

# 1 Einleitung

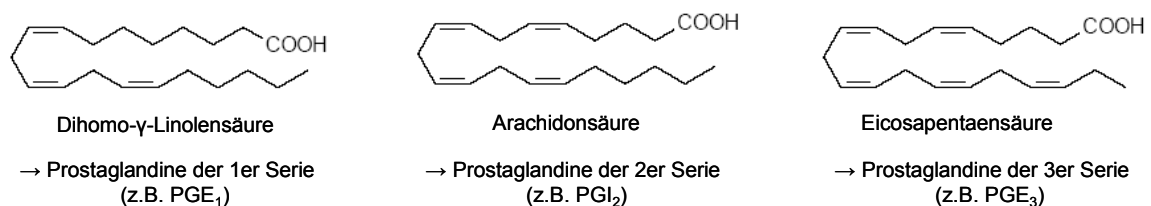
## 1.1 Prostaglandine

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 Prostata drüse 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

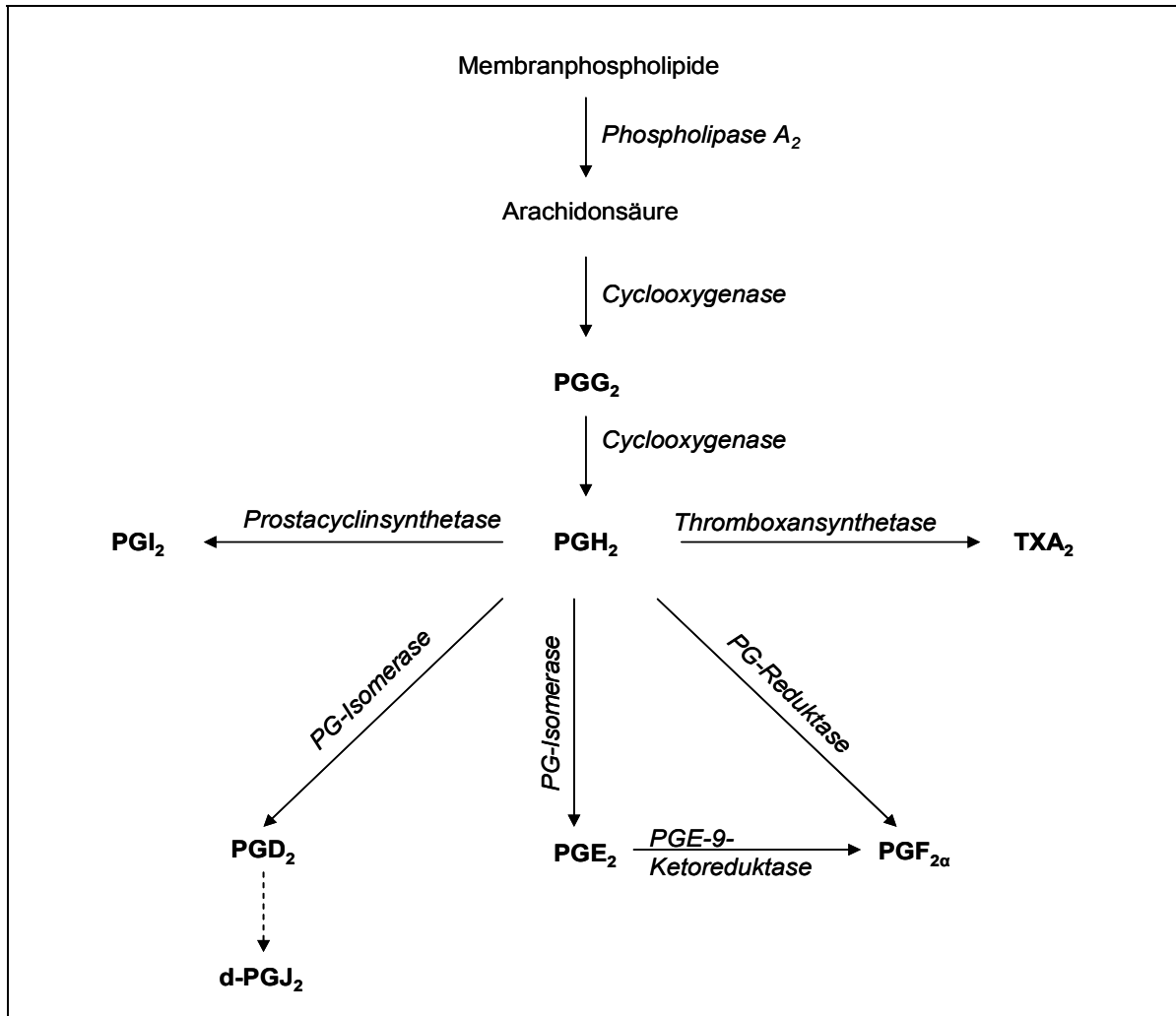
Prostaglandine sind mehrfach ungesättigte, zyklische Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen. Sie werden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren enzymatisch gebildet. Dabei entstehen aus Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure Prostaglandinderivate mit einer Doppelbindung in der Seitenkette, während aus Arachidonsäure (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 A<sub>2</sub> und lysosomale Phospholipasen freigesetzt (Vogt 1978).



