

5 Diskussion

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

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

Die Induktion der HO-1-Proteinsynthese durch Prostaglandinderivate wurde mit Hilfe der Western-Blot-Technik untersucht. Das PGE₁-Derivat Alprostadil induzierte das HO-1-Protein konzentrations- und zeitabhängig sowohl in der Endothelzelllinie ECV304 als auch in der Makrophagenzelllinie J774. Auch für Iloprost und d-PGJ₂ konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der HO-1 gezeigt werden. Keine Effekte zeigte jedoch PGF_{2α}, welches über andere Prostaglandinrezeptoren wirkt. Eine erhöhte Expression der HO-1 könnte daher Bestandteil des Wirkprofils der drei Prostaglandinderivate Alprostadil, Iloprost und d-PGJ₂ sein.

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

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

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

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

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

HO-1-Aktivität im Biolumineszenz-Imaging in lebenden NIH3T3-Zellen.

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

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

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

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch eine mögliche Beteiligung der HO an den cytoprotektiven Effekten des PGE₁-Derivats Misoprostol im Gastrointestinaltrakt. Prostaglandine regulieren viele gastroprotektive Funktionen

und Stoffwechselwege. Sie stimulieren die Schleim- und Bikarbonatsekretion, erhöhen den mukosalen Blutfluss, verbessern die Resistenz der gastralen Epithelzellen gegenüber Schäden durch verschiedene Mediatoren und unterdrücken die Adhäsion von Leukozyten (Martin et al. 2006). Verletzungen der Magenschleimhaut entwickeln sich, wenn das Gleichgewicht zwischen magenschützenden und aggressiven Faktoren gestört ist. Solche aggressiven Faktoren können Stress, NSAIDs oder *Helicobacter pylori*-Infektionen sein. Der Mechanismus der Schleimhautschädigung ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt, man vermutet aber u.a. eine Beteiligung von ROS (Biswas et al. 2003). Die antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften der HO-1 und ihrer Produkte könnten daher einer Magenschädigung entgegenwirken (Becker et al. 2004). Es gibt zwar bisher nur wenige Studien zur Regulation und Funktion der HO-1 in gastrointestinalem Gewebe, für Vitamin C konnte allerdings bereits eine Beteiligung der HO-1 am Schutz der Magenschleimhaut gezeigt werden (Becker et al. 2003). Weiterhin gibt es auch Hinweise darauf, dass eine Hochregulierung der HO-1 zu einer verbesserten Ulkusheilung im Rattenmodell beitragen kann (Guo et al. 2003). Auch Protonenpumpenhemmer und NO-freisetzende NSAIDs induzieren HO-1-abhängige gastroprotektive Effekte (Berndt et al. 2005; Becker et al. 2006). Ob eine vermehrte HO-1-Expression auch zur gastroprotektiven Wirkung von Misoprostol (PGE_1) beiträgt, ist bislang nicht belegt, kann aber auf der Basis der hier gezeigten Ergebnisse vermutet werden.

Die HO-1-Produkte können an der Vermittlung von Arzneistoffwirkungen beteiligt sein. Es wurden bisher einige, strukturell sehr unterschiedliche Arzneistoffe gefunden, die über eine Induktion der HO-1 einen zusätzlichen therapeutischen Effekt erzielen. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Aspirin und Statine in Endothelzellen die HO-1-Genexpression induzieren (Grosser et al. 2003; Grosser et al. 2004). Weiterhin konnte dargestellt werden, dass eine Induktion der HO-1 ein neuartiger Wirkmechanismus ist, der ursächlich an den protektiven Effekten von NO-NSAIDs in der Magenschleimhaut (Berndt et al. 2005) und an der protektiven Wirkung des ACE-inhibitorischen Dipeptids Met-Tyr im kardiovaskulären System (Erdmann et al. 2006) beteiligt ist. Die hier erhobenen Befunde fügen zu dieser Gruppe auch die Prostaglandinderivate Alprostadil und Iloprost hinzu. Nach Bach ist die Induktion der HO-1 dabei in Abhängigkeit vom Zelltyp an den zusätzlichen therapeutischen Wirkungen des jeweiligen Arzneistoffs beteiligt. Bach bezeichnet die HO-1 daher als einen therapeutischen Mediator und Verstärker antioxidativer, antiproliferativer und antiinflammatorischer Wirkungen von verschiedenen Substanzen (Bach 2005). Genauso vielfältig wie die Induktoren der HO, sind auch die beteiligten Transkriptionsfaktoren und Signalwege die zu einer Aktivierung führen (Alam et al. 2007). Es sollte daher am Beispiel von PGE_1 ein möglicher Signalweg für die HO-1-Induktion in Endothelzellen aufgezeigt werden.

Durch die Bindung von Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wird die membranständige Adenylatcyclase aktiviert und es kommt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel (Bourne et al. 1974). Eine Aktivierung der Adenylatcyclase durch PGE_1 konnte in verschiedenen Studien beschrieben werden (Dailey et al. 1988; Maldonado et al. 1991). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob Prostaglandinderivate in den verwendeten Zellsystemen ebenfalls zu einer Stimulation der cAMP-Bildung führen. Für die Derivate PGE_1 und Iloprost wurde erwartungsgemäß eine

konzentrationsabhängige Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel in Endothelzellen und Makrophagen gefunden. Dagegen hatten d-PGJ₂ und PGF_{2α} in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die cAMP-Akkumulation in Endothelzellen.

