

**Statine aktivieren die transkriptionelle und translationale
Expression des antioxidativen Enzyms
Hämoxygenase-1 in Endothelzellen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Anke Hemmerle-Kock
geb. am: 06.09.1975 in: Emmerich am Rhein

Gutachter /in

1. PD Dr. Johannes-Peter Stasch
2. Prof. Dr. med. Joachim Neumann
3. Prof. Dr. Britta Qualmann

Halle (Saale), 03.03.2010

Für Emma und Lukas

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	7
1.1 ATHEROSKLEROSE	7
1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose	7
1.1.2 Endothelfunktion und Atherosklerose	8
1.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und Atherosklerose	8
1.1.4 Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose	9
1.2 HYPERLIPIDÄMIE	10
1.2.1 Formen und Pathogenese	10
1.2.2 Therapie der Hypercholesterinämie	11
1.2.3 Medikamentöse Therapie der Hyperlipidämie	12
1.3 HMG-CoA-REDUKTASE-HEMMER	13
1.3.1 Wirkmechanismus der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer	14
1.3.2 Pleiotrope Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer	15
1.4 HÄMOXYGENASE	17
1.4.1 Isoformen und deren Vorkommen	17
1.4.2 Die Bedeutung der induzierbaren Hämoxygenase	18
1.4.3 Regulation der HO-1	20
2 PROBLEMSTELLUNG	21
3 METHODEN UND MATERIAL	23
3.1 ZELLKULTUR	23
3.1.1 Kultivierung der Endothelzellen	23
3.1.2 Kultivierung der Neuroblastomzellen	23
3.2 BESTIMMUNG FREIER SAUERSTOFFRADIKALE	23
3.2.1 Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung	24
3.2.2 Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz	24
3.3 VIABILITÄTS-ASSAY	24
3.4 NORTHERN-BLOT-ANALYSE	25
3.4.1 Gewinnung und Isolierung der Sonden	25
3.4.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	26
3.4.3 DNA-Gelelektrophorese und Fragmentisolierung	26
3.4.4 Inkubationsprotokoll zur RNA-Isolierung	26
3.4.5 RNA-Isolierung	26
3.4.6 RNA-Gelelektrophorese	27
3.4.7 RNA-Fixierung auf Nylon-Membranen durch Vakuum-Blotting	27

3.4.8	Markierung von DNA-Sonden mit ³² P-Desoxycytidin-Triphosphat	27
3.4.9	Vor- und Haupthybridisierung	28
3.4.10	Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle	28
3.5	WESTERN-BLOT-ANALYSE	28
3.5.1	Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse	28
3.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	29
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.5.4	Protein-Transfer durch Western-Blot.....	29
3.5.5	Detektion mit spezifischen Antikörpern	30
3.6	REPORTERGEN-ASSAY IN TRANSIENT TRANSFIZIERTEN ZELLEN	30
3.6.1	Transformation kompetenter Escherichia coli Zellen	30
3.6.2	Plasmidgewinnung und Isolierung	31
3.6.3	Identifikation durch Restriktionsverdau.....	31
3.6.4	Transfektion	32
3.6.5	Inkubationsprotokoll	32
3.6.6	Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay	32
3.7	MATERIAL	34
3.8	PUFFER UND SUBSTANZLÖSUNGEN	35
3.8.1	Puffer.....	35
3.8.2	Substanzlösungen	35
3.9	STATISTIK	36
4	ERGEBNISSE.....	37
4.1	ANTIOXIDATIVER EFFEKT DER STATINE	37
4.1.1	Stimulation der Radikalbildung durch NADPH.....	37
4.1.2	Konzentrationsabhängiger Effekt von Statinen in Endothelzellen	38
4.1.3	Zeitabhängigkeit der Radikalsenkung durch HMG-CoA-Reduktase- Hemmer	40
4.1.4	Zellviabilität nach Inkubation mit Simvastatin	40
4.1.5	Einfluss von Mevalonsäure auf die Reduktion der Radikalbildung.....	42
4.1.6	Direkter Effekt von Bilirubin in Endothelzellen	42
4.1.7	Einfluss eines HO-1-Inhibitors auf die antioxidative Wirkung der Statine	43
4.1.8	Zusammenfassung	45
4.2	INDUKTION DER HÄMOXYGENASE-1 DURCH STATINE	46
4.2.1	Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1 mRNA durch Statine	46
4.2.2	Induktion der HO-1 mRNA durch Statine in neuronalen Zellen	48
4.2.3	Konzentrationsabhängiger Effekt der Statin-Laktone.....	48
4.2.4	Zeitabhängigkeit der Induktion	49
4.2.5	Zeitabhängigkeit der HO-1-Induktion in neuronalen Zellen.....	50
4.2.6	Konzentrationsabhängiger Effekt der Statine auf die HO-1- Proteinexpression.....	50
4.2.7	Zusammenfassung	52

4.3	MECHANISMEN DER HO-1-INDUKTION DURCH STATINE	52
4.3.1	Einfluss von Sauerstoffradikalen	52
4.3.2	Einfluss von Mevalonsäure auf die mRNA-Expression	53
4.3.3	Einfluss von Mevalonsäure auf die Proteinexpression	54
4.3.4	Einfluss von GGPP und FPP	54
4.3.5	Einfluss von L-NAME.....	55
4.3.6	Einfluss des Translationsblockers Cycloheximid	56
4.3.7	Einfluss des Transkriptionsblockers Aktinomycin D	57
4.3.8	Effekt von Statinen auf die HO-1 Promotor-Aktivität.....	57
4.3.9	Zusammenfassung	59
5	DISKUSSION	60
6	ZUSAMMENFASSUNG	73
7	LITERATURVERZEICHNIS	75
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	86
8.1	ORIGINALARBEITEN	86
8.2	IN KURZFORM PUBLIZIERTE VORTRÄGE UND POSTER (ABSTRACTS)	86
9	DANKSAGUNG	88

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivator-Protein-1
ARE	<i>Antioxidant Responsive Element</i>
CHX	Cycloheximid
CNC-bZIP	<i>Cap'N' Collar-Basic-Leucin-Zipper</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
CRE	Cadmium Response Element
CRP	C reaktives Protein
Db-cAMP	Dibutyryl-cAMP
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDF	Endotheldysfunktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FPP	Farnesylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
HDL	High density Lipoprotein
HMG-CoA	Hydroxy-Methylglutaryl- Coenzym A
HO	Hämoxygenase
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1

IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
Kb	Kilobasen
Kda	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density Lipoprotein
LFA-1	Leukozyten-Funktions-Antigen-1
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin-methylester
LOX-1	Lipoxygenase 1
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf 2	<i>NF-E2-Related Factor 2</i>
ODQ	1-H-(1,2,4)-Oxadiazol-(4,3a)quinoxalin-1-on
OxLDL	Hochoxidiertes LDL
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase C
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator activated receptor γ</i>
RLU	Relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RR	Riva Rocci

SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumlaurylsulfat
SnPP	Zinn-Protoporphyrin XI
SR-B1	Scavenger Receptor B1
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
StRE	<i>Stress-Response-Element</i>
THP-1	
TLC	Therapeutic Lifestyle Changes
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TPA	Tumorpromotor A
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
ZnBG	Zink-deuteroporphyrin 2,4-bis-glycol

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Atherosklerose stellt eine chronische Entzündung des Subendotheliums mit einer teils herdförmigen, teils diffusen Veränderung der Gefäßwand dar. Die Entwicklung der Atherosklerose ist kein degenerativer, sondern ein aktiver Prozess, der die Elemente der chronischen Entzündungsvorgänge und Reparaturvorgänge in der Arterienwand beinhaltet (Fuster and Badimon 1995). Trotz zahlreicher morphologischer, biochemischer und epidemiologischer Untersuchungen ist die Pathogenese jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt.

Es existieren verschiedene Hypothesen zur Entstehung der Atherosklerose, wobei die von Ross entwickelte *Response-to-injury*- oder Verletzungstheorie (Maines, Trakshel et al. 1986; Guillot, Misslin et al. 1993) am weitesten verbreitet ist. Das initiale Ereignis besteht nach dieser Hypothese in einer Verletzung des Gefäßendothels. Gefäßverzweigungen und -biegungen weisen eine erhöhte Permeabilität des Endothels auf und sind somit besonders anfällig für Läsionen. Begünstigt werden diese durch die bekannten Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose wie Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus, Rauchen und auch Hyperlipoproteinämie. Durch die Schädigung des Gefäßendothels können Plasmabestandteile wie z.B. oxidierte Lipoproteine in die Gefäßwand eindringen. Es kommt zu einer subendothelialen Anreicherung der cholesterinreichen Lipoproteine (LDL), die daraufhin einer Modifikation zu minimal-oxidierten LDL unterliegen. Das Endothel reagiert darauf mit einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Faktoren wie VCAM-1 und MCP-1. Monozyten und T-Lymphozyten wandern vermehrt aus der Blutbahn ein. Monozyten wandeln sich zu Makrophagen um und produzieren verstärkt Zytokine (Lusis 2000). Die daraus resultierende gesteigerte Radikalbildung führt dazu, dass die minimal-oxidierten LDL durch Reaktionen mit ROS zu stark-oxidierten LDL (oxLDL) werden und nicht mehr über den LDL-Rezeptor endozytiert werden können. OxLDL wird von den Makrophagen über den *scavenger receptor* (z.B. CD 36) aufgenommen, wodurch diese wiederum zu Schaumzellen umgewandelt werden. Auch an diesem Prozess sind ROS beteiligt: Peroxydierte Lipide können als Liganden des nukleären Rezeptors *peroxisome proliferator activated receptor γ* (PPAR γ) fungieren (Neve,

Fruchart et al. 2000), der in Makrophagen die Expression des oxLDL Rezeptors CD 36 induziert und die Aufnahme von oxLDL erhöht (Nagy, Tontonoz et al. 1998).

Schaumzellen treten zuerst isoliert auf, entwickeln sich aber dann zusammen mit glatten Muskelzellen zu *fatty streaks* (Fettstreifen). Diese stellen die ersten sichtbaren Läsionen der Gefäßwand dar. In der Folge kommt es zur Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen und zur Synthese großer Mengen extrazellulärer Matrixproteine. Daraus entstehen atherosklerotische Plaques mit einer dünnen, fibrösen Kappe (*fibrous cap*) und einem lipidreichen nekrotischen Inneren (*necrotic core*). Die atherosklerotischen Plaques können schließlich rupturieren und intravaskuläre Thrombosen auslösen, die zu akuten Koronarsyndromen oder Schlaganfall führen (Lusis 2000).

1.1.2 Endothelfunktion und Atherosklerose

Das Endothel stellt die mechanische und biologische Barriere zwischen Blutstrom und Gefäßwand dar. Es ist ein bedeutendes endokrines Organ, welches für den lokalen Blutdruck, die Hämostase und die Abwehrmechanismen unentbehrlich ist. Durch das Endothel werden die Vasodilatation, antiinflammatorische und antikoagulatorische Effekte, sowie Zelladhäsion, -migration und -proliferation geregelt. Endothelzellen sind der Syntheseort zahlreicher Substanzen wie z.B. NO, Endothelin, Prostacyclin und Adhäsionsmolekülen. Jede Störung der Hämostase kann somit zur Gefäßschädigung und Ausbildung von Atherosklerose führen.

Die Endotheldysfunktion (EDF) ist eine systemische Erkrankung und ein wichtiger Bestandteil in der Pathogenese der Atherosklerose. EDF ist durch eine gestörte Bioverfügbarkeit von NO gekennzeichnet und führt zur Ischämie des Myokards und zum akuten Koronarsyndrom. Lipid-Peroxide und freie Radikale gelten allgemein als Auslöser zahlreicher chronischer und entzündlicher Erkrankungen. Ihr Wirkungsmechanismus ist dabei sehr vielfältig. Oxidativer Stress stimuliert in Endothelzellen zunächst inflammatorische Reaktionen: Bei zu hoher Konzentration führt er zur Apoptose und zum Absterben der Zellen. Oxidierte LDL führen in Endothelzellen ferner zur intrazellulären Ablagerung von Lipiden und zur Bildung von Schaumzellen. Die Anreicherung von Cholesterin in der Zellmembran führt zusätzlich zu einem Verlust an Elastizität und Adhäsionsfähigkeit, wodurch bei erhöhtem Druck und Scherstress die Ablösung von Endothelzellen erleichtert wird.

1.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und Atherosklerose

Eine Zelle und ihre Kompartimente stellen ein empfindliches System dar, das eine Vielzahl von Proteinen und Substanzen enthält, um das physiologische Gleichgewicht zu erhalten. Wenn die Balance zwischen Gehalt an Pro-Oxidantien (z.B. ROS) und Gehalt an oxidativen Schutzfaktoren aus dem Gleichgewicht gebracht wird, spricht man von oxidativem Stress. Durch ein Absinken des Gehaltes an Antioxidantien folgt eine

vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffzwischenstufen (Halliwell and Gutteridge 1990). In normalen biologischen Prozessen werden laufend freie Radikale gebildet. Die kontrollierte Generierung von Sauerstoffspezies dient in phagozytären Zellen der Immunabwehr. Unkontrollierter oxidativer Stress erzeugt hingegen zellschädigende Effekte wie z.B. Lipidperoxidationen (Rice-Evans and Burdon 1993) und dadurch Membranbeschädigungen (Ferrali, Signorini et al. 1992), DNA-Strangbrüche (Ames 1989) und Proteinveränderungen (Dean, Giese et al. 1993). Freie Radikale sind zumindest teilweise Ursache verschiedener Erkrankungen wie myokardialer Ischämie, inflammatorischer Prozesse, Krebs, oder auch zentralnervöser Störungen wie der Alzheimer-Demenz (Halliwell and Gutteridge 1990).

Auch an der Pathogenese der Atherosklerose sind reaktive Sauerstoffspezies beteiligt. Neben einer direkten Endothelschädigung werden freie Radikale für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion verantwortlich gemacht. Sie führen zu einem vermehrten Abbau des gefäßerweiternd wirkenden NO und somit zu einem NO-Mangel im Endothel (Mugge 1994). Sauerstoffradikale begünstigen durch Lipidperoxidationen die vermehrte Bildung von oxLDL, welches fördernd in die Atherogenese eingreift (Rice-Evans and Bruckdorfer 1992). Zudem aktivieren Sauerstoffradikale Metalloproteinasen und unterstützen dadurch den Abbau von Matrixproteinen an den Rändern eines atherosklerotischen Plaques. Dieser Prozess wird als wesentliche Ursache für die Instabilität und damit die Ruptur eines Plaques mit den Folgen eines thrombotischen Verschlusses diskutiert (Diederich, Skopec et al. 1994; Busse and Fleming 1996). Eine Hemmung bzw. Inaktivierung der unter pathophysiologischen Bedingungen im Überschuss gebildeten Sauerstoffradikale sollte sich daher im Sinne einer Endothel- und Gefäßprotektion auswirken (Cooke 1997).

1.1.4 Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose

Zahlreiche empirische Studien belegen, dass kardiovaskuläre Krankheiten multifaktoriell bedingt sind. Für die Entstehung einer Atherosklerose gibt es verschiedene Risikofaktoren: Nicht modifizierbare primäre Risikofaktoren sind Alter, männliches Geschlecht und familiäre Vorbelastung mit kardiovaskulären Krankheiten. Unter den primären modifizierbaren Risikofaktoren sind vor allem die arterielle Hypertonie, Nikotinabusus und die Hypercholesterinämie von Bedeutung. Sie erhöhen die Erkrankungswahrscheinlichkeit um ein Vielfaches, wobei sich das Risiko bei Kombination mehrerer Risikofaktoren potenziert (Poulter 1999).

1.2 Hyperlipidämie

1.2.1 Formen und Pathogenese

Grundsätzlich muss zwischen der primären, genetisch bedingten Form der Hyperlipidämie und der sekundären, erworbenen Form unterschieden werden. Ursachen für die sekundäre Hyperlipidämie sind vor allem verhaltens- und umweltbedingte Umstände wie mangelnde Bewegung, zu fettreiche Ernährung und erhöhter Alkoholgenuß. Aber auch die Einnahme bestimmter Medikamente (Kontrazeptiva, Kortikosteroide, etc.) und Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypothyreose oder Niereninsuffizienz können zu einer sekundären Hyperlipidämie führen.

Die primäre Hyperlipidämie wird genetisch bedingt. Sie entsteht durch Mutationen in den Genen für Apolipoproteine, bestimmte Enzyme oder Rezeptoren. Eine Erkrankung, welche mit einer exzessiven Erhöhung des Gesamt- und LDL-Cholesterins einhergeht, ist die familiäre Hypercholesterinämie. Sie zählt zu den häufigsten monogenetisch vererbten Stoffwechselerkrankungen. Ursache für die familiäre Hypercholesterinämie sind Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen (Goldstein and Brown 1987). Phänotypisch liegt eine Hypercholesterinämie Typ IIa nach Fredrickson vor (siehe Tabelle 1) (Windler 1994). Klinisch manifestiert sich die familiäre Hypercholesterinämie durch frühzeitige Koronarsklerose. Für das rasche Fortschreiten der Atherosklerose sind neben den erhöhten LDL-Spiegeln auch die niedrigen HDL-Konzentrationen verantwortlich.

Einteilung der Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson:

Typen	I	IIa	IIb	III	IV	V
Cholesterin	normal	erhöht	erhöht	erhöht	(erhöht)	(erhöht)
Triglyceride	erhöht	normal	erhöht	erhöht	erhöht	erhöht
LDL-Cholesterin	erniedrigt	erhöht	erhöht	(erhöht)	normal	(erniedrigt)
HDL-Cholesterin	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt
Atherosklerose-Risiko	nein	hoch	hoch	hoch	mäßig erhöht	gering erhöht

1.2.2 Therapie der Hypercholesterinämie

Die Therapie der Hypercholesterinämie gestaltet sich abhängig von der Anamnese des Patienten. Grundsätzlich wird zunächst eine Änderung des Lebensstils (*Therapeutic lifestyle changes, TLC*) hin zu einer fettarmen Ernährung, regelmäßiger Bewegung und Reduktion von Alkohol- und Nikotinabusus empfohlen. Zusätzlich werden bestehende Grunderkrankungen wie Hypertonie (RR > 140/90) oder Hypothyreose medikamentös behandelt. Liegt keine kardiovaskuläre Vorerkrankung oder Diabetes mellitus vor, so handelt es sich um eine Primärprävention. Ziel der Primärprävention ist die Verhinderung der Entstehung einer Atherosklerose durch Beseitigung der Risikofaktoren. Dies sind neben Rauchen und Hypertonie niedriges HDL (< 40mg/dL), familiäre Belastung (KHK bei einem männlichen Verwandten ersten Grades < 55 Jahre bzw. < 65 bei einer weiblichen Verwandten) und das Alter (Männer > 45 Jahre, Frauen > 55 Jahre). Erst wenn diese Maßnahmen nicht ausreichen, um die Zielwerte zu erreichen, wird zusätzlich medikamentös behandelt. Diabetespatienten werden auch ohne kardiovaskuläre Vorerkrankung nach den sekundärpräventiven Richtlinien behandelt, da es durch Insulinmangel zu einer verstärkten Lipolyse mit vermindertem VLDL-Abbau kommt. Ziele der Sekundärprävention sind die Verhinderung des Fortschreitens einer klinisch bereits manifesten Gefäßerkrankung, die Vermeidung einer neuerlichen klinischen Manifestation und unter Umständen sogar die Rückbildung bereits bestehender atherosklerotischer Läsionen. Hier erfolgt die medikamentöse Therapie zeitgleich mit der Lebensstiländerung, wobei die Zielwerte niedriger liegen als bei der Primärprävention.

Therapierichtlinien nach *National Cholesterol Education Program* (NCEP):

Risikokategorie	Zielwert LDL mg/dL	Nicht-medikamentöse Maßnahmen erforderlich ab	Medikamentöse Therapie erforderlich ab
KHK oder äquivalente Erkrankung, Diabetes mellitus	< 100 < 70 optional	≥ 100	≥ 100 (70-99 optional)
≥ 2 Risikofaktoren	< 130 < 100 optional	≥ 130	≥ 130 (100-129 optional)
0-1 Risikofaktor	< 160	≥ 160	≥ 190 (160-189 optional)

1.2.3 Medikamentöse Therapie der Hyperlipidämie

Zur Zeit sind fünf Substanzgruppen zur Therapie der Hyperlipidämie zugelassen:

- **Anionenaustauscherharze** (Colestyramin, Colestipol): Diese binden Gallensäuren im Darm, wodurch der enterohepatische Kreislauf unterbrochen wird. In Folge dessen wird vermehrt Cholesterin aus dem Blut resorbiert, welches zur Neusynthese der Gallensäuren benötigt wird.
- **Cholesterin-Resorptionshemmer** (Ezetimib): Dieser verhindert die Cholesterin-Aufnahme durch Hemmung des mukosalen Transportmechanismus (Hemmung des Cholesterin-Transporters SR-B1).
- **Fibrate** (Fenofibrat, Bezafibrat, Gemfibrozil): Diese steigern die Lipoprotein-Lipase-Aktivität, wodurch Triglycerid-reiches SR-B1 schneller abgebaut wird. Zusätzlich wird die Lipogenese in der Leber stimuliert und somit der Bedarf an Triglyceriden erhöht. Fibrate senken vor allem den Triglyceridspiegel, erreichen aber auch eine moderate LDL-Cholesterin-Senkung und einen leichten HDL-Anstieg.
- **Nicotinsäure und Analoga** (Niacin, Acipimox): Durch eine Hemmung der Triglyceridlipase wird die Lipolyse gehemmt und es kommt zu einer verminderten Produktion von VLDL und LDL. Darüber hinaus wird die Lipoproteinlipase-Aktivität stimuliert, wodurch der Triglyceridspiegel gesenkt wird.
- **HMG-CoA-Reduktase-Hemmer** (Statine): Diese hemmen die HMG-CoA-Reduktase und somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Cholesterinbiosynthese.

Statine sind Mittel der ersten Wahl bei der Therapie der Hyperlipidämie. Bei Statinunverträglichkeit oder Kontraindikationen kommt ersatzweise ein Fibrat zum Einsatz. In jedem Fall sollte die diätetische Behandlung parallel zur medikamentösen Therapie fortgesetzt werden. In den meisten Fällen kann der LDL-Zielwert nach NCEP durch eine Statin-Monotherapie erreicht werden. Die stärkste Senkung des LDL-Spiegels gelingt mit Rosuvastatin (Brown, Bays et al. 2002). Nur wenn das LDL-Cholesterin hierdurch nicht in den Zielbereich gesenkt werden kann kommt eine Kombinationstherapie in Betracht; z.B. ein Statin in Kombination mit einem Anionenaustauscherharz oder einem Resorptionshemmer.

1.3 HMG-CoA-Reduktase-Hemmer

HMG-CoA-Reduktase-Hemmer, oder auch Statine, sind die meistverschriebenen Arzneimittel zur Senkung der Hyperlipidämie (Maron, Fazio et al. 2000). Erstmals wurde 1976 Mevastatin aus dem Pilz *Penicillium citrinum* gewonnen. 1979 konnte aus Extrakten der Pilze *Monascus ruber* und *Aspergillus terreus* Lovastatin (Mevinolin, Monacolin K) isoliert und charakterisiert werden (Roth 2002). Pravastatin wird durch mikrobielle Hydroxylierung von Mevastatin gewonnen, während Simvastatin durch partialsynthetische Abwandlung von Lovastatin hergestellt wird. Alle übrigen auf dem Markt befindlichen Statine werden vollsynthetisch gewonnen (Manzoni and Rollini 2002). Eingesetzt werden die Statine nicht in ihrer sauren Form, sondern als *Prodrugs* in Form von Laktone (Lovastatin und Simvastatin) bzw. als stabile Monocalciumsalze (Atorvastatin, Rosuvastatin) oder Natriumsalze (Pravastatin).

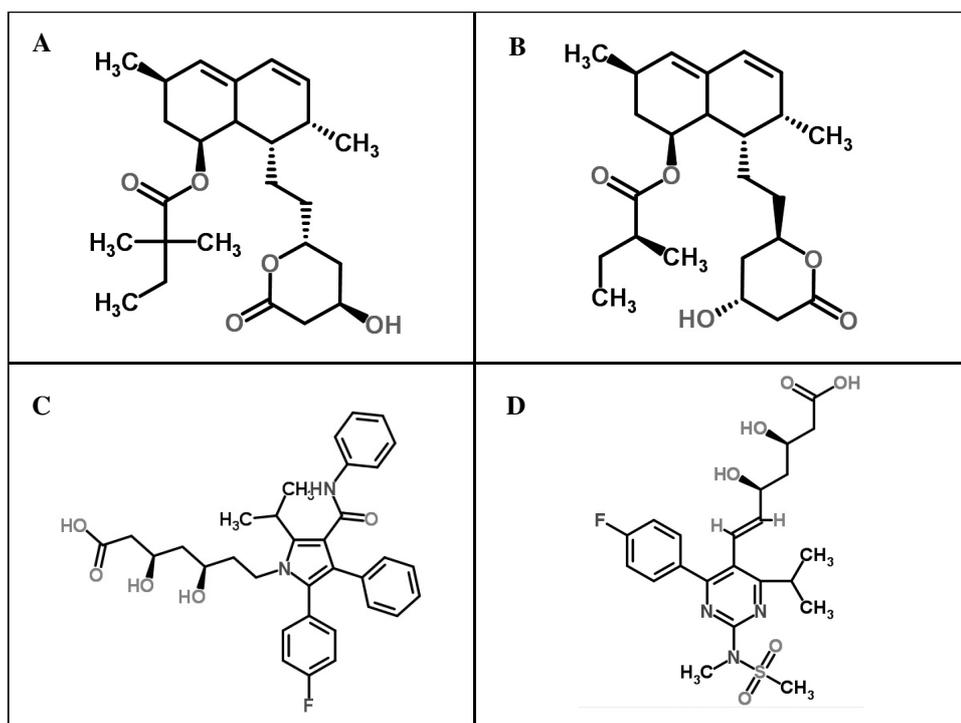


Abb. 1: Strukturformeln der verwendeten Statine

A: Simvastatin, B: Lovastatin, C: Atorvastatin, D: Rosuvastatin

1.3.1 Wirkmechanismus der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer

Statine hemmen in der Leber kompetitiv und reversibel die Reduktion von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) zu Mevalonsäure und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Cholesterolsynthese (Lennernas and Fager 1997). Dies führt zu einer drastischen Reduktion des intrazellulären Cholesterinspiegels. Daraufhin werden Proteasen aktiviert, welche wiederum Sterol-Regulator-Element bindende Proteine (SREBP) des endoplasmatischen Retikulums freisetzen. SREBPs werden in den Zellkern transloziert und induzieren dort die Genexpression für LDL-Rezeptoren (Duriez 2001). Dies bedingt eine Steigerung der Menge an LDL-Rezeptoren auf der Leberzelloberfläche, so dass in Folge die Resorption von im Plasma zirkulierenden LDL-Cholesterin-Partikeln erhöht wird. Mit den Hepatozyten als Zielorgan der Statine wird so eine nicht-lineare, dosisabhängige Senkung des LDL-Cholesterols erreicht.

