

4 Ergebnisse

4.1 Induktion auf translationaler Ebene

4.1.1 Induktion der HO-1 auf translationaler Ebene

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

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

Zunächst wurde der Effekt von PGE₁ auf die HO-1-Proteinexpression in der Endothelzelllinie ECV304 untersucht. PGE₁ induzierte die HO-1 ab einer Konzentration von 0,01 μ M signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 8). Die maximale Stimulation wurde mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 μ M erzielt.

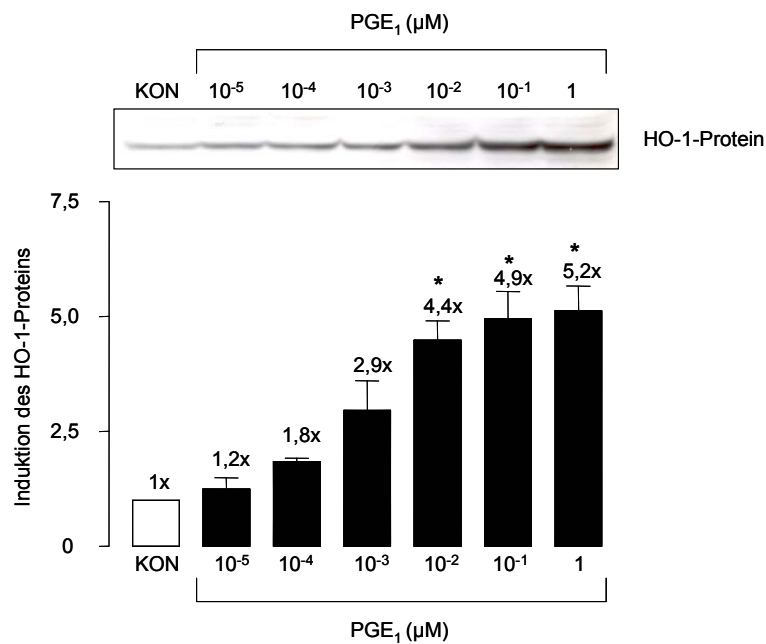


Abbildung 8: Effekt von PGE₁ auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

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

Weiterhin wurden die Effekte auf eine andere Endothelzelllinie sowie auf zirkulierende Blutzellen, als endothel-unabhängiges Modell untersucht, um eine Zelllinienspezifität auszuschließen. Sowohl in der Endothelzelllinie EA.hy 926 als auch in murinen Makrophagen (J774) führte PGE_1 zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der HO-1-Proteinexpression.

Das Prostaglandinderivat PGE_1 führte ab einer Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ zu einer signifikanten Steigerung der HO-1-Proteinexpression in den EA.hy 906. Die absoluten Induktionen waren hier etwas höher als in den ECV304-Zellen. Bei einer Konzentration vom $1 \mu\text{M}$ PGE_1 kam es in ECV304-Zellen zu einer 5,2fachen Induktion (Abb. 8), während es in den EA.hy 926 zu einer 8,1fachen Steigerung kam (Abb. 9).

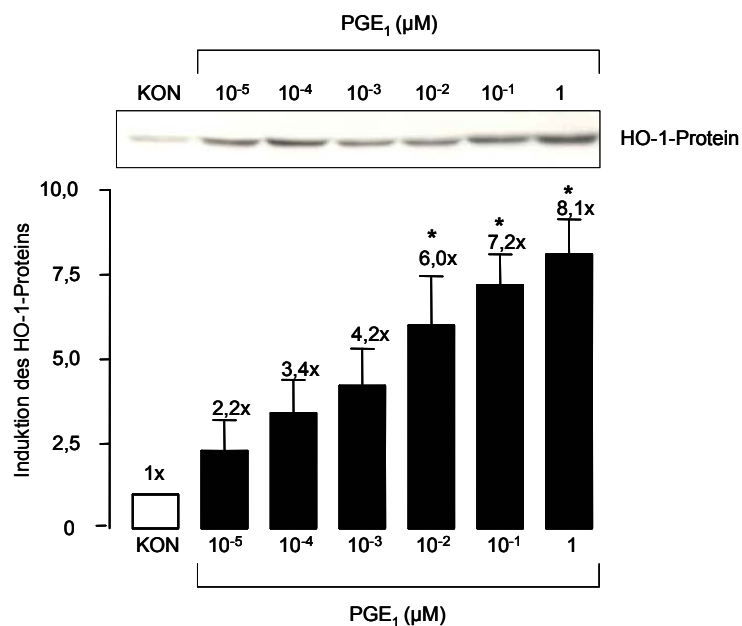


Abbildung 9: Effekt von PGE_1 auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. EA.hy 926-Zellen wurden 24 Stunden mit PGE_1 (10^{-5} - $1 \mu\text{M}$) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

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

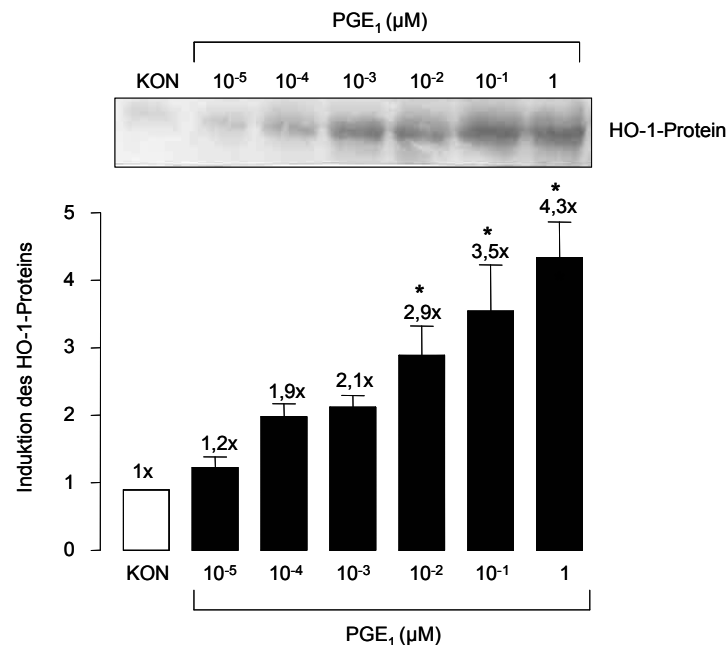


Abbildung 10: Effekt von PGE₁ auf die Expression des HO-1-Proteins in Makrophagen.

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

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

Als weiteres Prostaglandinderivat wurde das PGI₂-Analogon Iloprost ausgewählt und hinsichtlich eines stimulatorischen Effektes auf die HO-1-Proteinexpression untersucht. Bereits ab einer Konzentration von 0,01 μM war auch hier eine signifikante Induktion des HO-1-Proteins detektierbar. Ein Vergleich der beiden Prostaglandinderivate PGE₁ und Iloprost zeigte keine signifikanten Unterschiede. Bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden und einer eingesetzten Konzentration von 1 μM führte das PGE₁ zu einer 5,2fachen Induktion in Endothelzellen (Abb. 8). Iloprost zeigte unter gleichen Bedingungen eine 4,8fache Erhöhung der HO-1-Proteinexpression (Abb. 11).

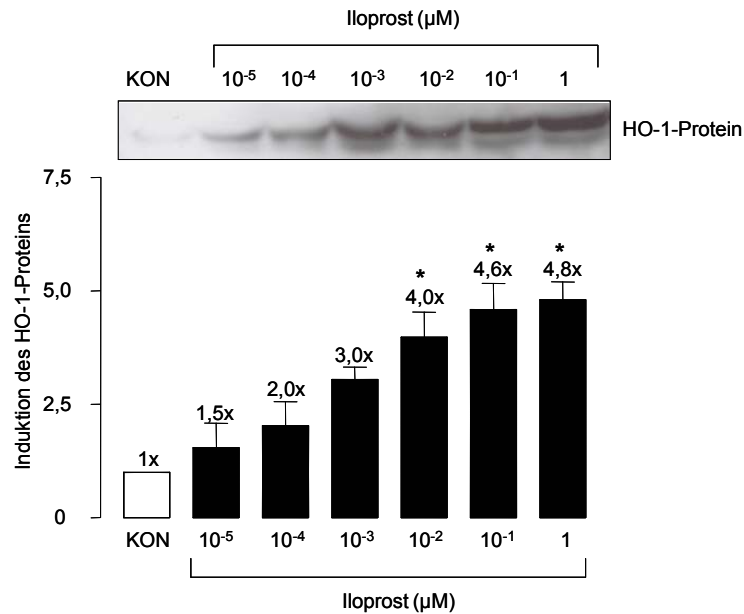


Abbildung 11: Effekt von Iloprost auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

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

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

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

Ein Vertreter der von mehreren Autoren als Induktor der HO-1 beschrieben wird, ist $d\text{-PGJ}_2$ (Koizumi et al. 1995; Lee et al. 2003; Zhuang et al. 2003). Dies konnte auch in dem hier verwendeten Zellsystem bestätigt werden. Signifikante Effekte wurden jedoch erst ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ beobachtet. Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ erwies $d\text{-PGJ}_2$ sich jedoch als gleich starker Induktor gegenüber PGE_1 (Abb. 12).

