

Charakterisierung der Simvastatin-abhängigen Hämoxygenase-1-Induktion

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Urte Hinkelmann

geboren am 23. Juni 1979 in Arnstadt

Gutachter:

1. Herr Prof. Andreas Langner, Halle (Saale)
2. Herr Prof. Ralf Benndorf, Halle (Saale)
3. Herr Prof. Sönke Behrends, Braunschweig

Halle (Saale), 09. März 2015

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktasehemmer	1
1.1.1 Wirkprinzip	1
1.1.2 Pleiotrope Effekte.....	2
1.1.3 Simvastatin	4
1.2 Hämoxygenase	4
1.2.1 Hämoxygenase-1.....	6
1.2.2 HO-1-Defizienz	6
1.2.3 Komponenten der HO-Enzymreaktion und ihre funktionelle Konsequenz	7
1.2.3.1 Häm.....	7
1.2.3.2 Kohlenstoffmonoxid (CO).....	7
1.2.3.3 Bilirubin	8
1.2.3.4 Eisenionen und Ferritin	9
1.2.4 Genregulation der Hämoxygenase-1.....	9
1.2.4.1 Mitogenaktivierte Proteinkinasen.....	9
1.2.4.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase und Akt	11
1.2.4.3 Weitere Stoffwechselwege.....	13
1.2.4.4 Regulatorische Promotorelemente und Transkriptionsfaktoren	13
2 AUFGABENSTELLUNG.....	16
3 MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1 Zellkultur.....	18
3.2 Transgene HO-1-Luciferase-Mäuse	19
3.3 Modell für oxidativen Stress.....	19
3.3.1 Inkubationsprotokoll	19
3.3.2 Bestimmung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz.....	20
3.4 Western-Blot-Analyse	20
3.4.1 Inkubationsprotokoll	20
3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford	20
3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
3.4.4 Proteintransfer durch Western-Blot	21
3.4.5 Immunodetektion	21
3.5 mRNA-Bestimmung mittels Northern-Blot-Analyse	22
3.5.1 Gewinnung der Sonden-DNA	22
3.5.2 Inkubationsprotokoll	23
3.5.3 RNA-Isolation.....	24
3.5.4 RNA-Quantifizierung und -Gelelektrophorese	24

3.5.5	RNA-Transfer durch Northern-Blot	24
3.5.6	Markierung der Sonden mit ³² P-Desoxycytidintriphosphat	24
3.5.7	Hybridisierung	25
3.5.8	Autoradiographische Detektion.....	25
3.6	mRNA-Bestimmung mittels <i>real-time</i> RT-PCR	25
3.6.1	Orale Applikation.....	25
3.6.2	Gewebeaufbereitung.....	26
3.6.3	RNA-Isolation	26
3.6.4	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	26
3.6.5	cDNA-Synthese	26
3.6.6	PCR.....	26
3.6.7	Quantifizierung.....	27
3.7	Bestimmung der Hämoxxygenase-Aktivität	28
3.7.1	Orale Applikation.....	28
3.7.2	Gewebeaufbereitung.....	28
3.7.3	Enzymreaktion	28
3.7.4	Gaschromtographische CO-Detektion.....	29
3.8	Luciferase-vermittelte Chemilumineszenz.....	31
3.8.1	Reportergen-Assay in stabil transfizierten Zellen	31
3.8.1.1	Inkubationsprotokoll	31
3.8.1.2	Luciferase-Assay.....	31
3.8.2	Reportergen-Assay in transient transfizierten Zellen.....	32
3.8.2.1	Transformation kompetenter Escherichia coli Zellen.....	33
3.8.2.2	Plasmidgewinnung und -isolierung	33
3.8.2.3	Transfektion	34
3.8.2.4	Inkubationsprotokoll	34
3.8.2.5	Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay.....	34
3.8.3	Reportergen-Assay mit HO-1-Luc-Mäusen	34
3.8.3.1	Orale Applikation.....	35
3.8.3.2	Luciferase-Assay.....	35
3.9	Material	35
3.10	Puffer, Lösungen, Medien.....	37
3.10.1	Puffer und Lösungen.....	37
3.10.2	Substanzlösungen	38
3.10.3	Medien	39
3.11	Statistik.....	39
3.12	Kooperationen	39
4	ERGEBNISSE	41
4.1	Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion	41
4.1.1	Antioxidative Effekte von Simvastatin in einem Modell für oxidativen Stress.....	41

4.1.2	Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Proteinexpression	42
4.1.3	Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-mRNA-Expression	43
4.1.4	Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Promotoraktivität	44
4.1.5	Stabilisierung der HO-1-mRNA durch Simvastatin	46
4.1.6	Einfluss der HO-1 auf die antioxidativen Effekte von Simvastatin.....	47
4.1.7	Zusammenfassung	48
4.2	Transkriptionale Mechanismen der HO-1-Genregulation.....	48
4.2.1	Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)	48
4.2.1.1	Einfluss von MAPK-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA- Induktion.....	48
4.2.1.2	Einfluss von Simvastatin auf die Aktivierung von MAPK	50
4.2.1.3	Einfluss von p38-Stoffwechselwegen auf die HO-1-Promotoraktivität	51
4.2.1.4	Einfluss von p38-Stoffwechselwegen auf die HO-1-Proteininduktion.....	53
4.2.2	Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Akt	54
4.2.2.1	Einfluss von PI3K/Akt-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA-Induktion ...	54
4.2.2.2	Einfluss von Simvastatin auf die Aktivierung von Akt	55
4.2.2.3	Einfluss von PI3K/Akt-Stoffwechselwegen auf die HO-1-Promotoraktivität ..	56
4.2.3	Weitere Stoffwechselwege und Regulationselemente	57
4.2.3.1	Adenylatcyclase und Proteinkinase A.....	57
4.2.3.2	Guanylatcyclase und Proteinkinase G	58
4.2.3.3	Proteinkinase C	59
4.2.3.4	Thioredoxin/Thioredoxinreduktase System	59
4.2.3.5	Regulationselemente der Promotorregion	60
4.2.4	Zusammenfassung	61
4.3	Post-transkriptionale Mechanismen der HO-1-Genregulation.....	61
4.3.1	Einfluss von NO-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA-Stabilität	62
4.3.2	Einfluss von p38-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA-Stabilität.....	63
4.3.3	Einfluss von PI3K/Akt-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA-Stabilität.....	64
4.3.4	Zusammenfassung	65
4.4	Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion <i>in vivo</i>.....	66
4.4.1	Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Promotoraktivität im Mausmodell.....	66
4.4.2	Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-mRNA-Induktion im Mausmodell	68
4.4.3	Einfluss von Simvastatin auf die HO-Aktivität im Mausmodell	69
4.4.4	Zusammenfassung	69
5	DISKUSSION.....	71
5.1	Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion	71
5.2	Transkriptionale Mechanismen der HO-1-Genregulation.....	75
5.3	Post-transkriptionale Mechanismen der HO-1-Genregulation.....	79
5.4	Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion <i>in vivo</i>.....	80
6	ZUSAMMENFASSUNG	84

