

1 Einleitung

1.1 Nichtsteroidale Antiphlogistika

1.1.1 Erwünschte und unerwünschte Wirkungen der klassischen NSAIDs

Vor mehr als 100 Jahren wurde Acetylsalicylsäure (ASS) als fiebersenkendes Schmerzmittel und Entzündungshemmer in die Therapie eingeführt. Es folgten zahlreiche verwandte Substanzen, die heute die Arzneistoffgruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs, *Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs*) bilden. Erst 1971 konnte geklärt werden, dass die Wirkung auf einer Hemmung der Cyclooxygenase (Prostaglandin-H-Synthase) beruht, die Arachidonsäure in die Vorstufen der Prostaglandine, des Thromboxans und des Prostacyclins überführt (Vane, 1971).

Prostaglandine sind sowohl an der Erregung und Sensibilisierung von Schmerzrezeptoren als auch an der Entstehung von Fieber und entzündlichen Reaktionen beteiligt. Daher wirken NSAIDs sowohl analgetisch als auch antipyretisch und antiphlogistisch. Durch Eingriff in die Thromboxansynthese hemmen NSAIDs die Plättchenaggregation und wirken antithrombotisch. Hier hat ASS die größte Bedeutung, da die Cyclooxygenase der Thrombozyten durch Acetylierung irreversibel blockiert wird (Reilly & FitzGerald, 1988).

NSAIDs gehören zu den am häufigsten angewendeten Präparaten bei Schmerzen, Migräne und Fieber sowie entzündlichen und degenerativen Gelenkerkrankungen. ASS wird in niedriger Dosierung als Thrombozytenaggregationshemmer oftmals über Jahre zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse eingenommen.

NSAIDs werden im Allgemeinen gut vertragen. Länger andauernde Therapien und die Einnahme höherer Dosen gehen jedoch mit einer Vielzahl unerwünschter Wirkungen einher, die vor allem den Gastrointestinaltrakt und die Niere betreffen. Dabei kommt es häufig zu dyspeptischen Beschwerden und an den Schleimhäuten im Gastrointestinaltrakt zu oberflächlichen Erosionen bis hin zu tiefer reichenden Läsionen, die zu subepithelialen Blutungen und zur Bildung von Ulzera führen können. Die Nierenfunktion wird durch verminderte Ausscheidung von Natriumionen und Wasser gestört, was erhöhten Blutdruck und Ödembildungen hervorrufen kann (Hawkey & Langman, 2003; Rainsford, 1999; Wolfe et al., 1999).

Schädigungen der Schleimhaut treten am häufigsten im Magen auf, doch auch der Dünndarm kann betroffen sein (Bjarnason et al., 1993). Das Risiko NSAID-induzierter Komplikationen steigt mit zunehmendem Alter, bei gleichzeitiger Einnahme von Corticoiden oder Antikoagulanzen sowie bei gastrointestinalen Blutungen und Ulkus in der Vorgeschichte. Ob das Geschlecht, Rauchen, Alkoholkonsum oder die Besiedlung mit *Helicobacter pylori* eine Rolle spielen, ist noch nicht eindeutig geklärt (Simon et al., 1996; Wolfe et al., 1999). Die Störung der Nierenfunktion stellt einen besonderen Risikofaktor bei Hypertonikern und herzinsuffizienten Patienten dar.

Nicht nur den erwünschten, sondern auch den unerwünschten Wirkungen der NSAIDs liegt die systemische Hemmung der Prostaglandin-Synthese zugrunde. Daher konnten sowohl die parenterale Gabe als auch die Synthese von Prodrugs oder die Formulierung magenresistenter Manteltabletten die Magenverträglichkeit der NSAIDs nur geringfügig verbessern (Wolfe et al., 1999).

1.1.2 Schutzmechanismen der Magenschleimhaut

Die Magenschleimhaut ist einer Vielzahl von potenziell schädigenden Agenzien ausgesetzt. Dazu zählen insbesondere die Magensäure, physiologische Detergenzien (z.B. Gallensalze), Pepsine, bakterielle Produkte und exogene Substanzen wie Arzneistoffe und Alkohol. Um einer Schädigung vorzubeugen, hält die Schleimhaut im physiologischen Zustand ein komplexes System an protektiven Mechanismen aufrecht, das als Mukosabarriere bezeichnet wird (Wallace & Granger, 1996).

Die erste Barriere besteht aus der Sekretion von Säure, Schleim und Bicarbonat. Die Säure wirkt antibakteriell und verhindert die Ausbreitung mit der Nahrung aufgenommener Keime. Die Schleimschicht schützt vor mechanischen und enzymatischen Angriffen und hält mit Hilfe der Pufferfunktion der Bicarbonationen einen pH-Gradienten zwischen pH 7 in den Epithelzellen und pH 2 im Magenlumen aufrecht.

Als zweite Barriere dient die Epithelzellschicht. Die Intaktheit aller Zellmembranen und interzellulären Schlussleisten des Oberflächenepithels ist essentiell für die Integrität der Mukosa. Im Fall einer Schädigung existieren rasch aktivierbare Mechanismen zur Regenerierung des Epithels (Paimela et al., 1995).

Das als gastrale Mikrozirkulation bezeichnete Blutgefäßsystem hält einen dritten Abwehrmechanismus aufrecht. Wenn durch eine Schädigung der Mukosa Säure und andere aggressive Faktoren in den subepithelialen Raum eindringen, erfolgt durch Aktivierung afferenter Sensornerven ein rapider Anstieg des Blutflusses. Diese reaktive Hyperämie ermöglicht die Abpufferung der Säure, den Abtransport toxischer Substanzen und die Versorgung von Wundheilungsprozessen mit Plasma (Holzer & Sametz, 1986; Wallace, 2001).

Ein vierter Abwehrmechanismus ist das mukosale Immunsystem bestehend aus verschiedenen Zelltypen, die als Wächter fungieren. Insbesondere Mastzellen und Makrophagen werden durch Antigene und Endotoxine aktiviert, setzen Mediatoren frei und rufen dadurch eine lokale Entzündungsreaktion hervor.

Die fünfte und letzte Stufe der Abwehr wird aktiviert, wenn eine Ulzeration der Mukosa entstanden ist. Unter diesen Umständen werden Reparaturmechanismen induziert, die das Zellwachstum, die Angiogenese neuer Blutgefäße und die Re-Innervierung der Mukosa koordinieren (Wallace & Ma, 2001).

Eine wichtige Mediatorfunktion zum Schutz der Mukosa besitzen die Prostaglandine. Sie stimulieren die Sekretion von Schleim und Bicarbonat und regulieren die Durchblutung und den Gefäßtonus der gastralen Mikrozirkulation (Hawkey & Rampton, 1985).

Auch die Entzündungsreaktion im Fall einer Aktivierung von Mastzellen und Makrophagen in der Mukosa wird von Prostaglandinen kontrolliert. So werden die Freisetzung von Tumor Nekrose Faktor(TNF)- α und Interleukin-1 aus Makrophagen und die Produktion des Chemotaxins Leukotrien B₄ in neutrophilen Granulozyten gehemmt. Prostaglandine blockieren außerdem die Freisetzung von Histamin, TNF- α und PAF (Plättchen-aktivierender Faktor) aus Mastzellen (Wallace & Ma, 2001). Ebenso hemmen sie die Expression von Adhäsionsmolekülen und damit die Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten und deren Migration in das Gefäßendothel der gastralen Mikrozirkulation (Asako et al., 1992).

Als zweiter essentieller Mediator der Mukosa-Protektion fungiert Stickstoffmonoxid (NO), das größtenteils in Synergie mit den Prostaglandinen wirkt.

1.1.3 Bedeutung von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid wird endogen durch die Familie der NO-Synthasen aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Sauerstoff gebildet. Man unterscheidet bisher drei Isoenzyme, die Produkte verschiedener Gene sind. Die konstitutiven NO-Synthasen eNOS (endotheliale NOS) und nNOS (neuronale NOS) werden vorwiegend in Endothelzellen und neuronalen Zellen exprimiert. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird nach exogener Stimulation vor allem in Makrophagen, aber auch in Endothelzellen und glatten Muskelzellen gebildet (Förstermann et al., 1994).

Wichtige physiologische Funktionen von Stickstoffmonoxid werden über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase vermittelt. Die Guanylatcyclase katalysiert die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat (Ignarro, 1999). Als *second messenger* ist cGMP in der Lage, unter anderem Calcium-Ionenkanäle zu regulieren und sowohl Phosphodiesterasen als auch Proteinkinasen zu aktivieren (Denninger & Marletta, 1999).