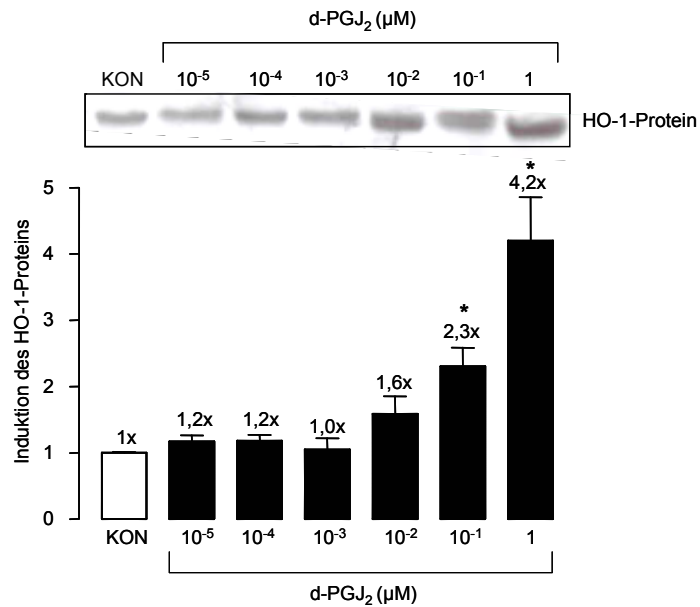


Abbildung 12: Effekt von d-PGJ₂ auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

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

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

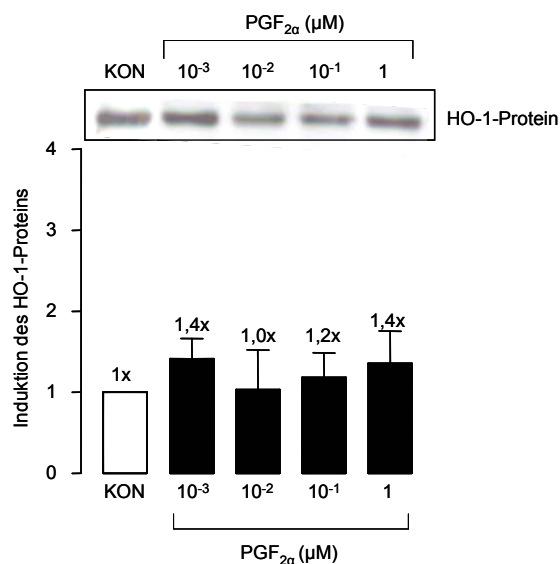


Abbildung 13: Effekt von PGF_{2α} auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

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

4.1.2 Zeitabhängigkeit der Proteininduktion

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

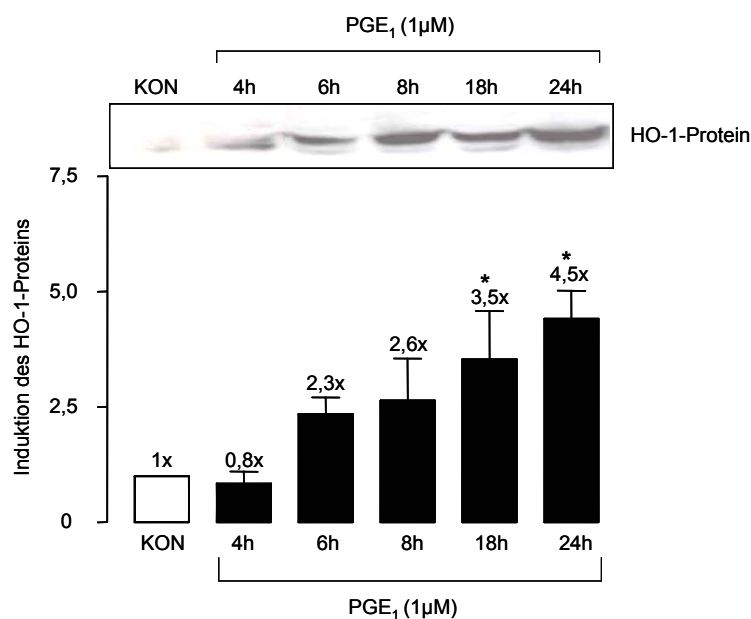


Abbildung 14: Zeitabhängiger Effekt von PGE₁ auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 4-24 Stunden mit PGE₁ (1 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p < 0,05 Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

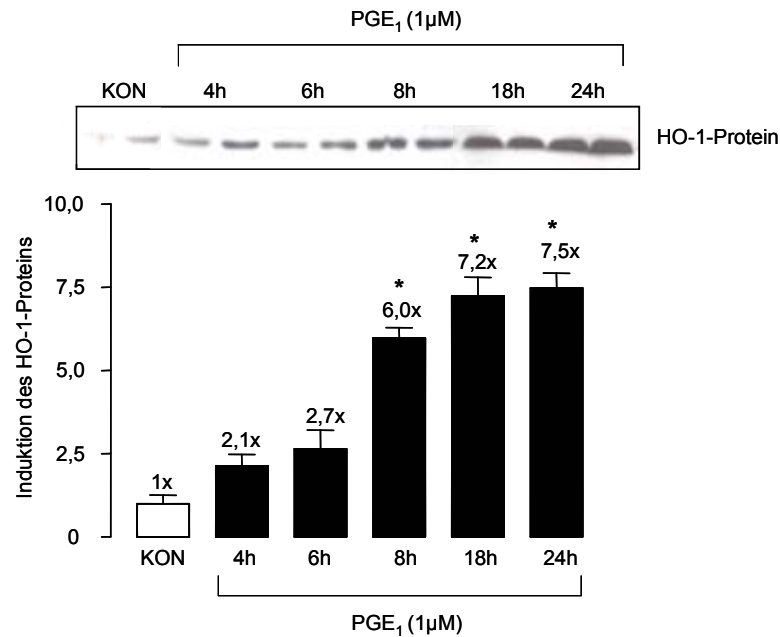


Abbildung 15: Zeitabhängiger Effekt von PGE₁ auf die Expression des HO-1-Proteins in Makrophagen.

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

4.1.3 Induktion des Ferritinproteins

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

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

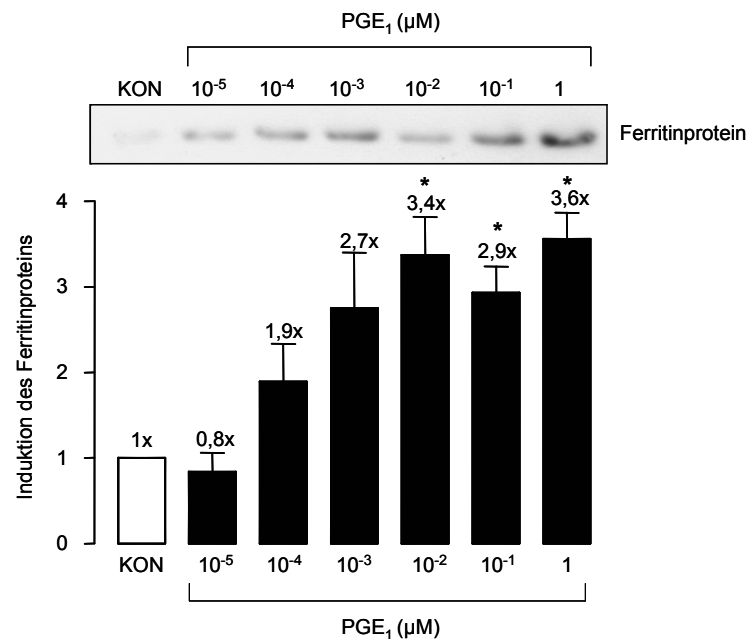


Abbildung 16: Effekt von PGE₁ auf die Expression des Ferritinproteins in Endothelzellen.

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

Die Ergebnisse in der zweiten Endothelzelllinie, EA.hy 926, sind nahezu identisch mit den Ergebnissen in ECV-304. Die absoluten Induktionen des Ferritinproteins waren im Vergleich zu den ECV304-Zellen etwas höher. Signifikante Erhöhungen zeigten sich ebenfalls ab einer Konzentration von 0,01 μM PGE₁ (Abb. 17). In Makrophagen induzierte das Prostaglandinderivat PGE₁ ebenfalls die Ferritinproteinexpression. Hier konnten jedoch signifikante Unterschiede erst ab einer Konzentration von 1 μM festgestellt werden (Abb. 18).

