Untersuchungen zur Regulation der Hämoxygenase-1 durch cAMP-abhängige Prostaglandine

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Stephan Schürger

geb. am: 19. Oktober 1978 in Erlangen

Gutachter/in:

- 1. Prof. Dr. W. Sippl, Halle (Saale)
- 2. Prof. Dr. H. Schröder, Minneapolis (USA)
- 3. Prof. Dr. T. Hohlfeld, Düsseldorf

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

Meinen Eltern und meinem Bruder Alex

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 5			
1 EINLEITUNG	7		
1.1Prostaglandine 1.1.1Biochemie der Prostaglandine1.1.1.1Nomenklatur, Struktur und Biosynthese1.1.1.2Prostanoidrezeptoren1.1.1.3Physiologische Funktionen der Prostaglandine1.1.1.4Prostaglandine und Atherosklerose1.1.2Biosynthese, Wirkungen und therapeutischer Einsatz de untersuchten Prostaglandine1.1.2.1Alprostadil (PGE1)1.1.2.2Iloprost (Prostacyclinanalogon)1.1.2.3Prostaglandin F _{2α} (PGF _{2α})1.1.2.415-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (d-PGJ2)	7 7 9 10 11 14 14 16 17 17		
1.2Die Hämoxygenase1.2.1Konstitutive und induzierbare Isoformen der Hämoxygenase1.2.2HO-1-Produkte und Ferritin1.2.3HO-1 als protektives Protein und therapeutische Zielstruktur	19 19 19 21		
 1.3 Genregulation der HO-1 1.3.1 Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden mit Einfluss auf die HO 1-Genregulation 1.3.1.1 Transkriptionsfaktoren 1.3.1.2 Vorgeschaltete Signalkaskaden 1.3.2 Genregulation der HO-1 durch cAMP-abhängige Signalwege ur CREB 	23 23 23 24 id 25		
2 PROBLEMSTELLUNG	27		
3 MATERIAL UND METHODEN	29		
 3.1 Zellkultur 3.1.1 Kultivierung der Endothelzellen 3.1.2 Kultivierung der Makrophagen 3.1.3 Kultivierung der Nierenepithelzellen 3.1.4 Kultivierung der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen 	29 29 29 29 29		
3.2Western-Blot-Analyse3.2.1Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse3.2.2Proteinbestimmung nach Bradford3.2.3SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese3.2.4Proteintransfer durch Western-Blot3.2.5Detektion mit spezifischen Antikörpern	30 30 30 31 31		

3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.3.5 3.3.6 3.3.7	Genreporter-Assay Konstruktion von Reporterplasmiden Transformation von kompetenten Zellen Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA Identifikation durch Restriktionsverdau Transfektion Inkubationsprotokoll zum Genreporter-Assay Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay	32 33 33 33 34 34 34
3.4 3.4.1 3.4.2	Biolumineszenz-Assay Inkubationsprotokoll zur Biolumineszenzmessung Biolumineszenzmessung	35 35 36
3.5 3.5.2 3.5.3 3.5.4 3.5.5 3.5.6 3.5.7 3.5.8	Northern-Blot-Analyse DNA-Sonden Inkubationsprotokoll zur Northern-Blot-Analyse RNA-Isolierung RNA-Gelelektrophorese RNA-Fixierung auf Nylon-Membranen durch Vakuum-Blotting Markierung der DNA-Sonde mit ³² P-Desoxycytidintriphosphat Vor- und Haupthybridisierung Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle	36 37 37 37 37 38 38 38
3.6 3.6.1 3.6.2 3.6.3	Bestimmung der cyclischen Nukleotide Inkubationsprotokoll zur Bestimmung von cAMP/cGMP Probenaufarbeitung Enzymimmunoassay (EIA)	39 39 39 39
3.7 3.7.1 3.7.2 3.7.3	Bestimmung der Hämoxygenase-Aktivität Inkubationsprotokoll zur Aktivitätsmessung Probenaufarbeitung HO-Aktivitätsbestimmung	40 40 40 40
3.8 3.8.1 3.8.2	Bestimmung freier Sauerstoffradikale Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz	42 42 42
3.9	Material	43
3.10 3.10.1 3.10.2 3.10.3 3.10.4	Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien Substanzen Puffer Lösungen Medien	44 44 45 46
3.11	Statistik	46
4 ER	GEBNISSE	47
4.1 4.1.1 4.1.1	Induktion auf translationaler Ebene Konzentrationsabhängige Induktion des HO-1-Proteins 1 Effekt von PGE1	47 47 47

 4.1.1.2 Effekt von lloprost 4.1.1.3 Effekte von weiteren Prostaglandinderivaten 4.1.2 Zeitabhängige Induktion des HO-1-Proteins 4.1.3 Induktion des Ferritinproteins 4.1.4 Zusammenfassung 	49 50 52 53 56
 4.2 Induktion auf transkriptioneller Ebene 4.2.1 Promotorstudien 4.2.1.1 Effekte von PGE₁ auf humane HO-1-Promotorkonstrukte 4.2.1.2 Effekte von PGE₁ auf murine HO-1-Promotorkonstrukte 4.2.1.3 Vergleich der Effekte verschiedener Prostaglandine auf der humanen HO-1-Promotor 4.2.2 Biolumineszenz-Assay 4.2.3 Induktion der HO-1-mRNA 4.2.4 Zusammenfassung 	57 58 59 60 61 62 63
 4.3 Funktionelle Untersuchungen 4.3.1 Effekt von PGE₁ auf die Hämoxygenase-Aktivität 4.3.2 Effekte in einem Modell für oxidativen Stress 4.3.2.1 Einfluss des HO-1-Produkts Bilirubin 4.3.2.2 Antioxidative Eigenschaften von PGE₁ 4.3.3 Zusammenfassung 	64 65 65 66 68
 4.4 Molekulare Mechanismen der HO-1-Induktion durch Prostaglandinderivate 4.4.1 Messung der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP 4.4.1.1 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit PGE₁ 4.4.1.2 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit lloprost 4.4.1.3 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit anderen Prostaglandinderivaten 4.4.1.4 Bestimmung der intrazellulären cGMP-Spiegel nach Stimulation 	69 ۱ 69 1 72 1 73
 mit PGE₁ 4.4.2 Effekt eines cAMP-Analogons auf die HO-1-Induktion 4.4.2.1 Effekt von db-cAMP auf die HO-1-Proteinexpression 4.4.2.2 Effekt von db-cAMP auf die Aktivität des HO-1-Promotors 4.4.3 Einfluss eines Inhibitors der Adenylatcyclase auf die HO-1- Induktion durch PGE₁ 4.4.3.1 Einfluss von DDA auf die PGE₁-induzierte HO-1 Proteinexpression 4.4.3.2 Einfluss von DDA auf die PGE₁-induzierte HO-1- Proteinexpression 4.4.3.4 Einfluss von Proteinkinase-Inhibitoren auf die HO-1-Induktion 	74 75 76 78 78 78 78 80
 4.4.4.1 Einfluss von Proteinkinase-Inhibitoren auf die PGE₁-induzierte HO-1-Promotoraktivität 4.4.4.2 Einfluss eines PKA-Inhibitors auf die PGE₁-induzierte HO-1 Proteinexpression 4.4.5 Beteiligung von CRE an der HO-1-Signalkaskade 4.4.6 Zusammenfassung 	80 - 81 82 83

5	DISKUSSION	85
6	ZUSAMMENFASSUNG	95
7	LITERATURVERZEICHNIS	97
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	118
8.1	Originalarbeiten	118
8.2	In Kurzform publizierte Vorträge und Poster (Abstracts)	118
9	DANKSAGUNG	119

Abkürzungsverzeichnis

α-MSH	α-melanocortin-stimulating-hormon
AA	Arachidonsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Activator protein
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	antioxidant response element
ATP	Adenosintriphosphat
Bbf	B site binding factor
BLI	Biolumineszenz-Imaging
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BVR	Biliverdinreduktase
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	complementary DNA
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CBP	CREB binding protein
CRE	cAMP-response element
CREB	cAMP-response element-binding protein
CRP	C-reaktive Protein
СО	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cox	Cyclooxygenase
db-cAMP	N ⁶ ,2'-O-Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DAG	Diacylglycerol
DDA	2`.3`-Dideoxyadenosin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGLA	Dihomo-y-Linolensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	PGD-Rezeptor
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d-PGJ ₂	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J ₂
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
EP	PGE-Rezeptor
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FP	PGF-Rezeptor
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HO-1	Hämoxygenase-1
IBMX	3-IsobutyI-1-methylxanthin
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP	PGI-Rezeptor
IRE	Iron-responsive element
IRE-BP	Iron-responsive element binding protein

JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kB	Kilobase
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LDL	Low density lipoprotein
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginin-methylester
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MARE	Maf recognition element
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
NF-κB	nuclear factor-κB
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf2	NF-E2-related factor 2
NSAIDs	nichtsteroidale antiphlogistische Analgetika
	1-H-(1 2 4)-Oxadiazol-(4 3a)quinoxalin-1-on
nAV/K	nerinhere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-genufferte Salzlösung
PDF	Phosphodiesterase
	Prostaglandin D ₂
PGE	Prostaglandin E_2 (Alprostadil)
	Prostaglandin C ₁ (Alprostadir)
	Prostaglandin H ₂
	Prostacyclin (Ilonrost)
PGE.	Prostaclandin E ₂
	Phoenhoinositid 3' Kinase
	Phoenbatidylinositol-3.4.5-trinboenbat
	Proteinkinge A
	Proteinkingse A
	Proteinkingse C
PKC	Proteinkingse G
	Proteinkingse G Passiva Lusis Ruffar
	Passive Lysis Duilei Dhonylmathyleylfanylflyarid
	Prienyimetryisunonyinuonu
	Peroxisonie promerator-activateu receptor
	Polotivo light unito
	Relative light units
RUS	reaktive Sauerstonspezies
rpm	Rounds per minute
550	Nathumchiond-Nathumcitrat-Losung
5D5	Natriumiauryisuitat
SDS-PAGE	Natriumiauryisultat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standard error of mean
IAE	Iris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-I etramethyl-ethylendiamin
INF-α	lumornekrosefaktor α
	IXA ₂ -Rezeptor
Iris	Iris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Thromboxan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
VSCM	vascular smooth muscle cells

1 Einleitung

1.1 Prostaglandine

Die Geschichte der Prostaglandine begann 1930, als Kurzrok und Lieb die kontrahierende und relaxierende Wirkung von Samenflüssigkeit auf die glatte Muskulatur des Uterus beobachteten. Die erstmalige Isolierung einer Substanz, die sowohl diese Uterusaktivität als auch eine Blutdrucksenkung zeigte, gelang 1935 von Euler und Goldblatt unabhängig voneinander. Die Bezeichnung Prostaglandin geht auf von Euler zurück, der den Hauptsyntheseort in der Prostatadrüse sah (Vergroesen et al. 1971). Obwohl sich diese Annahme später als falsch erwies, blieb die Bezeichnung dennoch bestehen. Erst etliche Jahre später konnte Bergström die chemische Struktur für 2 Prostaglandine aufklären, welche er nach ihrer Löslichkeit als PGE und PGF bezeichnete (Bergstrom et al. 1962). In den Folgejahren konnten viele weitere Verbindungen identifiziert werden.

1.1.1 Biochemie der Prostaglandine

1.1.1.1 Nomenklatur, Struktur und Biosynthese

Prostaglandine sind mehrfach ungesättigte, zyklische Fettsäuren mit 20 Sie werden aus ungesättigten Fettsäuren Kohlenstoffatomen. mehrfach aus Dihomo-y-Linolensäure enzymatisch gebildet. Dabei entstehen Prostaglandinderivate mit einer Doppelbindung in der Seitenkette, während aus Arachidonsäure (AA) und Eicosapentaensäure Verbindungen mit zwei bzw. drei Doppelbindungen in der Seitenkette entstehen (Weber et al. 1979). Diese Prostaglandin-Präkursorfettsäuren (Abb. 1) liegen gebunden in zellulären Membranen vor und werden durch Phospholipase A₂ und lysosomale Phospholipasen freigesetzt (Vogt 1978).



Abbildung 1: Prostaglandin-Präkursorfettsäuren.

Die freigesetzten Fettsäuren werden durch zwei unterschiedliche Oxygenase-Systeme zu biologisch aktiven Metaboliten verstoffwechselt. Durch eine Aktivierung der Lipoxygenase entstehen Leukotriene und Lipoxine, während die Cyclooxygenase (COX) Prostaglandine, Thromboxane (TX) und Prostacyclin (PGI₂) bildet (Grimminger et al. 1991). Prostaglandine werden nicht im Gewebe gespeichert, sondern auf einen Reiz hin neu synthetisiert. Die einzige Ausnahme bildet dabei die Samenflüssigkeit, in der Prostaglandine gespeichert vorliegen. Die Aktivität des Prostaglandin-Systems wird durch extrazelluläre, hormonale, neurale Reize mechanische sowie durch intrazelluläre und Faktoren wie Ionenkonzentrationen und Enzymaktivitäten beeinflusst (Weber et al. 1979).

Am Beispiel der AA wird in Abb. 2 der weitere Syntheseweg schematisch dargestellt. Die COX katalysiert zwei Reaktionen, die die AA über PGG_2 in PGH_2 überführt. Die entstehenden Endoperoxide sind sehr instabil. Anschließend kann PGH_2 von nachgeschalteten Synthasen zell- bzw. gewebespezifisch zu den verschiedenen Prostaglandinen, PGI_2 und Thromboxan A_2 (TXA₂) umgewandelt werden (Smith et al. 2000). Die Details zu den untersuchten Prostaglandinen werden unter 1.1.2 näher beschrieben.



Abbildung 2: Biosynthese der Prostaglandine.

Die Nomenklatur der Prostaglandine erfolgt nach dem Substitutionsmuster am Cyclopentanring der gemeinsamen Grundstruktur Prostansäure (Abb. 3). Nach der Abkürzung PG werden die Buchstaben A bis J angefügt und die im Molekül enthaltenen Doppelbindungen als Suffix angegeben. Die Buchstaben G und H stehen für die Endoperoxide, der Buchstabe I für das bicyclische Enolethergerüst des Prostacyclins. Der griechische Index bei PGF weist auf die Stereochemie der Hydroxylgruppe an C-9 hin (Nelson 1974).



Abbildung 3: Struktur und Nomenklatur der Prostaglandine.

1.1.1.2 Prostanoidrezeptoren

Bislang sind acht Typen bzw. Subtypen von membranären Prostaglandinrezeptoren bekannt: der PGD-Rezeptor (DP), vier Subtypen des PGE-Rezeptors (EP1, EP2, EP3 und EP4), der PGF-Rezeptor (FP), der PGI-Rezeptor (IP) und der TXA₂-Rezeptor (TP). Alle sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranären Bereichen und werden jeweils von verschiedenen Genen kodiert. Zusätzlich gibt es noch einige Varianten des EP3-, FP- und TP-Typs, welche sich jedoch nur an ihrem C-terminalen Ende unterscheiden (Narumiya et al. 2001).

Tabelle 1 gibt eine kurze Übersicht über die Prostanoidrezeptoren und deren Liganden sowie die entsprechenden Signaltransduktionswege. Während DP, EP2, EP4 und IP zu einem rezeptorvermittelten cAMP-Anstieg führen und als "relaxierende" Rezeptoren bezeichnet werden, bilden TP, FP und EP1 durch eine Ca²⁺-Freisetzung die Gruppe der sogenannten "kontrahierenden" Rezeptoren. EP3 führt zu einer cAMP-Abnahme und wird als "inhibitorischer" Rezeptor bezeichnet. Jedoch können sich diese Effekte durch die Konzentrationen oder die Struktur der Liganden ändern (Narumiya et al. 2001).

Das Derivat d- PGJ_2 (15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2) bildet eine Ausnahme, wie unter 1.1.2.4 näher erläutert wird.

Rezeptortyp	Rezeptorsubtyp	Ligand	Signaltransduktion
DP		PGD ₂	cAMP ↑
EP	EP1	PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2	Ca ²⁺ ↑
	EP2	PGE ₁ , PGE ₂	cAMP ↑
	EP3	PGE ₁ , PGE ₂	cAMP ↑↓
	EP4	PGE ₁ , PGE ₂	cAMP ↑
FP		PGF _{2α}	IP ₃ +Ca ²⁺
IP		PGI ₂ , PGE ₁	cAMP ↑
TP		TXA ₂ , PGH ₂	IP ₃ +Ca ²⁺

 Tabelle 1: Prostaglandinrezeptoren (Coleman et al. 1994; Narumiya et al. 1999).

1.1.1.3 Physiologische Funktionen der Prostaglandine

Das Wirkspektrum der Prostaglandine ist sehr vielfältig. Am besten untersucht sind die Effekte von Prostaglandinen auf Entzündungsreaktionen sowie die Regulierung von Immunreaktionen. Sie sind sowohl an der Entstehung von Fieber (PGE₂) als auch an der Erregung und Sensibilisierung von Schmerzrezeptoren beteiligt (PGE₂, PGI₂) (Davies et al. 1984; Simmons et al. 2004). Abhängig vom Auslöser, dem dominierenden Prostaglandinderivat und den vorherrschenden Prostaglandinrezeptoren können die Prostaglandine proaber auch antiinflammatorische Wirkungen zeigen (Tilley et al. 2001), z.B. kann d-PGJ₂ induzierte Entzündungen aufheben (Gilroy et al. 1999). PGE₂ hemmt sowohl die IL-2- (Interleukin-2) und Interferon-y-Produktion von T-Lymphozyten als auch die (Interleukin-1) und TNF- α -Freisetzung (Tumornekrosefaktor IL-1α) aus Makrophagen. Neben dieser dämpfenden Wirkung auf das Immunsystem zeigt es auch stimulierende Effekte wie z.B. eine Induktion der aber B-Lymphozytendifferenzierung (Simmons et al. 2004).

Die Prostaglandine gehören zu den stärksten bekannten vasoaktiven Substanzen. Das am meisten in Endothelzellen produzierte Eicosanoid ist PGI₂ (Moncada et al. 1976a; Schrör 1985), aber auch PGE₂, PGF_{2a} und weitere Derivate konnten dort gefunden werden. PGE1 und PGI2 haben gefäßerweiternde Eigenschaften, während PGF_{2a} vasokonstriktorisch und PGE₂ sowohl vasodilatierend als auch vasokonstriktorisch wirken kann (FitzGerald et al. 1983). Weiterhin ist die hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation von PGE1 und PGI2 in Blutplättchen bekannt. PGE₂ wirkt in physiologischen Konzentrationen aktivierend, in hohen Dosen jedoch hemmend. Der endogene Aktivator der Thrombozytenaggregation ist TXA₂ und somit der Gegenspieler von PGI₂ in der Regulation der Hämostase (Moncada et al. 1976b).

Im Gastrointestinaltrakt haben PGE₂, PGE₁ und PGI₂ cytoprotektive Effekte auf die Magenschleimhaut. Sie reduzieren die Magensäuresekretion und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und erhöhen sowohl die Schleim- und Bikarbonatausschüttung als auch den Blutfluss (Martin et al. 2006).

Innerhalb der Niere gebildete Prostaglandine (u.a. PGI₂, PGE₂) beeinflussen den renalen Blutfluss, die Reninfreisetzung sowie den Wasser- und Elektrolythaushalt und sind wichtige Modulatoren der renalen Vasopressin-Wirkung (Weber et al. 1979).

In der reproduktiven Physiologie spielt vor allem die uteruskontrahierende Wirkung von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ eine Rolle. Weiterhin sind Prostaglandine auch an der Regulation der Ovulation und an vielen Phasen des Fortpflanzungsprozesses beteiligt (Lippert 1977).

Den Prostaglandinen wird auch bei der Regulation der Kontraktion der glatten Muskulatur eine Funktion zugesprochen. Im Darm kommt es unter Einwirkung von Prostaglandinen der E-Serie zur Kontraktion. In der Lunge wirken PGE_2 und PGI_2 bronchodilatierend, dagegen zeigen $PGF_{2\alpha}$ und PGD_2 kontrahierende Eigenschaften (Simmons et al. 2004).

Wie diese kurze Zusammenstellung zeigt, sind Prostaglandinderivate in den verschiedensten Geweben an einer Vielzahl von physiologischen Wirkungen beteiligt. Im folgenden Kapitel wird näher auf die Bedeutung von Prostaglandinen beim Krankheitsbild der Atherosklerose eingegangen.

1.1.1.4 Prostaglandine und Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Gefäßerkrankung, die durch Einlagerung von Lipiden und eine erhöhte Zellproliferationen in Gefäßen gekennzeichnet ist (Reiss et al. 2006). Es existieren verschiedene Hypothesen zur Entstehung der Atherosklerose. Eine gestörte Wechselwirkung zwischen Gefäßwand, bestehend aus Endothel- und glatten Muskelzellen, und Zellen des strömenden Blutes (Makrophagen, Thrombozyten) wird für die Entstehung und Progression atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen als entscheidend angesehen (Ross 1986). In Folge atherosklerotischer Veränderungen kann es zu Myokardinfarkt, Schlaganfall oder peripherer arterieller Verschlußkrankheit (pAVK) Beteiligung kommen. Die Prostaglandine stehen aufgrund ihrer am Entzündungsgeschehen und ihre Rolle in der Hämostase direkt in Zusammenhang mit solchen Gefäßerkrankungen.

Bereits lange vor der Manifestation atherosklerotischer Erkrankungen ist die Funktion des Endothels gestört. Daraus resultiert eine verminderte Freisetzung von vasodilatierendem NO (Stickstoffmonoxid) und PGI2. Im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion kommt es zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen vasokonstriktorischen Mediatoren (wie z.B. Endothelin-1, Thromboxan) und deren Gegenspielern (NO und PGI₂). Diese beiden Mediatoren sind in der Lage, die Freisetzung von Endothelin-1 zu hemmen (Levin 1995). Die vom intakten Endothel freigesetzten Eicosanoide, wie PGE₂ und PGI₂, verhindern das Eindringen von LDL (low density lipoprotein) in Makrophagen, hemmen die Monozytenadhäsion auf der Endotheloberfläche und haben Einfluss auf die Proliferation der Gefäßmuskelzellen. Dadurch wirken sie proatherosklerotischen Effekten entgegen (Flavahan 1992; Pomerantz et al. 1995). Weiterhin gilt das Prostacyclin als potentester endogener Inhibitor der Plättchenaggregation (Vane et al. 1995). Neben diesen gefäßschützenden Wirkungen von PGI₂ sind die Prostaglandine aber auch am vorherrschenden Entzündungsgeschehen beteiligt. Es gibt sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Prostaglandinderivate (Tilley et al. 2001). Interessant sind in diesem Zusammenhang auch Studien, die zeigen, dass eine Infusion von PGE1 die endotheliale Dysfunktion verbessern kann (Gardinali et al. 2001; Giannattasio et al. 2007). Für das PGI₂-Analogon lloprost konnten in einer anderen Studie ebenfalls protektive Effekte auf das Endothel gezeigt werden (Mazzone et al. 2002).

Oxidativer Stress bzw. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind ebenfalls entscheidend an der Pathogenese von atherosklerotischen Erkrankungen beteiligt. Isoprostane sind eine Familie von isomeren Prostaglandinen, die als Folge einer durch freie Radikale katalysierten Lipidoxidation gebildet werden (Patrono et al. 1997; Reiss et al. 2006). Für das 8-Isoprostan-PGF_{2 α}, welches bei pAVK-Patienten mit erhöhtem Serumspiegel zu finden ist (Mueller et al. 2004), konnte eine Induktion der NADPH-Oxidase (Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat-Oxidase) nachgewiesen werden (Muzaffar et al. 2004). Die NADPH-Oxidase stellt die Hauptquelle der ROS-Bildung in Gefäßen dar (Morita et al. 2005). ROS wiederum führen zur Bildung von Isoprostanen, wodurch sich ein Circulus vitiosus ergibt (Reiss et al. 2006). Infolgedessen kommt es zu einer verringerten Bildung von PGI₂, das normalerweise als Gegenspieler über eine Hemmung der Plättchenaggregation und Leukozytenaktivierung fungiert. Durch die NADPH-Oxidase kommt es zum Ungleichgewicht zwischen 8-Iso-PGF_{2a} und PGI₂, welches wiederum zu oxidativem Stress und Gefäßläsionen führt (Muzaffar et al. 2004). Für das PGI₂-Analogon lloprost konnte jedoch eine Hemmung der NADPH-Oxidase gezeigt werden, wodurch dieser Kreislauf unterbrochen werden kann (Muzaffar et al. 2004). Isoprostane könnten in Zukunft sowohl als Marker zur Diagnose von oxidativem Stress als auch für das Verständnis der Pathogenese der Atherosklerose ein interessantes Ziel sein (Aghajanian et al. 1997).

Abgesehen von einer gestörten Endothelfunktion sowie dem schädigenden Einfluss von ROS zählt eine Dyslipidämie zu den pathogenetischen Risikofaktoren für atherosklerotische Gefäßkrankheiten. Überschüssiges LDL reichert sich in der Gefäßwand an und wird durch freie Radikale oxidiert. Infolge dessen kommt es zur Freisetzung verschiedenster Mediatoren, unter deren Einfluss zirkulierende Monozyten angelockt und zu Makrophagen ausdifferenziert werden. Diese Makrophagen nehmen das oxidierte LDL auf und entwickeln sich zu so genannten Schaumzellen ("foam cells"). Eine Anreicherung dieser Schaumzellen in den glatten Muskelzellen erzeugt die ersten sichtbaren Läsionen der Gefäßwand, sogenannte Fettstreifen ("fatty streaks"). Letztlich kommt es aufgrund dessen zur Bildung von atherosklerotischen Plagues (Lusis 2000; Reiss et al. 2006). Eine Dyslipidämie beeinflusst auch die Prostaglandinwirkungen. Es konnte gezeigt werden, dass modifiziertes LDL die Empfindlichkeit der Monozyten gegenüber den Prostaglandinen (PGE₁, PGI₂ und PGE₂) herabsetzt und dadurch zu einem erniedrigten cAMP-Spiegel führt (Li et al. 1997). Weiterhin wurde für HDL (high density lipoprotein), im Gegensatz zu LDL, eine vermehrte endogene PGI2-Bildung gefunden (Vinals et al. 1997). Da bei der Dyslipidämie jedoch die HDL-Spiegel erniedrigt sind, fehlt hier der gefäßschützende Effekt von PGI₂.

Eine Diät, die reich an bestimmten ungesättigten Fettsäuren ist, kann die Produktion der verschiedenen Prostaglandinderivate beeinflussen (Belch et al. 2000). So führte eine Gabe von γ -Linolensäure bei Mäusen zu einer gesteigerten PGE₁-Synthese (Fan et al. 1992; Fan et al. 1997). Die von der AA abstammenden Prostaglandine spielen eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen, autoimmunen und atherothrombotischen Krankheiten, dagegen konnten für das von der Dihomo- γ -Linolensäure abstammende PGE₁ antiinflammatorische und gefäßerweiternde Eigenschaften nachgewiesen werden (Levin et al. 2002). In einigen Studien konnte durch eine Veränderung des Nahrungsgehalts an ungesättigten Fettsäuren bzw. durch deren gezielte Supplementierung eine Verbesserung von verschiedenen entzündlichen Krankheiten erzielt werden (Belch et al. 2000). Einige der Wirkungen von PGE₁ konnten *in vivo* ebenfalls durch Gabe seiner Vorstufen γ -Linolensäure oder Dihomo- γ -Linolensäure erzielt werden. So zeigten beide Vorstufen in Tiermodellen eine antiinflammatorische und gewebeschützende Wirkung (Zurier 1982). Weiterhin konnte eine Hemmung der Proliferation von Gefäßmuskelzellen beobachtet werden (Fan et al. 1997). Beim Menschen wurde ebenfalls ein antiinflammatorischer Effekt gefunden, der über eine Hemmung der Leukotrien-Synthese in Neutrophilen erklärt wurde (Johnson et al. 1997). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch bisher nicht bekannt, da keine Anreicherung dieser PGE₁-Vorstufen in den Membranen beobachtet werden konnte (Levin et al. 2002).

Neben diesen antiinflammatorischen Effekten wurden in verschiedenen Untersuchungen auch andere protektive Wirkungen von PGE_1 beobachtet. PGE_1 konnte vor einem Ischämie-Reperfusionsschaden in den unteren Extremitäten bei der Behandlung des akuten Aortensyndroms (Sako et al. 2006) schützen. Eine Aktivierung der Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4 kann neuronale Zellen vor Schäden durch β -Amyloid-Peptid-vermittelte Radikalbildung schützen (Echeverria et al. 2005). PGE₁ bindet ebenfalls an diesen Rezeptoren. Über den EP2-Rezeptor können außerdem anti-apoptoische Effekte der Prostaglandine vermittelt werden (Sugiura et al. 2007).

Aufgrund dieser vielfältigen Verknüpfungen mit dem Krankheitsbild der Atherosklerose ist der Einsatz von Prostaglandinen zur Behandlung verschiedener vaskulärer Erkrankungen, wie z.B. der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), ein wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt (Reiss et al. 2006).

1.1.2 Biosynthese, Wirkungen und therapeutischer Einsatz der untersuchten Prostaglandine

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu den vasodilatierend wirkenden PGE_1 und Iloprost sowie dem vasokonstriktorisch wirkenden $PGF_{2\alpha}$ und dem therapeutisch nicht genutzten d-PGJ₂ durchgeführt (Tab. 2). Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit wurde jedoch auf das PGE_1 gerichtet.



 Tabelle 2: Eingesetze Prostaglandinderivate.

1.1.2.1 Alprostadil (PGE₁)

PGE₁ wurde zu Beginn der 60er Jahre von Bergstroem und Mitarbeitern (Bergstroem et al. 1963) entdeckt. Die Biosynthese erfolgt aus Dihomo-y-Linolensäure (DGLA). DGLA wird analog zur AA durch Cyclooxygenierung in PGH₁ überführt (Bergstroem et al. 1964; Van et al. 1964; Samuelsson 1965). Die gebildeten Endoperoxide PGG₁ initial und PGH₁ werden durch eine Prostaglandin-Endoperoxid-PGE₁-Isomerase schließlich in PGE₁ überführt (Samuelsson et al. 1978). Diese PGE1-Synthese konnte in vielen Geweben des Menschen nachgewiesen werden (Karim et al. 1967; Whorton et al. 1979). Während zunächst nur die Vasodilatation und eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion als Wirkeigenschaften des PGE₁ betrachtet wurden, haben neuere Untersuchungen ein differenzierteres pharmakologisches Wirkprofil ergeben. Einen Überblick über die vielfältigen Wirkungen von PGE1 soll die nachfolgende, nicht vollständige Aufzählung in Tabelle 3 geben:

Wirkung auf	Beispiele
Gefäße	Neben der Vasodilatation (Bergstrom et al. 1968; Wilkens et al. 1987) konnte eine Hemmung der Proliferation und Mitoseaktivität der glatten Muskulatur der Gefäßwand beobachtet werden (Dembinska-Kiec et al. 1980; Sinzinger 1986).
Fibrinolyse	Im Gegensatz zur Blutgerinnung (Duboff et al. 1974) wird die Fibrinolyse durch PGE ₁ aktiviert (Crutchley et al. 1982).
Thrombozyten	PGE ₁ ist ein Inhibitor der Thrombozytenaktivierung (Bousser et al. 1972) und hemmt die Synthese von Thromboxan sowie weiterer Faktoren (Schrör et al. 1987; Fitscha et al. 1988).
Erythrozyten	Senkung der Blutviskosität durch erhöhte Verformbarkeit der Erythrozyten (Kury et al. 1974) und verminderte Erythrozytenaggregation beim Menschen (Rudofsky 1986).
neutrophile Granulozyten	Durch die Hemmung der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten kommt es zu einer verminderten Sekretion toxischer Stoffwechselprodukte (u.a. Superoxidanionen, LTB ₄) (Ham et al. 1983; Schrör et al. 1987; Hecker et al. 1990).
Lipidstoffwechsel	PGE ₁ hemmt die Induktion der LDL-Rezeptoraktivität sowie die Akkumulation von LDL und dessen Abbau (Krone et al. 1985; Sinzinger et al. 1991).
Stoffwechsel	Hemmung der katecholamininduzierten Lipolyse (Steinberg et al. 1963; Weeks et al. 1969), Beeinflussung des Glucosestoffwechsels (Leighton et al. 1985).
Magen	Steigerung der Mucus- und Hydrogencarbonatsekretion und Verminderung der Säurebildung (Dajani et al. 1989).

