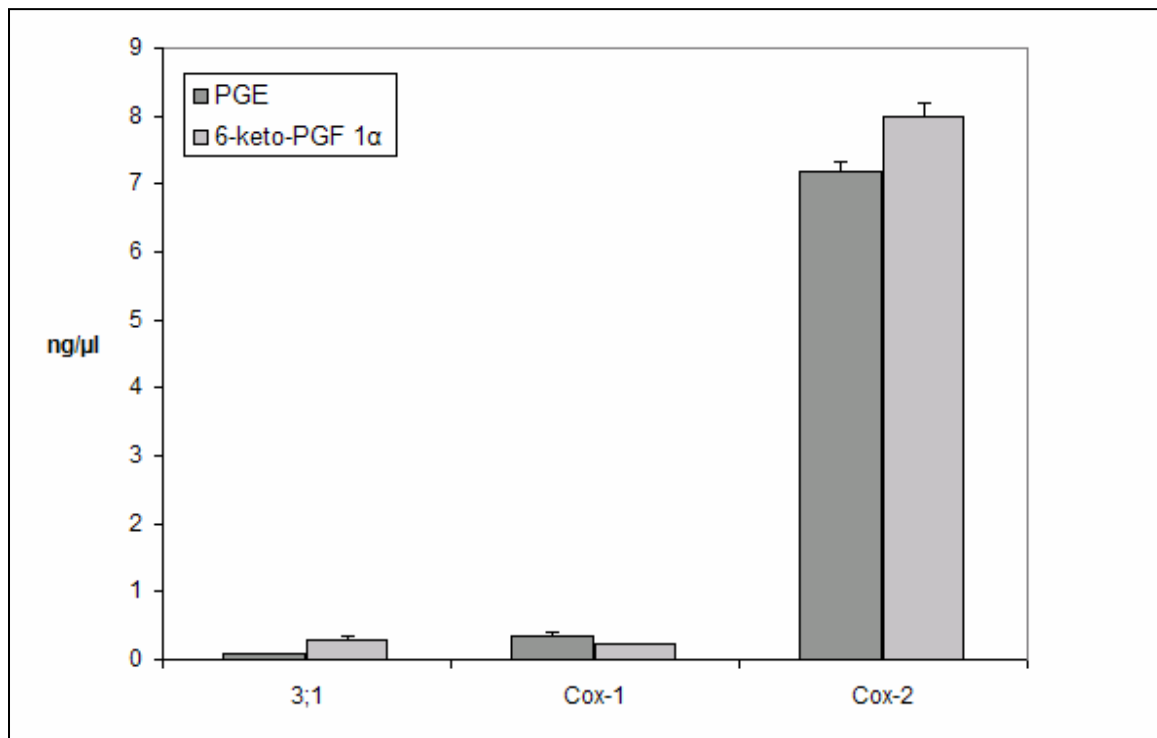


Abbildung 3-1: Cox-1 und Cox-2 transient transfiziert in HEK 293 bei basaler Arachidonsäurekonzentration

Cox-1, Cox-2 und der Kontrollvektor 3.1 wurden bei basaler Arachidonsäurekonzentration zusammen mit PCS transient in Hek-293 transfiziert und anschließend die Prostazyklin- und die PGE₂-Bildung im Mittelüberstand (ng/μl) gemessen. Die Daten ergaben sich aus jeweils drei Schälchen pro Gruppe ± Standardabweichung.

Die hellgraufarbigen Säulen stellen die Prostazyklin-Bildung dar, die dunkelgraufarbigen Säulen zeigen die PGE₂-Bildung.

In Abbildung 3-1 ist zu erkennen, dass bei basaler Arachidonsäurekonzentration die Zellen, die mit dem Kontrollvektor 3.1 plus PCS transient transfiziert wurden, nur geringe PGE₂-Werte, nämlich von 0,097 ng/μl und 6-keto-PGF_{1α}-Werte von 0,303 ng/μl, gebildet haben. Die Zellen, die mit Cox-1 plus PCS transient transfiziert wurden, produzierten nur eine gering größere Menge an Prostaglandin, nämlich PGE₂ um 0,319 ng/μl und 6-keto-PGF_{1α} um 0,224 ng/μl.

Im Gegensatz dazu wurde bei der Cox-2, die ebenso zusammen mit der PCS transient transfiziert wurde, sowohl ein Anstieg der PGE₂-Bildung als auch ein Anstieg der Prostazyklin-Bildung gemessen. Ersteres beträgt 7,2 ng/μl und letzteres 7,9 ng/μl.

Während sich das Verhältnis von PGE₂ zu 6-keto-PGF_{1α} bei der Cox-1 zugunsten des PGE₂ verändert, findet sich bei der Cox-2 eine größere Produktion von 6-keto-PGF_{1α}.

3.3.2 Cox-1 und Cox-2 bei supramaximaler AA

Um aufzuzeigen, wie sich das Zellsystem unter Stimulation von Arachidonsäure verhält, wurden erneut HEK 293 Zellen mit Cox-1 + PCS und Cox-2 + PCS transient transfiziert und die Prostaglandinproduktion unter supramaximaler Arachidonsäure-Stimulation (10 μ M) bestimmt. Auch hier wurde der Kontrollvektor 3.1 wieder mitgeführt.

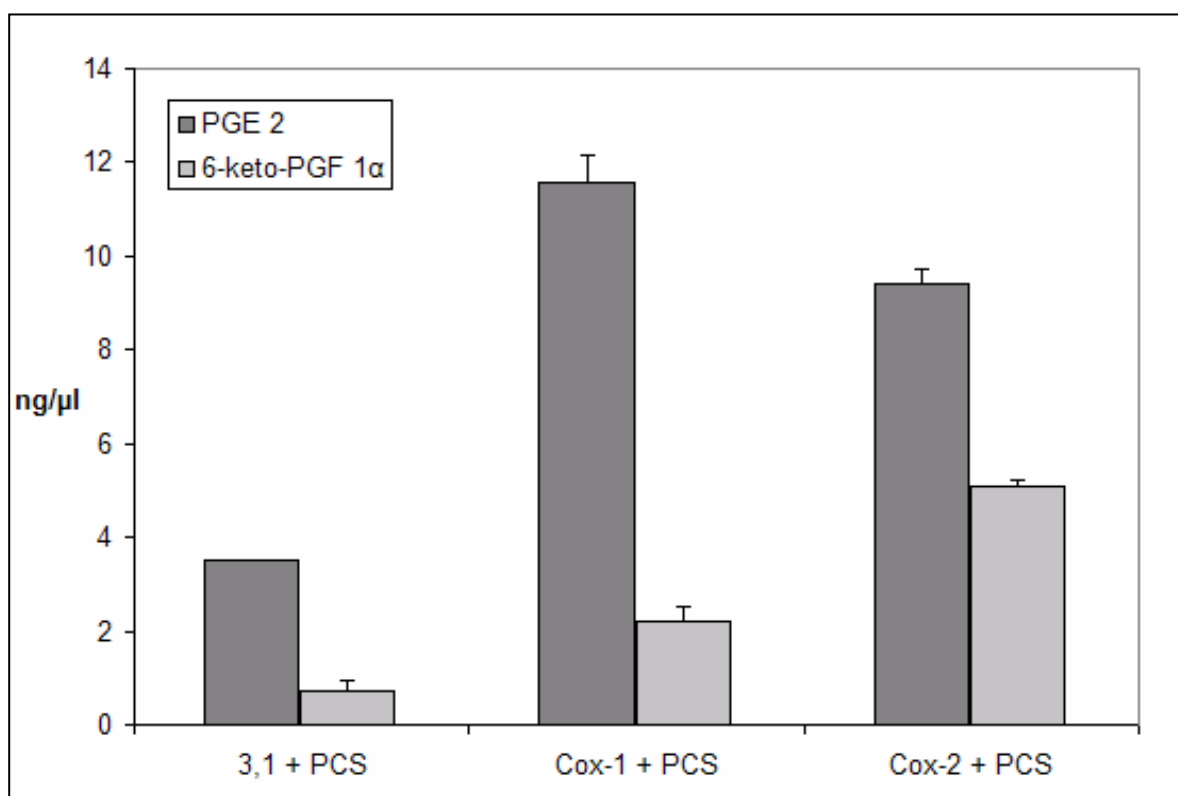


Abbildung 3-2: Cox-1 und Cox-2 transient transfiziert in HEK 293 bei supramaximaler Arachidonsäure-Stimulation

Die Abb. zeigt die Prostazyklin- und PGE₂-Bildung des 3.1-Kontrollvektors, der Cox-1 und der Cox-2 jeweils mit der PCS transient transfiziert in Hek-293 unter supramaximaler Arachidonsäure-Stimulation. Die Daten ergaben sich aus jeweils drei Schälchen pro Gruppe \pm Standardabweichung.

In Abbildung 3-2 erkennt man eine erhöhte Prostaglandinbildung bei allen drei Vektoren.

Während bei der Cox-1 + PCS die PGE₂-Werte auf ca. 11,67 ng/μl und die 6-keto-PGF_{1α}-Werte auf ca. 2,58 ng/μl steigen, belaufen sich die PGE₂-Werte bei den Zellen, die mit Cox-2 + PCS transfiziert wurden, auf ca. 9,6 ng/μl und die 6-keto-PGF_{1α}-Werte auf ca. 5,08 ng/μl.

Auch beim Kontrollvektor 3.1 konnte eine vermehrte Prostaglandinproduktion bestimmt werden. Diese liegt für den PGE₂-Wert bei ca. 3,51 ng/μl und für den 6-keto-PGF_{1α}-Wert bei 0,76 ng/μl.

3.3.3 PGE₂-Bildung bei basaler und supramaximaler AA

In den beiden folgenden Säulendiagrammen ist der Unterschied der PGE₂-Bildung und der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung bei basaler und supramaximaler Arachidonsäure-Stimulation verdeutlicht.