LITERATURVERZEICHNIS.....	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XXVI
TABELLENVERZEICHNIS.....	XXVIII
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	XXIX
DANKSAGUNG.....	XXXI
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XXXII
LEBENS LAUF.....	XXXIII

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
AP	Aktivatorprotein
AD	Aktinomycin D
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BLI	bioluminescence imaging
BSA	Rinderserumalbumin
BVR	Biliverdinreduktase
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
C/EBP	CAAT/enhancer-binding protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CdRE	<i>cadmium responsive element</i>
cGMP	Cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CHX	Cycloheximid
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRE	<i>cAMP response element</i>
CrMP	Chrom-Mesoporphyrin IX
CuO	Kupfer(II)-oxid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DDA	2',5'-Dideoxyadenosin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNCB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzen
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr1	<i>early growth response factor-1</i>
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
Ets1	<i>ets binding site</i>
FBS	Fetales Rinderserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GATAx	GATA binding proteins
GC	Guanylatcyclase
(GT) _n	GT-rich repeat region
HgO	Quecksilber(II)-oxid
HNF1/4	<i>hepatocyte nuclear factor 1 and 4</i>
HO	Hämoxygenase
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IgG	Immunglobulin G
IVIS	<i>in vivo</i> Imaging
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase

kb	Kilobase
KG	Körpergewicht
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginin-methylester
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-arginin
Luc	Luciferase
LY294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MnO	Mangan(II)-oxid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NRE	<i>negative regulatory element</i>
ODQ	1-H-(1,2,4)-Oxadiazol-(4,3a)quinoxalin-1-on
Pan-MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PK	Proteinkinase
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Kinase
PKB	Proteinkinase B, Akt
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G, cGMP-abhängige Kinase
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Phospho-MAPK	Phosphorylierte Form der Mitogen-aktivierten Proteinkinase
PP _i	Pyrophosphat
(Pyr) _n	<i>pyrimidine-rich region</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stressaktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
SEM	<i>standard error of mean</i>
sGC	Lösliche Guanylatcyclase
SnPP	Zinn-Protoporphyrin IX
SOD	Superoxiddismutase
SP-1	<i>specificity protein-1</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
StRE	<i>stress response element</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TATA	TATA box
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRX	Thioredoxin
USF	<i>upstream stimulatory factor</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>

1 Einleitung

1.1 Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktasehemmer

Für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose, Angina pectoris und Myokardinfarkt gilt ein erhöhter Cholesterolspiegel als entscheidender Risikofaktor (Pedersen 1994). Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktasehemmer (HMG-CoA-Reduktasehemmer) haben sich im letzten Jahrzehnt als effektive Therapeutika zur Senkung des Cholesterolspiegels etabliert und sind Mittel der Wahl bei Hypercholesterolämie (Jacobson 2007). Zu den momentan in Deutschland zugelassenen HMG-CoA-Reduktasehemmern gehören Simvastatin, Lovastatin, Atorvastatin, Fluvastatin, Pravastatin und Rosuvastatin. Vertreter aus dieser Arzneistoffklasse werden auch als Statine und Cholesterolsynthesehemmer (CSE-Hemmer) bezeichnet.

1.1.1 Wirkprinzip

Durch reversible und kompetitive Hemmung des Enzyms HMG-CoA-Reduktase verhindern Statine die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonsäure und inhibieren somit die endogene Cholesterolsynthese (Abb. 1) (Lennernas 1997). Als Substratanaloga reagieren sie mit dem aktiven Zentrum des Enzyms und blockieren dadurch die Bindetasche für HMG-CoA (Istvan 2002).