**Abbildung 1:** Prostaglandin-Präkursorfettsäuren.

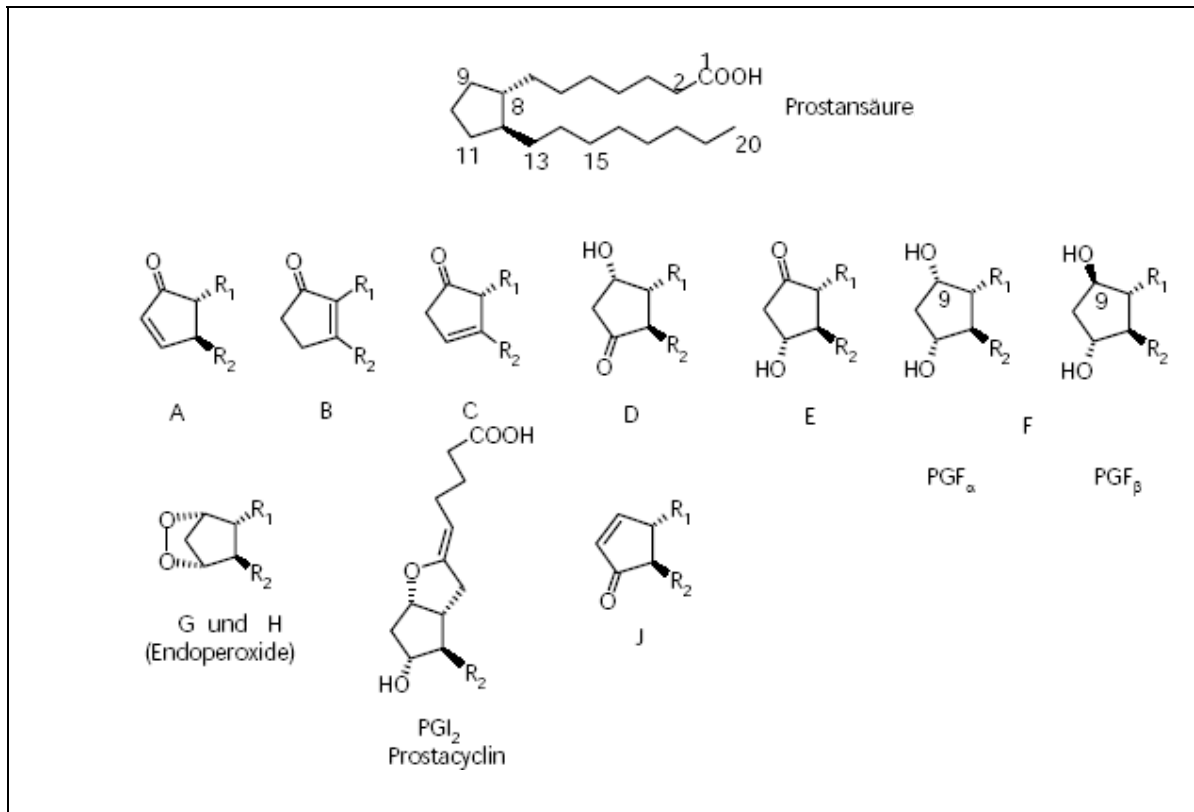
Die freigesetzten Fettsäuren werden durch zwei unterschiedliche Oxygenase-Systeme zu biologisch aktiven Metaboliten verstoffwechselt. Durch eine Aktivierung der Lipoxygenase entstehen Leukotriene und Lipoxine, während die Cyclooxygenase (COX) Prostaglandine, Thromboxane (TX) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) 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 und mechanische Reize sowie durch intrazelluläre 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  $\text{PGG}_2$  in  $\text{PGH}_2$  überführt. Die entstehenden Endoperoxide sind sehr instabil. Anschließend kann  $\text{PGH}_2$  von nachgeschalteten Synthasen zell- bzw. gewebespezifisch zu den verschiedenen Prostaglandinen,  $\text{PGI}_2$  und Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) 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 TXA<sub>2</sub>-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 Ca<sup>2+</sup>-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<sub>2</sub> (15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>) bildet eine Ausnahme, wie unter 1.1.2.4 näher erläutert wird.

