

Aus der Klinik für Endokrinologie und Nephrologie, Medizinische Klinik IV
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Wirkung der Phenylacetylsäure auf
die iNOS – Expression bei chronisch niereninsuffizienten
Patienten**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

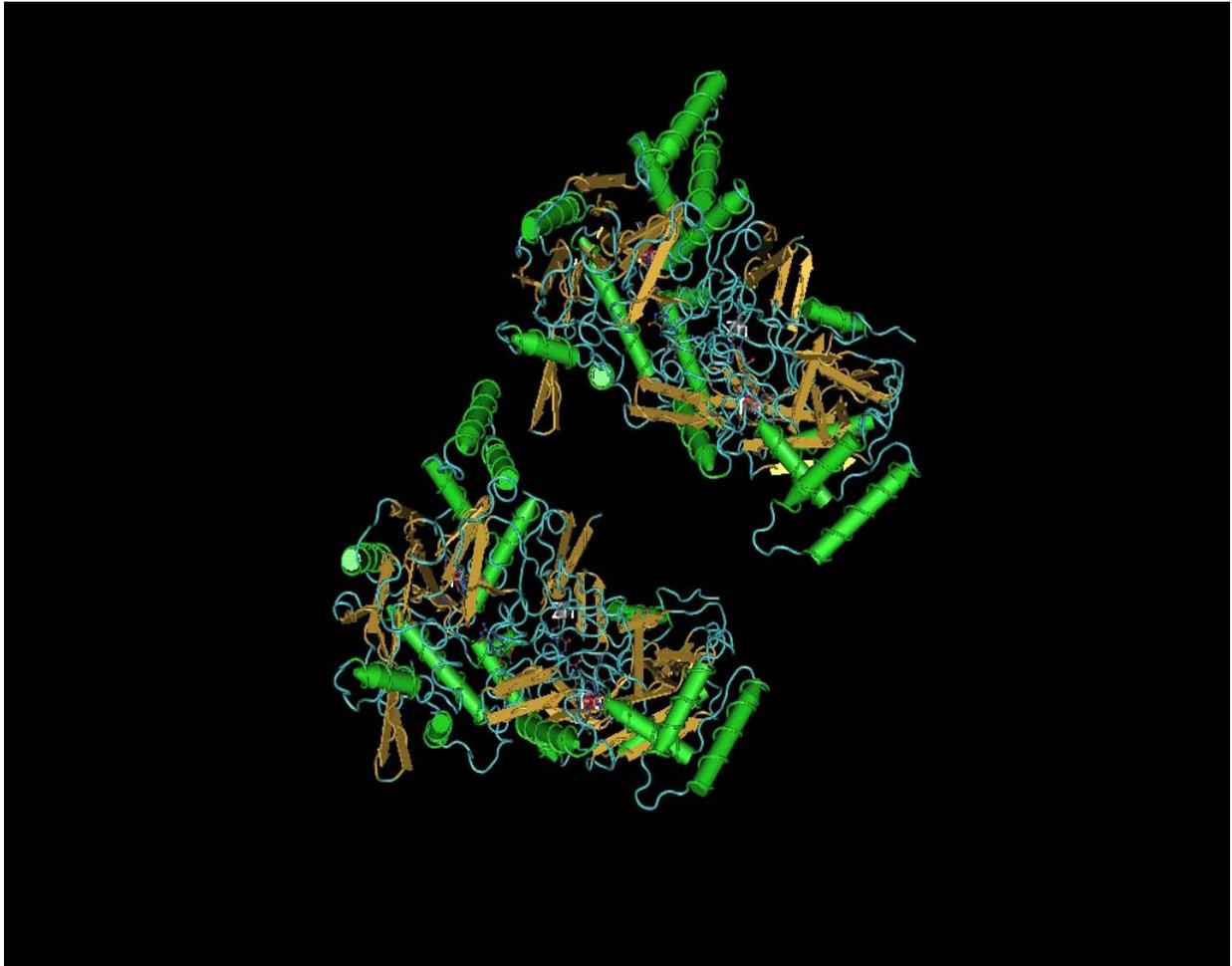
vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Brian Mahn
aus Gera

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. van der Giet
2. Prof. Dr. med. G. Schönfelder
3. Priv. - Doz. Dr. med. M. Ketteler

Datum der Promotion: 15.12.2006



Dreidimensionales Modell der induzierbaren Nitroxidsynthase
(erstellt mit CN3D, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>)