Tabelle 3: Übersicht über die Wirkungen von Alprostadil.

Alprostadil (Prostavasin®) wird zur Behandlung der pAVK im Stadium III und IV nach Fontaine eingesetzt. Die anti-ischämische Wirkung ist wahrscheinlich sehr komplex und nicht limitiert auf eine direkte vasodilatierende Wirkung von PGE1. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Wirkungen auf Blutfluss, Blutviskosität, Fibrinolvse. Plättchenaggregation und antiinflammatorischen der Neutrophilenhemmung, scheinen auch die Ergebnisse neuerer Studien zu der anti-ischämischen Wirkung beizutragen. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass PGE₁ auch die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Freisetzung von inflammatorischen Zvtokinen sowie Bildung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren hemmt (Schrör et al. 2004). Im Prostavasin® liegt ein Komplex aus Alprostadil (PGE₁) und Alfadex (α-Cyclodextrin) vor, der bei der Herstellung der Infusionslösung in seine Bestandteile dissoziiert. Die Pharmakokinetik der beiden Substanzen ist somit unabhängig von der

Komplexbildung im Lyophilisat (Schipper et al. 2005).

Weiterhin wird Alprostadil (Minprog®) zur zeitweiligen Aufrechterhaltung des *Ductus Arteriosus Botalli* bei Neugeborenen mit angeborenem Herzfehler angewendet (van der Sijp et al. 1985). PGE₁ ist außerdem zugelassen zur symptomatischen Behandlung der erektilen Dysfunktion (Muse®). In Deutschland wird das PGE₁-Analogon Misoprostol zur Schleimhautprotektion heute nur noch in Kombination mit dem nichtsteroidalen antiphlogistischen Analgetikum (NSAID) Diclofenac (Arthotec®) vertrieben.

Neben den therapeutisch genutzten Wirkungen zeigt Alprostadil noch eine Reihe weiterer interessanter Effekte. Verschiedene Studien konnten zum Beispiel antioxidative Eigenschaften von PGE₁ zeigen. So reduzierte eine Vorbehandlung mit PGE₁ z.B. die H₂O₂-induzierte Toxizität in retinalen Pigmentepithelzellen (Yamamoto et al. 1997).

Interessant ist auch der Metabolismus von PGE₁. PGE₁ wird nach der i.v.-Gabe ersten Lungenpassage zu 60-80% metabolisiert. Nach bei der einer enzymatischen Oxidation und anschließender Reduktion entsteht der Hauptmetabolit 15-Keto-13,14-Dihydro-PGE₁. Während dieser Ketometabolit nur geringe pharmakologische Wirkungen zeigt, entsteht anschließend aus dem Hauptmetaboliten eine im Vergleich zu PGE₁ fast ebenso aktive Substanz: 13,14-Dihydro-PGE₁ (PGE₀) (Simmet et al. 1988; Braun et al. 1991; Peskar et al. 1991).

1.1.2.2 Iloprost (Prostacyclinanalogon)

Das 1976 erstmals strukturell identifizierte PGI₂ (Whittaker et al. 1976) entsteht durch das Enzym PGI-Synthase aus PGH₂. Prostacyclin ist das Hauptprodukt des Prostaglandinstoffwechsels im Endothel (Moncada et al. 1976a) und der direkte Gegenspieler des vasokonstriktorischen und thrombozytenaggregierenden TXA₂. In der VIGOR-Studie wurde ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Zwischenfälle unter Therapie mit Cyclooxygenase-2-Hemmern (COX-2-Hemmer) im Vergleich zu nichtselektiven COX-Hemmern festgestellt (Bombardier et al. 2000). Da die COX-1 v.a. für die Synthese von TXA₂ und die COX-2 für die PGI₂-Produktion verantwortlich ist, verschiebt eine selektive COX-2-Inhibition das Verhältnis der beiden Gegenspieler klar zugunsten des Vasokonstriktors und Plättchenaktivators TXA₂ (Belton et al. 2000; Cheng et al. 2002). Dieses gestörte Gleichgewicht ist wahrscheinlich für die beobachteten Zwischenfälle verantwortlich.

Das natürliche Prostacyclin besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit und ist chemisch instabil. Deswegen werden in der klinischen Anwendung bzw. beim experimentellen Arbeiten stabilere Derivate verwendet. Neben dem hier verwendeteten Iloprost (Ilomedin®) gibt es noch ein weiteres Analogon (Cicaprost). Iloprost unterscheidet sich von PGI₂ strukturell dadurch, dass es am C16 eine Methyl-Gruppe trägt, in der 18-, 19-Stellung eine Dreifachbindung aufweist und dass der Enol-Sauerstoff durch eine Methen-Gruppe ersetzt wird. PGI₂ bindet an dem spezifischen IP-Rezeptor und hydrolysiert in wässriger Lösung zu dem inaktiven Metaboliten 6-keto-PGF_{1α} (Schrör 1985).

In seinen Wirkungen zeigt PGI₂ große Ähnlichkeit zu PGE₁, jedoch wird Alprostadil wegen der besseren Steuerbarkeit in der klinischen Anwendung meist bevorzugt (Marasini et al. 2004). Iloprost wird nicht sofort abgebaut und erreicht dadurch höhere Plasmaspiegel. Es wirkt weiterhin stärker plättchenaggregationshemmend und vasodilatierend als PGE₁. Im Gegensatz zu PGE₁ kommt es jedoch nicht zur Hemmung der Neutrophilenaktivierung und dadurch zu keiner Inhibition der Freisetzung von Sauerstoffradikalen und lysosomalen Enzymen (Fantone et al. 1981; Ney et al. 1989; Schultze 1990). In Deutschland ist Ilomedin® für die Behandlung der schweren *Thrombangiitis obliterans*, einer entzündlichen Form der arteriellen Verschlusskrankheit mit hohem Amputationsrisiko, zugelassen. Seit September 2003 ist mit Ventavis® auch ein inhalatives Iloprost zur Behandlung der primären pulmonalen Hypertonie zugelassen.

1.1.2.3 Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF_{2 α})

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Prostaglandinderivaten wirkt das $PGF_{2\alpha}$ vasokonstriktorisch auf glatte Muskelzellen. $PGF_{2\alpha}$ kann über 2 verschiedene Wege aus PGH_2 gebildet werden: einmal direkt über eine Reduktion von PGH_2 und zum anderen über eine Isomerisierung zu PGE_2 mit anschließender Reduktion zu $PGF_{2\alpha}$ (Weber et al. 1979). $PGF_{2\alpha}$ bindet an den FP-Rezeptor, von dem zwei Isoformen bekannt sind (Narumiya et al. 1999). Therapeutisch eingesetzt wird $PGF_{2\alpha}$ (Dinoprost - Minprostin $F_{2\alpha}$ ®) aufgrund seiner uteruskontrahierenden Wirkung zur Auslösung eines Aborts. Das $PGF_{2\alpha}$ -Derivat Latanoprost (Xalatan®) wird zur Senkung des Augeninnendrucks beim Glaukom eingesetzt (Ishida et al. 2006).

1.1.2.4 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (d-PGJ₂)

Das erst vor wenigen Jahren entdeckte d-PGJ₂ entsteht nicht-enzymatisch durch Dehydrierung aus PGD₂. Es unterscheidet sich von den anderen Prostaglandinen in einigen Punkten. So konnte für dieses Derivat bisher kein spezifisches Syntheseenzym und kein Rezeptor identifiziert werden (Scher et al. 2005). Während die herkömmlichen Prostaglandine an spezifischen Prostanoidrezeptoren der Zelloberfläche binden, müssen die PGD₂-Metaboliten über einen aktiven, spezifischen Transporter in den Zellkern transportiert werden und binden dort an Zellkernrezeptoren (Narumiya et al. 1987). Therapeutisch eingesetzt wird dieses Derivat bisher nicht, jedoch zeigt d-PGJ₂ einige interessante Wirkungen, auf die hier kurz eingegangen werden soll.

Am besten untersucht sind die Effekte von d-PGJ₂ auf den intrazellulären peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). Von diesem Zellkern-Rezeptor sind inzwischen mehrere Typen nachgewiesen worden. PPARs sind Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression verschiedenster Enzyme beeinflussen können. d-PGJ₂ wird als PPAR_v-Ligand (Nosjean et al. 2002; Ide et al. 2003) und sogar als möglicher endogener Aktivator beschrieben (Cippitelli et al. 2003). Andere Effekte des d-PGJ₂ sind jedoch unabhängig von PPAR_v und werden zum Teil über eine Hemmung von nuclear factor KB (NF-KB) oder über den Signalweg der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) vermittelt (Scher et al. 2005).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass d-PGJ₂ eine Vielzahl von zellulären Prozessen beeinflussen kann (Berry et al. 2005). In Makrophagen zeigt d-PGJ₂ antiinflammatorische Effekte über eine Sekretionshemmung verschiedenster Mediatoren, wie z.B. IL-6 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) (Ricote et al. 1998). Andere Studien zeigten Effekte auf die Zellproliferation (Chinery et al. 1999) oder Zelldifferenzierung (Forman et al. 1995). Auch wurden antivirale und antitumorale Eigenschaften beschrieben (Gong et al. 2002).

Für diese Arbeit aber von größtem Interesse waren Studien, die zeigen konnten, dass d-PGJ₂ die antioxidative und cytoprotektive Hämoxygenase-1 (HO-1)

induzieren kann (Lee et al. 2003; Zhuang et al. 2003). Über den zugrunde liegenden Mechanismus der HO-1-Induktion wird jedoch noch kontrovers diskutiert.

1.2 Die Hämoxygenase

Als zelluläre Antwort auf oxidativen Stress erfolgt eine transkriptionelle Aktivierung von Genen, deren Produkte als zellprotektive Proteine antioxidative Stoffwechselleistungen erbringen. Ein Überschuss an freiem Häm, welcher unter diesen Bedingungen aus Hämproteinen freigesetzt wird, spielt eine wichtige Rolle, da er die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale begünstigen kann. Einer Induktion des Häm-abbauenden Enzyms HO-1 kommt daher eine zentrale Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress zu (Immenschuh et al. 2000; Takahashi et al. 2004).

1.2.1 Konstitutive und induzierbare Isoformen der Hämoxygenase

Die physiologische Funktion der Hämoxygenase ist die Wiedergewinnung von Eisen aus dem Hämoglobin alternder Erythrocyten sowie der Abbau anderer Hämproteine. Das Enzym katalysiert den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim oxidativen Abbau von freiem Häm zu Biliverdin, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Eisen (Wu et al. 2005).

Die Hämoxygenase wird zu den Monooxygenasen gezählt und in drei bisher bekannte Isoformen unterteilt. Die drei Isoformen werden von verschiedenen Genen kodiert. Die Hämoxygenase-2 (HO-2, 36 kDa) ist eine konstitutive Form, die vor allem im zentralen Nervensystem und im Gefäßsystem, aber auch in anderen Geweben exprimiert wird. Die Bedeutung der Hämoxygenase vom Typ 3 (HO-3, 33 kDa, konstitutiv) ist noch relativ unklar, da sie nur eine geringe katalytische Aktivität zeigt (Ryter et al. 2002). Von größtem Interesse ist jedoch die ubiquitär vorkommende HO-1 (32 kDa), da sie nicht nur durch ihr natürliches Substrat Häm, sondern auch durch eine ganze Reihe strukturell unterschiedlicher Substanzen induziert werden kann (Bach 2005).

1.2.2 HO-1-Produkte und Ferritin

Zusätzlich zum Abbau des prooxidativen und cytotoxischen Häm durch die Hämoxygenase können sowohl die HO-1-Produkte Biliverdin/Bilirubin und Kohlenstoffmonoxid sowie das Eisenspeicherprotein Ferritin zu einer antioxidativen und protektiven Wirkung beitragen (Sikorski et al. 2004).



Abbildung 4: Schematische Darstellung des Abbaus der Häm-Gruppe und Wirkungen der HO-1-Produkte.

CO wurde in den letzten Jahren als wichtiger zellulärer Botenstoff wahrgenommen, der eine Vielzahl an Effekten ähnlich dem NO erfüllt. Seine physiologischen Effekte lassen sich über drei verschiedene Signalwege erklären (Slebos et al. 2003). Die gefäßerweiternde. plättchenund proliferationshemmende Wirkung erfolgt über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und einer vermehrten cGMP-Bildung (Morita et al. 1997; Cardell et al. 1998; Fujita et al. 2001). Eine Vasodilatation erfolgt möglicherweise auch über eine direkte Bindung von CO an Calcium-abhängige Kaliumkanäle (Wang et al. 1997). Die antiinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften entfaltet CO über eine Hemmung der Expression von proinflammatorischen Cytokinen (Otterbein et al. 2000a). Über eine mögliche Wechselwirkung mit anderen Hämproteinen (z.B. NADPH-Oxidase, iNOS (inducible nitric oxide synthase) oder COX) als drittem Weg herrscht bislang noch Unklarheit (Slebos et al. 2003). In vivo erwies sich CO als protektiv u.a. gegenüber Lungenschädigungen durch Hyperoxie (Otterbein et al. 1999) und gegenüber atherosklerotischen Läsionen nach Organtransplantationen (Otterbein et al. 2003).

Das HO-1-Produkt Biliverdin, das bereits leichte antioxidative Eigenschaften aufweist, wird sofort durch die Biliverdinreduktase (BVR) in Bilirubin umgewandelt (Sheftel et al. 2007). Bilirubin ist in physiologischen Konzentrationen ein starkes endogenes Antioxidans, welches reaktive Sauerstoffradikale neutralisiert und die Lipidperoxidation hemmt. Dies konnte sowohl für die freie als auch für die an Albumin gebundene Form gezeigt werden (Stocker et al. 1987a; Stocker et al. 1987b). In verschiedenen Studien wurde *in vivo* ein protektiver Effekt für Bilirubin gefunden. Im Tiermodell schützte ein erhöhter Bilirubin-Plasmaspiegel vor Hyperoxie-vermittelter oxidativer Schädigung (Dennery et al. 1995). Ebenso zeigten Patienten mit höheren Bilirubin-Plasmaspiegeln ein geringeres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Schwertner et al. 1994; Hopkins et al. 1996; Mayer 2000). Eine Beteiligung von Bilirubin an Immun- und Entzündungsreaktionen wurde ebenfalls nachgewiesen (Mayer 2000). Interessanterweise scheint die BVR nicht nur an der Synthese von Bilirubin aus Biliverdin, sondern auch an der Regulation der HO-1-Genexpression beteiligt zu sein (Maines 2005).

Die Hämabbau freigesetzten beim Eisenionen induzieren das Eisenspeicherprotein Ferritin. Ferritin ist ein ubiguitäres Protein, was aus 24 leichten und schweren Ketten besteht und bis zu 4500 Eisenatome aufnehmen kann (Harrison et al. 1996). Als Apoferritin bindet es die freien intrazellulären Eisenionen und entzieht somit der Sauerstoffradikalbildung einen essentiellen Katalysator (Balla et al. 1992; Fogg et al. 1999). Die antioxidativen und cytoprotektiven Eigenschaften des Ferritins sind auf diesen Wirkmechanismus zurückzuführen. Die Stimulation der Ferritinexpression in Endothelzellen konnte in verschiedenen Studien vor oxidativer Schädigung schützen (Balla et al. 1992; Oberle et al. 1997; Oberle et al. 1999). An die Induktion der HO-1 ist somit noch die Bildung eines zweiten antioxidativ wirksamen Proteins gekoppelt. Eine Hemmung der HO-1-Induktion inhibiert auch die Ferritinsynthese (Sheftel et al. 2007). Die Ferritinspiegel werden je nach intrazellulärem Eisengehalt über translationale Mechanismen reguliert (Zahringer et al. 1976; Aziz et al. 1986; Balla et al. 2003). In den letzten Jahren zeigten verschiedene Studien jedoch, dass die Ferritinexpression auch auf transkriptioneller Ebene geregelt werden kann. Dabei scheinen unterschiedliche Signalwege eine Rolle zu spielen (Torti et al. 2002), so konnte u.a. eine Beteiligung des Transkriptionsfaktor NF-kB (Pietsch et al. 2003) oder des second messengers cAMP (Bevilacqua et al. 1994; Faniello et al. 2002) nachgewiesen werden. Dies ist vor allem interessant, da beide ebenfalls an der Regulation der HO-1 beteiligt sind.

1.2.3 HO-1 als protektives Protein und therapeutische Zielstruktur

Die biologische Bedeutung der HO-1 als protektives Enzym konnte in einer Vielzahl von Studien in unterschiedlichen Geweben (u.a. Leber, Niere) gezeigt werden (Sikorski et al. 2004; Farombi et al. 2006). Von Interesse für diese Arbeit waren vor allem die Effekte der HO-1 auf vaskuläres Gewebe und ihre Bedeutung in der Pathogenese der Atherosklerose.

Charakteristisch für Atherosklerose und verwandte Gefäßkrankheiten ist eine chronische Entzündung und erhöhter oxidativer Stress, welcher sich durch eine Anreicherung von Makrophagen sowie oxidierter Lipide in den betroffenen Gefäßen äussert (Wu et al. 2006). Eine Beteiligung der HO-1 an der antioxidativen Abwehr solcher atherosklerotischer Veränderungen konnte in mehreren Studien gezeigt werden. So führte eine erhöhte HO-1-Expression in Makrophagen zu einer verminderten NADPH-Oxidase-Aktivität, einem wichtigen Enzym bei der Entstehung von ROS (Taille et al. 2004). Weiterhin führte eine Überexpression von HO-1 zu einer verringerten ROS-vermittelten Apoptose in Endothelzellen (Abraham et al. 2003) sowie zu einer Hemmung der LDL-ausgelösten Monozytenwanderung ins Endothel (Ishikawa et al. 1997; Hayashi et al. 1999). Während Wildtypmäuse nach einer Gefäßverletzung mit einem erhöhten ROS-Spiegel, einer vermehrten Bildung inflammatorischer Cytokine und einer Makrophageneinwanderung reagierten, wurden bei Mäusen mit überexprimierter HO-1 diese Veränderungen nicht gefunden (Morita et al. 2005). Mit HO-1defizienten Knockout-Mäusen konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein Verlust der HO-1 zu einer beschleunigten Atherosklerose führt (Yet et al. 2003). Der erste Fall humaner HO-1-Defizienz bestätigte diese Befunde eindrucksvoll. Ein 6jähriger Junge zeigte als klinischen Befund eine Hyperlipidämie mit schwerer

Atherosklerose und Endothelschädigung sowie darüber hinaus Eisenablagerungen in Leber und Niere, starke Wachstumsstörungen, Leuko- und Thrombozytose (Yachie et al. 1999; Kawashima et al. 2002). In einer anderen Studie wurde der Einfluss eines GT-Längen-Polymorphismus im humanen HO-Promotor auf die Stärke der HO-1-Induktion untersucht. Patienten mit einer kürzeren Wiederholung der Dinukleotidsequenz antworten mit einer stärkeren HO-1-Genexpression. Infolgedessen konnte für diese Gruppe ein vermindertes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (Funk et al. 2004; Ono et al. 2004), ein verminderter Blutdruck (Ono et al. 2003) und protektive Effekte nach Transplantationen (Exner et al. 2004) gegenüber den Patienten mit längerer (GT)_n-Sequenz festgestellt werden. Insgesamt sind allerdings noch nicht alle Einzelheiten und Zusammenhänge vollständig aufgeklärt.

Die HO-1 als induzierbares Protein gilt aufgrund ihrer gewebeschützenden Eigenschaften als potentielle Zielstruktur für Strategien zur Prävention von Atherosklerose (Immenschuh et al. 2006). Während die meisten bekannten HO-1-Induktoren wie Hämin oder Schwermetalle aufgrund ihrer toxischen Wirkungen ungeeignet sind, konnte für einige als Arzneimittel eingesetzte Substanzen ebenfalls ein HO-1-induzierender Effekt gezeigt werden. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Aspirin und Statine in Endothelzellen die HO-1-Genexpression induzieren und somit neben ihren bisher bekannten pharmakologischen Wirkungen zusätzliche antioxidative Wirkungen zeigen (Grosser et al. 2003; Grosser et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob therapeutisch eingesetzte Prostaglandinderivate ebenfalls einen HO-1-vermittelten Zusatzeffekt bewirken können.

Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt für eine therapeutische Bedeutung der HO-1 ist die nicht invasive Bestimmung des HO-1-Produkts CO zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs bzw. Therapieerfolgs. CO lässt sich in der Ausatmungsluft bei Frühgeborenen mit Hyperbilirubinämie messen (Stevenson et al. 2001). Auch für andere Krankheiten wie z.B. Asthma bronchiale oder Diabetes mellitus zeigten Studien hierzu erste Erfolge (Horvath et al. 1998; Paredi et al. 1999; Otterbein et al. 2000b; Hayashi et al. 2004). Weiterhin kann eine Bestimmung der HO-1 beim Patienten auch über eine Bestimmung des Bilirubinspiegels oder des HO-1-Proteins mit Hilfe eines ELISA im Serum erfolgen (Schipper et al. 2000).

1.3 Genregulation der HO-1

Die an der Aktivierung des HO-1-Gens beteiligten Signaltransduktionswege sind sehr komplex und bisher nur teilweise aufgeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Regulation des HO-1-Gens meist auf transkriptioneller Ebene stattfindet (Sikorski et al. 2004). Die Induktion der HO-1 durch ihr natürliches Substrat Häm, Stressfaktoren wie Endotoxine, Schwermetalle, UV-Licht, Hydrogenperoxid sowie inflammatorische Zytokine (Otterbein et al. 2000b) und verschiedenster Arzneistoffe wie Rapamycin, Aspirin, NO-Donoren und Statine (Bach 2005; Immenschuh et al. 2006) ist sowohl abhängig vom Zelltyp, der zellulären Umgebung und der Spezies als auch von der Intensität und Dauer der Stimulation (Prawan et al. 2005). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden gegeben werden, die an einer Expression der HO-1 beteiligt sein können.

1.3.1 Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden mit Einfluss auf die HO-1-Genregulation

Die *complementary DNA* (cDNA) des HO-1-Gen konnte sowohl für die Maus (Alam et al. 1994) und den Menschen (Yoshida et al. 1988) als auch für die Ratte (Muller et al. 1987) kloniert und sequenziert werden. Untersuchungen der HO-1-Promotorregion machten deutlich, dass die transkriptionelle Aktivität des HO-1-Gens über verschiedene regulatorische Elemente gesteuert wird (Prawan et al. 2005). Zu diesen regulatorischen Elementen zählen Bindungstellen für NF-ĸB, AP-1/2 (Aktivator-Protein) (Alam et al. 1992; Lavrovsky et al. 1994), Nrf2 (*NF-E2related factor 2*) (Alam et al. 1999; Alam et al. 2000), HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*) (Lee et al. 1997; Jozkowicz et al. 2002), CREB (*cAMP-response elementbinding protein*) und MARE (*Maf recognition element*) (Kronke et al. 2003). Dagegen konnte für ein Hitzeschockelement keine Funktionalität im Menschen nachgewiesen werden, obwohl sich dessen Sequenz ebenfalls im humanen HO-1-Gen wiederfindet (Shibahara et al. 1989).

1.3.1.1 Transkriptionsfaktoren

AP-1 ist ein basisches Proteindimer, das an der DNA Leucin-Zipper-Strukturen ausbildet. In verschiedenen Studien konnte eine Abhängigkeit der HO-1-Induktion von AP-1 gezeigt werden. Die durch Lipopolysaccharid (LPS) und Hypoxie induzierte HO-1-Genexpression in Makrophagen ist AP-1-vermittelt (Camhi et al. 1998; Lee et al. 2000). Auch konnte in humanen Endothelzellen durch eine Hemmung von AP-1 eine verminderte HO-1-Induktion gezeigt werden (Terry et al. 1998). Da eine AP-1-vermittelte HO-1-Induktion durch das antioxidative N-Acetylcystein abgeschwächt wird, scheinen ROS in diesem Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen (Camhi et al. 1998).

An der gleichen Sequenz, an der AP-1 bindet, liegt auch die Bindungsstelle für Nrf2. Diese Sequenz zählt zu den *antioxidant response elements (ARE)*) (Alam et al. 1999). Nrf2 wird eine wichtige Rolle in der Regulation antioxidativer Gene zugeordnet. Eine Beteiligung von Nrf2 an der HO-1-Induktion durch verschiedene

Substanzen wie Häm, Cadmium oder auch d-PGJ₂ konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (Alam et al. 1999; Alam et al. 2003; Kim et al. 2004). Interessant an der Nrf2-Aktivierung ist auch das Zusammenspiel mit *CREB binding protein* (CBP) (Katoh et al. 2001). CBP ist als Coaktivator auch für die CREB-vermittelte HO-1-Transkription wichtig. Auf den Transkriptionsfaktor CREB wird im Abschnitt 1.3.1.3 noch näher eingegangen.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor ist NF-κB, der an der Regulation verschiedenster Gene, die z.B. bei der Immunantwort und bei Entzündungen eine Rolle spielen, beteiligt ist (Alam et al. 2007). Dass eine Aktivierung der Transkription des HO-1-Gens auch durch NF-κB erfolgt, konnte u.a. für die LPS-induzierte HO-1-Expression in Makrophagen gezeigt werden (Wijayanti et al. 2004).

1.3.1.2 Vorgeschaltete Signalkaskaden

Verschiedene intrazelluläre Enzyme sind an der zellulären Signalkaskade beteiligt. Als Antwort auf einen externen Anreiz greifen sie gezielt an Transkriptionsfaktoren an und führen zu einer Regulierung der Genexpression. Unter diesen vorgeschalteten Signalkaskaden spielen für die Regulation der HO-1 vor allem die MAPK eine Rolle. Aber auch über andere Signalwege wie Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und Phosphoinositid-3'-Kinase (PI3K) erfolgt eine Regulierung der HO-1-Genexpression (Prawan et al. 2005).

Die Familie der MAPK hat in den letzten Jahren eine bedeutende Rolle in der Genregulation der HO-1 erlangt (Alam et al. 2007). Diese Gruppe von Proteinkinasen kann noch unterteilt werden in die extrazellulär regulierte Kinase (auch ERK oder p42/p44 genannt), die c-Jun-N-terminale Kinase (bezeichnet als JNK oder stressaktivierte Proteinkinase SAPK) sowie die p38-MAPK. Diese drei Hauptwege können jeweils noch weiter aufgeschlüsselt werden. Eine Signalübertragung erfolat Phosphorylierungsschritte über diverse der verschiedenen an der MAPK-Kaskade beteiligten Module. Die endständige aktivierte MAPK phosphoryliert schließlich das Target (Transkriptionsfaktor) und kann über diesen Weg eine Vielzahl von Genen regulieren (Kyriakis et al. 2001). Während für den Transkriptionsfaktor AP-1 eine direkte Phosphorylierung über die MAPK-Kaskade gezeigt werden konnte (Kyriakis et al. 2001; Yang et al. 2003), erfolgt eine Aktivierung von Nrf2 und NF-kB indirekt über zwischengeschaltete Schritte (Zipper et al. 2003; Shen et al. 2004). Eine Beteiligung von einer oder mehreren MAPK an der HO-1-Induktion konnte in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden (Übersicht in Alam et al. 2007).

Zur Gruppe der PKC gehören verschiedene Enzyme, die sich durch ihre Aktivierbarkeit durch Kofaktoren wie Calcium, Phospholipide (z.B. Phosphatidylserin) und Diacylglycerol (DAG) auszeichnen (Nishizuka 1995). Auch für die PKC konnte eine Beteiligung an der Induktion der HO-1 durch TNF_{α} , IL-1 β und oxidierte Phospholipide in Endothelzellen gezeigt werden (Terry et al. 1998; Kronke et al. 2003). Auf die Rolle der PKA wird unter 1.3.2 eingegangen.

Die PI3K wird über externe Stimuli aktiviert und phosphoryliert die Phosphoinositide. Das gebildete PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) ist wiederum an der Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt, auch Proteinkinase B

(PKB) genannt, beteiligt (Cantley 2002). Der PI3K/Akt Signalweg kontrolliert u.a. intrazelluläre ROS-Spiegel über eine Regulation der HO-1 (Prawan et al. 2005). Für die Simvastatin-induzierte HO-1-Expression konnte mit Hilfe spezifischer Hemmstoffe eine Beteiligung von PI3K/Akt gezeigt werden (Lee et al. 2004). Auch bei der d-PGJ₂-induzierten Aktivierung der HO-1 scheint der Signalweg über PI3K/Akt abzulaufen (Kim et al. 2004; Liu et al. 2004). Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 über PI3K/Akt konnte in einer Studie für die Cadmium-vermittelte HO-1-Induktion gezeigt werden (Nakaso et al. 2003).

Ein Zusammenspiel der einzelnen Signalwege wurde weiterhin in verschiedenen Studien dargestellt (Immenschuh et al. 1998a; Soh et al. 2001; Ryter et al. 2006).

1.3.2 Genregulation der HO-1 durch cAMP-abhängige Signalwege und CREB

Der Transkriptionsfaktor CREB, der ebenfalls an der Regulation des HO-1-Gens beteiligt ist, soll hier näher betrachtet werden. Eine Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel durch eine Vielzahl von Hormonen und anderen extrazellulären Stimuli (u.a. Prostaglandine) führt zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA (Lalli et al. 1994). Die PKA enthält in ihrer inaktiven Form zwei katalytische (k) und zwei regulatorische (r) Untereinheiten. Sobald jedoch cAMP an die jeweilige Bindungsstelle der r-Untereinheit bindet, ändert sich die Konfirmation der r-Strukturen und der k_2r_2 -Komplex dissoziiert. Die freien, katalytisch aktiven k-Untereinheiten wandern in den Nukleus, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren können (Karin et al. 1995).

Die aktivierte PKA beeinflusst auch die Funktion von Transkriptionsfaktoren, die an DNA-Sequenzen der Promotorregion von cAMP-induzierbaren Genen binden. Die meisten dieser Gene enthalten ein oder mehrere CRE (Comb et al. 1986; Montminy al. 1986; Borrelli et al. 1992). Der erste gefundene et Transkriptionsfaktor der an CRE bindet, war das CREB (Hoeffler et al. 1988). CREB wird durch die cAMP-abhängige PKA an Serin-133 phosphoryliert, erfährt eine Konformationsänderung und wird dadurch aktiviert. Anschließend kann er an Genen binden, die CRE-Motive in ihrem Promotorbereich aufweisen (Lalli et al. 1994), und die Expression dieser Gene erhöhen. Zusätzlich werden jedoch einige Kofaktoren wie CBP benötigt (Chrivia et al. 1993).

Solche CRE wurden auch in den HO-1-Promotorregionen verschiedener Spezies gefunden (Muller et al. 1987; Kronke et al. 2003). Anhand der Abbildung 5 ist ersichtlich, dass ein *cAMP-response element* sowohl im humanen als auch im murinen HO-1-Promotor vorhanden ist.



Abbildung 5: Schematische Übersicht der regulatorischen Domänen des murinen und humanen HO-1-Gens (Ryter et al. 2006).