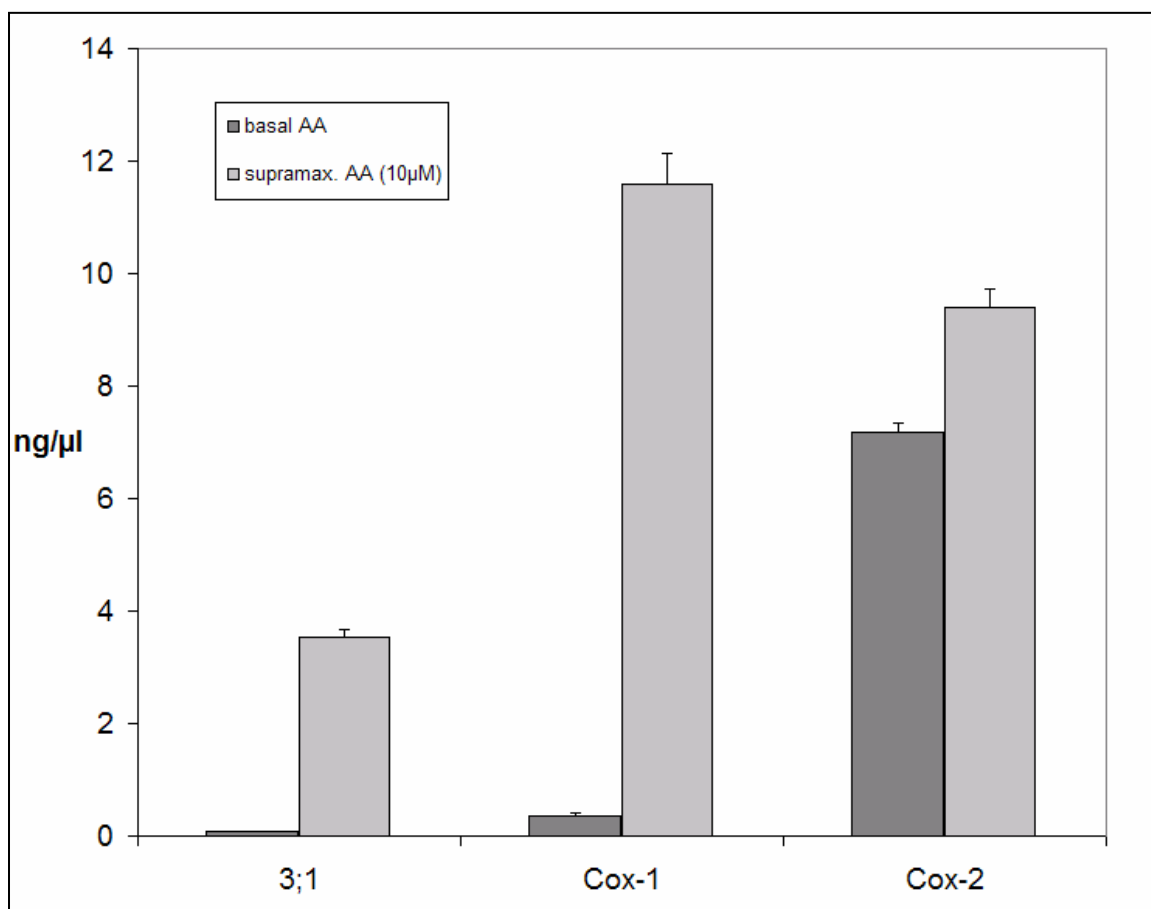


Abbildung 3-3: PGE₂-Bestimmung bei 3.1 Kontrollvektor, Cox-1 und Cox-2 transient transfiziert in HEK 293

Hierbei wurde einerseits bei basaler Arachidonsäurekonzentration, andererseits bei supramaximaler Arachidonsäurekonzentration die PGE₂-Bildung gemessen.

Abbildung 3-3 zeigt bezüglich des Kontrollvektors 3.1 eine Steigerung der PGE₂-Bildung von 0,097 ng/μl auf 3,511 ng/μl, d.h. eine Erhöhung um das 36-fache.

Ebenfalls um das 36-fache hat sich die PGE₂-Bildung der Cox-1 gesteigert, nämlich von 0,319 ng/μl auf 11,687 ng/μl.

Die PGE₂-Bildung der Cox-2 hat sich lediglich um das 1,33-fache erhöht, von 7,2 ng/μl auf 9,601 ng/μl.

3.3.4 6-keto-PGF_{1α}-Bildung bei basaler und supramaximaler AA

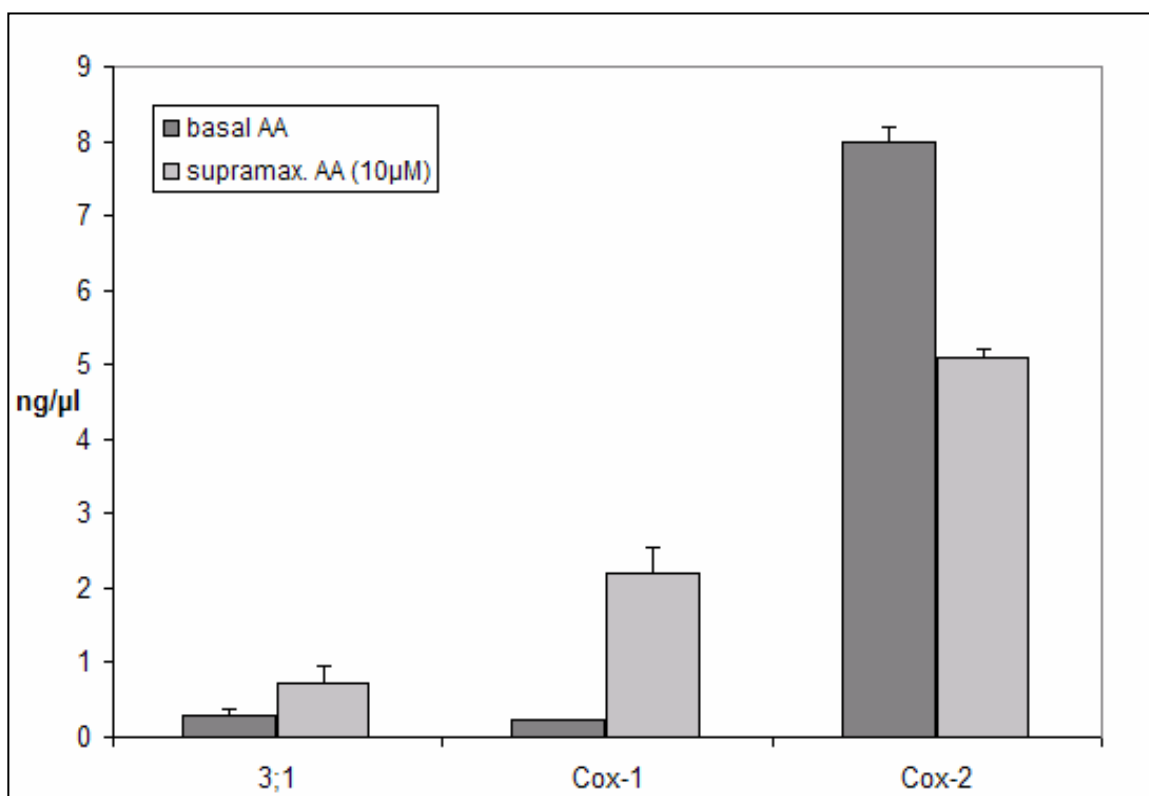


Abbildung 3-4: 6-keto-PGF_{1α}-Bildung bei 3.1-Kontrollvektor, Cox-1 und Cox-2

Das Säulendiagramm zeigt die 6-keto-PGF_{1α}-Bildung des 3.1-Kontrollvektors, der Cox-1 und der Cox-2 im Unterschied zwischen basaler Arachidonsäurekonzentration und supramaximaler Arachidonsäure-Stimulation (10 μM).

In der Abbildung 3-4 ist eine Steigerung der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung des 3.1 Kontrollvektors um das 2,5-fache zu erkennen, nämlich von 0,303 ng/μl auf 0,76 ng/μl. Ebenso ist ein Anstieg der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung der Cox-1 von 0,244 ng/μl auf 2,58 ng/μl zu verzeichnen, d.h. eine Steigerung um das 11,54-fache.

Die 6-keto-PGF_{1α}-Bildung der Cox-2, die bei der basalen Arachidonsäurekonzentration bei 7,906 ng/μl liegt, erfährt hingegen keine weitere Steigerung bei der supramaximalen Arachidonsäure-Stimulation, sondern liegt mit 5,08 ng/μl unter dem basalen Wert.

Aus den relativen Werten der Abbildung 3-2 ist zu entnehmen, dass nach der Arachidonsäure-Stimulation zwar die absolute Menge der 6-keto-PGF_{1α}-

Produktion der Cox-2 reduziert wurde, das Verhältnis von Prostazyklin zu PGE₂ aber immer noch höher ist als das der Cox-1, nämlich ein Drittel zu einem Fünftel.

3.3.5 Prostaglandinbildung der Mutanten

Zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit und damit der Prostaglandinbildung der Mutanten wurden diese in ein HEK 293-Zellsystem transient transfiziert.

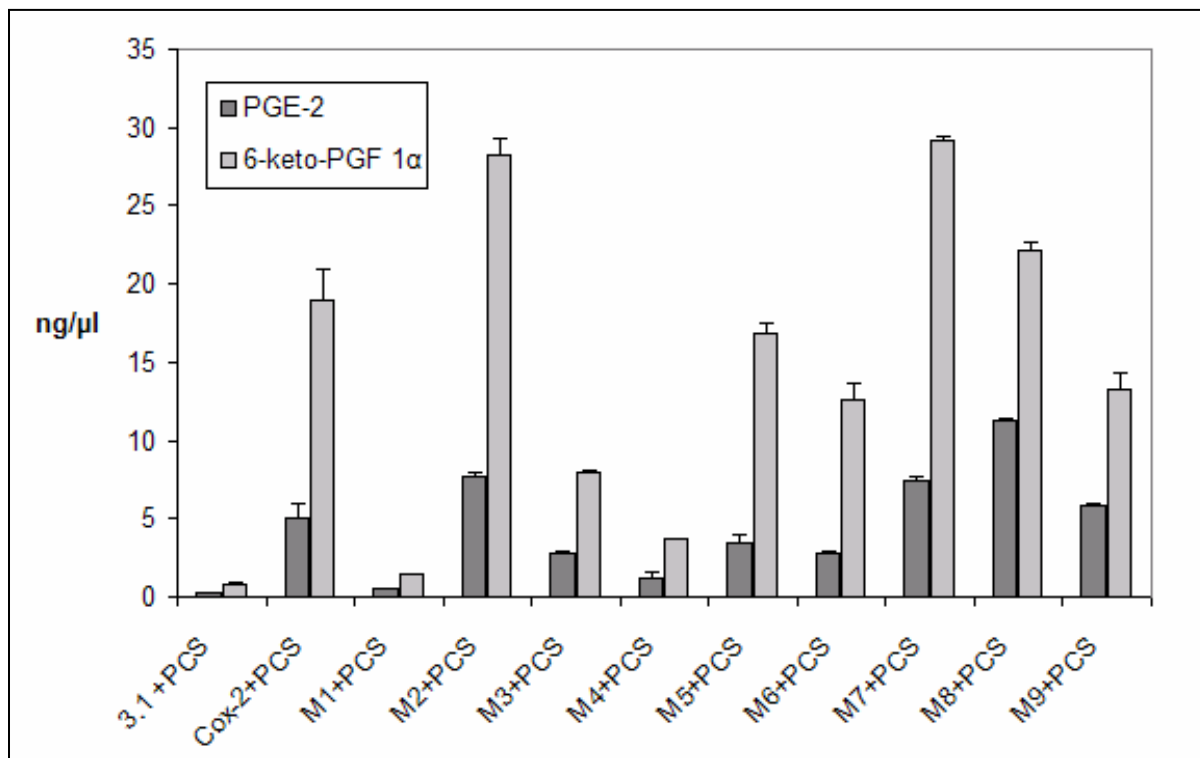


Abbildung 3-5: Prostaglandinbildung der Mutanten

Die Abbildung zeigt die Prostaglandinbildung der Mutanten M1 bis M9 im Vergleich zur nativen Cox-2 und zum Kontrollvektor 3.1. Bestimmt wurden die Prostazyklin- und die PGE₂-Bildung. Die Abbildung gibt ein repräsentatives Ergebnis aus den durchgeführten Versuchen (n=3) wieder. Die Daten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens 3 Einzelwerten errechnet.