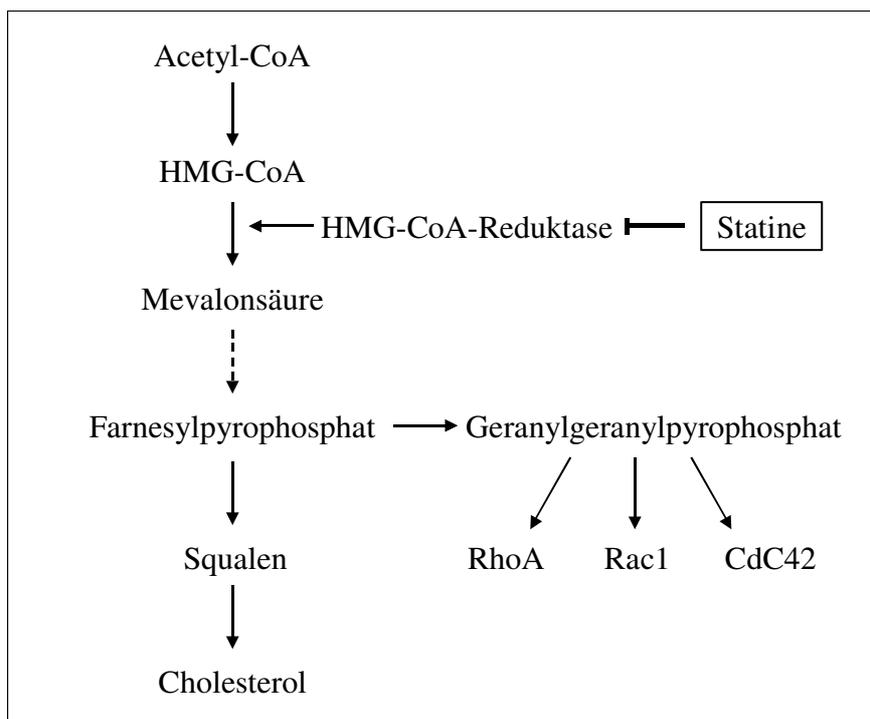


Abb. 2: Einfluss von Statinen auf die Cholesterolsynthese

Schematische Darstellung der Cholesterolsynthese und Angriffspunkt der Statine

Die in mehreren großangelegten Interventionsstudien klar belegte Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse unter einer Statintherapie wird heute vorwiegend auf diese deutliche Plasma-LDL-cholesterinsenkende Wirkung der Statine zurückgeführt (4S-Studie, HPS, WOSCOP, TexCAPS, LIPID). Häufig wird simultan eine Reduktion der

Triglyceride bei Vorliegen einer Hypertriglyceridämie erreicht. Dies ist eine Folge der verminderten Sekretion von hepatischen VLDL und unterstützt den gewünschten therapeutischen Effekt. Trotz der hohen Therapiesicherheit haben Statine auch Nebenwirkungen. Neben erhöhten Leberwerten kann es zu Myopathie und Rhabdomyolyse kommen. Letztere tritt vermehrt bei der Kombination von Statinen mit Fibraten oder Nikotinsäure auf, weshalb von einer Kombinationstherapie abgeraten werden sollte. Das vermehrte Auftreten von tödlich verlaufenden Rhabdomyolysen (insgesamt 31 Todesfälle) in Folge einer Kombinationstherapie von Cerivastatin und Gemfibrozil führte 2001 zur Marktrücknahme von Cerivastatin. Über die namensgebende Hemmung der HMG-CoA-Reduktase hinaus beeinflussen Statine mittels weiterer direkter und indirekter Effekte zahlreiche physiologische und pathophysiologische Funktionen.

1.3.2 Pleiotrope Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer

Neben der cholesterinsenkenden Wirkung werden für die Statine heute sogenannte pleiotrope Wirkmechanismen diskutiert; Effekte, die über eine Hemmung der Cholesterolsynthese hinausgehen. So wird zum Beispiel auch eine Beteiligung der Statine bei der Senkung des Hüftfrakturrisikos (Mundy, Garrett et al. 1999; Staal, Frith et al. 2003), Reduktion der Mortalität nach Transplantationen (Yildirim and Muderrisoglu 2004) und Senkung des Demenz-Risikos (Miida, Hirayama et al. 2004; Milani 2004) diskutiert.

Von besonderer therapeutischer Bedeutung scheinen jedoch die direkten vasoprotektiven und damit antiatherosklerotischen Eigenschaften der Statine zu sein, die unabhängig von einer Reduktion des Cholesterin-Plasmaspiegels beobachtet wurden. In der *Heart Protection Study* (HPS 2002) wurde deutlich, dass mit Statinen auch bei Patienten ohne erhöhte LDL-Konzentration die Herzinfarktrate signifikant vermindert werden konnte. In der *West of Scotland Protection Study* (WOSCOPS 1998) senkten Statine nicht nur die kardiovaskuläre Morbidität, sondern auch die Mortalität. Es gibt verschiedene Theorien, die diese cholesterin-unabhängigen, kardioprotektiven Effekte der Statine erklären könnten.

Die Atherogenese ist gekennzeichnet durch eine deutlich verminderte Endothelfunktion, Entzündungsprozesse in der Gefäßwand und ein übersteigertes Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen.

In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass Statine die endotheliale NO-Synthese induzieren und aktivieren und so das bei Atherosklerose reduzierte NO-Angebot erhöhen (Laufs 2003; Walter, Zeiher et al. 2004). Zusätzlich wird die Produktion des starken endothelialen Vasokonstriktors Endothelin-1 gehemmt (Davignon and Laaksonen 1999; Stoll, McCormick et al. 2004). Dadurch kann die

endotheliale Hämostase teilweise wieder hergestellt und die Endotheldysfunktion vermindert werden.

Entzündungsvorgänge können durch Reduktion des CRP-Levels, einem wichtigen Entzündungsmarker (Plenge, Hernandez et al. 2002), und Hemmung der Expression von inflammatorischen Cytokinen und Chemokinen sowie Adhäsionsmolekülen (Rezaie-Majd, Maca et al. 2002) erfolgreich verringert werden.

Statine hemmen das Makrophagenwachstum und reduzieren die Anzahl der Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche. Pietsch und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Lovastatin die Expression von CD-36 hemmt (Pietsch, Erl et al. 1996), Andere machten ähnliche Beobachtungen für die Expression von LOX-1 (Draude, Hrboticky et al. 1999) und THP-1 (Umetani, Kanayama et al. 1996). Diese *scavenger* Rezeptoren sind für die Aufnahme von oxLDL verantwortlich und spielen somit eine Schlüsselrolle in der Schaumzellbildung.

Die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen wird gehemmt (Bellosta, Bernini et al. 1998; Kwak, Mulhaupt et al. 2003) und durch Hemmung der Plättchenaktivität wird das *thrombogenic profile* verbessert (Novela and Hennekens 2004).

Darüber hinaus können Statine auf vielfältige Weise in Oxidationsprozesse eingreifen und auch auf diese Weise das Fortschreiten der Atherosklerose verzögern (Davignon, Jacob et al. 2004). Neben direkten antioxidativen Effekten (Hussein, Schlezinger et al. 1997) fördern Statine antioxidative Mechanismen der Zelle. Durch die hieraus resultierenden niedrigeren Spiegel an Prooxidantien wird die Konzentration an im Plasma zirkulierenden oxLDL gesenkt (Girona, La Ville et al. 1999).

Bisher konnten einige Mechanismen identifiziert werden, über die Statine in das Redox-Geschehen eingreifen: Sie induzieren Enzyme wie Catalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase (Wassmann, Laufs et al. 2001; Wassmann, Laufs et al. 2002; Perez-Guerrero, Alvarez de Sotomayor et al. 2003). Ein weiteres bedeutendes Enzym in der Stressantwort der Zellen stellt die Hämoxygenase-1 (HO-1) dar. Bis heute konnte nicht geklärt werden, ob Statine auch in die Regulation dieses Hitzeschockproteins (*heat shock protein*, HSP) eingreifen. Interessanterweise gibt es viele Übereinstimmungen im antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkprofil von Statinen und HO-1-Produkten (s. unter 1.4), so dass eine Mediatorfunktion dieses Enzyms bei pleiotropen Statineffekten vorstellbar ist.

1.4 Hämoxygenase

1.4.1 Isoformen und deren Vorkommen

Die Hämoxygenase gehört zur Familie der Monooxygenasen. Sie katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im oxidativen Hämabbau zu äquimolaren Mengen an Kohlenstoffmonoxid (CO), Eisen und Biliverdin. Das entstandene Biliverdin wird bei Säugetieren sofort durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert (Stocker, Yamamoto et al. 1987). Neben ihrer primären Aufgabe, das Eisen aus alternden roten Blutkörperchen zu rezyklieren, ist die Hämoxygenase ein wichtiger Bestandteil der zellulären Stressabwehr.

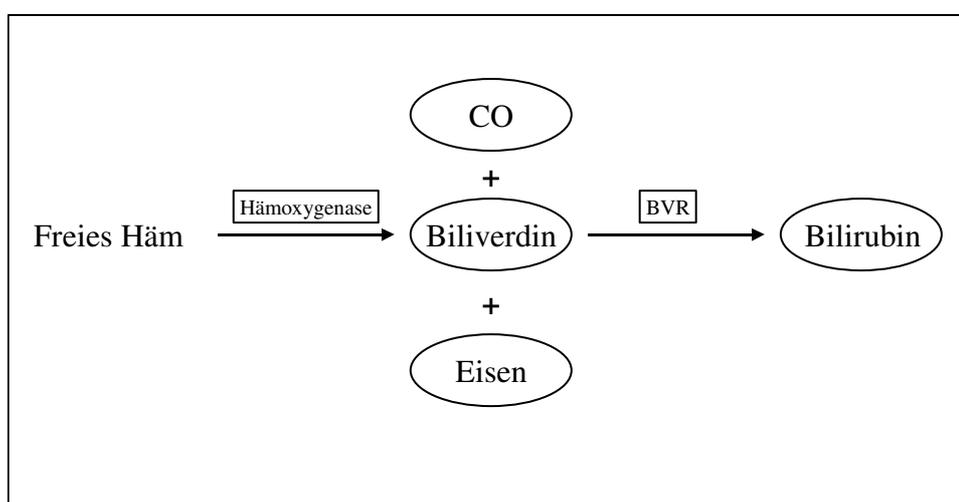


Abb. 3: Die Hämoxygenase-Enzymreaktion

Schematische Darstellung des Hämabbaus zu Kohlenmonoxid, Biliverdin und freiem Eisen (CO: Kohlenmonoxid; BVR: Biliverdinreduktase)

Das limitierende Enzym des Hämatabolismus wurde erstmals 1968 von Tenhunen beschrieben (Tenhunen, Marver et al. 1968). Bis heute wurden drei Isoformen der Hämoxygenase isoliert. Dazu gehören die durch oxidativen Stress induzierbare Hämoxygenase Typ 1 (HO-1, 32 kDa) aus der Familie der Hitzeschockproteine, die konstitutive Hämoxygenase Typ 2 (HO-2, 36 kDa) und die erst kürzlich identifizierte Hämoxygenase Typ 3 (HO-3, 33 kDa). Diese Membran-gebundenen Proteine sind Produkte unterschiedlicher Gene und sind in den Organen unterschiedlich verteilt.

Die HO-3 wird konstitutiv exprimiert, besitzt jedoch nur eine geringe katalytische Aktivität. Ihre zelluläre Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Die HO-2 wird ebenfalls konstitutiv exprimiert und ist vorrangig im zentralen Nervensystem und in den Testes lokalisiert. Ihre zelluläre Rolle ist noch nicht bekannt, dennoch liegt die

Vermutung nahe, dass die HO-2 eine wichtige Aufgabe in der Keimzellentwicklung und der Signaltransduktion neuronaler Gewebe hat. Die HO-1 ist die induzierbare Isoform der Hämoxxygenase. Sie kommt ubiquitär im gesamten Organismus vor, ist jedoch am höchsten in Milz und Leber konzentriert. Da 80-85% des gebildeten Bilirubins aus alternden oder beschädigten Erythrozyten stammt, ergibt sich diese Hauptlokalisation in Geweben, die reich an Retikuloendothelzellen sind (Schacter 1978). Induzierbar ist die HO-1 neben dem natürlichen Substrat Häm durch eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher pharmakologischer und chemischer Agentien, sowie durch Variation des Zellzustandes (Cruse and Maines 1988; Yoshida, Ishikawa et al. 1991). Außer Schwermetallen, Hormonen, Stickstoffmonoxid und Hitzeschock sind dies vor allem Agenzien, die oxidativen Stress verursachen. Darunter sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Endotoxine, Cytokine wie z.B. TNF- α , UV-Licht, Natriumarsenit, Hyper- bzw. Hypoxie und Glutathionmangel von besonderer Bedeutung (Nascimento, Luscher et al. 1993; Choi and Alam 1996; Hartsfield, Alam et al. 1997; Foresti and Motterlini 1999).

1.4.2 Die Bedeutung der induzierbaren Hämoxxygenase

In den letzten Jahren wurde für die induzierbare Hämoxxygenase eine Vielzahl von protektiven Effekten beschrieben. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die schützende Wirkung vor Zellschädigungen durch unterschiedliche Prooxidanzien. Die Hämoxxygenase vereint antiatherosklerotische, antiapoptotische und antiinflammatorische Wirkkomponenten.

Die physiologische Relevanz der HO-1 wurde zum ersten Mal deutlich nach Entwicklung einer HO-1 Knockout-Maus (Hussein, Schlezinger et al. 1997) bzw. nach der ersten Fallbeschreibung eines Patienten mit einem HO-1-Gendefekt (Yachie, Niida et al. 1999). Bei den Knockout-Mäusen wurden Anämie, Glomerulonephritis sowie deutliche Eisenablagerung in den Nieren diagnostiziert und sie zeigten die Symptome einer progressiven chronischen Entzündung. Darüber hinaus waren sie deutlich empfindlicher gegenüber oxidativem Stress als Mäuse die das HO-1-Gen enthielten. Der menschliche Patient zeigte ähnliche Symptome wie die Knockout-Mäuse einschließlich verlangsamtem Wachstum, erhöhter Ferritin-Werte, Eisenablagerungen in den Geweben und erhöhter Sensitivität gegenüber oxidativem Stress. Eine Induktion der HO-1 stellt daher eine endogene Strategie zur Vermeidung von pathogenen Zuständen dar, bei denen oxidativer Stress oder proinflammatorische Vorgänge eine Rolle spielen.

Die protektiven Effekte der HO-1 werden durch mehrere mögliche Mechanismen vermittelt. Erhöhte HO-1 Aktivität resultiert zunächst in einem vermehrten Abbau des toxischen Prooxidans Häm. Das dabei unter anderem freigesetzte CO wirkt ähnlich wie Stickstoffmonoxid (NO) als Aktivator der Guanylatcyclase und führt so zur Plättchenhemmung und Gefäßdilatation. Durch Hemmung der Expression proinflammatorischer

Zytokine besitzt CO ebenfalls entzündungshemmende Eigenschaften (Otterbein, Bach et al. 2000). Der Arbeitsgruppe um Motterlini gelang es, *CO releasing molecules* herzustellen (CORM), mit denen die protektiven Effekte der Hämoxxygenase imitiert werden konnten (Motterlini, Clark et al. 2002).

Neben CO konnten auch für Bilirubin zahlreiche protektive Effekte gezeigt werden. So führte ein Bilirubin-Zusatz zum Kulturmedium zu einer Reduktion der Zytotoxizität verschiedener Prooxidanzien (Stocker, Yamamoto et al. 1987). Bilirubin ist *in vitro* das stärkste bekannte endogene Antioxidans und hemmt die Lipidperoxidation effektiver als α -Tocopherol oder Vitamin C (Stocker, Yamamoto et al. 1987). Hopkins und Mitarbeiter konnten in Humanstudien zeigen, dass leicht erhöhte Bilirubin-Plasmaspiegel das Risiko für eine KHK senken (Hopkins, Wu et al. 1996). Außerdem wurde das Gilbert-Syndrom, eine benigne Hyperbilirubinämie, mit einem geringeren Risiko für die koronare Herzkrankheit assoziiert (Vitek, Jirsa et al. 2002). Dennery und Mitarbeiter zeigten am Tiermodell, dass erhöhte Plasmaspiegel an unkonjugiertem Bilirubin einen Schutz vor oxidativer Schädigung durch Hyperoxie darstellen (Dennery, McDonagh et al. 1995). Auch *ex vivo* wurde die antioxidative Wirkung von Bilirubin bewiesen. Im Ischämie-Reperfusion-Modell konnte an isolierten Rattenherzen sowohl durch Stimulation der HO-1 als auch durch exogen zugeführtes Bilirubin ein kardioprotektiver Effekt erzielt werden (Clark, Foresti et al. 2000).

Das aus dem Hämabbau freiwerdende Eisen stellt ein endogenes Prooxidans dar. Es kann als Promotor für die LDL-Oxidation dienen, kann andererseits aber auch durch Induktion des Ferritins einen Abwehrmechanismus gegenüber oxidativem Stress aktivieren. Ferritin ist ein Eisenspeicherprotein, welches vorrangig translationell reguliert wird (Oberle and Schroder 1997; Oberle, Polte et al. 1998). Es besitzt eine antioxidative Wirkung, die vorrangig darauf zurückzuführen ist, dass der Sauerstoffradikalbildung der Katalysator entzogen wird. Ferritin-defiziente Zellen zeigten ebenso wie HO-1-defiziente Zellen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress (Lin and Girotti 1998). Die Stimulation der Ferritinexpression schützte Endothelzellen vor oxidativer Schädigung (Balla, Jacob et al. 1992; Oberle and Schroder 1997).

Neben Ihrer Rolle als protektives Protein kann eine übermäßige Stimulation der HO-1 Zellschädigungen hervorrufen. Jedes Produkt des HO-1-Stoffwechselweges kann in deutlich erhöhter Konzentration auch toxische Reaktionen auslösen. CO stimuliert die mitochondriale Bildung von freien Radikalen und kann mit Hämproteinen Verbindungen eingehen. Freies Eisen katalysiert radikalische Reaktionen und Bilirubin ist mit dem Kernikterus bei Neugeborenen assoziiert.

Um eine protektive HO-1-Induktion zu erzielen, ist es wichtig, die molekularen Mechanismen, die der Regulation des Gens zu Grunde liegen, zu verstehen. Die Aufklärung signaltransduzierender Mechanismen der HO-1-Genregulation ermöglicht

eine „Feinregulierung“ der HO-1-Expression und könnte dadurch zu einer systematischen Nutzung der cytoprotektiven Effekte beitragen.

1.4.3 Regulation der HO-1

An der HO-1 Synthese sind hauptsächlich transkriptionelle und, wie erst seit kurzem bekannt wurde, auch posttranslationale Mechanismen beteiligt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Induktion der HO-1 nicht nur abhängig von der Gewebeart und dem Stimulator ist, sondern dass auch deutliche Unterschiede in der Regulation des Maus-Gens im Vergleich zum humanen Gen existieren. Das Maus-HO-1-Gen ist das besser untersuchte Gen. Mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Konstrukten konnten zwei 5' distale *Enhancer*-Regionen, E1 und E2 (auch als SX2 und AB1 bezeichnet), identifiziert werden. Jede dieser *Enhancer*-Regionen enthält Kopien so genannter *Stress-Response-Elements* (StRE – im humanen Gen *Antioxidant Responsive Element* ARE), die u.a. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (z.B. c-Jun, ARE) und CNC-bZIP-Proteine (z.B. Nrf 2) enthalten (Alam, Cai et al. 1994; Alam, Camhi et al. 1995; Huang, Nguyen et al. 2000). Neben DNA-Sequenzen, an die AP-1 und Nrf 2 binden, wurden auch Bindungsstellen für AP-2, NF-κB, Interleukin-6 und andere Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion der HO-1 gefunden (Lavrovsky, Schwartzman et al. 1994; Choi and Alam 1996).

Nrf 2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation antioxidativer Gene. Auch die Induktion der Hämoxxygenase durch Cadmium und andere Agenzien wird in vielen Zelltypen über Nrf 2 vermittelt. Für Mäuse konnte gezeigt werden, dass Nrf 2 nach Cadmium-Stimulation die Transkription der HO-1 durch Bindung an ein *Stress response element* im Promotor der HO-1 aktiviert. Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist an der Aktivierung der Transkription verschiedener Gene im Entzündungsgeschehen (z.B. TNF-α, ICAM-1) beteiligt. Im inaktiven Stadium liegt NF-κB im Cytosol assoziiert an ein Hemmprotein vor. Verschiedene Stimuli wie TNF-α, UV-Licht und H₂O₂ führen jedoch zum Abbau des Hemmproteins und somit zur Translokation von NF-κB in den Zellkern.

2 Problemstellung

HMG-CoA-Reduktase-Hemmer stellen eine sehr effektive Arzneistoffklasse zur Behandlung der Hypercholesterinämie dar. Verschiedene Studien zeigen, dass sich die positiven Auswirkungen einer Statintherapie nicht allein über die intensive Hemmung der Cholesterinbiosynthese erklären lassen, sondern darüber hinaus auch Cholesterin-unabhängige, pleiotrope Effekte an ihrer Wirkung beteiligt sind. Die pleiotropen Effekte umfassen eine Verbesserung der Endothelfunktion, Stabilisierung atherosklerotischer Plaques und Reduktion von oxidativem Stress und Entzündungsvorgängen (Liao 2005). Oxidativem Stress wird in der Pathogenese der Atherosklerose eine entscheidende Bedeutung beigemessen (Ross 1986; Cai and Harrison 2000). Zusätzlich zu ihrer effektiven cholesterinsenkenden Wirkung könnten die antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften der Statine (Wassmann, Laufs et al. 2001) zur der in klinischen Studien beobachteten Verringerung der Mortalität beigetragen haben (HPS 2002; Lahera, Goicoechea et al. 2007). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen für die antioxidative und antiinflammatorische Wirkung der Statine sind jedoch bislang nicht vollständig geklärt. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie sind die antioxidativen Eigenschaften der Statine in verschiedenen Zellsystemen charakterisiert?

Da reaktive Sauerstoffspezies in der Pathogenese der Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielen, sollte untersucht werden, ob Statine in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress antioxidative Wirkungen zeigen. Hierbei war von Interesse, ob es sich um einen Klasseneffekt handelt, oder ob nur einzelne Statine eine antioxidative Wirkung besitzen. Durch Zeitabhängigkeitsstudien sollte zusätzlich geklärt werden, ob es sich um einen direkten radikalfangenden Effekt handelt, oder ob eine Stimulation antioxidativer Proteine an dieser Wirkung beteiligt sein könnte.

2. Ist das HO-1-System an den antioxidativen Effekten der Statine beteiligt?

Ein Protein, welches ebenso wie Statine ausgeprägte antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt ist die Hämoxigenase. Durch Versuche mit dem HO-1 Metaboliten Bilirubin und spezifischen HO-Inhibitoren sollte eine eventuelle Beteiligung der HO an den Statineffekten geklärt werden. Mit Hilfe der Northern-Blot-Technik sollte der Frage nachgegangen werden, ob die verschiedenen Statine die Transkription der HO-1 beeinflussen. Über Western-Blot-Technik sollte zusätzlich

geklärt werden ob aus der Stimulation der Transkription ein vermehrte Proteinbiosynthese resultiert.

3. Über welche molekularen Mechanismen wird die Statin-abhängige HO-1-Induktion vermittelt?

Experimente mit dem Transkriptionsinhibitor Aktinomycin D und dem Translationsblocker Cycloheximid sollten Aufschluss über die transkriptionelle bzw. translationelle Regulation der Induktion geben. Über Zusatz der Intermediärprodukte des Mevalonsäureweges sollte geklärt werden, ob diese an der Regulation der Hämoxygenase beteiligt sind. Mit Hilfe von Promotorexperimenten sollte darüber hinaus die an der Regulation beteiligte Promotorregion näher spezifiziert werden.

3 Methoden und Material

3.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂, und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert.

3.1.1 Kultivierung der Endothelzellen

Für die Northern-Blot-Untersuchungen wurde die humane Endothel-Zelllinie ECV 304 (ECACC 92091712) in den Passagen 3-9 verwendet. Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte in Medium 199, das 10% fetales Kälberserum, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin enthielt. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

Für die Radikalmessungen wurde hauptsächlich die immortalisierte humane Nabelschnurzelllinie EA.hy 926 in den Passagen 61-67 verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. Cora-Jean S. Edgell, Pathology Department, University of North Carolina). Die Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) unter Zusatz von 15% fetalem Kälberserum, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

3.1.2 Kultivierung der Neuroblastomzellen

Für Northern-Blot-Untersuchungen wurde die Neuroblastomzelllinie N1E-115 (ECACC 88112303) in den Passagen 8-12 verwendet. Die Kultivierung der neuronalen Zellen erfolgte in Medium DMEM, das 10% fetales Kälberserum, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin enthielt. Das Zellkulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt.

3.2 Bestimmung freier Sauerstoffradikale

Durch Inkubation von Zellen mit NADPH wird die NADPH-abhängige Oxidase stimuliert, Superoxidradikale zu bilden [1] (Griending, Sorescu et al. 2000; Guzik, West et al. 2000).



Die Konzentration an Superoxidradikalen kann mit Hilfe von Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz am Luminometer gemessen werden (Li, Zhu et al. 1998; Tarpey, White et al. 1999). Durch Vorbehandlung oder direkte Inkubation der Zellen mit

potenziell antioxidativ wirkenden Substanzen lässt sich an diesem Modell deren Auswirkung auf die intrazelluläre und extrazelluläre Konzentration an Superoxidradikalen bestimmen.

3.2.1 Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung

Für die Messung wurde die jeweilige Zelllinie in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum wurde zur Bestimmung genomischer Effekte anschließend über 8 Stunden mit den Substanzen vorinkubiert. Mevalonsäure wurde 15 Minuten vor den Statinen zugesetzt. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA geerntet. Nach Zentrifugation über 5 Minuten bei 4°C wurden die Zellpellets in PBS resuspendiert und mit 100µM NADPH und 50µM Lucigenin für 10 Minuten inkubiert. Die Bestimmung direkter, substanzspezifischer Effekte erfolgte ohne Vorinkubation durch simultane Zugabe der Substanzen und Reagenzien zu den resuspendierten Zellpellets.

3.2.2 Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz

Für die Entstehung der Chemilumineszenz durch die Reaktion von Lucigenin (Bis-N-methylacridiniumnitrat) mit dem Superoxidradikal wird folgender Mechanismus diskutiert. Das Lucigenin-Kation (Luc^{2+}) nimmt zunächst ein Elektron auf und wird zum Radikal reduziert ($\text{Luc}^{\cdot+}$) [2]. Dieses reagiert mit dem Superoxidradikal zu einem instabilen Dioxethan-Intermediat. Bei dessen Zerfall entsteht ein angeregtes Acridon, welches beim Rückfall in den Ruhezustand Licht emittiert [3] (Vasquez-Vivar, Hogg et al. 1997; Tarpey, White et al. 1999).