Eine cAMP-vermittelte HO-1-Induktion konnte in Rattenhepatozyten (Immenschuh et al. 1998b), in humanen Endothelzellen (Kronke et al. 2003) und in glatten Gefäßmuskelzellen (Durante et al. 1997) durch verschiedene Substanzen gezeigt werden. Es gibt jedoch auch Studien, die das Gegenteil zeigen (Sardana et al. 1985; Alam et al. 1989). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Prostaglandine eine HO-1-Induktion hervorrufen und ob diese über die Signaltransduktionskaskade cAMP - PKA - CREB - CRE abläuft.

2 Problemstellung

Die pAVK ist durch atherosklerotische Schädigungen der großen Gefäße sowie durch eine gestörte Mikrozirkulation charakterisiert. In der Therapie werden seit vielen Jahren vasoaktive Prostaglandine verwendet. Zahlreiche prospektive randomisierte Studien gegen Placebo oder andere vasoaktive Substanzen dokumentieren die Überlegenheit von PGE₁ bei der inoperablen pAVK im Stadium III und IV (Gruß et al. 2001). Der Wirkmechanismus von Prostaglandinen ist komplex und nicht auf eine gefäßerweiternde Wirkung beschränkt. Zusätzlich zu bekannten Wirkungen auf Blutfluss, Blutviskosität, den Fibrinolvse. Plättchenaggregation und der antiinflammatorischen Neutrophilenhemmung (Schrör et al. 2004) wurden für PGE₁ in verschiedenen Studien direkte cytoprotektive Eigenschaften nachgewiesen. In Untersuchungen am isolierten Schweineherz konnte eine kardioprotektive Wirkung gezeigt werden (Mentz et al. 1988). Ebenso wurden solche Effekte auch in anderen Organen wie der Niere (Sketch et al. 2001) oder der Leber (Sugawara et al. 1998) beschrieben. Weiterhin verbesserte eine Infusion mit Alprostadil die endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit systemischer Sklerose (Giannattasio et al. 2007). Aufgrund dieser gewebeschützenden Eigenschaften, seiner Zulassung zur Behandlung der pAVK und der günstigeren pharmakokinetischen Eigenschaften gegenüber lloprost wurde das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit auf PGE1 gerichtet.

Die beobachteten protektiven Eigenschaften lassen eine mögliche Beteiligung antioxidativer Proteine vermuten. Dies wird durch verschiedene Studien bekräftigt, die für das Prostaglandinderivat d-PGJ₂ einen Einfluss auf die HO-1-Expression zeigen konnten (Koizumi et al. 1995; Zhuang et al. 2003; Kim et al. 2004). Während die Effekte von d-PGJ₂ auf das antioxidativ wirksame HO-1-Protein gut untersucht sind, gibt es für andere Prostaglandinderivate bisher nur sehr wenige Studien, die zum Teil noch widersprüchliche Ergebnisse liefern. So wird PGE₂ von Chen und Mitarbeitern als potentieller Induktor der HO-1 beschrieben wird (Chen et al. 2002a), jedoch zeigte es in anderen Untersuchungen keinen Effekt auf die HO-1-Expression (Koizumi et al. 1995). Auch für die klinisch verwendeten Prostaglandine Alprostadil und lloprost fehlen in dieser Hinsicht aussagekräftige Daten.

Da die bisherigen Studien keine eindeutigen Aussagen erlauben, sollten in der vorliegenden Arbeit die Effekte von therapeutisch genutzten Prostaglandinderivaten, vor allem von PGE₁, auf die Expression der HO-1 in verschiedenen Zellsystemen untersucht werden.

Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

Induzieren Prostaglandinderivate das antioxidative HO-1/Ferritin-System? Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob PGE₁ und andere Prostaglandinderivate die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen steigern können. Diese Untersuchungen sollten darüber Aufschluss geben, ob es sich um einen Gruppeneffekt verschiedener Prostaglandine handelt oder ob nur bestimmte Derivate zu einer Induktion der HO-1 führen. Um eine zellspezifische Reaktion auszuschließen, wurde das Experiment in verschieden Zelltypen durchgeführt.

Mit Hilfe von Genreporter-Assays und der Northern-Blot-Analyse wurden die Effekte auf die HO-1 ebenso auf transkriptioneller Ebene analysiert.

Gekoppelt an die Freisetzung des Häm-Eisens durch die HO-1 ist die Expression von Ferritin. Es sollte daher auch der Effekt von PGE₁ auf die Ferritinsynthese untersucht werden.

Welche funktionellen Auswirkungen hat die Induktion des HO-1/Ferritin-Systems?

Eine Messung der HO-Aktivität sollte aufzeigen, ob es sich bei dem gebildeten Protein um ein katalytisch aktives Enzym handelt. In einem Modell für oxidativen Stress sollte die antioxidative Wirkung von PGE₁ untersucht und mit den Effekten des HO-1-Produkts Bilirubin verglichen werden.

Über welche molekularen Mechanismen wird die HO-1-Expression vermittelt?

Am Beispiel von PGE₁ sollte der Mechanismus der HO-1-Genregulation untersucht werden. PGE₁ wird in der Literatur als potenter Aktivator der Adenylatcyclase beschrieben (Stein et al. 1983; Kirtland 1988). Daher sollte zunächst der intrazelluläre cAMP-Spiegel nach Inkubation mit den verwendeten Substanzen gemessen werden.

In früheren Studien konnte für den *second messenger* cAMP eine Beteiligung an der HO-1-Induktion gezeigt werden (Durante et al. 1997; Immenschuh et al. 1998b; Polte et al. 1998). Außerdem wurden in den HO-1-Promotorsequenzen verschiedenster Spezies CRE identifiziert (Muller et al. 1987; Kronke et al. 2003). Es sollte deshalb die Beteiligung eines cAMP-abhängigen Signalweges an der HO-1-Induktion durch PGE₁ mit Hilfe von unterschiedlichen Inhibitoren auf translationaler und transkriptioneller Ebene untersucht werden. Darüber hinaus sollte im Genreporter-Assay mit Hilfe von Deletionskonstrukten eine Abhängigkeit der HO-1-Induktion vom CRE nachgeprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zelllinien wurden bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.1.1 Kultivierung der Endothelzellen

Als Modell für Untersuchungen am Endothel wurde die humane Endothelzelllinie ECV304 (ECACC 92091712) in den Passagen 3-14 verwendet (Suda et al. 2001). Die Zellen wurden in Medium 199 unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in einem Inkubator kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Als zweite Endothelzelllinie wurden immortalisierte Zellen aus humanen Nabelschnurvenen (EA.hy 926) in den Experimenten verwendet. Die Kultivierung erfolgte in DMEM + Glucose unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage.

3.1.2 Kultivierung der Makrophagen

Als Modell für Untersuchungen an Blutzellen wurde die murine Makrophagenzelllinie J774 verwendet. Die Kultivierung erfolgte in DMEM + Glucose unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage.

3.1.3 Kultivierung der Nierenepithelzellen

Zur Bestimmung der cyclischen Nukleotide wurde zusätzlich die Nierenepithelzelllinie LLC-PK-1 vom Schwein (*porcine kidney epithelial cells*, ATCC CL 101) verwendet. Die Zellen wurden in Ham`s F12 Zellkulturmedium mit 20% DMEM, 15% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

3.1.4 Kultivierung der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen

Für die Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens (BLI) wurden NIH3T3-Zellen verwendet, welche stabil mit einem murinen 15kB HO-1-Reportergenkonstrukt transfiziert sind (Hajdena-Dawson et al. 2003). Die embryonalen Fibroblasten der Maus wurden in DMEM unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

3.2 Western-Blot-Analyse

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

3.2.1 Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse

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

3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

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

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes Natriumlaurylsulfat (SDS) und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da diese zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt (Sambrook 1989).

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

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

3.2.4 Proteintransfer durch Western-Blot

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

3.2.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern

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

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

Antikörper	Inkubationszeit	Lösung	Hersteller
HO-1, primär	2 Stunden	1:1000 in	Axxora,
		25% Blockierungslösung	Grünberg
		und 75% Tris/Tween	
Ferritin, primär	1 Stunde	1:500 in	Sigma,
-		25% Blockierungslösung	Taufkirchen
		und 75% Tris/Tween	
Anti-Kaninchen	30 Minuten	1:5000 (HO-1)	Sigma,
lgG, sekundär		1:2000 (Ferritin)	Taufkirchen
		in Blockierungslösung	

 Tabelle 4: Eingesetzte Antikörper.

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

3.3 Genreporter-Assay

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 "Reportergen" wurde ausgewählt, da sie eine viel höhere Sensivität zeigt als andere "Reportergene" (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).

3.3.1 Konstruktion von Reporterplasmiden

Die verschiedenen Konstrukte für die HO-1-Promotorstudien wurden freundlicherweise von PD Dr. Stephan Immenschuh (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Die Plasmid-DNA lag mit bekannter Konzentration als Lösung vor.

Promotorkonstrukt	Größe	Herkunft	Kontrollplasmid
mHO4045	4,045 kB	Maus	pGL2 basic
hHO4.5luc	4,5 kB	Human	pGL3 basic
hHO4.9luc	4,9 kB	Human	pGL3 basic
hHO4.9luc_M1	4,9 kB	Human	pGL3 basic
hHO3.8luc	3,8 kB	Human	pGL3 basic

 Tabelle 5: HO-1-Promotorkonstrukte.

Die Promotorsequenzen waren in kommerziell erhältliche Plasmide (Promega, Mannheim) kloniert. Die Plasmide enthielten als Reportergen die Luciferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) und zusätzlich ein Resistenzgen gegen Ampicillin (Abbildung 6).


Abbildung 6: Kontrollplasmide (Promega, Mannheim).

3.3.2 Transformation von kompetenten Zellen

Die kompetenten Zellen vom Typ E.coli Stamm DH-5 α wurden auf Eis aufgetaut. Pro Ansatz wurden zu 100 µl Bakteriensuspension 1 bis 5 µl entsprechender Plasmid-DNA pipettiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein so genannter Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 20 Sekunden. Nach erneut zwei Minuten auf Eis wurde 900 µl warmes LB-Medium (Luria-Broth-Medium) zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µl der Bakteriensuspension direkt auf eine Ampicillin-haltige Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurde mit einer sterilen Impföse eine Kolonie aufgenommen und in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert.

3.3.3 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA

Die Ernte der Bakterien erfolgte am nächsten Tag durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C. Die erhaltenen Pellets wurden entweder bei -20°C gelagert oder sofort aufgeschlossen. Mini- und Midipräparation unterschieden sich nur in der Menge der eingesetzten Bakterienkultur und der Menge der verwendeten Lösungen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des HiSpeed Plasmid Midi Isolation Kit der Firma Qiagen (Hilden). Dieses System basiert auf einer modifizierten alkalischen Zelllyse (Birnboim et al. 1979), gefolgt von einer spezifischen DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. Die Isolation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend erfolgte noch eine Konzentrationsbestimmung der vorliegenden Plasmidlösung am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg).

3.3.4 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.

3.3.5 Transfektion

Endothelzellen wurden in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen bis zur 70%-igen Konfluenz kultiviert. Die Transfektion wurde nach der Liposomen-Methode mit dem FuGene6-Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim) durchgeführt. Dabei wurden entsprechend den Herstellerangaben 3 µl FuGene6 und 1,5 µg Promotorplasmid pro Vertiefung eingesetzt. Aus den negativ geladenen Nukleinsäuren und den synthetisch hergestellten, positiv geladenen Liposomen bildet sich ein Komplex, der auf die Zellen gebracht wird und mit der Zellmembran fusioniert. Der Komplexinhalt gelangt dabei durch Endocytose in das Zellinnere.

3.3.6 Inkubationsprotokoll zum Genreporter-Assay

Nach einer 24stündigen Transfektion wurden die Zellen für 6 bis 8 Stunden mit Medium ohne Serum inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen über 18 Stunden mit den angegebenen Substanzen. Bei Hemmstoffexperimenten erfolgte eine Vorbehandlung für 20 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor, bevor die Inkubation mit den Substanzen für 18 Stunden fortgesetzt wurde.

3.3.7 Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit 500 µl *Passive Lysis Buffer* (PLB) (Promega, Mannheim; in einer 1:5 Verdünnung mit *Ultra Pure Water*) pro Well versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das erhaltene Zelllysat wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei 20000 rpm und 4°C zentrifugiert. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 µl des Zelllysat-Überstandes in 100 µl vorgelegtes Luciferase-Assay-Reagenz (Promega, Mannheim) gegeben und in direktem Anschluss im Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold, Bad Wildbach) 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 LuciferyI-AMP, das in einem weiteren Schritt unter Freisetzung von Licht der Wellenlänge 562 nm oxidiert wird (de Wet et al. 1987):

Luciferase + Luciferin + ATP + $Mg^{2+} \leftarrow \rightarrow Luciferase^{-}LuciferyI-AMP + PP_i$

Luciferase Luciferyl-AMP + $O_2 \rightarrow$ Luciferase + Oxyluciferin + AMP + CO_2 + Licht

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 so genannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden. Die so gemessene Luciferase-Aktivität wurde auf den Proteingehalt der Proben normiert.

3.4 Biolumineszenzmessung (BLI)

Mit dem BLI kann man die transkriptionelle Aktivität des zu untersuchenden HO-1-Promotors in lebenden Zellen messen. NIH3T3-Zellen wurden stabil mit einem 15kB HO-1-Promotorkonstrukt, welches die ganze Länge des HO-1-Promotors der Maus und eine Luciferase als Reportergen enthält, transfiziert. Die Aktivität des Proteins, der Luciferase, gilt dabei als Index für die Promotoraktivität des HO-1-Gens und kann nach Zugabe des Substrates Luciferin als Lichtemission gemessen und quantifiziert werden (Alam 1994; Hajdena-Dawson et al. 2003).



Abbildung 7: HO-1-luc15-Konstrukt des murinen HO-1-Gens (Hajdena-Dawson et al. 2003).

DE = distal enhancer, PE = proximal enhancer, P = Promotor, luc = Reportergen

Nach erfolgter Inkubation mit den entsprechenden Substanzen können die entstehenden Lichtquanten direkt als ein Maß für die transkriptionelle Aktivität des HO-1-Promotors gemessen werden. Der Unterschied zum Genreporter-Assay besteht darin, dass hier lebende Zellen vermessen werden können.

Die NIH-3T3-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Christopher H. Contag (Stanford University, Stanford, CA; USA) zur Verfügung gestellt und die Versuche von Frau Apothekerin Stephanie Schulz an der Stanford University (School of Medicine, Department of Pediatrics, Stanford, CA, USA) durchgeführt.

3.4.1 Inkubationsprotokoll BLI

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

3.4.2 Probenaufarbeitung und *in vivo* BLI

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

Luciferin + ATP + $O_2 \xrightarrow{\text{Luciferase}} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Licht$ Mg²⁺

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

3.5 Northern-Blot-Analyse

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

3.5.1 DNA-Sonden

Für die Analyse der HO-1-mRNA wurde ein EcoR I-Hind III-Restriktionsfragment der HO-1-cDNA verwendet, welches freundlicherweise von PD Dr. Stephan Immenschuh (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt wurde (Shibahara et al. 1985; Immenschuh et al. 2003). Aufgrund der hohen Homologie reagiert die cDNA der Ratte auch mit den entsprechenden DNA-Sequenzen der Maus und kann daher für die Northern-Blot-Analyse verwendet werden (Bauer et al. 2003).

Für die Analyse des *House-keeping*-Gens β-Aktin wurde ein kommerzielles Fragment der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet.

Gensonde	Größe	Restriktion
Hämoxygenase-1 rat	883 bp	EcoR I / Hind III
β-Aktin human	450 bp	Nco I / Pst I

 Tabelle 6:
 Verwendete DNA-Sonden.

3.5.2 Inkubationsprotokoll zur Northern-Blot-Analyse

Makrophagen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen über 12 Stunden. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA geerntet und die Pellets bei -80°C gelagert.

3.5.3 RNA-Isolierung

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

3.5.4 RNA-Gelelektrophorese

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

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

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

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

3.5.6 Markierung der DNA-Sonde mit ³²P-Desoxycytidintriphosphat

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

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

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

3.5.7 Vor- und Haupthybridisierung

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

3.5.8 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 (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung) in DEPC-Wasser bei 65°C gewaschen. Im Anschluss folgte eine zweistündige Exposition einer Bildplatte des Fuji *Bio-Imaging Analysers* BAS 1500 (Fujifilm, Japan). Diese aus Europium-Kristallen bestehenden Schirme ermöglichen eine erste Auswertung der markierten Membranen.

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

3.6 Bestimmung der cyclischen Nukleotide

3.6.1 Inkubationsprotokoll zur Bestimmung von cAMP/cGMP

Die jeweils verwendeten Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit 900 µl Medium ohne Serum inkubiert. Das Medium enthielt zusätzlich 500 µM des Phosphodiesterase-Hemmstoffes IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin). Nach 15 min im Trockenschrank bei 37°C wurden die Zellen mit den entsprechenden Prostaglandinderivaten inkubiert und wiederum für 15 min bei 37°C in den Trockenschrank gegeben. Das Endvolumen betrug 1 ml.

3.6.2 Probenaufarbeitung

Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und die Reaktion durch Zugabe von unvergälltem Ethanol (96%) gestoppt (Friedl et al. 1985). Der Alkohol wurde bei 60°C im Trockenschrank vollständig abgedampft. Der Rückstand wurde anschließend in 250 µl Wasser aufgenommen, bei -80°C eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut, um die Zellen zu lysieren und so eine vollständige Freisetzung der cyclischen Nukleotide zu erreichen. Dieser Einfrier-Auftau-Zyklus wurde dreimal durchgeführt. Abschließend wurde kurz zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Durchführung aliquotiert (Hinz et al. 1998).

3.6.3 Enzymimmunoassay (EIA)

Der cAMP-Gehalt der Proben wurde mit einem EIA-Kit von Cayman (Ann Arbor, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt (Pradelles et al. 1989; Maxey 1992). Hierbei handelt es sich um eine kompetitive Bestimmungsmethode. Bei diesem Test sind auf einer 96-well-Mikrotiterplatte spezifische cAMP-Antikörper immobilisiert, um deren limitierte Bindungsstellen freies, aus dem Zellüberstand gewonnenes und an Acetylcholinesterase-gekoppeltes cAMP konkurrieren. Nach Beendigung der Reaktion wurden die ungebundenen Reagenzien ausgewaschen. Die Acetylcholinesterase-Aktivität wurde mit Ellmanns Reagenz bestimmt. Dabei katalysiert das Enzym die Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, deren Extinktion bei 412 nm vermessen werden kann. Die Extinktion ist der Konzentration an freiem cAMP umgekehrt proportional. Eine Kalibrierung erfolgte mittels eines vom Hersteller mitgelieferten Standards (0,05-500 pmol/l).

Die Bestimmung von cGMP (cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat) erfolgte auf gleiche Art und Weise mit einem entsprechenden EIA-Kit von Cayman (Ann Arbor, USA).

3.7 Bestimmung der Hämoxygenase-Aktivität

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

3.7.1 Inkubationsprotokoll zur Aktivitätsmessung

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

3.7.2 Probenaufarbeitung

Die Zellen wurden durch dreimaliges Auftauen (bei 37°C im Wasserbad) und Einfrieren (mit flüssigem Stickstoff) schonend aufgeschlossen. Dadurch wird eine vollständige Freisetzung der Hämoxygenase erreicht. Nach einer 15sekündigen Nachbehandlung im Ultraschallbad wurde der Zellschrott durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C) abgetrennt. Für den Reaktionsansatz wurden 400 µl des Überstandes verwendet. Anschließend folgte eine Proteinbestimmung nach Bradford.

3.7.3 HO-Aktivitätsbestimmung

Als Substrat für die HO wurde Hämin als Analogon des körpereigenen Häms verwendet. Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Glucose-6-phosphat und NADPH stellen ein NADPH-generierendes System dar, welches als Reduktionsmittel beim enzymatischen Abbau des Häms zum Biliverdin wirksam ist. Als Quelle für die Biliverdinreduktase wurde der ultrazentrifugierte Überstand von Rattenlebercytosol verwendet (Erdmann et al. 2005).

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

 Tabelle 7: Reaktionsansatz für die HO-Aktivitätsbestimmung.

Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Um das gebildete Bilirubin zu extrahieren, wurden 800 µl Chloroform zu den Proben gegeben und anschließend stark gevortext. Nach mehrmaliger Zentrifugation (5 Minuten bei 3000 rpm bzw. 5000 rpm, Raumtemperatur) trennt sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase (Motterlini et al. 1996). Die Vermessung der organischen Phase mit dem extrahierten Bilirubin erfolgte am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bei den Wellenlängen 464 nm und 530 nm (Referenzwellenlänge).

Die gebildete Menge an Bilirubin (Extinktionskoeffizient 40 mM⁻¹ cm⁻¹) wurde über die Differenz der Absorptionen bei 464 nm und 530 nm errechnet und auf den Proteingehalt der Proben normiert. Die HO-Aktivität für jede Probe wurde als relative Bilirubinbildung (pro mg Protein und pro Stunde) zur Kontrolle angegeben.

3.8 Bestimmung freier Sauerstoffradikale

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

 $\mathsf{NADPH} + \mathsf{2O}_2 \rightarrow \mathsf{NADP}^{+} + \mathsf{H}^{+} + \mathsf{2O}_2^{+-}$

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

3.8.1 Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung

Die Endothelzellen wurden in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit Medium ohne Serum inkubiert. Zur Bestimmung der genomischen Effekte wurde über 24 Stunden mit den entsprechenden Prostaglandinderivaten vorinkubiert. Zur Ernte wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für eine Minute mit Trypsin/EDTA versetzt. Durch Spülen mit PBS wurden die Zellen von den Zellkulturplatten gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 100 μ M NADPH und 50 μ M Lucigenin für 20 Minuten inkubiert. Die Bestimmung der direkten radikalfangenden Eigenschaften von Alprostadil und Bilirubin erfolgte ohne Vorinkubation durch simultane Zugabe der Substanzen und der Reagenzien zu den resuspendierten Zellen.

3.8.2 Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz

Der Mechanismus für die Entstehung der Chemilumineszenz durch die Reaktion von Lucigenin (Bis-N-methylacridiniumnitrat) mit dem Superoxidradikal wird wie folgt diskutiert:

Luc²⁺ + e⁻ → Luc^{.+}

 $Luc^{+} + O_2^{-} \rightarrow Acridon + Licht$

Das Lucigenin-Kation (Luc²⁺) nimmt zunächst ein Elektron auf und wird zum Radikal reduziert (Luc⁺) 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 (Vasquez-Vivar et al. 1997; Tarpey et al. 1999). Die Photonen können mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt werden. Als Rohdaten erhält man so genannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden. Es wird dabei auf die Kontrolle (Zellen ohne Vorinkubation) normalisiert. Die Messung erfolgte mit dem Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold, Bad Wildbad) entsprechend den Herstellerangaben.

3.9 Material

American Type Culture Collection, Manassas (USA)	J774 (ATCC TIB 67)
Axxora, Lörrach	HO-1-Antikörper, lloprost, NADPH, PGE ₁ , <i>Ultra Pure Water</i>
DIFCO Laboratories, Detroit (USA)	Trypton
European collection of Cell Cultures (ECACC), Wiltshire (UK)	ECV304 (ECACC 92091712)
GE Healthcare, Freiburg	Dextransulfat, ECL Plus Detektionsreagenz, Hyperfilm ECL, Nitrocellulosemembran Hybond-ECL, Nylonmembran Hybond N ⁺ , <i>Quick Spin</i> Säulen
Hartmann Analytic, Braunschweig	³² P-dCTP
IBL, Hamburg	cAMP ELISA Kit, cGMP ELISA Kit
Invitrogen, Karlsruhe	Agarose, DNA-Standard, fetales Kälberserum, Ethidiumbromid, Fisch-DNA, PBS, Penicillin/Streptomycin, SDS, Trypsin/EDTA, Tris, Zellkulturmedien
Merck, Darmstadt	Ethanol, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Methanol, Natriumhydrogenphosphat
Peqlab, Erlangen	Protein-Marker, TriFast-Reagenz
Promega, Mannheim	Luciferase-Assay-System, PLB, pGL3- Vektoren
Qiagen, Hilden	HiSpeed Plasmid Midi Isolation Kit, Plasmid Midi Isolation Kit, Gel Extraction Kit
Roche, Mannheim	FuGene6, <i>Random Primed DNA Labeling</i> <i>Kit</i> , Restriktionsenzyme
Roth, Karlsruhe	Bradford-Reagenz, Chloroform, Coomassie-Brillantblau, DEPC, DMSO, EDTA, Essigsäure, Formaldehyd, Formamid, Glycin, Hefeextrakt, LB-Agar, MOPS, Natriumacetat, Natriumchloid, Natriumcitrat, Natriumhydroxid, Tween 20

Schwarz Pharma, Monheim	Alprostadil
Serva, Heidelberg	Acrylamid
Sigma, Taufkirchen	Ampicillin, APS, Bilirubin, BSA, Cadmiumchlorid, Captopril, Chloramphenicol, Cycloheximid, db-cAMP, 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J ₂ , DDA, DTT, Ferritin-Antikörper, Glucose-6- phosphat, Glucose-6- phosphatdehydrogenase, Glycerol, Hämin, IBMX, KT5720, KT5823, Lucigenin, Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper, PGF _{2α} , PMSF, , SOD, TEMED, Triton-X 100
TSI GmbH, Zeven	Trockenmilchpulver

3.10 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

3.10.1 Substanzen

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

DDA (10 mM), IBMX (50 mM), KT5720 (3,5 mM), KT5823 (4 mM), PGE₁ (10 mM) und PGF_{2 α} (10 mM) wurden als Stammlösungen in DMSO bei -20°C gelagert. Iloprost und d-PGJ₂ lagen als Lösung vor. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

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

3.10.2 Puffer

PBS	138 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 8,1 mM Natriumhydrogenphosphat, 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,3 bei 37°C
MOPS	20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0 bei 37°C
SCC	150 mM Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0 bei 37°C
Tris-Puffer	20 M Tris, pH 7,4 bei 37°C
Tris/Tween-Puffer	0,5% Tween, 20 M Tris, pH 7,4 bei 37°C

TAE-Puffer	40 mM Tris, 1mM EDTA, 0,1% Essigsäure, pH 8,0 bei 37°C
Laufpuffer für DNA-Agarose- Gelelektrophorese	1x TAE
Ladepuffer für RNA-Agarose- Gelelektrophorese	400 μl Formamid, 140 μl Formaldehyd, 80 μl 10x MOPS, 8 μl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)
Laufpuffer für RNA-Agarose- Gelelektrophorese	1x MOPS
Lysispuffer zur Proteinisolation	25 mM Tris, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7,4 bei 37°C, 1 μM PMSF frisch zugeben
Sammelgelpuffer	334 mM Tris, 17 mM SDS, pH 6,8 bei 37°C
Trenngelpuffer	1 M Tris, 17 mM SDS, pH 8,8 bei 37°C
Ladepuffer für SDS-PAGE	100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2% SDS, 20% Glycerol, 2,5 M DDT frisch zugeben
Laufpuffer für SDS-PAGE	50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1% SDS
Transferpuffer für Western Blot	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
PBS-Mg-Puffer	100 mM Kaliumhydrogenphosphat, 4,3 mM Magnesium- chlorid, ph 7,4 bei 37°C

3.10.3 Lösungen

TAE-Agarosegel (0,8%)	8 g/l Agarose in 1x TAE
Formaldehyd-Agarosegel (1%)	10 g/l Agarose, 10% MOPS in DEPC-Wasser, vor dem Gelgießen 17% Formaldehyd zugeben
Hybridisierungslösung für Northern-Blot-Analyse	10% Dextransulfat, 1 M NaCl, 1% SDS in DEPC- Wasser, 100 µg/ml Fisch-DNA frisch zugeben
Sammelgel für SDS-PAGE	5% Acrylamid, 20% Sammelgelpuffer, 1% APS (0,1 g/ml), 0,1% TEMED in bidestilliertem Wasser
Trenngel für SDS-PAGE	15% Acrylamid, 20% Trenngelpuffer, 1% APS (0,1 g/ml), 0,1 % TEMED in bidestilliertem Wasser

Coomassie-Brillantblau- Lösung	2,5 g/l Coomassie-Brillantblau, 10% Essigsäure, 45% Methanol in demineralisiertem Wasser
Entfärber	10% Essigsäure, 45% Methanol in demineralisiertem Wasser
Blockierungslösung	4% fettfreies Trockenmilchpulver in Tris-Puffer

3.10.4 Medien

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

3.11 Statistik

Bei den Messungen zur cAMP-/cGMP-Stimulation, der Promotorstudien, der Chemilumineszenz und der HO-Aktivität sind die Messdaten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (x \pm SEM) von n unabhängigen Experimenten angegeben. Die densitometrischen Daten der Northern- und Western-Blot-Analysen basieren auf n=3-6 unabhängigen Experimenten.

Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurde unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ mittels des t-Tests nach Student für unverbundene Stichproben geprüft. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni`s multipler Vergleichstest angewendet. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit P für $\alpha < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Induktion auf translationaler Ebene

4.1.1 Induktion der HO-1 auf translationaler Ebene

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik wurde untersucht, ob Prostaglandinderivate zu einer verstärkten Synthese des HO-1-Proteins führen. Dazu wurden die verwendeten Zelllinien mit den angegebenen Substanzen für 24 Stunden inkubiert und anschließend eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Als Positivkontrolle diente der HO-1-Induktor Cadmiumchlorid (10 μ M, nicht dargestellt).

4.1.1.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von PGE₁ auf die HO-1-Proteinexpression

Zunächst wurde der Effekt von PGE_1 auf die HO-1-Proteinexpression in der Endothelzelllinie ECV304 untersucht. PGE_1 induzierte die HO-1 ab einer Konzentration von 0,01 µM signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 8). Die maximale Stimulation wurde mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 µM erzielt.



Abbildung 8: Effekt von PGE₁ auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit PGE₁ (10⁻⁵-1 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Weiterhin wurden die Effekte auf eine andere Endothelzelllinie sowie auf zirkulierende Blutzellen, als endothel-unabhäniges Modell untersucht, um eine Zelllinienspezifität auszuschließen. Sowohl in der Endothelzelllinie EA.hy 926 als auch in murinen Makrophagen (J774) führte PGE₁ zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der HO-1-Proteinexpression.

Das Prostaglandinderivat PGE₁ führte ab einer Konzentration von 0,01 μ M zu einer signifikanten Steigerung der HO-1-Proteinexpression in den EA.hy 906. Die absoluten Induktionen waren hier etwas höher als in den ECV304-Zellen. Bei einer Konzentration vom 1 μ M PGE₁ kam es in ECV304-Zellen zu einer 5,2fachen Induktion (Abb. 8), während es in den EA.hy 926 zu einer 8,1fachen Steigerung kam (Abb. 9).



Abbildung 9: Effekt von PGE₁ auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. EA.hy 926-Zellen wurden 24 Stunden mit PGE₁ (10^{-5} -1 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

In Makrophagen führte die Vorbehandlung mit 1 μ M PGE₁ zu einer maximalen Stimulation von 4,3fach (Abb. 10). Damit konnte gezeigt werden, dass sich eine Induktion des HO-1-Proteins durch PGE₁ nicht auf Endothelzellen beschränkt.



Abbildung 10: Effekt von PGE₁ auf die Expression des HO-1-Proteins in Makrophagen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. J774-Zellen wurden 24 Stunden mit PGE₁ (10^{-5} -1 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.1.2 Konzentrationsabhängige Effekte von Iloprost auf die HO-1-Proteinexpression

Als weiteres Prostaglandinderivat wurde das PGI_2 -Analogon Iloprost ausgewählt und hinsichtlich eines stimulatorischen Effektes auf die HO-1-Proteinexpression untersucht. Bereits ab einer Konzentration von 0,01 µM war auch hier eine signifikante Induktion des HO-1-Proteins detektierbar. Ein Vergleich der beiden Prostaglandinderivate PGE₁ und Iloprost zeigte keine signifikanten Unterschiede. Bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden und einer eingesetzten Konzentration von 1 µM führte das PGE₁ zu einer 5,2fachen Induktion in Endothelzellen (Abb. 8). Iloprost zeigte unter gleichen Bedingungen eine 4,8fache Erhöhung der HO-1-Proteinexpression (Abb. 11).