In Endothelzellen gebildetes NO ist wichtigster Regulator der Durchblutung und des Gefäßtonus. Als *Endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) vermittelt Stickstoffmonoxid über Aktivierung der Guanylatcyclase die gefäßerweiternde Wirkung des Acetylcholins (Ignarro et al., 1987). Durch Absenkung des intrazellulären Calciumionen-Spiegels kommt es zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und damit zur Gefäßerweiterung. Die endothelialen NO-Synthasen werden sowohl durch eine Erhöhung des Calciumspiegels als auch durch verschiedene vasoaktive Substanzen (Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Thrombin u.a.) und Scherkräfte aktiviert. Eine wichtige Rolle spielt die eNOS in den Endothelzellen der gastralen Mikrozirkulation bei der Induktion der reaktiven Hyperämie. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der NO-Synthase die hyperämische Reaktion verhindert und so zur Schleimhautschädigung führt (Lippe & Holzer, 1992).

Eine weitere physiologische Aufgabe von NO ist die Regulation der Thrombozytenfunktion. NO hemmt deren Aggregation, die Adhäsion an Gefäßwände und die Sekretion vasoaktiver Substanzen durch aktivierte Thrombozyten. Dadurch wirkt NO antithrombotisch und hält die Durchblutung aufrecht. Auch diese Effekte werden über die Aktivierung der Guanylatcyclase vermittelt. (Lowenstein et al., 1994).

Die Epithelzellen der Magenschleimhaut bilden ebenfalls NO und tragen dadurch zur physiologischen Integrität der Mukosa bei. NO stimuliert über Aktivierung der Guanylatcyclase die Produktion und Sekretion von Schleim (Brown et al., 1993). Darüber hinaus stimuliert NO den Transport von Chloridionen aus dem Epithel in das Lumen und damit die Sekretion von Flüssigkeit. Eine gesteigerte Flüssigkeitssekretion vermindert die Adhäsion von Bakterien und verdünnt die Konzentration schädigender Agenzien (Wallace & Miller, 2000). Im Duodenum trägt NO auch zur Sekretion von Bicarbonat bei (Holm et al., 1998).

Im zentralen und peripheren Nervensystem hat NO Bedeutung als Neurotransmitter, der unabhängig von Synapsen Signale zwischen Zellen weiterleiten kann. So spielt NO im zentralen Nervensystem nicht nur bei der Schmerzwahrnehmung sondern auch bei der Ausprägung von Neuronen, bei der Gedächtnisfunktion und bei Lernvorgängen eine wichtige Rolle (Morris et al., 1992). Im peripheren Nervensystem reguliert NO als Neurotransmitter der NANC(nicht adrenerg nicht cholinerg)-Neuronen die Peristaltik des Gastrointestinaltrakts, insbesondere die direkte Relaxation der glatten Muskulatur (Martin et al., 2001).

Durch iNOS-Enzyme gebildetes NO agiert als Modulator der Wundheilung, von Entzündungsprozessen und der unspezifischen Immunabwehr.

Durch Stimulation der Angiogenese und der Kollagensynthese in Wundfibroblasten beschleunigt Stickstoffmonoxid die Heilung von Wunden und damit auch von gastralen

Ulzera. Während eine Hemmung der NOS die Heilungsprozesse verzögert, tragen NO-Donoren zur Heilung bei (Elliott et al., 1995; Schaffer et al., 1997). Auch eine gute Durchblutung am Rande der Wunde ist für die Heilung essentiell und wird durch NO positiv beeinflusst (Martin et al., 2001).

In Abhängigkeit von der Konzentration kontrolliert Stickstoffmonoxid Cytokin-vermittelte Entzündungsreaktionen. Eine konstante NO-Freisetzung durch konstitutive NO-Synthasen stabilisiert Mastzellen und hemmt die Freisetzung von TNF- α und Interleukinen aus Makrophagen (Wallace & Ma, 2001). NO verhindert außerdem die Interaktionen von Leukozyten mit dem Gefäßendothel. Es konnte gezeigt werden, dass NO sowohl die Expression von β -2 Adhäsionsmolekülen auf neutrophilen Granulozyten als auch von P-Selektin auf Endothelzellen hemmt (Wallace & Miller, 2000). So führte eine Hemmung der NO-Synthase zur vermehrten Adhäsion neutrophiler Granulozyten (Kubes et al., 1991), während NO-freisetzende Verbindungen die Adhäsion der Leukozyten hemmten (Kosonen et al., 1999).

Doch NO fungiert nicht nur als antiinflammatorischer Mediator. Bei der unspezifischen Immunabwehr kommt es durch Cytokine und Endotoxine zur Aktivierung von Makrophagen und Leukozyten. Diese Zellen produzieren dann neben reaktiven Sauerstoffspezies hohe Konzentrationen an NO, wodurch vermehrt proinflammatorische und cytotoxische Effekte auftreten. Durch Interaktionen mit Metallionen und Thiolgruppen modifizieren NO und durch Reaktion mit Superoxid entstandenes Peroxynitrit Proteine und Nukleinsäuren derart, dass sie eine cytotoxische Wirkung auf pathogene Organismen und infizierte Zellen entfalten (Liew & Cox, 1991; Martin et al., 2001).

1.1.4 Entstehung einer NSAID-induzierten Schleimhautschädigung

Aufgrund ihres Säurecharakters rufen manche NSAIDs direkt topische Verletzungen der Magenschleimhaut hervor. Im sauren Milieu des Magens liegen die schwachen Säuren undissoziiert vor und können so leicht durch die Schleimschicht und die Zellmembranen des Epithels migrieren. Im Zellinneren dissoziieren sie aufgrund des höheren pH-Wertes, was zu einer Akkumulation von Protonen und damit zur Zellschädigung führt. Die Migration in die Schleimschicht verringert zusätzlich deren Hydrophobie, wodurch sich die Barrierefunktion verschlechtert (Schoen & Vender, 1989).

Schwerwiegender sind aber die systemischen Effekte der NSAIDs. Wird durch Hemmung der Cyclooxygenase die Synthese der Prostaglandine in den Epithelzellen reduziert, verringert sich die Produktion von Schleim und Bicarbonat, die Durchblutung der Mukosa nimmt ab und die Epithelzellen werden in ihrer Proliferation gehemmt. Die Mukosabarriere wird überwindbar. Säure und andere aggressive Faktoren können die Epithelschicht angreifen (Schoen & Vender, 1989; Whittle, 2003; Wolfe et al., 1999). Schon geringe Dosen von NSAIDs reichen aus, die Prostaglandin-Synthese in der Magenschleimhaut zu unterdrücken (Lee et al., 1994). Durch die Hemmung der Thromboxan-Synthese und damit der Plättchenaggregation können NSAIDs Magen-Darm-Blutungen verursachen und die Heilung bereits vorhandener Ulzera verzögern (Prichard et al., 1989).

Ein initialer Schritt der NSAID-induzierten Mukosaschädigung ist die Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel der gastralen Mikrozirkulation. NSAIDs induzieren durch Stimulation der Freisetzung proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α eine vermehrte Expression der Leukozyten-Adhäsionsmoleküle (Andrews et al., 1994; Santucci et al., 1994). Dadurch wird die Durchblutung auf zweierlei Art und Weise beeinträchtigt. Zum einen können sich durch vermehrte Adhäsion von Leukozyten Mikrothromben im Gefäßsystem bilden, was ischämische Situationen hervorrufen und zum Verschluss bis hin zur Ruptur der Gefäße führen kann. Zum anderen werden die

Endothelzellen direkt geschädigt. Durch Adhäsion aktivierte Leukozyten setzen Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid frei. Reaktive Sauerstoffspezies wirken cytotoxisch auf Endothelzellen, indem sie Lipidperoxidationen in den Zellmembranen initiieren sowie mit Proteinen und der DNA interagieren. Sauerstoffradikale reagieren außerdem direkt mit NO, wodurch in den Gefäßen ein Mangelzustand entsteht (Wallace, 1997). Dass oxidativer Stress zur Schädigung der Magenschleimhaut beiträgt, konnten In-vivo-Studien belegen. Antioxidanzien und die Infusion antioxidativer Enzyme wie Superoxiddismutase und Catalase entfalteten protektive Wirkungen (Takeuchi et al., 1991; Vaananen et al., 1991).