Rezeptortyp	Rezeptorsubtyp	Ligand	Signaltransduktion
DP		PGD <sub>2</sub>	cAMP ↑
EP	EP1	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGI <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup> ↑
	EP2	PGE <sub>1</sub> , PGE <sub>2</sub>	cAMP ↑
	EP3	PGE <sub>1</sub> , PGE <sub>2</sub>	cAMP ↑↓
	EP4	PGE <sub>1</sub> , PGE <sub>2</sub>	cAMP ↑
FP		PGF <sub>2α</sub>	IP <sub>3</sub> +Ca <sup>2+</sup>
IP		PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>1</sub>	cAMP ↑
TP		TXA <sub>2</sub> , PGH <sub>2</sub>	IP <sub>3</sub> +Ca <sup>2+</sup>

**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 (PGE<sub>2</sub>) als auch an der Erregung und Sensibilisierung von Schmerzrezeptoren beteiligt (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) (Davies et al. 1984; Simmons et al. 2004). Abhängig vom Auslöser, dem dominierenden Prostaglandinderivat und den vorherrschenden Prostaglandinrezeptoren können die Prostaglandine pro- aber auch antiinflammatorische Wirkungen zeigen (Tilley et al. 2001), z.B. kann d-PGJ<sub>2</sub> induzierte Entzündungen aufheben (Gilroy et al. 1999). PGE<sub>2</sub> hemmt sowohl die IL-2- (Interleukin-2) und Interferon-γ-Produktion von T-Lymphozyten als auch die IL-1- (Interleukin-1) und TNF-α-Freisetzung (Tumornekrosefaktor α) aus Makrophagen. Neben dieser dämpfenden Wirkung auf das Immunsystem zeigt es aber auch stimulierende Effekte wie z.B. eine Induktion der B-Lymphozytendifferenzierung (Simmons et al. 2004).

Die Prostaglandine gehören zu den stärksten bekannten vasoaktiven Substanzen. Das am meisten in Endothelzellen produzierte Eicosanoid ist PGI<sub>2</sub> (Moncada et al. 1976a; Schrör 1985), aber auch PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und weitere Derivate konnten dort gefunden werden. PGE<sub>1</sub> und PGI<sub>2</sub> haben gefäßerweiternde Eigenschaften, während PGF<sub>2α</sub> vasokonstriktorisch und PGE<sub>2</sub> sowohl vasodilatierend als auch vasokonstriktorisch wirken kann (FitzGerald et al. 1983). Weiterhin ist die hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation von PGE<sub>1</sub> und PGI<sub>2</sub> in Blutplättchen bekannt. PGE<sub>2</sub> wirkt in physiologischen Konzentrationen aktivierend, in hohen Dosen jedoch hemmend. Der endogene Aktivator der Thrombozytenaggregation ist TXA<sub>2</sub> und somit der Gegenspieler von PGI<sub>2</sub> in der Regulation der Hämostase (Moncada et al. 1976b).