Die

Abbildung 3-5 zeigt, dass die Mutanten ebenso wie der Cox-2-Wildtyp schon unter basalen Arachidonsäurebedingungen Prostaglandine und insbesondere Prostazyklin bilden.

Cox-2 bildet auch hier, insgesamt gesehen, mehr Prostazyklin als PGE₂, nämlich 5 ng/μl PGE₂ und 19 ng/μl Prostazyklin, was einem Verhältnis von 1 : 3,8 entspricht.

Mutante M1, M3 und M4 zeigen wenig Prostaglandinbildung. M1 bildet bis zu 1,4 ng/ μ l, M3 bis zu 7,9 ng/ μ l und M4 bis zu 3,7 ng/ μ l Prostazyklin. Auch die PGE₂-Werte liegen bei den dreien in aufgezählter Reihenfolge bei 0,5 ng/ μ l, 2,5 ng/ μ l und 0,9 ng/ μ l.

Die nächsten Mutanten zeigen höhere Werte der Prostaglandinbildung. So findet sich bei M2 eine Prostazyklin-Bildung von bis zu 28,5 ng/ μ l, bei M5 bis zu 16,9 ng/ μ l, bei M6 bis zu 12,64 ng/ μ l und bei M7 bis zu 29,14 ng/ μ l. Hier steigt proportional dazu die PGE₂-Bildung ebenfalls an, nämlich auf Werte um 7,7 ng/ μ l bei M2, 3,5 ng/ μ l bei M5, 2,8 ng/ μ l bei M6 und 7,42 ng/ μ l bei der Mutante 7.

Aber auch wenn man Unterschiede in den absoluten Mengen der Prostaglandine erkennt, so bleibt das Verhältnis zwischen Prostazyklin und PGE₂ bei den Mutanten M1 bis M7 weitgehend gleich, nämlich ca. 3:1 zugunsten des Prostazyklins.

Bei M8 und M9 ist ebenfalls ein Anstieg der Prostaglandine zu erkennen: bei M8 auf bis zu 22,01 ng/ μ l und bei M9 auf bis zu 13,68ng/ μ l. Ein Anstieg ist aber ebenfalls bei den PGE₂-Werten zu erkennen. Hier ergeben sich Werte um 11,2 ng/ μ l und 5,8ng/ μ l. Das Verhältnis von PGE₂ zu Prostazyklin beträgt hier nur noch 2:1, d.h., es hat sich bei diesen beiden Mutanten zugunsten des PGE₂ verschoben (s. Abbildung 3-6).

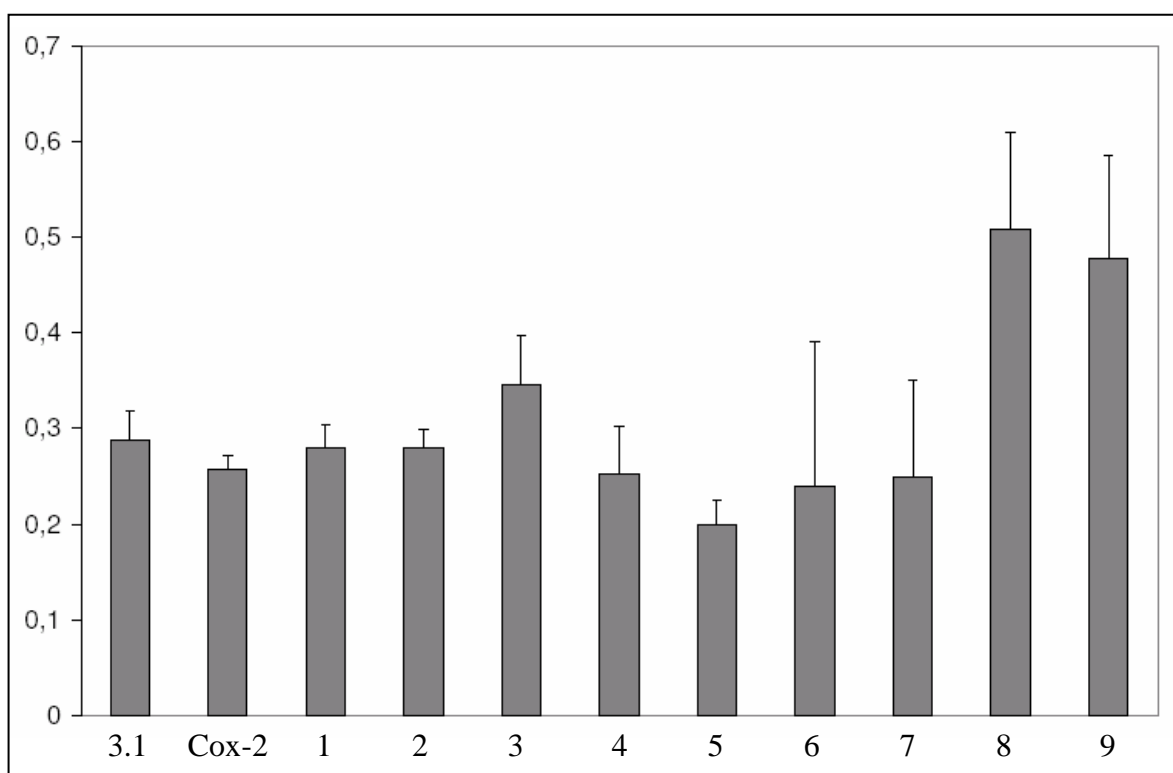
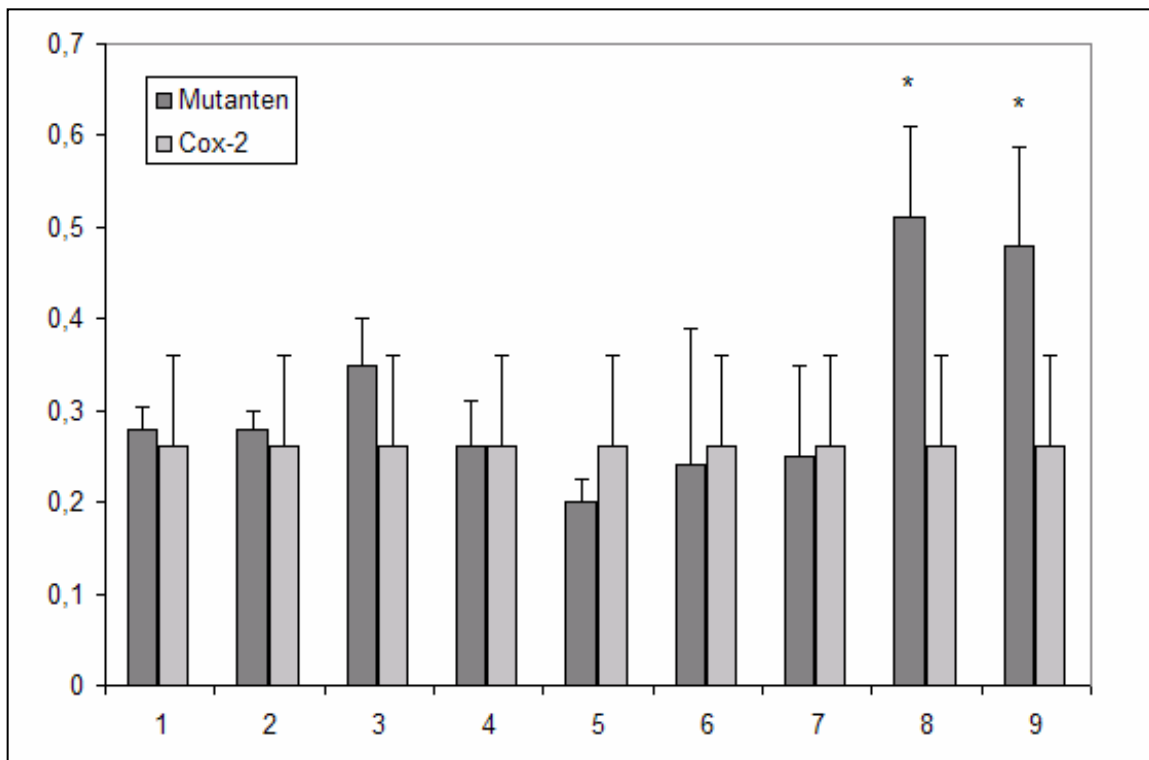


Abbildung 3-6: PGE₂/ 6-keto-PGF_{1α}-Ratio

Das Verhältnis von PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} bei der Prostaglandinproduktion des Kontrollvektors 3.1, der Cox-2 und der Mutanten (1-9)

**Abbildung 3-7: Das Verhältnis PGE₂/6 keto der Mutanten im Vergleich zur Cox-2**

* signifikant auf $p < 0,05$ Niveau

Die Veränderung des Verhältnisses wird nochmals in Abbildung 3-7 verdeutlicht.

Diese zeigt das Verhältnis von PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} der Cox-2 sowie das Verhältnis von PGE₂ und 6-keto-PGF_{1α} der neun Mutanten.

In dem durchgeführten T-Test ergibt sich bei den ersten sieben Punktmutationen kein signifikanter Unterschied zu dem Wildtyp der Cox-2 ($p > 0,05$).

Dagegen weist der Vergleich zwischen Cox-2 und der Mutante 8 sowie zwischen Cox-2 und der Mutante 9 einen signifikanten Unterschied bzgl. des Verhältnisses PGE₂ zu 6-keto-PGF_{1α} auf ($p < 0,001$).

3.4 Western-Blot

3.4.1 Kontroll-Western-Blot

Es wurden Western-Blot-Detektionen der 9 Mutanten im Vergleich zur ursprünglichen Cox-2 und dem 3.1-Kontroll-Vektor hergestellt.