Darüber hinaus aktivieren NSAIDs das mukosale Immunsystem und bewirken eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Leukotrien B₄, Histamin und PAF aus aktivierten Makrophagen und Mastzellen. Diese sind nicht nur starke Vasokonstriktoren sondern erhöhen auch die Permeabilität der Epithelschicht und können durch Chemotaxis weitere Immunzellen anlocken und aktivieren (Wallace, 1997).

1.1.5 Weiterentwicklungen von NSAIDs

Anfang der Neunzigerjahre wurde erkannt, dass es sich bei der Cyclooxygenase (COX) um zwei unterschiedlich exprimierte Isoformen handelt (Fletcher et al., 1992; Needleman & Isakson, 1997). Man ging zunächst davon aus, dass die COX-1 als konstitutiv exprimiertes Enzym die physiologische Bildung der Prostaglandin-Derivate z.B. im Magen, in der Niere und in den Thrombozyten katalysiert, während die Expression der COX-2 erst bei Schmerz- und Entzündungsreaktionen durch Cytokine und Endotoxine induziert wird. Die klassischen NSAIDs sind Hemmstoffe beider Isoformen. Die Identifizierung der COX-2 führte zur Suche nach selektiven Hemmstoffen, die die erwünschten Wirkungen der NSAIDs hervorrufen und weniger gastrale und renale Nebenwirkungen verursachen sollten (FitzGerald & Patrono, 2001; Mitchell & Warner, 1999).

Die ersten Vertreter dieser als Coxibe bezeichneten Arzneistoffgruppe, Rofecoxib und Celecoxib, kamen 1999 auf den Markt. Ihre verminderte ulzerogene Wirkung konnte in der VIGOR- und der CLASS-Studie gezeigt werden, in denen die Coxibe das Risiko für gastrointestinale Komplikationen in etwa halbierten (Bombardier et al., 2000; Silverstein et al., 2000).

In den letzten Jahren belegten allerdings immer mehr Studien, dass die COX-2 nicht nur eine pathophysiologische Funktion besitzt. Das Enzym wird in der Niere, im Uterus sowie im zentralen Nervensystem und in der Magenschleimhaut konstitutiv exprimiert. Es spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (Zimmermann et al., 1998). Coxibe beeinflussen die Nierenfunktion durch Retention von Natriumionen und Wasser, erhöhen den Blutdruck und verursachen Ödembildungen. Diese Effekte waren durchaus mit denen äquivalenter Dosen nicht-selektiver NSAIDs vergleichbar (FitzGerald & Patrono, 2001; Hawkey & Langman, 2003). Die selektive Hemmung der COX-2 verzögerte im Tiermodell ebenfalls die Heilung von Magenulzera (Mizuno et al., 1997; Schmassmann et al., 1998).

Noch schwerwiegender scheint aber ein sich abzeichnendes kardiovaskuläres Risiko der Coxibe zu sein (Mukherjee et al., 2001). So traten in der VIGOR-Studie unter Rofecoxib-Therapie fünfmal mehr Herzinfarkte auf als beim klassischen NSAID Naproxen. Die CLASS-Studie zeigte hingegen keinen Unterschied in der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse zwischen Coxib und klassischen NSAIDs. Allerdings durfte ASS als Thrombozytenaggregationshemmer eingenommen werden.

Eine Erklärung für das erhöhte Risiko könnte die fehlende plättchenhemmende Wirkung der Coxibe liefern. Coxibe verringern die Synthese des gefäßerweiternd und antiaggregatorisch wirkenden Prostacyclins (PGI₂) in den Gefäßen. Die COX-1-vermittelte Synthese des vasokonstriktiven und proaggregatorischen Thromboxans

(TxA₂) bleibt dagegen unbeeinflusst. Da Coxibe so das Gleichgewicht der funktionellen Antagonisten PGI₂ und TxA₂ in Richtung des prothrombotischen TxA₂ verschieben könnten, erhöhen sie möglicherweise das kardiovaskuläre Risiko (Mitchell & Warner, 1999; Weir et al., 2003).

Welche Vor- und Nachteile eine längerfristige Therapie mit Coxiben gegenüber klassischen NSAIDs mit sich bringt, muss noch in weiteren klinischen Studien geklärt werden. So könnte die gleichzeitige Gabe von ASS die kardiovaskulären Risiken der Coxibe ausgleichen, bei länger andauernder Therapie aber auch deren gastrointestinalen Vorteile zunichte machen. Für Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko, bestehender endothelialer Dysfunktion oder eingeschränkter Nierenfunktion erscheint eine Therapie mit Coxiben bis jetzt folglich eher problematisch.

Eine in den letzten Jahre entwickelte Alternative zu den klassischen NSAIDs und den Coxiben stellen die NO-NSAIDs oder CINODs (COX-inhibiting Nitric Oxide Donators) dar. Dabei handelt es sich um konventionelle NSAIDs wie ASS, Naproxen oder Flurbiprofen, die eine Stickstoffmonoxid-freisetzende Nitrooxybutyl- oder Nitrooxymethylphenyl-Gruppe tragen (Keeble & Moore, 2002; Muscara & Wallace, 1999; Wallace et al., 1994).

1.2 NO-NSAIDs

1.2.1 NO freisetzende NSAIDs

Eine Vielzahl von Studien lässt vermuten, dass Stickstoffmonoxid die gastroprotektive Funktion von Prostaglandinen unter einer Therapie mit COX-Hemmern übernehmen kann. Daher wurde untersucht, wie sich die gleichzeitige Gabe von NO und NSAIDs auf die Integrität der Mukosa auswirkt.

In diesen Studien schützten spontan NO-freisetzende Verbindungen und organische Nitrate wie Glyceroltrinitrat die Mukosa, indem sie die Durchblutung aufrecht hielten und die Leukozyten-Adhäsion am Gefäßendothel hemmten (Barrachina et al., 1995; Kosonen et al., 1999; Lopez-Belmonte et al., 1993). Ebenso wurde die Heilung gastraler Ulzera beschleunigt (Konturek et al., 1993). Konventionelle NO-Donoren haben jedoch unerwünschte systemische Wirkungen und die NO-Freisetzung verläuft schnell und kurzzeitig. Dies führte zur Entwicklung der NO-NSAIDs, in denen NO über eine Esterbindung an ein NSAID gekoppelt ist, was zu einer langsameren und länger andauernden NO-Freisetzung führt (Elliott et al., 1995; Wallace et al., 1994).