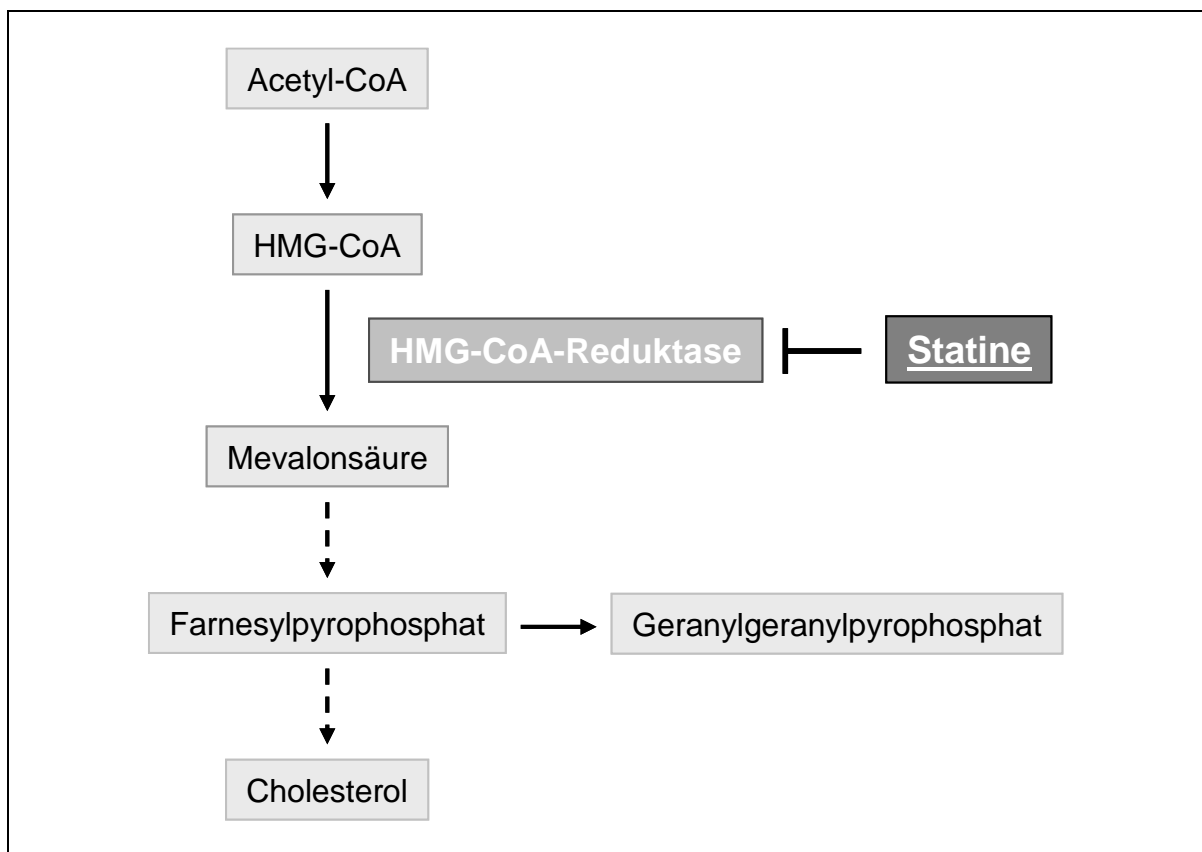


Abbildung 1: Effekt von Statinen auf die Cholesterolsynthese

Die pharmakologische Wirkung von Statinen auf den Lipidstoffwechsel besteht in einer dosisabhängigen Senkung des LDL-Cholesterols (*low density lipoprotein*, 19-60 %), einer moderaten Erhöhung des HDL-Cholesterols (*high density lipoprotein*, 5-10 %) und einer leichten Senkung der Triglyceride (22-45 %) (Jones 1998). Die Cholesterolsynthese wird vor allem in der Leber und nur zu einem geringen Teil in der Peripherie gehemmt. Der intrazelluläre Cholesterolabbau in den Hepatozyten bewirkt eine Freisetzung von *sterol regulatory element binding proteins* (SREBP), was im Nukleolus die Genexpression von LDL-Rezeptoren aktiviert. Die erhöhte Anzahl an LDL-Rezeptoren auf der Hepatozytenoberfläche hat eine gesteigerte Resorption von LDL-Cholesterol-Partikeln aus dem Blut zur Folge.

1.1.2 Pleiotrope Effekte

Statine werden nicht nur zur Behandlung der Hypercholesterolämie eingesetzt, sondern finden auch bei der Primär- und Sekundärprävention koronarer Herzkrankheiten (KHK) Anwendung. Der therapeutische Nutzen von Statinen ist dabei nicht nur auf die cholesterolsenkende Wirkung zurückzuführen. Vielmehr wurden in verschiedenen Studien protektive Statineigenschaften beobachtet, die unabhängig von der Cholesterolreduktion zu sein scheinen. Zu diesen als pleiotrop bezeichneten Effekten gehören eine verbesserte Endothelfunktion, Verringerung von oxidativem Stress, Stabilisierung atherosklerotischer Plaques sowie antiinflammatorische und antithrombotische Eigenschaften (Liao 2005; Leon 2013). Die protektiven Einflüsse beziehen sich jedoch nicht nur auf das kardiovaskuläre System. Auch für das Immunsystem, das ZNS und verschiedene Organe wie z. B. die Nieren konnten pleiotrope Statinwirkungen beobachtet werden (Cojocar 2013).

Als Ursache der pleiotropen Effekte wird eine Beeinflussung der frühen Phase der Cholesterolsynthese vermutet, wodurch die Bildung von Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) verhindert wird und als Folge Isoprenylierungsschritte verschiedener Signalmoleküle ausbleiben. Somit werden kleine G-Proteine in ihrer Funktion und Membranassoziation gehemmt, da diese eine Farnesylierung (Ras-Familie) und Geranylisierung (Rho-Familie) für ihre Wirkung benötigen. Weiterhin sind Isoprenoide für die post-translationale Modifikation von heterotrimeren G-Proteinen und Häm *a* erforderlich (Van Aelst 1997). Die Hemmung der Isoprenoidsynthese wird für die meisten der pleiotropen Statineffekte als Ursache diskutiert.

Ergebnisse von *in vitro* Studien, Tierexperimenten und klinischen Untersuchungen ergaben eine Protektion des Gefäßsystems als wichtigen pleiotropen Effekt der Statine (O'Driscoll 1997; Wassmann 2002). Es konnte eine verbesserte Endothelfunktion beobachtet werden, die vor allem auf die Beeinflussung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zurückzuführen ist. Durch Hemmung der Geranylisierung von RhoA bewirken Statine eine Stabilisierung der eNOS-mRNA und eine Steigerung der eNOS-Enzymaktivität durch post-translationale Aktivierung des PI3K/Akt-Weges (Phosphatidylinositol-3-Kinase) (Wassmann 2002). Die eNOS-Aktivität wird zusätzlich durch eine Statin-abhängige Inhibition von Caveolin-1, einem Negativregulator der eNOS, erhöht (Feron 2001). Eine weitere endothelprotektive Statinwirkung ist die Inhibition des Vasokonstriktors und Mitogens Endothelin-1 (Hernandez-Perera 1998). Interessanterweise konnte eine verbesserte Endothelfunktion auch ohne Senkung des Plasmacholesterolspiegels nachgewiesen werden, was die These cholesterolonabhängiger, pleiotroper Statineffekte unterstützt (Liao 2005).