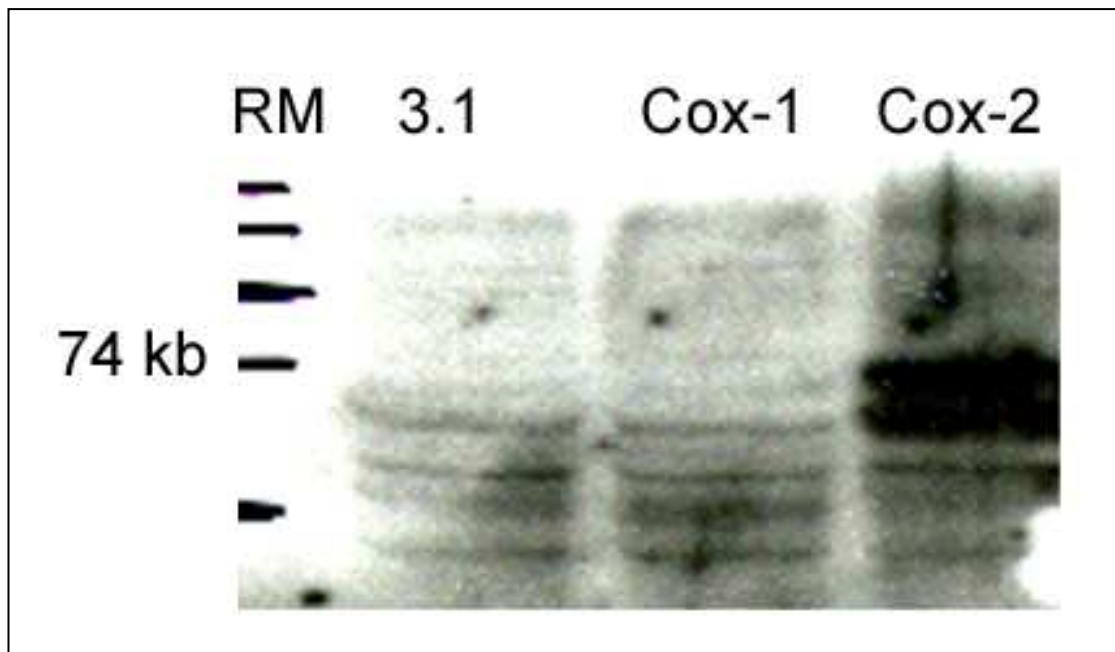


Abbildung 3-8: Western-Blot der Cox-1 und Cox-2 mit Kontrollvektor 3.1

Der vorliegende Western-Blot mit den Proben Cox-1, Cox-2 und 3.1 als Negativkontrolle zeigt die für die Cox-2 typische Doppelbande in Höhe der 74 kb-Marke. Detektiert wurde mit einem gegen den C-Terminus der Cox-2 des Kaninchens gerichteten Antikörper.

Der Western-Blot in Abbildung 3.8 zeigt die Wildtypen Cox-1 und Cox-2 neben dem negativen Kontrollvektor 3.1. In der ersten Bande läuft der „Full range Rainbow Molecular weight marker RPN 800“ zur Proteingrößenbestimmung mit. Detektiert wurde mit einem Erstantikörper von der Firma Santa Cruz, der gegen den C-Terminus der Cox-2 (Kaninchen) gerichtet ist. Als Zweitantikörper wurde ein entsprechend benötigter anti-Ziege Antikörper der Firma Dianova verwendet. Wie in der Abbildung 3.8 zu erkennen ist, zeigt sich eine Doppelbande bei der Cox-2 in Höhe von 74 kb. Weder bei der Cox-1 noch bei dem Kontrollvektor ist eine solche Bande zu erkennen.

3.4.2 Mutanten Western-Blot

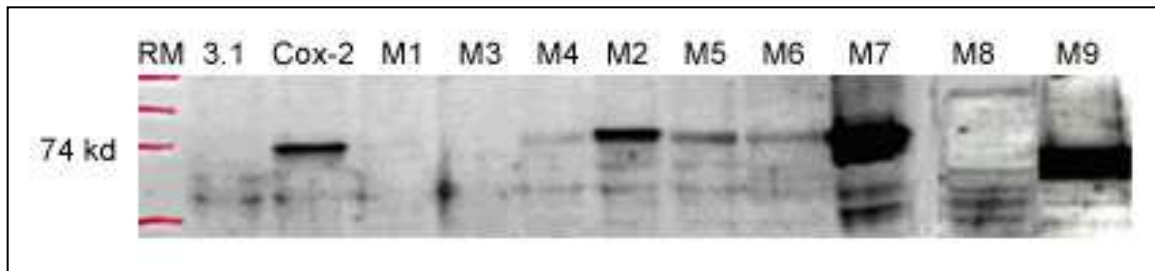


Abbildung 3-9: Mutanten Western-Blot

In der vorliegenden Western-Blot Abbildung 3-9 sind neben dem negativen Kontrollvektor 3.1 und der nativen Cox-2 die Mutanten M1 bis M9 aufgezeigt.

Auch hier wurde wieder der Erst-Antikörper der Firma Santa Cruz, der gegen den C-Terminus des Wildtyps der Cox-2 (Kaninchen) gerichtet ist, verwendet. Der Zweit-Antikörper Anti-Ziege dient erneut zur Detektion.

Hierbei zeigten sich folgende Ergebnisse: Während beim Kontrollvektor 3.1 keine Bande zu erkennen ist, konnte der Wildtyp der Cox-2 mittels einer Bande bei ca. 74 kb detektiert werden.

Bei den Mutanten M1, M3 und M4 ließ sich keine oder nur eine ganz schwache Bande erkennen. Die Mutante M2 zeigte eine in ihrer Stärke vergleichbare Bande wie die des Cox-2-Wildtyps. Bei den Mutanten M5 und M6 konnten nur schwächere, aber eindeutige Banden in der Höhe von 74 kd gezeigt werden. Keine Bande war hingegen bei der 8. Mutante zu detektieren.

M7 und M9 ließen sich wesentlich besser detektieren als der Wildtyp der Cox-2.

4 Diskussion

Im Arachidonsäure-Syntheseweg sind beide Isoformen der Cyclooxygenasen für die Umwandlung der Arachidonsäure in die verschiedenen Prostaglandine zuständig (SMITH et al. 1994). Trotz der gemeinsamen Funktion zeigen sich aber viele Unterschiede.

Wie in der Einleitung erläutert, sind die Cyclooxygenasen nicht nur auf zwei verschiedenen Genen kodiert, sondern sie unterscheiden sich auch in ihrer Präferenz bezüglich der Prostaglandinsynthesen im Biosyntheseweg der Eikosanoide und damit in ihrer Prostaglandinproduktion.

Während bei Induktion der Cox-1 hauptsächlich Thromboxan A₂, Prostaglandin D₂ und Hydroxyeicosatetraensäuren produziert werden, werden bei Induktion der Cox-2 präferentiell Prostazyklin und Prostaglandin E₂ synthetisiert (BROCK et al. 1999).

Ueno et al. konnten ferner in mehreren Untersuchungen darstellen, dass verschiedene Prostaglandinsynthesen Präferenzen bezüglich der Isoform der Cyclooxygenase zeigen, diese aber auch in Abhängigkeit zum Arachidonsäureangebot stehen. So konnte gezeigt werden, dass die Thromboxan-Synthase (TXS) bei geringen Arachidonsäure-Konzentrationen eher mit der Cox-2 zusammenarbeitet, wohingegen bei hohem Arachidonsäureaufkommen die TXS die Cox-1 bevorzugt (UENO et al. 2001). Die PCS hingegen hat bei jeder untersuchten Arachidonsäurekonzentration eine Präferenz für die Cox-2 gegenüber der Cox-1.

Warum eben diese Präferenzen bestehen, konnte bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden.

Nahe liegend wäre die Möglichkeit der unterschiedlichen Lokalisationen der Cox-1 und Cox-2 bezüglich der PCS, wie es bereits die Arbeitsgruppe um Morita angedacht hatte (MORITA et al. 1995). Darauf hinweisen könnte die bereits in der Einleitung aufgezeigte erhöhte Konzentration der Cox-2 an der Membran der Kernhülle. Die Literatur zeigt jedoch, dass die PCS nur in der Membran des endoplasmatischen Retikulums präsent ist, d.h. dort, wo sowohl die Cox-1 als auch die Cox-2 vorhanden sind (HARA et al. 1994; GARAVITO UND DEWITT 1999; SMITH UND LANGENBACH 2001).

Der Grund für die Präferenz der Cox-2 zur PCS könnte aber auch in den unterschiedlichen Strukturen der beiden Cyclooxygenasen liegen.

Der auffälligste Strukturunterschied liegt im C-Terminus der Cox-2, der eine Sequenz von 18 Aminosäuren aufweist, die bei der Cox-1 nicht vorhanden ist.

Die Arbeitsgruppe um Mbonye konnte im September 2006 aufzeigen, dass ein Teil dieser AS-Sequenz den Abbau der Cox-2 im ER beschleunigt. Zwar konnte nicht geklärt werden, welche Aminosäuren genau dafür verantwortlich sind, wichtig ist aber die Erkenntnis, dass diese AS-Sequenz des C-Terminus bestimmte Funktionen der Regulierung der Cox-2 übernimmt (MBONYE et al. 2006).

Es ist ebenso denkbar, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen dem C-Terminus der Cox-2 und der Präferenz zur Prostazyklin-Synthase gibt. Aus diesem Grund wurde der C-Terminus der Cox-2 in dieser Dissertation durch verschiedene gezielte Mutagenesen verändert.

4.1 Bewertung der Ergebnisse

4.1.1 Prostanoidsynthese der Cox-2 verglichen mit der mutierten Cox-2

Die angewandte Methode ist etabliert und weist durch ein strukturiertes Anwendungsverfahren kaum Fehlermöglichkeiten auf. So werden die benötigten mutagenen Primer bestellt, die Mutagenese mit Hilfe des etablierten PCR Verfahrens durchgeführt und das Ergebnis sowohl durch die anschließende Gelelektrophorese als auch durch darauf folgende Sequenzierungen überprüft (s. 2.2).

Das Mutagenese-Verfahren ist leicht anwendbar und es können sowohl Punktmutationen als auch komplexere Deletionsmutationen durchgeführt werden. Weiterhin ist der geringe Zeitaufwand, der sich auf nur einen Tag beschränkt, vorteilhaft.

Die konstruierten Mutanten konnten ohne Probleme hergestellt werden und zeigten in der auswärtig durchgeführten Sequenzierung die erwarteten Ergebnisse.

Um zunächst nur geringfügige Veränderungen am ursprünglichen C-Terminus zu bewirken, wurden die ersten Mutationen (Mutante M1-M7) als Punktmutationen

durchgeführt. Dabei wurde entweder die Hydrophobizität oder der Säuregrad oder aber auch beides gleichzeitig verändert. Damit sollte mit minimaler struktureller Veränderung maximale Veränderungen der Eigenschaften der Cox-2 erreicht werden.

Es zeigten sich in den anschließenden Prostaglandinanalysen keine wesentlichen Veränderungen in den relativen Verhältnissen zwischen PGE₂ und Prostazyklin, sondern nur in den absoluten Mengen. Die Gründe für die unterschiedlichen absoluten Mengen können zahlreich sein. Z.B. kann die Mutation eine veränderte biologische Halbwertszeit bedingen, so dass das mutierte Enzym nun länger oder kürzer Zeit hatte, um Prostaglandine zu bilden.