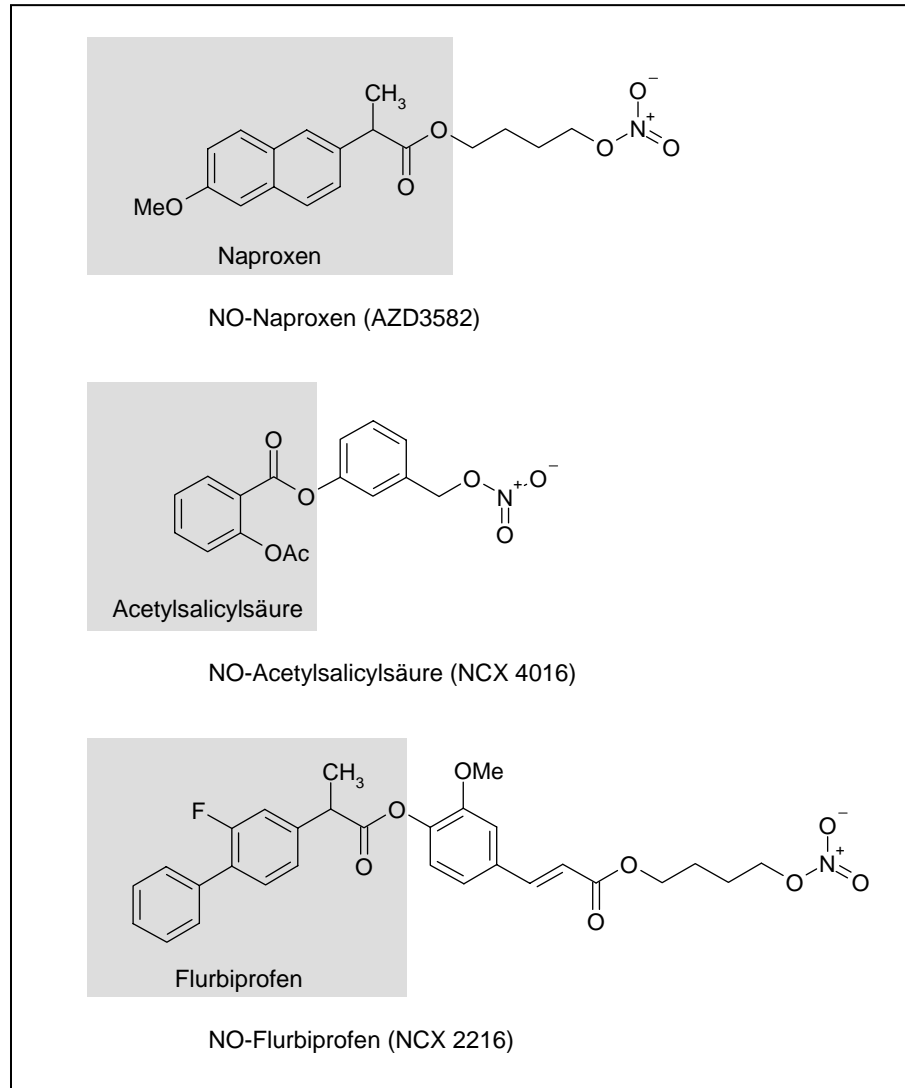


Abb. 1: Strukturen ausgewählter NO-NSAIDs

Die NO-NSAIDs zeigten in Tiermodellen akuter und chronischer Entzündungen antiinflammatorische und antipyretische Wirkungen, die mit denen der NO-freien Muttersubstanzen vergleichbar waren. Das NO-Derivat von Naproxen wirkte sogar stärker analgetisch als Naproxen selbst (Davies et al., 1997). Darüber hinaus hemmte NO-Acetylsalicylic acid (NO-ASS) die Plättchenaggregation effektiver als ASS (Momi et al., 2000). In allen Studien blieb der Gastrointestinaltrakt vor Schädigungen bewahrt. NO-NSAIDs verringerten weder die Durchblutung der Magenschleimhaut noch induzierten sie Leukozyten-Adhäsionsmoleküle auf dem Gefäßendothel. Auch Nierenfunktion und Blutdruck wurden durch NO-NSAIDs nicht beeinflusst (Wallace et al., 1994). Außerdem wurde gezeigt, dass NO-NSAIDs die Heilung von Wunden und bestehenden Magengeschwüren beschleunigten (Elliott et al., 1995; Muscara et al., 2000a). Vor kurzem wurden die Ergebnisse der präklinischen Studien auch in den ersten Humanstudien mit NO-ASS und NO-Naproxen bestätigt (Fiorucci et al., 2003; Hawkey et al., 2003). So trat bei vierzig gesunden Freiwilligen nach 7 Tagen eine dosisabhängige Schädigung der Magenschleimhaut durch ASS auf, während die Beeinträchtigungen durch NO-ASS um 90% reduziert waren. Die Behandlung mit NO-ASS unterschied sich nicht signifikant von der mit Placebo, obwohl das Ausmaß der Hemmung der COX-1 durch NO-ASS und ASS vergleichbar war (Fiorucci et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob NO-NSAIDs in verschiedenen Zellkulturmodellen Stickstoffmonoxid derart freisetzen, dass es zu Reaktionen mit NO-sensitiven Enzymen wie der löslichen Guanylatcyclase oder Bestandteilen anderer Signalwege, z.B. Proteinkinasen, kommt. Besondere Aufmerksamkeit galt hierbei der NO-abhängigen Induktion antioxidativer Proteine am Beispiel der Hämoxigenase-1, deren zellprotektiven Effekte zum Wirkprofil der NO-NSAIDs beitragen könnten.

1.2.2 Zielstrukturen von Stickstoffmonoxid in biologischen Systemen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges, hochreaktives Radikal, das aufgrund seiner Lipophilie frei durch Zellmembranen diffundieren kann. NO reagiert in biologischen Systemen vor allem mit Thiol-Gruppen tragenden Molekülen und Proteinkomplexen, die Redox-reaktive Metallionen beinhalten. Derartig strukturierte Proteine spielen häufig eine Rolle als Enzyme, Ionenkanäle und Rezeptoren sowie Signalproteine und Transkriptionsfaktoren.

Die Reaktion von NO mit solchen Metalloproteinen kann zur Aktivierung aber auch zum Aktivitätsverlust von Enzymen führen. Hämoglobin und Enzyme wie Cytochrom P450 und die lösliche Guanylatcyclase enthalten Redox-reaktive Metallionen in Form von zweiwertigem Eisen, das in der prosthetischen Häm-Gruppe als Zentralatom fungiert (Lancaster & Hibbs, 1990). So ändert die lösliche Guanylatcyclase durch Nitrosylierung des Eisenatoms der Häm-Gruppe ihre Konformation und wird aktiviert (Ignarro, 1999). Durch die Nitrosylierung der Häm-Gruppe bei den Cytochrom-P450-Enzymen kann es zum Häm-Verlust und damit zur Inaktivierung kommen (Stamler et al., 1992).

Während Stickstoffmonoxid mit Metallionen direkt unter Bildung von Nitrosyladdukten reagiert, ist die Reaktion mit Thiol-Gruppen nur indirekt dem NO-Radikal zuzuordnen. In Gegenwart von Sauerstoff findet zunächst die Autooxidation von NO zu NO₂ (Stickstoffdioxid) statt. Durch weitere Reaktionen von NO und NO₂ entsteht in einer Gleichgewichtsreaktion N₂O₃ (Distickstofftrioxid), das *in vitro* beispielsweise mit Glutathion nahezu vollständig zu S-Nitrosoglutathion reagiert (Wink et al., 1994).

Die S-Nitrosylierung hat ähnlich wie die Phosphorylierung von Proteinen die Eigenschaft eines physiologischen Signals (Stamler, 1994). Während z.B. G-Proteine wie p21^{ras} durch S-Nitrosylierung von Cysteinresten aktiviert werden, wird die Aktivität des NMDA-Rezeptors gehemmt. Einige Transkriptionsfaktoren, darunter AP-1 und NFκB, tragen reaktive Thiolgruppen in der DNA-bindenden Region. Modifikationen dieser Thiole können die Bindungseigenschaften verändern und damit zur Aktivierung oder Inhibierung der Transkriptionsfaktoren führen (Lander et al., 1995a; Marshall et al., 2000; Stamler, 1994).

1.2.3 NO als antioxidativer, antiapoptotischer und zellprotektiver Mediator

In den letzten Jahren konnte in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid in verschiedenen Zellmodellen für oxidativen Stress eine protektive Wirkung entfalten kann. Dabei wirkt NO nicht nur durch direkte Reaktionen sondern auch über den *second messenger* cGMP und die Modulation von Transkriptionsfaktoren.

Durch direkte Reaktion mit NO werden Sauerstoff- und Hydroxylradikale neutralisiert und damit weiteren Reaktionen entzogen (Wink et al., 1999). Mit Superoxid (O₂⁻) reagiert NO zu Peroxynitrit (ONOO⁻), das ein starkes Oxidanz darstellt. In erster Linie vermittelt diese Reaktion *in vivo* aber nicht Oxidationen, sondern fängt NO ab und verhindert direkte Effekte, z.B. bei der Regulation des Blutdrucks (Furchgott & Vanhoutte, 1989). Die Reaktion mit Superoxid hemmt außerdem die Haber-Weiss-

Reaktion, in der aus Superoxid und Wasserstoffperoxid u.a. das hoch reaktive Hydroxylradikal (HO^\cdot) gebildet wird. Diese reaktive Sauerstoffspezies führt durch Lipidperoxidation und DNA-Strangbrüche zur Zellschädigung.

Darüber hinaus kann NO Radikal-abhängige Lipidperoxidationen beenden, indem es mit Lipid-Peroxo-Radikalen reagiert und dadurch die Radikalkettenreaktion terminiert (Rubbo et al., 1994).

Zu den protektiven Effekten, die durch direkte Reaktion von NO vermittelt werden, gehört auch die Hemmung von Caspase-Enzymen. Die Caspasen sind eine Familie von Cystein-Proteasen, die mit dem Interleukin-1 β konvertierenden Enzym (ICE) verwandt sind. Man teilt sie in zwei Gruppen ein, die Caspase-1-ähnlichen und die Caspase-3-ähnlichen Enzyme. Die Aktivierung der Caspase-3-Enzymfamilie ist eine Hauptreaktion beim Cytokin-vermittelten apoptotischen Zelltod. In Endothelzellen konnte mit Hilfe von NO-Donoren gezeigt werden, dass niedrige NO-Spiegel die Caspasen 1 und 3 posttranslational durch S-Nitrosylierung inaktivierten und dadurch die TNF- α induzierte Apoptose hemmten (Dimmeler et al., 1997; Fiorucci et al., 1999b).