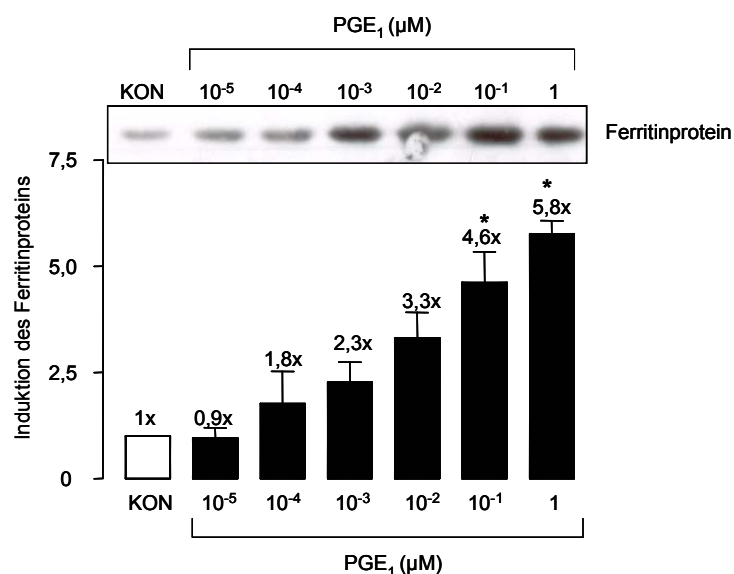


Abbildung 17 : Effekt von PGE₁ auf die Expression des Ferritinproteins in Endothelzellen.

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

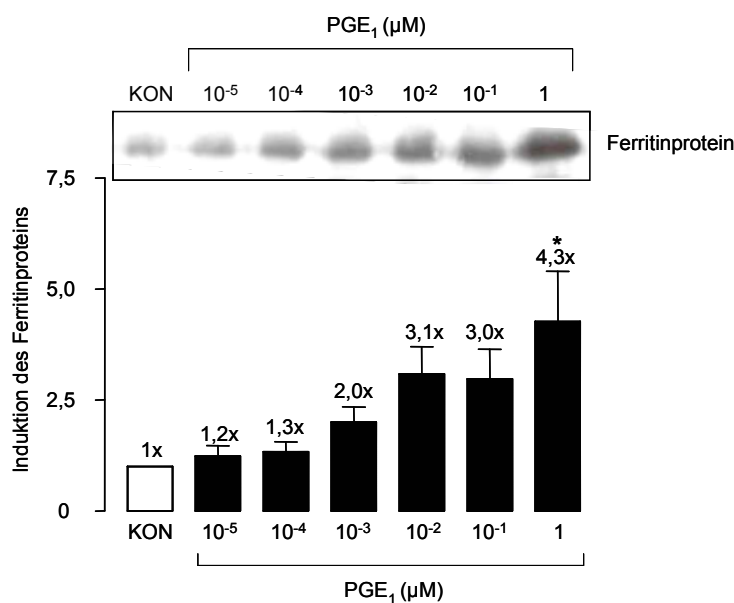


Abbildung 18: Effekt von PGE₁ auf die Expression des Ferritinproteins in Makrophagen.

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

4.1.4 Zusammenfassung

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

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

Weiterhin konnte für PGE_1 exemplarisch gezeigt werden, dass die HO-1-Proteinbildung auch zeitabhängig ist, und je nach verwendeter Zelllinie signifikante Änderungen nach 8 bzw. 18 Stunden eintreten.

Mit PGE_1 konnte darüber hinaus die konzentrationsabhängige Induktion des Eisenspeicherproteins Ferritin in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden.

4.2 Induktion auf transkriptioneller Ebene

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

4.2.1 Promotorstudien

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

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

4.2.1.1 Effekte von PGE₁ auf humane HO-1-Promotorkonstrukte

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

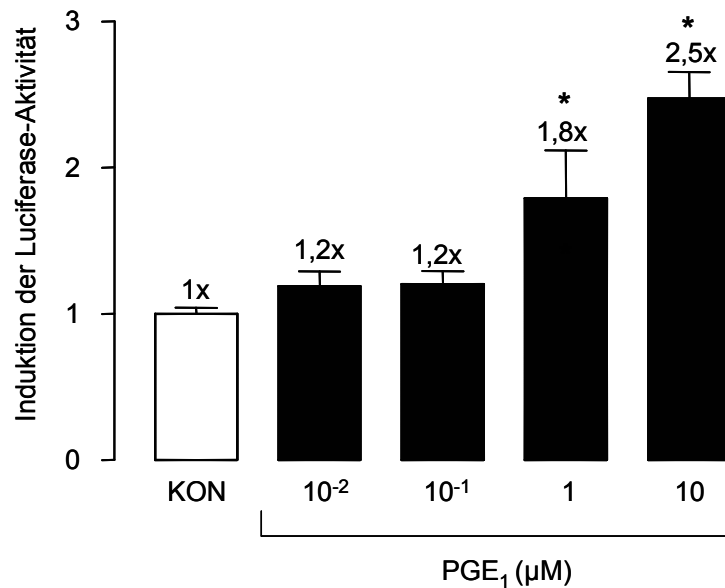


Abbildung 19: Effekt von PGE₁ auf die Luciferase-Aktivität in hHO4.5luc-Reporter-gen-transfizierten Endothelzellen.

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

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

4.2.1.2 Effekte von PGE₁ auf murine HO-1-Promotorkonstrukte

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

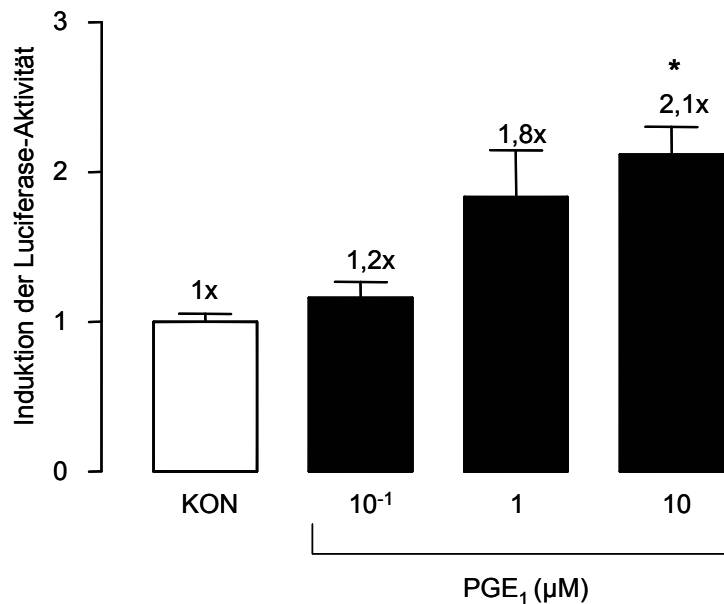


Abbildung 20: Effekt von PGE₁ auf die Luciferase-Aktivität in mHO4045-Reporter-gen-transfizierten Endothelzellen.

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

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

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

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

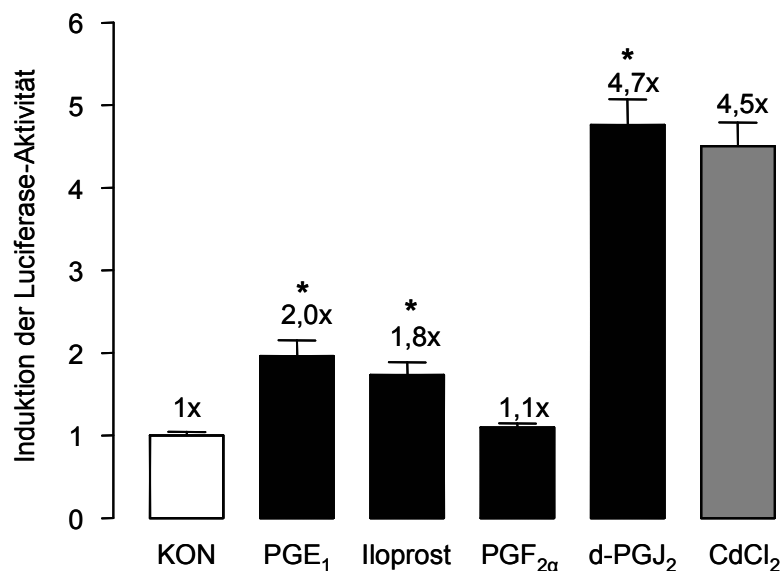


Abbildung 21: Effekt von verschiedenen Prostaglandinderivaten auf die Luciferase-Aktivität in hHO4.9luc-Reporter-gen-transfizierten Endothelzellen.