Sicher ist, dass sich das relative Verhältnis von PGE₂ und Prostazyklin bei keinem der Punktmutanten verändert hatte. Dies wurde auf einen zu geringen Einfluss der Punktmutationen zurückgeführt. Daher wurden größere Veränderungen im C-Terminus der Cox-2 vorgenommen. Durch die Deletionsmutation wurde bei der Mutante 9 die Hälfte des C-Terminus, bei der Mutante 8 der komplette C-Terminus entfernt.

4.1.2 Ergebnisse der Prostaglandinproduktion

Die ausgewerteten Daten der Prostaglandinbestimmungen bei basaler Arachidonsäurekonzentration und supramaximaler Arachidonsäurekonzentration bestätigten die in der Literatur angegebenen Ergebnisse. Wie man in Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2 erkennen kann, konnte gezeigt werden, dass bei basaler Arachidonsäurekonzentration hauptsächlich die Cox-2 Prostazyklin und PGE₂ produziert. Bei supramaximaler Stimulation der Arachidonsäure wurde die Bildung dieser beiden Prostaglandine ebenfalls von der Cox-1 mit übernommen. Obwohl dementsprechend die Bildung von Prostazyklin und PGE₂ über die Cox-2 abnahm, fiel das Verhältnis zwischen PGE₂ und Prostazyklin mit 1:3 aber immer noch zugunsten des Prostazyklins aus. Bei der Bildung der Prostaglandine via Cox-1 lag das Verhältnis bei 3:1 zugunsten des PGE₂. Somit zeigte die Prostazyklin-Synthase in vitro eine eindeutige Präferenz zur Cox-2.

Wie im Säulendiagramm der Mutanten (

Abbildung 3-5) zu sehen ist, veränderte sich die Prostaglandinbildung der Mutanten im Gegensatz zu der nativen Cox-2, absolut gesehen, in unterschiedlichem Ausmaß. Während die Mutanten M1, M3 und M4 weniger Prostaglandine produzierten, lag die Prostaglandinbildung bei den Mutanten M5, M6 und M9 in annähernd gleichen Bereichen wie die der nativen Cox-2. Die Mutanten M2, M7 und M8 zeigten dagegen eine höhere Produktion von Prostazyklin und PGE₂.

Betrachtet man nun aber nicht nur die absoluten Werte, sondern das relative Verhältnis von PGE₂ zu Prostazyklin, so fällt auf, dass sich dieses in den beschriebenen Mutanten M1 bis M7 im Vergleich zum Cox-2-Wildtyp nicht verändert hatte. Trotz der Punktmutationen des C-Terminus lag das Verhältnis von PGE₂ zu Prostazyklin bei ca. 1:3 zugunsten des Prostazyklins und gleicht damit der Cox-2.

Im Gegensatz dazu hatte sich das Verhältnis der Prostaglandine bei den letzten beiden Mutanten, den Deletionsmutanten, verändert. Wie man in den Ergebnissen der

Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6 erkennen kann, zeigten sich Verschiebungen der Prostaglandinproduktion zugunsten der PGE₂-Bildung.

Dies deutet darauf hin, dass der C-Terminus eine Rolle für die Präferenz der Cox-2 zur PCS spielt, da ohne diese vollständigen 18 Aminosäuren die Prostazyklin-Bildung sinkt. Weiterhin war nicht nur ein Unterschied zwischen den Punkt- und Deletionsmutanten gegeben, sondern es zeigte sich auch zwischen den beiden Deletionsmutanten ein wesentlicher Unterschied. So war die Prostazyklin-Produktion bei der Mutante M9 zwar bereits rückläufig und wies ein verändertes PGE₂ : 6-keto-PGF_{1α} Verhältnis von 1 : 2,3 auf; die Mutante M8, bei der der gesamte C-Terminus weggefallen war, zeigte aber noch eindeutiger das veränderte Verhältnis von PGE₂ zu 6-keto-PGF_{1α} bei Werten von 1 : 1,9 (PGE₂ : 6-keto-PGF_{1α}).

4.1.3 Western-Blot Ergebnisse

Die Quantität der Prostaglandinbildung spiegelte sich mit Ausnahmen auch in der Detektierbarkeit der Mutanten im Western-Blot wieder. Die Mutanten, die eine sehr geringe Produktion aufwiesen, waren auch schlecht im Western-Blot-

Verfahren zu detektieren (M1, M3 und M4). Diejenigen, die hohe Prostaglandinproduktionen aufwiesen, hatten auch eine dementsprechend gut sichtbare Bande im Western-Blot (M2, M5-M7).

Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse, trotz eher geringer Veränderungen in den Mutanten M1, M3 und M4, könnte eine veränderte Halbwertszeit sein. Möglicherweise wurde diese durch die Mutationen verkürzt, so dass der Abbau dieser Mutanten beschleunigt wurde und damit weniger Proteinmenge zum Detektieren blieb.

Im Gegensatz dazu zeigten sich Veränderungen bei den Deletionsmutanten M8 und M9. Hier war zu erkennen, dass die Mutante M8 trotz hoher Prostaglandinproduktion im Western-Blot nicht detektierbar war. Dies ist damit zu erklären, dass der verwendete Cox-2-Antikörper von Santa Cruz gegen den C-Terminus der Cox-2 gerichtet ist, welcher bei dieser Mutante deletiert wurde. Die Mutante M9 hingegen ließ sich trotz Deletion des halben C-Terminus sehr gut im Western-Blot detektieren. Dies kann darauf hindeuten, dass der Antikörper vielleicht genau an den noch bestehenden Teil des C-Terminus bindet.

Wünschenswert wäre gewesen, wenn man die Mutanten ebenfalls noch mit einem N-terminalen Antikörper detektiert hätte. Aber die käuflich zu erwerbenden N-terminalen Antikörper waren in diesen Versuchen leider zu unspezifisch, um den Cox-2-Wildtyp spezifisch detektieren zu können.

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Fasst man die einzelnen Ergebnisse aus der Mutagenese (4.1.1), der Prostaglandinsynthese (4.1.2) und den Western-Blot-Verfahren (4.1.3) zusammen, so wird ersichtlich, dass bei der Mutante 8, bei der der C-Terminus komplett entfernt wurde, am deutlichsten eine Verschiebung der Prostaglandinproduktion zugunsten des PGE₂ aufgezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse können möglicherweise die Präferenz der Cox-2 mit der Prostazyklin-Synthase mitbegründen.

Ferner konnte ebenso wie bei den Arbeitsgruppen um Trifan und Smith gezeigt werden, dass die Cox-2, trotz der eingearbeiteten Mutationen bzw. des fehlenden C-Terminus, weiterhin aktiv ist (SMITH UND DEWITT 1996; TRIFAN et al. 1999).

4.2 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen

In der vorliegenden Arbeit wurde der C-Terminus der Cox-2 in unterschiedlicher Weise mutiert, um so zu erforschen, ob darin die vorrangige Zusammenarbeit der PCS mit der Cox-2 begründet liegt.

In den oben aufgeführten Ergebnissen konnten Hinweise dafür gezeigt werden, dass der C-Terminus der Cox-2 womöglich eine Schlüsselrolle in der Zusammenarbeit der Cox-2 mit der PCS spielt, da sich bei kompletter Deletion desselben die absolute und relative Menge der gebildeten Prostaglandine untereinander verändert.

Zwar konnte nicht geklärt werden, welche Aminosäuren genau für die Präferenz der beiden Enzyme verantwortlich sind, aber aufgrund der fehlenden Veränderungen bei den Mutanten M1 bis M7, die Punktmutationen darstellen, lässt sich sagen, dass nicht einzelne Aminosäuren ausschlaggebend sind, sondern eine Abfolge von mehreren Aminosäuren des C-Terminus.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Arbeit um die Arbeitsgruppe Kurumbail, welche zeigte, dass nur der 18-Aminosäuren-Einschub des C-Terminus der Cox-2 nicht kristallisierbar ist (KURUMBAIL et al. 1996). Zu diskutieren wäre, ob die Cox-2 einen bestimmten Bindungspartner braucht, um diesen Teil zu aktivieren und damit eine definierte räumliche Position einzunehmen.

Für die Zukunft wäre es daher wünschenswert, den C-Terminus genauer zu verändern, so z.B. mehrere hintereinander liegende Aminosäuren zu mutieren oder Kombinationen der Punktmutationen einzuführen, um dadurch die verantwortlichen Aminosäuren näher zu identifizieren.

Um einen weiteren Beweis anzutreten, dass es der C-Terminus ist, der die Präferenz der Cox-2 und der PCS begründet, könnte man Chimären bilden, wobei die Cox-1 mit dem C-terminalen Ende der Cox-2 verkoppelt werden könnte. Hier sollten sich dann ebenso Präferenzen zur PCS zeigen.

4.3 Klinische Relevanz

Hinsichtlich der klinischen Relevanz konnte durch die Arbeit verständlich gemacht werden, dass selektive Cox-2-Inhibitoren, wie z.B. Vioxx, eine geringere Beeinflussung der Cox-1 erbringen und somit bekannte Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Schleimhautreizungen und Magenschleimhautblutungen, verhindert

werden. Durch die Ausschaltung der Cox-2 kommen aber leider andere Wechselwirkungen zum Tragen.

Es konnten Hinweise aufgezeigt werden, dass die Cox-2 bei Überexpression in vitro vermutlich bevorzugt mit der Prostazyklin-Synthase zusammenarbeitet und - so resultierend - bevorzugt Prostazyklin entsteht. Dieses wirkt vasodilatierend und ist bekanntermaßen ein Gegenspieler des vasokonstriktorisch wirkenden Thromboxans.

Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass bei selektiver Hemmung der Cox-2 die Produktion des Prostazyklins abnimmt und das Gleichgewicht der beiden Gegenspieler zugunsten des Thromboxans verschoben wird. Hieraus können unerwünschte Nebenwirkungen wie z.B. Thrombose, erhöhtes Risiko für Schlaganfälle oder Herzinfarkte resultieren.

In klinischen Studien, wie z.B. der Vigor-Studie und weiteren Studien, wurden bereits die sichtbaren Folgen aufgezeigt (BOMBARDIER et al. 2000; MUKHERJEE et al. 2001; FITZGERALD 2004; SOLOMON et al. 2004).

Zu überlegen wäre daher, ob die Anwendung von z.B. „low-dose-Aspirin“ sinnvoll ist, um - unter Inkaufnahme des zunehmenden gastrointestinalen Risikos – damit das kardiovaskuläre Risiko zu reduzieren.

Diese Dissertation gibt auf molekularer Ebene Hinweise für mögliche Gründe der schon in den klinischen Studien gesehenen Präferenz der Cox-2 für die Prostazyklin-Synthase und den damit verbundenen kardiovaskulären Problemen.

5 Zusammenfassung

Die NSAR gehören zu den weltweit am häufigsten eingenommenen Schmerzmedikamenten. Sie hemmen die Cyclooxygenase 1 und 2, Enzyme, die für die Produktion von Schmerzmediatoren (Prostaglandine) verantwortlich sind.