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

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

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

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

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

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

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

Promotors durch PGE_1 hinsichtlich einer Beteiligung von CRE zu untersuchen, wurden Konstrukte verschiedener Länge bzw. mit einer Mutation innerhalb des CRE verwendet. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine Stimulation des HO-1-Promotors über das CRE erfolgt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zu dem möglichen Mechanismus der PGE_1 -vermittelten HO-1-Induktion werden in folgendem Schema noch einmal zusammengefasst:

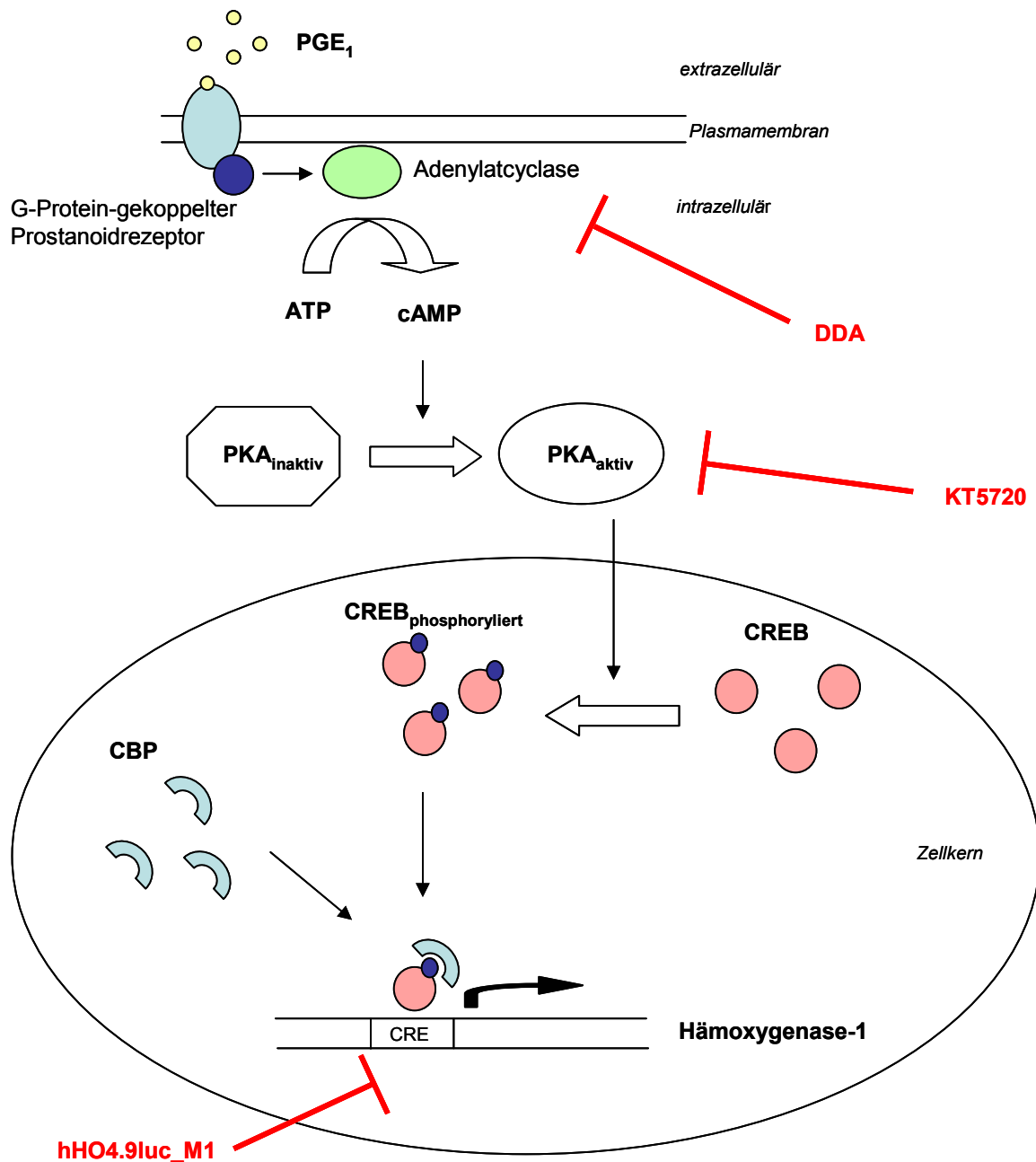


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Signalweges der HO-1-Induktion durch PGE_1 .