Auch die antioxidativen Eigenschaften von Statinen und die damit verbundene Reduktion von oxidativem Stress tragen zur verbesserten Endothelfunktion bei. In Zellsystemen konnte eine verringerte Bildung von proatherosklerotisch wirkenden Superoxidanionen und von oxidiertem LDL nachgewiesen werden (Giroux 1993). Auch *in vivo* Studien belegen eine Senkung der Lipoproteinoxidation bei Statintherapie (Aviram 1992; Girona 1999). In glatten Gefäßmuskelzellen verringerte Atorvastatin durch Reduktion der AT-1-Rezeptorexpression die Angiotensin-II-induzierte Sauerstoffradikalbildung. Zusätzlich senken Statine die Aktivität der radikalbildenden NAD(P)H-Oxidase durch eine verringerte Expression der Untereinheiten p22phox und Nox1 (Wassmann 2002; Violi 2013b).

Durch Hemmung von Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) und Interleukinen (IL-1 β , IL-6, IL-8) können Statine auch dem Entzündungsgeschehen entgegenwirken (Dichtl 2003; Riad 2007). Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Entzündungsmarker, der mit dem Risiko KHK positiv korreliert (Rifai 2002). Zahlreiche *in vivo* Untersuchungen belegen eine Reduktion des Plasmaanteils von CRP unter Statintherapie (Albert 2001; Ray 2005; Gortney 2007). Zu ihnen gehören u. a. die *Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation* (PRINCE)-Studie, *Cholesterol and Recurrent Events* (CARE)-Studie und *Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study* (AFCAPS/TexCAPS). Zusätzlich wurde unter Statingabe eine Inhibition von Matrix-Metalloproteasen beobachtet (Crisby 2001).

Antiatherosklerotische Eigenschaften zählen ebenfalls zu den pleiotropen Statineffekten. Durch Erhöhung des Kollagengehalts und Hemmung von Matrix-Metalloproteasen stabilisieren Statine die fibröse Kappe atherosklerotischer Plaques (Bellosta 1998; Libby 2003). Die Expression von Adhäsionsmolekülen wie z. B. VCAM (vascular cell adhesion molecule) und ICAM (intercellular adhesion molecule) wird ebenfalls verringert (Tsiara 2003; Riad 2007).

Statine sind weiterhin in der Lage die Thrombusbildung zu senken und das fibrinolytische Profil zu verbessern (Violi 2013a). Durch Steigerung der eNOS-Aktivität verringern sie die Thrombozytenaggregation (Wassmann 2002). Ein weiterer Effekt ist die verminderte Produktion von Thromboxan A₂, einem prothrombotischen Mediator (Vaughan 2000). Auch die Expression des Gewebefaktors (*tissue factor*), welcher die extrinsische Gerinnungskaskade aktiviert, wird gesenkt (Aikawa 2001).

Die pleiotropen Effekte beschränken sich jedoch nicht nur auf das kardiovaskuläre System. Ein positiver Einfluss von Statinen wird u. a. bei Alzheimer Erkrankungen vermutet (Barone 2013). Neben der Senkung des Cholesterolspiegels, welcher in erhöhter Form als Risikofaktor gilt, scheinen Statine zusätzlich über cholesterolumabhängige Wege den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen (Wolozin 2000; Haag 2009). An neuronalen Primärkulturen sowie am Tier-Modell konnten Statine die Bildung und die Akkumulation von β -Amyloid reduzieren (Fassbender 2001). Weiterhin wurde in Gegenwart von Statinen der Abbau extrazellulären β -Amyloids durch eine verstärkte Sekretion des Insulin-abbauenden Enzyms (IDE) beobachtet (Tamboli 2010).

Des Weiteren sind für Statine auch immunmodulatorische Eigenschaften beschrieben, die zu einer Verbesserung des Zustands bei multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Lupus erythematodes und zu einer verringerten Organabstoßung nach Transplantationen führen (Steffens 2006; Soares 2007; Cojocar 2013).

1.1.3 Simvastatin

Simvastatin ist das in Deutschland am häufigsten verschriebene Statin und wurde deshalb als Untersuchungssubstanz aus der Gruppe der HMG-CoA-Reduktasehemmer ausgewählt (Gerdemann 2008). Die Gewinnung von Simvastatin erfolgt partialsynthetisch aus Lovastatin. Simvastatin besitzt eine geschlossene Ringstruktur, wodurch es als Prodrug eingenommen wird. Charakteristisches Merkmal von Statinen ist die 3,5-Dihydroxyheptansäure-Struktur, die dem natürlichen Substrat HMG-CoA ähnelt. Die Hydrolyse zur aktiven 3,5-Dihydroxysäure-Form erfolgt durch unspezifische Esterasen in der Mukosa und Leber. Simvastatin verfügt über einen hohen *First-Pass-Effekt* (65 %), wodurch die Cholesterolsynthese hauptsächlich in den Hepatozyten gehemmt wird (Stark 2003). Wie die meisten Statine wird es über CYP450-abhängige Systeme (CYP3A4, CYP2C9) metabolisiert und zu aktiven Hydroxymetaboliten umgewandelt. Die Elimination erfolgt hauptsächlich hepatisch (80 %) und nur zu einem geringen Teil renal (Stark 2003).