Im Gastrointestinaltrakt haben PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub> und PGI<sub>2</sub> 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. PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 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  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  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  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGI}_2$  bronchodilatierend, dagegen zeigen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGD}_2$  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) kommen. Die Prostaglandine stehen aufgrund ihrer Beteiligung 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  $\text{PGI}_2$ . Im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion kommt es zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen vasokonstriktorisches Mediatoren (wie z.B. Endothelin-1, Thromboxan) und deren Gegenspielern (NO und  $\text{PGI}_2$ ). Diese beiden Mediatoren sind in der Lage, die Freisetzung von Endothelin-1 zu hemmen (Levin 1995). Die vom intakten Endothel freigesetzten Eicosanoide, wie  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGI}_2$ , 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  $\text{PGI}_2$  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  $\text{PGE}_1$  die endotheliale Dysfunktion verbessern kann (Gardinali et al. 2001; Giannattasio et al. 2007). Für das  $\text{PGI}_2$ -Analogon Iloprost

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<sub>2α</sub>, 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 PGI<sub>2</sub>, das normalerweise als Gegenspieler über eine Hemmung der Plättchenaggregation und Leukozytenaktivierung fungiert. Durch die NADPH-Oxidase kommt es zum Ungleichgewicht zwischen 8-Iso-PGF<sub>2α</sub> und PGI<sub>2</sub>, welches wiederum zu oxidativem Stress und Gefäßläsionen führt (Muzaffar et al. 2004). Für das PGI<sub>2</sub>-Analogon Iloprost 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 angezogen 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 Plaques (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 (PGE<sub>1</sub>, PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>) 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 PGI<sub>2</sub>-Bildung gefunden (Vinals et al. 1997). Da bei der Dyslipidämie jedoch die HDL-Spiegel erniedrigt sind, fehlt hier der gefäßschützende Effekt von PGI<sub>2</sub>.

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  $\gamma$ -Linolensäure bei Mäusen zu einer gesteigerten PGE<sub>1</sub>-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- $\gamma$ -Linolensäure abstammende PGE<sub>1</sub> antiinflammatorische und gefäßerweiternde Eigenschaften nachgewiesen werden (Levin et al. 2002). In