Die antiapoptotische Wirkung von Stickstoffmonoxid wird in unterschiedlichen Zelltypen aber nicht nur direkten Reaktionen zugeschrieben. In Hepatozyten konnte zusätzlich zur Hemmung der Caspase-Aktivität auch die Involvierung des *second messengers* cGMP gezeigt werden (Kim et al., 1997c; Saavedra et al., 1997). Darüber hinaus hemmte Stickstoffmonoxid apoptotische Prozesse in humanen Eosinophilen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Endothelzellen über Induktion cGMP-abhängiger Signalwege (Beauvais et al., 1995; Genaro et al., 1995; Oberle & Schröder, 1997; Polte et al., 1997; Sciorati et al., 1997; Shen et al., 1998). Allerdings wurde ebenfalls in Endothelzellen und B-Lymphozyten sowie in Brustepithelzellen (MCF-7) gezeigt, dass cGMP nicht an der antiapoptotischen Wirkung beteiligt war (Dimmeler et al., 1997; Kim et al., 1998; Mannick et al., 1994).

Ein Schwerpunkt der Erforschung zellschützender Eigenschaften von Stickstoffmonoxid lag in den letzten Jahren auf der Induktion antioxidativer und antiapoptotischer Proteine. Dabei belegen immer mehr Studien, dass die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress vorrangig auf der Stufe der Transkription reguliert wird. Die posttranslationale Modifikation von Transkriptionsfaktoren könnte dabei einen wichtigen Mechanismus darstellen, über den zelluläre Systeme Veränderungen im Redox-Gleichgewicht registrieren (Marshall et al., 2000).

NO besitzt sowohl durch direkte Reaktionen mit Elementen von Transkriptionsfaktoren als auch indirekt durch Stimulation bestimmter Signalwege die Eigenschaft, die Expression von Proteinen zu regulieren. Hierzu zählen u.a. das antiapoptotische Protein Bcl-2 (Ciani et al., 2002), die Superoxiddismutase (Frank et al., 1999; Sano et al., 1997), das Eisenspeicherprotein Ferritin (Oberle et al., 1999) und mindestens zwei Vertreter der so genannten Hitzeschockproteine, HSP70 und HSP32, für die zellschützende Eigenschaften beschrieben wurden (Kim et al., 1997b; Polte et al., 2000).

Die Induktion von Hitzeschockproteinen (*heat shock proteins*, HSP) schützt Zellen nicht nur vor Schädigungen durch Hitze sondern auch durch Cytokin-vermittelte Prozesse und oxidativem Stress. So induzierte NO in Hepatozyten das HSP70 und schützte diese vor durch TNF- α - und Actinomycin-D-induzierter Apoptose (Kim et al., 1997b). Das Hitzeschockprotein HSP32 mit einem Molekulargewicht von 32 kDa ist identisch mit der Hämoxxygenase Typ 1. Diese nimmt eine besondere Stellung als antioxidativ, antiapoptotisch und antiinflammatorisch wirkendes Enzym ein.

1.3 Die Hämoxygenase

1.3.1 Konstitutive und induzierbare Isoformen

Die Hämoxygenase gehört zur Familie der Monooxygenasen. Das Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim oxidativen Abbau des Häms zu Biliverdin und äquimolaren Mengen an Kohlenstoffmonoxid (CO) und Eisen. Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Wiedergewinnung des Eisens aus dem Hämoglobin alternder Erythrozyten und beim Abbau anderer Hämproteine (Abb. 2). Das lineare Tetrapyrrol Biliverdin wird im Folgenden sofort durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert (Choi & Alam, 1996).

Bis heute wurden drei Isoformen der Hämoxygenase identifiziert, die Produkte unterschiedlicher Gene sind. Die Hämoxygenase Typ 2 (HO-2, 36 kDa) wird konstitutiv im zentralen Nervensystem, in der Leber, Milz und im Gefäßsystem exprimiert. Die erst vor kurzem identifizierte Hämoxygenase Typ 3 (HO-3, 33 kDa) wird ebenfalls konstitutiv exprimiert. Sie besitzt jedoch nur eine geringe katalytische Aktivität. Ihre zelluläre Funktion ist noch weitgehend ungeklärt. Die Hämoxygenase Typ 1 (HO-1) ist die induzierbare, ubiquitär im Organismus vorkommende Isoform (Maines et al., 1986; McCoubrey et al., 1997; Otterbein & Choi, 2000). Die HO-1 wird durch das natürliche Substrat Häm und eine Vielzahl strukturell stark unterschiedlicher Agenzien induziert. Neben Schwermetallen, Hormonen und Hitzeschock sind dies vor allem Stickstoffmonoxid und verwandte Spezies sowie Agenzien, die oxidativen Stress verursachen. Darunter sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS oder *reactive oxygen intermediates*, ROI), Endotoxine, Cytokine wie TNF- α , UV-Licht, Natriumarsenit, Hyperoxie und Glutathionmangel von besonderer Bedeutung (Choi & Alam, 1996; Foresti & Motterlini, 1999; Hartsfield et al., 1997).

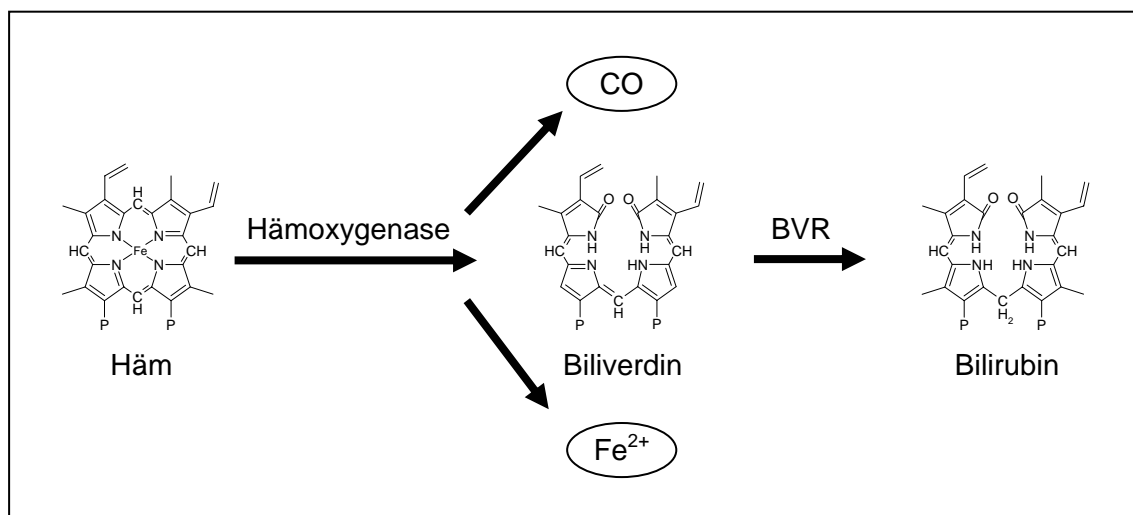


Abb. 2: Schematische Darstellung des Abbaus der Häm-Gruppe. (BVR: Biliverdin-Reduktase, CO: Kohlenstoffmonoxid, P = Propionatrest)

1.3.2 Die induzierbare HO-1 und ihre Funktion als protektives Protein

In den letzten Jahren wurde für die induzierbare Hämoxigenase eine Vielzahl von protektiven Effekten *in vitro* und *in vivo* beschrieben. Die Induktion oder Überexprimierung des Enzyms schützte die unterschiedlichsten Zelltypen vor Schädigung durch Prooxidanzien (Clark et al., 2000a; Inguaggiato et al., 2001; Motterlini et al., 1996a; Polte et al., 2000). So vereint die HO-1 antiatherosklerotische und antiapoptotische Eigenschaften (Brouard et al., 2000; Petrache et al., 2000; Siow et al., 1999) mit einer antiinflammatorischen und Schmerz-modulierenden Wirkung (Haider et al., 2002; Steiner et al., 2001; Wagener et al., 2001; Willis et al., 1996). Im Speziellen schützte die HO-1 *in vivo* Transplantate vor der Abstoßung (Soares et al., 2001), die Niere vor toxischer Glomerulonephritis (Mosley et al., 1998) und bei induzierter Rhabdomyolyse (Nath et al., 1992) sowie das Herz vor Schädigung durch Ischämie und Reperfusion (Yet et al., 2001). Darüber hinaus spielt das Enzym eine entscheidende Rolle im Wachstum und bei der Angiogenese. Durch Regulation der Synthese von Wachstumsfaktoren und der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung kontrolliert die HO-1 Zellproliferation, Apoptose und Hypertrophie (Durante, 2003).