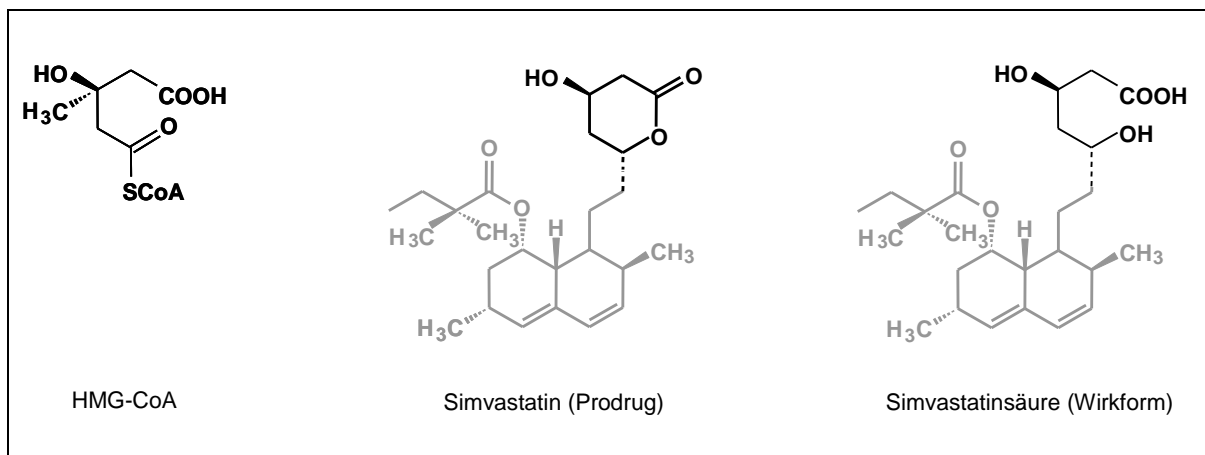


Abbildung 2: Strukturformeln

1.2 Hämoxygenase

Die Hämoxygenase (HO, EC 1.14.99.3) katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Hämabbaus (Gozzelino 2010). Häm ist ein Tetrapyrrol, dessen vier Pyrrole über Methen-Brücken (α , β , γ , δ) verknüpft sind. Nach Spaltung der α -Methen-Brücke durch die HO wird Häm *b* zu äquimolaren Mengen an Kohlenstoffmonoxid (CO), freien Eisenionen und Biliverdin IX α umgesetzt. Biliverdin IX α wird direkt im Anschluss durch die Biliverdinreduktase in Bilirubin IX α umgewandelt (Abb.3).

Das HO-System wird ubiquitär exprimiert und verfügt über drei Isoformen, die auf verschiedenen Genen codiert sind: die induzierbare Isoform HO-1, die konstitutive Isoform HO-2 und die zuletzt identifizierte Isoform HO-3. Eine charakteristische Gemeinsamkeit ist die katalytische Häm-Domäne, bestehend aus 23 Aminosäuren, die auch als „HO-Signatur“ bezeichnet wird (Chen 2000). Obwohl alle Isoformen die gleiche biochemische Reaktion katalysieren, besitzen sie Unterschiede in ihrer Struktur, ihrer Regulation und ihren biochemischen Eigenschaften. Die HO-2 verfügt im Gegensatz zur HO-1 und HO-3 über zwei

zusätzliche Häm-regulatorische Domänen, die ein konserviertes Cys-Pro-Motiv enthalten (McCoubrey 1997a). Als funktionelle Konsequenz wird eine Beteiligung an Häm-abhängigen Regulationsschritten vermutet, die unabhängig vom Hämabbau sind. Über die Bedeutung der dritten Isoform ist bislang am wenigsten bekannt. Die HO-3 (33 kDa) konnte bisher nur im Rattengewebe nachgewiesen werden und weist eine sehr geringe katalytische Aktivität auf (McCoubrey 1997b). Das Enzym besitzt eine hohe, ca. 90 %ige Homologiesequenz zur HO-2 und wird auch als Produkt eines Pseudogens, abgeleitet vom HO-2-Transkript diskutiert (Hayashi 2004).

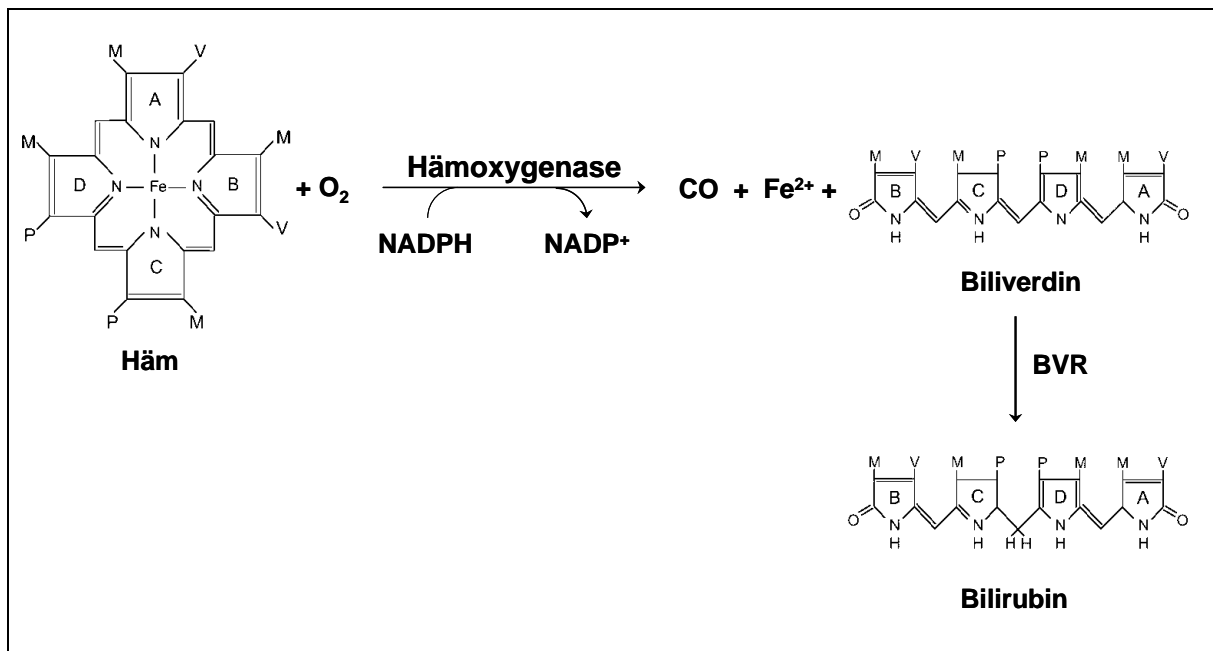


Abbildung 3: Hämoxygenase-Enzymreaktion

Schematische Darstellung des katalytischen Abbaus von Häm zu CO, Eisenionen (Fe^{2+}) und Biliverdin. Die Biliverdinreduktase (BVR) wandelt Biliverdin zu Bilirubin um. Modifiziert nach Agarwal 2000. M-Methyl-, P-Propyl-, V-Vinylrest