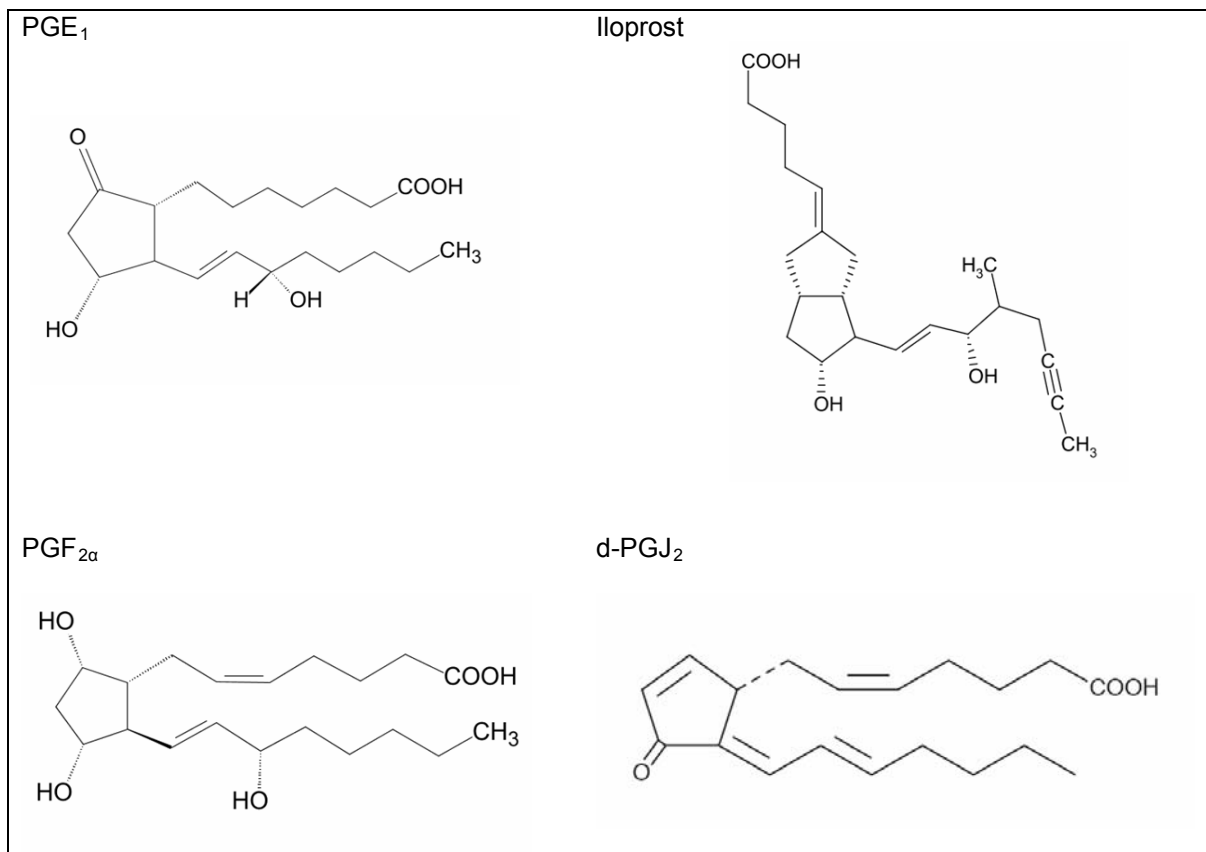
einigen Studien konnte durch eine Veränderung des Nahrungsgehalts an ungesättigten Fettsäuren bzw. durch deren gezielte Supplementierung eine Verbesserung von verschiedenen entzündlichen Krankheiten erzielt werden (Belch et al. 2000). Einige der Wirkungen von PGE<sub>1</sub> konnten *in vivo* ebenfalls durch Gabe seiner Vorstufen  $\gamma$ -Linolensäure oder Dihomo- $\gamma$ -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 PGE<sub>1</sub>-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<sub>1</sub> beobachtet. PGE<sub>1</sub> 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  $\beta$ -Amyloid-Peptid-vermittelte Radikalbildung schützen (Echeverria et al. 2005). PGE<sub>1</sub> bindet ebenfalls an diesen Rezeptoren. Über den EP2-Rezeptor können außerdem anti-apoptische 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<sub>1</sub> und Iloprost sowie dem vasokonstriktorisch wirkenden PGF<sub>2α</sub> und dem therapeutisch nicht genutzten d-PGJ<sub>2</sub> durchgeführt (Tab. 2). Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit wurde jedoch auf das PGE<sub>1</sub> gerichtet.



**Tabelle 2:** Eingesetzte Prostaglandinderivate.

#### 1.1.2.1 Alprostadil (PGE<sub>1</sub>)

PGE<sub>1</sub> wurde zu Beginn der 60er Jahre von Bergstroem und Mitarbeitern (Bergstroem et al. 1963) entdeckt. Die Biosynthese erfolgt aus Dihomo-γ-Linolensäure (DGLA). DGLA wird analog zur AA durch Cyclooxygenierung in PGH<sub>1</sub> überführt (Bergstroem et al. 1964; Van et al. 1964; Samuelsson 1965). Die initial gebildeten Endoperoxide PGG<sub>1</sub> und PGH<sub>1</sub> werden durch eine Prostaglandin-Endoperoxid-PGE<sub>1</sub>-Isomerase schließlich in PGE<sub>1</sub> überführt (Samuelsson et al. 1978). Diese PGE<sub>1</sub>-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 PGE<sub>1</sub> betrachtet wurden, haben neuere Untersuchungen ein differenzierteres pharmakologisches Wirkprofil ergeben. Einen Überblick über die vielfältigen Wirkungen von PGE<sub>1</sub> soll die nachfolgende, nicht vollständige Aufzählung in Tabelle 3 geben:



<b>Wirkung auf</b>	<b>Beispiele</b>
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 <sub>1</sub> aktiviert (Crutchley et al. 1982).
Thrombozyten	PGE <sub>1</sub> 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 <sub>4</sub> ) (Ham et al. 1983; Schrör et al. 1987; Hecker et al. 1990).
Lipidstoffwechsel	PGE <sub>1</sub> 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 (Prostvasin®) 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 PGE<sub>1</sub>. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Wirkungen auf Blutfluss, Blutviskosität, Fibrinolyse, Plättchenaggregation und der antiinflammatorischen Neutrophilenhemmung, scheinen auch die Ergebnisse neuerer Studien zu der anti-ischämischen Wirkung beizutragen. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass PGE<sub>1</sub> auch die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen sowie Bildung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren hemmt (Schrör et al. 2004). Im Prostvasin® liegt ein Komplex aus Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) 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). PGE<sub>1</sub> ist außerdem zugelassen zur symptomatischen Behandlung der erektilen Dysfunktion (Muse®). In Deutschland wird das PGE<sub>1</sub>-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 PGE<sub>1</sub> zeigen. So reduzierte eine Vorbehandlung mit PGE<sub>1</sub> z.B. die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Toxizität in retinalen Pigmentepithelzellen (Yamamoto et al. 1997).

Interessant ist auch der Metabolismus von PGE<sub>1</sub>. PGE<sub>1</sub> wird nach der i.v.-Gabe bei der ersten Lungenpassage zu 60-80% metabolisiert. Nach einer enzymatischen Oxidation und anschließender Reduktion entsteht der Hauptmetabolit 15-Keto-13,14-Dihydro-PGE<sub>1</sub>. Während dieser Ketometabolit nur geringe pharmakologische Wirkungen zeigt, entsteht anschließend aus dem Hauptmetaboliten eine im Vergleich zu PGE<sub>1</sub> fast ebenso aktive Substanz: 13,14-Dihydro-PGE<sub>1</sub> (PGE<sub>0</sub>) (Simmet et al. 1988; Braun et al. 1991; Peskar et al. 1991).

#### 1.1.2.2 Iloprost (Prostacyclinanalogon)

Das 1976 erstmals strukturell identifizierte PGI<sub>2</sub> (Whittaker et al. 1976) entsteht durch das Enzym PGI-Synthase aus PGH<sub>2</sub>. Prostacyclin ist das Hauptprodukt des Prostaglandinstoffwechsels im Endothel (Moncada et al. 1976a) und der direkte Gegenspieler des vasokonstriktorischen und thrombozytenaggregierenden TXA<sub>2</sub>. 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 TXA<sub>2</sub> und die COX-2 für die PGI<sub>2</sub>-Produktion verantwortlich ist, verschiebt eine selektive COX-2-Inhibition das Verhältnis der beiden Gegenspieler klar zugunsten des Vasokonstriktors und Plättchenaktivators TXA<sub>2</sub> (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 verwendeten Iloprost (Ilomedin®) gibt es noch ein weiteres Analogon (Cicaprost). Iloprost unterscheidet sich von PGI<sub>2</sub> 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. PGI<sub>2</sub> bindet an dem spezifischen IP-Rezeptor und hydrolysiert in wässriger Lösung zu dem inaktiven Metaboliten 6-keto-PGF<sub>1α</sub> (Schrör 1985).

In seinen Wirkungen zeigt PGI<sub>2</sub> große Ähnlichkeit zu PGE<sub>1</sub>, 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 PGE<sub>1</sub>. Im Gegensatz zu PGE<sub>1</sub> 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<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)

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

#### 1.1.2.4 15-Deoxy-Δ<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> (d-PGJ<sub>2</sub>)

Das erst vor wenigen Jahren entdeckte d-PGJ<sub>2</sub> entsteht nicht-enzymatisch durch Dehydrierung aus PGD<sub>2</sub>. Es unterscheidet sich von den anderen Prostaglandinen in einigen Punkten. So konnte für dieses Derivat bisher kein spezifisches Synthesenzym und kein Rezeptor identifiziert werden (Scher et al. 2005). Während die herkömmlichen Prostaglandine an spezifischen Prostanoidrezeptoren der Zelloberfläche binden, müssen die PGD<sub>2</sub>-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-PGJ<sub>2</sub> einige interessante Wirkungen, auf die hier kurz eingegangen werden soll.