Die Photonen können mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt werden. Als Rohdaten erhält man so genannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden. Die Messung wurde mit dem Luminometer Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Wildbad) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.3 Viabilitäts-Assay

Zur Bestimmung der Sensibilität der Zellen gegenüber cytotoxischen Einflüssen wurden Viabilitätstests durchgeführt. Dabei kam ein spektralphotometrisches Verfahren zum Einsatz, das auf der Anfärbbarkeit von lebenden Zellen mit dem Farbstoff Gentianaviolett (Kristallviolett) beruht (Flick and Gifford 1984). Dabei wurden die

Zellen mit einer Konzentration von 2×10^4 Zellen in $100 \mu\text{l}$ serumhaltigem Medium je Vertiefung ausgesät. Die Aussaat erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen. Nach einer 48-stündigen Kultivierung der Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz erfolgte die Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Diese Vorinkubation der Zellen wurde für 8 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in das Inkubationsmedium gegeben und es schloss sich eine weitere Inkubation für 24 Stunden an. Danach erfolgt die Bestimmung der Zellviabilität. Der Zellüberstand mit den toten Zellen wurde entfernt und die am Boden haftenden, noch lebenden Zellen wurden mit $100 \mu\text{l}$ absolutem Methanol für 10 Minuten denaturiert und fixiert. Nach Waschen unter fließendem Leitungswasser wurden die Zellen für 10 Minuten mit $100 \mu\text{l}$ einer 0,1%igen Gentianaviolettlösung gefärbt. Es folgten erneut mehrere Waschschritte unter fließendem Leitungswasser und schließlich das Lösen des von den Zellen aufgenommenen Farbstoffs mit ethanolischer Natriumcitratlösung (0,1 M). Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplattenphotometers (Biotek EL 311s) vermessen. Die Extinktion kann hierbei als direktes Maß für die Anzahl lebensfähiger Zellen angesehen werden.

3.4 Northern-Blot-Analyse

Für das Northern-Blot-Verfahren wird aus Proben isolierte RNA zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden die Moleküle aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägerschicht (z.B. Nylonmembran) übertragen und fixiert. Durch Hybridisierung mit geeigneten, markierten Sonden können spezifische RNA-Moleküle sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden (Alwine, Kemp et al. 1977).

3.4.1 Gewinnung und Isolierung der Sonden

Als Sonden dienten Fragmente der kodierenden Regionen der entsprechenden Gene. Diese lagen als Plasmid-DNA in *Escherichia coli* DH5- α -Kulturen vor. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *Plasmid-Midi-Isolation-Kits* der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Dieses System basiert auf einer modifizierten alkalischen Zellyse (Birnboim and Doly 1979), gefolgt von einer spezifischen DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. Die Isolation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

Gensonde	Größe	Restriktion
Hämoxxygenase-1 human	1000 bp	Eco R I
β-Aktin human	450 bp	Nco I / Pst I

3.4.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

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

3.4.3 DNA-Gelelektrophorese und Fragmentisolierung

Die Sonden-DNA wurde nach der Restriktionsspaltung in einem 0,8%-igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA enthielt das Gel den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25µg/ml. Als Referenz diente ein Standard mit DNA-Fragmenten definierter Größe (Promega, Mannheim). Mit Hilfe von UV-Licht wurden die DNA-Banden detektiert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Für die Isolierung der DNA aus den Gelbanden wurde der *Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und die Extraktion nach den Herstellerangaben vorgenommen.

3.4.4 Inkubationsprotokoll zur RNA-Isolierung

Die entsprechenden Zellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen über 8 Stunden. Anschließend wurden die Endothelzellen mit Trypsin/EDTA geerntet, abzentrifugiert und die Pellets bei -80° gelagert. Für die Ernte der Neuroblastomzellen wurde kein Trypsin/EDTA eingesetzt. Die neuronalen Zellen wurden mit PBS vom Boden der Kulturschalen gespült, abzentrifugiert und die Pellets dann ebenfalls bei -80° gelagert.

3.4.5 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus den Zellpellets wurde nach der *Single-Step*-Methode (Chomczynski and Sacchi 1987) mit Hilfe des TRIZOL-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert. Das Reagenz besteht aus einem Phenol-Guanidinisothiocyanat-Gemisch. Die Zellen werden aufgeschlossen und Zellkomponenten gelöst, ohne dass die

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

3.4.6 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Konzentration der Proben wurde am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bestimmt. Anschließend wurden je 25µg RNA mit 4fach konzentriertem Ladepuffer (Formamid, Formaldehyd, 10x MOPS, 0,01µg/ml Ethidiumbromid) versetzt und 10 Minuten bei 60°C denaturiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1%-igen Formaldehyd-Agarose-Gelen unter denaturierenden Bedingungen (Rave, Crkvenjakov et al. 1979; Sambrook et al., 1989). Als Referenz diente ein Standard mit RNA-Fragmenten definierter Größe (Sigma, Taufkirchen).

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

Mit der Methode des Vakuum-Blottens kann RNA aus einem Agarosegel über vakuumverstärkte Diffusion auf eine Nylonmembran transferiert werden. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst fotografiert. Anschließend wurden sie 20 Minuten in DEPC-Wasser mit 0,05N NaOH, 5 Minuten in reinem DEPC-Wasser und zweimal 15 Minuten in konzentriertem Transferpuffer (20x SSC) gewaschen. Mit Hilfe eines Vakuum-Blotters (Biometra, Göttingen) erfolgte der 90minütige Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺; Amersham, Freiburg). Danach wurden die Membranen für 30 Minuten bei 80°C in einem Trockenschrank gelagert. Dieses sogenannte *baking* fixiert die RNA-Moleküle auf der Nylonmembran durch Ausbildung von Bindungen zwischen den Basen der RNA und den positiv geladenen Aminogruppen der Nylonmembran.

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

Die Sonden wurden mit Hilfe des *Random Primed DNA Labeling Kits* der Firma Roche (Mannheim) markiert. Diese von Feinberg und Vogelstein 1983 entwickelte Methode basiert auf der Hybridisierung eines Gemisches aller möglichen Hexanukleotid-Kombinationen mit dem zu markierenden DNA-Fragment. Die als Sonde einzusetzende doppelsträngige DNA wird zunächst für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Sobald ein Hexanukleotid des Reaktionsgemisches als Primer an den DNA-Strang binden kann, wird der komplementäre Strang durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase synthetisiert. Durch Zugabe von ³²P-Desoxycytidin-Triphosphat (Amersham, Freiburg) und einer Mischung der übrigen Nukleotide wird der komplementäre DNA-Strang als radioaktiv markierte Sonde gebildet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten

werden die nicht inkorporierten Nukleotide durch Zentrifugation des Reaktionsansatzes über *Quick Spin* Säulen, Sephadex G50 (Amersham, Freiburg) abgetrennt.

3.4.9 Vor- und Haupthybridisierung

Die Membranen wurden zunächst über 2 Stunden bei 65°C mit 100µg/ml Fisch-DNA enthaltender Hybridisierungslösung (10 % Dextransulfat, 1 M NaCl, 1 % SDS in DEPC-Wasser) vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen der Sonde zu minimieren. Anschließend wurde die Haupthybridisierung über 24 Stunden bei 65°C mit der jeweiligen Sonde in Hybridisierungslösung durchgeführt.

3.4.10 Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle

Nach der Haupthybridisierung wurden die Membranen zunächst jeweils zweimal 15 Minuten mit 2x SSC in DEPC-Wasser bei Raumtemperatur und 0,5x SSC in DEPC-Wasser bei 65°C gewaschen. Danach folgte eine zweistündige Exposition einer Bildplatte des Fuji *Bio Imaging Analysers BAS 1500* (Fujifilm, Japan). Diese aus Europiumkristallen bestehenden Schirme ermöglichen eine erste Auswertung der markierten Membranen. Anschließend wurde ein Autoradiographiefilm (Amersham, Freiburg) über 24 Stunden mit Hilfe eines so genannten *Hyperscreens* bei -80°C exponiert. Dieser Schirm absorbiert die Strahlung starker β -Strahler und gibt sie in Form von Licht wieder ab, welches dann den Film schwärzt. Die densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms Tina 2.0 (Raytest GmbH, Straubenhardt) durchgeführt. Die Membranen wurden im Anschluss an die Detektion mit 0,1 % SDS in DEPC-Wasser gewaschen, um die gebundenen Sondenmoleküle zu entfernen. Anschließend folgte eine zweite Hybridisierung mit einer β -Aktin-Gensonde. Die RNA dieses Haushaltsproteins diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele.

3.5 Western-Blot-Analyse

Beim Western-Blot-Verfahren werden die Zellen nach der Inkubation lysiert und das Gesamtprotein unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli 1970; Towbin, Staehelin et al. 1992). Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe eines *Tank-Blot*-Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion des Hämoxxygenaseproteins erfolgte über einen spezifischen Antikörper (Alexis, Grünberg) unter Nutzung eines Chemilumineszenz-Systems.

3.5.1 Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse

Die jeweiligen Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum wurden die Zellen mit den Statinen über weitere 8

Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet, abzentrifugiert und in Lysispuffer (Tris, EDTA, 1% Triton, 1 μ M PMSF) resuspendiert.

3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mit Hilfe eines Kits der Firma Bio-Rad (München). Hierbei bilden Proteine Komplexe mit dem enthaltenen Farbstoff Coomassie-Brilliantblau, die über ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. Der Proteingehalt wird anschließend über eine Kalibriergerade berechnet, die parallel zu den Proben mit Rinderserumalbumin (12,5 – 200 μ g/ml) erstellt wurde.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten eine negative Ladung. Da diese proportional zu ihrem Molekulargewicht ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt (Sambrook et al, 1989). Bei der verwendeten Methode nach Lämmli (Laemmli 1970) werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5% Polyacrylamid konzentriert und anschließend im 15%igen Trenngel aufgetrennt. Es wurden vertikale Minigel-Elektrophoresekammern von Biometra (Göttingen) verwendet. Die Proben (20-100 μ g Protein) wurden mit 5fach konzentriertem Ladepuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA, 2% SDS, 2% Glycerol) und 2,5 M Dithiothreitol versetzt und über 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 V über 3-4 Stunden in den mit Ladepuffer (50 mM Tris-HCl, 384 mM Glycin, 0,1% SDS) gefüllten Gelkammern. Als Molekulargewichtsmarker diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgrößen (Gibco, Mannheim).

3.5.4 Protein-Transfer durch Western-Blot

Das Proteinmuster des Gels wurde mit Hilfe des *Tank-Blot*-Verfahrens in einem vertikalen Puffertank (Eigenbau) auf eine Nitrocellulosemembran (Biometra, Göttingen) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 100 mA und 5°C über 14-16 Stunden. Hierbei diente der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker zur Kontrolle der Transfereffizienz (Sambrook et al., 1989). Zur Kontrolle der Beladung wurden die Gele nach dem Transfer mit Coomassie Brilliantblau angefärbt und fotografiert (Silhavy et al., 1984).

3.5.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung (Tris-Puffer mit 4% fettfreiem Trockenmilchpulver) inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem in Blockierungslösung 1:1000 verdünnten Erstantikörper (Alexis, Grünberg) über 2 Stunden (Shibahara, Muller et al. 1985). Nach zweimaligem Waschen der Membran mit Blockierungslösung folgte die 30minütige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Anti-Kaninchen IgG-HRP; Sigma, Taufkirchen). Im Anschluss wurden die Membranen dreimal mit Blockierungslösung und zweimal mit Tris-Puffer (mit 0,5% Tween) gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Zweitantikörper wurde der ECL-Plus-Detektions-Kit der Firma Amersham (Freiburg) eingesetzt. Die enthaltene Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht nun eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm. Diese kann durch die Exposition eines Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL; Amersham, Freiburg) mit der Membran nachgewiesen werden. Die Expositionszeit lag bei 1-10 Minuten.

3.6 Reporteragen-Assay in transient transfizierten Zellen

Mit einem Genreporter-Assay kann man die transkriptionelle Aktivität von Promotoren messen. Weiterhin können mit diesem Assay auch Aussagen über die Regulation des Gens getroffen werden. Dazu wurden die HO-1-Promotoren in ein Reporterplasmid kloniert, welches die Expression einer Luciferase unter Kontrolle des Promotors ermöglicht. Die Luciferase als „Reporteragen“ wurde ausgewählt, da sie eine viel höhere Sensivität zeigt als andere „Reporterene“ (Mülhardt 2006). In Zellen, die mit diesem Reporterplasmid transfiziert worden sind, ist die Luciferase-Aktivität daher proportional zur Aktivität des klonierten Promotors. Um Aussagen über die Regulation von Genen zu treffen, kann die Promotorsequenz verändert werden. Es können z.B. bestimmte Sequenzen auf dem Promotor „ausgeknockt“ werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Kotransfektion von Expressionsplasmiden für verschiedene Transkriptionsfaktoren (Alam et al. 1990). Für die transiente Transfektion von ECV304-Zellen wurde ein Genkonstrukt, bestehend aus den *upstream* liegenden 4000 bp der humanen HO-1- Promotorregion (hHO-1) einschließlich codierendem Luciferase-Reporteragen verwendet. Weiterhin wurden Genkonstrukte verwendet, welche vier Kopien der Sequenz von Nf- κ B (pNf- κ B), drei Kopien des *stress response element* (pStRE) oder das Kontrollplasmid (pGL3basic) enthielten.

3.6.1 Transformation kompetenter Escherichia coli Zellen

Die bei -70°C gelagerten E. coli DH5- α -Kulturen wurden auf Eis aufgetaut. 100 μ l des Bakterienstamms wurden mit 1 μ g Plasmid-DNA versetzt, sanft invertiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte ein kurzer Hitzeschock für 30 Sekunden im

42°C warmen Wasserbad mit anschließender zweiminütiger Lagerung auf Eis. Nach Zusatz von 900 µl LB-Medium wurde das Gemisch für eine Stunde bei 37°C unter ständigem Schütteln (225-250 rpm) inkubiert. Von der transformierten DH5- α -Bakterienkultur wurden 10 µl auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Die verwendeten Plasmide enthielten alle ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Von den über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien wurde ein einzelner Klon ausgewählt und in 5 ml LB-Medium überführt. Nach weiterer Schüttelinkubation (37°C, 80 rpm) über Nacht wurden 900 µl transformierte E. coli-Kultur mit 100 µl Glycerol als Dauerkultur bei -70°C eingefroren. Der qualitative Transformationsnachweis erfolgte durch Spaltung der Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Tab.11) und anschließender elektrophoretischer Trennung. Die für den Restriktionsverdau benötigten Enzyme und Puffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Der Restriktionsansatz wurde nach Firmenangaben hergestellt und bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Restriktionsgemisch in einem 0,8%-igen TAE-Agarosegel (60 mV) über Nacht der Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA enthielt das Gel den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25 µg/ml. Für die Identifikation der spezifischen DNA-Fragmente im Gel wurde ein DNA-Standard (Invitrogen, Karlsruhe) definierter Größe eingesetzt. Mit Hilfe von UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und fotografiert (Eagle Eye II, Stratagene, Heidelberg).

3.6.2 Plasmidgewinnung und Isolierung

Für die Plasmidgewinnung wurden 50 ml LB-Medium mit 10 µl der transformierten Stammkultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator (80 rpm) aufbewahrt. Die Plasmidisolierung wurde am darauf folgenden Tag mit Hilfe des Plasmid-Midi-Isolations-Kits der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Dieses System basiert auf einer modifizierten alkalischen Zellyse (Birnboim and Doly 1979), gefolgt von einer spezifischen DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. Die Isolation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am UV-Spektrometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 260 nm.

3.6.3 Identifikation durch Restriktionsverdau

Zur Überprüfung, ob das Plasmid ein bestimmtes Insert enthielt, wurde das Plasmid mit einem oder zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) hergestellt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der verdauten Plasmide in einem ethidiumbromidhaltigen 0,8%-igen TAE-Agarosegel (Tris-Acetat-EDTA-Puffer-Agarosegel) erfolgte eine Beurteilung der erhaltenen Fragmentlängen unter UV-Licht gegenüber einem DNA-Standard definierter Größe (Invitrogen, Karlsruhe). Zum

Vergleich wurden die entsprechenden ursprünglichen DNA-Plasmide und Kontrollplasmide ebenso behandelt.

3.6.4 Transfektion

Als Transfektionsmittel wurde das aus mehreren Komponenten bestehende, nicht liposomale *FuGENE6*-Reagenz (Roche, Mannheim) verwendet. Das auf Lipidbasis beruhende Reagenz bildet mit der negativ geladenen Plasmid-DNA Komplexe, die durch Endozytose in die Zelle gelangen. Obwohl *FuGENE6* keine Liposomen im eigentlichen Sinne bildet, wird es wie ein liposomales Transfektionsmittel verwendet (Nagy and Watzele 2006). ECV304- und MEF-Zellen wurden zu 80%iger Konfluenz in 6-well-Platten ausgesät. Eine optimale Transfektionseffizienz wurde mit 3 μ l *FuGENE6* und 1,5 μ g Promotorplasmid pro Vertiefung erzielt. Entsprechend den Herstellerangaben wurde das Transfektionsmittel mit 100 μ l Antibiotika-freiem Medium für fünf Minuten bei RT inkubiert bevor das Promotorkonstrukt zugesetzt wurde. Nach kurzem vortexen und weiteren 15 Minuten Inkubation erfolgte dann die tropfenweise Zugabe zu den Zellen. Die Transfektionszeit betrug 24 Stunden.

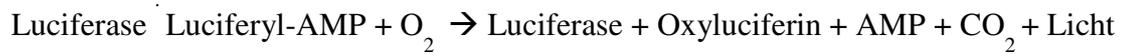
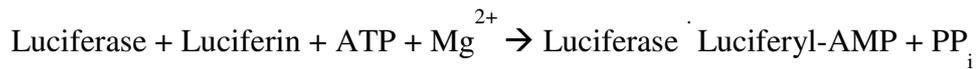
3.6.5 Inkubationsprotokoll

Das Transfektionsmedium wurde nach 24 Stunden entfernt und durch Medium ohne Serum ersetzt. Nach einer Nüchternphase von vier Stunden wurden die Zellen für 18 Stunden mit Simvastatin inkubiert. Für Hemmstoffexperimente wurden die Zellen für 25 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorbehandelt. Danach wurde die Inkubation mit Simvastatin für 18 Stunden fortgesetzt. Als Positivkontrolle wurde Cadmiumchlorid in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug ebenfalls 18 Stunden.

3.6.6 Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit warmen PBS gespült, mit 600 μ l PLB (*passive lysis buffer*, Promega, Mannheim) pro Vertiefung versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das erhaltene Zelllysate wurde in Eppendorfgefäße überführt und für zwei Minuten bei 14000 rpm (4°C) zentrifugiert. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 μ l des Überstandes in 100 μ l Luciferase-Assay-Puffer (Promega, Mannheim) gegeben und direkt im Anschluss im Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold, Bad Wildbad) für 10 Sekunden vermessen.

Das Luciferase-Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (*firefly luciferase*) ist ein monomeres Protein (62 kDa), das keiner posttranslationalen Prozessierung unterliegt. Die Luciferase katalysiert die Umsetzung von Luciferin in Gegenwart von Magnesium-Ionen und ATP zu Luciferyl-AMP, das in einem weiteren Schritt unter Freisetzung von Licht der Wellenlänge 562 nm oxidiert wird (de Wet et al. 1987):



Liegt ein Substratüberschuss vor, ist die Stärke der emittierten Lichtblitze proportional der Luciferase-Aktivität und damit ein Maß für die Promotoraktivität. Die Photonen können mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt werden. Als Rohdaten erhält man sogenannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden. Die so gemessene Luciferase-Aktivität wurde auf den Proteingehalt der Proben normiert (siehe Proteinbestimmung 3.5.2).

3.7 Material

Alexis Deutschland, Grünberg	HO-1-Antikörper, ODQ, SnPP
Amersham, Freiburg	Dextransulfat, ECL Plus Detektionsreagenz, ³² P-dCTP, Quick Spin Säulen
Bio-Rad, München	Bradford-Reagenz
European Collection of Cell Cultures (ECACC), Wiltshire, UK	ECV 304 (ECACC 92091712) N1E-115 (ECACC)
Gibco, Eggenstein	Agarose, fetales Kälberserum, Fisch-DNA, PBS, Penicillin/Streptomycin, SDS, Trypsin/EDTA, Tris
Invitrogen, Karlsruhe	Protein-Marker, Trizol-Reagenz
Merck	Ethanol, Isopropanol
Promega, Mannheim	DNA-Standard, Luciferase-Assay-System, pGL3-Vektoren
Qiagen, Hilden	Plasmid Midi Isolations Kit, Gel Extraktions Kit
Roche, Penzberg	FuGene6, Random Primed DNA Labeling Kit, Restriktionsenzyme
Roth, Mannheim	Chloroform, DEPC, DMSO, EDTA, Formaldehyd, Formamid, MOPS, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Polyacrylamid
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Bilirubin, CdCl ₂ , Cycloheximid, DTT, Ethidiumbromid, Glutamin, KT 5823, Lucigenin, NAC, NADPH, PMSF, RNA-Standard, SOD, Triton-X 100, Zellkulturmedien

3.8 Puffer und Substanzlösungen

3.8.1 Puffer

- PBS:** 138,0 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 8,1 mM Natriumhydrogen-phosphat, 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,3 bei 37°C
- MOPS:** 20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0 bei 37°C
- SSC:** 0,15 M Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0 bei 37°C
- Tris-Puffer:** 20 M Tris, pH 7,4 bei 37°C
- Ladepuffer** für RNA-Agarose-Gelelektrophorese: 400 µl Formamid, 140 µl Formaldehyd, 80 µl 10x MOPS, 8 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)
- Laufpuffer** für RNA-Agarose-Gelelektrophorese: 1x MOPS
- Ladepuffer** für Polyacrylamid-Gelelektrophorese: 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1% SDS
- Lysispuffer** zur Proteinisolation: 25 mM Tris, 5 mM EDTA, 1% Triton-X 100, pH 7,4 bei 37°C.

3.8.2 Substanzlösungen

Simvastatin und Lovastatin wurden entsprechend den Herstellerangaben zunächst einer alkalischen Hydrolyse unterzogen um die Statin-Laktone in die wirksame Form, die freie Säure zu überführen. Die resultierenden Stammlösungen (20 mM) wurden bei –20°C gelagert. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

Atorvastatin wurde als Stammlösung in DMSO bei –20°C gelagert. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

Mevalonolacton wurde ebenso wie die Statine einer alkalischen Hydrolyse unterzogen und die resultierende Stammlösung bei –20°C gelagert. Die weiteren Verdünnungen wurden mit PBS gemacht.

SnPP und ODQ wurden als Stammlösungen (20 bzw. 50 mM) in DMSO bei –20°C gelagert. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

CHX wurde als „Ready Made“ Lösung (10 mg/ml) gekauft. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

Bilirubin, Lucigenin, NAC und NADPH wurden frisch eingewogen und in den entsprechenden Mengen PBS gelöst.

3.9 Statistik

Bei den Messungen der Zellviabilität und der Chemilumineszenz sind alle Messdaten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von n unabhängigen Experimenten angegeben.

Die videodensitometrischen Daten der Northern-Blot-Analysen basieren auf 3-5 unabhängigen Experimenten.

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

4 Ergebnisse

4.1 Antioxidativer Effekt der Statine

Es wurde eine Methode etabliert, bei der durch Zugabe von NADPH die NADPH-Oxidase zur Bildung von Superoxidradikalen angeregt wird. Als Radikalbildner wurde NADPH gewählt, da in der Gefäßwand die Membran-assoziierte NADPH-Oxidase eine Hauptquelle für Superoxidradikale darstellt. Die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) lässt sich am Luminometer mit Hilfe von Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz in Form von relativen Lichteinheiten (RLU) messen. Die Stimulation der ROS-Bildung durch NADPH in unbehandelten Kontrollzellen wurde als maximal erreichbarer RLU-Wert (RLU_{max}) gleich 100% gesetzt.

4.1.1 Stimulation der Radikalbildung durch NADPH

Es wurde nach Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von NADPH (0,1-1000 μ M) untersucht, in welchem Bereich die Radikalbildung stark genug und reproduzierbar ist. Eine Konzentration von 100 μ M NADPH erwies sich als geeignet für diese Methode. Lucigenin wurde in einer Konzentration von 50 μ M eingesetzt. In dieser Konzentration erfolgt noch keine störende Autooxidation, die zu einer Verfälschung der Reaktion führen könnte.

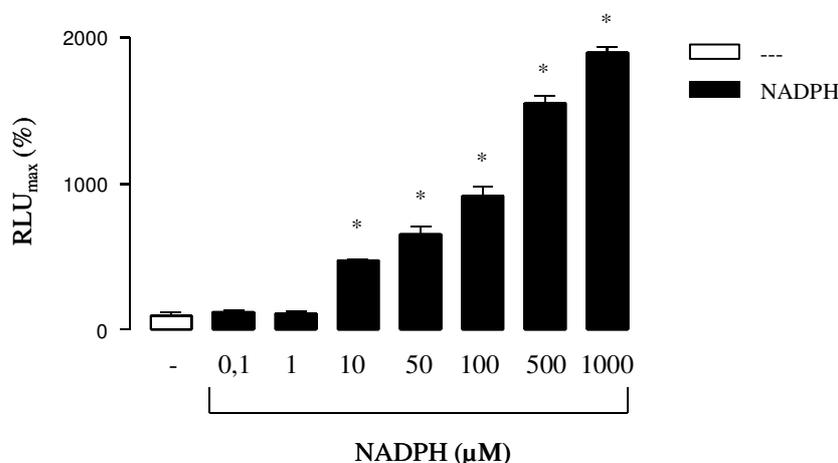


Abb. 4: Stimulation der Radikalbildung durch NADPH-Zusatz

EA.hy Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (1-1000μM) und Lucigenin (50μM) 10 Minuten inkubiert.