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

4.2.2 Biolumineszenz-Assay

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

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

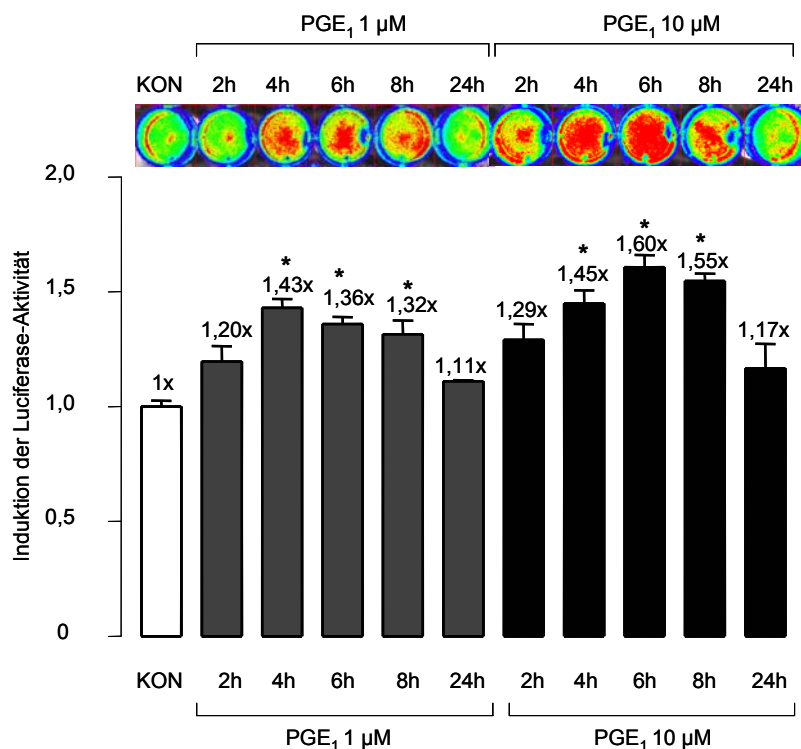


Abbildung 22: Effekt von PGE₁ auf die Luciferase-Aktivität in stabil transfizierten NIH3T3-HO-1-luc-Zellen.

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

4.2.3 Induktion der HO-1 auf mRNA-Ebene

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Promotorstudien und des Biolumineszenz-Assays wurde am Beispiel des PGE_1 ausserdem eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse kann eine vermehrte HO-1-mRNA-Bildung nachgewiesen werden.

Das Prostaglandinderivat PGE_1 zeigte eine konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA in Makrophagen. Weiterhin führte die höchste eingesetzte Konzentration zur maximalen Stimulation der HO-1-mRNA-Bildung. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen der Promotorstudien und den Versuchen zur HO-1-Proteinexpression überein.

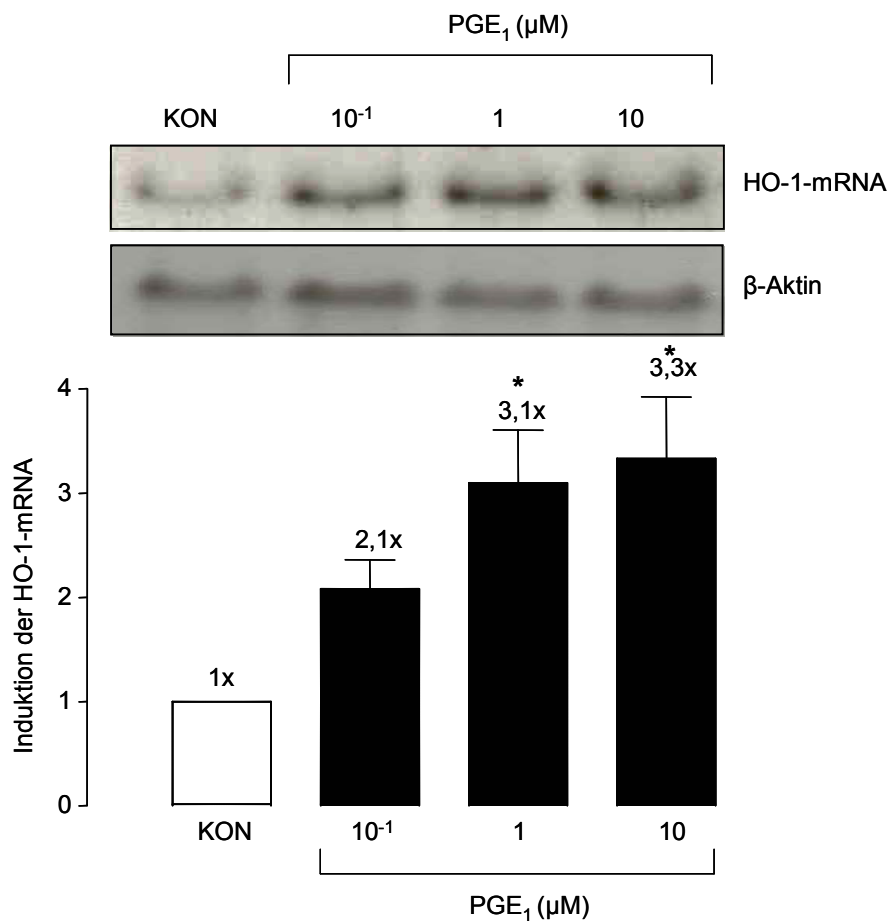


Abbildung 23: Effekt von PGE_1 auf die Expression der HO-1-mRNA in Makrophagen.

Repräsentativer Northern-Blot mit densitometrischer Auswertung und β -Aktin-Kontrolle. J774-Zellen wurden 12 Stunden mit PGE_1 (10^{-1} -10 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.2.4 Zusammenfassung

In den durchgeführten Promotorstudien erhöhten die Prostaglandine PGE₁, Iloprost und d-PGJ₂ die Aktivität des untersuchten HO-1-Promotors signifikant. Von diesen Derivaten erwies sich d-PGJ₂ als der stärkste Induktor. In Analogie zu den Western-Blot-Analysen erhöhte PGF_{2α} die Promotoraktivität nicht.

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

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

4.3 Funktionelle Untersuchungen

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

4.3.1 Effekt von PGE₁ auf die Hämoxygenase-Aktivität

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

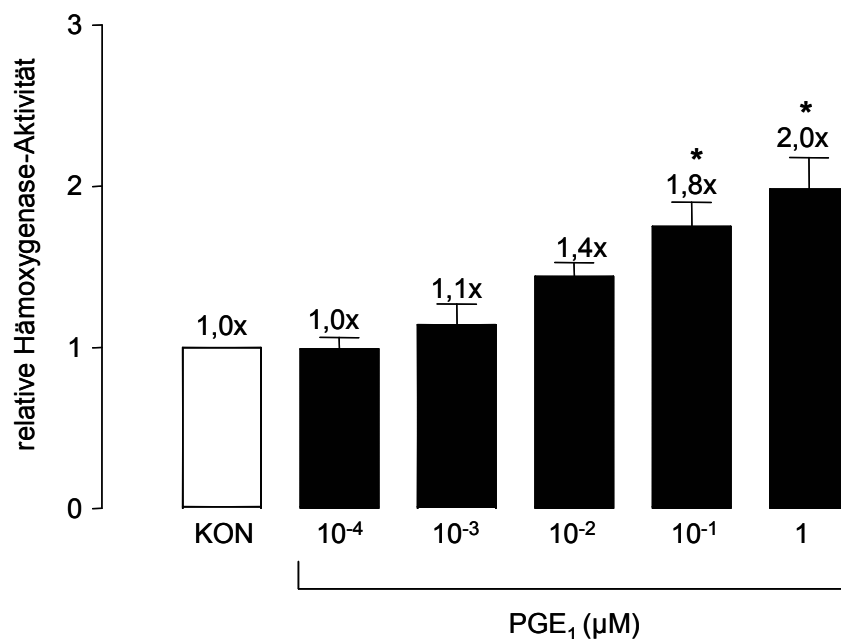


Abbildung 24: Effekt von PGE₁ auf die HO-Aktivität in Endothelzellen

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

4.3.2 Effekte in einem Modell für oxidativen Stress

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

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

4.3.2.1 Einfluss des HO-1-Produkts Bilirubin

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

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

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

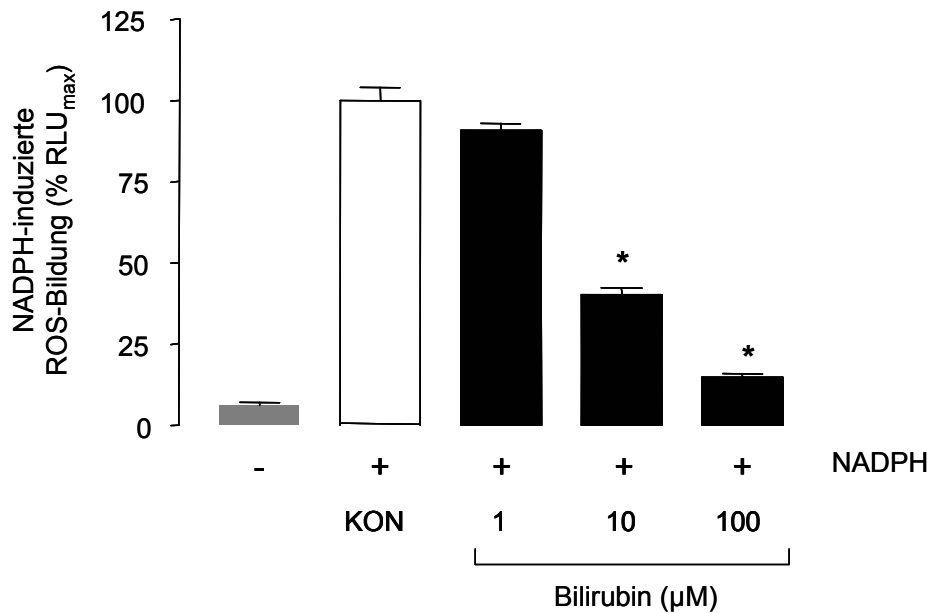


Abbildung 25: Direkter Effekt des HO-Produkts Bilirubin auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen (Erdmann et al. 2005).