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

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

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

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

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

In verschiedenen Untersuchungen erwies sich die HO-1 aufgrund ihrer protektiven Eigenschaften als interessante Zielstruktur. So konnte u.a. in einer Studie gezeigt werden, dass Patienten durch einen speziellen GT-Längen-Polymorphismus im humanen HO-Promotor mit einer geringeren HO-1-Aktivität und dadurch mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse reagieren (Funk et al. 2004; Ono et al. 2004). Weiterhin scheint die HO-1 auch eine wichtige Rolle während der Schwangerschaft zu spielen. So führte bei schwangeren Frauen eine verminderte HO-1-Expression am Uterus zu einem erhöhten Risiko für eine Präeklampsie (Bainbridge et al. 2005). Auch der erste Fall einer humanen HO-1-Defizienz bestätigte diese Befunde eindrucksvoll. Ein 6-jähriger Junge zeigte als klinischen Befund eine Hyperlipidämie mit schwerer Atherosklerose und Endothelschädigung (Yachie et al. 1999; Kawashima et al. 2002). Deshalb zielen therapeutische Strategien darauf, durch einen moderaten Anstieg der HO-1-Expression, einen günstigen Einfluss auf die genannten Krankheiten zu erzielen. Die meisten der bekannten HO-1-Induktoren, wie zum Beispiel Cadmiumchlorid, eignen sich jedoch nicht zum therapeutischen Einsatz (Schröder 2005; Immenschuh et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch PGE_1 als potenter HO-1-Induktor charakterisiert werden. Die Induktion der HO-1 ist ein neuartiger Wirkmechanismus, der zusätzlich zu den bekannten Prostaglandineffekten, zur therapeutischen Wirksamkeit bei atherosklerotischen Gefäßveränderungen beitragen könnte.

In zahlreichen Studien konnten die protektiven Eigenschaften einer Überexprimierung der HO-1 auch nach Organtransplantationen nachgewiesen werden (Katori et al. 2002; Camara et al. 2005). Durch eine erhöhte Expression der HO-1 kann einerseits das Überleben des Transplantats gesteigert werden (Soares et al. 1998; Soares et al. 2001), zum anderen unterdrückt die HO-1 beim Empfänger die T-Zellaktivierung und -proliferation, welche eine wichtige Rolle bei der Transplantatabstoßung spielen (Choi et al. 2004; Pae et al. 2004; Yamashita et al. 2006). Protektive Eigenschaften bei Transplantationen wurden auch für PGE_1 gefunden. Eine Vorbehandlung mit PGE_1 führte z.B. bei Rattenlebern zu einer erhöhten Viabilität der Transplantate (Itasaka et al. 1999). Diese Effekte wurden auch in einem Modell für Lungentransplantation gefunden. Diese Studie zeigte weiterhin, dass die bessere Transplantatakzeptanz nicht über eine gefäßerweiternde Wirkung sondern über cAMP vermittelt wird (Naka et al. 1996). Ob die cytoprotektiven Eigenschaften von PGE_1 in diesen Modellen zumindest zum Teil in einer Induktion der HO-1 begründet liegen, müssen jedoch weitere Untersuchungen zeigen.

Interessanterweise könnte man sich eine erhöhte HO-1-Expression auch in der therapeutischen Diagnostik zu Nutzen machen. Dabei könnte die HO-1 als wertvoller diagnostischer Parameter für ein Ansprechen der Patienten auf eine Behandlung mit PGE_1 herangezogen werden. Beim Vergleich mehrerer klinischer Studien zur pAVK konnte gezeigt werden, dass nicht alle Patienten auf eine Therapie mit Alprostadil ansprechen (Creutzig et al. 2004). Die Methodik zur

HO-1-Bestimmung beim Patienten, z.B. durch Messung des HO-1-Proteins mit Hilfe eines spezifischen ELISA im Plasma, ist bekannt und verfügbar (Schipper et al. 2000). Da nur für solche Patienten, die mit einer erhöhten HO-1-Expression auf eine Alprostadil-Therapie antworten, ein therapeutischer Nutzen erwartet werden kann (Chen et al. 2002b; Yet et al. 2003), wäre eine Voraussage der HO-1-Sensitivität gegenüber einer solchen Behandlung durch genomische Analysen oder die Mikrochip-Array-Technik sehr nützlich. Dies könnte zur Optimierung der Therapie genutzt werden. Durch eine Bestimmung solcher sensitiven Patienten vor Behandlungsbeginn könnte ein wichtiger Schritt in Richtung einer personalisierten Arzneimitteltherapie gemacht und dadurch zu einer signifikanten Reduktion der Therapiekosten beigetragen werden. Hierzu sind aber noch weitere Untersuchungen notwendig, um die beobachteten Effekte *in vivo* zu bestätigen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass das Prostaglandinderivat PGE₁ und das Prostacyclinanalogon Iloprost die antioxidativen Proteine HO-1 und Ferritin induzieren. Die Induktion erfolgt über eine Erhöhung der cAMP-Spiegel unter Beteiligung von der Proteinkinase A und dem Transkriptionsfaktor CREB. Die cytoprotektiven, antioxidativen und vasodilatatorischen Eigenschaften der HO-1 und ihrer Stoffwechselprodukte könnten einen zusätzlichen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung inflammatorischer Prozesse, wie der arteriellen Verschlusskrankheit und Atherosklerose, mit Prostaglandinderivaten haben.