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

4.1.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von Statinen in Endothelzellen

Um den Einfluss der Statine auf die Radikalbildung im Endothel zu charakterisieren wurden Endothelzellen (EA.hy) bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 8 Stunden mit Simvastatin (1-30μM), Lovastatin (1-100μM), Atorvastatin (1-100μM) oder Rosuvastatin (30-300μM) inkubiert. In den verwendeten Konzentrationen zeigten die Substanzen keine toxischen Eigeneffekte. Es muss zwischen zwei Gruppen von Statinen unterschieden werden: Simvastatin und Lovastatin liegen nicht als freie Säuren, sondern als Laktone vor. Sie sind *Prodrugs* und müssen zunächst in Ethanol angelöst und anschließend alkalisch hydrolysiert werden, um die freie Säure zu erhalten. Die Endprodukte sind wasserlöslich, so dass die Inkubationslösungen in PBS hergestellt werden können. Atorvastatin und Rosuvastatin sind sehr lipophile Substanzen, die zunächst in DMSO gelöst werden müssen. Die eingesetzten Lösungen enthalten den Radikalfänger DMSO in einer maximalen Konzentration von 1:1000. In dieser Verdünnung blieb DMSO ohne Effekt. Nach Auswaschen der zugegebenen Substanzen und Trypsinisieren der Zellen erfolgte eine 10minütige Inkubation der Zellsuspension mit NADPH und Lucigenin, in der die gebildete Radikalmenge bestimmt wurde. Alle untersuchten Statine zeigten eine konzentrationsabhängige Reduktion der Radikalbildung im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

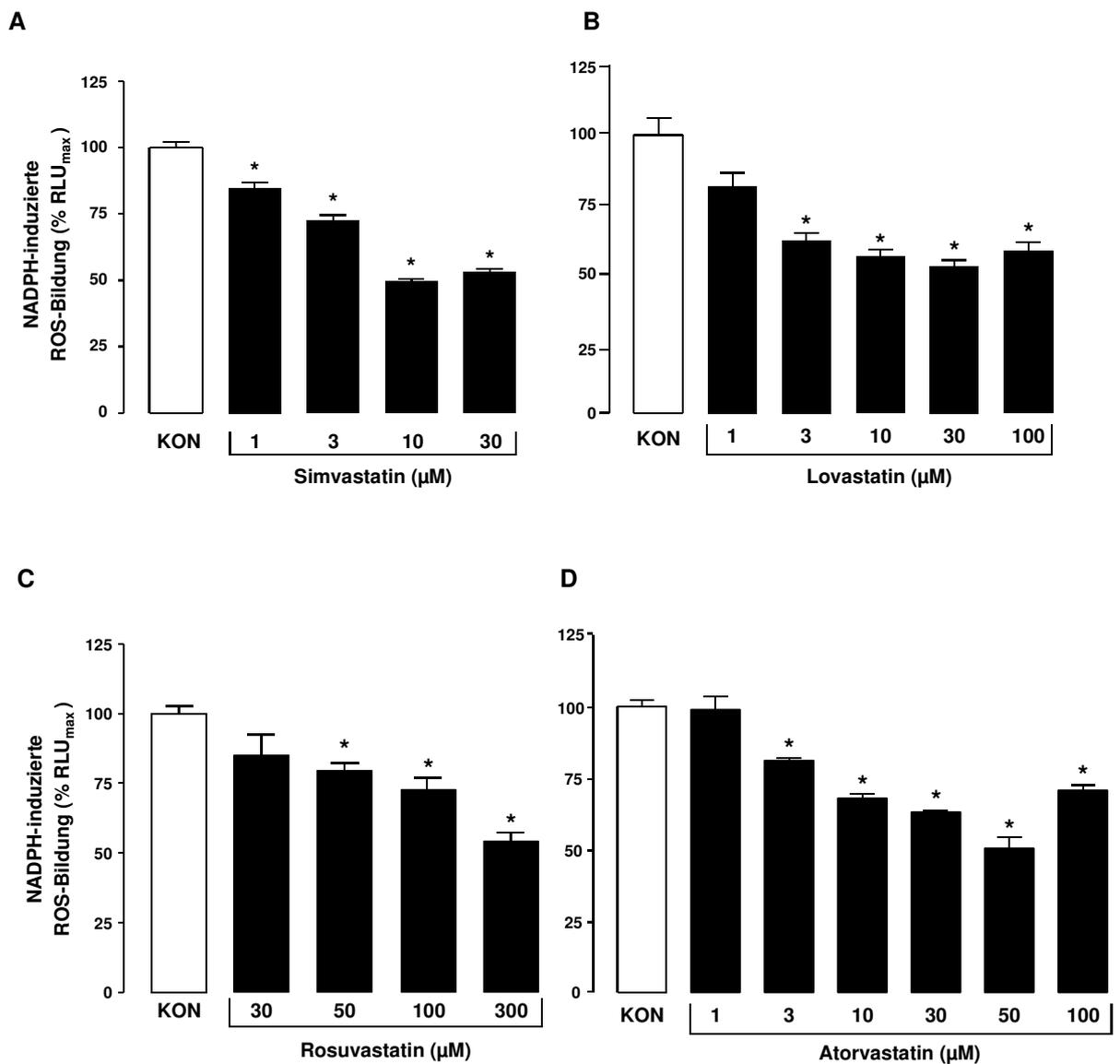


Abb. 5: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Statinen auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen.

EA.hy Zellen wurden 8 Stunden mit A) Simvastatin (1-30 μM), B) Lovastatin (1-100 μM), C) Rosuvastatin (30-300 μM) oder D) Atorvastatin (1-100 μM) vorbehandelt, geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μM) und Lucigenin (50 μM) 10 Minuten inkubiert.

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

4.1.3 Zeitabhängigkeit der Radikalsenkung durch HMG-CoA-Reduktase-Hemmer

Um den zeitlichen Verlauf der reduzierten Radikalbildung durch Statine zu charakterisieren wurden Endothelzellen für Zeiten von 6 bis 24 Stunden mit Simvastatin inkubiert. Die Radikalbildung behandelter Zellen sank nach 8 Stunden auf ein Minimum und stieg dann wieder an, bis der Effekt nach 24 Stunden fast vollständig aufgehoben war. Die Radikalbildung stieg wieder bis auf das Kontrollniveau der unbehandelten Zellen an. In den folgenden Versuchen wurde die Inkubationszeit auf 8 Stunden festgelegt.

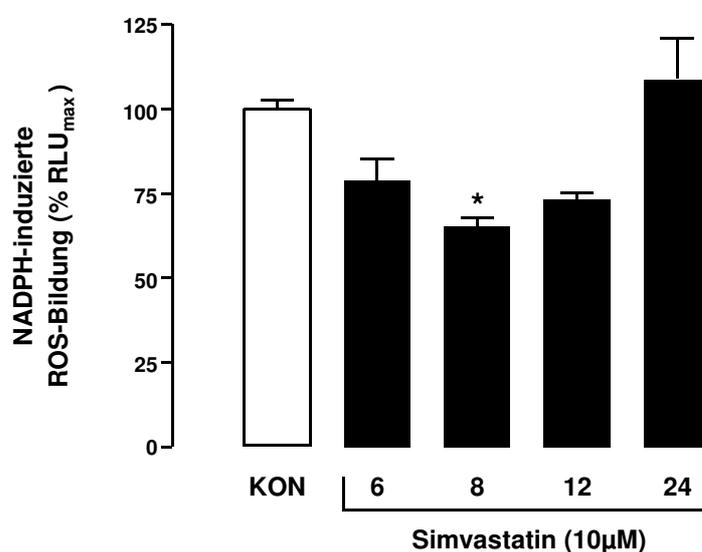


Abb. 6: Zeitabhängiger Effekt von Simvastatin auf die NADPH-abhängige Radikalbildung in Endothelzellen.

EA.hy Zellen wurden bis zu 24 Stunden mit Simvastatin (10μM) vorbehandelt, geerntet, in PBS resuspendiert und 10 Minuten mit NADPH (100μM) und Lucigenin (50μM) inkubiert.

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

4.1.4 Zellviabilität nach Inkubation mit Simvastatin

Es sollte untersucht werden, ob HMG-CoA-Reduktase-Hemmer bei den gewählten Inkubationszeiten einen Effekt auf die Zellviabilität haben. Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und 8 Stunden mit Simvastatin (1-30μM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Gentianaviolett angefärbt. Die

Extinktion dient als direktes Maß für die Anzahl der überlebenden Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden blieb die Behandlung mit Simvastatin ohne Effekt auf die Viabilität der Zellen. Nach 24 Stunden Inkubation konnte jedoch eine deutliche Toxizität von Simvastatin bei einer Konzentration von $30\mu\text{M}$ festgestellt werden .

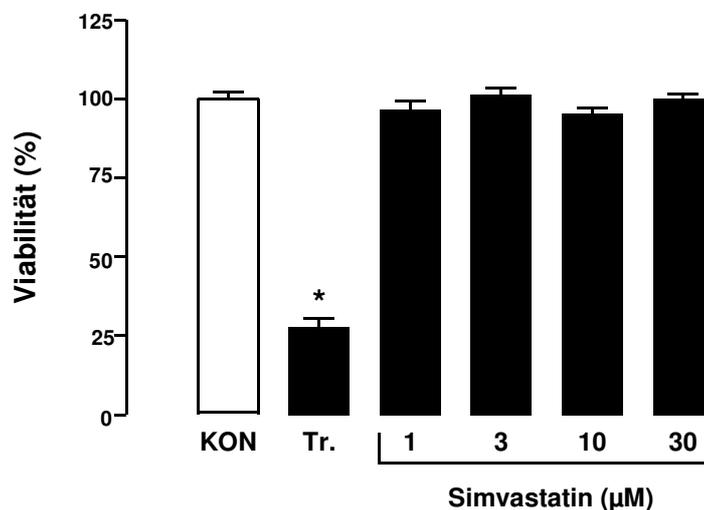


Abb. 7: Zellviabilität von Endothelzellen nach Simvastatin-Behandlung.

EA.hy Zellen wurden 8 Stunden mit Simvastatin ($1\text{-}30\mu\text{M}$) vorbehandelt und weitere 24 Stunden mit Triton X100 (Tr.) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Viabilitätsmessung.

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

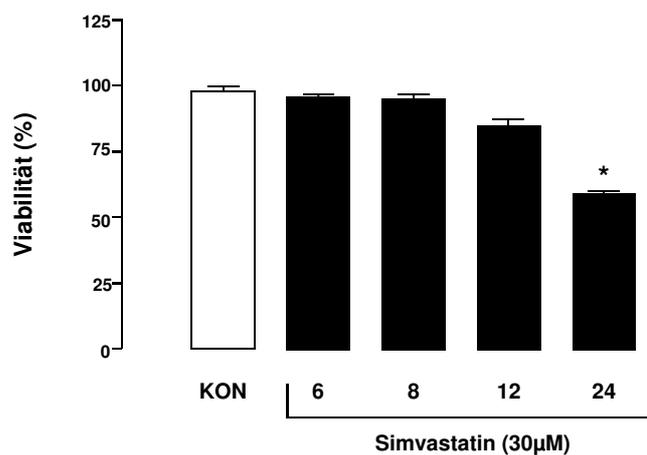


Abb. 8: Zeitabhängigkeit der Toxizität von Simvastatin.

EA.hy Zellen wurden 6 bis 24 Stunden mit Simvastatin ($30\mu\text{M}$) vorbehandelt. Im Anschluss daran erfolgte die Viabilitätsmessung.

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

4.1.5 Einfluss von Mevalonsäure auf die Reduktion der Radikalbildung

Mit Hilfe der Zugabe von Mevalonsäure vor der Statininkubation sollte überprüft werden, ob der radikalsenkende Effekt der Statine über die Cholesterinbiosynthese vermittelt wird. Nach Zugabe von Mevalonsäure (300 μ M) stieg die Radikalbildung in den untersuchten Endothelzellen trotz Statinbehandlung über das Niveau der Kontrollzellen hinaus an. Mevalonsäure zeigte jedoch einen Eigeneffekt, so dass unter diesen Versuchsbedingungen nicht eindeutig gezeigt werden kann, ob der Statineffekt Cholesterin-abhängig ist.

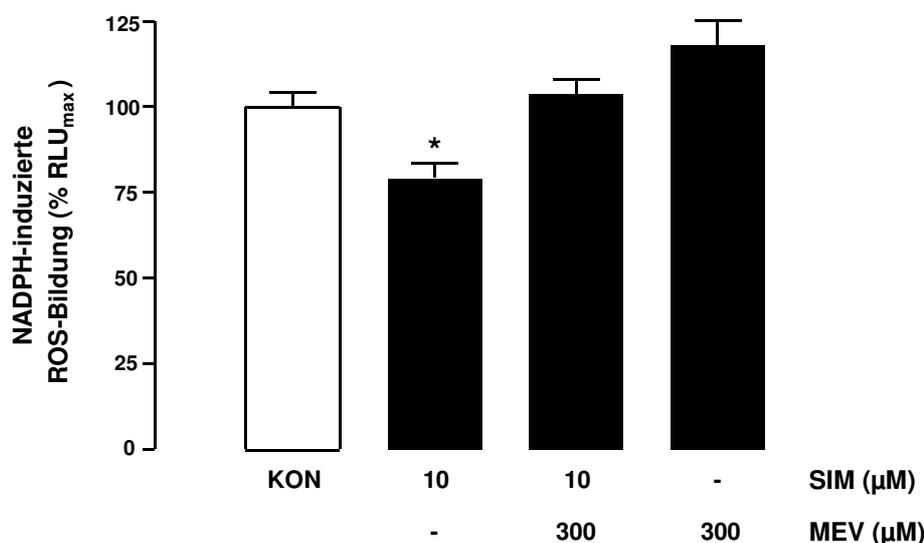


Abb. 9: Einfluss von Mevalonsäure auf die NADPH-abhängige ROS-Bildung in Endothelzellen nach Statinbehandlung.

EA.hy Zellen wurden 15 Minuten mit Mevalonsäure inkubiert bevor die 8 stündige Zugabe von Simvastatin erfolgte. Im Anschluss daran wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und 10 Minuten mit NADPH (100 μ M) und Lucigenin (50 μ M) inkubiert.

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

4.1.6 Direkter Effekt von Bilirubin in Endothelzellen

Bilirubin stellt ein potentes Antioxidans dar; Bilirubinwerte im oberen Normbereich zeigen eine Endothelprotektion vergleichbar mit der von HDL. Es sollte untersucht werden, ob Bilirubin auch in diesem Modell für oxidativen Stress ähnliche Effekte zeigt. Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, trypsinisiert und in PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde Bilirubin (1-100 μ M) zusammen mit NADPH und Lucigenin direkt zu der Zellsuspension gegeben und 10 Minuten inkubiert. Bilirubin reduzierte konzentrationsabhängig die Radikalbildung in den verwendeten Zellen.

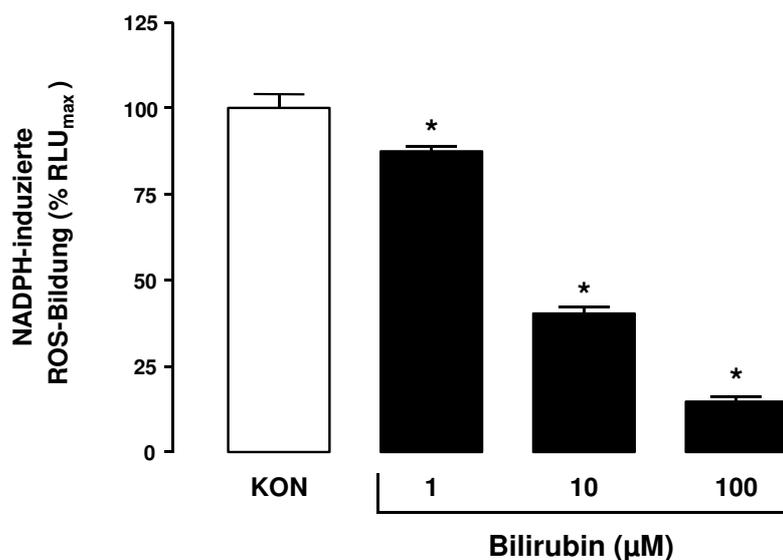


Abb. 10: Direkter Effekt von Bilirubin auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen.

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

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

4.1.7 Einfluss eines HO-1-Inhibitors auf die antioxidative Wirkung der Statine

Die Reduktion der Radikalbildung durch Statine erst nach 8stündiger Vorinkubation und Auswaschen weist auf eine Beteiligung antioxidativer Stoffwechselwege hin. Da der HO-1-Metabolit Bilirubin signifikante antioxidative Effekte aufweist, sollte überprüft werden, ob die Wirkung der Statine ursächlich mit dem antioxidativen Enzym Hämoxygenase verbunden werden kann. Den Zellen wurde 15 Minuten vor Statinzugabe der HO-1-Inhibitor Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP) oder der HO-1-Inhibitor Zink-bis-glykol (ZnBG) zugesetzt. SnPP ist ein spezifischer Hemmstoff der Hämoxygenase. Der Effekt der Statine konnte durch SnPP teilweise aufgehoben werden. ZnBG ist ein Hemmstoff der Hämoxygenase, welcher die Expression des Enzyms nicht beeinflusst und sogar *in vivo* zur Anwendung kommt. Der Hemmstoff konnte den Simvastatineffekt zum Teil aufheben. Beide Inhibitoren allein zeigten keine Senkung der Radikalbildung.

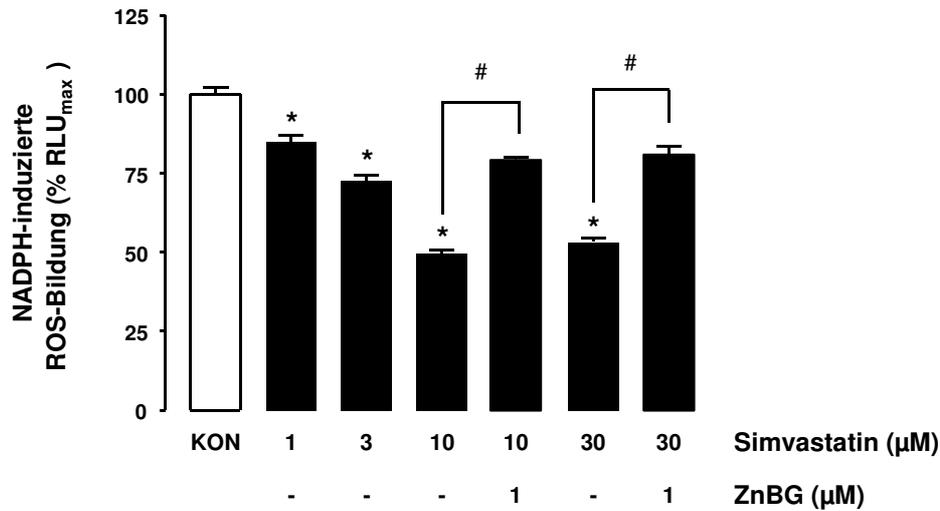
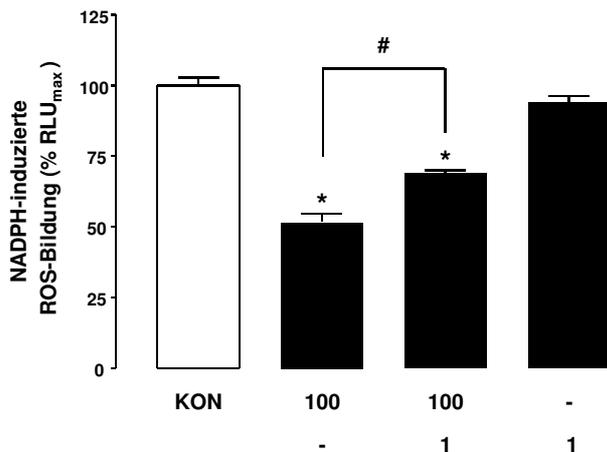
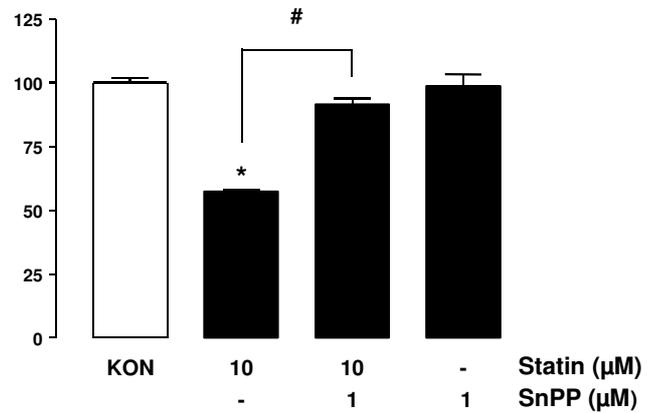
A**B****C**

Abb. 11: Einfluss der Hämoxigenase-Inhibitoren ZnBG und SnPP auf die Reduktion der NADPH-abhängigen ROS-Bildung in Endothelzellen durch Statine.

EA.hy-Zellen wurden 15 Minuten mit ZnBG (1μM) oder SnPP (1μM) vorbehandelt und nach Zugabe von A) Simvastatin (1-30μM) B) Rosuvastatin (100μM) oder C) Atorvastatin (10μM) 8 Stunden weiterinkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und 10 Minuten mit NADPH (100μM) und Lucigenin (50μM) inkubiert.

*) : P < 0,05; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=4-6 Einzelerperimenten in separaten Kulturschalen.

#): P < 0,05; Inkubation vs. Inkubation mit A) ZnBG oder B) SnPP, einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.8 Zusammenfassung

Alle untersuchten Statine weisen einen konzentrationsabhängigen signifikanten Effekt auf die NADPH-stimulierte ROS-Bildung auf. Dieser trat erst nach längerer Inkubation und Auswaschen der Substanzen auf. Vermutlich handelt es sich um einen indirekten Radikalfang.

Die Senkung der Radikalbildung durch Statine erreichte ihr Maximum nach 8 Stunden.

Während der Inkubationszeit von 8 Stunden zeigten Statine unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Veränderung der Zellviabilität. Bei längerer Inkubation von bis zu 24 Stunden konnte bei einer Konzentration von 30 μ M jedoch eine Toxizität festgestellt werden.

Die Beteiligung von Mevalonsäure an den beobachteten Statineffekten lässt sich mit dem hier dargestellten Versuch nicht endgültig klären. Durch den Eigeneffekt der Mevalonsäure ist eine eindeutige Auswertung nicht möglich.

Der HO-1-Metabolit Bilirubin wirkt im gleichen Modell als Antioxidans und kommt somit als Mediator der Statin-Effekte in Frage.

Mit Hilfe der Hämoxygenase-Inhibitoren SnPP und ZnBG konnte gezeigt werden, dass die antioxidative Wirkung der Statine zum Teil über die HO-1 vermittelt wird.

4.2 Induktion der Hämoxigenase-1 durch Statine

4.2.1 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1 mRNA durch Statine

Die zellprotektiven Wirkungen von Statinen in oxidativen Stresssituationen lassen eine Beteiligung antioxidativer Proteine vermuten. Die Hämoxigenase ist eine Monooxygenase, welche durch vielfältige Stimuli aktiviert wird und Endothelzellen vor oxidativem Stress schützen kann. Mittels Northern-Blot-Analyse sollte untersucht werden, ob Statine die Transkription des HO-1-Gens in humanen Endothelzellen (ECV 304) aktivieren. Die Endothelzellen wurden hierzu 8h mit Simvastatin (10-100 μ M), Lovastatin (30-300 μ M), Rosuvastatin (100-300 μ M) oder Atorvastatin (100-300 μ M) inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert und der Gehalt an HO-1 mRNA mittels Northern-Blot-Analyse bestimmt.

Es muss zwischen zwei Gruppen von Statinen unterschieden werden: Simvastatin und Lovastatin liegen nicht als freie Säuren, sondern als Laktone vor. Sie sind *Prodrugs* und müssen zunächst in Ethanol angelöst und anschließend alkalisch hydrolysiert werden, um die freie Säure zu erhalten. Die Endprodukte sind wasserlöslich, so dass die Inkubationslösungen in PBS hergestellt werden können. Atorvastatin und Rosuvastatin sind sehr lipophile Substanzen, die zunächst in DMSO gelöst werden müssen. Die eingesetzten Lösungen enthalten den Radikalfänger DMSO in einer maximalen Konzentration von 1:1000. In dieser Verdünnung blieb DMSO ohne Effekt. Für alle Statine konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der HO-1 mRNA gezeigt werden.

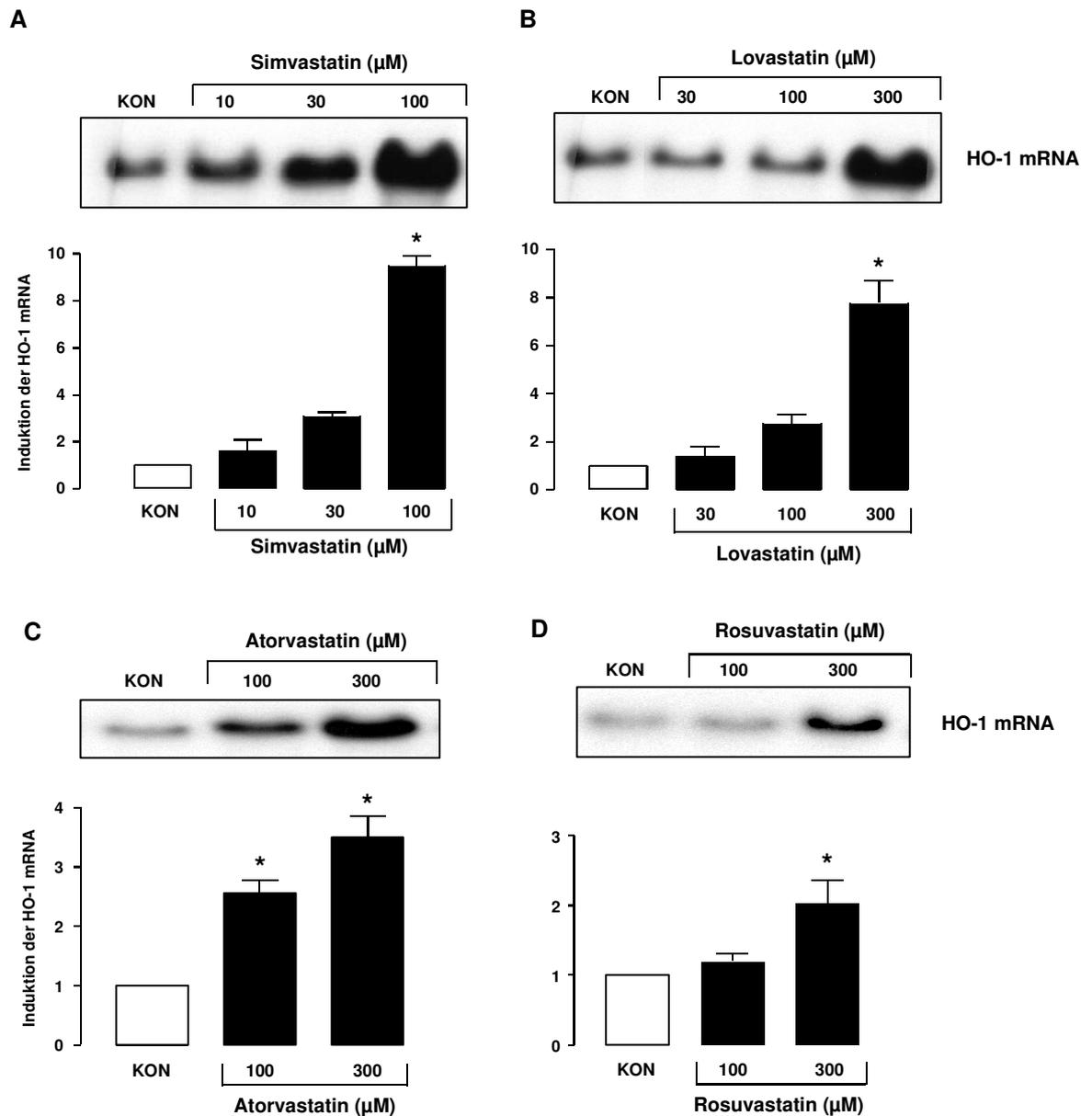


Abb. 12: Effekt von Statinen auf die HO-1 mRNA in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit A) Simvastatin (10-100 μM), B) Lovastatin (30-300 μM), C) Atorvastatin (100-300 μM) und D) Rosuvastatin (100-300 μM) inkubiert.