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

4.3.2.2 Antioxidative Eigenschaften von PGE₁

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

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

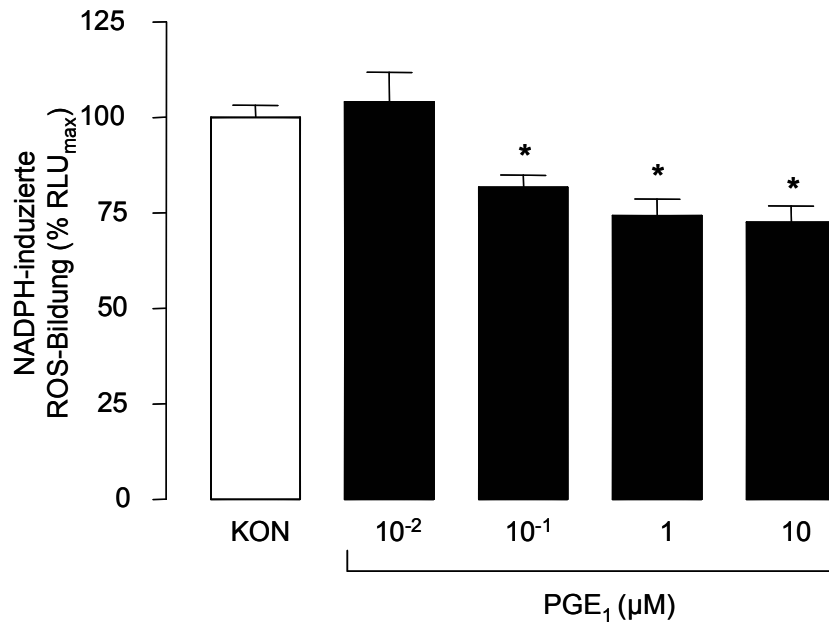


Abbildung 26: Effekt von PGE₁ auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen.

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

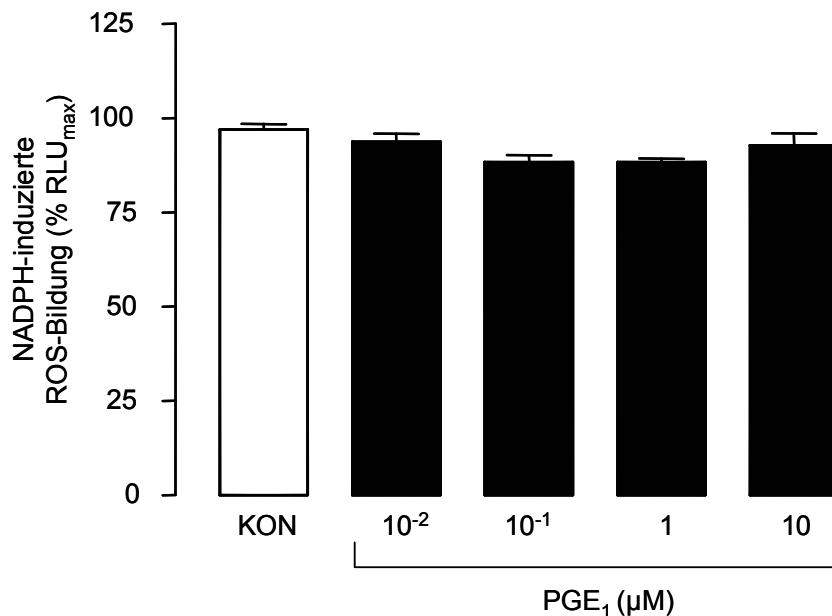


Abbildung 27: Direkter Effekt von PGE₁ auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen.

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

4.3.3 Zusammenfassung

PGE₁ führte in Endothelzellen zu einer gesteigerten HO-Aktivität. Die Effekte waren konzentrationsabhängig. Eine signifikante Erhöhung konnte ab einer Konzentration von 0,1 µM beobachtet werden.

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

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

4.4 Molekulare Mechanismen der HO-1-Induktion durch Prostaglandinderivate

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

4.4.1 Messung der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP

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

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

4.4.1.1 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit PGE₁

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

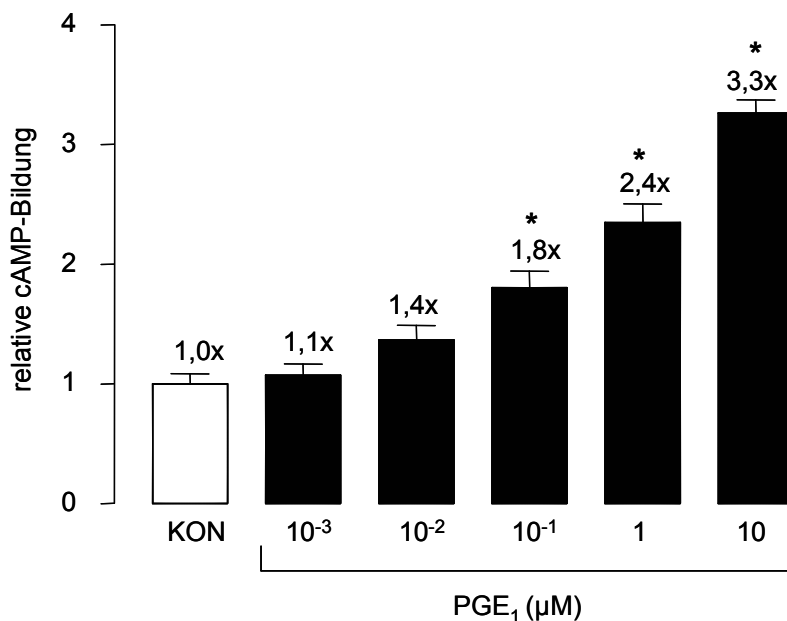


Abbildung 28: Effekt von PGE₁ auf die Bildung von cAMP in Endothelzellen.

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

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

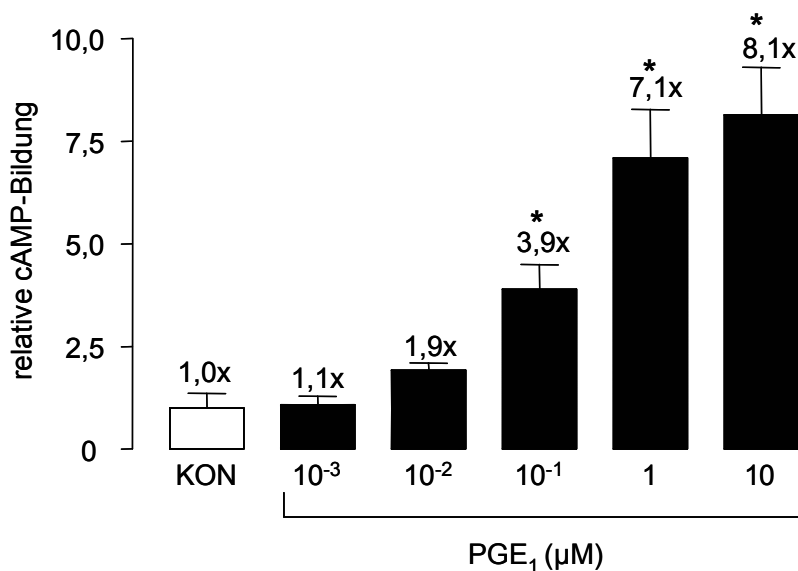


Abbildung 29: Effekt von PGE₁ auf die Bildung von cAMP in Makrophagen.

J774-Zellen wurden 15 Minuten mit PGE₁ (10⁻³-10 µM) inkubiert und anschließend wurde mit einem EIA die Menge an cAMP bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten. * p<0,05 Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Zusätzlich wurden die Versuche in LLC-PK-1 Nierenepithelzellen wiederholt. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen in Endothelzellen und Makrophagen. PGE₁ führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der cAMP-Konzentrationen.

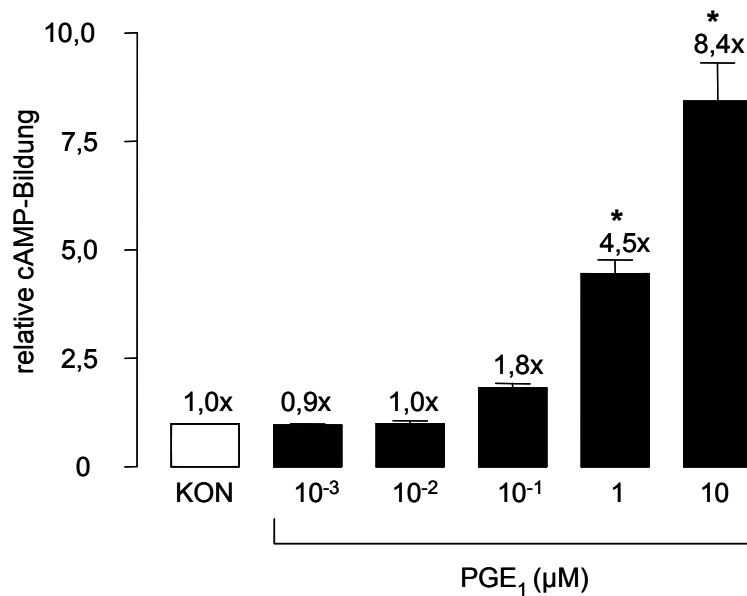


Abbildung 30: Effekt von PGE₁ auf die Bildung von cAMP in Nierenepithelzellen.