Abbildung 11: Effekt von lloprost auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit lloprost (10^{-5} -1 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.1.3 Konzentrationsabhängige Effekte von weiteren Prostaglandinderivaten auf die HO-1- Proteinexpression

Um zu klären, ob es sich bei der Stimulation der HO-1-Proteinexpression um einen Gruppeneffekt der Prostaglandine handelt, wurden weitere Derivate untersucht.

Ein Vertreter der von mehreren Autoren als Induktor der HO-1 beschrieben wird, ist d-PGJ₂ (Koizumi et al. 1995; Lee et al. 2003; Zhuang et al. 2003). Dies konnte auch in dem hier verwendeten Zellsystem bestätigt werden. Signifikante Effekte wurden jedoch erst ab einer Konzentration von 0,1 μ M beobachtet. Bei einer Konzentration von 1 μ M erwies d-PGJ₂ sich jedoch als gleich starker Induktor gegenüber PGE₁ (Abb. 12).



Abbildung 12: Effekt von d-PGJ₂ auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit d-PGJ₂ (10⁻⁵-1 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Als weiterer Vertreter wurde das vasokonstriktorische Prostaglandinderivat $PGF_{2\alpha}$ untersucht. $PGF_{2\alpha}$ zeigte jedoch in allen eingesetzten Konzentrationen keine signifikante Steigerung der HO-1-Proteinexpression (Abb. 13).



Abbildung 13: Effekt von $PGF_{2\alpha}$ auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit PGF_{2α} (10⁻³-1 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.2 Zeitabhängigkeit der Proteininduktion

Am Beispiel von PGE₁ (1µM) wurde außerdem die Zeitabhängigkeit der HO-1-Proteinexpression in Endothelzellen und Makrophagen untersucht. In beiden Zelllinien wurde eine Abhängigkeit der HO-1-Proteinexpression von der Zeit gefunden. Signifikante Effekte auf die HO-1-Proteinexpression zeigten sich in Makrophagen bereits nach 8 Stunden (Abb. 15), in Endothelzellen hingegen erst nach einer Inkubationsdauer von 18 Stunden (Abb. 14). In beiden Zelllinien erhöhte sich die Menge an gebildetem HO-1-Protein mit zunehmender Inkubationsdauer und erreichte das Maximum im betrachteten Zeitraum nach 24 Stunden. Nach dem gewählten Zeitraum wurde keine weitere Erhöhung der HO-1-Proteinexpression festgestellt (Daten hier nicht dargestellt).



Abbildung 14: Zeitabhängiger Effekt von PGE₁ auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 4-24 Stunden mit PGE_1 (1 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.



Abbildung 15: Zeitabhängiger Effekt von PGE₁ auf die Expression des HO-1-Proteins in Makrophagen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. Makrophagen J774 wurden 4-24 Stunden mit PGE₁ (1 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.3 Induktion des Ferritinproteins

Gekoppelt an die Freisetzung des Häm-Eisens durch die HO-1 ist die Expression des Ferritinproteins, um in einer Art antioxidativer Folgereaktion freies Eisen schnell und effektiv zu binden (Balla et al. 2003). Das Eisenspeicherprotein Ferritin ist somit ebenfalls ein antioxidatives Stressprotein. Am Beispiel von PGE₁ sollte geklärt werden, ob es neben einer vermehrten HO-1-Proteinexpression auch zu einer verstärkten Ferritinproteinbildung kommt. Hierzu wurden verschiedene Zelllinien mit PGE₁ über einen Zeitraum von 24h inkubiert und danach eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

In Endothelzellen konnte eine konzentrationsabhängige Induktion des Ferritinproteins gezeigt werden. Bereits ab einer Konzentration von 0,01 μ M induzierte PGE₁ das Ferritinprotein signifikant, bei einer Konzentration von 1 μ M war das Maximum erreicht (Abb.16). Diese Ergebnisse sind mit der Induktion des HO-1-Proteins vergleichbar.



Abbildung 16: Effekt von PGE₁ auf die Expression des Ferritinproteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit PGE₁ (10⁻⁵-1 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Die Ergebnisse in der zweiten Endothelzelllinie, EA.hy 926, sind nahezu identisch mit den Ergebnissen in ECV-304. Die absoluten Induktionen des Ferritinproteins waren im Vergleich zu den ECV304-Zellen etwas höher. Signifikante Erhöhungen zeigten sich ebenfalls ab einer Konzentration von 0,01 μ M PGE₁ (Abb. 17). In Makrophagen induzierte das Prostaglandinderivat PGE₁ ebenfalls die Ferritinproteinexpression. Hier konnten jedoch signifikante Unterschiede erst ab

einer Konzentration von 1 µM festgestellt werden (Abb. 18).



Abbildung 17 : Effekt von PGE₁ auf die Expression des Ferritinproteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. EA.hy 926-Zellen wurden 24 Stunden mit PGE₁ (10^{-5} -1 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.



Abbildung 18: Effekt von PGE₁ auf die Expression des Ferritinproteins in Makrophagen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. Makrophagen J774 wurden 24 Stunden mit PGE₁ (10⁻⁵-1 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.1.4 Zusammenfassung

Auf translationaler Ebene konnte gezeigt werden, dass die Prostaglandinderivate PGE_1 , Iloprost und d- PGJ_2 das HO-1-Protein konzentrationsabhängig induzieren. Dies konnte sowohl in verschiedenen Endothelzellen als auch in Makrophagen dargestellt werden. Ein zellspezifischer Effekt konnte somit ausgeschlossen werden. Die verschiedenen Verbindungen erwiesen sich dabei als ähnlich potent.

Im Gegensatz dazu zeigte $PGF_{2\alpha}$ jedoch keine Effekte auf die HO-1-Proteinexpression. Dies deutet darauf hin, dass es sich nicht um einen Gruppeneffekt der Prostaglandine handelt, sondern dass die einzelnen Derivate über unterschiedliche Wirkungen verfügen.

Weiterhin konnte für PGE₁ exemplarisch gezeigt werden, dass die HO-1-Proteinbildung auch zeitabhängig ist, und je nach verwendeter Zelllinie signifikante Änderungen nach 8 bzw. 18 Sunden eintreten.

Mit PGE₁ konnte darüber hinaus die konzentrationsabhängige Induktion des Eisenspeicherproteins Ferritin in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden.

4.2 Induktion auf transkriptioneller Ebene

Um zu zeigen, dass eine erhöhte transkriptionelle Aktivität die Grundlage der vermehrten HO-1-Proteinsynthese ist, wurden Promotorstudien mit verschiedenen HO-1-Promotorkonstrukten, Biolumineszenzmessungen in lebenden Zellen und Northern-Blot-Analysen durchgeführt.

4.2.1 Promotorstudien

Mit Hilfe von HO-1-Reportergenkonstrukten sollte eine Induzierbarkeit der HO-1 auch auf transkriptioneller Ebene gezeigt werden. Endothelzellen wurden mit den entsprechenden HO-1-Promotorkonstrukten transient transfiziert. Nach einer kurzen Nüchternphase, erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Prostaglandinderivat über 18 Stunden. Die im Anschluss gemessene Luciferase-Aktivität korreliert mit der Aktivität des HO-1-Promotors.

Auf die gleiche Art und Weise wurden auch die Kontrollplasmide ohne Promotorinsert gegenüber den verwendeten Substanzen untersucht. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass Effekte unabhängig vom HO-1-Promotor für die Induktion verantwortlich sind. Alle Prostaglandinderivate zeigten keine Effekte auf die Luciferase-Aktivität der verwendeten Kontrollplasmide pGL2 und pPGL3 (nicht dargestellt).

4.2.1.1 Effekte von PGE₁ auf humane HO-1-Promotorkonstrukte

Zunächst wurde der Effekt von PGE₁ auf ein humanes Promotorkonstrukt mit der Länge von 4500 bp untersucht. Im Reportergenversuch bewirkte die Inkubation mit PGE₁ (10 μ M) eine 2,5fache Erhöhung der Transkriptionsrate des HO-1-Gens gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Eine signifikante Steigerung der Transkriptionsrate konnte ab einer Konzentration von 1 μ M PGE₁ gezeigt werden (Abb. 19).



Abbildung 19: Effekt von PGE₁ auf die Luciferase-Aktivität in hHO4.5luc-Reportergen-transfizierten Endothelzellen.

Nach Transfektion und kurzer Nüchternphase wurden die ECV304-Zellen für 18 Stunden mit PGE₁ (0,01-10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Bei den Promotorstudien mussten insgesamt höhere Konzentrationen als bei der Western-Blot-Analyse eingesetzt werden. Dies lässt sich möglicherweise zum einen über eine herabgesetzte Empfindlichkeit der Zellen durch die Transfektionsschritte, zum anderen aber auch über die verwendeten Konstrukte erklären. Da es sich nicht um die komplette Promotorsequenz der HO-1 handelt, können eventuell auch noch andere Sequenzen zu einer Aktivierung und Erhöhung der Transkriptionsrate beitragen.

4.2.1.2 Effekte von PGE₁ auf murine HO-1-Promotorkonstrukte

In den Experimenten zur HO-1-Proteinexpression wurden neben humanen Endothelzellen auch murine Makrophagen eingesetzt. Daher sollten die Effekte von PGE₁ auch auf einen Maus-HO-1-Promotor untersucht werden. Hierzu wurde ein Promotorkonstrukt von 4045 bp verwendet. Eine Inkubation mit PGE₁ führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der HO-1-Promotor-Aktivität. Eine maximale und signifikante Erhöhung der Transkriptionsrate wurde mit der höchsten eingesetzten Konzentration (10 μ M) erzielt (Abb. 20).



Abbildung 20: Effekt von PGE₁ auf die Luciferase-Aktivität in mHO4045-Reportergen-transfizierten Endothelzellen.

Nach Transfektion und kurzer Nüchternphase wurden ECV304-Zellen für 18 Stunden mit PGE₁ (0,1-10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.2.1.3 Vergleich der Effekte verschiedener Prostaglandine auf den humanen HO-1-Promotor

Analog zu den Western-Blot-Analysen wurde anschließend untersucht, ob die verschiedenen Prostaglandinderivate die HO-1-Promotoraktivität beeinflussen. Hierzu wurde ein humanes HO-1-Promotorkonstrukt der Länge 4.9 kB verwendet.

Sowohl PGE₁, lloprost und d-PGJ₂ waren in der Lage die HO-1-Promotor-Aktivität signifikant zu erhöhen, während PGF₂ keine Induktion zeigte. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Western-Blot-Analyse. Jedoch zeigte sich im Genreporter-Assay d-PGJ₂ als potentere Verbindung. Während die Inkubation mit PGE₁ zu einer 2,0fachen und mit PGI₂ zu einer 1,8fachen Erhöhung der Transkriptionsrate führte, steigerte d-PGJ₂ die Luciferase-Aktivität um das 4,7fache. Es induzierte die HO-1-Promotoraktivität damit sogar stärker, als das als Positivkontrolle verwendete CdCl₂. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Induktion des HO-1-Promotors durch d-PGJ₂ über andere Signalwege reguliert wird als bei PGE₁ und Iloprost.



Abbildung 21: Effekt von verschiedenen Prostaglandinderivaten auf die Luciferase-Aktivität in hHO4.9luc-Reportergen-transfizierten Endothelzellen.

Nach Transfektion und kurzer Nüchternphase wurden ECV304-Zellen für 18 Stunden mit PGE₁, lloprost, PGF_{2α} und d-PGJ₂ (jeweils 10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.2.2 Biolumineszenz-Assay

Zusätzlich zu den Promotorstudien in transient transfizierten Zellen wurde ein Biolumineszenz-Assay durchgeführt. Im Unterschied zu den Reportergen-Assays werden hierbei stabil transfizierte Zellen verwendet, welche den kompletten HO-1-Promotor der Maus enthalten. Weiterhin handelt es sich im Biolumineszenz-Assav um lebende Zellen, die vermessen werden. Es wurden exemplarisch die konzentrationsund zeitabhängigen Effekte von PGE₁ auf die HO-1in NIH3T3-HO-1-luc Zellen untersucht. Transkriptionsrate Eine erhöhte Promotoraktivität wird über eine steigende Farbintensität in den Wells, gegenüber der unbehandelten Kontrolle, direkt sichtbar. Die Auswertung erfolgte mit der LivingImage Software (Xenogen, Alameda, CA, USA).

Ein signifikanter Anstieg der HO-1-Transkription konnte bereits nach 4 Stunden beobachtet werden. Die Luciferase-Aktivität, als ein Maß der Promotor-Aktivität, war hingegen nach 24 Stunden wieder vollständig aufgehoben. Mit steigender Konzentration an PGE₁ konnte auch eine zunehmende Aktivität des HO-1-Promotors festgestellt werden. Die maximale Biolumineszenz konnte nach 6 Stunden bei einer Konzentration von 10 µM detektiert werden. Mit Hilfe dieses Assays konnte eine Zeitabhängigkeit auch auf transkriptioneller Ebene gezeigt werden. Die unterschiedlichen Zeiträume bis zur maximalen Induktion im Vergleich zum Genreporter-Assay lassen sich über die verwendeten Zelllinien und die direkte Messung erklären.





Repräsentatives Biolumineszenzimage mit densiometrischer Auswertung. Nach kurzer Nüchternphase wurden die NIH3T3-HO-1-luc-Zellen 2-24 Stunden mit PGE₁ (1-10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.2.3 Induktion der HO-1 auf mRNA-Ebene

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Promotorstudien und des Biolumineszenz-Assays wurde am Beispiel des PGE₁ ausserdem eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse kann eine vermehrte HO-1-mRNA-Bildung nachgewiesen werden.

Das Prostaglandinderivat PGE₁ zeigte eine konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA in Makrophagen. Weiterhin führte die höchste eingesetzte Konzentration zur maximalen Stimulation der HO-1-mRNA-Bildung. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen der Promotorstudien und den Versuchen zur HO-1-Proteinexpression überein.



Abbildung 23: Effekt von PGE₁ auf die Expression der HO-1-mRNA in Makrophagen.

Repräsentativer Northern-Blot mit densitometrischer Auswertung und β -Aktin-Kontrolle. J774-Zellen wurden 12 Stunden mit PGE₁ (10⁻¹-10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.2.4 Zusammenfassung

In den durchgeführten Promotorstudien erhöhten die Prostaglandine PGE_1 , Iloprost und d-PGJ₂ die Aktivität des untersuchten HO-1-Promotors signifikant. Von diesen Derivaten erwies sich d-PGJ₂ als der stärkste Induktor. In Analogie zu den Western-Blot-Analysen erhöhte PGF₂ die Promotoraktivität nicht.

Am Beispiel des PGE₁ konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die Aktivierung nicht auf den humanen HO-1-Promotor beschränkt, sondern dass auch die Aktiviät eines murines HO-1-Reportergenkonstruktes erhöht wird. Eine Zeitabhängigkeit der Induktion wurde mit Hilfe des Biolumineszenz-Assays in lebenden Zellen dargestellt. Auch auf Ebene der HO-1-mRNA wurde eine Steigerung der Expression beobachtet.

Diese Befunde belegen eindeutig, dass eine Inkubation mit Prostaglandinderivaten nicht nur zu einer gesteigerten HO-1-Proteinbildung führt, sondern auch die translationale Aktivität beeinflusst.

4.3 Funktionelle Untersuchungen

Zusätzlich zu den Untersuchungen auf molekularer Ebene sollten auch die funktionellen Auswirkungen der beobachteten HO-1-Induktion untersucht werden. Mit Hilfe der HO-Aktivität sollte geklärt werden, ob nach Inkubation mit Prostaglandinen ein katalytisch aktives HO-1-Enzym gebildet wird. Weiterhin wurde in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress untersucht, ob die Prostaglandine über das induzierte HO-1-Protein auch antioxidative Effekte zeigen.

4.3.1 Effekt von PGE₁ auf die Hämoxygenase-Aktivität

Nach Inkubation von Endothelzellen mit PGE_1 wurde eine konzentrationsabhängige Steigerung der HO-Aktivität gemessen. Die Bestimmung erfolgte über eine Bilirubinmessung im zellfreien System (Motterlini et al. 1996) wie unter 3.7 beschrieben. Die gemessenen Bilirubinkonzentrationen wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Ein signifikanter Effekt konnte bereits ab einer Konzentration von 0,1 µM beobachtet werden. Das Maximum mit 2facher Induktion zeigte sich bei der Inkubation mit 1 µM PGE₁.



Abbildung 24: Effekt von PGE1 auf die HO-Aktivität in Endothelzellen

ECV304-Zellen wurden 12 Stunden mit PGE₁ (10^{-4} -1 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.3.2 Effekte in einem Modell für oxidativen Stress

In einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress wurde die indirekte und direkte antioxidative Wirkung von PGE₁ untersucht. Die pathophysiologische Situation erhöhter Sauerstoffradikal-Spiegel wurde durch Inkubation von Endothelzellen mit NADPH hervorgerufen. Dadurch wird die NADPH-abhängige Oxidase zur Superoxid-Bildung angeregt (Griendling et al. 1994; Guzik et al. 2000a). Die NADPH-abhängige Oxidase zählt neben der Xanthin-Oxidase zu den im Entzündungsgeschehen hochregulierten Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren (Terry et al. 1998).

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

4.3.2.1 Einfluss des HO-1-Produkts Bilirubin

Die für die HO-1 beobachtete antioxidative Wirkung wird vor allem dem HO-1-Produkt Bilirubin zugeschrieben. Eine Reihe von Studien charakterisieren Bilirubin *in vitro* und *in vivo* als direktes Antioxidans (Stocker et al. 1987b; Dore et al. 1999). Clark und Mitarbeiter konnten die cytoprotektiven Wirkungen des Bilirubins gegenüber oxidativen Stress zeigen (Clark et al. 2000). Dieser Befund sollte unter den gewählten Versuchsbedingungen bestätigt werden.

Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, geerntet und mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit NADPH (100 μ M), Lucigenin (50 μ M) und Bilirubin (1-100 μ M) 20 Minuten inkubiert und am Luminometer vermessen.

Bereits ab einer eingesetzten Bilirubinkonzentration von 10 μ M konnte eine signifikante Reduktion der NADPH-induzierten ROS-Spiegel gezeigt werden. Bei einer Konzentration von 100 μ M war eine fast vollständige Reduktion der ROS-Bildung festzustellen (Erdmann et al. 2005).



Abbildung 25: Direkter Effekt des HO-Produkts Bilirubin auf die NADPHinduzierte ROS-Bildung in Endothelzellen (Erdmann et al. 2005).

ECV304-Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit Bilirubin (1-100 μ M), NADPH (100 μ M) und Lucigenin (50 μ M) 20 Minuten inkubiert und vermessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.3.2.2 Antioxidative Eigenschaften von PGE₁

Eine 18stündige Vorinkubation mit dem Prostaglandinderivat PGE₁ senkte die NADPH-induzierte ROS-Bildung konzentrationsabhängig. Bereits ab einer Konzentration von 0,1 µM konnte ein signifikanter Rückgang der ROS-Spiegel gezeigt werden. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration wurde eine 30%ige Reduktion der ROS-Bildung beobachtet (Abb. 26). Da die antioxidative Wirkung nach einer 18stündigen Inkubation mit anschließendem Auswaschen auftrat, lässt die Radikalsenkung indirekte antioxidative Effekte vermuten.

Dies konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Bei direkter Zugabe von PGE₁ wurde keine signifikante Reduktion der NADPH-induzierten ROS-Spiegel beobachtet (Abb. 27). Die Ergebnisse sprechen daher für eine Stimulation antioxidativer Stoffwechselwege.



Abbildung 26: Effekt von PGE₁ auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 18 Stunden mit PGE₁ (0,01-10 μ M) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 μ M) und Lucigenin (50 μ M) 20 Minuten inkubiert und vermessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.



Abbildung 27: Direkter Effekt von PGE₁ auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit PGE₁ (0,01-10 μ M), NADPH (100 μ M) und Lucigenin (50 μ M) 20 Minuten inkubiert und vermessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.3.3 Zusammenfassung

 PGE_1 führte in Endothelzellen zu einer gesteigerten HO-Aktivität. Die Effekte waren konzentrationsabhängig. Eine signifikante Erhöhung konnte ab einer Konzentration von 0,1 μ M beobachtet werden.

Das HO-1-Produkt Bilirubin zeigte in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress direkte antioxidative Wirkungen. Diese Effekte waren ebenfalls konzentrationsabhängig.

PGE₁ reduzierte den Anstieg der Sauerstoffradikalbildung konzentrationsabhängig. In den Konzentrationsbereichen, in denen eine gesteigerte HO-Aktivität gemessen wurde, wurden auch die antioxidativen Effekte festgestellt. Hieraus lässt sich schließen, dass Bilirubin unter den gewählten Bedingungen als Mediator der PGE₁-Effekte in Frage kommt und somit die Induktion der HO-1 für die antioxidative Wirkung verantwortlich sein könnte.
4.4 Molekulare Mechanismen der HO-1-Induktion durch Prostaglandinderivate

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die untersuchten Substanzen sowohl die HO-1-Proteinexpression erhöhen als auch die transkriptionelle Aktivität der HO-1 steigern, sollte im Folgenden der Mechanismus der HO-1-Induktion durch die Prostaglandinderivate untersucht werden.

4.4.1 Messung der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP

Eine Vielzahl der Prostaglandinwirkungen wird über den *second messenger* cAMP vermittelt. Eine Messung der intrazellulären cAMP-Spiegel sollte aufzeigen, ob dieses cyclische Nukleotid nach Stimulation mit Prostaglandinderivaten auch in den bisher verwendeten Zelllinien vermehrt gebildet wird.

Da sowohl cAMP als auch cGMP als mögliche Induktoren der HO-1 diskutiert werden (Durante et al. 1997; Polte et al. 2000), sollte der Effekt von Prostaglandinen auf die Bildung beider cyclischer Nukleotide untersucht werden.

4.4.1.1 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit PGE₁

Der cAMP-Gehalt der Proben wurde mit einem Enzymimmunoassay (EIA) (Cayman, Ann Arbor, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Zunächst wurde die Bestimmung des cAMP-Gehalts in der Endothelzelllinie ECV304 durchgeführt. Erwartungsgemäß zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der cAMP-Bildung. Nach Inkubation mit PGE₁ (10 μ M) wurde eine 3,3fache Erhöhung des cAMP-Spiegels gegenüber dem Basalwert gefunden. Signifikante Steigerungen traten bereits in geringeren Konzentrationen auf (Abb. 28).



Abbildung 28: Effekt von PGE₁ auf die Bildung von cAMP in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit PGE₁ (10^{-3} -10 µM) inkubiert und anschließend wurde mit einem EIA die Menge an cAMP bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Wie in den Western-Blot-Analysen wurden als Model für zirkulierende Blutzellen Makrophagen verwendet. Die resultierenden Ergebnisse entsprechen denen in Endothelzellen, jedoch wurden hier höhere relative Induktionen gefunden. Bei einer eingesetzten Konzentration von 10 μ M PGE₁ kam es zu einer 8,1fachen Erhöhung des cAMP-Spiegels (Abb. 29).



Abbildung 29: Effekt von PGE₁ auf die Bildung von cAMP in Makrophagen.

J774-Zellen wurden 15 Minuten mit PGE_1 (10⁻³-10 μ M) inkubiert und anschließend wurde mit einem EIA die Menge an cAMP bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Zusätzlich wurden die Versuche in LLC-PK-1 Nierenepithelzellen wiederholt. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen in Endothelzellen und Makrophagen. PGE₁ führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der cAMP-Konzentrationen.



Abbildung 30: Effekt von PGE₁ auf die Bildung von cAMP in Nierenepithelzellen.

LLC-PK-1-Zellen wurden 15 Minuten mit PGE₁ (10^{-3} -10 µM) inkubiert und anschließend wurde mit einem EIA die Menge an cAMP bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.1.2 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit lloprost

Auch für das PGI_2 -Derivat Iloprost wurden die intrazellulären cAMP-Spiegel nach entsprechender Inkubation in Makrophagen bestimmt. Mit einer PGI_2 -Konzentration von 0,1 µM war eine signifikante, 5,5fache Induktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle feststellbar. Mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µM war im Durchschnitt eine 10,4fache Stimulation zu erkennen (Abb. 31).





J774-Zellen wurden 15 Minuten mit lloprost (10^{-3} -10 µM) inkubiert und anschließend wurde mit einem EIA die Menge an cAMP bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Α

В

4.4.1.3 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit anderen Prostaglandinderivaten

Für die beiden anderen Prostaglandinderivate wurden ebenso die intrazellulären cAMP-Spiegel bestimmt. Weder $PGF_{2\alpha}$ (Abb. 32 A) noch d- PGJ_2 (Abb. 32 B) zeigten einen signifikanten Effekt auf die intrazelluläre cAMP-Bildung.



Abbildung 32: Effekt von $PGF_{2\alpha}$ (A) und $d-PGJ_2$ (B) auf die Bildung von cAMP in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit den Prostaglandinderivaten PGF_{2α} (A) und d-PGJ₂ (B) (10⁻²-10 μ M) inkubiert und anschließend wurde mit einem EIA die Menge an cAMP bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.1.4 Bestimmung der intrazellulären cGMP-Spiegel nach Stimulation mit PGE₁

Im Folgenden sollte ein weiteres cyclisches Nukleotid untersucht werden. Die Bestimmung der cGMP-Spiegel erfolgte mit einem EIA in Nierenepithelzellen. Diese Zelllinie ist etabliert zur Untersuchung zellulärer Mechanismen der cGMP-Bildung, da sie verhältnismäßig große Mengen an löslicher Guanylatcyclase und eNOS enthält (Bennett et al. 1989). Es sollte daher in diesen Zellen neben der cAMP- auch die cGMP-Bildung nach Inkubation mit Prostaglandinen gemessen werden.

Es zeigte sich jedoch bei keiner der verwendeten Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der cGMP-Spiegel in Nierenepithelzellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass PGE₁ keine Effekte auf eine cGMP-Bildung ausübt (Abb. 33). Die Versuche wurden in Endothelzellen wiederholt. Auch in diesen Zellen konnte keine Erhöhung der cGMP-Spiegel beobachtet werden (Daten hier nicht gezeigt).





LLC-PK-1-Zellen wurden 15 Minuten mit PGE₁ (10^{-3} -10 µM) inkubiert und anschließend wurde mit einem EIA die Menge an cGMP bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.2 Effekt eines cAMP-Analogons auf die HO-1-Induktion

4.4.2.1 Effekt von db-cAMP auf die HO-1-Proteinexpression

Mit Hilfe des cAMP-Analogons N^6 , 2'-O-Dibutyryladenosine-3', 5'-cyclic monophosphat (db-cAMP) sollte der Frage nachgegangen werden, ob die HO-1-Induktion durch cAMP vermittelt wird. Für cAMP ist eine spezifische Bindungsstelle ("cAMP response Element") in der Promotorregion des HO-1-Gens bekannt (Choi et al. 1996; Immenschuh et al. 1998a; Wijayanti et al. 2005). Aus diesem Grund wurde der Effekt von db-cAMP auf die endotheliale HO-1-Proteinexpression und auf ein HO-1-Promotorkonstrukt untersucht.

Endothelzellen wurden für 24 Stunden mit db-cAMP (0,1-100 μ M) inkubiert. Das cAMP-Analogon erhöhte konzentrationsabhängig die HO-1-Proteinexpression. Bei einer Konzentration von 100 μ M wurde die Bildung des HO-1-Proteins um das 2,6fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle gesteigert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe in Endothelzellen der Rinderpulmonalarterie (Polte et al. 1998).



Abbildung 34: Effekt von db-cAMP auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 24 Stunden mit db-cAMP (10^{-1} -100 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Darüber hinaus wurde der Effekt von db-cAMP auch in Makrophagen untersucht. Eine Inkubation mit dem cAMP-Analogon führte ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der HO-1-Proteinkonzentration (Abb. 35).



Abbildung 35: Effekt von db-cAMP auf die Expression des HO-1-Proteins in Makrophagen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. Makrophagen J774 wurden 18 Stunden mit db-cAMP (10^{-1} -100 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.2.2 Effekt von db-cAMP auf die Aktivität des HO-1-Promotors

Im Folgenden sollte der Einfluss von cAMP auf die HO-1-Transkription untersucht werden. Die hHO4.9luc-Reportergen-transfizierten Zellen wurden mit db-cAMP (10-200 μ M) über 18 Stunden inkubiert. Die im Anschluss gemessene Luciferase-Aktivität korreliert mit der Aktivität des hHO-1-Promotors. Bei einer Konzentration von 200 μ M konnte eine signifikante 1,43fache Stimulation der HO-1-Promotoraktivität beobachtet werden.

Mit Hilfe dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass das cAMP-Analogon db-cAMP sowohl auf translationaler als auch auf transkriptioneller Ebene die HO-1-Induktion beeinflusst. Die Effekte des cAMP-Analogons db-cAMP waren jedoch schwächer ausgeprägt als bei den cAMP-bildenden Prostaglandinen. Dies lässt sich zum einen durch eine nicht vollständige Membrangängigkeit des Analogons erklären. Daher sind hier, im Gegensatz zu dem intrazellulär gebildetem cAMP durch die Prostaglandine, im Zellinneren niedrigere cAMP-Spiegel zu erwarten. Ein weiterer Grund könnte eine Beteiligung zusätzlicher Mechanismen an der HO-1-Induktion durch die Prostaglandine sein.



Abbildung 36: Effekt von db-cAMP auf die Luciferase-Aktivität in hHO4.9luc-Reportergen-transfizierten Endothelzellen.

Nach Transfektion und kurzer Nüchternphase wurden die ECV304-Zellen 24 Stunden mit db-cAMP (10-200 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation *vs.* Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.3 Einfluss eines Inhibitors der Adenylatcyclase auf die HO-1-Induktion durch PGE₁

Um die Rolle von cAMP bei der PGE₁-induzierten HO-1-Induktion zu bestätigen, wurden weitere Experimente mit dem Adenylatcyclase-Inhibitor 2`5`-Dideoxyadenosin (DDA) durchgeführt. Dieser zellpermeable Hemmstoff wurde in einer Konzentration von 5 bis 10 μ M verwendet (Maurice et al. 1990; Shoshani et al. 2000).

4.4.3.1 Einfluss von DDA auf die PGE₁-induzierte HO-1-Proteinexpression

Mit dem Adenylatcyclase-Hemmstoff DDA konnte ein signifikanter Rückgang der PGE₁-induzierten HO-1-Proteinexpression in Makrophagen gezeigt werden. Im Western-Blot konnte jedoch nur die geringere Konzentration von 5 μ M DDA eingesetzt werden, da bei höheren Konzentrationen Eigeneffekte des Hemmstoffs auftraten. Dadurch lässt sich auch die nicht vollständige Hemmung erklären (Abb. 37).



Abbildung 37: Einfluss von DDA auf die PGE₁-induzierte HO-1-Proteinexpression in Makrophagen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. Makrophagen J774 wurden 20 Minuten mit DDA (5 μ M) vorbehandelt und anschließend über 18 Stunden mit PGE₁ (10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. *): p < 0,001; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni`s multipler Vergleichstest. #): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + DDA, t-Test nach Student.

4.4.3.2 Einfluss von DDA auf die PGE₁-induzierte HO-1-Promotor-Aktivität

Neben einer Reduktion der PGE_1 -induzierten HO-1-Proteinexpression führte DDA zu einer fast vollständigen Aufhebung der PGE_1 -induzierten HO-1-Promotoraktivität. Mit einer Konzentraion von 10 μ M PGE1 wurde eine 2,1fache HO-1-Promotor-Aktivität gemessen, während diese nach Vorbehandlung mit DDA bei nur noch 1,2fach lag. Der Inhibitor DDA zeigte in den Promotorstudien keine signifikanten Eigeneffekte.