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

4.2.2 Induktion der HO-1 mRNA durch Statine in neuronalen Zellen

Die positiven Effekte der Statine auf entzündliche Prozesse im Gehirn lassen vermuten, dass auch dort protektive Mechanismen wie die Induktion der HO-1 beteiligt sein könnten. Mit Northern-Blot-Untersuchungen sollte geklärt werden ob die Induktion der HO-1 durch Statine gewebespezifisch nur in Endothelzellen beobachtet werden kann, oder ob dieser Signalweg auch den positiven Effekt von Statinen auf neuronale Erkrankungen zum Teil erklären kann.

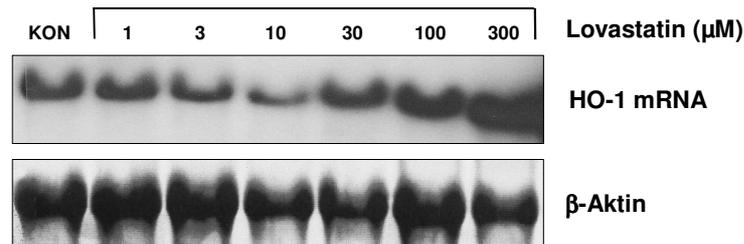


Abb. 13: Effekt von Lovastatin auf die HO-1 mRNA in Neuroblastomzellen

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin Kontrolle. N1E-115-Zellen wurden 8 Stunden mit Lovastatin 1-300µM inkubiert.

4.2.3 Konzentrationsabhängiger Effekt der Statin-Laktone

Um zu überprüfen, ob auch die *Prodrugs* Simvastatin-Lakton und Lovastatin-Lakton die Transkription der HO-1 mRNA beeinflussen können, wurden Endothelzellen für 8 Stunden mit den Laktonen (10-100µM, bzw. 30-300µM) inkubiert. Die Northern-Blots zeigten eine schwache, nicht signifikante Induktion durch Simvastatin-Lakton, jedoch keine Induktion durch Lovastatin-Lakton. Dies beruht vermutlich darauf, dass die Zellen das Lakton zu einem geringen Teil in die aktive Säureform umwandeln.

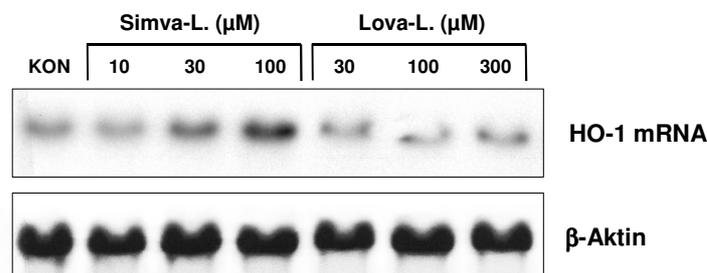


Abb. 14: Effekt von Statin-Laktonen auf die HO-1 mRNA in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit Simvastatin-Lakton (SIM-L., 10-100µM) oder Lovastatin-Lakton (LOV-L., 30-300µM) inkubiert.

4.2.4 Zeitabhängigkeit der Induktion

Um den zeitlichen Verlauf der HO-1 mRNA-Bildung zu ermitteln wurden Endothelzellen für Zeiten von 0 bis 24 Stunden mit Statinen inkubiert. Es konnte ein ähnlicher Verlauf für alle Statine mit einer beginnenden Induktion ab 6 Stunden und einem Induktionsmaximum bei ca. 12 Stunden festgestellt werden. Nach 24 Stunden Inkubationszeit erfolgte ein Abfall der zuvor beobachteten mRNA-Induktion.

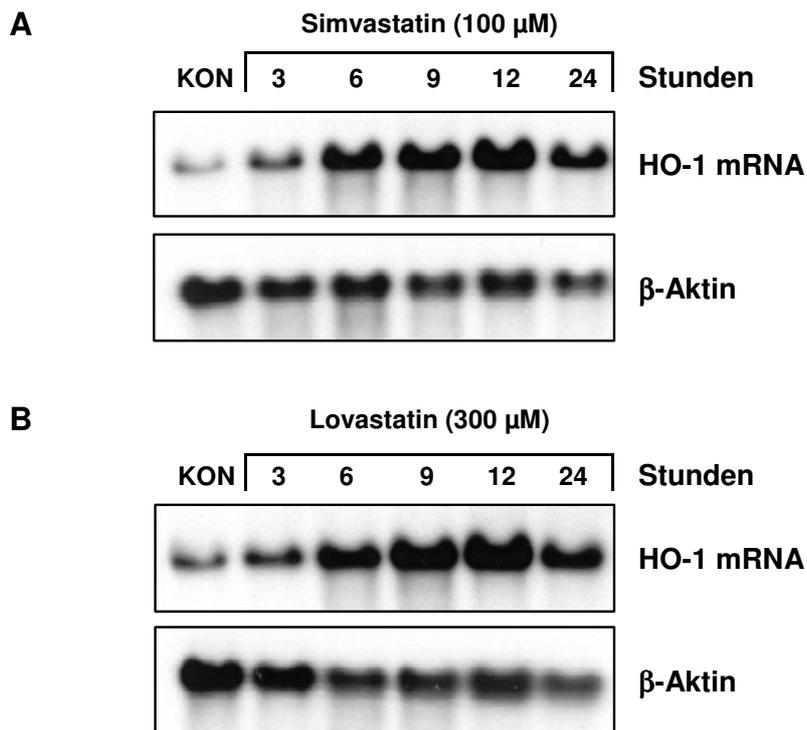


Abb. 15: Zeitabhängigkeit des Effekts von Statinen auf die HO-1 mRNA in Endothelzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden bis zu 24 Stunden mit A) Simvastatin (100 μ M) oder B) Lovastatin (300 μ M) inkubiert.

4.2.5 Zeitabhängigkeit der HO-1-Induktion in neuronalen Zellen

Um den zeitlichen Verlauf der HO-1 mRNA-Bildung zu ermitteln wurden auch die neuronalen Zellen für Zeiten von 0 bis 12 Stunden mit Statinen inkubiert. Es konnte ein ähnlicher Verlauf wie in Endothelzellen beobachtet werden. Das Induktionsmaximum wurde allerdings schon nach 9 Stunden erreicht und nach 12 Stunden Inkubationszeit erfolgte bereits der Abfall der zuvor beobachteten mRNA-Induktion.

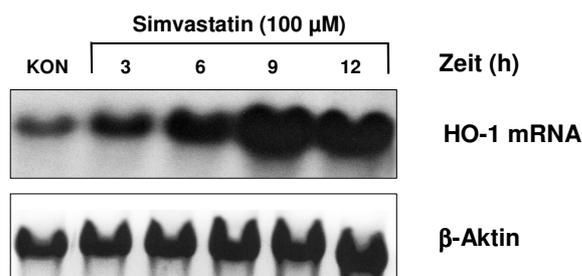


Abb. 16: Zeitabhängigkeit des Effekts von Statinen auf die HO-1 mRNA in neuronalen Zellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β-Aktin Kontrolle. N1E-115-Zellen wurden bis zu 12 Stunden mit Simvastatin (100µM) inkubiert.

4.2.6 Konzentrationsabhängiger Effekt der Statine auf die HO-1-Proteinexpression

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik sollte untersucht werden, ob die Stimulation der mRNA-Bildung zu einer vermehrten Proteinsynthese der Hämoxxygenase führt. Endothelzellen wurden 8 Stunden mit Statinen inkubiert. Das Gesamtprotein wurde aus den Zellen extrahiert und mittels Western-Blot-Technik der Gehalt an HO-1-Protein bestimmt. Wie auch auf transkriptioneller Ebene führte die Inkubation zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Proteinexpression. Der Effekt zeigte sich im gleichen Konzentrationsbereich wie auch bei den mRNA-Analysen.

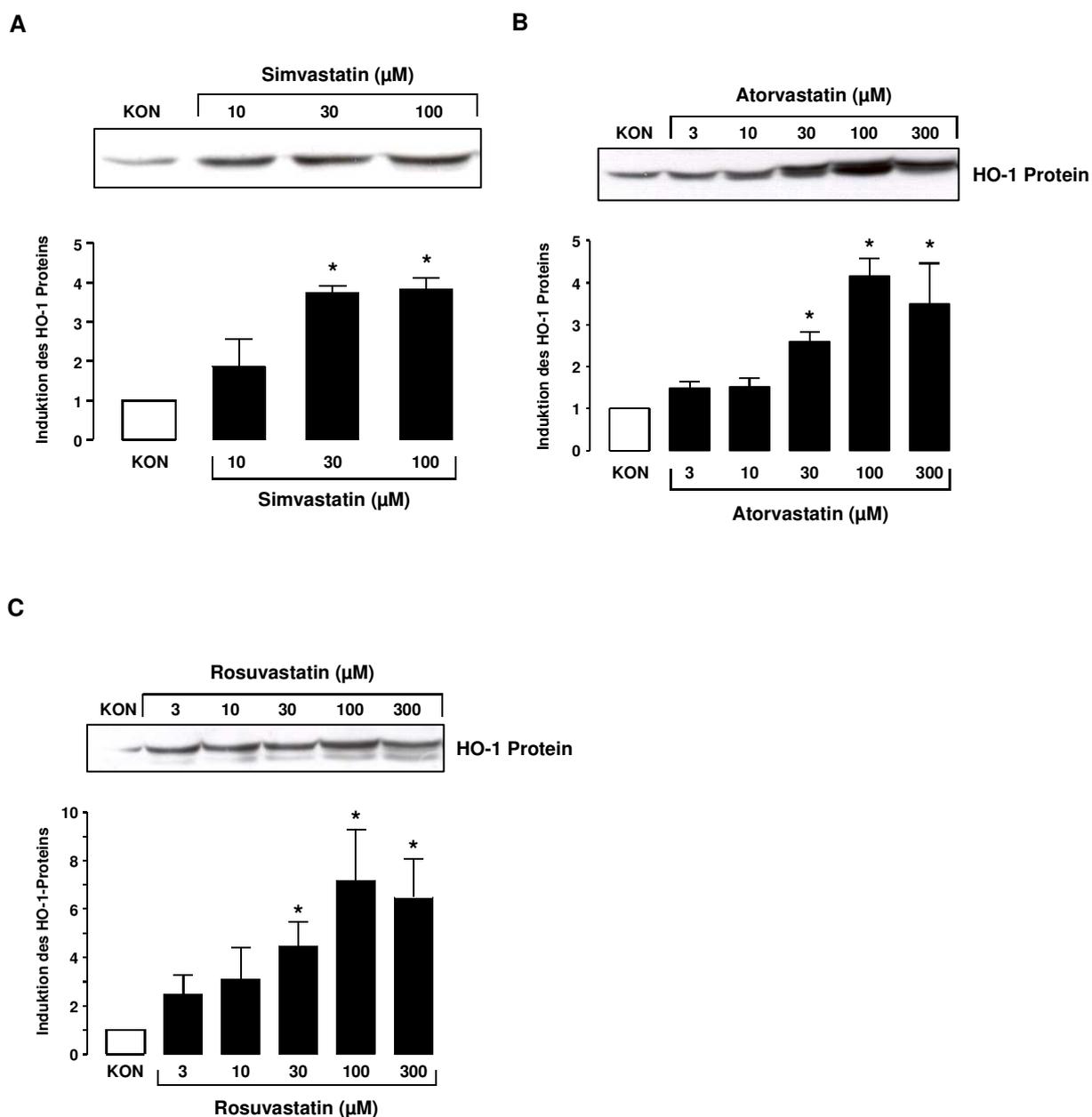


Abb. 17: Effekt von Statinen auf die HO-1 Expression in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit A) Simvastatin (10-100 μM), B) Atorvastatin (3-300 μM) oder C) Rosuvastatin (3-300 μM) inkubiert.

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

4.2.7 Zusammenfassung

Statine aktivieren die Transkription der Hämoxigenase in Endothelzellen konzentrations- und zeitabhängig. Die verschiedenen Statine zeigen hierbei eine unterschiedliche Potenz. Simvastatin erreichte das Induktionsmaximum bereits bei einer Konzentration von 100 μ M während Lovastatin, Rosuvastatin und Atorvastatin erst bei einer Konzentration von 300 μ M signifikante Stimulationen erreichten. Im zeitlichen Verlauf zeigt sich, dass die Induktion nach etwa 6 Stunden startet und ihr Maximum bei ca. 12 Stunden erreicht.

Auch in Neuroblastomzellen zeigt sich eine konzentrationsabhängige Induktion der HO-1 durch Statine. Die notwendigen Konzentrationen für eine signifikante Stimulation liegen im gleichen Bereich wie bei den Endothelzellen. Im Unterschied zu den Endothelzellen wird in den neuronalen Zellen das Induktionsmaximum bereits nach 9 Stunden erreicht.

Simvastatin-Lakton zeigt eine geringe, nicht signifikante Induktion der HO-1 mRNA.

In Western-Blot-Experimenten führte die Inkubation mit Statinen zu einer konzentrationsabhängigen Expressionssteigerung des HO-1-Proteins.

4.3 Mechanismen der HO-1-Induktion durch Statine

4.3.1 Einfluss von Sauerstoffradikalen

Die Hämoxigenase wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli induziert. Viele dieser Substanzen verursachen direkt oder indirekt oxidativen Stress. Da zur Untersuchung der genomischen Effekte der Statine höhere Konzentrationen der Substanzen eingesetzt werden mussten, sollte überprüft werden, ob der Effekt der Statine auf die HO-1 mRNA-Expression ein Artefakt durch entstandenen oxidativen Stress darstellt. Hierzu wurden die Zellen 15 Minuten vor Statinzugabe mit dem Antioxidans N-Acetylcystein (0,5-1,5mM) inkubiert, um eventuell entstehende Radikale sofort abzufangen. N-Acetylcystein (NAC) ist eine Vorstufe des endogenen, antioxidativen Glutathions und ist in der Lage, Sauerstoffradikale zu neutralisieren. Die Vorinkubation mit NAC zeigte keine Veränderung der mRNA-Expression in Statin-behandelten Zellen. Auch NAC allein blieb ohne Effekt.

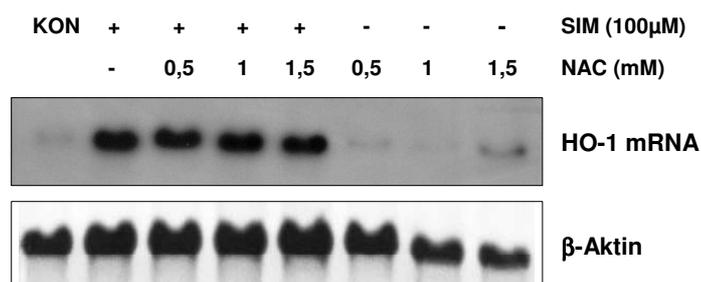


Abb. 18: Einfluss von N-Acetylcystein auf die HO-1 Induktion in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit NAC vorbehandelt. Nach Zugabe von Simvastatin (100 μ M) wurde die Inkubation für 8 Stunden fortgesetzt.

4.3.2 Einfluss von Mevalonsäure auf die mRNA-Expression

HMG-CoA-Reduktase-Hemmer senken den Cholesterinspiegel durch einen Eingriff in die Cholesterinbiosynthese. Sie hemmen die Synthese des Zwischenproduktes Mevalonsäure. Um festzustellen, ob die Aktivierung der HO-1 mRNA-Expression über die Cholesterinbiosynthese vermittelt wird, wurde den Zellen 15 Minuten vor Statinzugabe Mevalonsäure zugesetzt. Durch einen Überschuss des Produktes sollte die Statin-abhängige HO-1 mRNA-Expression aufgehoben werden, falls diese Cholesterin-abhängig ist. Mevalonsäure hatte weder einen Effekt auf die Statin-induzierte mRNA-Expression, noch auf die Basalexpression.

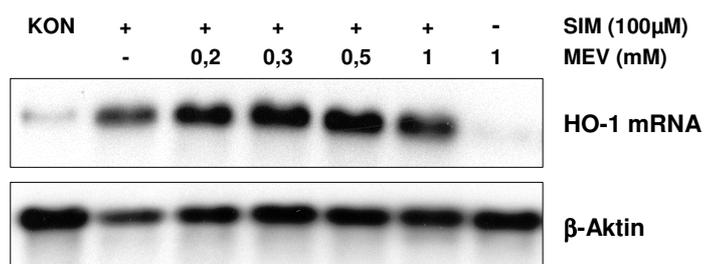


Abb. 19: Einfluss von Mevalonsäure (MEV) auf die HO-1 Induktion in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit Mevalonsäure (200-1000 μ M) vorbehandelt. Nach Zugabe von Simvastatin (100 μ M) wurde die Inkubation für 8 Stunden fortgesetzt.

4.3.3 Einfluss von Mevalonsäure auf die Proteinexpression

Es sollte untersucht werden, ob die Proteinexpression der HO-1 wie die Transkription des HO-1-Gens unabhängig von der Cholesterinbiosynthese vermittelt wird. Wie bereits in den Northern-Blot-Analysen zeigte sich im Western-Blot, dass die Statin-vermittelte Induktion der Hämoxigenase durch Mevalonsäure nicht beeinflussbar ist. Auch hier zeigte Mevalonsäure allein keinen Effekt auf die gebildete HO-1-Proteinmenge.

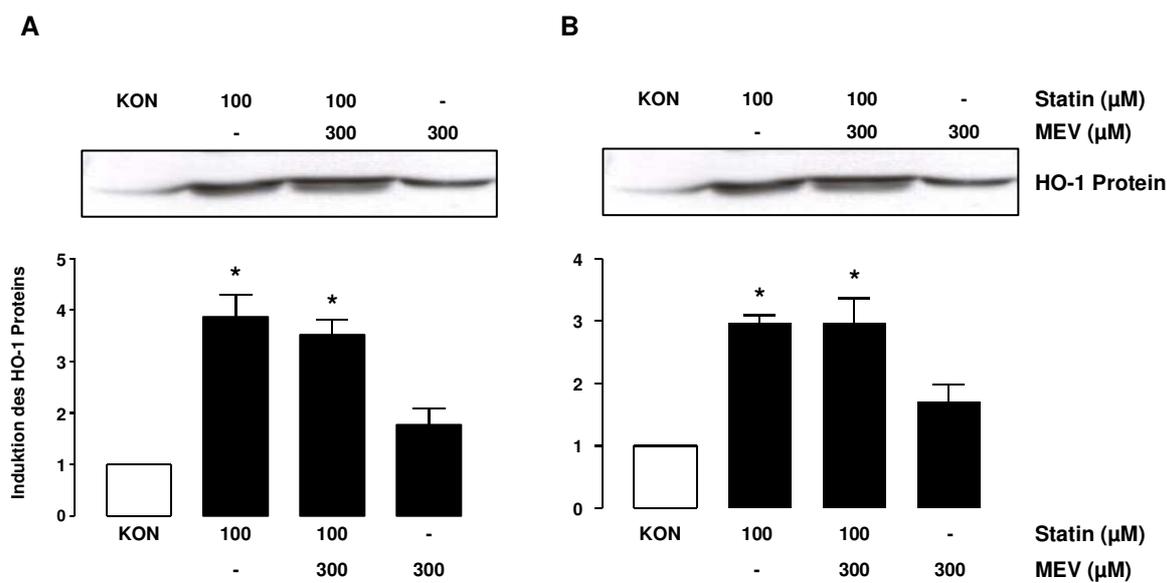


Abb. 20: Einfluss von Mevalonsäure (MEV) auf die HO-1 Expression in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit Mevalonsäure (300μM) vorbehandelt. Nach Zugabe von A) Atorvastatin (100μM), oder B) Rosuvastatin (100μM) wurde die Inkubation für 8 Stunden fortgesetzt.

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

4.3.4 Einfluss von GGPP und FPP

Einige pleiotrope Effekte der Statine werden über die kleinen G-Proteine vermittelt. Die Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP) werden zur Isoprenylierung von kleinen G-Proteinen wie den Proteinen der Ras- und Rho-Familie benötigt. Um eine Beteiligung dieser Proteine an der Aktivierung der HO-1-Transkription zu untersuchen wurde den Zellen 15 Minuten vor Inkubation mit den Statinen GGPP oder FPP (jeweils 5μM) zugesetzt. Beide Substanzen reduzierten die Statin-vermittelte HO-1-Induktion jedoch nicht und blieben ohne Eigeneffekt.

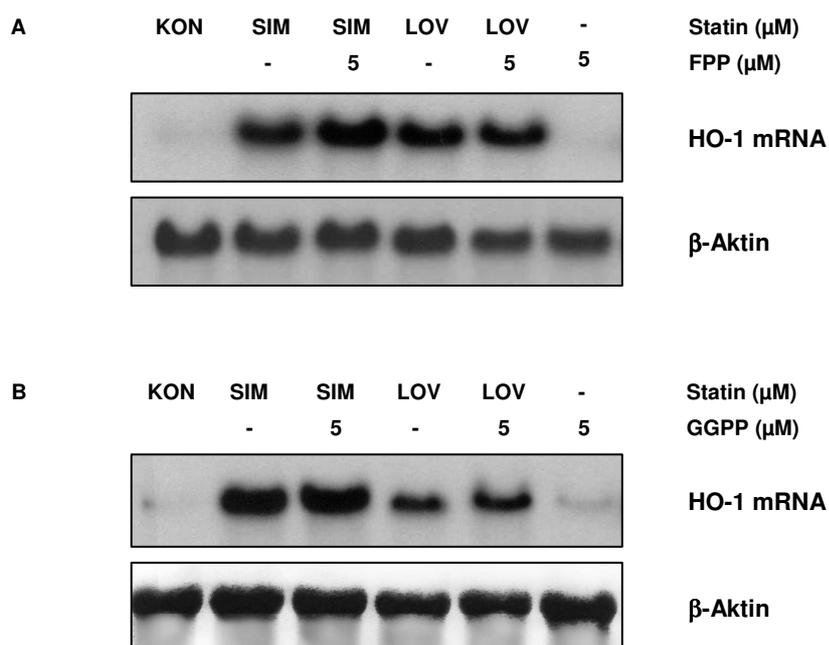


Abb. 21: Einfluss von Isoprenoiden auf die HO-1 Induktion in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit A) Farnesylpyrophosphat ($5\mu\text{M}$) oder B) Geranylgeranylpyrophosphat ($5\mu\text{M}$) vorbehandelt. Nach Zugabe von Simvastatin ($100\mu\text{M}$) bzw. Lovastatin ($300\mu\text{M}$) wurde die Inkubation für 8 Stunden fortgesetzt.

4.3.5 Einfluss von L-NAME

Da viele pleiotrope Effekte der Statine über eine Induktion und Aktivierung der eNOS und eine hierdurch gesteigerte NO-Freisetzung vermittelt werden, sollte gezeigt werden, ob auch die Aktivierung des Hämoxigenase-Gens NO-abhängig ist. Die Endothelzellen wurden vor der 8 stündigen Statininkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME ($1\text{-}2\text{mM}$) behandelt. Die Vorbehandlung zeigte keine Veränderung der Statin-induzierten mRNA-Expression. Auch die Menge an gebildetem HO-1-Protein steigerte sich nicht. Der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME allein blieb ohne Effekt. Entgegen den Vermutungen scheint NO als Mediator der HO-1 Induktion durch Statine nicht beteiligt zu sein.

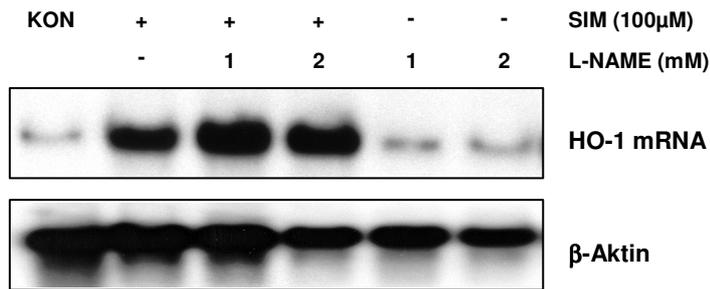


Abb. 22: Einfluss von L-NAME auf die HO-1 Induktion durch Statine in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit L-NAME (1-2mM) vorbehandelt. Nach Zugabe von Simvastatin (100 μ M) wurde die Inkubation für 8 Stunden fortgesetzt.

4.3.6 Einfluss des Translationsblockers Cycloheximid

Der Proteinsynthese-Hemmstoff Cycloheximid (CHX) blockiert die Translation von mRNA an den Ribosomen. Mit Hilfe von CHX sollte untersucht werden, ob die Aktivierung des Hämooxygenase-Gens eine De-novo-Synthese von Proteinen erfordert. Endothelzellen wurden 15 Minuten mit CHX (20 μ M) behandelt, bevor die 8 stündige Inkubation mit Statinen folgte. Der Translationsblocker hob die HO-1-Induktion nach Statinbehandlung nahezu vollständig auf. Cycloheximid blieb ohne Eigeneffekt in unbehandelten Zellen.

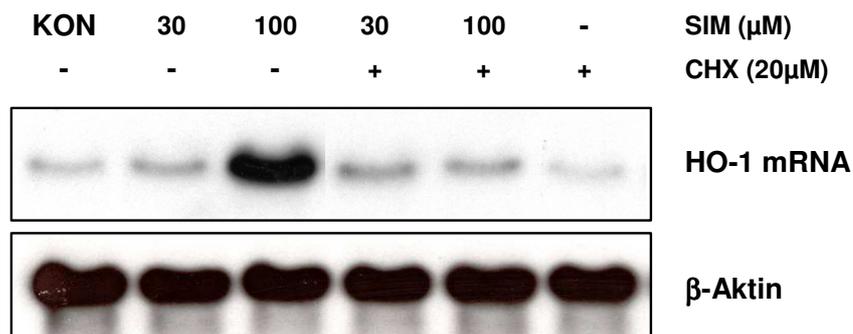


Abb. 23: Effekt von Cycloheximid auf die HO-1 mRNA- Induktion in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β -Aktin Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit Cycloheximid (20 μ M) vorbehandelt. Nach Zugabe von Simvastatin (30-100 μ M) wurde die Inkubation für 8 Stunden fortgesetzt.

4.3.7 Einfluss des Transkriptionsblockers Aktinomycin D

Der Transkriptionseinhibitor Aktinomycin D hemmt die Neusynthese von RNA. Durch eine Vorinkubation mit diesem Agens kann somit ermittelt werden, ob für die beobachtete mRNA-Induktion eine Neusynthese von RNA stattfindet. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit Aktinomycin D (1 µg/ml) vorbehandelt und anschließend für weitere 8 Stunden mit Statinen inkubiert. Nach Vorbehandlung mit dem Transkriptionshemmer ist die Hämoxigenase-Induktion vollständig aufgehoben.