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

4.4.1.2 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation mit Iloprost

Auch für das PGI₂-Derivat Iloprost wurden die intrazellulären cAMP-Spiegel nach entsprechender Inkubation in Makrophagen bestimmt. Mit einer PGI₂-Konzentration von 0,1 µM war eine signifikante, 5,5fache Induktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle feststellbar. Mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µM war im Durchschnitt eine 10,4fache Stimulation zu erkennen (Abb. 31).

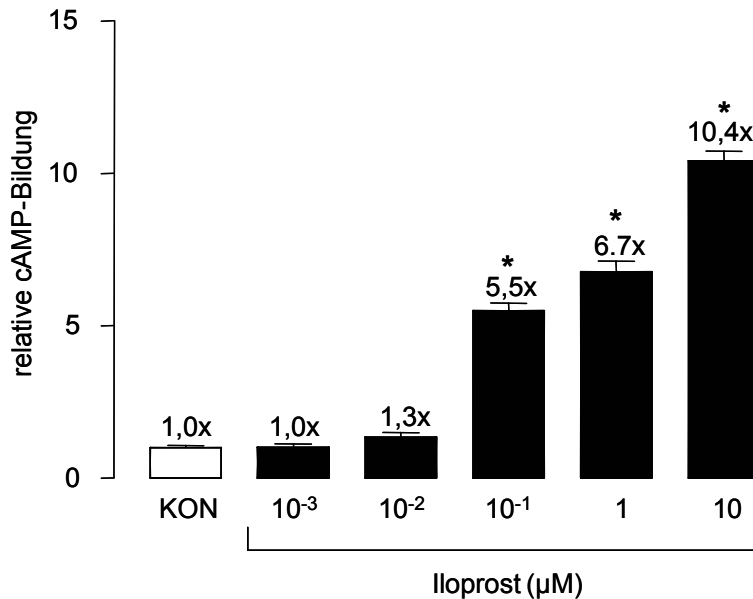


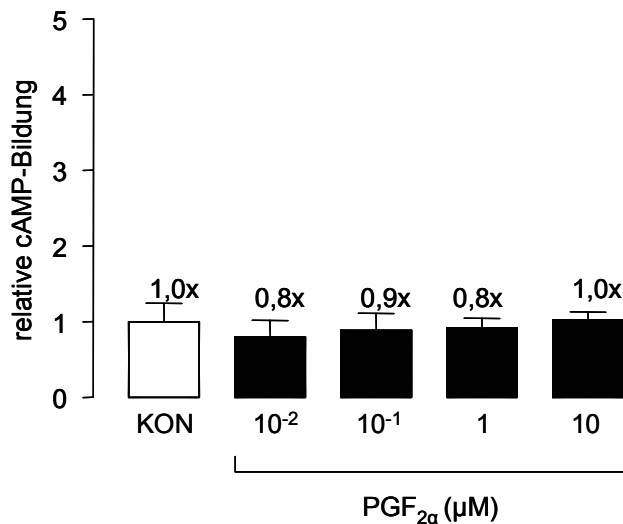
Abbildung 31: Effekt von Iloprost auf die Bildung von cAMP in Makrophagen.

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

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

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

A



B

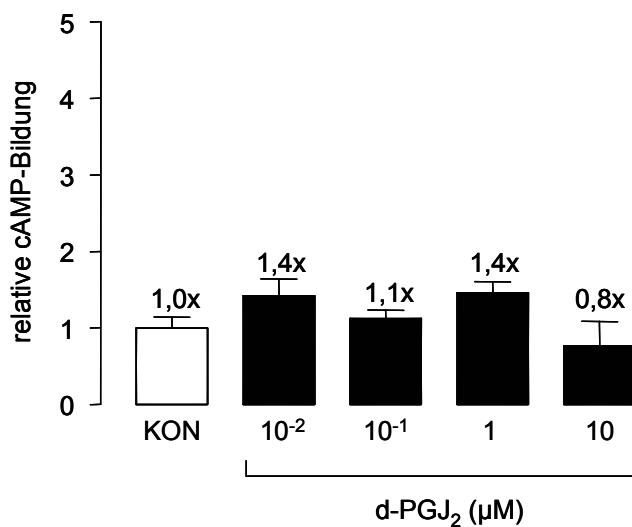


Abbildung 32: Effekt von $\text{PGF}_{2\alpha}$ (A) und d-PGJ_2 (B) auf die Bildung von cAMP in Endothelzellen.

ECV304-Zellen wurden 15 Minuten mit den Prostaglandinderivaten $\text{PGF}_{2\alpha}$ (A) und d-PGJ_2 (B) (10^{-2} -10 μM) inkubiert und anschließend wurde mit einem EIA die Menge an cAMP bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3-6$ Einzelexperimenten. * $p < 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.4.1.4 Bestimmung der intrazellulären cGMP-Spiegel nach Stimulation mit PGE₁

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

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

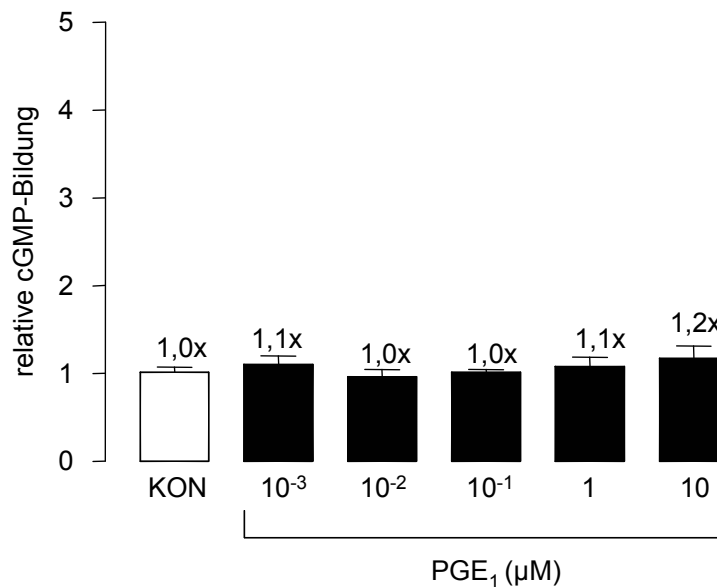


Abbildung 33: Effekt von PGE₁ auf die Bildung von cGMP in Nierenepithelzellen.

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

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

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

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

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

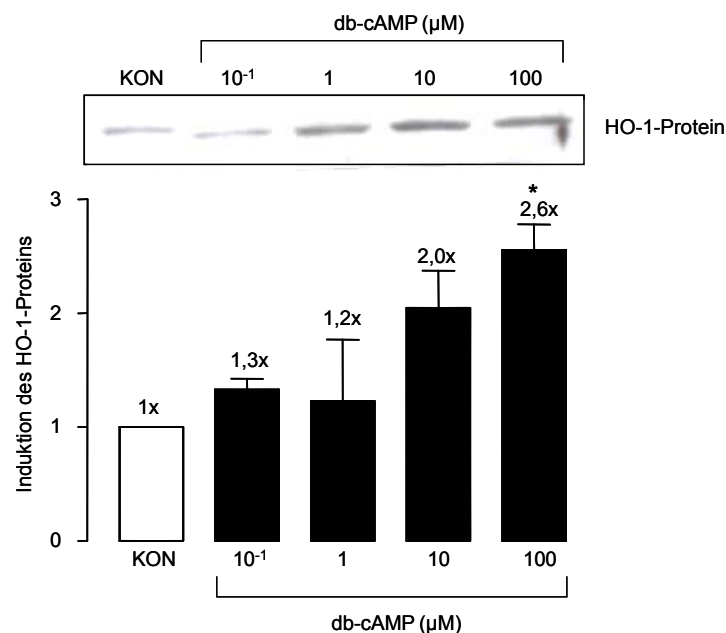


Abbildung 34: Effekt von db-cAMP auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

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

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

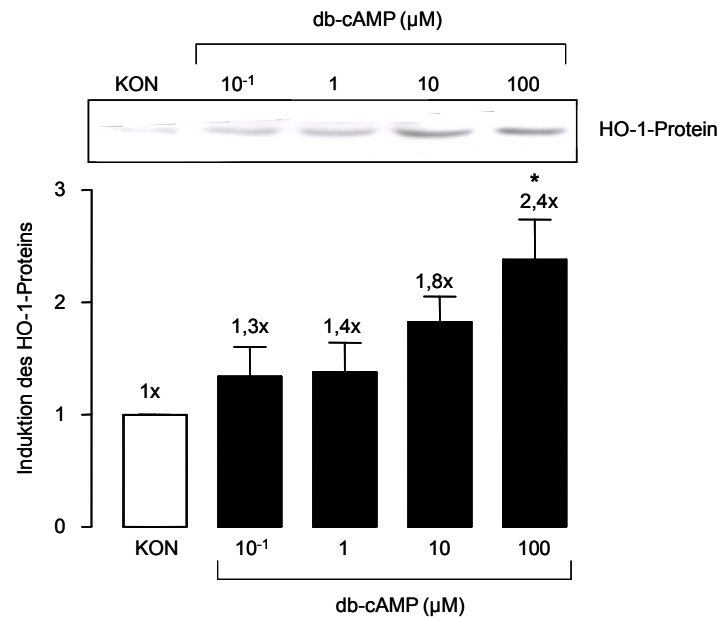


Abbildung 35: Effekt von db-cAMP auf die Expression des HO-1-Proteins in Makrophagen.