Abbildung 38: Einfluss von DDA auf die PGE₁-induzierte Luciferase-Aktivität in hHO4.9luc-Reportergen-transfizierten Endothelzellen.

Nach Transfektion und kurzer Nüchternphase wurden ECV304-Zellen 20 Minuten mit DDA (10 μ M) vorbehandelt und anschließend 24 Stunden mit PGE₁ (10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten.

*): p < 0,001; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni`s multipler Vergleichstest. #): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + KT 5720, t-Test nach Student.

4.4.4 Einfluss von Proteinkinase-Inhibitoren auf die HO-1-Induktion

Das cAMP kann spezifisch die PKA aktivieren. Proteinkinasen wiederum können Proteine phosphorylieren und somit nachgeordnete Prozesse steuern (Tasken et al. 1997; Immenschuh et al. 1998b). Um eine mögliche Beteiligung der PKA an der HO-1-Induktion zu untersuchen, wurde ein spezifischer PKA-Inhibitor, KT5720, verwendet. Zum Vergleich wurde ebenfalls ein spezifischer Hemmstoff der cGMP-abhängigen PKG getestet (Gudi et al. 1996; Immenschuh et al. 1998a). Endothelzellen wurden jeweils 20 Minuten mit den Proteinkinase-Inhibitoren vorinkubiert, bevor die eigentliche Inkubation mit PGE₁ erfolgte.

4.4.4.1 Einfluss von Proteinkinase-Inhibitoren auf die PGE₁-induzierte HO-1-Promotoraktivität

Während der PKA-Inhibitor die PGE₁-induzierte HO-1-Promotor-Aktivität nahezu vollständig aufhob, konnte der PKG-Inhibitor KT5823 die Induktion nicht signifikant senken. Die geringe Hemmung der PGE₁-induzierten Luciferase-Aktivität durch KT5823 könnte sich durch unspezifische Effekte des Inhibitors erklären lassen. Beide Inhibitoren besaßen in den verwendeten Konzentrationen keine Eigeneffekte auf die Luciferase-Aktivität.



Abbildung 39: Einfluss von Proteinkinase-Inhibitoren auf die PGE₁-induzierte Luciferase-Aktivität in hHO4.9luc-Reportergen-transfizierten Endothelzellen.

Nach Transfektion und kurzer Nüchternphase wurden die ECV304-Zellen 20 Minuten mit KT5720 (0,3 μ M) bzw. KT5823 (1 μ M) vorbehandelt und anschließend 18 Stunden mit PGE₁ (10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. *): p < 0,001; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni`s multipler Vergleichstest. #): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + KT 5720, t-Test nach Student.

4.4.4.2 Einfluss eines PKA-Inhibitors auf die PGE₁-induzierte HO-1-Proteinexpression

Da die Untersuchungen zur Promotoraktivität eine Beteiligung der PKA erwarten lassen, sollte dies auch auf Proteinebene dargestellt werden. Auch im Western-Blot konnte durch eine Vorinkubation mit dem PKA-Inhibitor KT5720 eine fast vollständige Hemmung der PGE₁-induzierten HO-1-Proteinexpression in Endothelzellen gezeigt werden.



Abbildung 40: Einfluss des PKA-Inhibitors KT5720 auf die PGE₁-induzierte HO-1-Proteinexpression

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 20 Minuten mit KT5720 (0,3 μ M) vorbehandelt und anschließend über 18 Stunden mit PGE₁ (10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. *): p < 0,05; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni`s multipler Vergleichstest. #): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + DDA, t-Test nach Student.

4.4.5 Beteiligung von CRE an der HO-1-Signalkaskade

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass PGE₁ zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor CREB führt (Thomas et al. 1995; Castano et al. 2003). Das aktivierte CREB-Protein ist ein Genaktivator für Gene mit CRE im Promotorbereich (Lalli et al. 1994). Ein solches CRE-Element konnte auch im HO-1-Promotor gefunden werden (Immenschuh et al. 1998a; Kronke et al. 2003).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Aktivierung der HO-1-Promotor-Aktivität über ein CRE reguliert wird. Hierzu wurden verschiedene humane HO-1-Reportergenkonstrukte verwendet (Abb. 41). Die Inkubation und Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.3 beschrieben.

Zunächst wurde der Effekt von PGE₁ auf das Promotorkonstrukt hHO4.9luc untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante 1,7fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Bei der Verwendung eines zweiten Konstrukts (hHO4.9luc_M1), welches eine Mutation innerhalb des CRE (Kronke et al. 2003) beinhaltet, wurde die Aktivierung der HO-1-Promotoraktivität vollständig aufgehoben (Abb. 42).



Abbildung 41: hHO-Promotorkonstrukte (Kronke et al. 2003)

Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich auch bei einem dritten HO-1-Promotorkonstrukt der Länge 3.8kB, welches aufgrund der kürzeren Sequenz kein CRE mehr enthält. Hier konnte ebenfalls keine gesteigerte Luciferase-Aktivität beobachtet werden (Abb. 42).



Abbildung 42: Effekt von PGE₁ auf die Luciferase-Aktivität in hHO-Reportergentransfizierten Endothelzellen.

Nach der Transfektion wurden ECV304-Zellen 18 Stunden mit PGE₁ (10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. *): p < 0,001; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni`s multipler Vergleichstest. #): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + DDA, t-Test nach Student.

4.4.6 Zusammenfassung

Für PGE_1 und Iloprost wurde in den verwendeten Zellen eine konzentrationsabhängie Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel beobachtet. Dagegen hatten d-PGJ₂ und PGF_{2α} in den eingesetzten Konzentrationen keine Effekte auf die cAMP-Akkumulation. Eine Inkubation mit PGE₁ zeigte keinen Effekt auf die intrazellulären cGMP-Spiegel.

Das HO-1-Gen konnte sowohl auf translationaler als auch auf transkriptioneller Ebene durch das cAMP-Analogon db-cAMP induziert werden.

Die PGE₁-induzierte HO-1-Proteinexpression konnte mit dem Adenylatcyclase-Inhibitor DDA und dem PKA-Inhibitor KT5720 nahezu vollständig aufgehoben werden. Auch in den Promotorstudien wurde ein signifikanter Rückgang der PGE₁-induzierten Luciferase-Aktivität durch die Inhibitoren DDA und KT5720 gefunden. Dagegen konnte mit dem PKG-Inhibitor KT5823 keine signifikante Senkung der HO-1-Promotor-Aktivität beobachtet werden. Eine Abhängigkeit der HO-1-Induktion vom CRE konnte in den abschließenden Promotorstudien mit Hilfe von verschiedenen Konstrukten dargestellt werden, so dass eine nahezu durchgängige Signalkaskade für die PGE₁-vermittelte HO-1-Induktion beschrieben werden konnte: PGE₁ erhöht über eine Aktivierung der Adenylatcyclase die intrazellulären cAMP-Spiegel und dadurch die Aktivität der PKA. Durch diesen cAMP-abhängigen Signalweg kommt es schließlich über ein CRE in der Promotorsequenz zur Aktivierung des HO-1-Gens.

5 Diskussion

Nach der Entdeckung von PGE₁ durch Bergström (Bergstrom et al. 1962) und der Erstanwendung durch Carlson (Carlson et al. 1968) stand zunächst dessen Wirkung auf die Plättchenfunktion im Mittelpunkt der pathophysiologischen und therapeutischen Überlegungen. Erst die umfangreiche klinische Anwendung bei Patienten mit pAVK sowie die Bemühungen die Therapieformen zu optimieren und Näheres über den Wirkmechanismus zu erfahren, führten zu einer wesentlichen Erweiterung des Wissenstandes (Sinzinger 1988). Eine Übersicht der bisher bekannten Wirkungen zeigt Tabelle 3. Neuere Studien bestätigen die gute Wirksamkeit von Prostaglandinderivaten im fortgeschrittenen Stadium der pAVK (Creutzig et al. 2004; Heidrich 2006). Der Wirkmechanismus von Prostaglandinen ist jedoch komplex und immer noch nicht vollständig aufgeklärt (Weiss 2003; Gensch et al. 2007).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die beobachteten protektiven Wirkungen von PGE₁ und anderer Prostaglandinderivate (Tilley et al. 2001; Mazzone et al. 2002; Echeverria et al. 2005; Sako et al. 2006). Es sollte untersucht werden, ob diese Verbindungen eine Induktion und Aktivierung von zellschützenden Proteinen wie HO-1 und Ferritin bewirken. Die HO-1 wird in der Literatur als antiinflammatorisches, cytoprotektives und antiatherogenes Protein beschrieben (Otterbein et al. 2000b; Abraham et al. 2003; Bach 2005; Immenschuh et al. 2006) Produkte und könnte über seine Bilirubin und Carbonmonoxid zum therapeutischen Nutzen der Prostaglandine beitragen. Die Untersuchungen erfolgten in Endothelzellen und Makrophagen, da beide Zellsysteme unmittelbar an der der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind. Makrophagen als Model für zirkulierende Blutzellen zeichnen sich durch eine hohe NADPH-Oxidase-Aktivität aus und gelten daher als eine Hauptguelle für ROS im Organismus (Griendling et al. 2000; Cathcart 2004).

Die Induktion der HO-1-Proteinsynthese durch Prostaglandinderivate wurde mit Hilfe der Western-Blot-Technik untersucht. Das PGE_1 -Derivat Alprostadil induzierte das HO-1-Protein konzentrations- und zeitabhängig sowohl in der Endothelzelllinie ECV304 als auch in der Makrophagenzelllinie J774. Auch für Iloprost und d-PGJ₂ konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der HO-1 gezeigt werden. Keine Effekte zeigte jedoch $PGF_{2\alpha}$, welches über andere Prostaglandinrezeptoren wirkt. Eine erhöhte Expression der HO-1 könnte daher Bestandteil des Wirkprofils der drei Prostaglandinderivate Alprostadil, Iloprost und d-PGJ₂ sein.

Signifikante Induktionen wurden auf translationaler Ebene bereits im nanomolaren Bereich festgestellt. Diese Konzentrationen liegen damit innerhalb des tatsächlichen Konzentrationsbereich, der nach einer Infusion mit PGE1 beim Menschen erreicht wird (Cawello et al. 1995). Für die Untersuchungen zum Mechanismus wurden höhere Konzentrationen verwendet, die aber noch innerhalb des für Prostaglandine in Zellkulturuntersuchungen üblichen Konzentrationsbereichs liegen (Krone et al. 1985; Jozkowicz et al. 2002; Zhuang et al. 2003; Kim et al. 2004; Echeverria et al. 2005). Selbst in der höchsten eingesetzten Konzentration wurden keine toxischen Effekte beobachtet. Dies wurde sowohl lichtmikroskopisch als auch mit Hilfe von LDH-Assays (Daten nicht dargestellt) bestätigt.

Die in verschiedenen Studien beschriebene Kopplung von Ferritin- und HO-1-Expression konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Eisenstein et al. 1991; Fogg et al. 1999). Während eine Erhöhung der Ferritinsynthese durch *second messenger* wie cAMP (Torti et al. 2002) oder cAMP-abhängige Schilddrüsenhormone (Chazenbalk et al. 1990) gut untersucht ist, konnte mit Hilfe von PGE₁ erstmalig eine konzentrationsabhängige Steigerung der Ferritinsynthese durch Prostaglandine gezeigt werden. Die Induktion des Ferritinproteins erfolgte dabei im gleichen Konzentrationsbereich wie die Induktion des HO-1-Proteins.

Die Regulation der Ferritin-Expression findet vorwiegend auf translationaler Ebene statt (Zahringer et al. 1976). Das aus dem Hämabbau durch die HO-1 freigesetzte Eisen verhindert die Bindung des endogenen Repressorproteins IRE-BP (*ironresponsive element-binding protein*) an das *iron-responsive element* (IRE) des Ferritintranskripts (Klausner et al. 1993). Die RNA-Bindungsfähigkeit des IRE-BP ist direkt abhängig von der freien cytosolischen Eisenkonzentration. Bei niedrigen Eisen-Spiegeln hat das IRE-BP eine hohe Affinität zu IRE, bei einem Überangebot an Eisen bindet es jedoch nicht mehr am IRE (Haile et al. 1989). Das cytosolische Protein IRE-BP ist daher ein wichtiger Sensor und Regulator für den Eisengehalt der Zelle.

Neben dieser translationalen Regulierung über den Gehalt an freiem Eisen, gibt es jedoch auch Hinweise auf eine transkriptionelle Aktivierung des Ferritingens. Als möglicher Mediator wird der Botenstoff cAMP beschrieben (Chazenbalk et al. 1990; Bevilacqua et al. 1997; Faniello et al. 1999). Eine Aktivierung des Ferritinpromotors durch cAMP erfolgt über Bbf (*B site binding factor*). Bbf ist nicht mit dem Transkriptionsfaktor CREB identisch, benötigt aber als Cofaktor ebenfalls CBP sowie p300 (Bevilacqua et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Erhöhung der cAMP-Spiegel durch PGE₁ gezeigt werden. Gegen eine transkriptionelle Aktivierung sprechen jedoch unsere Beobachtungen, dass auch d-PGJ₂, ein Prostaglandin ohne Effekte auf intrazelluläre cAMP-Spiegel, zu einer erhöhten Ferritinexpression führt (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte eine vermehrte Ferritinsynthese erst nach 24 Stunden beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache spricht ebenfalls für eine translationale Aktivierung der Ferritinsynthese als Konsequenz einer vorgeschalteten HO-1-Induktion.

Für PGE₁ konnte neben der gesteigerten HO-1-Proteinexpression auch eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität des HO-1-Gens gezeigt werden. Mit Hilfe von verschiedenen Reportergenkonstrukten wurde sowohl beim humanen als auch beim murinen HO-1-Promotor eine erhöhte Aktivität nach Behandlung mit PGE1 beobachtet. Dies lässt vermuten, dass bei beiden Spezies die Regulation der HO-1-Expression über vergleichbare Signalwege abläuft. Die Promotorsequenzen unterscheiden sich in einigen Punkten (Abb. 5), besitzen aber auch identische regulatorische Domänen wie z.B. das CRE (Ryter et al. 2006). Beim Vergleich verschiedener PG-Derivate wurde am humanen HO-1-Promotor eine deutlich stärkere Induktion durch das cAMP-unabhängige d-PGJ₂ beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Effekte dieses Derivats über andere Signalwege vermittelt werden. Dagegen erwiesen sich die cAMP-Stimulatoren PGE1 und lloprost als gleichwertiae Induktoren. $PGF_{2\alpha}$ zeigte keine Effekte auf die HO-1-Promotoraktivität. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen auf translationaler Ebene. Die Ergebnisse für PGE1 konnten auch in nichtendothelialen Zellen bestätigt werden. So wurde in Makrophagen eine gesteigerte HO-1-mRNA-Expression beobachtet. Ebenso erhöhte PGE₁ die transkriptionelle HO-1-Aktivität im Biolumineszenz-Imaging in lebenden NIH3T3-Zellen.

Zusätzlich zu den Untersuchungen zum Expressionsverhalten der HO-1 wurde auch der Effekt von PGE₁ auf die endotheliale HO-Aktivität betrachtet. Mit diesem Versuch kann nachgewiesen werden, ob ein katalytisch aktives HO-Enzym vermehrt gebildet wird. Nach Stimulation mit PGE₁ wurde die Enzymaktivität über eine Bestimmung des HO-Produkts Bilirubin gemessen. Dabei ergab sich ein ähnliches Ergebnis wie bei der HO-1-Proteinexpression. PGE₁ erhöhte die HO-Aktivität ab einer Konzentration von 0,1 μ M signifikant. Die benötigten Konzentrationen lagen im Vergleich zur HO-1-Proteinexpression etwas höher. Dies lässt sich über einen partiellen Sensibiltätsverlust der Hämoxygenase während der komplexen Aufarbeitung des Lysats erklären (Motterlini et al. 1996).

In einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress wurde die funktionelle Auswirkung einer Induktion des antioxidativen HO-1-Gens untersucht. Dabei wird die pathophysiologische Situation von oxidativem Stress erzeugt, indem die NADPH-Oxidase durch Zugabe von NADPH zur Superoxid-Radikalbildung anregt wird (Griendling et al. 2000). Erdmann und Mitarbeiter fanden für das HO-1-Produkt Bilirubin nach direkter Zugabe eine starke Senkung der Radikalbildung. Dies lässt vermuten, dass die antioxidativen Effekte der HO-1 über deren Produkte wie z.B. Bilirubin vermittelt werden können. Der protektive Effekt des Bilirubins im gewählten Testsystem wurde im Bereich physiologischer Konzentrationen gefunden (Erdmann et al. 2005). Nachdem bereits durch die Bestimmung der HO-Aktivität gezeigt werden konnte, dass PGE1 über seine Wirkung auf das HO-System auch die Bilirubin-Konzentration erhöht, wurde im nächsten Schritt die antioxidative Wirkung einer Inkubation mit PGE₁ getestet. Es konnte hierbei eine konzentrationsabhängige Senkung der NADPH-induzierten **ROS-Spiegel** beobachtet werden. Diese Radikalsenkung trat nicht bei direkter Zugabe des Prostaglandinderivates auf, sondern wurde erst nach mehrstündiger Vorinkubation mit anschließendem Auswaschen der Substanz beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass die protektiven Effekte von PGE1 über komplexe Prozesse wie z.B. die Induktion des HO-1-Systems vermittelt werden und nicht etwa Folge einer direkten Neutralisierung oder Bindung von Sauerstoffradikalen sind.

Neben den antioxidativen, zellprotektiven Effekten der Ferritininduktion und Bilirubinbildung werden auch dem CO als weiterem HO-1-Produkt protektive Eigenschaften zugeordnet. CO und PGE₁ zeigen eine Vielzahl an identischen Wirkungen. Beide Substanzen haben gefäßerweiternde, plättchenund proliferationshemmende Eigenschaften. Bei CO werden diese Eigenschaften vor allem über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und cGMP vermittelt (Morita et al. 1997; Cardell et al. 1998; Fujita et al. 2001). Viele Effekte von PGE1 werden dagegen über cAMP geregelt. Weiterhin zeigen sowohl CO als auch PGE1 antiinflammatorische Eigenschaften. So konnte eine Hemmung der Freisetzung des proinflammatorischen TNF-a für beide Substanzen nachgewiesen werden (Otterbein et al. 2000a; Schrör et al. 2004). Denkbar ist, dass die PGE1vermittelten zellprotektiven Effekte neben der cAMP-Stimulation auch durch eine Induktion der HO-1 und durch eine Aktivierung CO/cGMP-abhängiger Signalwege synergistisch verstärkt werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch eine mögliche Beteiligung der HO an den cytoprotektiven Effekten des PGE₁-Derivats Misoprostol im Gastrointestinaltrakt. Prostaglandine regulieren viele gastroprotektive Funktionen und Stoffwechselwege. Sie stimulieren die Schleim- und Bikarbonatsekretion, erhöhen den mukosalen Blutfluss, verbessern die Resistenz der gastralen Ephitelzellen gegenüber Schäden durch verschiedene Mediatoren und unterdrücken die Adhäsion von Leukozyten (Martin et al. 2006). Verletzungen der Magenschleimhaut entwickeln sich, wenn das Gleichgewicht zwischen magenschützenden und aggressiven Faktoren gestört ist. Solche aggressiven Faktoren können Stress, NSAIDs oder Heliobacter pylori-Infektionen sein. Der Mechanismus der Schleimhautschädigung ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt, man vermutet aber u.a. eine Beteiligung von ROS (Biswas et al. 2003). Die antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften der HO-1 und ihrer Produkte könnten daher einer Magenschädigung entgegenwirken (Becker et al. 2004). Es gibt zwar bisher nur wenige Studien zur Regulation und Funktion der HO-1 in gastrointestinalem Gewebe, für Vitamin C konnte allerdings bereits eine Beteiligung der HO-1 am Schutz der Magenschleimhaut gezeigt werden (Becker et al. 2003). Weiterhin gibt es auch Hinweise darauf, dass eine Hochregulierung der HO-1 zu einer verbesserten Ulkusheilung im Rattenmodell beitragen kann (Guo et al. 2003). Auch Protonenpumpenhemmer und NO-freisetzende NSAIDs induzieren HO-1-abhängige gastroprotektive Effekte (Berndt et al. 2005; Becker et al. 2006). Ob eine vermehrte HO-1-Expression auch zur gastroprotektiven Wirkung von Misoprostol (PGE1) beiträgt, ist bislang nicht belegt, kann aber auf der Basis der hier gezeigten Ergebnisse vermutet werden.

Die HO-1-Produkte können an der Vermittlung von Arzneistoffwirkungen beteiligt sein. Es wurden bisher einige, strukturell sehr unterschiedliche Arzneistoffe gefunden, die über eine Induktion der HO-1 einen zusätzlichen therapeutischen Effekt erzielen. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Aspirin und Statine in Endothelzellen die HO-1-Genexpression induzieren (Grosser et al. 2003; Grosser et al. 2004). Weiterhin konnte dargestellt werden, dass eine Induktion der HO-1 ein neuartiger Wirkmechanismus ist, der ursächlich an den protektiven Effekten von NO-NSAIDs in der Magenschleimhaut (Berndt et al. 2005) und an der protektiven Wirkung des ACE-inhibitorischen Dipeptids Met-Tyr im kardiovaskulären System (Erdmann et al. 2006) beteiligt ist. Die hier erhobenen Befunde fügen zu dieser Gruppe auch die Prostaglandinderivate Alprostadil und Iloprost hinzu. Nach Bach ist die Induktion der HO-1 dabei in Abhängigkeit vom Zelltyp an den zusätzlichen therapeutischen Wirkungen des jeweiligen Arzneistoffs beteiligt. Bach bezeichnet die HO-1 daher als einen therapeutischen Mediator und Verstärker antioxidativer, antiproliferativer und antiinflammatorischer Wirkungen von verschiedenen Substanzen (Bach 2005). Genauso vielfältig wie die Induktoren der HO, sind auch die beteiligten Transkriptionsfaktoren und Signalwege die zu einer Aktivierung führen (Alam et al. 2007). Es sollte daher am Beispiel von PGE1 ein möglicher Signalweg für die HO-1-Induktion in Endothelzellen aufgezeigt werden.

Durch die Bindung von Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wird die membranständige Adenylatcyclase aktiviert und es kommt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel (Bourne et al. 1974). Eine Aktivierung der Adenylatcyclase durch PGE₁ konnte in verschiedenen Studien beschrieben werden (Dailey et al. 1988; Maldonado et al. 1991). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob Prostaglandinderivate in den verwendeten Zellsystemen ebenfalls zu einer Stimulation der cAMP-Bildung führen. Für die Derivate PGE₁ und Iloprost wurde erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel in Endothelzellen und Makrophagen gefunden. Dagegen hatten d-PGJ₂ und PGF₂ in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die cAMP-Akkumulation in Endothelzellen.

In mehreren Studien konnte eine Beteiligung des second messengers cAMP an der Induktion der HO-1 nachgewiesen werden (Durante et al. 1997; Immenschuh et al. 1998b; Kronke et al. 2003). Mit dem zellgängigen cAMP-Analogon db-cAMP konnte in glatten Gefäßmuskelzellen eine Induktion der HO-1 auf Protein- und mRNA-Ebene sowie eine erhöhte HO-Aktivität aufgezeigt werden (Durante et al. 1997). Eine Rolle spielt cAMP auch bei der Induktion der HO-1 durch α -MSH (α melanocortin-stimulating-hormon) in Makrophagen (Lam et al. 2005). Weiterhin konnte sowohl im HO-1-Promotor der Ratte (Immenschuh et al. 1998a; Immenschuh et al. 1998b) als auch beim Menschen (Kronke et al. 2003) ein CRE identifiziert und für die cAMP-vermittelte HO-1-Induktion verantwortlich gemacht werden. Das C-reaktive Protein (CRP), das als Marker für kardiovaskuläres Risiko dient und an der Progression der Atherosklerose beteiligt ist, zeigt ein genau gegensätzliches Verhalten. In humanen Makrophagen erniedrigte CRP sowohl den cAMP-Gehalt als auch die Expression der HO-1 (Singh et al. 2006). Eine Beteiligung von cAMP an der Transduktionskaskade der HO-1-Aktivierung konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig belegt werden. Zum einen wurde mit dem Adenvlatcvclase-Inhibitor DDA die Induktion der HO-1 durch PGE1 vollständig gehemmt. Zum anderen erwies sich das cAMP-Analogon db-cAMP als potenter HO-1-Induktor. Dies deutet auf eine Beteiligung von cAMP am Signalweg der PGE₁-vermittelten HO-1-Induktion hin.

Einem weiteren Botenstoff, dem cGMP, wird ebenfalls eine Beteiligung an der HO-1-Induktion zugeschrieben. In Endothelzellen wurde cGMP als wichtiger Mediator für die Regulation der HO-1 beschrieben (Polte et al. 2000). Vergleichbare Ergebnisse zeigen auch Untersuchungen in Rattenhepatozyten (Immenschuh et al. 1998a) oder Studien zur ANP-vermittelten HO-1-Induktion (Polte et al. 2002; Kiemer et al. 2003). Der second messenger cGMP gilt auch als Hauptmediator der physiologischen Effekte von NO. Durch Bindung von NO an die prosthetische Hämgruppe der löslichen Guanylatcyclase wird diese aktiviert und daraufhin vermehrt cGMP gebildet. Anschließend kommt es über eine Aktivierung von Proteinkinasen zu einer NO-vermittelten Vasodilatation (Murad et al. 1987; Waldman et al. 1987). Die Regulation der HO-1-Induktion durch cGMP kann über Wege erfolgen. verschiedene Neben einer direkten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 durch cGMP (Pilz et al. 1995), konnte auch eine mögliche Beteiligung der PKG an der cGMP-abhängigen HO-1-Induktion gezeigt werden (Immenschuh et al. 1998a). Eine andere Möglichkeit der HO-1-Regulation durch NO/cGMP liegt in der Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch die cGMP/PDE (Phosphodiesterase) III-vermittelte Hemmung des cAMP-Abbaus (Maurice et al. 1990). Polte et al. beobachteten in Endothelzellen, dass eine Induktion der HO-1 durch NO direkt über cGMP und indirekt durch eine sekundäre Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel erfolgt. Außerdem wirkten cAMP-Analoga und der Adenylatcyclase-Aktivator Forskolin unter diesen Bedingungen endothelprotektiv. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die NO-abhängige Endothelprotektion über eine cAMP-induzierte Erhöhung antioxidativer Proteine erfolgt (Polte et al. 1998; Polte et al. 2000).

Eine Beteiligung von cGMP an der PGE₁-induzierten HO-1-Genexpression konnte aber in den vorliegenden Untersuchungen zum Wirkmechanismus von PGE₁ nicht nachgewiesen werden. Die intrazellulären cGMP-Spiegel blieben unter dem Einfluss von PGE₁ unverändert. Ebenso konnte durch einen Inhibitor der PKG keine Aufhebung der HO-1-Induktion erreicht werden.

Eine Vielzahl an Hormonen und Neurotransmittern vermitteln ihre Effekte nach Aktivierung einer oder mehrerer Isoformen der Adenylatcyclase über cAMP. Das cAMP-Signal wird anschließend über eine Aktivierung der PKA weitergeleitet und verstärkt (Beavo et al. 2002; Meja et al. 2004). Das freigesetzte cAMP bindet an der regulatorischen Untereinheit der PKA und führt zu einer Dissoziation des inaktiven Holoenzvms. Die beiden freigesetzten, katalytisch aktiven k-Untereinheiten wandern in den Zellkern und können dort verschiedene Targets phosphorylieren (Francis et al. 1999). Umgekehrt verbinden sich die Untereinheiten bei Abnahme der cAMP-Konzentration zu einem inaktiven Enzym. Der Abbau von cAMP erfolgt dabei über verschiedene PDE (Meja et al. 2004). Da es inzwischen aber auch einige Berichte gibt, die cAMP-vermittelte Effekte unabhängig von einer Aktivierung der PKA beschreiben (Martin et al. 2001; Beavo et al. 2002), sollte die Beteiligung der PKA am HO-1-Signalweg untersucht werden. Mit Hilfe des spezifischen PKA-Inhibitor KT5720 konnte eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Proteinkinase an der PGE1-vermittelten HO-1-Induktion nachgewiesen werden. Bei einer Vorbehandlung der Zellen mit KT5720 konnte sowohl auf Proteinebene als auch in den Promotorstudien eine Hemmung der HO-1-Induktion gezeigt werden. Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung der Proteinkinase A an der PG-vermittelten HO-1-Genexpression vermuten.

Diese cAMP-vermittelten PKA-Signale können nach Erreichen des Zellkerns zahlreiche Gene durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren regulieren (Daniel et al. 1998; Mayr et al. 2001). Sowohl der PKA-Komplex als auch die r-Untereinheiten können wegen ihrer Größe nicht in den Nukleus eintreten, so dass nur die katalytisch aktiven Untereinheiten über passive Diffusion in den Zellkern gelangen (Meinkoth et al. 1990; Harootunian et al. 1993). Diese phosphorylieren dort Transkriptionsfaktoren wie das CREB. Das CREB mit basischer Leucin-Zipper-Domäne liegt im Zellkern in inaktiver Form vor, wird aber durch die katalytische Untereinheit der PKA am Serin-Rest 133 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Gonzalez et al. 1989). Das phosphorylierte CREB wiederum bindet zusammen mit dem Co-Aktivator CBP an CRE-Sequenzen des Zielgens (Chrivia et al. 1993). Das p300, ein dem CBP sehr ähnliches Protein, wurde lange als weiterer Cofaktor gesehen. Untersuchungen in p300-defizienten Mäusen haben jedoch gezeigt, dass es für die CREB-abhängige Aktivierung der Genexpression nicht erforderlich ist (Yao et al. 1998).

Eine cAMP-vermittelte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor CREB durch PGE₁ konnte von verschiedenen Autoren in anderen Zusammenhängen gezeigt werden (Thomas et al. 1995; Chin et al. 1996; Castano et al. 2003) und wurde daher in der vorliegenden Arbeit nicht wiederholt.

In Rattenhepatozyten konnte Immenschuh für ein CRE/AP-1 Element eine Beteiligung an der HO-1-Signalkaskade nachweisen (Immenschuh et al. 1998a). Weiterhin wurde eine funktionelle CRE-Sequenz auch im humanen HO-1-Promotor identifiziert (Kronke et al. 2003). Um die Aktivierung des humanen HO-1-

Promotors durch PGE₁ hinsichtlich einer Beteiligung von CRE zu untersuchen, wurden Konstrukte verschiedener Länge bzw. mit einer Mutation innerhalb des CRE verwendet. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine Stimulation des HO-1-Promotors über das CRE erfolgt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zu dem möglichen Mechanismus der PGE₁-vermittelten HO-1-Induktion werden in folgendem Schema noch einmal zusammengefasst:



Abbildung 43: Schematische Darstellung des Signalweges der HO-1-Induktion durch PGE₁.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen am Beispiel des PGE₁ eindeutig, dass eine Erhöhung der cAMP-Spiegel und eine Aktivierung cAMP-abhängiger Signalwege zu einer Induktion der HO-1-Genexpression führen.