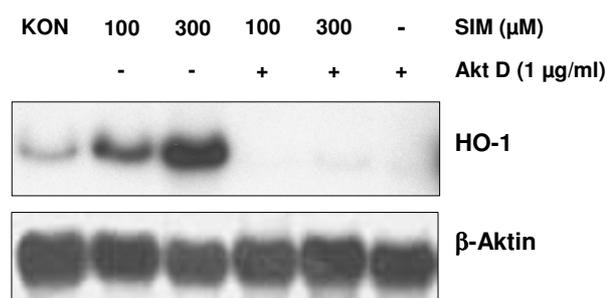


Abb. 24: Effekt von Aktinomycin D (Akt D) auf die HO-1 mRNA-Induktion in Endothelzellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot mit β-Aktin Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit Aktinomycin D (1 µg/ml) vorbehandelt. Nach Zugabe von Simvastatin (100-300 µM) wurde die Inkubation für 8 Stunden fortgesetzt.

4.3.8 Effekt von Statinen auf die HO-1 Promotor-Aktivität

Da die Versuche mit dem Translationsblocker Cycloheximid bereits eine Beteiligung von Proteinen an der Genaktivierung der HO-1 durch Statine gezeigt haben, soll nun anhand des Luciferase-Reporterassays gezeigt werden, ob und welche Transkriptionsfaktoren an der Regulation beteiligt sein könnten. Hierzu wurden Endothelzellen bis zur Konfluenz kultiviert und dann mit verschiedenen Reportergenkonstrukten transient transfiziert. Die Konstrukte enthielten entweder die proximalen 4000bp des 5'-Endes des HO-1 Promotors (pHO-4000), vier Kopien der Sequenz von NF-κB (pNF-κB), drei Kopien des HO-1 *stress response elements* (p3xStRE) oder das Kontrollplasmid (pGL3basic). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen weitere 18 Stunden mit oder ohne Statinzugabe inkubiert. Die Zellextrakte wurden anschließend auf Luciferaseaktivität untersucht. Die gemessene Aktivität in den unbehandelten Zellen wurde jeweils als Kontrolle gleich 1 gesetzt. Die Statine zeigten beide nur mit einem der untersuchten Reportergenkonstrukte eine erhöhte Aktivität. Sowohl das Plasmid mit der Sequenz von NF-κB als auch das Plasmid mit der Sequenz von StRE zeigte keine erhöhte Aktivität. Dies bedeutet, dass

der Transkriptionsfaktor NF- κ B in der Regulation der HO-1-Gen-Aktivierung durch Statine nur eine untergeordnete Rolle einnimmt. Die drei StRE-Einheiten des Plasmids pStRE erinnern an eine Bindungsstelle für NF-E2. Dort kann der Transkriptionsfaktor Nrf 2 (*NF-E2 related factor 2*) binden. Dieser spielt eine wichtige Rolle in der Genregulation der Hämoxxygenase, scheint jedoch am Statineffekt unbeteiligt zu sein. Vielmehr muss eine weitere an der Genexpression beteiligte Struktur auf dem 4000bp langen 5'-Ende der Promotorregion lokalisiert sein.

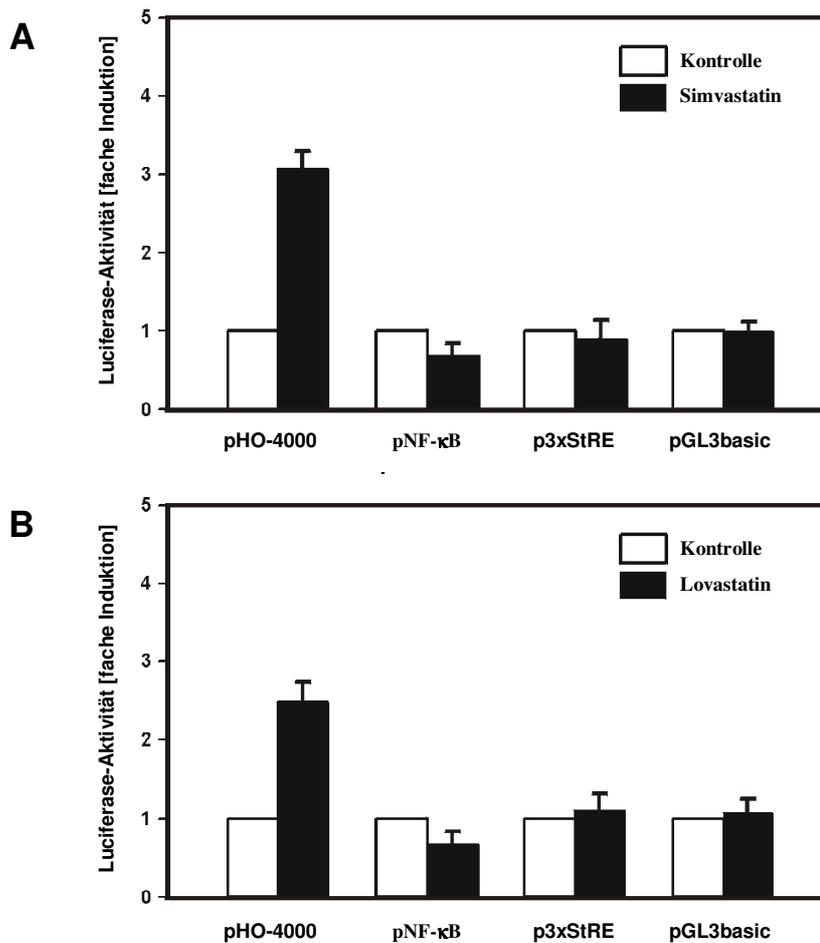


Abb. 25: Einfluss von Statinen auf die HO-1 Promotoraktivität.

ECV-304-Zellen wurden mit Reportergenkonstrukten transfiziert, die entweder die proximalen 4000bp des HO-1-Promotors enthielten (pHO-4000), vier Kopien der Sequenz von Nf- κ B (pNf- κ B), drei Kopien des *stress response element* (pStRE) oder das Kontrollplasmid (pGL3basic). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen dann für weitere 18 Stunden mit A) Simvastatin (50 μ M) oder B) Lovastatin (100 μ M) inkubiert. In den Zellextrakten wurde dann die Luciferaseaktivität bestimmt und die Induktionsrate relativ zur Kontrolle bestimmt.

Die hier dargestellten Ergebnisse entstanden in Kooperation mit PD Dr. S. Immenschuh (Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen). Die HO-1-Promotorkonstrukte wurden ursprünglich von Dr. N. Leitinger (Robert M. Berne Cardiovascular Research Center, University of Virginia, VA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Versuche wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Stephan Immenschuh und Dr. N. Wijayanti (Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführt.

4.3.9 Zusammenfassung

Die Vorbehandlung der Zellen mit N-Acetylcystein weist darauf hin, dass die Statin-vermittelte Genaktivierung der HO-1 nicht durch oxidativen Stress verursacht wird.

Die Induktion der HO-1 mRNA, ebenso wie die HO-1 Proteinexpression, verläuft vermutlich nicht über die Cholesterinbiosynthese, da die Vorbehandlung der Zellen mit Mevalonsäure den Statineffekt nicht verhindern konnte.

Sowohl GGPP als auch FPP sind an der mRNA-Induktion nicht beteiligt.

Eine Vorbehandlung mit dem NOS-Inhibitor L-NAME veränderte die HO-1 mRNA-Induktion nicht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Effekt der Statine auf die mRNA nicht über NO vermittelt wird.

Auch die gesteigerte Proteinexpression der HO-1 durch Statine ist vermutlich NO-unabhängig.

Der Translationsblocker Cycloheximid hemmt die mRNA-Induktion fast vollständig. Für die Genaktivierung der HO-1 durch Statine muß eine *de novo* Proteinsynthese erfolgen.

Nach Vorbehandlung mit Aktinomycin D erfolgt keine Induktion der Hämoxxygenase. Für die Induktion der Hämoxxygenase durch Statine muss eine *de novo* Transkription erfolgen.

Die Ergebnisse der Reportergen-Assays lassen vermuten, dass weder Nf- κ B noch Nrf 2 an der Genregulation der Hämoxxygenase durch Statine beteiligt sind. Auf dem 4000 bp langen 5'-Ende der Promotorregion befindet sich jedoch eine andere Sequenz, welche ursächlich an der Regulation der HO-1 durch Statine beteiligt ist.

5 Diskussion

Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen sind die häufigste Ursache für Todesfälle in Deutschland (Quelle: Bundesamt für Statistik, Gesundheitsbericht 2006). Es handelt sich hierbei um eine multifaktorielle Erkrankung. Neben nicht beeinflussbaren Risikofaktoren wie Geschlecht, Alter und genetischer Prädisposition spielen Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Rauchen eine entscheidende Rolle für das Fortschreiten der Atherosklerose. Einen weiteren sehr wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung dieser Gefäßkrankheit stellen Fettstoffwechselstörungen dar. Durch erhöhte Cholesterinspiegel und einen ungünstigen Cholesterinquotienten (Gesamtcholesterin/ HDL-Cholesterin) kommt es zur Ablagerung des überschüssigen LDL in Gefäßwänden. Dieses oxidiert, wird von Makrophagen aufgenommen, führt zur Bildung von Schaumzellen und anschließend zur Ausbildung von *fatty streaks*. Aus diesen ersten sichtbaren Läsionen der Gefäßwand entstehen die atherosklerotischen Plaques. Der Cholesterinspiegel eines Patienten ist somit ursächlich mit der Entstehung und dem Fortschreiten der Atherosklerose verknüpft.

Die heute am häufigsten verschriebenen Mittel zur Behandlung der Hyperlipidämie sind die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer. Sie gewährleisten eine sehr effektive Senkung des Cholesterinspiegels bei hoher Therapiesicherheit. Statine greifen in den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolsynthese ein und hemmen dort die Synthese des Zwischenproduktes Mevalonsäure. Dadurch senken sie nicht nur den Cholesterinspiegel, sondern beeinflussen auch die Synthese anderer Substanzen wie Geranylgeraniol oder Farnesol. Durch den hieraus resultierenden Mangel an Isoprenoiden wird eine Vielzahl der pleiotropen Effekte von Statinen bedingt. Bis vor wenigen Jahren wurden die positiven Wirkungen der Statine allein der Cholesterolreduktion zugeschrieben. Heute wird die Aufmerksamkeit zusätzlich auch auf ihre pleiotropen Wirkungen gelenkt. Wie verschiedene Studien (Scandinavian Simvastatin Survival Study ; Heart Protection Study 2002) zeigen, ist die unter Statinbehandlung beobachtete Senkung der Mortalitätsrate nicht allein mit der Verbesserung der Cholesterinwerte zu begründen. Mit einer äquivalenten Reduktion des Cholesterinspiegels durch Diät oder Fibrate konnten nicht die gleichen positiven Effekte erzielt werden. In mehreren Studien wurde deutlich, dass auch Patienten ohne erhöhte Cholesterinspiegel von einer Statintherapie profitieren (Sacks, Pfeffer et al. 1996; Downs, Clearfield et al. 1998). Darüber hinaus wurde in Zellkulturuntersuchungen gezeigt, dass die Zugabe von Statinen auch ohne Senkung der LDL-Werte zu einer Hemmung der Apoptoserate führte (Henrich, Seebach et al. 2007). Die Erforschung der pleiotropen Effekte von Statinen ist deshalb von großem medizinischen Interesse. Bisher konnten für Statine positive Wirkungen bei Atherosklerose (Vaughan, Gotto et

al. 2000; Ganesh, Nass et al. 2003), Transplantatabstoßung (Soares, Lin et al. 1998; Yildirim and Muderrisoglu 2004) und Immunmodulation (Mach 2003) nachgewiesen werden. Neuere Untersuchungen belegen auch einen positiven Effekt der Statine auf den Verlauf einer Osteoporose (Mundy, Garrett et al. 1999; Maeda, Matsunuma et al. 2001; Maeda, Matsunuma et al. 2004). Auf all diesen Gebieten spielen antioxidative Mechanismen der Zelle eine entscheidende Rolle. Noch ist ungeklärt, über welche Signalkaskaden Statine in das Entzündungsgeschehen eingreifen, doch es gibt bereits einige interessante Ansätze zur Aufklärung ihrer antioxidativen Potenz. Durch Senkung der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen hemmen Statine die Chemotaxis und die Anlagerung und Infiltration von Leukozyten, welche aktiv am Inflammationsprozess beteiligt sind (Rezaie-Majd, Maca et al. 2002; Halcox and Deanfield 2004). Zusätzlich senken sie den Plasmaspiegel von Entzündungsmarkern wie CRP (Ridker, Rifai et al. 2001) und hemmen die Makrophagenmigration (Plenge, Hernandez et al. 2002). Bereits in einer Dosierung die keinen Einfluss auf den Cholesterinspiegel zeigt, hemmen Statine die Oxidation von LDL zu oxLDL (Yasuhara, Suzumura et al. 2000; Rikitake, Kawashima et al. 2001). Durch Reduktion von oxidiertem LDL werden weniger Schaumzellen ausgebildet. Darüber hinaus senken Statine die Schaumzellformation über einen weiteren Mechanismus: *Scavenger* Rezeptoren wie CD 36 oder LOX-1 werden weniger ausgebildet, so dass die Aufnahme von oxidiertem LDL nur noch in eingeschränktem Ausmaß stattfinden kann (Pietsch, Erl et al. 1996; Umetani, Kanayama et al. 1996; Draude, Hrboticky et al. 1999). Auch eine Stabilisierung atherosklerotischer Plaques durch Statine wird diskutiert. Neben der Reduktion des Cholesterin- und Makrophagengehalts in den Plaques (Aikawa, Sugiyama et al. 2002) senken sie die Produktion von Metalloproteinasen welche ursächlich an der Instabilität der atherosklerotischen Plaques beteiligt sind (Crisby, Nordin-Fredriksson et al. 2001; Sukhova, Williams et al. 2002).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen einen radikalfangenden Effekt für Statine. In einem Assay für oxidativen Stress wurden Endothelzellen einer erhöhten Konzentration von NADPH ausgesetzt. Diese Versuchsanordnung imitiert die physiologischen Bedingungen der Generation von reaktiven Sauerstoffspezies im Endothel (Griendling, Sorescu et al. 2000). Die gebildeten Radikale lassen sich mittels des Chemilumineszenzreagenzes Lucigenin nachweisen. Nach mehrstündiger Vorbehandlung der Endothelzellen mit Statinen zeigte sich eine signifikant schwächere Radikalbildung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Statine senkten die Menge an gebildeten Radikalen um bis zu 50%. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Durch Vorbehandlung der Zellen mit Fluvastatin konnte die Arbeitsgruppe um Kugi eine Senkung der Radikalentstehung nach Angiotensin-II-Stimulation erzielen (Kugi, Matsunaga et al. 2002). Wassmann und Mitarbeiter zeigten in VSMC (*vascular smooth muscle cells*) ebenfalls eine reduzierte ROS-Bildung nach Angiotensin-II-Stimulation durch Vorinkubation mit Atorvastatin

(Wassmann, Laufs et al. 2002). Die Einsatzkonzentrationen der Statine liegen in einem vergleichbaren Bereich. In unserer Versuchsanordnung konnte mit 50 μ M Atorvastatin eine 50%ige Reduktion der Radikalbildung in Endothelzellen (EA.hy) erzielt werden, Wassmann und Kollegen erzielten in glatten Gefäßmuskelzellen mit 10 μ M Atorvastatin den gleichen Effekt. Für Simvastatin konnte in Endothelzellen eine Halbierung der Radikalmenge bereits mit einer Konzentration von 10 μ M erreicht werden, bei Lovastatin genügten 30 μ M.

Wie bereits beschrieben können Statine die Oxidation von LDL zu oxLDL hemmen (Hussein, Schlezinger et al. 1997). Durch Bindung des freien LDL an Fluvastatin wird die Oxidation verhindert, so dass es sich dabei um einen direkten Effekt handelt. Ein solcher Mechanismus kann hier ausgeschlossen werden, da die Inkubationslösungen vor der NADPH-Stimulation ausgewaschen wurden. Zum Zeitpunkt der Messung befand sich kein Statin mehr im Zellüberstand. Darüber hinaus wird in den Zeitabhängigkeitsstudien deutlich, dass die Reduktion der Bildung von Sauerstoffradikalen erst nach mehrstündiger Vorbehandlung der Zellen mit Statinen auftritt. Die Wirkung setzt nach ca. 6 Stunden ein und erreicht ihr Maximum bei etwa 8 Stunden. Auch andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Radikalsenkung erst nach einer Inkubationszeit von mehreren Stunden einsetzt (Wassmann, Laufs et al. 2002). Es scheint sich hier um einen indirekten Mechanismus zu handeln. Denkbar ist die Beteiligung von protektiven Proteinen am radikalfangenden Effekt der Statine.

Eine Gruppe von Proteinen, welche mit entzündlichen Prozessen und oxidativem Stress verknüpft werden, sind die Hitzeschockproteine. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Statine an der Regulation verschiedener Hitzeschockproteine beteiligt sind (Negre-Aminou, van Leeuwen et al. 2002; Wang, Tokuda et al. 2003) (Kim, Wang et al. 2005). Ein Hitzeschockprotein welches noch nicht auf seine Empfindlichkeit gegenüber HMG-CoA-Reduktase-Hemmern analysiert wurde, ist die Hämoxygenase. Dieses Enzym katalysiert den Abbau von prooxidativem Häm zu äquimolaren Mengen an Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen. Biliverdin wird über die Biliverdinreduktase bei Säugetieren direkt weiter zu Bilirubin reduziert, welches *in vitro* das stärkste bekannte endogene Antioxidans darstellt (Stocker, Yamamoto et al. 1987; Baranano, Rao et al. 2002). Bilirubin erwies sich in Zellkulturuntersuchungen sogar effektiver als α -Tocopherol oder Vitamin C (Stocker, Yamamoto et al. 1987). Ähnlich wie die Behandlung mit Statinen wird auch ein leicht erhöhter Bilirubin-Serumspiegel mit einem verringerten Atherosklerose-Risiko assoziiert (Vitek, Novotny et al. 2006). Für Patienten mit einer benignen Hyperbilirubinämie, dem Gilbert-Syndrom, konnte in Studien ein verringertes KHK-Risiko beobachtet werden (Hopkins, Wu et al. 1996; Vitek, Jirsa et al. 2002). Ein weiteres Abbauprodukt ist Kohlenmonoxid. Auch für diese Substanz konnten bereits viele protektive Effekte gezeigt werden. Ähnlich wie NO ist CO in der Lage, den Gefäßtonus zu regulieren indem es die lösliche Guanylatcylase

aktiviert und somit die Vasodilatation anregt (Hartsfield 2002). Darüber hinaus verringert CO die Abstoßungsrate nach Transplantationen und verbessert die Toleranz von Organen gegenüber Ischämie und nachfolgender Reperfusion (Foresti, Bani-Hani et al. 2008). Die Hämoxigenase und die Abbauprodukte der von ihr katalysierten Reaktion besitzen somit ein großes antioxidatives Potenzial.

Da bei einer Induktion der Hämoxigenase wie oben beschrieben das Antioxidans Bilirubin gebildet wird, wurden auch Radikalmessungen mit direkt zugesetztem Bilirubin durchgeführt. Durch den Bilirubinzusatz konnte konzentrationsabhängig eine starke Senkung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies erzielt werden. Dies zeigt, dass Bilirubin an der Vermittlung des protektiven Statineffektes beteiligt sein könnte. Um eine ursächliche Beteiligung der Hämoxigenase nachzuweisen wurden Endothelzellen vor Statinzugabe mit dem selektiven Hämoxigenaseinhibitor SnPP behandelt. Der antioxidative Effekt der Statine wurde durch Zusatz des Hemmstoffs nahezu vollständig aufgehoben. Nach Vorinkubation mit ZnBG, einem weiteren selektiven HO-Inhibitor, konnten vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Senkung der Radikalbildung partiell auf eine Expressionssteigerung der Hämoxigenase zurückzuführen sein könnte.

Die Tatsache, dass der radikalsenkende Effekt der Statine erst nach mehrstündiger Vorinkubation einsetzt lässt vermuten, dass die Neusynthese eines Proteins an dieser Wirkung beteiligt ist. Da die Messungen mit SnPP und ZnBG auf eine Beteiligung der Hämoxigenase schließen lassen, wurde die gebildete Menge an HO-1 mit Hilfe der Northern- und Western-Blot-Technik quantifiziert. In der vorliegenden Arbeit konnten Statine zum ersten Mal als potente Induktoren der Hämoxigenase-1 identifiziert werden (Grosser, Erdmann et al. 2004; Grosser, Hemmerle et al. 2004). In kultivierten Endothelzellen induzierten sie die HO-1 mRNA konzentrationsabhängig bis zu 9-fach über den Basalspiegel. Auch in N1E-115, einer Neuroblastomzelllinie konnte die Hämoxigenase mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren stimuliert werden. Die Induktion der Hämoxigenase durch Statine beschränkt sich somit nicht nur auf Endothelzellen. Auch in neuronalem Gewebe lässt sich dieser Effekt beobachten. Andere Arbeitsgruppen zeigten kürzlich ebenfalls die Stimulation der HO-1 in neuronalem Gewebe. Sie induzierten die HO-1 sowohl in Neuroblastomzellen als auch in Gliazellen (Hsieh, Jeng et al. 2008). Da Statine die Blut-Hirn-Schranke überwinden können gewinnen diese Effekte vermehrt an klinischer Bedeutung (Guillot, Misslin et al. 1993). Das Interesse an neuronalen Effekten der Statine wird aktuell immer größer, nachdem eine Vielzahl von Studien einen positiven Effekt auf das Fortschreiten einer Demenz und die Ausprägung ischämischer Prozesse zeigen konnten (Endres, Laufs et al. 1998; Amin-Hanjani, Stagliano et al. 2001; Vaughan 2003; Sparks, Sabbagh et al. 2005). Darüber hinaus postulieren neuere Studien zusätzlich eine Statinbeteiligung an der Verhinderung der Ausbildung einer Multiplen Sklerose (Stuve, Prod'homme et al. 2004; Neuhaus and Hartung 2007).

Für die mRNA-Analysen sowohl in Endothel- als auch in Neuroblastomzellen waren deutlich höhere Einsatzkonzentrationen notwendig als für die Bestimmung der Statinwirkung auf die Radikalbildung und die Proteinsynthese. In Studien anderer Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass für HMG-CoA-Reduktase-abhängige oder –unabhängige Effekte *in vitro* meist relativ hohe Dosierungen benötigt werden. Häufig lassen sich die dabei gemachten Beobachtungen *in vivo* bei wesentlich niedrigeren Einsatzkonzentrationen reproduzieren. Die Arbeitsgruppe um Lee publizierte eine Studie in der sie zeigen, dass Simvastatin nach intraperitonealer Gabe die Hämoxygenase induziert (Lee, Chang et al. 2004). Die dort verwendeten Konzentrationen liegen bei maximal 5mg/kg Körpergewicht (12 μ M), erste Stimulationen konnten aber schon im therapeutischen Bereich beobachtet werden. Die therapeutische Dosis beträgt ca. 0,75 bis 1,5mg/kg Körpergewicht, dies entspricht einer Konzentration von 1,8 μ M bis 3,6 μ M. Ebenso zeigten Muchova und Kollegen die Induktion der Hämoxygenase im Mausmodell. Die dort verwendeten Konzentrationen lagen ähnlich wie bei Lee mit maximal 5mg/kg Körpergewicht im hohen therapeutischen Bereich (Muchova, Wong et al. 2007). In Tiereperimenten liegen die für die Erlangung der HO-1-Induktion notwendigen Konzentrationen also deutlich niedriger als im Zellkulturmodell. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe um Weitz-Schmidt zeigen, dass der Einfluss von Statinen auf Zelladhäsion und Migration im Zellkulturmodell erst im mikromolekularen Konzentrationsbereich zu beobachten war, *in vivo* hingegen im nanomolekularen Bereich reproduziert werden konnte (Weitz-Schmidt 2002). Dies zeigt, dass die beschriebenen Ergebnisse durchaus auch bei klinisch relevanten Dosierungen von Statinen zum Tragen kommen könnten. Da Statine ihre Hauptwirkung, die Senkung der Cholesterinbiosynthese, in der Leber ausüben, spielen die Plasmakonzentrationen therapeutisch nur eine untergeordnete Rolle. Die pleiotropen Wirkungen hingegen erzielen Statine außerhalb der Leber, so dass für derartige Untersuchungen die Plasmaspiegel von Interesse sind. Generell kommen Statine in Zellkulturuntersuchungen in Konzentrationen von ca. 1-100 μ M (Chen, Huang et al. 2006; Hsieh, Rau et al. 2008) zum Einsatz (Loboda, Jazwa et al. 2006). Von Bedeutung ist hierbei natürlich auch die Art der untersuchten Zellsysteme. Makrophagen reagieren zum Beispiel relativ sensibel auf die Behandlung mit Statinen, so dass bereits mit geringen Konzentrationen signifikante Effekte erzielt werden können (Chen, Huang et al. 2006).

Ein weiterer Grund für die Notwendigkeit der Verwendung von hohen Konzentrationen kann in der Sensitivität der Methode liegen. Bei Proteinuntersuchungen zeigte sich, dass die HO-1 bereits bei Einsatzkonzentrationen ab 3 μ M durch Statine leicht induziert wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch auf transkriptioneller Ebene bereits mit geringeren Mengen von Statinen Stimulationen erzielt werden, diese jedoch mit der verwendeten Northern-Blot-Technik nicht nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus spielt das Lösungsverhalten der verwendeten Substanzen eine große Rolle. In

den Zellkulturuntersuchungen zeigte sich, dass die Wirkung der Statine auf die HO-1 umso effektiver ist je lipophiler die eingesetzte Substanz ist. Eine Sonderstellung unter den verwendeten Statinen nimmt Rosuvastatin ein. Diese Substanz ist im Vergleich zu den anderen Statinen besonders hydrophil und zeichnet sich *in vivo* durch eine besonders hohe Leberzellaffinität aus (McTaggart, Buckett et al. 2001). Daraus resultiert eine sehr effektive Senkung des Cholesterinspiegels. Rosuvastatin ist hinsichtlich der Cholesterinsenkung das stärkste unter den verwendeten Statinen. Bereits eine Tagesdosis von 10mg übertrifft die Wirkung von 20mg Pravastatin oder Simvastatin (Paoletti, Fahmy et al. 2001). In den hier gezeigten Versuchen stellt sich die Reihung der Statine bezüglich der Hämoxigenase-Induktion etwas anders dar. Das lipophile Simvastatin erzielt die stärksten Induktionen, Lovastatin ist in seiner Wirkung nur wenig schwächer. Unter den neueren Statinen zeigt Atorvastatin die größeren Effekte, Rosuvastatin stellt sich in den Versuchen als das schwächste der verwendeten Statine dar. Da die gezeigten Effekte unabhängig von der Hemmung der Cholesterolbiosynthese verlaufen war eine Reihung der Statine analog ihrer cholesterinsenkenden Potenz auch nicht zu erwarten. Vielmehr scheint die Lipophilie, und somit die Membrangängigkeit der Substanzen eine entscheidende Rolle für das Ausmaß ihrer pleiotropen Wirkungen in Zellkulturuntersuchungen zu spielen. Die Wirksamkeit der Statine in den hier vorgestellten Versuchen steigt mit zunehmender Lipophilie der verwendeten Substanz (Igel, Sudhop et al. 2002):

Substanz	Lipophilie (C log P)
Simvastatin	4,7
Lovastatin	4,3
Atorvastatin	4,1
Rosuvastatin	-0,3

Die Induktion der Hämoxigenase beschränkt sich nicht nur auf die Transkription. In Western-Blots konnten wir zeigen, dass auch die Translation der HO-1 signifikant gesteigert wird. Ähnlich wie die Stimulation der mRNA erfolgt die Proteininduktion nach mehrstündiger Vorinkubation der Zellen mit Statinen. In neueren Publikationen beschreiben auch andere Arbeitsgruppen die Induktion der Hämoxigenase durch Statine in verschiedenen Zellsystemen (Chen, Huang et al. 2006; Hsieh, Rau et al. 2008) und *in vivo* (Lee, Chang et al. 2004; Muchova, Wong et al. 2007). Sie bestätigen damit die hier vorgelegten Ergebnisse.