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

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

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

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

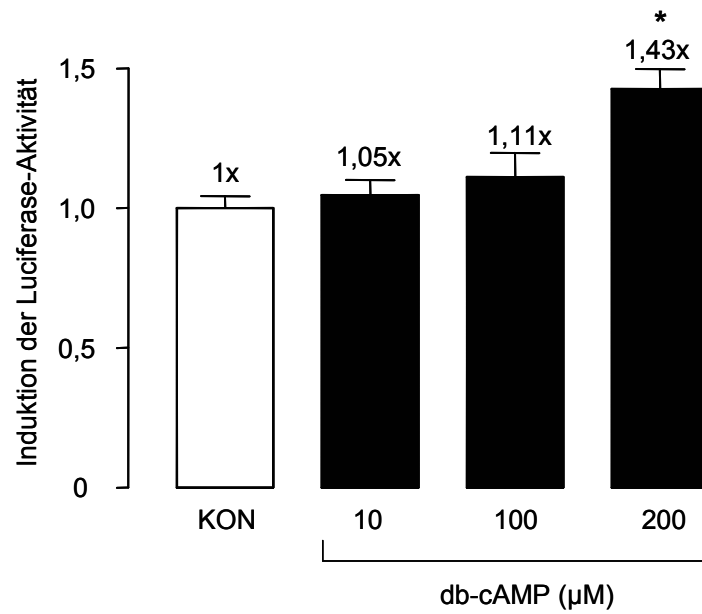


Abbildung 36: Effekt von db-cAMP auf die Luciferase-Aktivität in hHO4.9luc-Reporter-gen-transfizierten Endothelzellen.

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

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

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

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

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

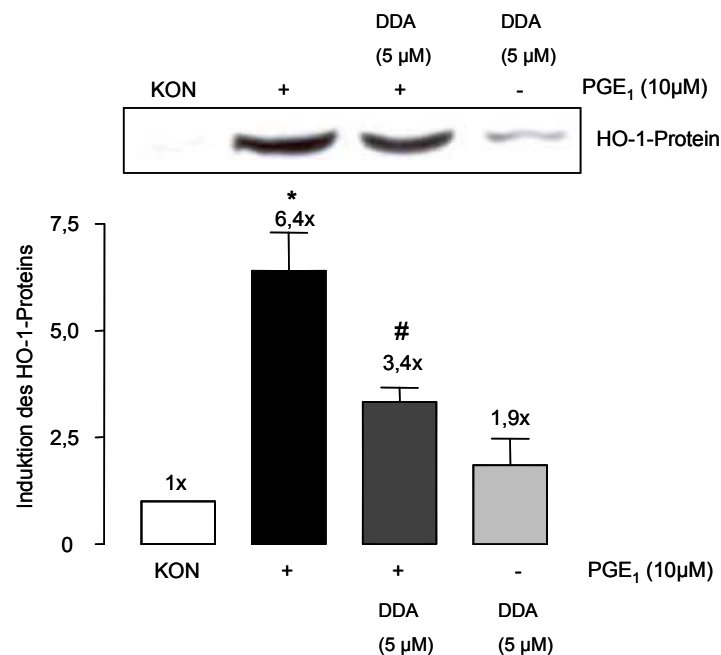


Abbildung 37: Einfluss von DDA auf die PGE₁-induzierte HO-1-Proteinexpression in Makrophagen.

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. Makrophagen J774 wurden 20 Minuten mit DDA (5 µM) vorbehandelt und anschließend über 18 Stunden mit PGE₁ (10 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten.

*) : p < 0,001; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + DDA, t-Test nach Student.

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

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

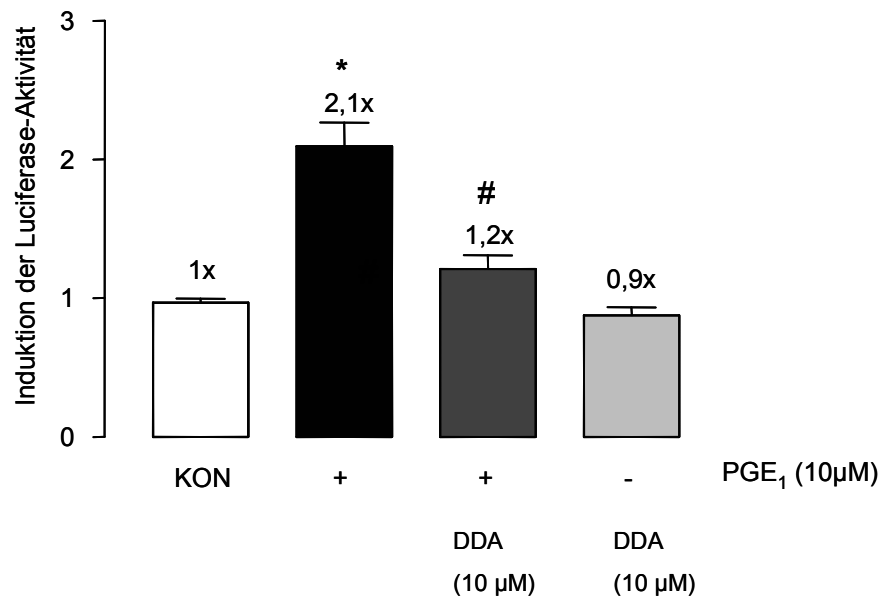


Abbildung 38: Einfluss von DDA auf die PGE₁-induzierte Luciferase-Aktivität in hHO4.9luc-Reporter-gen-transfizierten Endothelzellen.

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

*) : p < 0,001; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + KT 5720, t-Test nach Student.

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

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

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

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

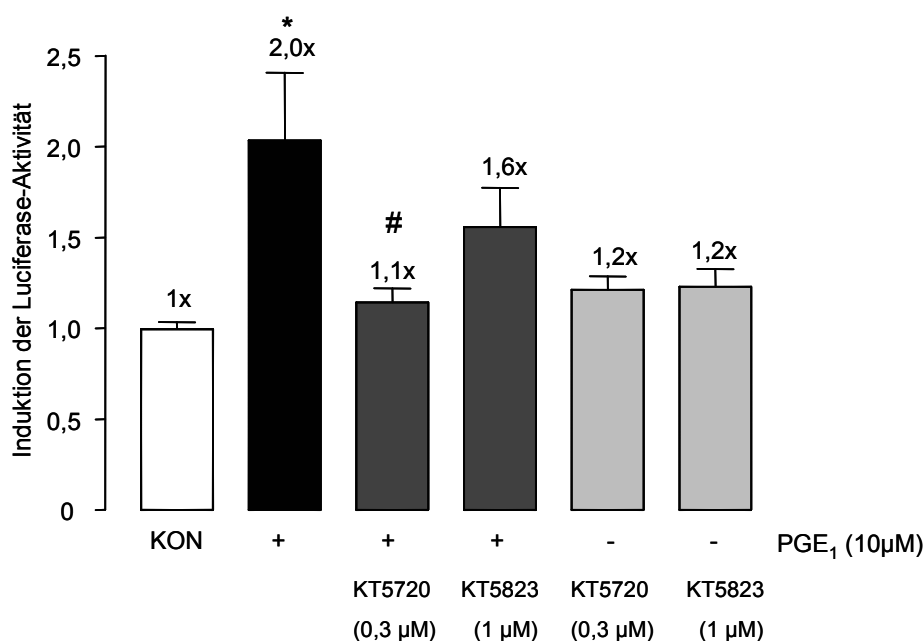


Abbildung 39: Einfluss von Proteinkinase-Inhibitoren auf die PGE₁-induzierte Luciferase-Aktivität in hHO4.9luc-Reporter-gen-transfizierten Endothelzellen.

Nach Transfektion und kurzer Nüchternphase wurden die ECV304-Zellen 20 Minuten mit KT5720 (0,3 μM) bzw. KT5823 (1 μM) vorbehandelt und anschließend 18 Stunden mit PGE₁ (10 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelerperimenten.

*): p < 0,001; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + KT 5720, t-Test nach Student.