Durch die unselektive Hemmung beider Cyclooxygenasen kommt es jedoch auch zu der Hemmung des physiologischen Wirkungsspektrums der Cyclooxygenase 1, z.B. dem Schutz der Magenschleimhaut. Dies kann zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie z.B. Magenschleimhautblutungen, führen.

Da die Cyclooxygenase 2 im Gegensatz zu der Cyclooxygenase 1 weniger bzw. andere physiologische Funktionen übernimmt und in erhöhtem Maße in entzündetem Gewebe exprimiert wird, wurden selektive Cyclooxygenase 2 – Hemmer entwickelt.

Leider zeigten sich in der klinischen Anwendung dieser selektiven Inhibitoren nach Jahren kardiovaskuläre Komplikationen.

Eine mögliche Ursache dieser Komplikationen könnte in der Präferenz der Cyclooxygenase 2 zur Prostazyklin-Synthase und somit zur Prostazyklin-Bildung liegen. Prostazyklin ist ein vaskulär-protectives Eikosanoid, welches die Thrombozytenaggregation hemmt und vasodilatierend wirkt. Eine Verminderung des Prostazyklins kann also thromboembolische Komplikationen verursachen.

Warum aber gerade die Prostazyklin-Synthase vorrangig mit der Cyclooxygenase 2 statt mit der Cyclooxygenase 1 arbeitet, ist bisher noch nicht geklärt.

Eine mögliche Ursache könnte in einem strukturellen Unterschied der beiden Enzyme liegen. Obwohl die Cyclooxygenasen in Ihren Sequenzen eine Homologie von 60 % aufweisen, findet sich ein auffallender Unterschied in der Struktur des C-terminalen Endes. Die Cyclooxygenase 2 weist hier einen Einschub von 18 Aminosäuren auf, welche sich im C-terminalen Ende der Cyclooxygenase 1 nicht finden lässt.

Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation das C-terminale Ende der Cyclooxygenase 2 zunächst durch sieben Punktmutationen verändert. Die Veränderungen bezogen sich sowohl auf die Struktur als auch auf die

Hydrophobizität, den Säuregrad und die Polarität bzw. den Ladungszustand des Enzyms.

Darüber hinaus wurden zwei Deletionsmutationen durchgeführt, bei der der C-Terminus der Cyclooxygenase 2 zum einen zur Hälfte, zum anderen ganz entfernt wurde.

Alle neun Mutanten wurden in ein Zellsystem (HEK 293) transformiert, die Überstände auf die Prostazyklin- und PGE₂-Produktion untersucht und mit Hilfe des Western-Blot-Verfahren überprüft.

Die Untersuchungen ergaben, dass sich die Produktionen des Prostazyklins und des PGE₂ bei den Punktmutationen nur in ihrer gesamten Menge, nicht aber im Verhältnis Prostazyklin zu PGE₂ veränderten.

Die Deletionsmutanten zeigten jedoch einen Rückgang der Prostazyklin-Produktion in der Gesamtmenge und im Verhältnis zu PGE₂. Die Deletion der Hälfte bzw. des ganzen C-Terminus der Cyclooxygenase hat also zu einer veränderten Prostazyklin-Produktion geführt.

Diese Daten weisen daraufhin, dass der C-Terminus für die Präferenz der Cyclooxygenase 2 bezüglich der Prostazyklin-Synthase eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Es bedarf weiterer Forschungen, um eine etwaige Verbindung der Prostazyklin-Synthase und des C-Terminus der Cyclooxygenase 2 noch genauer zu untersuchen.

Die vollständige Aufklärung dieser Präferenz ist in Bezug auf eine Schmerztherapie ohne mögliche Komplikationen für die Zukunft von großer klinischer Bedeutung.

6 Literaturverzeichnis

- BELTON, O., BYRNE, D., KEARNEY, D., LEAHY, A. UND FITZGERALD, D.J. (2000). "Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis." Circulation **102**(8): 840-5.
- BELTON, O. UND FITZGERALD, D. (2003). "Cyclooxygenase-2 inhibitors and atherosclerosis." J Am Coll Cardiol **41**(10): 1820-2.
- BERGSTROEM, S., DANIELSSON, H. UND SAMUELSSON, B. (1964). "The Enzymatic Formation of Prostaglandin E2 from Arachidonic Acid Prostaglandins and Related Factors 32." Biochim Biophys Acta **90**: 207-10.
- BOMBARDIER, C., LAINE, L., REICIN, A., SHAPIRO, D., BURGOS-VARGAS, R., DAVIS, B., DAY, R., FERRAZ, M.B., HAWKEY, C.J., HOCHBERG, M.C., KVIEN, T.K. UND SCHNITZER, T.J. (2000). "Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group." N Engl J Med **343**(21): 1520-8, 2 p following 1528.
- BRASH, A.R. (2001). "Arachidonic acid as a bioactive molecule." J Clin Invest **107**(11): 1339-45.
- BREYER, R.M., BAGDASSARIAN, C.K., MYERS, S.A. UND BREYER, M.D. (2001). "Prostanoid receptors: subtypes and signaling." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 661-90.
- BROCK, T.G., MCNISH, R.W. UND PETERS-GOLDEN, M. (1999). "Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2." J Biol Chem **274**(17): 11660-6.
- CAUGHEY, G.E., CLELAND, L.G., PENGLIS, P.S., GAMBLE, J.R. UND JAMES, M.J. (2001). "Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2." J Immunol **167**(5): 2831-8.
- CHEN, Q.R., MIYaura, C., HIGASHI, S., MURAKAMI, M., KUDO, I., SAITO, S., HIRAIDE, T., SHIBASAKI, Y. UND SUDA, T. (1997). "Activation of cytosolic phospholipase A2 by platelet-derived growth factor is essential for cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 synthesis in mouse osteoblasts cultured with interleukin-1." J Biol Chem **272**(9): 5952-8.

- CHENG, Y., AUSTIN, S.C., ROCCA, B., KOLLER, B.H., COFFMAN, T.M., GROSSER, T., LAWSON, J.A. UND FITZGERALD, G.A. (2002). "Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2." Science **296**(5567): 539-41.
- CHULADA, P.C., THOMPSON, M.B., MAHLER, J.F., DOYLE, C.M., GAUL, B.W., LEE, C., TIANO, H.F., MORHAM, S.G., SMITHIES, O. UND LANGENBACH, R. (2000). "Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice." Cancer Res **60**(17): 4705-8.
- CLARKE, R.J., MAYO, G., PRICE, P. UND FITZGERALD, G.A. (1991). "Suppression of thromboxane A2 but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin." N Engl J Med **325**(16): 1137-41.
- CULLEN, L., KELLY, L., CONNOR, S.O. UND FITZGERALD, D.J. (1998). "Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man." J Pharmacol Exp Ther **287**(2): 578-82.
- DEWITT, D.L., DAY, J.S., SONNENBURG, W.K. UND SMITH, W.L. (1983). "Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I2 synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta." J Clin Invest **72**(6): 1882-8.
- DEWITT, D.L. UND MEADE, E.A. (1993). "Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes." Arch Biochem Biophys **306**(1): 94-102.
- DEWITT, D.L. UND SMITH, W.L. (1983). "Purification of prostacyclin synthase from bovine aorta by immunoaffinity chromatography. Evidence that the enzyme is a hemoprotein." J Biol Chem **258**(5): 3285-93.
- DEWITT, D.L. UND SMITH, W.L. (1988). "Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(5): 1412-6.
- DINCHUK, J.E., CAR, B.D., FOCHT, R.J., JOHNSTON, J.J., JAFFEE, B.D., COVINGTON, M.B., CONTEL, N.R., ENG, V.M., COLLINS, R.J., CZERNIAK, P.M. UND ET AL. (1995). "Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II." Nature **378**(6555): 406-9.

- DRAZEN, J.M. (2005). "COX-2 inhibitors--a lesson in unexpected problems." N Engl J Med **352**(11): 1131-2.
- DUBOIS, R.N., ABRAMSON, S.B., CROFFORD, L., GUPTA, R.A., SIMON, L.S., VAN DE PUTTE, L.B. UND LIPSKY, P.E. (1998). "Cyclooxygenase in biology and disease." Faseb J **12**(12): 1063-73.
- FITZGERALD, G.A. (2004). "Coxibs and cardiovascular disease." N Engl J Med **351**(17): 1709-11.
- FITZGERALD, G.A. UND LOLL, P. (2001). "COX in a crystal ball: current status and future promise of prostaglandin research." J Clin Invest **107**(11): 1335-7.
- FITZGERALD, G.A. UND PATRONO, C. (2001). "The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2." N Engl J Med **345**(6): 433-42.
- FITZGERALD, G.A., SMITH, B., PEDERSEN, A.K. UND BRASH, A.R. (1984). "Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation." N Engl J Med **310**(17): 1065-8.
- FLETCHER, B.S., KUJUBU, D.A., PERRIN, D.M. UND HERSCHMAN, H.R. (1992). "Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase." J Biol Chem **267**(7): 4338-44.
- FU, J.Y., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., RAZ, A. UND NEEDLEMAN, P. (1990). "The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes." J Biol Chem **265**(28): 16737-40.
- FUNK, C.D. (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." Science **294**(5548): 1871-5.
- FUNK, C.D., FUNK, L.B., KENNEDY, M.E., PONG, A.S. UND FITZGERALD, G.A. (1991). "Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment." Faseb J **5**(9): 2304-12.
- GARAVITO, R.M. UND DEWITT, D.L. (1999). "The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins." Biochim Biophys Acta **1441**(2-3): 278-87.

- GIERSE, J.K., McDONALD, J.J., HAUSER, S.D., RANGWALA, S.H., KOBOLDT, C.M. UND SEIBERT, K. (1996). "A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors." J Biol Chem **271**(26): 15810-4.
- GOLDEN, B.D. UND ABRAMSON, S.B. (1999). "Selective cyclooxygenase-2 inhibitors." Rheum Dis Clin North Am **25**(2): 359-78.
- HARA, S., MIYATA, A., YOKOYAMA, C., INOUE, H., BRUGGER, R., LOTTSPEICH, F., ULLRICH, V. UND TANABE, T. (1994). "Isolation and molecular cloning of prostacyclin synthase from bovine endothelial cells." J Biol Chem **269**(31): 19897-903.
- HARADA, Y., HATANAKA, K., KAWAMURA, M., SAITO, M., OGINO, M., MAJIMA, M., OHNO, T., OGINO, K., YAMAMOTO, K., TAKETANI, Y., YAMAMOTO, S. UND KATORI, M. (1996). "Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E2 formation in rat carrageenin-induced pleurisy." Prostaglandins **51**(1): 19-33.
- HERSCHMAN, H.R. (1991). "Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters." Annu Rev Biochem **60**: 281-319.
- HERSCHMAN, H.R. (1996). "Prostaglandin synthase 2." Biochim Biophys Acta **1299**(1): 125-40.
- HIGGS, E.A., MONCADA, S. UND VANE, J.R. (1978). "Inflammatory effects of prostacyclin (PGI₂) and 6-oxo-PGF₁α in the rat paw." Prostaglandins **16**(2): 153-62.
- HINZ, B. UND BRUNE, K. (2002). "Cyclooxygenase-2--10 years later." J Pharmacol Exp Ther **300**(2): 367-75.
- HIRAI, H., TANAKA, K., YOSHIE, O., OGAWA, K., KENMOTSU, K., TAKAMORI, Y., ICHIMASA, M., SUGAMURA, K., NAKAMURA, M., TAKANO, S. UND NAGATA, K. (2001). "Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH₂." J Exp Med **193**(2): 255-61.
- HLA, T., BISHOP-BAILEY, D., LIU, C.H., SCHAEFERS, H.J. UND TRIFAN, O.C. (1999). "Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes." Int J Biochem Cell Biol **31**(5): 551-7.
- JONES, D.A., CARLTON, D.P., MCINTYRE, T.M., ZIMMERMAN, G.A. UND PRESCOTT, S.M. (1993). "Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines." J Biol Chem **268**(12): 9049-54.