Im menschlichen Organismus liegt die HO als ternärer Komplex vor. Gebunden an die NADPH-Oxidase und Biliverdinreduktase ist sie in der mikrosomalen Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert (Ryter 2002). Beide Isoformen, HO-1 und HO-2, kommen ubiquitär im Organismus vor und werden jedoch abhängig vom Gewebe unterschiedlich stark exprimiert. Die HO-1 ist aufgrund des Erythrozytenabbaus vor allem in Milz und Leber vorzufinden. Die HO-2 wurde dagegen vorrangig im Gehirn und in den Testes nachgewiesen (Ryter 2002). Beide Isoformen unterscheiden sich neben ihrer Lokalisation auch hinsichtlich ihres Molekulargewichts und ihrer Thermostabilität. Die HO-1 (32 kDa) ist im Gegensatz zur HO-2 (33 kDa) thermostabil und gehört zur Familie der Hitzeschockproteine. Insgesamt konnte zwischen den beiden Isoformen nur eine 43 %ige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz nachgewiesen werden. Die Nukleotidsequenzen von Mensch, Ratte und Maus sind bei der HO-1 über 80 % und bei der HO-2 über 90 % identisch (Maines 1997). Neben dem Vorkommen in Säugetieren wird das HO-System auch in Pflanzen, Bakterien und Pilzen exprimiert.

1.2.1 Hämoxxygenase-1

Das Hitzeschockprotein (HSP 32) HO-1 wurde erstmalig 1968 von Tenhunen beschrieben (Tenhunen 1968). Neben der Kontrolle des basalen Hämabbaus, wirkt die HO-1 auch als Regulator bei kurzfristigen Hämschwankungen. Das Enzym verfügt im Gegensatz zur HO-2, deren einzige bekannte Stimuli Häm und Glucocorticoide sind, über eine enorme Vielzahl von Induktoren (Weber 1994). Neben dem natürlichen Substrat Häm wird die HO-1 vor allem durch Substanzen, die zu erhöhtem Zellstress führen induziert. Typische Induktoren sind Endotoxine, Schwermetalle, Hitzeschock, UV-Strahlung, Hypoxie, Wasserstoffperoxid und inflammatorische Zytokine (Maines 1988; Choi 1996). Die hohe Anzahl an pro-oxidativen Stimuli ließ stets eine Schutzfunktion der HO-1 vor oxidativem Zellstress vermuten, die jedoch aufgrund der Toxizität der Verbindungen nicht ausgenutzt werden konnte. In den letzten Jahren wurden allerdings vermehrt HO-1-Induktoren bekannt, die nicht als Stressfaktoren gelten. Zu diesen benignen HO-1-Induktoren zählen die pflanzlichen Inhaltsstoffe Curcumin und Resveratrol sowie Aminosäuren (Balogun 2003; Grosser 2004b; Erdmann 2005; Hsieh 2008). Weiterhin wurden einige Arzneistoffe als therapeutisch relevante HO-1-Induktoren beschrieben: Acetylsalicylsäure, NO-Donoren und Protonenpumpenhemmer (Oberle 2002; Grosser 2003; Berndt 2005; Becker 2006). Die protektive Wirkung dieser Verbindungen soll dabei im Zusammenhang mit der HO-1-Induktion stehen (Bach 2005).

1.2.2 HO-1-Defizienz

Neben der Bereitstellung freier Eisenionen für die Erythropoese, ist die Gewährleistung der Häm-Homöostase durch die HO von großer Bedeutung. In den letzten Jahren erlangte das HO-System jedoch über seine hämabbauende Funktion hinaus enorme Beachtung und entwickelte sich vom einfachen katabolen Enzym zu einem entscheidenden Mediator der endogenen Zytoprotektion. Studien mit Antisense- und Knockout-Modellen bewiesen eine zentrale Rolle der HO-1 bei der Abwehr von oxidativem Stress. Unter Hypoxie gehaltene HO-1-defiziente Mäuse zeigten oxidative Schäden der Kardiomyozyten sowie Infarkte im rechten Ventrikel, die im Wildtyp ausblieben (Yet 1999). In einem Endotoxämie-Modell mit ebenfalls HO-1-defizienten Mäusen führte der verminderte oxidative Schutz zu Leberzellnekrosen und einer erhöhten Mortalität durch endotoxischen Schock (Poss 1997b). Weiterhin wiesen HO-1-defiziente Tiere eine Eisenmangelanämie mit verstärkter Eisenablagerung in Leber und Nieren auf, die zu oxidativen Gewebeschäden und chronischer Entzündung der Organe führte (Poss 1997a). Auffällig ist, dass die HO-1 besonders stark im Plazentagewebe exprimiert wird. Studien ergaben ein erhöhtes Risiko für Schwangerschaftskomplikationen, Fehlgeburten und Präeklampsie bei vorhandener HO-1-Defizienz in der Plazenta (Wong 2012). Als Ursache werden eine gestörte Angiogeneseregulation, ein verringerter Gewebeschutz und eine verminderte Relaxation der glatten Muskulatur vermutet. 1999 konnte erstmalig bei einem Patienten eine HO-1-Defizienz im Genom nachgewiesen werden. Der HO-1-Gensequenz fehlten im maternalen Allel der komplette Bereich des Exon2 sowie zwei Nukleotide im dritten Exonbereich des paternalen Allels. Der Gendefekt äußerte sich phenotypisch in einer generalisierten Inflammation, intravaskulären Hämolyse, Nephropathien, Endothelschäden und in pathologischen Veränderungen im Gerinnungsverhalten. Der Patient verstarb im Alter von sechs Jahren aufgrund

intrakranieller Hämorrhagie (Koizumi 2007). Ein weiterer Fall wurde 2011 von Radhakrishnan und Mitarbeitern beschrieben. Ein junges Mädchen wies eine generalisierte Inflammation, intravaskuläre Hämolyse, chronische Nephritis und Asplenie auf. Die diagnostizierte Symptomatik wurde ebenfalls auf eine genetisch bedingte HO-1-Defizienz zurückgeführt (Radhakrishnan 2011). Das Mädchen verstarb im Alter von 15 Jahren.