Am besten untersucht sind die Effekte von d-PGJ<sub>2</sub> 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-PGJ<sub>2</sub> wird als PPAR<sub>γ</sub>-Ligand (Nosjean et al. 2002; Ide et al. 2003) und sogar als möglicher endogener Aktivator beschrieben (Cippitelli et al. 2003). Andere Effekte des d-PGJ<sub>2</sub> sind jedoch unabhängig von PPAR<sub>γ</sub> und werden zum Teil über eine Hemmung von *nuclear factor κB* (NF-κB) oder über den Signalweg der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) vermittelt (Scher et al. 2005).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass d-PGJ<sub>2</sub> eine Vielzahl von zellulären Prozessen beeinflussen kann (Berry et al. 2005). In Makrophagen zeigt d-PGJ<sub>2</sub> 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-PGJ<sub>2</sub> die antioxidative und cytoprotektive Hämoxxygenase-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 Hämoxigenase**

Als zelluläre Antwort auf oxidativen Stress erfolgt eine transkriptionelle Aktivierung von Genen, deren Produkte als zellprotektive Proteine antioxidative Stoffwechsellleistungen 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).

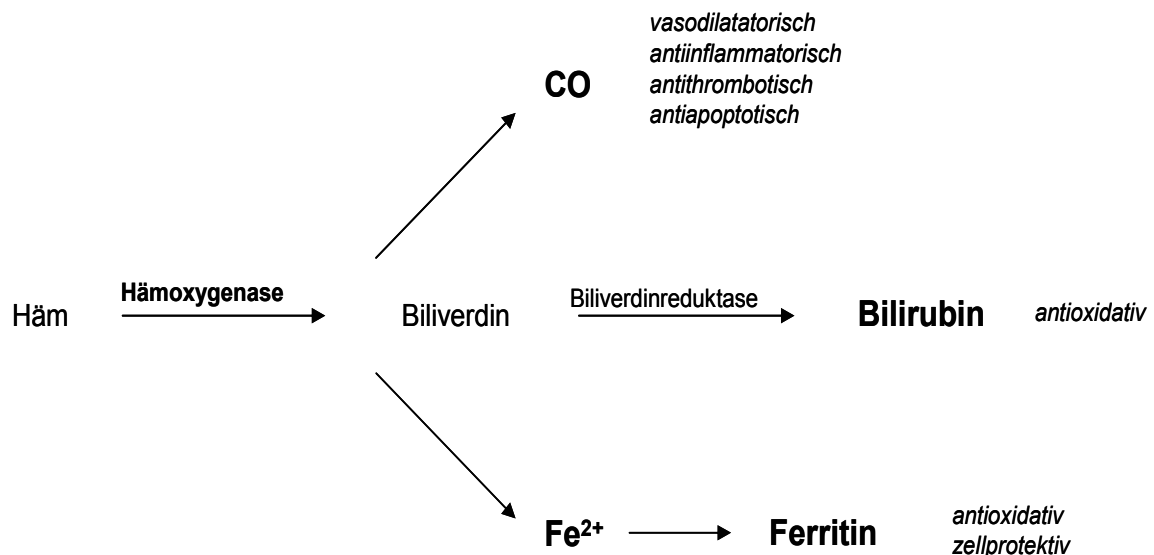
### **1.2.1 Konstitutive und induzierbare Isoformen der Hämoxigenase**