- KOMHOFF, M., WANG, J.L., CHENG, H.F., LANGENBACH, R., MCKANNA, J.A., HARRIS, R.C. UND BREYER, M.D. (2000). "Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development." Kidney Int **57**(2): 414-22.
- KRAEMER, S.A., MEADE, E.A. UND DEWITT, D.L. (1992). "Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences." Arch Biochem Biophys **293**(2): 391-400.
- KRAMER, B.K., KAMMERL, M.C. UND KOMHOFF, M. (2004). "Renal cyclooxygenase-2 (COX-2). Physiological, pathophysiological, and clinical implications." Kidney Blood Press Res **27**(1): 43-62.
- KUJUBU, D.A., FLETCHER, B.S., VARNUM, B.C., LIM, R.W. UND HERSCHMAN, H.R. (1991). "TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue." J Biol Chem **266**(20): 12866-72.
- KUJUBU, D.A. UND HERSCHMAN, H.R. (1992). "Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene." J Biol Chem **267**(12): 7991-4.
- KURUMBAIL, R.G., STEVENS, A.M., GIERSE, J.K., McDONALD, J.J., STEGEMAN, R.A., PAK, J.Y., GILDEHAUS, D., MIYASHIRO, J.M., PENNING, T.D., SEIBERT, K., ISAKSON, P.C. UND STALLINGS, W.C. (1996). "Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents." Nature **384**(6610): 644-8.
- KURZROCK, R. UND LIEB, C.C. (1930). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **28**: 268.
- LANGENBACH, R., MORHAM, S.G., TIANO, H.F., LOFTIN, C.D., GHANAYEM, B.I., CHULADA, P.C., MAHLER, J.F., LEE, C.A., GOULDING, E.H., KLUCKMAN, K.D. UND ET AL. (1995). "Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration." Cell **83**(3): 483-92.
- LIM, H., GUPTA, R.A., MA, W.G., PARIA, B.C., MOLLER, D.E., MORROW, J.D., DUBOIS, R.N., TRZASKOS, J.M. UND DEY, S.K. (1999). "Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta." Genes Dev **13**(12): 1561-74.

- LOFTIN, C.D., TRIVEDI, D.B., TIANO, H.F., CLARK, J.A., LEE, C.A., EPSTEIN, J.A., MORHAM, S.G., BREYER, M.D., NGUYEN, M., HAWKINS, B.M., GOULET, J.L., SMITHIES, O., KOLLER, B.H. UND LANGENBACH, R. (2001). "Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(3): 1059-64.
- LUONG, C., MILLER, A., BARNETT, J., CHOW, J., RAMESHA, C. UND BROWNER, M.F. (1996). "Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2." Nat Struct Biol **3**(11): 927-33.
- MAIER, J.A., HLA, T. UND MACIAG, T. (1990). "Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells." J Biol Chem **265**(19): 10805-8.
- MASFERRER, J.L., ZWEIFEL, B.S., SEIBERT, K. UND NEEDLEMAN, P. (1990). "Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice." J Clin Invest **86**(4): 1375-9.
- MAXAM, A.M. UND GILBERT, W. (1977). "A new method for sequencing DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(2): 560-4.
- MBONYE, U.R., WADA, M., RIEKE, C.J., TANG, H.Y., DEWITT, D.L. UND SMITH, W.L. (2006). "The 19 amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the ER-associated degradation system." J Biol Chem.
- MCADAM, B.F., CATELLA-LAWSON, F., MARDINI, I.A., KAPOOR, S., LAWSON, J.A. UND FITZGERALD, G.A. (1999). "Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 272-7.
- MERLIE, J.P., FAGAN, D., MUDD, J. UND NEEDLEMAN, P. (1988). "Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)." J Biol Chem **263**(8): 3550-3.
- MIYATA, A., HARA, S., YOKOYAMA, C., INOUE, H., ULLRICH, V. UND TANABE, T. (1994). "Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase." Biochem Biophys Res Commun **200**(3): 1728-34.
- MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S. UND VANE, J.R. (1976). "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation." Nature **263**(5579): 663-5.

- MONNERET, G., GRAVEL, S., DIAMOND, M., ROKACH, J. UND POWELL, W.S. (2001). "Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor." Blood **98**(6): 1942-8.
- MORHAM, S.G., LANGENBACH, R., LOFTIN, C.D., TIANO, H.F., VOULOUMANOS, N., JENNETTE, J.C., MAHLER, J.F., KLUCKMAN, K.D., LEDFORD, A., LEE, C.A. UND ET AL. (1995). "Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse." Cell **83**(3): 473-82.
- MORITA, I., SCHINDLER, M., REGIER, M.K., OTTO, J.C., HORI, T., DEWITT, D.L. UND SMITH, W.L. (1995). "Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2." J Biol Chem **270**(18): 10902-8.
- MUKHERJEE, D., NISSEN, S.E. UND TOPOL, E.J. (2001). "Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors." Jama **286**(8): 954-9.
- MULLIS, K.B. UND FALOONA, F.A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- MURAKAMI, M., BINGHAM, C.O., 3RD, MATSUMOTO, R., AUSTEN, K.F. UND ARM, J.P. (1995A). "IgE-dependent activation of cytokine-primed mouse cultured mast cells induces a delayed phase of prostaglandin D2 generation via prostaglandin endoperoxide synthase-2." J Immunol **155**(9): 4445-53.
- MURAKAMI, M., KUWATA, H., AMAKASU, Y., SHIMBARA, S., NAKATANI, Y., ATSUMI, G. UND KUDO, I. (1997). "Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells. Enhancement by secretory phospholipase A2." J Biol Chem **272**(32): 19891-7.
- MURAKAMI, M., MATSUMOTO, R., AUSTEN, K.F. UND ARM, J.P. (1994). "Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 couple to different transmembrane stimuli to generate prostaglandin D2 in mouse bone marrow-derived mast cells." J Biol Chem **269**(35): 22269-75.
- MURAKAMI, M., MATSUMOTO, R., URADE, Y., AUSTEN, K.F. UND ARM, J.P. (1995B). "c-kit ligand mediates increased expression of cytosolic phospholipase A2, prostaglandin endoperoxide synthase-1, and hematopoietic prostaglandin D2 synthase and increased IgE-dependent prostaglandin D2 generation in immature mouse mast cells." J Biol Chem **270**(7): 3239-46.

- NARABA, H., MURAKAMI, M., MATSUMOTO, H., SHIMBARA, S., UENO, A., KUDO, I. UND OH-ISHI, S. (1998). "Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages." J Immunol **160**(6): 2974-82.
- NARUMIYA, S. UND FITZGERALD, G.A. (2001). "Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function." J Clin Invest **108**(1): 25-30.
- OATES, J.A. (1982). "The 1982 Nobel Prize in Physiology or Medicine." Science **218**(4574): 765-8.
- O'BANION, M.K., WINN, V.D. UND YOUNG, D.A. (1992). "cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4888-92.
- O'SULLIVAN, M.G., CHILTON, F.H., HUGGINS, E.M., JR. UND MCCALL, C.E. (1992A). "Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase." J Biol Chem **267**(21): 14547-50.
- O'SULLIVAN, M.G., HUGGINS, E.M., JR., MEADE, E.A., DEWITT, D.L. UND MCCALL, C.E. (1992B). "Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages." Biochem Biophys Res Commun **187**(2): 1123-7.
- OTTO, J.C. UND SMITH, W.L. (1995). "Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2." J Lipid Mediat Cell Signal **12**(2-3): 139-56.
- PATRIGNANI, P., PANARA, M.R., GRECO, A., FUSCO, O., NATOLI, C., IACOBELLI, S., CIPOLLONE, F., GANCI, A., CREMINON, C., MACLOUF, J. UND ET AL. (1994). "Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases." J Pharmacol Exp Ther **271**(3): 1705-12.
- PATRONO, C. (1998). "Prevention of myocardial infarction and stroke by aspirin: different mechanisms? Different dosage?" Thromb Res **92**(1 Suppl 1): S7-12.
- PEREIRA, B., WU, K.K. UND WANG, L.H. (1993). "Bovine prostacyclin synthase: purification and isolation of partial cDNA." Biochem Biophys Res Commun **197**(3): 1041-8.
- PICOT, D., LOLL, P.J. UND GARAVITO, R.M. (1994). "The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1." Nature **367**(6460): 243-9.

- RAYCHOWDHURY, M.K., YUKAWA, M., COLLINS, L.J., MCGRIL, S.H., KENT, K.C. UND WARE, J.A. (1995). "Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor." J Biol Chem **270**(12): 7011.
- REDDY, S.T. UND HERSCHMAN, H.R. (1997). "Prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for the generation of prostaglandin D2 in activated mast cells." J Biol Chem **272**(6): 3231-7.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. UND ERLICH, H.A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- SCHWEER, H., WATZER, B. UND SEYBERTH, H.W. (1994). "Determination of seven prostanoids in 1 ml of urine by gas chromatography-negative ion chemical ionization triple stage quadrupole mass spectrometry." J Chromatogr **652**(2): 221-7.
- SIMMONS, D.L., BOTTING, R.M. UND HLA, T. (2004). "Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition." Pharmacol Rev **56**(3): 387-437.
- SIMMONS, D.L., LEVY, D.B., YANNONI, Y. UND ERIKSON, R.L. (1989). "Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1178-82.
- SMITH, W.L. UND DEWITT, D.L. (1996). "Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2." Adv Immunol **62**: 167-215.
- SMITH, W.L., DEWITT, D.L. UND GARAVITO, R.M. (2000). "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." Annu Rev Biochem **69**: 145-82.
- SMITH, W.L., GARAVITO, R.M. UND DEWITT, D.L. (1996). "Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2." J Biol Chem **271**(52): 33157-60.
- SMITH, W.L. UND LANGENBACH, R. (2001). "Why there are two cyclooxygenase isozymes." J Clin Invest **107**(12): 1491-5.
- SMITH, W.L., MARNETT, L.J. UND DEWITT, D.L. (1991). "Prostaglandin and thromboxane biosynthesis." Pharmacol Ther **49**(3): 153-79.