Das Prostacyclinderivat lloprost erhöhte ebenso wie PGE₁ den cAMP-Spiegel und verhielt sich auch sehr ähnlich im Bezug auf die HO-1-Induktion, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch die PGI₂-vermittelte HO-1-Genaktivierung über die vorgeschlagene Kaskade abläuft. Dies wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Anders verhält es sich mit dem Cyclopentenon-Derivat d-PGJ₂. Es ist in einer Vielzahl von Veröffentlichungen als potenter Induktor der HO-1 beschrieben (Lee et al. 2003; Liu et al. 2004; Zhang et al. 2004). Über den zugrunde liegenden Mechanismus wird aber noch kontrovers diskutiert. Einige Autoren beschreiben d-PGJ₂ als endogenen Liganden für PPAR_y (Jiang et al. 1998; Ricote et al. 1998), während andere argumentieren, die Haupteffekte seien über eine Hemmung des Transkriptionsfaktor NF- κ B (Straus et al. 2000; Cernuda-Morollon et al. 2001) oder über eine Regulierung der MAP-Kinasen (Hortelano et al. 2000; Relic et al. 2004) vermittelt. Die Effekte von d-PGJ₂ auf die HO-1-Genxpression scheinen jedoch unabhängig von PPAR_y zu sein (Wayman et al. 2002). Von Koizumi wird sogar ein spezifisches *Prostaglandin response element* in dem HO-1-Promotor der Ratte postuliert (Koizumi et al. 1995). Auch scheint die spezielle Struktur mit der α , β -ungesättigten Ketongruppe eine wichtige Rolle zu spielen (Straus et al. 2001). Hierzu sind in Zukunft jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

Wie PGE₁ induzierte d-PGJ₂ in den hier verwendeten Endothelzellen die HO-1-Proteinexpression. Auf transkriptioneller Ebene erwies sich d-PGJ₂ gegenüber PGE₁ als stärkerer Induktor der HO-1. Diese grundlegenden Unterschiede lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass PGE1 an der Zelloberfläche an spezifischen Rezeptoren bindet und über die cAMP-Kaskade seine Wirkungen entfaltet. Dagegen wird d-PGJ₂ aktiv in den Zellkern transportiert und bindet dort an nukleären Rezeptoren (Koizumi et al. 1995). Dies wurde auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die d-PGJ₂ vermittelte HO-1-Stimulation im Gegensatz zur HO-1-Induktion durch PGE₁ unabhängig von cAMP stattfindet. Ein weiterer Unterschied besteht hinsichtlich der Struktur. d-PGJ₂ zeichnet sich durch eine α , β -ungesättigte Ketonstruktur aus, die sehr empfänglich für nukleophile Additionsreaktionen mit Thiolen ist (Atsmon et al. 1990). In einer Studie konnte die d-PGJ₂-induzierte HO-1-Genexpression durch Thiolantioxidans das N-Acetvlcvstein und das thiolreduzierende DTT gehemmt werden. Dagegen zeigten andere, nicht thiolhaltige Substanzen wie Vitamin C und E keine hemmenden Effekte. Es wurde daher angenommen, dass eine Induktion der HO-1 durch d-PGJ₂ über eine Oxidation von zellulären Thiolstrukturen stattfindet, wenn auch nicht bekannt ist, um welche Strukturen es sich im Detail handelt (Liu et al. 2004). Die biologische Funktion von d-PGJ₂ und sein potenzieller therapeutischer Nutzen muss noch weiter erforscht werden (Scher et al. 2005). Es soll an dieser Stelle nur darauf hingewiesen werden, dass z.B. in Makrophagen, die eine bedeutende Rolle bei chronisch-entzündlichen Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose spielen, hohe Konzentrationen an d-PGJ₂ gefunden wurden (Shibata et al. 2002). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass d-PGJ2 über eine Induktion der HO-1 in Nierenzellen therapeutische Ansatzpunkte zur Behandlung von entzündlichen Nierenerkrankungen liefern könnte (Zhang et al. 2004).

Das Prostaglandinderivat $PGF_{2\alpha}$ scheint dagegen keine Effekte auf die HO-1-Genexpression zu haben. Dies spricht dafür, dass es sich bei den zuvor genannten Effekten auf die HO-1 nicht um einen Gruppeneffekt aller Prostaglandine handelt, sondern eine Aktivierung der HO-1 durch Prostaglandine über unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird.

In verschiedenen Untersuchungen erwies sich die HO-1 aufgrund ihrer protektiven Eigenschaften als interessante Zielstruktur. So konnte u.a. in einer Studie gezeigt werden, dass Patienten durch einen speziellen GT-Längen-Polymorphismus im humanen HO-Promotor mit einer geringeren HO-1-Aktivität und dadurch mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse reagieren (Funk et al. 2004; Ono et al. 2004). Weiterhin scheint die HO-1 auch eine wichtige Rolle während der Schwangerschaft zu spielen. So führte bei schwangeren Frauen eine verminderte HO-1-Expression am Uterus zu einem erhöhten Risiko für eine Präeklampsie (Bainbridge et al. 2005). Auch der erste Fall einer humanen HO-1-Defizienz bestätigte diese Befunde eindrucksvoll. Ein 6-jähriger Junge zeigte als klinischen Befund eine Hyperlipidämie mit schwerer Atherosklerose und Endothelschädigung (Yachie et al. 1999; Kawashima et al. 2002). Deshalb zielen therapeutische Strategien darauf, durch einen moderaten Anstieg der HO-1-Expression, einen günstigen Einfluss auf die genannten Krankheiten zu erzielen. Die meisten der bekannten HO-1-Induktoren, wie zum Beispiel Cadmiumchlorid, eignen sich jedoch nicht zum therapeutischen Einsatz (Schröder 2005; Immenschuh et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch PGE₁ als potenter HO-1-Induktor Induktion HO-1 charakterisiert werden. Die der ist ein neuartiger Wirkmechanismus, der zusätzlich zu den bekannten Prostaglandineffekten, zur therapeutischen Wirksamkeit bei atherosklerotischen Gefäßveränderungen beitragen könnte.

zahlreichen Studien konnten die protektiven Eigenschaften einer In Überexprimierung der HO-1 auch nach Organtransplantationen nachgewiesen werden (Katori et al. 2002; Camara et al. 2005). Durch eine erhöhte Expression der HO-1 kann einerseits das Überleben des Transplantats gesteigert werden (Soares et al. 1998; Soares et al. 2001), zum anderen unterdrückt die HO-1 beim Empfänger die T-Zellaktivierung und -proliferation, welche eine wichtige Rolle bei der Transplantatabstoßung spielen (Choi et al. 2004; Pae et al. 2004; Yamashita et al. 2006). Protektive Eigenschaften bei Transplantationen wurden auch für PGE1 gefunden. Eine Vorbehandlung mit PGE1 führte z.B bei Rattenlebern zu einer erhöhten Viabilität der Transplantate (Itasaka et al. 1999). Diese Effekte wurden auch in einem Modell für Lungentransplantation gefunden. Diese Studie zeigte weiterhin, dass die bessere Transplantatakzeptanz nicht über eine gefäßerweiternde Wirkung sondern über cAMP vermittelt wird (Naka et al. 1996). Ob die cytoprotektiven Eigenschaften von PGE1 in diesen Modellen zumindest zum Teil in einer Induktion der HO-1 begründet liegen, müssen jedoch weitere Untersuchungen zeigen.

Interessanterweise könnte man sich eine erhöhte HO-1-Expression auch in der therapeutischen Diagnostik zu Nutzen machen. Dabei könnte die HO-1 als wertvoller diagnostischer Parameter für ein Ansprechen der Patienten auf eine Behandlung mit PGE₁ herangezogen werden. Beim Vergleich mehrerer klinischer Studien zur pAVK konnte gezeigt werden, dass nicht alle Patienten auf eine Therapie mit Alprostadil ansprechen (Creutzig et al. 2004). Die Methodik zur HO-1-Bestimmung beim Patienten, z.B. durch Messung des HO-1-Proteins mit Hilfe eines spezifischen ELISA im Plasma, ist bekannt und verfügbar (Schipper et al. 2000). Da nur für solche Patienten, die mit einer erhöhten HO-1-Expression auf eine Alprostadil-Therapie antworten, ein therapeutischer Nutzen erwartet werden kann (Chen et al. 2002b; Yet et al. 2003), wäre eine Voraussage der HO-1-Sensitivität gegenüber einer solchen Behandlung durch genomische Analysen oder die Mikrochip-Array-Technik sehr nützlich. Dies könnte zur Optimierung der Therapie genutzt werden. Durch eine Bestimmung solcher sensitiven Patienten vor Behandlungsbeginn könnte ein wichtiger Schritt in Richtung einer personalisierten Arzneimitteltherapie gemacht und dadurch zu einer signifikanten Reduktion der Therapiekosten beigetragen werden. Hierzu sind aber noch weitere Untersuchungen notwendig, um die beobachteten Effekte *in vivo* zu bestätigen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass das Prostaglandinderivat **PGE**₁ und das Prostacyclinanalogon die lloprost antioxidativen Proteine HO-1 und Ferritin induzieren. Die Induktion erfolgt über eine Erhöhung der cAMP-Spiegel unter Beteiligung von der Proteinkinase A und Transkriptionsfaktor CREB. Die cytoprotektiven, antioxidativen dem und vasodilatatorischen Eigenschaften der HO-1 und ihrer Stoffwechselprodukte könnten einen zusätzlichen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung inflammatorischer Prozesse, wie der arteriellen Verschlusskrankheit und Atherosklerose, mit Prostaglandinderivaten haben.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Alprostadil (PGE₁) und anderer Prostaglandinderivate auf die Expression von Genen mit zellprotektiver Funktion (HO-1, Ferritin) untersucht.

Das Prostaglandinderivat PGE₁ konnte die HO-1 auf Proteinebene in verschiedenen Endothelzelllinien und in Makrophagen induzieren. Diese Effekte waren sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig.

Das Prostacyclinanalogon lloprost und das Prostaglandinderivat d-PGJ₂ zeigten ebenso eine konzentrationsabhängige Induktion des HO-1-Proteins. Dagegen wurden für das Prostaglandinderivat PGF₂ keine Effekte auf die HO-1-Proteinexpression gefunden, so dass nicht von einem Gruppeneffekt der Prostaglandine gesprochen werden kann.

Gekoppelt an die Freisetzung des Häm-Eisens durch die HO-1 ist die Expression eines zweiten antioxidativ wirksamen Stressproteins, des Eisenspeicherproteins Ferritin. In verschiedenen Zelllinien führte eine Vorbehandlung mit PGE₁ auch zu einer Zunahme der Ferritinproteinexpression.

Mit Hilfe von Promotorstudien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte transkriptionelle Aktivität die Grundlage für die vermehrte HO-1-Proteinsynthese ist. Während PGE₁, PGI₂ und d-PGJ₂ die Transkription des HO-1-Gens erhöhten, konnten für PGF₂ wie schon auf translationaler Ebene keine stimulierenden Effekte nachgewiesen werden. Für PGE₁ wurden die Ergebnisse sowohl mit Hilfe einer *in vivo*-Biolumineszenzmessung der Promotoraktivität als auch auf mRNA-Ebene bestätigt.

Durch die Bestimmung der HO-Aktivität konnte gezeigt werden, dass eine 24stündige Inkubation mit PGE₁ zur Bildung eines katalytisch aktiven Enzyms in Endothelzellen führt.

Inwieweit sich die PGE₁-vermittelte HO-1-Induktion funktionell als antioxidative Schutzwirkung manifestiert, wurde in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress untersucht. Eine direkte Zugabe von PGE₁ zeigte keinen Einfluss auf die ROS-Spiegel. Im Gegensatz dazu reduzierte eine 24stündige PGE₁-Vorinkubation mit anschließendem Auswaschen die NADPH-induzierte Superoxidradikalbildung signifikant. Für das HO-1-Produkt Bilirubin konnte im gleichen Modell ebenfalls konzentrationsabhängige, antioxidative Effekte gezeigt werden, was darauf schließen lässt, dass Bilirubin als Mediator der antioxidativen PGE₁-Effekte fungieren kann.

Das cyclische Nukleotid cAMP ist ein wichtiger Botenstoff für Prostaglandinvermittelte Effekte. Es wurden daher die intrazellulären cAMP-Spiegel nach Behandlung mit den entsprechenden Prostaglandinderivaten bestimmt. Für PGE₁ und Iloprost konnte in den verwendeten Zelllinien eine konzentrationsabhängige Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel gezeigt werden. Dagegen erhöhten d-PGJ₂ und PGF_{2α} in den eingesetzten Konzentrationen die cAMP-Konzentrationen nicht. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Botenstoff cAMP und der Induktion der HO-1 durch PGE₁ konnte in abschließenden Untersuchungen dargestellt werden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass ein membrangängiges Analogon des cyclischen Nukleotids cAMP sowohl die HO-1-Proteinexpression als auch die HO-1-Promotoraktivität erhöht. Unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren der Adenylatcyclase (DDA) und der Proteinkinase A (KT5723) konnte die PGE₁vermittlelte HO-1-Induktion nahezu vollständig aufgehoben werden. Dies spricht für eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A an der HO-1-Genregualtion durch PGE₁. Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte die Beteiligung eines CRE bei der PGE₁-induzierten Aktivierung des HO-1-Promotors festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PGE_1 ein potenter Aktivator des HO-1/Ferritin-Systems ist. Während sich auch die Derivate d-PGJ₂ und PGI₂ als potente Induktoren erwiesen, zeigte $PGF_{2\alpha}$ keine Effekte. Die Induktion der HO-1 über eine cAMP-abhängige Kaskade durch PGE_1 ist ein hier erstmalig beschriebener Signalweg. Neben den bekannten vaskulären Effekten stellt die hier beschriebene HO-1-Induktion eine neuartige Wirkqualität cAMP-stimulierender Prostaglandine dar. Die zellprotektiven und antioxidativen Eigenschaften der HO-1 könnten einen zusätzlichen therapeutischen Nutzen bei der Therapie der arteriellen Verschlusskrankheit, aber auch bei anderen inflammatorischen Prozessen wie Atherosklerose bedeuten.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, N. G., Kushida, T., McClung, J., Weiss, M., Quan, S., Lafaro, R., Darzynkiewicz, Z. and Wolin, M. (2003). Heme Oxygenase-1 Attenuates Glucose-Mediated Cell Growth Arrest and Apoptosis in Human Microvessel Endothelial Cells. *Circ Res* 93(6): 507-514.
- Aghajanian, A. A., Oguogho, A. and Sinzinger, H. (1997). [Isoprostanes, a New Substance Group in Angiology--of Future Significance?]. *Vasa* 26(2): 65-69.
- Alam, J. (1994). Multiple Elements within the 5' Distal Enhancer of the Mouse Heme Oxygenase-1 Gene Mediate Induction by Heavy Metals. *J Biol Chem* 269(40): 25049-25056.
- Alam, J., Cai, J. and Smith, A. (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): 1001-1009.
- Alam, J. and Cook, J. L. (1990). Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription. *Anal Biochem* 188(2): 245-254.
- Alam, J. and Cook, J. L. (2007). How Many Transcription Factors Does It Take to Turn on the Heme Oxygenase-1 Gene? Am J Respir Cell Mol Biol 36(2): 166-174.
- Alam, J. and Den, Z. (1992). Distal Ap-1 Binding Sites Mediate Basal Level Enhancement and Tpa Induction of the Mouse Heme Oxygenase-1 Gene. J Biol Chem 267(30): 21894-21900.
- Alam, J., Killeen, E., Gong, P., Naquin, R., Hu, B., Stewart, D., Ingelfinger, J.
 R. and Nath, K. A. (2003). Heme Activates the Heme Oxygenase-1 Gene in Renal Epithelial Cells by Stabilizing Nrf2. Am J Physiol Renal Physiol 284(4): F743-752.
- Alam, J., Shibahara, S. and Smith, A. (1989). Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase Gene by Heme and Cadmium in Mouse Hepatoma Cells. *J Biol Chem* 264(11): 6371-6375.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M. and Cook, J. L. (1999). Nrf2, a Cap'n'collar Transcription Factor, Regulates Induction of the Heme Oxygenase-1 Gene. *J Biol Chem* 274(37): 26071-26078.
- Alam, J., Wicks, C., Stewart, D., Gong, P., Touchard, C., Otterbein, S., Choi,
 A. M., Burow, M. E. and Tou, J. (2000). Mechanism of Heme Oxygenase1 Gene Activation by Cadmium in Mcf-7 Mammary Epithelial Cells. Role of
 P38 Kinase and Nrf2 Transcription Factor. J Biol Chem 275(36): 2769427702.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J. and Stark, G. R. (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): 5350-5354.
- Atsmon, J., Freeman, M. L., Meredith, M. J., Sweetman, B. J. and Roberts, L. J., 2nd (1990). Conjugation of 9-Deoxy-Delta 9,Delta 12(E)-Prostaglandin D2 with Intracellular Glutathione and Enhancement of Its Antiproliferative Activity by Glutathione Depletion. *Cancer Res* 50(6): 1879-1885.
- Aziz, N. and Munro, H. N. (1986). Both Subunits of Rat Liver Ferritin Are Regulated at a Translational Level by Iron Induction. *Nucleic Acids Res* 14(2): 915-927.
- Bach, F. H. (2005). Heme Oxygenase-1: A Therapeutic Amplification Funnel.

Faseb J 19(10): 1216-1219.

- Bainbridge, S. A. and Smith, G. N. (2005). Ho in Pregnancy. Free Radic Biol Med 38(8): 979-988.
- Balla, G., Jacob, H. S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.
 W. and Vercellotti, G. M. (1992). Ferritin: A Cytoprotective Antioxidant Strategem of Endothelium. *J Biol Chem* 267(25): 18148-18153.
- Balla, J., Vercellotti, G. M., Nath, K., Yachie, A., Nagy, E., Eaton, J. W. and Balla, G. (2003). Haem, Haem Oxygenase and Ferritin in Vascular Endothelial Cell Injury. *Nephrol Dial Transplant* 18 Suppl 5: v8-12.
- Bauer, I., Rensing, H., Florax, A., Ulrich, C., Pistorius, G., Redl, H. and Bauer,
 M. (2003). Expression Pattern and Regulation of Heme Oxygenase-1/Heat
 Shock Protein 32 in Human Liver Cells. *Shock* 20(2): 116-122.
- Beavo, J. A. and Brunton, L. L. (2002). Cyclic Nucleotide Research -- Still Expanding after Half a Century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 710-718.
- Becker, J. C., Domschke, W. and Pohle, T. (2004). Current Approaches to Prevent Nsaid-Induced Gastropathy--Cox Selectivity and Beyond. *Br J Clin Pharmacol* 58(6): 587-600.
- Becker, J. C., Grosser, N., Boknik, P., Schröder, H., Domschke, W. and Pohle, T. (2003). Gastroprotection by Vitamin C--a Heme Oxygenase-1-Dependent Mechanism? *Biochem Biophys Res Commun* 312(2): 507-512.
- Becker, J. C., Grosser, N., Waltke, C., Schulz, S., Erdmann, K., Domschke,
 W., Schröder, H. and Pohle, T. (2006). Beyond Gastric Acid Reduction: Proton Pump Inhibitors Induce Heme Oxygenase-1 in Gastric and Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345(3): 1014-1021.
- Belch, J. J. and Hill, A. (2000). Evening Primrose Oil and Borage Oil in Rheumatologic Conditions. *Am J Clin Nutr* 71(1 Suppl): 352S-356S.
- Belton, O., Byrne, D., Kearney, D., Leahy, A. and Fitzgerald, D. J. (2000). Cyclooxygenase-1 and -2-Dependent Prostacyclin Formation in Patients with Atherosclerosis. *Circulation* 102(8): 840-845.
- Bennett, B. M., Leitman, D. C., Schröder, H., Kawamoto, J. H., Nakatsu, K. and Murad, F. (1989). Relationship between Biotransformation of Glyceryl Trinitrate and Cyclic Gmp Accumulation in Various Cultured Cell Lines. J Pharmacol Exp Ther 250(1): 316-323.
- Bergstroem, S., Danielsson, H. and Samuelsson, B. (1964). The Enzymatic Formation of Prostaglandin E2 from Arachidonic Acid Prostaglandins and Related Factors 32. *Biochim Biophys Acta* 90: 207-210.
- Bergstroem, S., Ryhage, R., Samuelsson, B. and Sjoevall, J. (1963). Prostaglandins and Related Factors. 15. The Structures of Prostaglandin E1, F1-Alpha, and F1-Beta. *J Biol Chem* 238: 3555-3564.
- Bergstrom, S., Carlson, L. A. and Weeks, J. R. (1968). The Prostaglandins: A Family of Biologically Active Lipids. *Pharmacol Rev* 20(1): 1-48.
- Bergstrom, S. and Samuelsson, B. (1962). Isolation of Prostaglandin E1 from Human Seminal Plasma. Prostaglandins and Related Factors. 11. *J Biol Chem* 237: 3005-3006.
- Berndt, G., Grosser, N., Hoogstraate, J. and Schröder, H. (2005). Azd3582 Increases Heme Oxygenase-1 Expression and Antioxidant Activity in Vascular Endothelial and Gastric Mucosal Cells. *Eur J Pharm Sci* 25(2-3): 229-235.
- Berry, E. B., Keelan, J. A., Helliwell, R. J., Gilmour, R. S. and Mitchell, M. D. (2005). Nanomolar and Micromolar Effects of 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2 on Amnion-Derived Wish Epithelial Cells: Differential

Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma and Delta and Nuclear Factor Kappa B. *Mol Pharmacol* 68(1): 169-178.

- Bevilacqua, M. A., Faniello, M. C., Quaresima, B., Tiano, M. T., Giuliano, P., Feliciello, A., Avvedimento, V. E., Cimino, F. and Costanzo, F. (1997). A Common Mechanism Underlying the E1a Repression and the Camp Stimulation of the H Ferritin Transcription. J Biol Chem 272(33): 20736-20741.
- Bevilacqua, M. A., Faniello, M. C., Russo, T., Cimino, F. and Costanzo, F. (1994). Transcriptional Regulation of the Human H Ferritin-Encoding Gene (Ferh) in G418-Treated Cells: Role of the B-Box-Binding Factor. *Gene* 141(2): 287-291.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Chattopadhyay, I., Varadaraj, A., Ali, E. and Banerjee, R. K. (2003). A Novel Antioxidant and Antiapoptotic Role of Omeprazole to Block Gastric Ulcer through Scavenging of Hydroxyl Radical. J Biol Chem 278(13): 10993-11001.
- Bombardier, C., Laine, L., Reicin, A., Shapiro, D., Burgos-Vargas, R., Davis, B., Day, R., Ferraz, M. B., Hawkey, C. J., Hochberg, M. C., Kvien, T. K. and Schnitzer, T. J. (2000). Comparison of Upper Gastrointestinal Toxicity of Rofecoxib and Naproxen in Patients with Rheumatoid Arthritis. Vigor Study Group. N Engl J Med 343(21): 1520-1528, 1522 p following 1528.
- Borrelli, E., Montmayeur, J. P., Foulkes, N. S. and Sassone-Corsi, P. (1992). Signal Transduction and Gene Control: The Camp Pathway. *Crit Rev Oncog* 3(4): 321-338.
- Bourne, H. R., Lichtenstein, L. M., Melmon, K. L., Henney, C. S., Weinstein, Y. and Shearer, G. M. (1974). Modulation of Inflammation and Immunity by Cyclic Amp. *Science* 184(132): 19-28.
- Bousser, M. G. and Lecrubier, C. (1972). Effect of Prostaglandin E1 on Experimental Thrombosis and Platelet Aggregation in Rabbits. *Haemostasis* 1(5): 294-303.
- 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: 248-254.
- Braun, M., Bruch, L., Ney, P., Torsello, G. and Schrör, K. (1991). Actions of Pge₀ and 15-Keto-Pge₁ on Vessel Tone in Vitro. Springer Verlag.
- Camara, N. O. and Soares, M. P. (2005). Heme Oxygenase-1 (Ho-1), a Protective Gene That Prevents Chronic Graft Dysfunction. *Free Radic Biol Med* 38(4): 426-435.
- Camhi, S. L., Alam, J., Wiegand, G. W., Chin, B. Y. and Choi, A. M. (1998). Transcriptional Activation of the Ho-1 Gene by Lipopolysaccharide Is Mediated by 5' Distal Enhancers: Role of Reactive Oxygen Intermediates and Ap-1. Am J Respir Cell Mol Biol 18(2): 226-234.
- Cantley, L. C. (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. Science 296(5573): 1655-1657.
- Cardell, L. O., Ueki, I. F., Stjarne, P., Agusti, C., Takeyama, K., Linden, A. and Nadel, J. A. (1998). Bronchodilatation in Vivo by Carbon Monoxide, a Cyclic Gmp Related Messenger. *Br J Pharmacol* 124(6): 1065-1068.
- Carlson, L. A., Irion, E. and Oro, L. (1968). Effect of Infusion of Prostaglandin E1 on the Aggregation of Blood Platelets in Man. *Life Sci* 7(1): 85-90.
- Castano, E. and Gil, J. (2003). 15-Deoxy-Delta12,14 Prostaglandin J2

Synergizes with Phorbol Ester to Induce Proliferation in Swiss 3t3 Cells Independently of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Pgd2 Receptors. *J Cell Physiol* 195(3): 421-427.

- **Cathcart, M. K.** (2004). Regulation of Superoxide Anion Production by Nadph Oxidase in Monocytes/Macrophages: Contributions to Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(1): 23-28.
- Cawello, W., Leonhardt, A., Schweer, H., Seyberth, H. W., Bonn, R. and Lomeli, A. L. (1995). Dose Proportional Pharmacokinetics of Alprostadil (Prostaglandin E1) in Healthy Volunteers Following Intravenous Infusion. Br J Clin Pharmacol 40(3): 273-276.
- Cernuda-Morollon, E., Pineda-Molina, E., Canada, F. J. and Perez-Sala, D. (2001). 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2 Inhibition of Nf-Kappab-DNA Binding through Covalent Modification of the P50 Subunit. *J Biol Chem* 276(38): 35530-35536.
- Chazenbalk, G. D., Wadsworth, H. L. and Rapoport, B. (1990). Transcriptional Regulation of Ferritin H Messenger Rna Levels in Frtl5 Rat Thyroid Cells by Thyrotropin. *J Biol Chem* 265(2): 666-670.
- Chen, Y. C., Shen, S. C., Lee, W. R., Lin, H. Y., Ko, C. H. and Lee, T. J. (2002a). Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Participate in Lipopolysaccharide/Interferon-Gamma-Induced Heme Oxygenase 1 and Prevent Raw264.7 Macrophages from Uv-Irradiation-Induced Cell Death. J Cell Biochem 86(2): 331-339.
- Chen, Y. H., Lin, S. J., Lin, M. W., Tsai, H. L., Kuo, S. S., Chen, J. W., Charng, M. J., Wu, T. C., Chen, L. C., Ding, Y. A., Pan, W. H., Jou, Y. S. and Chau, L. Y. (2002b). Microsatellite Polymorphism in Promoter of Heme Oxygenase-1 Gene Is Associated with Susceptibility to Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetic Patients. *Hum Genet* 111(1): 1-8.
- Cheng, Y., Austin, S. C., Rocca, B., Koller, B. H., Coffman, T. M., Grosser, T., Lawson, J. A. and FitzGerald, G. A. (2002). Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A2. *Science* 296(5567): 539-541.
- Chin, J. H., Okazaki, M., Frazier, J. S., Hu, Z. W. and Hoffman, B. B. (1996). Impaired Camp-Mediated Gene Expression and Decreased Camp Response Element Binding Protein in Senescent Cells. *Am J Physiol* 271(1 Pt 1): C362-371.
- Chinery, R., Coffey, R. J., Graves-Deal, R., Kirkland, S. C., Sanchez, S. C., Zackert, W. E., Oates, J. A. and Morrow, J. D. (1999). Prostaglandin J2 and 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J2 Induce Proliferation of Cyclooxygenase-Depleted Colorectal Cancer Cells. *Cancer Res* 59(11): 2739-2746.
- Choi, A. M. and Alam, J. (1996). Heme Oxygenase-1: Function, Regulation, and Implication of a Novel Stress-Inducible Protein in Oxidant-Induced Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(1): 9-19.
- Choi, B. M., Pae, H. O., Jeong, Y. R., Oh, G. S., Jun, C. D., Kim, B. R., Kim, Y. M. and Chung, H. T. (2004). Overexpression of Heme Oxygenase (Ho)-1 Renders Jurkat T Cells Resistant to Fas-Mediated Apoptosis: Involvement of Iron Released by Ho-1. *Free Radic Biol Med* 36(7): 858-871.
- **Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-159.
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R. and

Goodman, R. H. (1993). Phosphorylated Creb Binds Specifically to the Nuclear Protein Cbp. *Nature* 365(6449): 855-859.

- Cippitelli, M., Fionda, C., Di Bona, D., Lupo, A., Piccoli, M., Frati, L. and Santoni, A. (2003). The Cyclopentenone-Type Prostaglandin 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2 Inhibits Cd95 Ligand Gene Expression in T Lymphocytes: Interference with Promoter Activation Via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma-Independent Mechanisms. *J Immunol* 170(9): 4578-4592.
- Clark, J. E., Foresti, R., Sarathchandra, P., Kaur, H., Green, C. J. and Motterlini, R. (2000). Heme Oxygenase-1-Derived Bilirubin Ameliorates Postischemic Myocardial Dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(2): H643-651.
- Coleman, R. A., Smith, W. L. and Narumiya, S. (1994). International Union of Pharmacology Classification of Prostanoid Receptors: Properties, Distribution, and Structure of the Receptors and Their Subtypes. *Pharmacol Rev* 46(2): 205-229.
- Comb, M., Birnberg, N. C., Seasholtz, A., Herbert, E. and Goodman, H. M. (1986). A Cyclic Amp- and Phorbol Ester-Inducible DNA Element. *Nature* 323(6086): 353-356.
- **Creutzig, A., Lehmacher, W. and Elze, M.** (2004). Meta-Analysis of Randomised Controlled Prostaglandin E1 Studies in Peripheral Arterial Occlusive Disease Stages lii and Iv. *Vasa* 33(3): 137-144.
- Crutchley, D. J., Conanan, L. B. and Maynard, J. R. (1982). Stimulation of Fibrinolytic Activity in Human Skin Fibroblasts by Prostaglandins E1, E2 and I2. *J Pharmacol Exp Ther* 222(3): 544-549.
- Dailey, M. O., Schreurs, J. and Schulman, H. (1988). Hormone Receptors on Cloned T Lymphocytes. Increased Responsiveness to Histamine, Prostaglandins, and Beta-Adrenergic Agents as a Late Stage Event in T Cell Activation. J Immunol 140(9): 2931-2936.
- **Dajani, E. Z. and Agrawal, N. M.** (1989). Protective Effects of Prostaglandins against Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Gastrointestinal Mucosal Injury. *Int J Clin Pharmacol Res* 9(6): 359-369.
- Daniel, P. B., Walker, W. H. and Habener, J. F. (1998). Cyclic Amp Signaling and Gene Regulation. *Annu Rev Nutr* 18: 353-383.
- Davies, P., Bailey, P. J., Goldenberg, M. M. and Ford-Hutchinson, A. W. (1984). The Role of Arachidonic Acid Oxygenation Products in Pain and Inflammation. *Annu Rev Immunol* 2: 335-357.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. and Subramani, S. (1987). Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol* 7(2): 725-737.
- **Dembinska-Kiec, A., Rucker, W. and Schonhofer, P. S.** (1980). Effects of Pgi2 and Pgi Analogues on Camp Levels in Cultured Endothelial and Smooth Muscle Cells Derived from Bovine Arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 311(1): 67-70.
- Dennery, P. A., McDonagh, A. F., Spitz, D. R., Rodgers, P. A. and Stevenson, D. K. (1995). Hyperbilirubinemia Results in Reduced Oxidative Injury in Neonatal Gunn Rats Exposed to Hyperoxia. *Free Radic Biol Med* 19(4): 395-404.
- Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C. D., Zakhary, R., Hester, L. D., Guastella, D. and Snyder, S. H. (1999). Bilirubin, Formed by Activation of Heme Oxygenase-2, Protects Neurons against Oxidative Stress Injury. Proc Natl

Acad Sci U S A 96(5): 2445-2450.