Die Bedeutung der Hämoxigenase Typ 1 *in vivo* zeigte sich an HO-1-defizienten *Knockout*-Mäusen. Kultivierte Fibroblasten dieser Mäuse produzierten hohe Spiegel an freien Sauerstoff-Radikalen und zeigten starke Cytotoxizität durch Prooxidanzien. Die Gabe von Endotoxin verursachte in den *Knockout*-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren vermehrte Leberzellnekrose durch oxidative Schädigung und eine höhere Mortalität durch endotoxischen Schock (Poss & Tonegawa, 1997b). Darüber hinaus entwickelten die Mäuse eine Eisenmangel-Anämie mit Eisenablagerung in Leber und Niere, die zur chronischen Entzündung der Organe führte (Poss & Tonegawa, 1997a). Die gleichen Befunde zeigte der erste klinische Fall humaner HO-1 Defizienz, der darüber hinaus u.a. unter starken Wachstumsstörungen, Hyperlipidämie mit schwerwiegender Atherosklerose und Endothelschädigung sowie Leuko- und Thrombozytose litt (Kawashima et al., 2002; Yachie et al., 1999).

Für diese weitgreifenden protektiven Effekte der HO-1 werden, neben dem Abbau des prooxidativen und cytotoxischen Häms (Jeney et al., 2002; Vincent, 1989), vor allem die katalytischen Produkte Kohlenstoffmonoxid (CO), freie Eisenionen sowie Biliverdin und Bilirubin verantwortlich gemacht.

Kohlenstoffmonoxid besitzt eine mit NO vergleichbare Bedeutung als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem und ist ebenso in der Lage über Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase den Gefäßmuskeltonus und die Plättchenaggregation zu regulieren (Foresti & Motterlini, 1999; Maines, 1997). Durch Hemmung der Expression proinflammatorischer Cytokine besitzt endogen gebildetes CO entzündungshemmende Eigenschaften (Otterbein et al., 2000). In Endothelzellen und Fibroblasten konnte eine Hemmung der TNF- α -vermittelten Apoptose durch CO gezeigt werden (Brouard et al., 2002; Petrache et al., 2000). Darüber hinaus schützte CO *in vivo* gegen Lungenschädigung durch Hyperoxie (Otterbein et al., 1999) und beugte atherosklerotischen Läsionen vor, die bei chronischer Transplantatabstoßung und Ballondilatation von Gefäßen vermehrt auftreten (Otterbein et al., 2003). Diese Effekte wurden mit Hemmung der Aktivierung und Migration von Leukozyten und der Proliferation von Gefäßmuskelzellen in Verbindung gebracht.

Bilirubin wurde früher zumeist als cytotoxisches, lipidlösliches Abfallprodukt eingestuft, das man in hohen Konzentrationen mit Gelbsucht und Hirnschäden bei Neugeborenen assoziierte. Doch Stocker et al. zeigten 1987 zum ersten Mal, dass Bilirubin in physiologischen Konzentrationen *in vitro* antioxidativ wirkt, indem es reaktive Sauerstoffspezies bindet und neutralisiert. In der Hemmung der Lipidperoxidation übertraf Bilirubin sogar die antioxidativen Eigenschaften von α -Tocopherol und Vitamin C

(Stocker et al., 1987). Durch Aktivierung der HO-2 endogen gebildetes Bilirubin schützte kultivierte Neuronen vor Wasserstoffperoxid-induzierter Schädigung. Der Effekt konnte durch Inkubation mit Bilirubin in nanomolaren Konzentrationen reproduziert werden (Dore et al., 1999). Wenn in HeLa-Zellen die Expression der Biliverdin-Reduktase mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden blockiert wurde, waren erhöhte Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies und vermehrter apoptotischer Zelltod feststellbar (Baranano et al., 2002). Die antioxidativen Eigenschaften des Bilirubins wurden durch verschiedene Studien *ex vivo* und *in vivo* belegt. So konnte an isolierten Rattenherzen ein kardioprotektiver Effekt sowohl durch Stimulation der HO-1 als auch durch exogenes Bilirubin im Ischämie-Reperfusion-Modell gezeigt werden (Clark et al., 2000b). Dennery et al. stellten im Tiermodell einen protektiven Effekt erhöhter Plasmaspiegel an unkonjugiertem Bilirubin gegen Hyperoxie-vermittelte oxidative Schädigung fest (Dennery et al., 1995). Humanstudien zeigten bei Patienten mit höherem Bilirubin-Plasmaspiegel ein geringeres Risiko für eine koronare Herzkrankheit (Hopkins et al., 1996; Mayer, 2000; Schwertner et al., 1994). Außerdem wurde das Gilbert-Syndrom, eine benigne Hyperbilirubinämie, mit einem geringeren Risiko für die koronare Herzkrankheit in Zusammenhang gebracht (Vitek et al., 2002).

Durch Spaltung der Häm-Gruppe freigesetzte Eisenionen sind ein starker physiologischer Induktor des Ferritins. Dieses Eisenspeicherprotein kommt ubiquitär im Körper vor. Die Regulation der Expression findet hauptsächlich auf translationaler Ebene statt. In den letzten Jahren konnten verschiedene Studien zeigen, dass Ferritin antioxidative und cytoprotektive Eigenschaften besitzt. Diese Wirkung ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass Ferritin durch Speicherung des freien Eisens der Sauerstoffradikalbildung den Katalysator entzieht. So schützte die Stimulation der Ferritinexpression Endothelzellen vor oxidativer Schädigung (Balla et al., 1992; Oberle & Schröder, 1997; Oberle et al., 1999) und Ferritin-defiziente Zellen wiesen eine gesteigerte Empfindlichkeit auf (Lin & Girotti, 1998).

Auch wenn in einigen Arbeiten die Effekte der HO-1 einzelnen Produkten zugeordnet werden, so ist in der Gesamtheit davon auszugehen, dass die cytoprotektiven, antiinflammatorischen und antiapoptotischen Effekte der HO-1 aus einem Zusammenspiel aller katalytischen Produkte resultieren.

1.4 Genregulation der HO-1

1.4.1 Genregulation der HO-1 durch cGMP-abhängige Signalwege

Welche Rolle der *second messenger* cGMP bei der Genregulation der HO-1 spielt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert und bedarf noch weiterer Klärung. In glatten Gefäßmuskelzellen ist die HO-1 durch NO-Donoren induzierbar. Lipophile, membran-gängige cGMP-Analoga wie 8-Bromo-cGMP induzierten die HO-1 jedoch nicht (Durante et al., 1997; Hartsfield et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse ergaben Studien in Hepatozyten (Kim et al., 1995) und Endothelzellen (Mottlerlini et al., 1996a). Auch der selektive Guanylatcyclase-Hemmstoff ODQ blockierte sowohl in glatten Gefäßmuskelzellen als auch in Nierenepithelzellen die Induktion der HO-1 durch NO nicht (Hartsfield et al., 1997; Liang et al., 2000).

Im Gegensatz dazu zeigten Immenschuh et al. in primären Hepatozyten eine Induktion der HO-1 durch 8-Bromo-cGMP, die mit Hilfe von KT5823, einem spezifischen Hemmstoff der cGMP-abhängigen Proteinkinase G, blockiert werden konnte (Immenschuh et al., 1998). Außerdem gibt es Belege für eine cGMP-abhängige Induktion in Endothelzellen. So waren die Effekte von NO-Donoren in bovinen Endothelzellen durch den Guanylatcyclase-Hemmstoff ODQ hemmbar und konnten mit Hilfe lipophiler

cGMP-Analoga reproduziert werden (Polte et al., 2000). Darüber hinaus induzierte 8-Bromo-cGMP die HO-1 in humanen Endothelzellen und in Nierenepithelzellen (Kiemer et al., 2003; Polte et al., 2002).