- SMITH, W.L., MEADE, E.A. UND DEWITT, D.L. (1994). "Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2." Ann N Y Acad Sci **714**: 136-42.
- SOLOMON, D.H., SCHNEEWEISS, S., GLYNN, R.J., KIYOTA, Y., LEVIN, R., MOGUN, H. UND AVORN, J. (2004). "Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults." Circulation **109**(17): 2068-73.
- SUGIMOTO, Y., NARUMIYA, S. UND ICHIKAWA, A. (2000). "Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice." Prog Lipid Res **39**(4): 289-314.
- TRIFAN, O.C., SMITH, R.M., THOMPSON, B.D. UND HLA, T. (1999). "Overexpression of cyclooxygenase-2 induces cell cycle arrest. Evidence for a prostaglandin-independent mechanism." J Biol Chem **274**(48): 34141-7.
- UENO, N., MURAKAMI, M., TANIOKA, T., FUJIMORI, K., TANABE, T., URADE, Y. UND KUDO, I. (2001). "Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2." J Biol Chem **276**(37): 34918-27.
- VANE, J.R. (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs." Nat New Biol **231**(25): 232-5.
- VANE, J.R., BAKHLE, Y.S. UND BOTTING, R.M. (1998). "Cyclooxygenases 1 and 2." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 97-120.
- WALLACE, J.L., MCKNIGHT, W., REUTER, B.K. UND VERGNOLLE, N. (2000). "NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2." Gastroenterology **119**(3): 706-14.
- WANG, L.H. UND CHEN, L. (1996). "Organization of the gene encoding human prostacyclin synthase." Biochem Biophys Res Commun **226**(3): 631-7.
- WU, K.K. UND LIU, J.Y. (2005). "Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 45-52.
- XIE, W. UND HERSCHMAN, H.R. (1996). "Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum." J Biol Chem **271**(49): 31742-8.

XIE, W.L., CHIPMAN, J.G., ROBERTSON, D.L., ERIKSON, R.L. UND SIMMONS, D.L. (1991). "Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2692-6.

YOKOYAMA, C., TAKAI, T. UND TANABE, T. (1988). "Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence." FEBS Lett **231**(2): 347-51.

YOKOYAMA, C., YABUKI, T., SHIMONISHI, M., WADA, M., HATAE, T., OHKAWARA, S., TAKEDA, J., KINOSHITA, T., OKABE, M. UND TANABE, T. (2002). "Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction." Circulation **106**(18): 2397-403.

ZELDIN, D.C. (2001). "Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism." J Biol Chem **276**(39): 36059-62.

7 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AS	Aminosäuren
Abb	Abbildung
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserum Albumin)
bp	Basenpaare
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosin-3', 5-Monophosphat
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C-terminal	Carboxylterminus
Cox-1	Cyclooxygenase 1
Cox-2	Cyclooxygenase 2
DEPC-Wasser	mit Diethyl-Pyrocbonat behandeltes Wasser
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
kDa	kiloDalton
NSAID	nonsteroidal antiinflammatory drugs
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
E. coli	Escherichia coli
EET	Epoxyeicosatrienoidsäure
EGF	Epidermal growth factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HEK	human embryonal kidneycells (Nierenzellen)
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
IL	Interleukin
LB	Luria Broth (Aminosäuren, Salze, Zucker, welche Bakterien zum Wachstum benötigen)
LPS	Lipopolysacharide
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NEAA	non-essential amino acids
p.a.	pro analysis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCS	Prostazyklin-Synthase

PG	Prostaglandin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF ₂	Prostaglandin F ₂
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGHS	Prostaglandin Endoperoxidase H Synthasen
PGI ₂	Prostaglandin I (= Prostazyklin)
PGIS	Prostaglandin I – Synthase (= Prostazyklin-Synthase = PCS)
PLA ₂ ,	Phospholipase A ₂
PPAR	Peroxisome-Proliferator-Aktivator-Rezeptoren
rpm	rotations per minutes (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur (22°C)
Tab	Tabelle
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TNF	tumor nekrose faktor
tPA	tissue-type plasminogen activator, gewebespez. Plasminogenaktivator
Tris	Tris-hydroxy methyl-aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXS	Thromboxan-Synthase
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die Eikosanoide	8
Abbildung 1-2: Der Biosyntheseweg der Eikosanoide	9
Abbildung 1-3: Prostaglandin-Rezeptoren	10
Abbildung 1-4: Cox-1 Gen	12
Abbildung 1-5: Cox-2 Gen	13
Abbildung 1-6: Struktur der Cox – 1	16
Abbildung 1-7: Cox-2-selektiver Inhibitor	22
Abbildung 2-1: Expressionsvektor pcDNA 3.1 + / -	32
Abbildung 2-2: Mutageneseverfahren	34
Abbildung 2-3: DPN I Verdau	36
Abbildung 3-1: Cox-1 und Cox-2 transient transfiziert in HEK 293 bei basaler	51
Abbildung 3-2: Cox-1 und Cox-2 transient transfiziert in HEK 293 bei supramaximaler Arachidonsäure-Stimulation	52
Abbildung 3-3: PGE ₂ -Bestimmung bei 3.1 Kontrollvektor, Cox-1 und Cox-2 transient transfiziert in HEK 293	53
Abbildung 3-4: 6-keto-PGF _{1α} -Bildung bei 3.1-Kontrollvektor, Cox-1 und Cox-2	54
Abbildung 3-5 Prostaglandinbildung der Mutanten	55
Abbildung 3-6: PGE ₂ / 6-keto-PGF _{1α} -Ratio	57
Abbildung 3-7 Das Verhältnis PGE ₂ /6 keto der Mutanten im Vergleich zur Cox-2	57
Abbildung 3-8: Western-Blot der Cox-1 und Cox-2 mit Kontrollvektor 3.1	58
Abbildung 3-9: Mutanten Western-Blot	59

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Unterschiede der Cox-1 gegenüber der Cox-2	13
Tabelle 2-1: verwendete Chemikalien	26
Tabelle 2-2: verwendete Lösungen, Puffer u. Medien und deren Zusammensetzungen	27
Tabelle 2-3: Sequenzen der Cox-2 und der Mutanten	28
Tabelle 2-4: verwendete Kitsysteme	29
Tabelle 2-5: Geräte und Hersteller, in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet	29
Tabelle 2-6: benötigte Zellkulturmaterialien, geordnet nach Material, Typ und Firma	30
Tabelle 2-7: PCR-Ansatz der Mutagenese	33
Tabelle 2-8: TransFast TM Transfektion Reagent-Protokoll (Fa.Promega)	39
Tabelle 2-9: Western-Blot-Lösungen	42
Tabelle 2-10: Trenn- und Sammelgel	42
Tabelle 2-11: Probengewinnung	43
Tabelle 3-1: Mutantentabelle, dargestellt in einem Ein-Buchstaben-Code	46
Tabelle 3-2: Ein-Buchstaben-Code	47

10 Anhang

10.1 Danksagung

Hiermit möchte ich allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, danken:

Herrn Univ.-Professor Dr. med. H. Seyberth für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Univ.-Professor Dr. med. Maier für die wertvolle Unterstützung zur Weiterführung dieser Dissertation.

Herrn PD Dr. med. Kömhoff für die Betreuung, die anregenden Diskussionen und Fertigstellung dieser Arbeit.

Allen Kollegen im Labor der Universitäts-Kinderklinik Marburg für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die vielen hilfreichen Antworten.

Frau F. Hackmann, die mir als Mitdoktorantin in und außerhalb des Labors immer motivierend zur Seite stand, sowie Frau A. Gumminie, die mit Ihrer Mitarbeit und Ihrem Fachwissen viel zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Meiner langjährigen Mitbewohnerin und Freundin Dr. med. K. Salzig für Ihre Geduld, Motivationen und Verbesserungsvorschläge, sowie Dr. med. T. Härle, Stefan Arzner und Dipl. Psych. Sebastian Pilgramm für die Diskussionsbereitschaft und die EDV-Hilfen.

Herrn Studiendirektor a.D. Friedrich Einwich für die Beratung in stilistischen Fragen.

Meinem Ehemann Dr. med. G. Pilgramm für die langjährige und liebevolle Unterstützung, ohne den diese Arbeit nicht zum Abschluss gekommen wäre.

Meinem Bruder Jason, der mich in jeder Situation unterstützt hat.

Meinen Eltern für die Begleitung während dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums und dafür, dass sie immer mit Rat und Tat für mich da sind.

10.2 Meine akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Arnold	Aumüller	Bach	Back
Bandmann	Barth	Barth	Basler
Baum	Bertalanffy	Bien	Bolm
Cetin	Cetin	Cziubayko	Daut
Dobbelstein	Eilers	Engenhardt- Cabillic	Feuser
Fruhstorfer	Gemsa	Gerdes	Geus
Görg	Görg	Gotthardt	Gotzen
Grimm	Griss	Grzesik	Gudermann
Happle	Hamer	Hasilik	Herzum
Hörle	Hoffmann	Hofmann	Joseph
Jungclas	Kaluza	Kern	Kill
Kim-Berger	Klaus	Klenk	Klose
Knake	Koolman	Kraft	Kretschmer
Krieg	Kroh	Kroll	Kuhn
Lammel	Lang	Lange	Lennartz
Lippert	Löffler	Maisch	Mennel
Meyer-Wittstock	Moll	Moosdorf	Müller
Müller	Mutters	Neubauer	Nies
Oertel	Pfeiffer	Prinz	Radsak
Renschmidt	Renz	Richter	
Röhm	Rosenow	Rothmund	Schachtschabel
Schäfer	Schäfer	Schepelmann	Schmidt
Schmidt	Schnabel	Schneider	Schneyer
Schüffel	Schulze	Schwarz	Seitz
Seyberth	Slenczka	Sommer	Steiniger
Sturm	Sundermeyer	Sure	Vogelmeier
Vohland	Voigt	Wagner	Weihe
Werner	Westermann	v.Wichert	Wulf

Meine weiteren akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Andres ₄	Bartels ₄	Bergler ₄	Burkschart ₄
Bөгemann ₄	Elbelt ₄	Gerste ₄	Koch ₄
Langer ₁	Neumann ₄	Piotrowski ₄	Reicke ₄
Schäfer ₄	Schlotmann ₄	Strombach ₂	Tyssen ₄
Trends ₃	Wiedenhöft ₄		

- 1 St. Elisabeth Hospital Herten, Klinik für Anästhesie
- 2 Diakonie-Krankenhaus Marburg-Wehrda, Klinik für Chirurgie
- 3 Universitätsspital Zürich, Klinik für Unfallchirurgie
- 4 St. Joseph Stift Bremen