1.2.3 Komponenten der HO-Enzymreaktion und ihre funktionelle Konsequenz

Die zytoprotektive Wirkung der HO-1 setzt sich zum einen aus dem Abbau von in freier Form zytotoxischem Häm und zum anderen durch die schützenden Effekte der gebildeten Reaktionsprodukte CO und Bilirubin zusammen. Die Freisetzung von Eisenionen bewirkt eine Induktion des Eisenspeicherproteins Ferritin, welches ebenfalls protektive Eigenschaften aufweist. Die Zytoprotektion der HO-1 wird somit maßgeblich durch die physiologischen Eigenschaften der einzelnen Reaktionsprodukte vermittelt (Abraham 2008).

1.2.3.1 Häm

Das eisenhaltige Protoporphyrin IX, auch Häm *b* genannt, kann im Körper in freier Form oder gebunden an Proteine vorkommen. Es ist Bestandteil verschiedener Proteine und Enzyme, die in ihrer Funktion stark variieren. Häm ist z. B. essenziell für die Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin und Myoglobin. Als Bestandteil in Zytochromen ist es an der Atmungskette und in Zytochrom P450-Systemen an Metabolisierungsvorgängen beteiligt. Weitere hämhaltige Verbindungen sind Oxidasen, Peroxidasen, Oxygenasen und Signaltransduktionsenzyme, wie die NO-Synthasen (NOS) und die lösliche Guanylylzyklase (sGC). Im Gegensatz zu der physiologischen Notwendigkeit besitzt Häm jedoch auch zytotoxische Eigenschaften. In freier, ungebundener Form kommt es durch das hohe Oxidationspotenzial zur vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen, die u. a. an DNA- und Endothelschäden sowie der Lipidperoxidation beteiligt sind (Ryter 2000). Der Abbau von freiem Häm durch das HO-System ist somit ein essenzieller Schutzmechanismus des Organismus.

1.2.3.2 Kohlenstoffmonoxid (CO)

CO wird hauptsächlich als Schadstoff und Atemgift betrachtet. Es besitzt im Vergleich zu Sauerstoff eine 200-fach stärkere Affinität zu Hämoglobin und kann dadurch in hohen Konzentrationen zur Asphyxie führen. CO wird jedoch auch endogen gebildet und wirkt, vergleichbar mit Stickstoffmonoxid (NO) als Signaltransduktor (Ryter 2002). Der Hauptteil des endogenen CO (86 %) entsteht innerhalb der katalytischen Hämdegradation. Der restliche Anteil wird u. a. durch nicht-enzymatische Photo-, Auto- und Peroxidation organischer Verbindungen, Bakterien und Xenobiotika gebildet (Weitz-Schmidt 2001; Abraham 2008; Gullotta 2013).

CO beeinflusst in erster Linie das vaskuläre System, indem es als Aktivator der löslichen Guanylylzyklase den cGMP-Spiegel erhöht. Basierend auf dieser Stimulation bewirkt CO eine Hemmung der Thrombozytenaggregation, ist als Vasodilatator an der Regulation des Gefäßmuskeltonus beteiligt und hemmt die

Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Furchgott 1991; Morita 1997; Durante 1998). Die Funktion als Neurotransmitter wird ebenfalls auf die Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase zurückgeführt (Verma 1993). Die beobachteten antiinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften von CO beruhen hingegen auf der Hemmung proinflammatorischer Zytokine durch Modulation des p38-MAPK-Signalweges (Ryter 2002). Von Vorteil ist die geringe Reaktivität des Gases, wodurch die unter NO beobachtete Bildung von höchst reaktivem Peroxynitrit und anderen Sauerstoffspezies ausgeschlossen werden kann. CO besitzt deshalb aber auch eine geringere Affinität zur löslichen Guanylylzyklase und ist somit weniger potent im Vergleich zu NO (Ryter 2002). Die Affinität zur Hämgruppe reicht jedoch aus, um mit anderen häm-haltigen Proteinen wie Cytochrom P450-Enzymen, NO-Synthasen, NADPH-Oxidasen zu reagieren und dadurch an Metabolisierungs-, Entzündungs- und Respirationsvorgängen beteiligt zu sein (Guengerich 1975; Volpe 1975; Chen 2000; Contag 2001). Für den therapeutischen Nutzen von CO spielen in erster Linie die vaskulär protektiven und antiinflammatorischen Eigenschaften des HO-1-Produktes eine Rolle (Ryter 2013).

1.2.3.3 Bilirubin

Biliverdin, ein weiteres Produkt des katalytischen Hämabbaus, wird direkt im Anschluss durch die Biliverdinreduktase in Bilirubin umgewandelt. Bilirubin besitzt wie CO je nach Konzentration sowohl protektive als auch toxische Eigenschaften. In pathophysiologischen Konzentrationen ($> 340 \mu\text{mol/l}$) führt Bilirubin zum Kernikterus mit neurotoxischen Begleiterscheinungen. Leicht erhöhte Serumbilirubinkonzentrationen werden bei Neugeborenen hingegen als physiologisch betrachtet. Bilirubin gehört zu den stärksten endogenen Antioxidantien. Sowohl albumin-gebundenes, konjugiertes als auch freies Bilirubin können die Oxidation von LDL und anderen Lipiden verhindern, freie Sauerstoffradikale binden und somit oxidativem Stress entgegenwirken (Hopkins 1996; Li 2007). Der beobachtete Schutz vor oxidativer Schädigung ist mit der Wirkung klassischer Antioxidantien wie Vitamin C, E und antioxidativ-wirkender Enzyme wie der Superoxiddismutase vergleichbar bzw. übertrifft sie sogar (Hopkins 1996; Chen 2004; Li 2007). Oxidierte Lipide und reaktive Sauerstoffspezies sind an atherosklerotischen, inflammatorischen und kardiovaskulären Krankheitsprozessen beteiligt. Basierend auf der antioxidativen Wirkung von Bilirubin wurde somit eine mögliche Schutzfunktion vor oxidativem Stress und dessen pathophysiologischen Folgen vermutet. Tatsächlich konnte eine Vielzahl von Studien einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen Serumbilirubinspiegel und kardiovaskulären Ereignissen belegen (Schwertner 1994; Hopkins 1996; Djousse 2001; Schwertner 2008). Moderat erhöhte Bilirubinspiegel ($33 \pm 14 \mu\text{mol/l}$) wurden mit einem verringerten atherosklerotischen und kardiovaskulären Risiko assoziiert (Schwertner 2008). Eine Meta-Analyse verschiedener Studien ergab eine 6,5 %ige Senkung kardiovaskulärer Erkrankungen bei einem Anstieg des Serumbilirubinspiegels von $1 \mu\text{mol/l}$ (Schwertner 2008). Ein zu geringer Bilirubinspiegel wurde von Mayer sogar als selbstständiger kardiovaskulärer Risikofaktor beschrieben (Mayer 2000). Als Grenzwert wurde eine Serumbilirubinkonzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ ermittelt (Schwertner 2008).