- **Duboff, G. S., Penner, J. A. and Rohwedder, J.** (1974). Effect of Prostaglandins E1, E2 and F2alpha on Human Blood Coagulation. *Nature* 251(5474): 430-431.
- Durante, W., Christodoulides, N., Cheng, K., Peyton, K. J., Sunahara, R. K. and Schafer, A. I. (1997). Camp Induces Heme Oxygenase-1 Gene Expression and Carbon Monoxide Production in Vascular Smooth Muscle. *Am J Physiol* 273(1 Pt 2): H317-323.
- Echeverria, V., Clerman, A. and Dore, S. (2005). Stimulation of Pge Receptors Ep2 and Ep4 Protects Cultured Neurons against Oxidative Stress and Cell Death Following Beta-Amyloid Exposure. *Eur J Neurosci* 22(9): 2199-2206.
- Eisenstein, R. S., Garcia-Mayol, D., Pettingell, W. and Munro, H. N. (1991). Regulation of Ferritin and Heme Oxygenase Synthesis in Rat Fibroblasts by Different Forms of Iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(3): 688-692.
- **Erdmann, K., Grosser, N., Schipporeit, K. and Schröder, H.** (2006). The Ace Inhibitory Dipeptide Met-Tyr Diminishes Free Radical Formation in Human Endothelial Cells Via Induction of Heme Oxygenase-1 and Ferritin. *J Nutr* 136(8): 2148-2152.
- Erdmann, K., Grosser, N. and Schröder, H. (2005). L-Methionine Reduces Oxidant Stress in Endothelial Cells: Role of Heme Oxygenase-1, Ferritin, and Nitric Oxide. *Aaps J* 7(1): E195-200.
- Exner, M., Bohmig, G. A., Schillinger, M., Regele, H., Watschinger, B., Horl, W. H., Raith, M., Mannhalter, C. and Wagner, O. F. (2004). Donor Heme Oxygenase-1 Genotype Is Associated with Renal Allograft Function. *Transplantation* 77(4): 538-542.
- Fan, Y. Y. and Chapkin, R. S. (1992). Mouse Peritoneal Macrophage Prostaglandin E1 Synthesis Is Altered by Dietary Gamma-Linolenic Acid. *J Nutr* 122(8): 1600-1606.
- Fan, Y. Y., Ramos, K. S. and Chapkin, R. S. (1997). Dietary Gamma-Linolenic Acid Enhances Mouse Macrophage-Derived Prostaglandin E1 Which Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. J Nutr 127(9): 1765-1771.
- Faniello, M. C., Bevilacqua, M. A., Condorelli, G., de Crombrugghe, B., Maity, S. N., Avvedimento, V. E., Cimino, F. and Costanzo, F. (1999). The B Subunit of the Caat-Binding Factor Nfy Binds the Central Segment of the Co-Activator P300. J Biol Chem 274(12): 7623-7626.
- Faniello, M. C., Chirico, G., Quaresima, B., Cuda, G., Allevato, G., Bevilacqua, M. A., Baudi, F., Colantuoni, V., Cimino, F., Venuta, S., Avvedimento, V.
 E. and Costanzo, F. (2002). An Alternative Model of H Ferritin Promoter Transactivation by C-Jun. *Biochem J* 363(Pt 1): 53-58.
- **Fantone, J. C., Kunkel, S. L. and Ward, P. A.** (1981). Suppression of Human Polymorphonuclear Function after Intravenous Infusion of Prostaglandin E1. *Prostaglandins Med* 7(2): 195-198.
- Farombi, E. O. and Surh, Y. J. (2006). Heme Oxygenase-1 as a Potential Therapeutic Target for Hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol* 39(5): 479-491.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal Biochem* 132(1): 6-13.
- Fitscha, P., Simmet, T., Peskar, B. A., Reuter, H., Sinzinger, H., Rogatti, W. and Tilsner, V. (1988). [Fibrinolytic Activity, Thrombocyte Function and

Pharmacokinetics During Intra-Arterial or Intravenous Prostaglandin E1 Infusion in Patients with Chronic Arterial Occlusive Disease]. *Wien Klin Wochenschr* 100(14): 477-481.

- FitzGerald, G. A., Pedersen, A. K. and Patrono, C. (1983). Analysis of Prostacyclin and Thromboxane Biosynthesis in Cardiovascular Disease. *Circulation* 67(6): 1174-1177.
- Flavahan, N. A. (1992). Atherosclerosis or Lipoprotein-Induced Endothelial Dysfunction. Potential Mechanisms Underlying Reduction in Edrf/Nitric Oxide Activity. *Circulation* 85(5): 1927-1938.
- Fogg, S., Agarwal, A., Nick, H. S. and Visner, G. A. (1999). Iron Regulates Hyperoxia-Dependent Human Heme Oxygenase 1 Gene Expression in Pulmonary Endothelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(4): 797-804.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. and Evans, R. M. (1995). 15-Deoxy-Delta 12, 14-Prostaglandin J2 Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor Ppar Gamma. *Cell* 83(5): 803-812.
- Francis, S. H. and Corbin, J. D. (1999). Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases: Intracellular Receptors for Camp and Cgmp Action. *Crit Rev Clin Lab Sci* 36(4): 275-328.
- Friedl, A., Harmening, C., Schuricht, B. and Hamprecht, B. (1985). Rat Atrial Natriuretic Peptide Elevates the Level of Cyclic Gmp in Astroglia-Rich Brain Cell Cultures. *Eur J Pharmacol* 111(1): 141-142.
- Fujita, T., Toda, K., Karimova, A., Yan, S. F., Naka, Y., Yet, S. F. and Pinsky, D. J. (2001). Paradoxical Rescue from Ischemic Lung Injury by Inhaled Carbon Monoxide Driven by Derepression of Fibrinolysis. *Nat Med* 7(5): 598-604.
- Funk, M., Endler, G., Schillinger, M., Mustafa, S., Hsieh, K., Exner, M., Lalouschek, W., Mannhalter, C. and Wagner, O. (2004). The Effect of a Promoter Polymorphism in the Heme Oxygenase-1 Gene on the Risk of Ischaemic Cerebrovascular Events: The Influence of Other Vascular Risk Factors. *Thromb Res* 113(3-4): 217-223.
- Gardinali, M., Pozzi, M. R., Bernareggi, M., Montani, N., Allevi, E., Catena, L., Cugno, M., Bottasso, B. and Stabilini, R. (2001). Treatment of Raynaud's Phenomenon with Intravenous Prostaglandin E1alpha-Cyclodextrin Improves Endothelial Cell Injury in Systemic Sclerosis. *J Rheumatol* 28(4): 786-794.
- Gensch, C., Clever, Y., Werner, C., Hanhoun, M., Bohm, M. and Laufs, U. (2007). Regulation of Endothelial Progenitor Cells by Prostaglandin E1 Via Inhibition of Apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 42(3): 670-677.
- Giannattasio, C., Pozzi, M., Gradinali, M., Montemerlo, E., Citterio, F., Maestroni, S., Fantini, E., Failla, M., Robuschi, M., Bianco, S. and Mancia, G. (2007). Effects of Prostaglandin E1alpha Cyclodestrin Treatment on Endothelial Dysfunction in Patients with Systemic Sclerosis. J Hypertens 25(4): 793-797.
- Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M. J. and Willoughby, D. A. (1999). Inducible Cyclooxygenase May Have Anti-Inflammatory Properties. *Nat Med* 5(6): 698-701.
- Gong, P., Stewart, D., Hu, B., Li, N., Cook, J., Nel, A. and Alam, J. (2002). Activation of the Mouse Heme Oxygenase-1 Gene by 15-Deoxy-Delta(12,14)-Prostaglandin J(2) Is Mediated by the Stress Response Elements and Transcription Factor Nrf2. Antioxid Redox Signal 4(2): 249-257.

- Gonzalez, G. A. and Montminy, M. R. (1989). Cyclic Amp Stimulates Somatostatin Gene Transcription by Phosphorylation of Creb at Serine 133. *Cell* 59(4): 675-680.
- Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D. and Alexander, R. W. (1994). Angiotensin Ii Stimulates Nadh and Nadph Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 74(6): 1141-1148.
- Griendling, K. K., Sorescu, D. and Ushio-Fukai, M. (2000). Nad(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res* 86(5): 494-501.
- Grimminger, F., Sibelius, U. and Seeger, W. (1991). Amplification of Ltb4 Generation in Am-Pmn Cocultures: Transcellular 5-Lipoxygenase Metabolism. *Am J Physiol* 261(2 Pt 1): L195-203.
- Grosser, N., Abate, A., Oberle, S., Vreman, H. J., Dennery, P. A., Becker, J. C., Pohle, T., Seidman, D. S. and Schröder, H. (2003). Heme Oxygenase-1 Induction May Explain the Antioxidant Profile of Aspirin. *Biochem Biophys Res Commun* 308(4): 956-960.
- Grosser, N., Hemmerle, A., Berndt, G., Erdmann, K., Hinkelmann, U., Schürger, S., Wijayanti, N., Immenschuh, S. and Schröder, H. (2004). The Antioxidant Defense Protein Heme Oxygenase 1 Is a Novel Target for Statins in Endothelial Cells. *Free Radic Biol Med* 37(12): 2064-2071.
- Gruß, J. D., Hanschke, D., Geißler, C. and Generotzky, K. (2001). Die Prostaglandintherapie Der Pavk. *Gefässchirugie* 6(5): S60-S66.
- Gudi, T., Huvar, I., Meinecke, M., Lohmann, S. M., Boss, G. R. and Pilz, R. B. (1996). Regulation of Gene Expression by Cgmp-Dependent Protein Kinase. Transactivation of the C-Fos Promoter. *J Biol Chem* 271(9): 4597-4600.
- Guo, J. S., Cho, C. H., Wang, W. P., Shen, X. Z., Cheng, C. L. and Koo, M. W. (2003). Expression and Activities of Three Inducible Enzymes in the Healing of Gastric Ulcers in Rats. *World J Gastroenterol* 9(8): 1767-1771.
- Guzik, T. J., West, N. E., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R. and Channon, K. M. (2000a). Ultrarapid Communications : Vascular Superoxide Production by Nad(P)H Oxidaseassociation with Endothelial Dysfunction and Clinical Risk Factors. *Circ Res* 86(9): 1008.
- Guzik, T. J., West, N. E., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R. and Channon, K. M. (2000b). Vascular Superoxide Production by Nad(P)H Oxidase: Association with Endothelial Dysfunction and Clinical Risk Factors. *Circ Res* 86(9): E85-90.
- Haile, D. J., Hentze, M. W., Rouault, T. A., Harford, J. B. and Klausner, R. D. (1989). Regulation of Interaction of the Iron-Responsive Element Binding Protein with Iron-Responsive Rna Elements. *Mol Cell Biol* 9(11): 5055-5061.
- Hajdena-Dawson, M., Zhang, W., Contag, P. R., Wong, R. J., Vreman, H. J., Stevenson, D. K. and Contag, C. H. (2003). Effects of Metalloporphyrins on Heme Oxygenase-1 Transcription: Correlative Cell Culture Assays Guide in Vivo Imaging. *Mol Imaging* 2(3): 138-149.
- Ham, E. A., Soderman, D. D., Zanetti, M. E., Dougherty, H. W., McCauley, E. and Kuehl, F. A., Jr. (1983). Inhibition by Prostaglandins of Leukotriene B4 Release from Activated Neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(14): 4349-4353.
- Harootunian, A. T., Adams, S. R., Wen, W., Meinkoth, J. L., Taylor, S. S. and Tsien, R. Y. (1993). Movement of the Free Catalytic Subunit of Camp-Dependent Protein Kinase into and out of the Nucleus Can Be Explained by
Diffusion. Mol Biol Cell 4(10): 993-1002.

- Harrison, P. M. and Arosio, P. (1996). The Ferritins: Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275(3): 161-203.
- Hayashi, M., Takahashi, T., Morimatsu, H., Fujii, H., Taga, N., Mizobuchi, S., Matsumi, M., Katayama, H., Yokoyama, M., Taniguchi, M. and Morita, K. (2004). Increased Carbon Monoxide Concentration in Exhaled Air after Surgery and Anesthesia. *Anesth Analg* 99(2): 444-448, table of contents.
- Hayashi, S., Takamiya, R., Yamaguchi, T., Matsumoto, K., Tojo, S. J., Tamatani, T., Kitajima, M., Makino, N., Ishimura, Y. and Suematsu, M. (1999). Induction of Heme Oxygenase-1 Suppresses Venular Leukocyte Adhesion Elicited by Oxidative Stress: Role of Bilirubin Generated by the Enzyme. *Circ Res* 85(8): 663-671.
- Hecker, G., Ney, P. and Schrör, K. (1990). Cytotoxic Enzyme Release and Oxygen Centered Radical Formation in Human Neutrophils Are Selectively Inhibited by E-Type Prostaglandins but Not by Pgi2. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 341(4): 308-315.
- **Heidrich, H.** (2006). [Vasoactive Agents and Prostanoids in the Therapy of Pad: Facts, Questions, Disproven Assumptions]. *Hamostaseologie* 26(3): 220-223.
- Hinz, B. and Schröder, H. (1998). Vitamin C Attenuates Nitrate Tolerance Independently of Its Antioxidant Effect. *FEBS Lett* 428(1-2): 97-99.
- Hoeffler, J. P., Meyer, T. E., Yun, Y., Jameson, J. L. and Habener, J. F. (1988). Cyclic Amp-Responsive DNA-Binding Protein: Structure Based on a Cloned Placental Cdna. *Science* 242(4884): 1430-1433.
- Hopkins, P. N., Wu, L. L., Hunt, S. C., James, B. C., Vincent, G. M. and Williams, R. R. (1996). Higher Serum Bilirubin Is Associated with Decreased Risk for Early Familial Coronary Artery Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 16(2): 250-255.
- Hortelano, S., Castrillo, A., Alvarez, A. M. and Bosca, L. (2000). Contribution of Cyclopentenone Prostaglandins to the Resolution of Inflammation through the Potentiation of Apoptosis in Activated Macrophages. *J Immunol* 165(11): 6525-6531.
- Horvath, I., Donnelly, L. E., Kiss, A., Paredi, P., Kharitonov, S. A. and Barnes, P. J. (1998). Raised Levels of Exhaled Carbon Monoxide Are Associated with an Increased Expression of Heme Oxygenase-1 in Airway Macrophages in Asthma: A New Marker of Oxidative Stress. *Thorax* 53(8): 668-672.
- Ide, T., Egan, K., Bell-Parikh, L. C. and FitzGerald, G. A. (2003). Activation of Nuclear Receptors by Prostaglandins. *Thromb Res* 110(5-6): 311-315.
- Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E., Tan, M., Iwahara, S., Ramadori, G. and Fahimi, H. D. (2003). Differential Cellular and Subcellular Localization of Heme-Binding Protein 23/Peroxiredoxin I and Heme Oxygenase-1 in Rat Liver. J Histochem Cytochem 51(12): 1621-1631.
- Immenschuh, S., Hinke, V., Ohlmann, A., Gifhorn-Katz, S., Katz, N., Jungermann, K. and Kietzmann, T. (1998a). Transcriptional Activation of the Haem Oxygenase-1 Gene by Cgmp Via a Camp Response Element/Activator Protein-1 Element in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. *Biochem J* 334 (Pt 1): 141-146.
- Immenschuh, S., Kietzmann, T., Hinke, V., Wiederhold, M., Katz, N. and Muller-Eberhard, U. (1998b). The Rat Heme Oxygenase-1 Gene Is

Transcriptionally Induced Via the Protein Kinase a Signaling Pathway in Rat Hepatocyte Cultures. *Mol Pharmacol* 53(3): 483-491.

- Immenschuh, S. and Ramadori, G. (2000). Gene Regulation of Heme Oxygenase-1 as a Therapeutic Target. *Biochem Pharmacol* 60(8): 1121-1128.
- Immenschuh, S. and Schröder, H. (2006). Heme Oxygenase-1 and Cardiovascular Disease. *Histol Histopathol* 21(6): 679-685.
- Ishida, N., Odani-Kawabata, N., Shimazaki, A. and Hara, H. (2006). Prostanoids in the Therapy of Glaucoma. *Cardiovasc Drug Rev* 24(1): 1-10.
- Ishikawa, K., Navab, M., Leitinger, N., Fogelman, A. M. and Lusis, A. J. (1997). Induction of Heme Oxygenase-1 Inhibits the Monocyte Transmigration Induced by Mildly Oxidized Ldl. *J Clin Invest* 100(5): 1209-1216.
- Itasaka, H., Suehiro, T., Wakiyama, S., Yanaga, K., Shimada, M. and Sugimachi, K. (1999). The Mechanism of Hepatic Graft Protection against Reperfusion Injury by Prostaglandin E1. *Surg Today* 29(6): 526-532.
- Jiang, C., Ting, A. T. and Seed, B. (1998). Ppar-Gamma Agonists Inhibit Production of Monocyte Inflammatory Cytokines. *Nature* 391(6662): 82-86.
- Johnson, M. M., Swan, D. D., Surette, M. E., Stegner, J., Chilton, T., Fonteh, A. N. and Chilton, F. H. (1997). Dietary Supplementation with Gamma-Linolenic Acid Alters Fatty Acid Content and Eicosanoid Production in Healthy Humans. J Nutr 127(8): 1435-1444.
- Jozkowicz, A., Huk, I., Nigisch, A., Weigel, G., Weidinger, F. and Dulak, J. (2002). Effect of Prostaglandin-J(2) on Vegf Synthesis Depends on the Induction of Heme Oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal* 4(4): 577-585.
- Karim, S. M., Sandler, M. and Williams, E. D. (1967). Distribution of Prostaglandins in Human Tissues. *Br J Pharmacol Chemother* 31: 340-344.
- **Karin, M. and Hunter, T.** (1995). Transcriptional Control by Protein Phosphorylation: Signal Transmission from the Cell Surface to the Nucleus. *Curr Biol* 5(7): 747-757.
- Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A. and Yamamoto,
 M. (2001). Two Domains of Nrf2 Cooperatively Bind Cbp, a Creb Binding Protein, and Synergistically Activate Transcription. *Genes Cells* 6(10): 857-868.
- Katori, M., Busuttil, R. W. and Kupiec-Weglinski, J. W. (2002). Heme Oxygenase-1 System in Organ Transplantation. *Transplantation* 74(7): 905-912.
- Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S. and Nakanishi, I. (2002). Heme Oxygenase-1 Deficiency: The First Autopsy Case. *Hum Pathol* 33(1): 125-130.
- Kiemer, A. K., Bildner, N., Weber, N. C. and Vollmar, A. M. (2003). Characterization of Heme Oxygenase 1 (Heat Shock Protein 32) Induction by Atrial Natriuretic Peptide in Human Endothelial Cells. *Endocrinology* 144(3): 802-812.
- Kim, E. H., Kim, D. H., Na, H. K. and Surh, Y. J. (2004). Effects of Cyclopentenone Prostaglandins on the Expression of Heme Oxygenase-1 in Mcf-7 Cells. Ann N Y Acad Sci 1030: 493-500.
- **Kirtland, S. J.** (1988). Prostaglandin E1: A Review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 32(3): 165-174.
- Klausner, R. D., Rouault, T. A. and Harford, J. B. (1993). Regulating the Fate of Mrna: The Control of Cellular Iron Metabolism. *Cell* 72(1): 19-28.
- Koizumi, T., Odani, N., Okuyama, T., Ichikawa, A. and Negishi, M. (1995).

Identification of a Cis-Regulatory Element for Delta 12-Prostaglandin J2-Induced Expression of the Rat Heme Oxygenase Gene. *J Biol Chem* 270(37): 21779-21784.

- Krone, W., Kaczmarczyk, P., Muller-Wieland, D. and Greten, H. (1985). The Prostacyclin Analogue Iloprost and Prostaglandin E1 Suppress Sterol Synthesis in Freshly Isolated Human Mononuclear Leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 835(1): 154-157.
- Kronke, G., Bochkov, V. N., Huber, J., Gruber, F., Bluml, S., Furnkranz, A., Kadl, A., Binder, B. R. and Leitinger, N. (2003). Oxidized Phospholipids Induce Expression of Human Heme Oxygenase-1 Involving Activation of Camp-Responsive Element-Binding Protein. J Biol Chem 278(51): 51006-51014.
- Kury, P. G., Ramwell, P. W. and McConnell, H. M. (1974). The Effect of Prostaglandins E1 and E2 on the Human Erythrocyte as Monitored by Spin Labels. *Biochem Biophys Res Commun* 56(2): 478-483.
- **Kyriakis, J. M. and Avruch, J.** (2001). Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiol Rev* 81(2): 807-869.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lalli, E. and Sassone-Corsi, P. (1994). Signal Transduction and Gene Regulation: The Nuclear Response to Camp. *J Biol Chem* 269(26): 17359-17362.
- Lam, C. W., Getting, S. J. and Perretti, M. (2005). In Vitro and in Vivo Induction of Heme Oxygenase 1 in Mouse Macrophages Following Melanocortin Receptor Activation. *J Immunol* 174(4): 2297-2304.
- Lavrovsky, Y., Schwartzman, M. L., Levere, R. D., Kappas, A. and Abraham, N. G. (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): 5987-5991.
- Lee, P. J., Camhi, S. L., Chin, B. Y., Alam, J. and Choi, A. M. (2000). Ap-1 and Stat Mediate Hyperoxia-Induced Gene Transcription of Heme Oxygenase-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(1): L175-182.
- Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L. and Choi, A. M. (1997). Hypoxia-Inducible Factor-1 Mediates Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase-1 Gene in Response to Hypoxia. *J Biol Chem* 272(9): 5375-5381.
- Lee, T. S., Chang, C. C., Zhu, Y. and Shyy, J. Y. (2004). Simvastatin Induces Heme Oxygenase-1: A Novel Mechanism of Vessel Protection. *Circulation* 110(10): 1296-1302.
- Lee, T. S., Tsai, H. L. and Chau, L. Y. (2003). Induction of Heme Oxygenase-1 Expression in Murine Macrophages Is Essential for the Anti-Inflammatory Effect of Low Dose 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2. *J Biol Chem* 278(21): 19325-19330.
- Leighton, B., Budohoski, L., Lozeman, F. J., Challiss, R. A. and Newsholme,
 E. A. (1985). The Effect of Prostaglandins E1, E2 and F2 Alpha and Indomethacin on the Sensitivity of Glycolysis and Glycogen Synthesis to Insulin in Stripped Soleus Muscles of the Rat. *Biochem J* 227(1): 337-340.
- Levin, E. R. (1995). Endothelins. N Engl J Med 333(6): 356-363.
- Levin, G., Duffin, K. L., Obukowicz, M. G., Hummert, S. L., Fujiwara, H., Needleman, P. and Raz, A. (2002). Differential Metabolism of Dihomo-

Gamma-Linolenic Acid and Arachidonic Acid by Cyclo-Oxygenase-1 and Cyclo-Oxygenase-2: Implications for Cellular Synthesis of Prostaglandin E1 and Prostaglandin E2. *Biochem J* 365(Pt 2): 489-496.

- Li, S. R., Yang, Q., Koller, E., Kurtaran, A., Bischof, C., Leimer, M., Rauscha, F., Pidlich, J. and Virgolini, I. (1997). Modified Ldl Decreases the Binding of Prostaglandin E2, I2, and E1 onto Monocytes in Patients with Peripheral Vascular Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(10): 2066-2073.
- Li, Y., Zhu, H., Kuppusamy, P., Roubaud, V., Zweier, J. L. and Trush, M. A. (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): 2015-2023.
- Lippert, T. H. (1977). [Prostaglandins in Reproductive Physiology (Author's Transl)]. *Klin Wochenschr* 55(11): 515-524.
- Liu, J. D., Tsai, S. H., Lin, S. Y., Ho, Y. S., Hung, L. F., Pan, S., Ho, F. M., Lin, C. M. and Liang, Y. C. (2004). Thiol Antioxidant and Thiol-Reducing Agents Attenuate 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2-Induced Heme Oxygenase-1 Expression. *Life Sci* 74(19): 2451-2463.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. Nature 407(6801): 233-241.
- Maines, M. D. (2005). New Insights into Biliverdin Reductase Functions: Linking Heme Metabolism to Cell Signaling. *Physiology (Bethesda)* 20: 382-389.
- Maldonado, D., Schumann, M., Nghiem, P., Dong, Y. and Gardner, P. (1991). Prostaglandin E1 Activates a Chloride Current in Jurkat T Lymphocytes Via Camp-Dependent Protein Kinase. *Faseb J* 5(14): 2965-2970.
- Marasini, B., Massarotti, M., Bottasso, B., Coppola, R., Papa, N. D., Maglione, W., Comina, D. P. and Maioli, C. (2004). Comparison between Iloprost and Alprostadil in the Treatment of Raynaud's Phenomenon. Scand J Rheumatol 33(4): 253-256.
- Martin, G. R. and Wallace, J. L. (2006). Gastrointestinal Inflammation: A Central Component of Mucosal Defense and Repair. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(2): 130-137.
- Martin, M. C., Dransfield, I., Haslett, C. and Rossi, A. G. (2001). Cyclic Amp Regulation of Neutrophil Apoptosis Occurs Via a Novel Protein Kinase a-Independent Signaling Pathway. *J Biol Chem* 276(48): 45041-45050.
- Maurice, D. H. and Haslam, R. J. (1990). Molecular Basis of the Synergistic Inhibition of Platelet Function by Nitrovasodilators and Activators of Adenylate Cyclase: Inhibition of Cyclic Amp Breakdown by Cyclic Gmp. *Mol Pharmacol* 37(5): 671-681.
- Maxey, K., Maddipati, KR., Birkmeier, J. (1992). Interference in Imunoassay. J Clin Immunoassay 15: 116-120.
- Mayer, M. (2000). Association of Serum Bilirubin Concentration with Risk of Coronary Artery Disease. *Clin Chem* 46(11): 1723-1727.
- Mayr, B. M., Canettieri, G. and Montminy, M. R. (2001). Distinct Effects of Camp and Mitogenic Signals on Creb-Binding Protein Recruitment Impart Specificity to Target Gene Activation Via Creb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10936-10941.
- Mazzone, A., Faggioli, P., Cusa, C., Stefanin, C., Rondena, M. and Morelli, B. (2002). Effects of lloprost on Adhesion Molecules and F1 + 2 in Peripheral Ischemia. *Eur J Clin Invest* 32(12): 882-888.
- Meinkoth, J. L., Ji, Y., Taylor, S. S. and Feramisco, J. R. (1990). Dynamics of the Distribution of Cyclic Amp-Dependent Protein Kinase in Living Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9595-9599.

- Meja, K. K., Catley, M. C., Cambridge, L. M., Barnes, P. J., Lum, H., Newton, R. and Giembycz, M. A. (2004). Adenovirus-Mediated Delivery and Expression of a Camp-Dependent Protein Kinase Inhibitor Gene to Beas-2b Epithelial Cells Abolishes the Anti-Inflammatory Effects of Rolipram, Salbutamol, and Prostaglandin E2: A Comparison with H-89. J Pharmacol Exp Ther 309(2): 833-844.
- Mentz, P., Pawelski, K. E., Giessler, C., Mest, H. J., Schwab, M., Kersten, T. and Czeslick, E. (1988). Significance of the Cardioprotective Effect of Prostanoids and Indomethacin. *Biomed Biochim Acta* 47(10-11): S48-51.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. and Vane, J. R. (1976a). An Enzyme Isolated from Arteries Transforms Prostaglandin Endoperoxides to an Unstable Substance That Inhibits Platelet Aggregation. *Nature* 263(5579): 663-665.
- Moncada, S., Needleman, P., Bunting, S. and Vane, J. R. (1976b). Prostaglandin Endoperoxide and Thromboxane Generating Systems and Their Selective Inhibition. *Prostaglandins* 12(3): 323-335.
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. and Goodman, R.
 H. (1986). Identification of a Cyclic-Amp-Responsive Element within the Rat Somatostatin Gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(18): 6682-6686.
- Morita, T., Imai, T., Sugiyama, T., Katayama, S. and Yoshino, G. (2005). Heme Oxygenase-1 in Vascular Smooth Muscle Cells Counteracts Cardiovascular Damage Induced by Angiotensin Ii. *Curr Neurovasc Res* 2(2): 113-120.
- Morita, T., Mitsialis, S. A., Koike, H., Liu, Y. and Kourembanas, S. (1997). Carbon Monoxide Controls the Proliferation of Hypoxic Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* 272(52): 32804-32809.
- Motterlini, R., Foresti, R., Intaglietta, M. and Winslow, R. M. (1996). No-Mediated Activation of Heme Oxygenase: Endogenous Cytoprotection against Oxidative Stress to Endothelium. *Am J Physiol* 270(1 Pt 2): H107-114.
- Mueller, T., Dieplinger, B., Gegenhuber, A., Haidinger, D., Schmid, N., Roth, N., Ebner, F., Landl, M., Poelz, W. and Haltmayer, M. (2004). Serum Total 8-Iso-Prostaglandin F2alpha: A New and Independent Predictor of Peripheral Arterial Disease. J Vasc Surg 40(4): 768-773.
- Mülhardt, C. (2006). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. München. Spektrum Akademischer Verlag.
- Muller, R. M., Taguchi, H. and Shibahara, S. (1987). Nucleotide Sequence and Organization of the Rat Heme Oxygenase Gene. *J Biol Chem* 262(14): 6795-6802.
- Murad, F., Waldman, S., Molina, C., Bennett, B. and Leitman, D. (1987). Regulation and Role of Guanylate Cyclase-Cyclic Gmp in Vascular Relaxation. *Prog Clin Biol Res* 249: 65-76.
- Muzaffar, S., Shukla, N., Lobo, C., Angelini, G. D. and Jeremy, J. Y. (2004). Iloprost Inhibits Superoxide Formation and Gp91phox Expression Induced by the Thromboxane A2 Analogue U46619, 8-Isoprostane F2alpha, Prostaglandin F2alpha, Cytokines and Endotoxin in the Pig Pulmonary Artery. *Br J Pharmacol* 141(3): 488-496.
- Naka, Y., Roy, D. K., Liao, H., Chowdhury, N. C., Michler, R. E., Oz, M. C. and Pinsky, D. J. (1996). Camp-Mediated Vascular Protection in an Orthotopic Rat Lung Transplant Model. Insights into the Mechanism of Action of Prostaglandin E1 to Improve Lung Preservation. *Circ Res* 79(4): 773-783.
- Nakaso, K., Yano, H., Fukuhara, Y., Takeshima, T., Wada-Isoe, K. and

Nakashima, K. (2003). Pi3k Is a Key Molecule in the Nrf2-Mediated Regulation of Antioxidative Proteins by Hemin in Human Neuroblastoma Cells. *FEBS Lett* 546(2-3): 181-184.