Die physiologische Funktion der Hämoxigenase 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 Hämoxigenase wird zu den Monooxygenasen gezählt und in drei bisher bekannte Isoformen unterteilt. Die drei Isoformen werden von verschiedenen Genen kodiert. Die Hämoxigenase-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 Hämoxigenase 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 Hämoxigenase 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, plättchen- und 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 (Sheffel 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 (Dennerly 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 beim Hämabbau freigesetzten Eisenionen induzieren das Eisenspeicherprotein Ferritin. Ferritin ist ein ubiquitäres 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- $\kappa$ B (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 oxidierten 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-1-defizienten 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 6-jähriger 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)<sub>n</sub>-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 Ausatemluft 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 Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B, AP-1/2 (Aktivator-Protein) (Alam et al. 1992; Lavrovsky et al. 1994), Nrf2 (*NF-E2-related 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 element-binding 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-PGJ<sub>2</sub> 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) (Kato 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 erfolgt über diverse Phosphorylierungsschritte 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-κB 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<sub>α</sub>, IL-1β 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 PIP<sub>3</sub> (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-PGJ<sub>2</sub>-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).

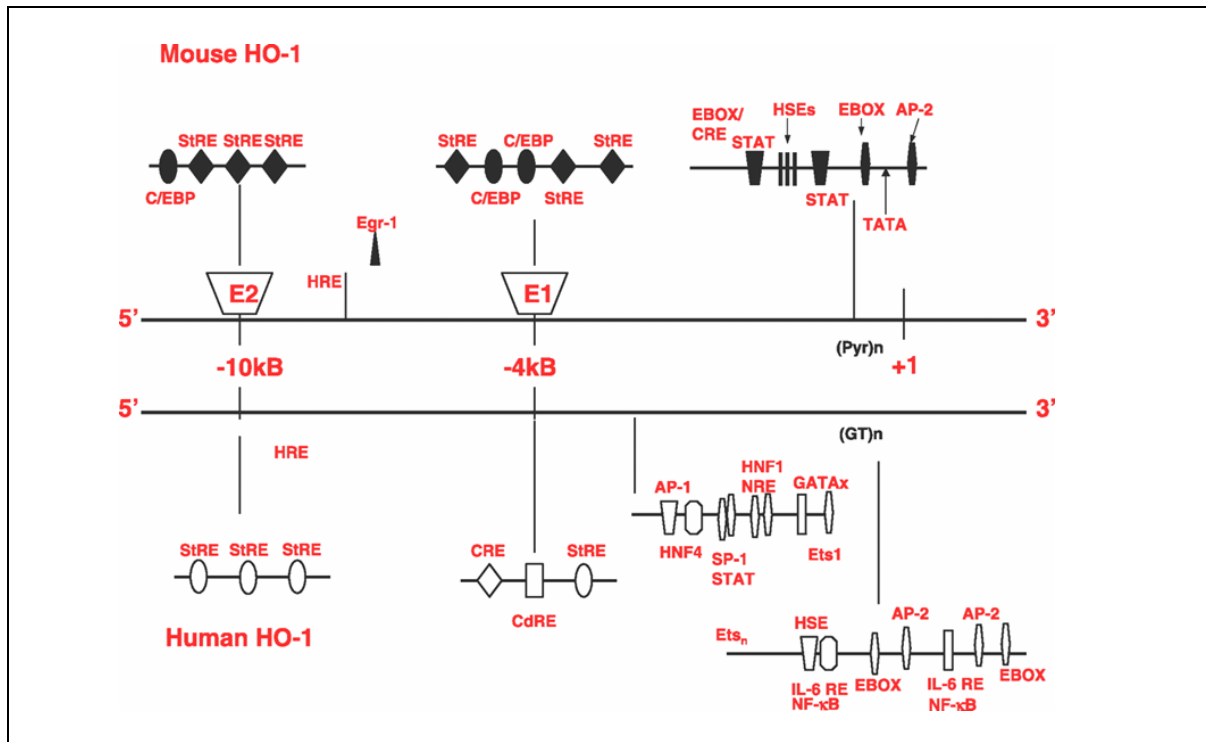
Ein Zusammenspiel der einzelnen Signalwege wurde weiterhin in verschiedenen Studien dargestellt (Immenschuh et al. 1998a; Soh et al. 2001; Ryter et al. 2006).

### **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 Konformation der r-Strukturen und der k<sub>2</sub>r<sub>2</sub>-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 et al. 1986; Borrelli et al. 1992). Der erste gefundene 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.