1.4.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Proteinkinasen und Proteinphosphatasen sowie GTP-bindende Proteine sind Bestandteile zahlreicher zellulärer Signalwege. Unter den Proteinkinasen hat in den letzten Jahren eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen, die so genannten Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAP-Kinasen, MAPK) eine besondere Bedeutung erlangt (Arbabi & Maier, 2002; Davis, 1993; Widmann et al., 1999).

Neben der namensgebenden Aktivierung durch bestimmte Wachstumsfaktoren (Mitogene) konnte bisher gezeigt werden, dass MAP-Kinasen durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden, die auch die Transkription der HO-1 induzieren. So führte z.B. die Inkubation von Zellen mit Phorbolestern, Cytokinen, UV-Licht, Hitzeschock, LPS und Induktoren von oxidativem Stress zur Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen (Elbirt et al., 1998).

Zu dieser Familie von Proteinkinasen zählen die extrazellulär regulierte Kinase (ERK; auch als p42/p44 bezeichnet), die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK; auch als Stress-aktivierte Proteinkinase SAPK bezeichnet) sowie die p38 MAP-Kinase.

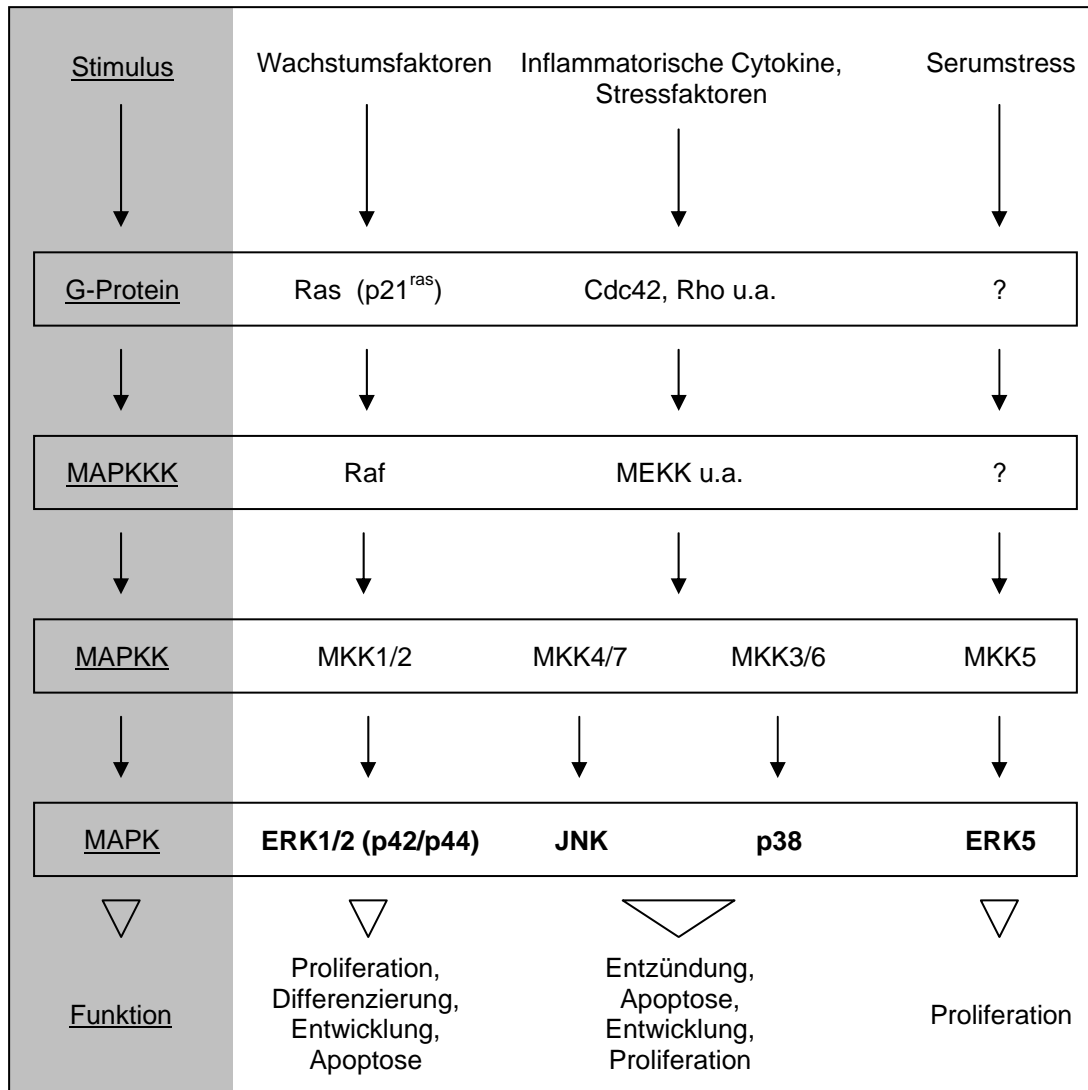


Abb. 3: Die vier Hauptsignalwege der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Zur Aktivierung müssen MAP-Kinasen an einem Threonin- und an einem Tyrosinrest phosphoryliert werden. Der MAP-Kinase-Aktivator, der beide Phosphorylierungen katalysiert, ist die so genannte MAP-Kinase-Kinase (MAPKK oder MKK). Diese wird stimuliert durch eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK oder MEKK), die zuvor durch ein GTP-bindendes Protein (z.B. Ras, Cdc42) aktiviert wurde (Davis, 1993). Nach der Aktivierung dieser Kaskade wird das Signal durch Phosphorylierung verschiedener cytoplasmatischer Proteine weitergeleitet. Darüber hinaus können die Kinasen durch Translokation in den Zellkern genregulatorische Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (*Activator-Protein-1*), der TCF-Familie (*Ternary Complex Factors*), CNC-bZIP-Proteine (*Cap`N`Collar-Basic-Leucin-Zipper*) und STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) aktivieren (Karin, 1995; Pearson et al., 2001; Yu et al., 2000). Auch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (*Nuclear-Factor κB*) durch MAP-Kinasen wurde beschrieben (Carter et al., 1999; Korus et al., 2002).

Die MAP-Kinase ERK nimmt bei der Regulation von Zelldifferenzierungs- und Zellproliferationsvorgängen eine zentrale Rolle ein. Die Kinasen p38 und JNK werden hauptsächlich durch verschiedene zelluläre Stressformen aktiviert.

1.4.3 Aktivierung von MAP-Kinasen durch Stickstoffmonoxid

In humanen T-Zellen aktivieren Stickstoffmonoxid und chemisch verwandte Spezies (NO_x) das GTP-bindende Protein p21^{ras} . Dieses den ERK-Kinase-Signalweg einleitende Protein wurde als essentiell für die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ beschrieben (Lander et al., 1995a; Lander et al., 1995b). Weitere Studien zeigten, dass NO und NO_x in diesem Zelltyp die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 aktivieren (Lander et al., 1996).

Durch Inkubation mit dem NO -Donor Nitroprussid-Natrium (SNP) wurde in Nierenepithelzellen (HEK293) die Kinase JNK (Kim et al., 1997a) und in Makrophagen (RAW 264.7) die Kinase JNK und p38 aber nicht ERK aktiviert (Jun et al., 1999). In der gleichen Makrophagen-Zelllinie wurde die LPS-induzierte Phosphorylierung von JNK und p38 durch NO verstärkt und verlängert (Jacobs & Ignarro, 2003). Pfeilschifter und Huwiler zeigten die Aktivierung der MAP-Kinase JNK durch verschiedene NO -Donoren in glomerulären Mesangial- und Endothelzellen (Pfeilschifter & Huwiler, 1996). Ebenfalls in Mesangialzellen aktivierten NO -Donoren die MAP-Kinasen ERK1/2 (Callsen et al., 1998). In vaskulären Endothelzellen wurden ERK1/2 durch Inkubation mit SNP stimuliert (Parenti et al., 1998). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass eine Inkubation von primären bovinen Endothelzellen (BAEC) mit dem NO -Donor SperminNONOat die Phosphorylierung von ERK, JNK und p38 stimuliert. Darüber hinaus stimulierte NO über einen ERK und p38 abhängigen Mechanismus die Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern (Buckley et al., 2003).