- Narumiya, S. and FitzGerald, G. A. (2001). Genetic and Pharmacological Analysis of Prostanoid Receptor Function. *J Clin Invest* 108(1): 25-30.
- Narumiya, S. and Fukushima, M. (1987). Active Transport and Cellular Accumulation of Cyclopentenone Prostaglandins: A Mechanism of Prostaglandin-Induced Growth Inhibition. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 17B: 972-975.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y. and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol Rev* 79(4): 1193-1226.
- Nelson, N. A. (1974). Prostaglandin Nomenclature. J Med Chem 17(9): 911-918.
- Ney, P. and Schrör, K. (1989). E-Type Prostaglandins but Not Iloprost Inhibit Platelet Activating Factor-Induced Generation of Leukotriene B4 by Human Polymorphonuclear Leukocytes. Br J Pharmacol 96(1): 186-192.
- **Nishizuka, Y.** (1995). Protein Kinase C and Lipid Signaling for Sustained Cellular Responses. *Faseb J* 9(7): 484-496.
- Nosjean, O. and Boutin, J. A. (2002). Natural Ligands of Ppargamma: Are Prostaglandin J(2) Derivatives Really Playing the Part? *Cell Signal* 14(7): 573-583.
- **Oberle, S. and Schröder, H.** (1997). Ferritin May Mediate Sin-1-Induced Protection against Oxidative Stress. *Nitric Oxide* 1(4): 308-314.
- **Oberle, S., Schwartz, P., Abate, A. and Schröder, H.** (1999). The Antioxidant Defense Protein Ferritin Is a Novel and Specific Target for Pentaerithrityl Tetranitrate in Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261(1): 28-34.
- Ono, K., Goto, Y., Takagi, S., Baba, S., Tago, N., Nonogi, H. and Iwai, N. (2004). A Promoter Variant of the Heme Oxygenase-1 Gene May Reduce the Incidence of Ischemic Heart Disease in Japanese. *Atherosclerosis* 173(2): 315-319.
- **Ono, K., Mannami, T. and Iwai, N.** (2003). Association of a Promoter Variant of the Haeme Oxygenase-1 Gene with Hypertension in Women. *J Hypertens* 21(8): 1497-1503.
- Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A. and Choi, A. M. (2000a). Carbon Monoxide Has Anti-Inflammatory Effects Involving the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Nat Med* 6(4): 422-428.
- Otterbein, L. E. and Choi, A. M. (2000b). Heme Oxygenase: Colors of Defense against Cellular Stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(6): L1029-1037.
- Otterbein, L. E., Mantell, L. L. and Choi, A. M. (1999). Carbon Monoxide Provides Protection against Hyperoxic Lung Injury. *Am J Physiol* 276(4 Pt 1): L688-694.
- Otterbein, L. E., Zuckerbraun, B. S., Haga, M., Liu, F., Song, R., Usheva, A., Stachulak, C., Bodyak, N., Smith, R. N., Csizmadia, E., Tyagi, S., Akamatsu, Y., Flavell, R. J., Billiar, T. R., Tzeng, E., Bach, F. H., Choi, A. M. and Soares, M. P. (2003). Carbon Monoxide Suppresses Arteriosclerotic Lesions Associated with Chronic Graft Rejection and with Balloon Injury. Nat Med 9(2): 183-190.
- Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Chae, S. C., Kim, Y. M., Chung, K. R. and Chung, H. T. (2004). Carbon Monoxide Produced by Heme Oxygenase-1

Suppresses T Cell Proliferation Via Inhibition of II-2 Production. *J Immunol* 172(8): 4744-4751.

- Paredi, P., Biernacki, W., Invernizzi, G., Kharitonov, S. A. and Barnes, P. J. (1999). Exhaled Carbon Monoxide Levels Elevated in Diabetes and Correlated with Glucose Concentration in Blood: A New Test for Monitoring the Disease? *Chest* 116(4): 1007-1011.
- Patrono, C. and FitzGerald, G. A. (1997). Isoprostanes: Potential Markers of Oxidant Stress in Atherothrombotic Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(11): 2309-2315.
- **Peskar, B., Hesse, W., Rogatti, W. and Rudofsky, G.** (1991). On the Metabolism and Pharmacokinetics of Prostaglandin E₁ Administered by Intraarterial or Intravenous Infusions. Springer Verlag.
- Pietsch, E. C., Chan, J. Y., Torti, F. M. and Torti, S. V. (2003). Nrf2 Mediates the Induction of Ferritin H in Response to Xenobiotics and Cancer Chemopreventive Dithiolethiones. *J Biol Chem* 278(4): 2361-2369.
- Pilz, R. B., Suhasini, M., Idriss, S., Meinkoth, J. L. and Boss, G. R. (1995). Nitric Oxide and Cgmp Analogs Activate Transcription from Ap-1-Responsive Promoters in Mammalian Cells. *Faseb J* 9(7): 552-558.
- Polte, T., Abate, A., Dennery, P. A. and Schröder, H. (2000). Heme Oxygenase-1 Is a Cgmp-Inducible Endothelial Protein and Mediates the Cytoprotective Action of Nitric Oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1209-1215.
- Polte, T., Hemmerle, A., Berndt, G., Grosser, N., Abate, A. and 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.
- Polte, T. and Schröder, H. (1998). Cyclic Amp Mediates Endothelial Protection by Nitric Oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 251(2): 460-465.
- Pomerantz, K. B., Nicholson, A. C. and Hajjar, D. P. (1995). Signal Transduction in Atherosclerosis: Second Messengers and Regulation of Cellular Cholesterol Trafficking. Adv Exp Med Biol 369: 49-64.
- Pradelles, P., Grassi, J., Chabardes, D. and Guiso, N. (1989). Enzyme Immunoassays of Adenosine Cyclic 3',5'-Monophosphate and Guanosine Cyclic 3',5'-Monophosphate Using Acetylcholinesterase. *Anal Chem* 61(5): 447-453.
- Prawan, A., Kundu, J. K. and Surh, Y. J. (2005). Molecular Basis of Heme Oxygenase-1 Induction: Implications for Chemoprevention and Chemoprotection. Antioxid Redox Signal 7(11-12): 1688-1703.
- Rave, N., Crkvenjakov, R. and Boedtker, H. (1979). Identification of Procollagen Mrnas Transferred to Diazobenzyloxymethyl Paper from Formaldehyde Agarose Gels. *Nucleic Acids Res* 6(11): 3559-3567.
- **Reiss, A. B. and Edelman, S. D.** (2006). Recent Insights into the Role of Prostanoids in Atherosclerotic Vascular Disease. *Curr Vasc Pharmacol* 4(4): 395-408.
- Relic, B., Benoit, V., Franchimont, N., Ribbens, C., Kaiser, M. J., Gillet, P., Merville, M. P., Bours, V. and Malaise, M. G. (2004). 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J2 Inhibits Bay 11-7085-Induced Sustained Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation and Apoptosis in Human Articular Chondrocytes and Synovial Fibroblasts. J Biol Chem 279(21): 22399-22403.
- Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. and Glass, C. K. (1998). The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Is a Negative

Regulator of Macrophage Activation. *Nature* 391(6662): 79-82.

- **Ross, R.** (1986). The Pathogenesis of Atherosclerosis--an Update. *N Engl J Med* 314(8): 488-500.
- **Rudofsky, G.** (1986). The Effect of Intraarterial Und Intravenous Prostaglandin E₁ in a Model of Ischaemia in Healthy Volunteers. Berlin. Springer Verlag.
- Ryter, S. W., Alam, J. and Choi, A. M. (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev* 86(2): 583-650.
- Ryter, S. W., Otterbein, L. E., Morse, D. and Choi, A. M. (2002). Heme Oxygenase/Carbon Monoxide Signaling Pathways: Regulation and Functional Significance. *Mol Cell Biochem* 234-235(1-2): 249-263.
- Sako, H., Hadama, T., Miyamoto, S., Anai, H., Wada, T., Iwata, E., Hamamoto, H., Tanaka, H., Urushino, K. and Shuto, T. (2006). Effect of Prostaglandin E1 on Ischemia-Reperfusion Injury During Abdominal Aortic Aneurysm Surgery. Surg Today 36(2): 140-146.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Samuelsson, B. (1965). On the Incorporation of Oxygen in the Conversion of 8, 11, 14-Eicosatrienoic Acid to Prostaglandin E1. J Am Chem Soc 87: 3011-3013.
- Samuelsson, B., Goldyne, M., Granstrom, E., Hamberg, M., Hammarstrom, S. and Malmsten, C. (1978). Prostaglandins and Thromboxanes. *Annu Rev Biochem* 47: 997-1029.
- Sardana, M. K., Sassa, S. and Kappas, A. (1985). Hormonal Regulation of Heme Oxygenase Induction in Avian Hepatocyte Culture. *Biochem Pharmacol* 34(16): 2937-2944.
- Scher, J. U. and Pillinger, M. H. (2005). 15d-Pgj2: The Anti-Inflammatory Prostaglandin? *Clin Immunol* 114(2): 100-109.
- Schipper, B. R. and Ramstad, T. (2005). Determination of the Binding Constant between Alprostadil and Alpha-Cyclodextrin by Capillary Electrophoresis: Implications for a Freeze-Dried Formulation. J Pharm Sci 94(7): 1528-1537.
- Schipper, H. M., Chertkow, H., Mehindate, K., Frankel, D., Melmed, C. and Bergman, H. (2000). Evaluation of Heme Oxygenase-1 as a Systemic Biological Marker of Sporadic Ad. *Neurology* 54(6): 1297-1304.
- Schröder, H. (2005). New Signaling Routes for an Old Drug: Lipoxin A4 Might Mediate Heme Oxygenase-1 Induction by Aspirin. Focus On "Novel Lipid Mediator Aspirin-Triggered Lipoxin A4 Induces Heme Oxygenase-1 in Endothelial Cells". Am J Physiol Cell Physiol 289(3): C507-508.
- Schrör, K. (1985). [Prostaglandins and Endothelial Cells]. Z Kardiol 74 Suppl 7: 93-97.
- Schrör, K. and Hecker, G. (1987). Potent Inhibition of Superoxide Anion Generation by Pge1 and the Pge1 Analogue Op-1206 in Human Pmn's--Unrelated to Its Antiplatelet Pgi2-Like Activity. Vasa Suppl 17: 11-16.
- Schrör, K. and Hohlfeld, T. (2004). Mechanisms of Anti-Ischemic Action of Prostaglandin E1 in Peripheral Arterial Occlusive Disease. Vasa 33(3): 119-124.
- Schultze, G. (1990). Eicosanoids and Blood Pressure During Hemodialysis. Int J Artif Organs 13(3): 145-148.
- Schwertner, H. A., Jackson, W. G. and Tolan, G. (1994). Association of Low Serum Concentration of Bilirubin with Increased Risk of Coronary Artery Disease. *Clin Chem* 40(1): 18-23.

- Sheftel, A. D., Kim, S. F. and Ponka, P. (2007). Non-Heme Induction of Heme Oxygenase-1 Does Not Alter Cellular Iron Metabolism. *J Biol Chem*.
- Shen, G., Hebbar, V., Nair, S., Xu, C., Li, W., Lin, W., Keum, Y. S., Han, J., Gallo, M. A. and Kong, A. N. (2004). Regulation of Nrf2 Transactivation Domain Activity. The Differential Effects of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Synergistic Stimulatory Effect of Raf and Creb-Binding Protein. J Biol Chem 279(22): 23052-23060.
- Shibahara, S., Muller, R., Taguchi, H. and Yoshida, T. (1985). Cloning and Expression of Cdna for Rat Heme Oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(23): 7865-7869.
- Shibahara, S., Sato, M., Muller, R. M. and Yoshida, T. (1989). Structural Organization of the Human Heme Oxygenase Gene and the Function of Its Promoter. *Eur J Biochem* 179(3): 557-563.
- Shibata, T., Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M. and Uchida, K. (2002). 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2. A Prostaglandin D2 Metabolite Generated During Inflammatory Processes. J Biol Chem 277(12): 10459-10466.
- Shoshani, I., Taussig, R., Iyengar, R. and Johnson, R. A. (2000). Synthesis and Use of 3'-(Azidoiodosalicyl) Derivatives of 2', 5'-Dideoxyadenosine as Photoaffinity Ligands for Adenylyl Cyclase. Arch Biochem Biophys 376(1): 221-228.
- Sikorski, E. M., Hock, T., Hill-Kapturczak, N. and Agarwal, A. (2004). The Story So Far: Molecular Regulation of the Heme Oxygenase-1 Gene in Renal Injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(3): F425-441.
- Simmet, T. and Peskar, B. A. (1988). Prostaglandin E1 and Arterial Occlusive Disease: Pharmacological Considerations. *Eur J Clin Invest* 18(6): 549-554.
- Simmons, D. L., Botting, R. M. and Hla, T. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* 56(3): 387-437.
- Singh, U., Devaraj, S., Dasu, M. R., Ciobanu, D., Reusch, J. and Jialal, I. (2006). C-Reactive Protein Decreases Interleukin-10 Secretion in Activated Human Monocyte-Derived Macrophages Via Inhibition of Cyclic Amp Production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(11): 2469-2475.
- **Sinzinger, H.** (1986). Inhibition of Mitotic and Proliferative Activity of Smooth Muscle Cells by Prostaglandin E₁. Heidelberg. Springer.
- Sinzinger, H., Virgolini, I., Lupattelli, G., Molinari, E., Gerakakis, A. and Angelberger, P. (1991). Prostaglandin E1 Decreases the Low-Density-Lipoprotein Entry into Rabbit Arterial Wall. Br J Pharmacol 103(3): 1626-1628.
- Sinzinger, H., Virgolini, I., Fitscha, P. (1988). Prostaglandin E1: Wirkungen Und Therapeutische Wirksamkeit. Berlin Heidelberg. Springer.
- Sketch, M. H., Jr., Whelton, A., Schollmayer, E., Koch, J. A., Bernink, P. J., Woltering, F. and Brinker, J. (2001). Prevention of Contrast Media-Induced Renal Dysfunction with Prostaglandin E1: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. Am J Ther 8(3): 155-162.
- Slebos, D. J., Ryter, S. W. and Choi, A. M. (2003). Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Pulmonary Medicine. *Respir Res* 4: 7.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L. and Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. Annu Rev Biochem 69: 145-182.
- Soares, M. P., Brouard, S., Smith, R. N. and Bach, F. H. (2001). Heme

Oxygenase-1, a Protective Gene That Prevents the Rejection of Transplanted Organs. *Immunol Rev* 184: 275-285.

- Soares, M. P., Lin, Y., Anrather, J., Csizmadia, E., Takigami, K., Sato, K., Grey, S. T., Colvin, R. B., Choi, A. M., Poss, K. D. and Bach, F. H. (1998). Expression of Heme Oxygenase-1 Can Determine Cardiac Xenograft Survival. *Nat Med* 4(9): 1073-1077.
- Soh, J. W., Mao, Y., Liu, L., Thompson, W. J., Pamukcu, R. and Weinstein, I.
 B. (2001). Protein Kinase G Activates the Jnk1 Pathway Via Phosphorylation of Mekk1. *J Biol Chem* 276(19): 16406-16410.
- Stein, J. M. and Martin, B. R. (1983). The Role of Gtp in Prostaglandin E1 Stimulation of Adenylate Cyclase in Platelet Membranes. *Biochem J* 214(1): 231-234.
- Steinberg, D., Vaughan, M., Nestel, P. J. and Bergstrom, S. (1963). Effects of Prostaglandin E Opposing Those of Catecholamines on Blood Pressure and on Triglyceride Breakdown in Adipose Tissue. *Biochem Pharmacol* 12: 764-766.
- Stevenson, D. K., Vreman, H. J., Wong, R. J. and Contag, C. H. (2001). Carbon Monoxide and Bilirubin Production in Neonates. *Semin Perinatol* 25(2): 85-93.
- Stocker, R., Glazer, A. N. and Ames, B. N. (1987a). Antioxidant Activity of Albumin-Bound Bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16): 5918-5922.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. and Ames, B. N. (1987b). Bilirubin Is an Antioxidant of Possible Physiological Importance. *Science* 235(4792): 1043-1046.
- Straus, D. S. and Glass, C. K. (2001). Cyclopentenone Prostaglandins: New Insights on Biological Activities and Cellular Targets. *Med Res Rev* 21(3): 185-210.
- Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C. H., Sengchanthalangsy, L. L., Ghosh, G. and Glass, C. K. (2000). 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2 Inhibits Multiple Steps in the Nf-Kappa B Signaling Pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4844-4849.
- Suda, K., Rothen-Rutishauser, B., Gunthert, M. and Wunderli-Allenspach, H. (2001). Phenotypic Characterization of Human Umbilical Vein Endothelial (Ecv304) and Urinary Carcinoma (T24) Cells: Endothelial Versus Epithelial Features. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37(8): 505-514.
- Sugawara, Y., Kubota, K., Ogura, T., Esumi, H., Inoue, K., Takayama, T. and Makuuchi, M. (1998). Protective Effect of Prostaglandin E1 against Ischemia/Reperfusion-Induced Liver Injury: Results of a Prospective, Randomized Study in Cirrhotic Patients Undergoing Subsegmentectomy. J Hepatol 29(6): 969-976.
- Sugiura, H., Liu, X., Togo, S., Kobayashi, T., Shen, L., Kawasaki, S., Kamio, K., Wang, X. Q., Mao, L. J. and Rennard, S. I. (2007). Prostaglandin E(2) Protects Human Lung Fibroblasts from Cigarette Smoke Extract-Induced Apoptosis Via Ep(2) Receptor Activation. J Cell Physiol 210(1): 99-110.
- Taille, C., El-Benna, J., Lanone, S., Dang, M. C., Ogier-Denis, E., Aubier, M. and Boczkowski, J. (2004). Induction of Heme Oxygenase-1 Inhibits Nad(P)H Oxidase Activity by Down-Regulating Cytochrome B558 Expression Via the Reduction of Heme Availability. J Biol Chem 279(27): 28681-28688.
- Takahashi, T., Morita, K., Akagi, R. and Sassa, S. (2004). Heme Oxygenase-1: A Novel Therapeutic Target in Oxidative Tissue Injuries. *Curr Med Chem*

11(12): 1545-1561.

- Tarpey, M. M., White, C. R., Suarez, E., Richardson, G., Radi, R. and Freeman,
 B. A. (1999). Chemiluminescent Detection of Oxidants in Vascular Tissue.
 Lucigenin but Not Coelenterazine Enhances Superoxide Formation. *Circ Res* 84(10): 1203-1211.
- Tasken, K., Skalhegg, B. S., Tasken, K. A., Solberg, R., Knutsen, H. K., Levy, F. O., Sandberg, M., Orstavik, S., Larsen, T., Johansen, A. K., Vang, T., Schrader, H. P., Reinton, N. T., Torgersen, K. M., Hansson, V. and Jahnsen, T. (1997). Structure, Function, and Regulation of Human Camp-Dependent Protein Kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31: 191-204.
- Terry, C. M., Clikeman, J. A., Hoidal, J. R. and Callahan, K. S. (1998). Effect of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-1 Alpha on Heme Oxygenase-1 Expression in Human Endothelial Cells. Am J Physiol 274(3 Pt 2): H883-891.
- Thomas, J. M., Frazier, J. S., Hu, Z. W. and Hoffman, B. B. (1995). Phosphorylation of Cyclic Amp Response Element-Binding Protein and Induction of C-Fos Gene Expression on Withdrawal from Chronic Treatment with Carbachol in Ng108-15 Cells. *Mol Pharmacol* 48(4): 593-600.
- **Tilley, S. L., Coffman, T. M. and Koller, B. H.** (2001). Mixed Messages: Modulation of Inflammation and Immune Responses by Prostaglandins and Thromboxanes. *J Clin Invest* 108(1): 15-23.
- Torti, F. M. and Torti, S. V. (2002). Regulation of Ferritin Genes and Protein. Blood 99(10): 3505-3516.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Van, D., Beerthuis, R. K., Nugteren, D. H. and Vonkeman, H. (1964). Enzymatic Conversion of All-Cis-Polyunsaturated Fatty Acids into Prostaglandins. *Nature* 203: 839-841.
- **van der Sijp, J. R. and Rohmer, J.** (1985). [Prostaglandin Therapy in Newborn Infants with a Botalli Duct-Dependent Circulation]. *Tijdschr Kindergeneeskd* 53(1): 20-25.
- Vane, J. R. and Botting, R. M. (1995). Pharmacodynamic Profile of Prostacyclin. *Am J Cardiol* 75(3): 3A-10A.
- Vasquez-Vivar, J., Hogg, N., Pritchard, K. A., Jr., Martasek, P. and Kalyanaraman, B. (1997). Superoxide Anion Formation from Lucigenin: An Electron Spin Resonance Spin-Trapping Study. *FEBS Lett* 403(2): 127-130.
- Vergroesen, A. J., Gans, P., Gottenbos, J. J. and ten Hoor, F. (1971). [Clinical Use of Prostaglandins]. *Klin Wochenschr* 49(16): 889-895.
- Vinals, M., Martinez-Gonzalez, J., Badimon, J. J. and Badimon, L. (1997). Hdl-Induced Prostacyclin Release in Smooth Muscle Cells Is Dependent on Cyclooxygenase-2 (Cox-2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(12): 3481-3488.
- **Vogt, W.** (1978). Role of Phospholipase A2 in Prostaglandin Formation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 3: 89-95.
- Waldman, S. A. and Murad, F. (1987). Cyclic Gmp Synthesis and Function. *Pharmacol Rev* 39(3): 163-196.
- Wang, R., Wang, Z. and Wu, L. (1997). Carbon Monoxide-Induced Vasorelaxation and the Underlying Mechanisms. *Br J Pharmacol* 121(5): 927-934.

- Wayman, N. S., Hattori, Y., McDonald, M. C., Mota-Filipe, H., Cuzzocrea, S., Pisano, B., Chatterjee, P. K. and Thiemermann, C. (2002). Ligands of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (Ppar-Gamma and Ppar-Alpha) Reduce Myocardial Infarct Size. *Faseb J* 16(9): 1027-1040.
- Weber, P. C., Siess, W. and Scherer, B. (1979). [Prostaglandins in Cardiovascular and Renal Function. Biochemical, Physiological and Clinical Findings (Author's Transl)]. *Klin Wochenschr* 57(9): 425-444.
- Weeks, J. R., Sekhar, N. C. and Ducharme, D. W. (1969). Relative Activity of Prostaglandins E1, A1, E2 and A2 on Lipolysis, Platelet Aggregation, Smooth Muscle and the Cardiovascular System. *J Pharm Pharmacol* 21(2): 103-108.
- Weiss, T. (2003). [Mechanisms of Action of Prostaglandin E1 in Therapy of Peripheral Arterial Occlusive Diseases]. *Vasa* 32(4): 187-192.
- Whittaker, N., Bunting, S., Salmon, J., Moncada, S., Vane, J. R., Johnson, R.
 A., Morton, D. R., Kinner, J. H., Gorman, R. R., McGuire, J. C. and Sun,
 F. F. (1976). The Chemical Structure of Prostaglandin X (Prostacyclin).
 Prostaglandins 12(6): 915-928.
- Whorton, A. R., Sweetman, B. J. and Oates, J. A. (1979). Application of High Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry to Analysis of Prostaglandin E1 in Biological Media. *Anal Biochem* 98(2): 455-463.
- Wijayanti, N., Huber, S., Samoylenko, A., Kietzmann, T. and Immenschuh, S. (2004). Role of Nf-Kappab and P38 Map Kinase Signaling Pathways in the Lipopolysaccharide-Dependent Activation of Heme Oxygenase-1 Gene Expression. *Antioxid Redox Signal* 6(5): 802-810.
- Wijayanti, N., Kietzmann, T. and Immenschuh, S. (2005). Heme Oxygenase-1 Gene Activation by the Nad(P)H Oxidase Inhibitor 4-(2-Aminoethyl) Benzenesulfonyl Fluoride Via a Protein Kinase B, P38-Dependent Signaling Pathway in Monocytes. *J Biol Chem* 280(23): 21820-21829.
- Wilkens, J. H., Wilkens, H., Elger, B., Cassidy, F., Caspary, L., Creutzig, A. and Frolich, J. C. (1987). Cardiac and Microcirculatory Effects of Different Doses of Prostaglandin E1 in Man. *Eur J Clin Pharmacol* 33(2): 133-137.
- Wu, B. J., Kathir, K., Witting, P. K., Beck, K., Choy, K., Li, C., Croft, K. D., Mori, T. A., Tanous, D., Adams, M. R., Lau, A. K. and Stocker, R. (2006). Antioxidants Protect from Atherosclerosis by a Heme Oxygenase-1 Pathway That Is Independent of Free Radical Scavenging. J Exp Med 203(4): 1117-1127.
- Wu, L. and Wang, R. (2005). Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. *Pharmacol Rev* 57(4): 585-630.
- Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y. and Koizumi, S. (1999). Oxidative Stress Causes Enhanced Endothelial Cell Injury in Human Heme Oxygenase-1 Deficiency. J Clin Invest 103(1): 129-135.
- Yamamoto, M., Sato, N., Tajima, H., Furuke, K., Ohira, A., Honda, Y. and Yodoi, J. (1997). Induction of Human Thioredoxin in Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells through Cyclic Amp-Dependent Pathway; Involvement in the Cytoprotective Activity of Prostaglandin E1. *Exp Eye Res* 65(5): 645-652.
- Yamashita, K., Ollinger, R., McDaid, J., Sakahama, H., Wang, H., Tyagi, S., Csizmadia, E., Smith, N. R., Soares, M. P. and Bach, F. H. (2006). Heme

Oxygenase-1 Is Essential for and Promotes Tolerance to Transplanted Organs. *Faseb J* 20(6): 776-778.

- Yang, S. H., Sharrocks, A. D. and Whitmarsh, A. J. (2003). Transcriptional Regulation by the Map Kinase Signaling Cascades. *Gene* 320: 3-21.
- Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D., Ch'ng, L. E., Newsome, D., Bronson, R. T., Li, E., Livingston, D. M. and Eckner, R. (1998). Gene Dosage-Dependent Embryonic Development and Proliferation Defects in Mice Lacking the Transcriptional Integrator P300. *Cell* 93(3): 361-372.
- Yet, S. F., Layne, M. D., Liu, X., Chen, Y. H., Ith, B., Sibinga, N. E. and Perrella, M. A. (2003). Absence of Heme Oxygenase-1 Exacerbates Atherosclerotic Lesion Formation and Vascular Remodeling. *Faseb J* 17(12): 1759-1761.
- Yoshida, T., Biro, P., Cohen, T., Muller, R. M. and Shibahara, S. (1988). Human Heme Oxygenase Cdna and Induction of Its Mrna by Hemin. *Eur J Biochem* 171(3): 457-461.
- Zahringer, J., Baliga, B. S. and Munro, H. N. (1976). Novel Mechanism for Translational Control in Regulation of Ferritin Synthesis by Iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(3): 857-861.
- Zhang, X., Bedard, E. L., Potter, R., Zhong, R., Alam, J., Choi, A. M. and Lee, P. J. (2002). Mitogen-Activated Protein Kinases Regulate Ho-1 Gene Transcription after Ischemia-Reperfusion Lung Injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283(4): L815-829.
- Zhang, X., Lu, L., Dixon, C., Wilmer, W., Song, H., Chen, X. and Rovin, B. H. (2004). Stress Protein Activation by the Cyclopentenone Prostaglandin 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J2 in Human Mesangial Cells. *Kidney Int* 65(3): 798-810.
- Zhuang, H., Pin, S., Li, X. and Dore, S. (2003). Regulation of Heme Oxygenase Expression by Cyclopentenone Prostaglandins. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(5): 499-505.
- **Zipper, L. M. and Mulcahy, R. T.** (2003). Erk Activation Is Required for Nrf2 Nuclear Localization During Pyrrolidine Dithiocarbamate Induction of Glutamate Cysteine Ligase Modulatory Gene Expression in Hepg2 Cells. *Toxicol Sci* 73(1): 124-134.
- **Zurier, R. B.** (1982). Prostaglandins, Immune Responses, and Murine Lupus. *Arthritis Rheum* 25(7): 804-809.

8 Veröffentlichungen

8.1 Originalarbeiten

Grosser, N., Hemmerle, A., Berndt, G., Erdmann, K., Hinkelmann, U., Schürger, S., Wijayanti, N., Immenschuh, S. and Schröder, H. (2004). The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 37:2064-207

8.2 In Kurzform publizierte Vorträge und Poster (Abstracts)

Schürger, S., Grosser, N., Oberle-Plümpe, S. and Schröder H. (2005). Antioxidant and cytoprotective actions of aspirin and vitamin c – relevance for gastric tolerability. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 371(Suppl 1):R11

Schürger, S., Grosser, N., Oberle-Plümpe, S. and Schröder H. (2005). Role of the heme oxygenase pathway in mediating gastric tolerability of aspirin and vitamin c. <u>www.ho-conference.org</u>, Boston, USA

Erdmann, K., Schürger, S., Schulz, S., Grosser, N. and Schröder H. (2007). D-Pantothenol induces heme-oxygenase-1 in macrophages and skin cells – a novel antioxidant and antiinflammatory mechanism (in press)

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

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

Grosser, N., Becker, J.C., Schulz, S., Erdmann, K., Schürger, S., Waltke, C., Domschke, W., Pohle, T. and Schröder, H. (2005). Beyond gastric acid reduction: proton pump inhibitors induce heme oxygenase-1 in endothelial cells. <u>www.ho-conference.org</u>, Boston, USA

Hinkelmann, U., Grosser, N., Hemmerle, A., Berndt, G., Schürger, S. and Schröder H. (2005). Statin-mediated activation of heme oxygenase-1 in endothelial cells: endogenous cytoprotection against oxidative stress. *DPhG-Doktorandentagung*

9 Danksagung

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Henning Schröder, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für die produktive und von Vertrauen geprägte Zusammenarbeit sowie die Möglichkeit der Präsentation von Ergebnissen auf nationaler und internationaler Ebene, vor allem für die Teilnahme an der internationalen *HO Conference* in Boston.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die interessannten Diskussionen und die vielen Erlebnisse auch außerhalb des Labors möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe Pharmakologie bedanken.

Im Speziellen bei Frau Dr. Nina Großer für die Einarbeitung im Zelllabor, die Hilfe bei Vorträgen und Postern und die tatkräftige Unterstützung bei allem Organisatorischem. Bei Frau Dr. Kati Erdmann möchte ich mich besonders für die Einführung ins Isotopenlabor, die vielen nützliche Hilfestellungen und das fleißige Korrekturlesen bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht auch an Frau Stephanie Schulz für die Durchführung der Versuche zum BLI an der Stanford University, die kritische Durchsicht der Manuskripte und dafür, dass sie mir während des Studium und der Promotionszeit eine stetige und wichtige Begleiterin war.

Dankbar bin ich auch unseren guten Seelen im Zelllabor, Frau Kathrin Schipporeit, Frau Petra Schwarz und Frau Astrid Nemitz, die auch in schwierigen Zeiten stets ein offenes Ohr hatten.

Herrn PD Dr. Stephan Immenschuh und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Einführung in die Thematik des Genreporterassays und die Überlassung der Konstrukte.

Bei der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt möchte ich mich für die Überlassung des Stipendiums bedanken, ohne welches diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich nicht nur während des Studiums und der Promotion immer in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Ein besonders wichtiger Rückhalt war mir während der Promotion auch stets meine Freundin Sonja Schlimme, der ich auf diesem Wege von ganzem Herzen danken möchte.

Erklärung

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

Halle (Saale), den 3.7.2008

Stephan Schurger

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geboren am 19.10.1978 in Erlangen Eltern: Dr. Gert und Silvia Schürger Geschwister: Aline, Alexander und Lisa Familienstand: ledig

Schulausbildung:

9/1985 - 7/1989	Grundschule Berching
9/1989 - 6/1998	Willibald-Gluck-Gymnasium Neumarkt
6/1998	Abitur mit der Note 2,6

Zivildienst:

7/1998 - 8/1999	Zivildienst im Pflegedienst der Heliosklinik Berching,
	Fachklinik für geriatrische Rehabilitation

Studium:

Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-
Universität Halle
1.Staatsexamen mit der Note 1,5
2.Staatsexamen mit der Note 1,25
3. Staatsexamen mit der Note 1,5
Gesamtnote: 1,39
Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit:

10/2003 - 3/2004	Praktisches Jahr in der St.Lorenz-Apotheke, Berching Praktisches Jahr bei Herrn Prof. Schröder am Institut
4/2004 - 10/2004	für Pharmazie Institutsbereich für pharmazeutische
	Biologie und Pharmakologie, Martin-Luther-Universität Halle
ab 11/2004	Doktorand bei Herrn Prof. Schröder am Institut für
	Pharmazie, Institutsbereich für pharmazeutische
	Biologie und Pharmakologie, Martin-Luther-Universität
	Halle
ab 10/2005	Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes
	Sachsen-Anhalts
ab 6/2007	Leitung der Wolfsteiner Apotheke in Pyrbaum

Halle (Saale), den 3.7.2008

Stephan Schurger