Während in dieser Arbeit und auch in den Studien von Chen und Lee ein protektiver Effekt der Statine durch Stimulation des Stressproteins HO-1 beschrieben wird, erwies

sich die Induktion der Hämoxxygenase unter Stressbedingungen in Neuronen als toxisch. Hsieh und Kollegen zeigten, dass durch Statinvorinkubation die gebildete Menge an Radikalen nach Stimulation mit LPS signifikant gesteigert und Nf- κ B vermehrt aktiviert wurde. Beide Effekte ließen sich durch Zugabe von ZnPP aufheben, so dass eine Abhängigkeit von der HO-1-Induktion anzunehmen ist. Da die vermehrte Radikalbildung durch den Eisenchelator Desferoxamin aufgehoben werden kann scheint ein erhöhtes Eisenangebot nach HO-1-Stimulation für die Toxizität verantwortlich zu sein. Im Unterschied zu unseren und anderen Untersuchungen wurde die Inkubationszeit mit 24 Stunden sehr lang gewählt (Hsieh, Jeng et al. 2008). Unsere Versuche zeigten, dass die radikalsenkende Wirkung bereits bei etwa 8 Stunden Vorinkubation ihr Maximum erreicht. Nach etwa 24 Stunden Vorinkubationszeit stieg die Radikalbildung wieder bis auf Kontrollniveau an. In Zellviabilitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Statine vor allem in höheren Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von mehr als 12 Stunden eine Eigentoxizität entwickeln. Für Simvastatin konnten wir bereits mit $10\mu\text{M}$ eine Halbierung der ROS-Produktion erzielen. In dieser Konzentration und bei einer Inkubationszeit von 8 Stunden sind keine toxischen Effekte aufgetreten. Zellviabilitätstests konnten zeigen, dass die Anzahl lebender Zellen nahezu unverändert blieb. Wodurch der Anstieg der Radikalbildung auf Kontrollniveau nach 24 Stunden Statinbehandlung verursacht wird ist bislang unbekannt. Bei einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ Simvastatin erscheint ein toxischer Effekt eher unwahrscheinlich. Die Arbeitsgruppe um Ulrich Laufs konnte zeigen, dass in Endothelzellen nach 36 Stunden Statinbehandlung Simvastatin erst ab einer Konzentration von $15\mu\text{M}$ toxisch wird (Laufs and Liao 1998). Denkbar ist, dass die Aktivierung der HO-1 nicht über den kompletten Zeitraum anhält und so allmählich der Ausgangszustand wieder erreicht wird. Eine andere Möglichkeit besteht in einer Komplexbildung der einzelnen Hämoxxygenase-Isoformen untereinander. Weng und Mitarbeiter konnten eine Komplexbildung zwischen der induktiven HO-1 und der konstitutiv exprimierten HO-2 zeigen, wodurch es zur Blockierung der Häm-Bindungstasche und infolgedessen zu einer verminderten HO-Aktivität kommt. Dies wird als negativer Rückkopplungsmechanismus postuliert um eine überschießende HO-Aktivierung zu vermeiden (Weng, Yang et al. 2003). Suttner und Kollegen zeigten bereits 1999, dass eine bis zu 5-fache HO-Induktion cytoprotektiv wirkt, eine zu intensive Hämoxxygenasestimulation jedoch durch große anfallende Eisenmengen toxisch wirkt (Suttner and Dennery 1999).

Als Stressprotein reagiert die Hämoxxygenase hochsensibel auf die Freisetzung von Radikalen. Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Induktionen um eine Reaktion auf oxidativen Stress handelt, wurden die Endothelzellen mit N-Acetylcystein vorbehandelt. Diese Substanz ist ein starker Radikalfänger und kann somit eventuell entstehende reaktive Sauerstoffspezies sofort neutralisieren. Mit dieser Versuchsanordnung soll ausgeschlossen werden, dass die Induktion der HO-1 weder als

Folge von unspezifischem Stress induziert wird noch als Reaktion auf eine eventuelle Eigentoxizität der verwendeten Statine entsteht. Eine nachfolgende Inkubation mit Statinen führte unverändert zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der HO-1, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die beobachteten Stimulationen nicht durch oxidativen Stress verursacht wurden.

Der Haupteffekt der Statine, die Senkung des Cholesterinspiegels, wird über die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase vermittelt. Das Fehlen des Intermediärprodukts Mevalonsäure führt zu einer massiven Reduktion der Cholesterolsynthese. Darüber hinaus kommt es zu einem deutlichen Mangel an Isoprenoiden wie Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP), welche wie Cholesterol aus dem Intermediärprodukt Mevalonsäure gebildet werden. Durch Geranylgeranylierung bzw. Farnesylierung werden kleine GTP-bindende Proteine (G-Proteine) der Ras- und Rho-Familie aktiviert (Abb. 26) und aus dem Cytosol in die Membran transportiert (Chen, Pendyala et al. 2008). G-Protein gekoppelte Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen und Chemotaxis. Darüber hinaus sind sie an der Steuerung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung ursächlich beteiligt. Das Wirkungsspektrum der GTPasen umfasst auch Effekte, wie sie bei einer Statintherapie beobachtet werden. So führt die Hemmung von RhoA zu einer Verbesserung der Endothelfunktion und die Hemmung von Rac1 verhindert die Aktivierung der NADPH Oxidase und infolge dessen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Chen, Pendyala et al. 2008). Eine mögliche Beteiligung der GTPasen an den Statineffekten sollte daher durch Experimente mit den Isoprenoiden FPP und GGPP geklärt werden. Die beobachteten Induktionen der Hämoxxygenasetranskription und -Proteinexpression lassen sich jedoch durch eine Substitution von Mevalonsäure nicht aufheben. Auch der Zusatz von Geranylgeraniolpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP) beeinflusst die beobachtete Induktion nicht. Daraus lässt sich schließen, dass Isoprenoid-abhängige Wege wie die Blockade von Rho und der nachgeschalteten Rho-Kinase an den hier gezeigten Statineffekten unbeteiligt sind (Laufs and Liao 2000; Eto, Kozai et al. 2002).

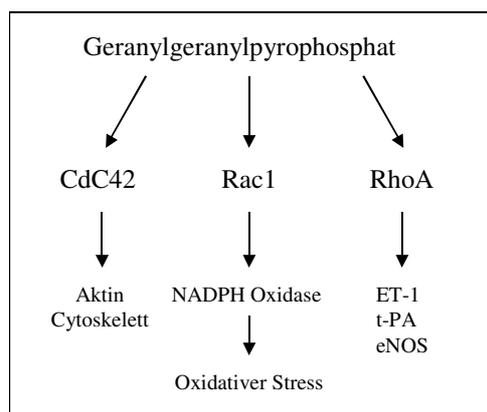


Abb. 26: Bedeutung der kleinen G-Proteine

Von anderen Arzneistoffen wie z.B. Acetylsalicylsäure und NO-NSAIDS ist bekannt, dass sie die Hämoxygenaseexpression über eine erhöhte Freisetzung von NO stimulieren (Grosser, Abate et al. 2003; Berndt, Grosser et al. 2005). Die meisten der pleiotropen Effekte der Statine werden auf eine Aktivierung des NO-Stoffwechselweges zurückgeführt (Chen, Xing et al. 2001; Kalinowski, Dobrucki et al. 2002). Dies geschieht sowohl durch Senkung der oxLDL-Spiegel und damit Hemmung der Bildung des inhibitorischen Komplexes aus Caveolin-1 und eNOS (Feron, Dessy et al. 1999), als auch durch Mangel an isoprenyliertem Rho, welches die eNOS Expression negativ reguliert. Zusätzlich führt die verringerte Isoprenylierung von Rho zu einer Erhöhung der eNOS mRNA-Stabilität (Laufs, Fata et al. 1997; Laufs and Liao 1998). Alle in der Literatur beschriebenen Mechanismen der eNOS-Induktion liegen also ursächlich in einer Hemmung der HMG-CoA-Reduktase begründet. Da die Induktion der HO-1 wie oben beschrieben unabhängig von der Cholesterin- und Isoprenoidsynthese verläuft, lag die Vermutung nahe, dass der NO-Signalweg in unseren Experimenten keine Rolle von Bedeutung spielt. Wie erwartet konnte die HO-1-Induktion durch Zusatz des selektiven NO-Synthase-Inhibitors L-NAME nicht aufgehoben werden. NO kann somit in diesem Modell als Mediator des Effekts ausgeschlossen werden. Es muss einen weiteren, bislang unbekanntem Weg geben, über den Statine in die Regulation der Hämoxygenase eingreifen. Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe um Weitz-Schmidt ebenfalls einen Statineffekt charakterisieren, der sowohl unabhängig von der Hemmung der Cholesterinsynthese als auch unabhängig von der NO-Freisetzung verläuft. Sie zeigten, dass Statine an einer Stelle außerhalb des aktiven Zentrums an das Leukozyten-Funktions-Antigen-1 (LFA-1) binden und es so zu einer verringerten Anziehung von Leukozyten kommt. Es handelt sich hierbei also um eine allosterische Hemmung (Weitz-Schmidt, Welzenbach et al. 2001). Ähnlich wie die Hemmung des LFA-1 ist die

Induktion der HO-1 durch Statine weder über NO noch über den Mevalonsäureweg vermittelt.

Eine mögliche Erklärung könnte in einer Stabilisierung der mRNA durch Inkubation mit Statinen liegen. Es gibt bereits Hinweise, dass sowohl die Induktion der HO-1 über mRNA-Stabilisierung vermittelt sein kann wie auch manche pleiotrope Effekte der Statine (Hu, Sung et al. 2006). Demple und Mitarbeiter zeigten z. B., dass die durch NO verursachte Induktion der HO-1 zum Teil auf eine Stabilisierung der HO-1 mRNA zurückzuführen ist (Demple 2004; Leautaud and Demple 2007). Die hier vorgestellten Experimente zeigen, dass nach Vorbehandlung mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D und anschließender Inkubation mit Statinen die HO-1-Induktion vollständig aufgehoben wird. Ob die HO-1-Induktion nur durch Genaktivierung erfolgt, oder ob eine Stabilisierung der mRNA zusätzlich zu dem Effekt beiträgt muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Über welchen Mechanismus die Aktivierung der HO-1 erfolgt ist bislang unklar. Die Hämoxygenase wird hauptsächlich transkriptionell reguliert. Durch Vorbehandlung der Zellen mit Cycloheximid, einem selektiven Inhibitor der Proteinbiosynthese, konnten jedoch nachgewiesen werden, dass es sich bei der hier beobachteten Induktion nicht um einen direkten Effekt der Statine an der DNA handelt, sondern dass Proteine als Mediatoren beteiligt sein müssen. Denkbar ist die Beteiligung eines Transkriptionsfaktors wie z.B. Nrf 2, der die Induktion der Hämoxygenase stimuliert. Eine andere Möglichkeit besteht in der Deaktivierung eines Repressorproteins wie Bach-1. Dieses hemmt die Transkription der Hämoxygenase. Führt die Expression eines Proteins wie Hämin zur Deaktivierung von Bach-1, so wird dadurch indirekt die Expression der Hämoxygenase induziert. Das Wechselspiel zwischen Transkriptionsaktivierung durch Nrf 2 und die Repression durch Bach-1 scheint einen wichtigen Stellenwert bei der Genregulation der HO-1 einzunehmen und bedarf weiterer Untersuchungen (Abate, Zhao et al. 2007).

Der Aufbau und die Struktur des HO-1-Promotors sind bereits Bestandteil zahlreicher Studien. Dabei stellte sich heraus, dass die Promotorregionen der humanen und der murinen Hämoxygenase zwar sehr ähnlich aufgebaut sind, die Regulation dieses Gens jedoch teilweise unterschiedlich verläuft. Beide Promotorregionen weisen zwei große regulatorische Elemente auf. Bei der Maus werden sie mit Region E1 und E2 bezeichnet und befinden sich bei ca. -4kb und -10kb. Im humanen HO-1-Promotor sind diese Regionen bei -4kb und -9kb lokalisiert und werden Region A und B genannt. Bei beiden Spezies enthalten diese regulatorischen Regionen je zwei bzw. drei *stress response elements* (StRE). Im Gegensatz zur murinen HO-1 enthält die humane HO-1 außerdem eine *enhancer region* welche sich innerhalb des Gens befindet (Sikorski, Hock et al. 2004). Die Stimulation durch Cadmium und Hämin wird zum Teil über dieses Element gesteuert. Bei einer Vielzahl der Stimuli wird die Induktion der

Hämoxxygenase im Mausmodell über die regulatorischen Regionen E1 und E2 vermittelt (Alam and Cook 2003). Dabei spielen Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle. Von besonderer Bedeutung ist hier Nrf 2. Durch Dimerisierung (z.B. mit ATF-4) und anschließende Bindung an *StRE* vermittelt Nrf 2 die HO-Induktion vieler Agenzien. Neben Häm, Hyperoxie und Cadmium ist Nrf 2 auch der Mediator für die durch Oxidantien verursachte Induktion der HO-1 (Alam, Wicks et al. 2000). Außer den *StRE* enthält der Promotor der humanen Hämoxxygenase weitere Bindungsstellen. Unter ihnen befinden sich die Aktivatorproteine AP-1 und AP-2, ein *heat shock element* (HSE), ein *Cadmium response element* (CRE) und auch Nf-κB. Nf-κB ist ein induzierbarer, ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der unter physiologischen Bedingungen ein wichtiger Regulator bei Immun- und Entzündungsreaktionen ist. Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Aktivierung von NF-κB z.B. durch LPS oder IL-1β und einer HO-1-Induktion zeigen (Kurata, Matsumoto et al. 1996; Bauer, Vollmar et al. 2000). Für viele Stimuli ist jedoch bislang ungeklärt, über welche Signalkaskaden es zur gesteigerten Expression der humanen Hämoxxygenase kommt. Um die eventuelle Beteiligung eines Transkriptionsfaktors an der HO-Induktion durch Statine genauer zu untersuchen, wurden Promotorstudien durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden Endothelzellen mit unterschiedlichen Reportergenkonstrukten transfiziert. Diese enthielten entweder Kopien der Sequenz von Nf-κB oder *StRE* oder ein 4000bp langes Stück des proximalen Endes des HO-1-Promotors. Bei beiden verwendeten Statinen konnte eine gesteigerte Aktivität nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die Induktion der HO-1 durch Statine tatsächlich über den Promotor erfolgt. Interessanterweise scheinen die Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und Nf-κB in der Vermittlung der beobachteten Induktion jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es muss ein weiteres regulatives Element im Promotor der Hämoxxygenase beteiligt sein. Nur in Zellen, welche mit einem Plasmid aus den ersten 4000bp des Promotors transfiziert waren, ließ sich die Hämoxxygenase durch Inkubation mit Statinen induzieren. Das regulative Element für die Statin-vermittelte Induktion muss sich also auf diesem Teilstück des Promotors befinden.

Bestandteil zahlreicher zellulärer Signalkaskaden sind Proteinkinasen. Unter ihnen hat in den letzten Jahren eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen eine besondere Bedeutung erlangt (Davis 1993), (Widmann, Gibson et al. 1999; Arbabi and Maier 2002). Die Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAP-Kinasen, MAPK) regulieren zelluläre Vorgänge wie Wachstum, Apoptose, Proliferation, Zelldifferenzierung und Antworten auf externe Stimuli (Ryter, Xi et al. 2002). Sie unterteilen sich in drei Signalkaskaden: die extrazellulär regulierte Kinase (ERK 1/2) nimmt in der Regulation von Zelldifferenzierung und Zellproliferation eine zentrale Rolle ein. Die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK, oder auch Stress-aktivierte Proteinkinase SAPK) und die p38 MAP-Kinase werden vor allem durch inflammatorische Cytokine und Stressfaktoren aktiviert. Auffällig ist, dass eine Vielzahl der Stimuli für MAP-Kinasen auch Induktoren

der Hämoxxygenase darstellen. In verschiedenen Zellsystemen konnte bereits gezeigt werden, dass die Induktion der HO-1 vor allem durch Stressfaktoren über einen MAPK-Signalweg verläuft (Elbirt, Whitmarsh et al. 1998; Alam, Wicks et al. 2000). Von besonderer Bedeutung sind hier die MAP-Kinasen ERK und p38. Allgemein anerkannt ist jedoch, dass die MAP-Kinasen auf denselben Stimulus in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich reagieren. In Hepatozyten der Ratte wird die durch Arsen verursachte HO-1-Induktion über JNK und p38 vermittelt (Kietzmann, Samoylenko et al. 2003), in Hepatozyten von Hühnern sind ERK und p38 an der Regulation beteiligt (Elbirt, Whitmarsh et al. 1998). Die auf Hypoxie folgende Induktion der HO-1 verläuft in Endothelzellen der Ratte über p38 und ERK (Ryter, Xi et al. 2002), in Kardiomyozyten der Ratte hingegen über die Proteinkinase C (PKC) (Kacimi, Chentoufi et al. 2000). Auch die durch NO hervorgerufene Induktion wird über MAP-Kinasen vermittelt: in primären bovinen Endothelzellen führte die Inkubation mit SperminNONOat zur Phosphorylierung von ERK, JNK und p38 (Buckley, Marshall et al. 2003). NO-Donoren hingegen induzieren die Hämoxxygenase vorrangig über p38 und JNK (Jun, Oh et al. 1999; Chen and Maines 2000).

Auch für Statine ist eine Abhängigkeit der HO-1-Induktion von MAP-Kinasen denkbar. Die Aktivierung der MAP-Kinasen durch Statine konnte bereits mehrfach gezeigt werden (Chen, Huang et al. 2006; Yano, Matsumura et al. 2007). Ob auch die Stimulation der Hämoxxygenase über den MAPK-Signalweg verläuft ist bislang ungeklärt. Doch nicht nur die MAPK sind mögliche Mediatoren der Effekte von Statinen. Seit bekannt wurde, dass die Hämoxxygenase durch den *tumor promotor* TPA, einen Proteinkinase C-Agonisten, induzierbar ist, wird auch für die Proteinkinase C eine Bedeutung in der HO-1-Regulation diskutiert (Hiwasa, Fujimura et al. 1982; Hiwasa, Fujiki et al. 1983). Einige wenige Studien konnten auch eine Beteiligung der Proteinkinasen A und G an der Regulation der HO-1 nachweisen. Inkubationen mit dem membrangängigen cAMP-Analogen Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) oder mit PKA-Agonisten führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der HO-1 (Durante, Christodoulides et al. 1997; Immenschuh, Kietzmann et al. 1998). All diese Regulationsmechanismen stellen mögliche Angriffspunkte für Statine dar. Über welche Signalkaskaden die Induktion der Hämoxxygenase durch Statine in unserem Zellsystem verläuft, ist bisher noch unbekannt und wird Bestandteil weiterführender Studien sein. Auf Grund der Promotorstudien kann bislang lediglich festgestellt werden, dass Nrf und Nf-κB nicht als alleinige Mediatoren für die Stimulation der HO-1 verantwortlich gemacht werden können.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgelegten Ergebnisse erstmalig eine Induktion der HO-1 in Zellkulturen durch Behandlung mit Statinen. Die vermehrte Bildung dieses Enzyms weist auf eine Beteiligung der HO-1 an den pleiotropen Effekten der Statine hin. Die Induktion antioxidativer und antiinflammatorischer Stoffwechselwege könnte einen

Teilaspekt der bislang ungeklärten Mortalitätssenkung unter Statintherapie darstellen. Die Mortalitäts- und Morbiditätssenkung und die im Allgemeinen sehr gute Verträglichkeit der Statine macht ihren Einsatz auch im prophylaktischen Bereich denkbar. Es ist zu erwarten, dass Statine in naher Zukunft nicht mehr nur zur Senkung erhöhter Cholesterinspiegel eingesetzt werden, sondern auch zur Prophylaxe kardiovaskulärer Komplikationen bei Risikopatienten wie z.B. Diabetikern zum Einsatz kommen könnten. Die hier dargestellten Ergebnisse geben weiteren Anlass zu der Annahme, dass Statine nicht nur im Bereich der Cholesterinsenkung einen sinnvollen Einsatz finden können. Durch Aufklärung der beteiligten Signalkaskaden könnten neue Therapieoptionen erschlossen werden.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der zytoprotektiven Effekte von HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffen und die Identifizierung von Zielstrukturen über die diese Wirkungen vermittelt sein können.

Statine reduzieren die NADPH-abhängige Bildung von Sauerstoffradikalen konzentrations- und zeitabhängig. Die antioxidative Wirkung ist spezifisch für die Gruppe der HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffe.

Durch Zusatz von Mevalonsäure kann dieser Effekt teilweise aufgehoben werden. Dies wird allerdings durch einen antioxidativen Eigeneffekt der Mevalonsäure beeinflusst, so dass eine eindeutige Aussage zu einer Beteiligung der Mevalonsäure an der reduzierten Radikalbildung nach Statininkubation nicht möglich ist.

Eine mehrstündige Inkubationszeit und Untersuchungen mit spezifischen HO-Inhibitoren sprechen für eine ursächliche Beteiligung des antioxidativen Enzyms HO-1 an dem radikalfangenden Effekt der Statine. Das HO-Stoffwechselprodukt Bilirubin stellt unter den gegebenen Bedingungen einen sehr effektiven Radikalfänger dar.

Statine werden als potente Induktoren der HO-1 charakterisiert. Die Hämoxygenase wird sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene vermehrt gebildet. Die Induktion wird in Endothelzellen und in Neuroblastomzellen gezeigt.

Die Stimulation der HO-1 Genexpression wird durch die Substitution von Mevalonsäure nicht beeinflusst. Der Ersatz von FPP, GGPP oder Cholesterol ergeben ebenso keine Veränderung.

Durch Vorinkubation mit dem starken Antioxidans NAC wird gezeigt, dass die Induktion der HO-1 mRNA nicht durch reaktive Sauerstoffspezies verursacht wird.

Inkubationen mit dem NOS-Inhibitor L-NAME ergeben, dass die HO-1-Induktion durch Statine unabhängig von NO verläuft.

Experimente mit dem Proteinsynthesehemmer CHX deuten auf eine mögliche Beteiligung von Proteinen an der Statin-vermittelten Genaktivierung der HO-1 hin.

Ergebnisse mit dem Transkriptionshemmstoff Aktinomycin D zeigen, dass unter Statinbehandlung eine Neusynthese von HO-1-mRNA stattfindet.

Die Untersuchungen demonstrieren, dass die Aktivierung der HO-1 Genexpression durch die Statine über regulatorische DNA-Sequenzen der proximalen HO-1 Promotorregion vermittelt wird, jedoch nicht über eine alleinige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ b oder Nrf 2 erfolgt.

Die vorliegende Arbeit zeigt einen kausalen Zusammenhang zwischen Induktion des HO-1-Systems und Reduktion der Radikalbildung in Endothelzellen durch Behandlung mit Statinen. Dies kann eine mögliche Erklärung für einen Teil der pleiotropen Effekte von Statinen darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- 4S (1994). "Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)." Lancet **344**(8934): 1383-9.
- Abate, A., H. Zhao, et al. (2007). "The role of Bach1 in the induction of heme oxygenase by tin mesoporphyrin." Biochem Biophys Res Commun **354**(3): 757-63.
- Aikawa, M., S. Sugiyama, et al. (2002). "Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma." Circulation **106**(11): 1390-6.
- Alam, J., J. Cai, et al. (1994). "Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals." J Biol Chem **269**(2): 1001-9.
- Alam, J., S. Camhi, et al. (1995). "Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer." J Biol Chem **270**(20): 11977-84.
- Alam, J. and J. L. Cook (2003). "Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway." Curr Pharm Des **9**(30): 2499-511.
- Alam, J., C. Wicks, et al. (2000). "Mechanism of Heme Oxygenase-1 Gene Activation by Cadmium in MCF-7 Mammary Epithelial Cells. ROLE OF p38 KINASE AND Nrf2 TRANSCRIPTION FACTOR." J. Biol. Chem. **275**(36): 27694-27702.
- Alwine, J. C., D. J. Kemp, et al. (1977). "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5350-4.
- Ames, B. N. (1989). "Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer." Free Radic Res Commun **7**(3-6): 121-8.
- Amin-Hanjani, S., N. E. Stagliano, et al. (2001). "Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice." Stroke **32**(4): 980-6.
- Arbabi, S. and R. V. Maier (2002). "Mitogen-activated protein kinases." Crit Care Med **30**(1 Supp): S74-S79.
- Balla, J., H. S. Jacob, et al. (1992). "Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins: a possible mechanism limiting shock damage." Trans Assoc Am Physicians **105**: 1-6.
- Baranano, D. E., M. Rao, et al. (2002). "Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16093-8.
- Bauer, I., B. Vollmar, et al. (2000). "Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat." J Hepatol **33**(3): 395-406.

- Bellosta, S., F. Bernini, et al. (1998). "Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors." *Atherosclerosis* **137 Suppl**: S101-9.
- Berndt, G., N. Grosser, et al. (2005). "AZD3582 increases heme oxygenase-1 expression and antioxidant activity in vascular endothelial and gastric mucosal cells." *Eur J Pharm Sci* **25**(2-3): 229-35.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brown, W. V., H. E. Bays, et al. (2002). "Efficacy and safety of rosuvastatin compared with pravastatin and simvastatin in patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, 52-week trial." *Am Heart J* **144**(6): 1036-43.
- Buckley, B. J., Z. M. Marshall, et al. (2003). "Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium." *Biochem Biophys Res Commun* **307**(4): 973-9.
- Busse, R. and I. Fleming (1996). "Endothelial dysfunction in atherosclerosis." *J Vasc Res* **33**(3): 181-94.
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." *Circ Res* **87**(10): 840-4.
- Chen, H., Y. Xing, et al. (2001). "Lovastatin increases nitric oxide synthesis in IL-1 beta-stimulated smooth muscle cells." *Chin Med J (Engl)* **114**(11): 1123-7.
- Chen, J. C., K. C. Huang, et al. (2006). "HMG-CoA reductase inhibitors upregulate heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 macrophages via ERK, p38 MAPK and protein kinase G pathways." *Cell Signal* **18**(1): 32-9.
- Chen, K. and M. D. Maines (2000). "Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**(3): 609-17.
- Chen, W., S. Pendyala, et al. (2008). "Endothelial cell barrier protection by simvastatin: GTPase regulation and NADPH oxidase inhibition." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**(4): L575-83.
- Choi, A. M. and J. Alam (1996). "Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury." *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**(1): 9-19.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Clark, J. E., R. Foresti, et al. (2000). "Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress." *Biochem J* **348 Pt 3**: 615-9.
- Cooke, J. P. (1997). "Therapeutic interventions in endothelial dysfunction: endothelium as a target organ." *Clin Cardiol* **20**(11 Suppl 2): II-45-51.