**Meiner Familie und
Herrn Karl - Heinz Schmidt**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. NO und NO – Synthasen	1
1.2. Physiologische und pathophysiologische Rolle von NO bei der Regulation der Gefäßfunktion	3
1.3. Endotheliale Dysfunktion und Pathogenese der Atherosklerose	4
1.4. Endotheliale Dysfunktion und NO	5
1.5. Atherosklerose und chronisches Nierenversagen	6
1.6. Mechanismen der reduzierten NO – Bioverfügbarkeit beim chronischen Nierenversagen	8
1.6.1. Urämietoxine.....	8
1.6.2. Phenyllessigsäure als neues Urämietoxin.....	9
1.7. Zielstellung	10
2. Methoden.....	12
2.1. Probanden	12
2.2. Präparation und Stimulation von Monozyten aus peripherem Blut	13
2.3. Präparation und Stimulation von RAW 264.7 Zellen.....	14
2.4. Zellvitalität.....	15
2.5. Präparation der RNA und real – time PCR (TaqMan).....	15
2.5.1. Primer- und Probendesign.....	15
2.5.2. RNA – Gewinnung und –Vermessung.....	16
2.5.3. RT – Reaktion.....	17
2.5.4. Amplifikation der c – DNA mit Real – time PCR.....	17
2.6. Proteingewinnung und Westernblot.....	19
2.7. Messung der Nitrit – Produktion	20
2.8. Präparation von Endothelzellen.....	20
2.9. Statistik.....	21
3. Ergebnisse	22
3.1. Einleitung.....	22
3.2. Stimulation der iNOS - Synthese durch IFN γ und LPS und Inhibition durch Dialyseplasma	22

3.3. Untersuchung der Effekte von PAA auf die iNOS - Expression	25
3.4. Wirkung verschiedener Phenylalaninderivate auf die iNOS - Expression...	26
3.5. Stimulation der iNOS - Expression in RAW 264.7 durch LPS sowie Hemmung durch PAA.....	27
3.6. Bestimmung der Zellviabilität.....	28
3.7. Western - Blot nach Stimulation von RAW 264.7 - Zellen unter dem Einfluss von PAA	28
3.7. Messung der Nitritbildung mittels Griess – Assay.....	30
3.8. Einfluss von PAA auf die endotheliale NOS - Isoform	31
4. Diskussion	33
5. Zusammenfassung	39
6. Literaturverzeichnis	41
7. Danksagung	49
8. Lebenslauf.....	50
9. Erklärung.....	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Summenformel der NO - Synthese aus L - Arginin.....	1
Abbildung 2.	Allgemeine Struktur der NOS – Genfamilie mit Darstellung der Bindungsstellen für Arginin (Arg), Haem, BH ₄ (Tetrahydrobiopterin), FAD, FMN und NADPH.....	2
Abbildung 3.	Strukturformel von PAA.....	9
Abbildung 4.	Übersicht über die Bildung von PAA im Körper.....	10
Abbildung 5.	Expression der iNOS - mRNA in humanen Monozyten über die Zeit nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS und 100 u/ml IFN _γ	23
Abbildung 6.	Prozentuale Steigerung der basalen iNOS - Expression unter dem Einfluss des Plasmas von Dialysepatienten.....	24
Abbildung 7.	Effekt unterschiedlicher PAA - Konzentrationen auf die mit IFN _γ und LPS - stimulierte iNOS - Expression.....	25
Abbildung 8.	Einfluss von Phenylalaninderivaten auf die iNOS - Expression.....	26
Abbildung 9.	Inhibierung der iNOS - Expression durch unterschiedliche PAA - Konzentrationen in mit 1 µg/ml LPS über 6 h stimulierten RAW 264.7 - Zellen.....	27
Abbildung 10.	Vitalität von RAW 264.7 - Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von PAA.....	28
Abbildung 11.	Repräsentativer Immunoblot von iNOS und β – Actin.....	29
Abbildung 12.	Ergebnisse der densitometrischen Messung der iNOS – Westernblots.....	30
Abbildung 13.	Mittels Griess - Assay gemessene Nitritmenge im Kulturmedium von RAW 264.7 - Zellen nach Stimulation mit LPS 1 µg/ml.....	31
Abbildung 14.	Einfluss verschiedener PAA – Konzentrationen und des eNOS – Inhibitors L – NAME auf die Nitritproduktion von ECV 304 - Zellen.....	32
Abbildung 15.	Biologische Wirkungen von Peroxynitrit.....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Übersicht über die bekannten NO – Synthase – Isoformen.....	2
Tabelle 2.	Klinische und biochemische Charakteristika der Versuchspersonen.....	13
Tabelle 3.	Sequenzen von Primern und TaqMan – Proben für das murine und humane iNOS- und β – Actin - Gen.....	15