1.4.4 Beteiligung von MAP-Kinasen an der Genregulation der HO-1

Bei der NO -abhängigen Induktion der HO-1 haben Buckley et al. in Endothelzellen eine Beteiligung von MAP-Kinasen nachgewiesen. Spezifische Inhibitoren der MAP-Kinasen p38 und ERK hemmten die Induktion der HO-1-Proteinexpression durch SperminNONOat konzentrationsabhängig (Buckley et al., 2003). Chen und Maines zeigten in HeLa-Zellen eine Beteiligung der Kinasen p38 und ERK, nicht aber JNK an der Induktion der HO-1-mRNA durch spontane NO -Donoren (Chen & Maines, 2000).

In einigen Zellsystemen gibt es Belege für eine Beteiligung von MAP-Kinasen an der Induktion der HO-1-mRNA durch verschiedene Stressfaktoren. So war die HO-1-Induktion durch Reoxygenierung nach Anoxie in Endothelzellen der Ratte (PAEC) von der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 abhängig (Zhang et al., 2002). In humanen Brustepithelzellen (MCF-7) erfolgte eine Promotor-Konstrukt-Aktivierung durch Cadmium über p38-abhängige Signalwege (Alam et al., 2000). Eine HO-1-Promotor-Aktivierung in Hepatomzellen des Huhns (LMH) durch Cadmium, Arsenit und Hitzeschock erforderte die Aktivität der Kinasen ERK und p38, war aber von JNK unabhängig (Elbirt et al., 1998). In Hepatozyten der Ratte wurde eine Abhängigkeit der HO-1-Genexpression von JNK und p38 nachgewiesen (Kietzmann et al., 2003). In humanen Endothelzellen war für die HO-1-Induktion durch das kardiovaskuläre Hormon ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK und JNK erforderlich (Kierner et al., 2003). Darüber hinaus wurde für die HO-1-Induktion durch die pflanzlichen Antioxidanzien Curcumin und Kaffeesäurephenylester eine Abhängigkeit vom MAP-Kinase-p38-Signalweg in Nierenepithelzellen der Ratte (NRK-52E) gezeigt (Balogun et al., 2003).

1.4.5 Genregulatorische Proteine mit Einfluss auf die HO-1-Promotorregion

Bisher konnten durch Untersuchungen am HO-1-Gen der Maus mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Konstrukten zwei 5' distale *Enhancer*-Regionen, E1 und E2 (auch als SX2 und AB1 bezeichnet), identifiziert werden. Diese aktivieren die Transkription als Reaktion auf verschiedene, zumeist oxidativen Stress auslösende Agenzien (z.B. Häm, Cadmium, Phorbol ester, Arsenit, H₂O₂ und LPS). Jede dieser Enhancer-Regionen enthält Kopien so genannter *Stress-Response-Elements* (StRE), die u.a. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (z.B. c-Jun, c-Fos) und CNC-bZIP-Proteine (z.B. Nrf2) enthalten (Alam et al., 1994; Alam et al., 1995; Huang et al., 2000).

Die strukturell und funktionell ähnlichen Bindungsstellen der DNA humaner Zellen werden meist als *Antioxidant-Responsive-Elements* (ARE) bezeichnet (Balogun et al., 2003). Diese wurden nicht nur in der Promotorregion des HO-1-Gens (Alam et al., 1999) sondern auch bei anderen antioxidativen Enzymen wie der γ -Glutamylcystein-Synthase (Wild et al., 1999) und der L- und H-Kette des Ferritins (Wasserman & Fahl, 1997) gefunden.

Neben DNA-Sequenzen, an die AP-1 und Nrf2 binden, wurden auch Bindungsstellen für AP-2, NF κ B, Interleukin-6 und andere Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion der HO-1 gefunden (Choi & Alam, 1996; Lavrovsky et al., 1994).

Die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie und Nrf2 haben gemeinsam, dass es sich um basische Proteindimere handelt, die an der DNA Leucin-Zipper-Strukturen ausbilden.

Aktivator-Protein-1 (AP-1) ist eine kollektive Bezeichnung für dimerische Transkriptionsfaktoren, die aus Jun-, Fos- oder ATF (*Activating Transcription Factor*)-Proteinen bestehen. Die AP-1 Proteine Jun und Fos sind Produkte so genannter *immediate-early-response* Gene, deren Transkription zur initialen zellulären Antwort auf verschiedene Stressformen gehört (Bebien et al., 2003).

Eine Reihe von Studien zeigte die Abhängigkeit der HO-1-Induktion von AP-1-Proteinen. So führte die pharmakologische Hemmung der AP-1-Aktivität in humanen Endothelzellen zu einer verminderten HO-1-Induktion durch IL-1 α , TNF- α (Terry et al., 1998) und ANP (Kierner et al., 2003). Weiterhin verhinderten dominant-negative Mutanten von c-Jun im Gegensatz zum Wildtyp die Arsenit-vermittelte Aktivierung des HO-1-Promotors in Hepatomzellen (Elbirt et al., 1998). Auch in Makrophagen (RAW 264.7) stellte sich sowohl die durch LPS als auch die durch Hypoxie induzierte Transkription des HO-1-Gens als AP-1-abhängig heraus (Camhi et al., 1998; Lee et al., 2000).

Das CNC-bZIP-Protein Nrf2 (*NF-E2-Related Factor 2*) liegt im Cytosol an das Hemmprotein KEAP1 assoziiert vor. Durch Prooxidanzien und elektrophile Agenzien wird dieser Hemmmechanismus inaktiviert und Nrf2 in den Zellkern transloziert (Huang et al., 2000; Itoh et al., 1999). Da das KEAP1-Protein viele Cysteinreste enthält, wird vermutet, dass der Nrf2-KEAP1-Komplex als zellulärer Sensor für oxidativen Stress fungiert (Itoh et al., 1999).

Nrf2 wird eine wichtige Rolle bei der Regulation antioxidativer Gene zugeordnet. Nrf2-Deletionsmutanten waren wesentlich empfindlicher gegenüber oxidativer Zellschädigung (Ishii et al., 2000) und exprimierten signifikant niedrigere Konzentrationen antioxidativer Proteine bei Inkubation mit Prooxidanzien (Yu et al., 2000). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Nrf2 die HO-1-Induktion durch Cadmium und andere Agenzien in diversen Zelltypen vermittelt (Alam et al., 1999; Alam et al., 2000; He et al., 2001). Auch das pflanzliche Antioxidanz Curcumin bewirkte in Nierenepithelzellen (NRK-52E) die Inaktivierung des Nrf2-KEAP1-Komplexes und eine gesteigerte Nrf2-Bindung an den HO-1-Promotor (Balogun et al., 2003). Darüber

hinaus aktivierte das natürliche Substrat der HO-1 deren Transkription in Nierenepithelzellen durch Stabilisierung des Nrf2-Proteins (Alam et al., 2003).

Der Transkriptionsfaktor NF κ B (*Nuclear Factor* κ B) ist ein dimerisches Protein bestehend aus Proteinen der Rel-Familie (p50, p65, p52, cRel und RelB). Vor allem das p50-p65 Heterodimer ist an der Aktivierung der Transkription verschiedener Gene im Entzündungsgeschehen (u.a. TNF- α , ICAM-1, NOS2) beteiligt. Im inaktiven Stadium liegt NF κ B im Cytosol an das Hemmprotein I κ B assoziiert vor. Verschiedene Stimuli, darunter TNF- α , UV-Licht und H₂O₂, können die Degradation von I κ B einleiten. Dadurch wird NF κ B freigesetzt und in den Zellkern transloziert (Thanos & Maniatis, 1995).

1.4.6 NO/cGMP und HO-1-regulatorische Proteine

Verschiedene Studien belegten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Signalwegen, die für die Expression der HO-1 diskutiert werden. So wurde gezeigt, dass NO über Guanylatcyclase- und Proteinkinase-G-abhängige Mechanismen in Fibroblasten die MAP-Kinase p38 und in Mesangialzellen die MAP-Kinasen ERK1/2 aktiviert (Browning et al., 2000; Callsen et al., 1998). Darüber hinaus sind Zusammenhänge zwischen cGMP-abhängiger Genaktivierung und AP-1-Elementen nachgewiesen worden (Gudi et al., 1996; Pilz et al., 1995). In Hepatozyten wurde das HO-1-Gen durch cGMP über das so genannte cAMP-Response/AP-1-Element aktiviert (Immenschuh et al., 1998). Erhöhte cGMP-Spiegel und eine konstitutiv aktive Mutante der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) aktivierten in Fibroblasten die MAP-Kinase JNK und darüber die AP-1-Aktivität (Soh et al., 2001).