- Crisby, M., G. Nordin-Fredriksson, et al. (2001). "Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization." Circulation **103**(7): 926-33.
- Cruse, I. and M. D. Maines (1988). "Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes." J Biol Chem **263**(7): 3348-53.
- Davignon, J., R. F. Jacob, et al. (2004). "The antioxidant effects of statins." Coron Artery Dis **15**(5): 251-8.
- Davignon, J. and R. Laaksonen (1999). "Low-density lipoprotein-independent effects of statins." Curr Opin Lipidol **10**(6): 543-59.
- Davis, R. J. (1993). "The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." J Biol Chem **268**(20): 14553-6.
- Dean, R. T., S. Gieseg, et al. (1993). "Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins." Trends Biochem Sci **18**(11): 437-41.
- Demple, B. (2004). "Protection from the dark side of NO: signaling and cellular defenses against nitric oxide toxicity." IUBMB Life **56**(2): 59-64.
- Dennery, P. A., A. F. McDonagh, et al. (1995). "Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia." Free Radic Biol Med **19**(4): 395-404.
- Diederich, D., J. Skopec, et al. (1994). "Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals." Am J Physiol **266**(3 Pt 2): H1153-61.
- Downs, J. R., M. Clearfield, et al. (1998). "Primary Prevention of Acute Coronary Events With Lovastatin in Men and Women With Average Cholesterol Levels: Results of AFCAPS/TexCAPS.10.1001/jama.279.20.1615." JAMA **279**(20): 1615-1622.
- Draude, G., N. Hrboticky, et al. (1999). "The expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin." Biochem Pharmacol **57**(4): 383-6.
- Durante, W., N. Christodoulides, et al. (1997). "cAMP induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle." Am J Physiol **273**(1 Pt 2): H317-23.
- Duriez, P. (2001). "Current practice in the treatment of hyperlipidaemias." Expert Opin Pharmacother **2**(11): 1777-94.
- Elbirt, K. K., A. J. Whitmarsh, et al. (1998). "Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem **273**(15): 8922-31.
- Endres, M., U. Laufs, et al. (1998). "Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8880-5.
- Eto, M., T. Kozai, et al. (2002). "Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways." Circulation **105**(15): 1756-9.

- Feron, O., C. Dessy, et al. (1999). "Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase." J Clin Invest **103**(6): 897-905.
- Ferrali, M., C. Signorini, et al. (1992). "Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil." Biochem J **285** (Pt 1): 295-301.
- Flick, D. A. and G. E. Gifford (1984). "Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor." J Immunol Methods **68**(1-2): 167-75.
- Foresti, R., M. G. Bani-Hani, et al. (2008). "Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges." Intensive Care Med **34**(4): 649-58.
- Foresti, R. and R. Motterlini (1999). "The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis." Free Radic Res **31**(6): 459-75.
- Fuster, V. and J. J. Badimon (1995). "Regression or stabilization of atherosclerosis means regression or stabilization of what we don't see in the arteriogram." Eur Heart J **16 Suppl E**: 6-12.
- Ganesh, S. K., C. M. Nass, et al. (2003). "Anti-atherosclerotic effects of statins: lessons from prevention trials." J Cardiovasc Risk **10**(3): 155-9.
- Girona, J., A. E. La Ville, et al. (1999). "Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein oxidation." Am J Cardiol **83**(6): 846-51.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1987). "Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis." Circulation **76**(3): 504-7.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.
- Grosser, N., A. Abate, et al. (2003). "Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin." Biochem Biophys Res Commun **308**(4): 956-60.
- Grosser, N., K. Erdmann, et al. (2004). "Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1." Biochem Biophys Res Commun **325**(3): 871-6.
- Grosser, N., A. Hemmerle, et al. (2004). "The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells." Free Radic Biol Med **37**(12): 2064-71.
- Guillot, F., P. Misslin, et al. (1993). "Comparison of fluvastatin and lovastatin blood-brain barrier transfer using in vitro and in vivo methods." J Cardiovasc Pharmacol **21**(2): 339-46.
- Guzik, T. J., N. E. West, et al. (2000). "Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors." Circ Res **86**(9): E85-90.
- Halcox, J. P. and J. E. Deanfield (2004). "Beyond the laboratory: clinical implications for statin pleiotropy." Circulation **109**(21 Suppl 1): II42-8.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods Enzymol **186**: 1-85.

- Hartsfield, C. L. (2002). "Cross talk between carbon monoxide and nitric oxide." Antioxid Redox Signal **4**(2): 301-7.
- Hartsfield, C. L., J. Alam, et al. (1997). "Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide." Am J Physiol **273**(5 Pt 1): L980-8.
- Henrich, D., C. Seebach, et al. (2007). "High dosage of simvastatin reduces TNF-alpha-induced apoptosis of endothelial progenitor cells but fails to prevent apoptosis induced by IL-1beta in vitro." J Surg Res **142**(1): 13-9.
- Hiwasa, T., H. Fujiki, et al. (1983). "Increase in the synthesis of a Mr 32,000 protein in BALB/c 3T3 cells treated with tumor-promoting indole alkaloids or polyacetates." Cancer Res **43**(12 Pt 1): 5951-5.
- Hiwasa, T., S. Fujimura, et al. (1982). "Tumor promoters increase the synthesis of a 32,000-dalton protein in BALB/c 3T3 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(6): 1800-4.
- Hopkins, P. N., L. L. Wu, et al. (1996). "Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(2): 250-5.
- HPS (2002). "MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial." Lancet **360**(9326): 7-22.
- Hsieh, C. H., S. F. Jeng, et al. (2008). "Statin-induced heme oxygenase-1 increases NF-kappaB activation and oxygen radical production in cultured neuronal cells exposed to lipopolysaccharide." Toxicol Sci **102**(1): 150-9.
- Hsieh, C. H., C. S. Rau, et al. (2008). "Simvastatin-induced heme oxygenase-1 increases apoptosis of Neuro 2A cells in response to glucose deprivation." Toxicol Sci **101**(1): 112-21.
- Hu, H., A. Sung, et al. (2006). "Simvastatin enhances bone morphogenetic protein receptor type II expression." Biochem Biophys Res Commun **339**(1): 59-64.
- Huang, H. C., T. Nguyen, et al. (2000). "Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12475-80.
- Hussein, O., S. Schlezinger, et al. (1997). "Reduced susceptibility of low density lipoprotein (LDL) to lipid peroxidation after fluvastatin therapy is associated with the hypocholesterolemic effect of the drug and its binding to the LDL." Atherosclerosis **128**(1): 11-8.
- Igel, M., T. Sudhop, et al. (2002). "Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin." J Clin Pharmacol **42**(8): 835-45.
- Immenschuh, S., T. Kietzmann, et al. (1998). "The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures." Mol Pharmacol **53**(3): 483-91.
- Jun, C. D., C. D. Oh, et al. (1999). "Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, p38 kinase, and CPP-32 protease pathways." J Immunol **162**(6): 3395-401.

- Kacimi, R., J. Chentoufi, et al. (2000). "Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection." Cardiovasc Res **46**(1): 139-50.
- Kalinowski, L., I. T. Dobrucki, et al. (2002). "Cerivastatin potentiates nitric oxide release and enos expression through inhibition of isoprenoids synthesis." J Physiol Pharmacol **53**(4 Pt 1): 585-95.
- Kietzmann, T., A. Samoylenko, et al. (2003). "Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes." J Biol Chem **278**(20): 17927-36.
- Kim, H. P., X. Wang, et al. (2005). "Heat Shock Protein-70 Mediates the Cytoprotective Effect of Carbon Monoxide: Involvement of p38{beta} MAPK and Heat Shock Factor-1 " J Immunol **175**(4): 2622-2629.
- Kugi, M., A. Matsunaga, et al. (2002). "Antioxidative effects of fluvastatin on superoxide anion activated by angiotensin II in human aortic smooth muscle cells." Cardiovasc Drugs Ther **16**(3): 203-7.
- Kurata, S., M. Matsumoto, et al. (1996). "Lipopolysaccharide activates transcription of the heme oxygenase gene in mouse M1 cells through oxidative activation of nuclear factor kappa B." Eur J Biochem **239**(3): 566-71.
- Kwak, B. R., F. Mulhaupt, et al. (2003). Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Lahera, V., M. Goicoechea, et al. (2007). "Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins." Curr Med Chem **14**(2): 243-8.
- Laufs, U. (2003). "Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide." Eur J Clin Pharmacol **58**(11): 719-31.
- Laufs, U., V. L. Fata, et al. (1997). "Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase." J Biol Chem **272**(50): 31725-9.
- Laufs, U. and J. K. Liao (1998). "Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase." J Biol Chem **273**(37): 24266-71.
- Laufs, U. and J. K. Liao (2000). "Targeting Rho in cardiovascular disease." Circ Res **87**(7): 526-8.
- Lavrovsky, Y., M. L. Schwartzman, et al. (1994). "Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 5987-91.
- Leautaud, V. and B. Demple (2007). "Regulation of heme oxygenase-1 mRNA deadenylation and turnover in NIH3T3 cells by nitrosative or alkylation stress." BMC Mol Biol **8**: 116.
- Lee, T.-S., C.-C. Chang, et al. (2004). "Simvastatin Induces Heme Oxygenase-1: A Novel Mechanism of Vessel Protection10.1161/01.CIR.0000140694.67251.9C." Circulation **110**(10): 1296-1302.

- Lennernas, H. and G. Fager (1997). "Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences." Clin Pharmacokinet **32**(5): 403-25.
- Li, Y., H. Zhu, et al. (1998). "Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems." J Biol Chem **273**(4): 2015-23.
- Liao, J. K. (2005). "Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol." Am J Cardiol **96**(5A): 24F-33F.
- Lin, F. and A. W. Girotti (1998). "Hemin-enhanced resistance of human leukemia cells to oxidative killing: antisense determination of ferritin involvement." Arch Biochem Biophys **352**(1): 51-8.
- Loboda, A., A. Jazwa, et al. (2006). "Atorvastatin prevents hypoxia-induced inhibition of endothelial nitric oxide synthase expression but does not affect heme oxygenase-1 in human microvascular endothelial cells." Atherosclerosis **187**(1): 26-30.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-41.
- Mach, F. (2003). "Statins as novel immunomodulators: from cell to potential clinical benefit." Thromb Haemost **90**(4): 607-10.
- Maeda, T., A. Matsunuma, et al. (2001). "Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells." Biochem Biophys Res Commun **280**(3): 874-7.
- Maeda, T., A. Matsunuma, et al. (2004). "Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells." J Cell Biochem **92**(3): 458-71.
- Maines, M. D., G. M. Trakshel, et al. (1986). "Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible." J Biol Chem **261**(1): 411-9.
- Manzoni, M. and M. Rollini (2002). "Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs." Appl Microbiol Biotechnol **58**(5): 555-64.
- Maron, D. J., S. Fazio, et al. (2000). "Current perspectives on statins." Circulation **101**(2): 207-13.
- McTaggart, F., L. Buckett, et al. (2001). "Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor." Am J Cardiol **87**(5A): 28B-32B.
- Miida, T., S. Hirayama, et al. (2004). "Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia." J Atheroscler Thromb **11**(5): 253-64.
- Milani, R. V. (2004). "Lipid and statin effects on stroke and dementia." Am J Geriatr Cardiol **13**(3 Suppl 1): 25-8.
- Motterlini, R., J. E. Clark, et al. (2002). "Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities." Circ Res **90**(2): E17-24.
- Muchova, L., R. J. Wong, et al. (2007). "Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice: a novel mechanism of in vivo antioxidant protection." Can J Physiol Pharmacol **85**(8): 800-10.

- Mugge, A. (1994). "[Abnormal endothelium-mediated regulation of vascular tone in arteriosclerosis]." Z Kardiol **83**(10): 759-67.
- Mundy, G., R. Garrett, et al. (1999). "Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins." Science **286**(5446): 1946-9.
- Nagy, L., P. Tontonoz, et al. (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma." Cell **93**(2): 229-40.
- Nascimento, A. L., P. Luscher, et al. (1993). "Ultraviolet A (320-380 nm) radiation causes an alteration in the binding of a specific protein/protein complex to a short region of the promoter of the human heme oxygenase 1 gene." Nucleic Acids Res **21**(5): 1103-9.
- Negre-Aminou, P., R. E. van Leeuwen, et al. (2002). "Differential effect of simvastatin on activation of Rac(1) vs. activation of the heat shock protein 27-mediated pathway upon oxidative stress, in human smooth muscle cells." Biochem Pharmacol **64**(10): 1483-91.
- Neuhaus, O. and H. P. Hartung (2007). "Evaluation of atorvastatin and simvastatin for treatment of multiple sclerosis." Expert Rev Neurother **7**(5): 547-56.
- Neve, B. P., J. C. Fruchart, et al. (2000). "Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis." Biochem Pharmacol **60**(8): 1245-50.
- Novela, C. and C. H. Hennekens (2004). "Hypothesis: atorvastatin has pleiotropic effects that translate into early clinical benefits on cardiovascular disease." J Cardiovasc Pharmacol Ther **9**(1): 61-3.
- Oberle, S., T. Polte, et al. (1998). "Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway." Circ Res **82**(9): 1016-20.
- Oberle, S. and H. Schroder (1997). "Ferritin may mediate SIN-1-induced protection against oxidative stress." Nitric Oxide **1**(4): 308-14.
- Otterbein, L. E., F. H. Bach, et al. (2000). "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway." **6**(4): 422-428.
- Paoletti, R., M. Fahmy, et al. (2001). "Rosuvastatin demonstrates greater reduction of low-density lipoprotein cholesterol compared with pravastatin and simvastatin in hypercholesterolaemic patients: a randomized, double-blind study." J Cardiovasc Risk **8**(6): 383-90.
- Perez-Guerrero, C., M. Alvarez de Sotomayor, et al. (2003). "Effects of simvastatin on endothelial function after chronic inhibition of nitric oxide synthase by L-NAME." J Cardiovasc Pharmacol **42**(2): 204-10.
- Pietsch, A., W. Erl, et al. (1996). "Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells." Biochem Pharmacol **52**(3): 433-9.
- Plenge, J. K., T. L. Hernandez, et al. (2002). "Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days: an effect independent of low-density lipoprotein cholesterol reduction." Circulation **106**(12): 1447-52.
- Poulter, N. (1999). "Coronary heart disease is a multifactorial disease." Am J Hypertens **12**(10 Pt 2): 92S-95S.
- Rave, N., R. Crkvenjakov, et al. (1979). "Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzoyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels." Nucleic Acids Res **6**(11): 3559-67.

- Rezaie-Majd, A., T. Maca, et al. (2002). "Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(7): 1194-9.
- Rice-Evans, C. and K. R. Bruckdorfer (1992). "Free radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction." Mol Aspects Med **13**(1): 1-111.
- Rice-Evans, C. and R. Burdon (1993). "Free radical-lipid interactions and their pathological consequences." Prog Lipid Res **32**(1): 71-110.
- Ridker, P. M., N. Rifai, et al. (2001). "Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events." N Engl J Med **344**(26): 1959-65.
- Rikitake, Y., S. Kawashima, et al. (2001). "Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits." Atherosclerosis **154**(1): 87-96.
- Ross, R. (1986). "The pathogenesis of atherosclerosis--an update." N Engl J Med **314**(8): 488-500.
- Roth, B. D. (2002). "The discovery and development of atorvastatin, a potent novel hypolipidemic agent." Prog Med Chem **40**: 1-22.
- Ryter, S. W., S. Xi, et al. (2002). "Mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway regulates heme oxygenase-1 gene expression by hypoxia in vascular cells." Antioxid Redox Signal **4**(4): 587-92.
- Sacks, F. M., M. A. Pfeffer, et al. (1996). "The Effect of Pravastatin on Coronary Events after Myocardial Infarction in Patients with Average Cholesterol Levels10.1056/NEJM199610033351401." N Engl J Med **335**(14): 1001-1009.
- Schacter, B. A. (1978). "Assay of microsomal heme oxygenase in liver and spleen." Methods Enzymol **52**: 367-72.
- Shibahara, S., R. Muller, et al. (1985). "Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7865-9.
- Sikorski, E. M., T. Hock, et al. (2004). "The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury." Am J Physiol Renal Physiol **286**(3): F425-41.
- Soares, M. P., Y. Lin, et al. (1998). "Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival." Nat Med **4**(9): 1073-7.
- Sparks, D. L., M. N. Sabbagh, et al. (2005). "Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results." Arch Neurol **62**(5): 753-7.
- Staal, A., J. C. Frith, et al. (2003). "The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity." J Bone Miner Res **18**(1): 88-96.
- Stocker, R., Y. Yamamoto, et al. (1987). "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance." Science **235**(4792): 1043-6.
- Stoll, L. L., M. L. McCormick, et al. (2004). "Antioxidant effects of statins." Drugs Today (Barc) **40**(12): 975-90.
- Stuve, O., T. Prod'homme, et al. (2004). "Statins as potential therapeutic agents in multiple sclerosis." Curr Neurol Neurosci Rep **4**(3): 237-44.

- Sukhova, G. K., J. K. Williams, et al. (2002). "Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(9): 1452-8.
- Suttner, D. M. and P. A. Dennery (1999). "Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron." Faseb J **13**(13): 1800-9.
- Tarpey, M. M., C. R. White, et al. (1999). "Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation." Circ Res **84**(10): 1203-11.
- Tenhunen, R., H. S. Marver, et al. (1968). "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase." Proc Natl Acad Sci U S A **61**(2): 748-55.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1992). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979." Biotechnology **24**: 145-9.
- Umetani, N., Y. Kanayama, et al. (1996). "Lovastatin inhibits gene expression of type-I scavenger receptor in THP-1 human macrophages." Biochim Biophys Acta **1303**(3): 199-206.
- Vasquez-Vivar, J., N. Hogg, et al. (1997). "Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study." FEBS Lett **403**(2): 127-30.
- Vaughan, C. J. (2003). "Prevention of stroke and dementia with statins: Effects beyond lipid lowering." Am J Cardiol **91**(4A): 23B-29B.
- Vaughan, C. J., A. M. Gotto, Jr., et al. (2000). "The evolving role of statins in the management of atherosclerosis." J Am Coll Cardiol **35**(1): 1-10.
- Vitek, L., M. Jirsa, et al. (2002). "Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels." Atherosclerosis **160**(2): 449-56.
- Vitek, L., L. Novotny, et al. (2006). "The inverse association of elevated serum bilirubin levels with subclinical carotid atherosclerosis." Cerebrovasc Dis **21**(5-6): 408-14.
- Walter, D. H., A. M. Zeiher, et al. (2004). "Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells." Coron Artery Dis **15**(5): 235-42.
- Wang, X., H. Tokuda, et al. (2003). "Mechanism of simvastatin on induction of heat shock protein in osteoblasts." Arch Biochem Biophys **415**(1): 6-13.
- Wassmann, S., U. Laufs, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species." Hypertension **37**(6): 1450-7.
- Wassmann, S., U. Laufs, et al. (2002). "Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(2): 300-5.
- Weitz-Schmidt, G. (2002). "Statins as anti-inflammatory agents." Trends Pharmacol Sci **23**(10): 482-6.
- Weitz-Schmidt, G., K. Welzenbach, et al. (2001). "Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site." Nat Med **7**(6): 687-92.

- Weng, Y. H., G. Yang, et al. (2003). "Interaction between heme oxygenase-1 and -2 proteins." *J Biol Chem* **278**(51): 50999-1005.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* **79**(1): 143-80.
- Windler, E. (1994). "[Hypocholesterolemia]." *Dtsch Med Wochenschr* **119**(48): 1677.
- WOSCOPS (1998). "Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS)." *Circulation* **97**(15): 1440-5.
- Yachie, A., Y. Niida, et al. (1999). "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency." *J. Clin. Invest.* **103**(1): 129-135.
- Yano, M., T. Matsumura, et al. (2007). "Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages." *Circ Res* **100**(10): 1442-51.
- Yasuhara, M., K. Suzumura, et al. (2000). "Fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, protects LDL from oxidative modification in hypercholesterolemic rabbits." *Biol Pharm Bull* **23**(5): 570-4.
- Yildirim, A. and H. Muderrisoglu (2004). "Non-lipid effects of statins: emerging new indications." *Curr Vasc Pharmacol* **2**(4): 309-18.
- Yoshida, T., K. Ishikawa, et al. (1991). "Degradation of heme by a soluble peptide of heme oxygenase obtained from rat liver microsomes by mild trypsinization." *Eur J Biochem* **199**(3): 729-33.

8 Veröffentlichungen

8.1 Originalarbeiten

Polte T, Hemmerle A, Berndt G, Grosser N, Abate A, Schroder H (2002). "Atrial natriuretic peptide reduces cyclosporin toxicity in renal cells: role of cGMP and heme oxygenase-1." Free Radic Biol Med **32**(1): 56-63.

Oberle S, Abate A, Grosser N, Hemmerle A, Vreman HJ, Dennery PA, Schneider HA, Stalleicken D, Schroder H (2003). "Endothelial protection by pentaerythryl trinitrate: bilirubin and carbon monoxide as possible mediators." Exp Biol Med (Maywood) **228**(5): 529-34.

Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Hinkelmann U, Smith G, Schroder H (2004). "Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1." Biochem Biophys Res Commun **325**(3): 871-6.

Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, Erdmann K, Hinkelmann U, Schurgerc S, Wijayanti N, Immenschuh S, Schroder H (2004). "The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells." Free Radic Biol Med **37**(12): 2064-71.

Grosser N, Oberle S, Berndt G, Erdmann K, Hemmerle A, Schroder H (2004). "Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators." Biochem Biophys Res Commun **314**(2): 351-5.

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

Polte T., Hemmerle A., Grosser N., Abate A., Schröder H. (2001). Atrial natriuretic peptide protects renal cells from cyclosporin toxicity via increased bilirubin formation. Archiv der Pharmazie 334 (Suppl. 2): 61.

Polte T, Hemmerle A, Abate A, Schröder H (2001) Increased formation of bilirubin contributes to atrial natriuretic peptide-induced protection of renal cells from cyclosporin toxicity. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 363 (Suppl):R113

Grosser N, Oberle S, Hemmerle A, Berndt G, Schröder H (2003) Endothelial protection by L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible antioxidant mediators. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 367 (Suppl 1):R16

Grosser N, Hemmerle A, Abate A, Schröder H (2003). Endothelial protection by aspirin: role of nitric oxide and heme oxygenase-1. *J Exp Biol Med* 228:598.

Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, Hinkelmann U, Smith G, Schröder H (2005) The antioxidant defense protein heme oxygenase-1 is a novel target site for rosuvastatin in endothelial cells. *Int J Clin Pract*

Hinkelmann U, Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Smith G, Schröder H (2005). Rosuvastatin increases heme oxygenase-1 expression and antioxidant activity in endothelial cells. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 371 (Suppl 1):R13

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

Grosser N, Hemmerle A, Erdmann K, Hinkelmann U, Wijayanti N, Immenschuh S, Smith G, Schröder H (2005) Heme oxygenase-1 and ferritin induction by rosuvastatin: a protective antioxidant stratagem in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:e69

Hinkelmann U, Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Oberle-Plümpe S, Smith G, Schröder H (2005) Antioxidant actions of rosuvastatin: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. www.ho-conference.org, Boston, October 6-9

Grosser N, Hinkelmann U, Hemmerle A, Erdmann K, Berndt G, Schürger S, Wijayanti N, Immenschuh S, Schröder H (2005) Heme oxygenase-1 as target and mediator of pleiotropic statin actions. www.ho-conference.org, Boston, October 6-9

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

9 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer, Prof. Henning Schröder, für die Überlassung dieses interessanten Themas. Er ließ mir bei allen Dingen viel Raum für die Entwicklung eigener Ideen und deren Umsetzung.

Besonders danke ich Frau Dr. Nina Großer ohne deren großartige und geduldige Unterstützung die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie war während der langen Zeit des Schreibens immer wieder für mich da und hat mit der kritischen Durchsicht des Manuskripts entscheidend zum Gelingen beigetragen. Ohne Ihr Engagement nach dem Weggang von Prof. Schröder wäre die Vollendung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Dr. Georg Berndt danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen konstruktiven Stunden im Isotopenlabor. Auch kleine Rückschläge wurden dank Georg schnell vergessen.

Für die vielen interessanten Diskussionen und die herzliche Atmosphäre danke ich Dr. Aida Abate und Dr. Stephanie Oberle-Plümpe.

PD Dr. Stephan Immenschuh und Dr. N. Wijayanti danke ich für die gute Kooperation bei den Promotorstudien.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Marwin und meinen Kindern Emma und Lukas. Sie haben mir immer wieder Mut gemacht und mir viel Freiraum zum Arbeiten gegeben. In schwierigen Phasen haben sie mich so wunderbar unterstützt. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Ein ganz großes Dankeschön gilt meiner Mutter, die in allen Lebenslagen für mich da ist und sich immer wieder liebevoll um Emma und Lukas gekümmert hat, damit ich arbeiten kann.

Auch bei allen Anderen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben möchte ich mich für die Unterstützung und Hilfe bedanken.

Erklärung

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

Jena, den 04.11.2009

Anke Hemmerle-Kock

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Anke Hemmerle-Kock (geb. Hemmerle)
Geburtsdatum: 06.09.1975
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung:

1982 – 1986 St. Georg-Grundschule, Hüthum
1986 – 1995 Städt. Willibrord-Gymnasium, Emmerich
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/1995 – 09/1999 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
08/1997 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
09/1999 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/2000 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/2000 Erteilung der Approbation

Praktisches Jahr:

10/1999 – 03/2000 August-Bebel-Apotheke, Halle (Saale)
04/2000 – 09/2000 Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und
Toxikologie, MLU Halle-Wittenberg

Wissenschaftlicher Werdegang:

10/2000 – 01/2003 Doktorandin am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmakologie
und Toxikologie, MLU Halle-Wittenberg
04/2000 – 05/2002 Stipendiatin der Graduiertenförderung des Landes
Sachsen-Anhalt

Berufliche Weiterentwicklung:

01/2003 – 12/2005 Elternzeit
01/2006 – 09/2008 Angestellte Apothekerin Campus-Apotheke, Jena
10/2008 – 09/2009 Fertigstellung der Dissertation
10/2009 – bis jetzt Angestellte Apothekerin Apotheke A1, Erfurt