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

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

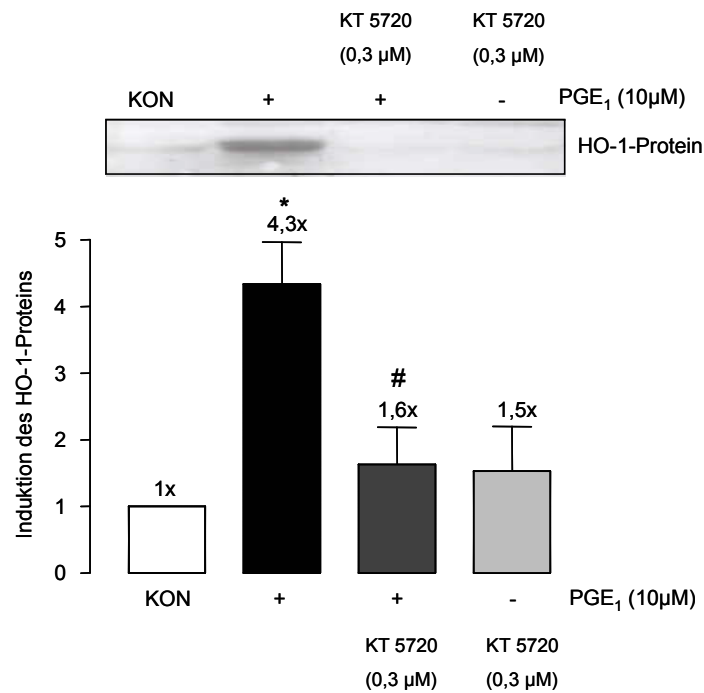


Abbildung 40: Einfluss des PKA-Inhibitors KT5720 auf die PGE₁-induzierte HO-1-Proteinexpression

Repräsentativer Western-Blot mit densitometrischer Auswertung. ECV304-Zellen wurden 20 Minuten mit KT5720 (0,3 μM) vorbehandelt und anschließend über 18 Stunden mit PGE₁ (10 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten.

*) : p < 0,05; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + DDA, t-Test nach Student.

4.4.5 Beteiligung von CRE an der HO-1-Signalkaskade

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass PGE_1 zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor CREB führt (Thomas et al. 1995; Castano et al. 2003). Das aktivierte CREB-Protein ist ein Genaktivator für Gene mit CRE im Promotorbereich (Lalli et al. 1994). Ein solches CRE-Element konnte auch im HO-1-Promotor gefunden werden (Immenschuh et al. 1998a; Kronke et al. 2003).

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

Zunächst wurde der Effekt von PGE_1 auf das Promotorkonstrukt hHO4.9luc untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante 1,7fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Bei der Verwendung eines zweiten Konstrukts (hHO4.9luc_M1), welches eine Mutation innerhalb des CRE (Kronke et al. 2003) beinhaltet, wurde die Aktivierung der HO-1-Promotoraktivität vollständig aufgehoben (Abb. 42).

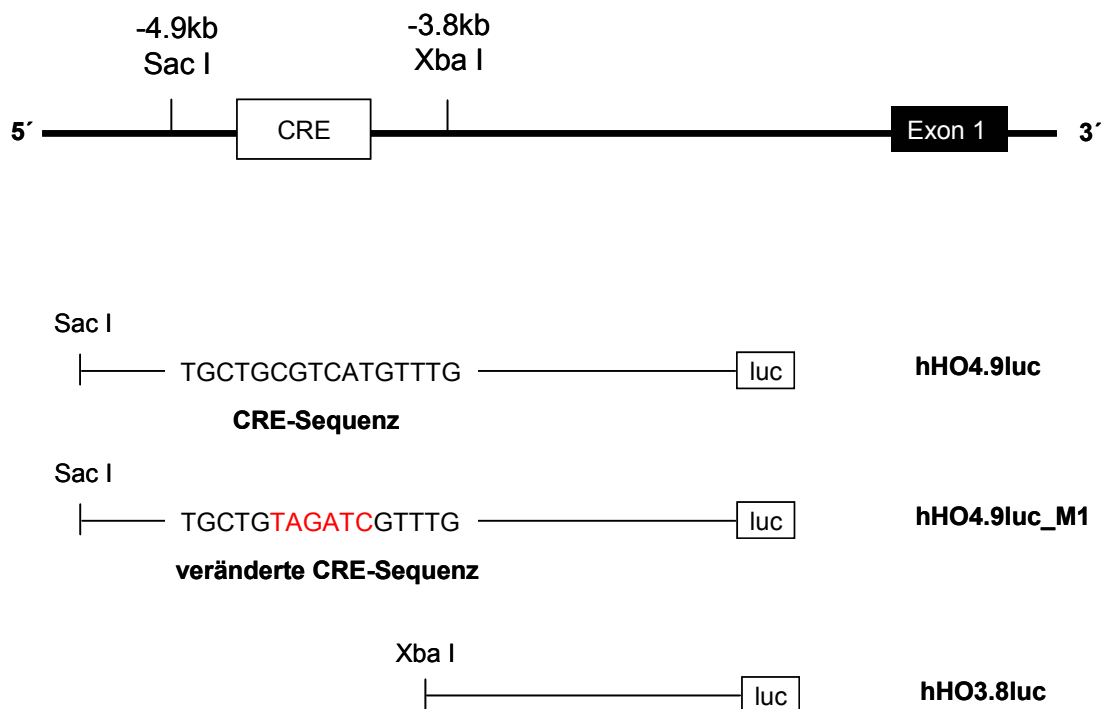


Abbildung 41: hHO-Promotorkonstrukte (Kronke et al. 2003)

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

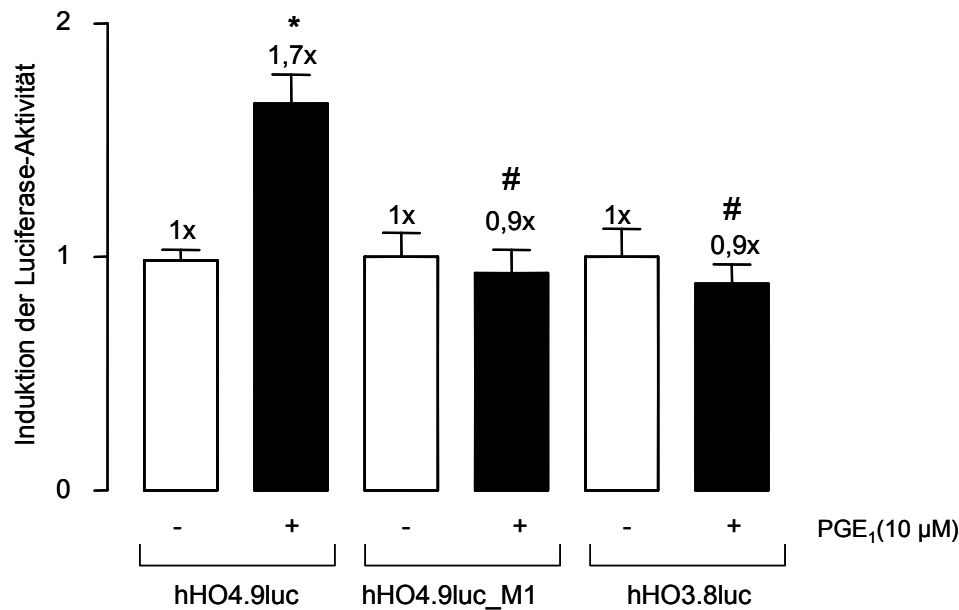


Abbildung 42: Effekt von PGE₁ auf die Luciferase-Aktivität in hHO-Reporter-gen-transfizierten Endothelzellen.

Nach der Transfektion wurden ECV304-Zellen 18 Stunden mit PGE₁ (10 µM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n=3-6 Einzelexperimenten.

*) : p < 0,001; PGE₁ vs. KON, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#): p < 0,05; PGE₁ vs. PGE₁ + DDA, t-Test nach Student.

4.4.6 Zusammenfassung

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

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

Die PGE₁-induzierte HO-1-Proteinexpression konnte mit dem Adenylatcyclase-Inhibitor DDA und dem PKA-Inhibitor KT5720 nahezu vollständig aufgehoben werden. Auch in den Promotorstudien wurde ein signifikanter Rückgang der PGE₁-induzierten Luciferase-Aktivität durch die Inhibitoren DDA und KT5720 gefunden. Dagegen konnte mit dem PKG-Inhibitor KT5823 keine signifikante Senkung der HO-1-Promotor-Aktivität beobachtet werden.

Eine Abhängigkeit der HO-1-Induktion vom CRE konnte in den abschließenden Promotorstudien mit Hilfe von verschiedenen Konstrukten dargestellt werden, so dass eine nahezu durchgängige Signalkaskade für die PGE₁-vermittelte HO-1-Induktion beschrieben werden konnte: PGE₁ erhöht über eine Aktivierung der Adenylatcyclase die intrazellulären cAMP-Spiegel und dadurch die Aktivität der PKA. Durch diesen cAMP-abhängigen Signalweg kommt es schließlich über ein CRE in der Promotorsequenz zur Aktivierung des HO-1-Gens.