Neben den antioxidativen Effekten wurden für Bilirubin auch antiinflammatorische und antiproliferative Eigenschaften beschrieben, die auf einer verringerten

T-Zellaktivität und verminderten Synthese pro-inflammatorischer Zytokine und Entzündungsmediatoren beruhen (Chen 2000; Li 2007; Ryter 2007). Die damit verbundene Immunsuppression kann z. B. bei Transplantationen und Autoimmunerkrankungen von Vorteil sein, jedoch auch zur unerwünschten septischen Begleiterscheinung bei bestehender Hyperbilirubinämie führen (Chen 2000).

Insgesamt wird Bilirubin eine dem *high-density-lipoprotein* vergleichbare Funktion als gefäßschützender und antiatherogener Mediator zugeschrieben, der für die antioxidative Kapazität des Körpers eine entscheidende Rolle spielt (Hopkins 1996; Mayer 2000). Die beschriebenen protektiven Effekte gelten für leicht erhöhte Serumbilirubinkonzentrationen im physiologischen Bereich und stellen nicht die Toxizität einer Hyperbilirubinämie in Frage.

1.2.3.4 Eisenionen und Ferritin

Das Spurenelement Eisen ist in ionischer Form essenzieller Bestandteil verschiedener Kofaktoren und redoxabhängiger Enzyme, die u. a. in den Transport und die Speicherung von Sauerstoff integriert sind. In freier Form katalysieren Eisenionen (Fe^{2+}) jedoch die Fenton-Reaktion und besitzen durch die Beteiligung an der Hydroxylradikalbildung ein toxisches Potenzial. Als Schutzfunktion des Körpers wird deshalb parallel zur Induktion der HO das Eisenspeicherprotein Ferritin induziert (Eisenstein 1991). Die bei der HO-Reaktion freigesetzten Eisenionen (Fe^{2+}) werden direkt im Anschluss durch Ferritin oxidiert (Fe^{3+}), gespeichert und somit der Sauerstoffradikalbildung entzogen. Somit besitzt Ferritin als antioxidatives Schutzenzym und Eisenspeicherprotein eine duale Funktion (Harrison 1996).

1.2.4 Genregulation der Hämoxxygenase-1

Die HO-1 kann durch eine Vielzahl strukturell sehr unterschiedlicher Stimuli induziert werden. Die hohe Diversität an HO-1-Induktoren ist bereits ein erster Hinweis, dass die Genregulation des Enzyms über verschiedene Signalwege vermittelt werden kann. Die Effekte der einzelnen Stimuli auf die HO-1 sind dabei meist zell- und gewebespezifisch. Häufig an der HO-1-Genregulation beteiligt sind die Signalkaskaden der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK), Phosphatidylinositol-3-Kinase, Tyrosinkinase, cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) (Ryter 2002).

Die HO-1 ist ein hauptsächlich transkriptional reguliertes Enzym, dessen regulatorische Elemente und Transkriptionsfaktoren der Promotorregion zumindest teilweise bekannt sind (Paine 2010). In den letzten Jahren wurden auch post-transkriptionale Mechanismen der HO-1-Genregulation beobachtet (Erdmann 2006; Hinkelmann 2010).

1.2.4.1 Mitogenaktivierte Proteinkinasen

Die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Physiologisch sind sie an Proliferations- und Differenzierungsschritten der Zelle beteiligt, können jedoch auch in unkontrollierter Form zur Onkogenese beitragen. MAPK können durch eine Vielzahl

extrazellulärer Stimuli wie z. B. die namensgebenden Wachstumsfaktoren (Mitogene) aktiviert werden und vermitteln die Signalweiterleitung von der Zelloberfläche zum Zellkern (Campbell 1995). Der MAPK-Weg stellt eine Phosphorylierungskaskade dar, in die mindestens drei hintereinander geschaltete Kinasen integriert sind und entsprechend ihrer Aktivierungsreihenfolge als MAPKKK, MAPKK und MAPK bezeichnet werden (Widmann 1999). Die terminalen MAPK führen letztendlich zur Aktivierung der Zielstruktur, meist Transkriptionsfaktoren, und liegen im Anschluss in dephosphorylierter Form zur erneuten Aktivierung im Zytosol vor. Der MAPK-Weg wird in drei Hauptwege unterteilt, die nach der jeweiligen terminalen Kinase benannt sind: extrazellulär regulierte Kinase (ERK), c-Jun N-terminale Kinase (JNK), auch als stressaktivierte Proteinkinase (SAPK) bezeichnet, und p38-MAPK.

Die ERK-Kaskade beinhaltet verschiedene MAPK-Isoformen (ERK1-8), von denen ERK1 und ERK2 am detailliertesten charakterisiert sind (Ramos-Nino 2002). Die Aktivierung erfolgt hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren, die eine Stimulation von kleinen G-Proteinen z. B. Ras bewirken (Roux 2004). Durch duale Phosphorylierung des Thr-Glu-Tyr-Motivs von ERK können Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, c-fos und AP-1 aktiviert werden.

Der JNK-Weg umfasst hingegen nur drei terminale MAPK (JNK1-3) und wird vorwiegend durch Zellstress und Zytokine induziert. Die Initialisierung wird meist von den kleinen G-Proteinen Rac und Rho übernommen. Charakteristisch ist die duale Phosphorylierung des Thr-Pro-Tyr-Motivs in der Kinasedomäne, durch die Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, c-Jun, AP-1 und ATF-2 beeinflusst werden können (Campbell 1995).

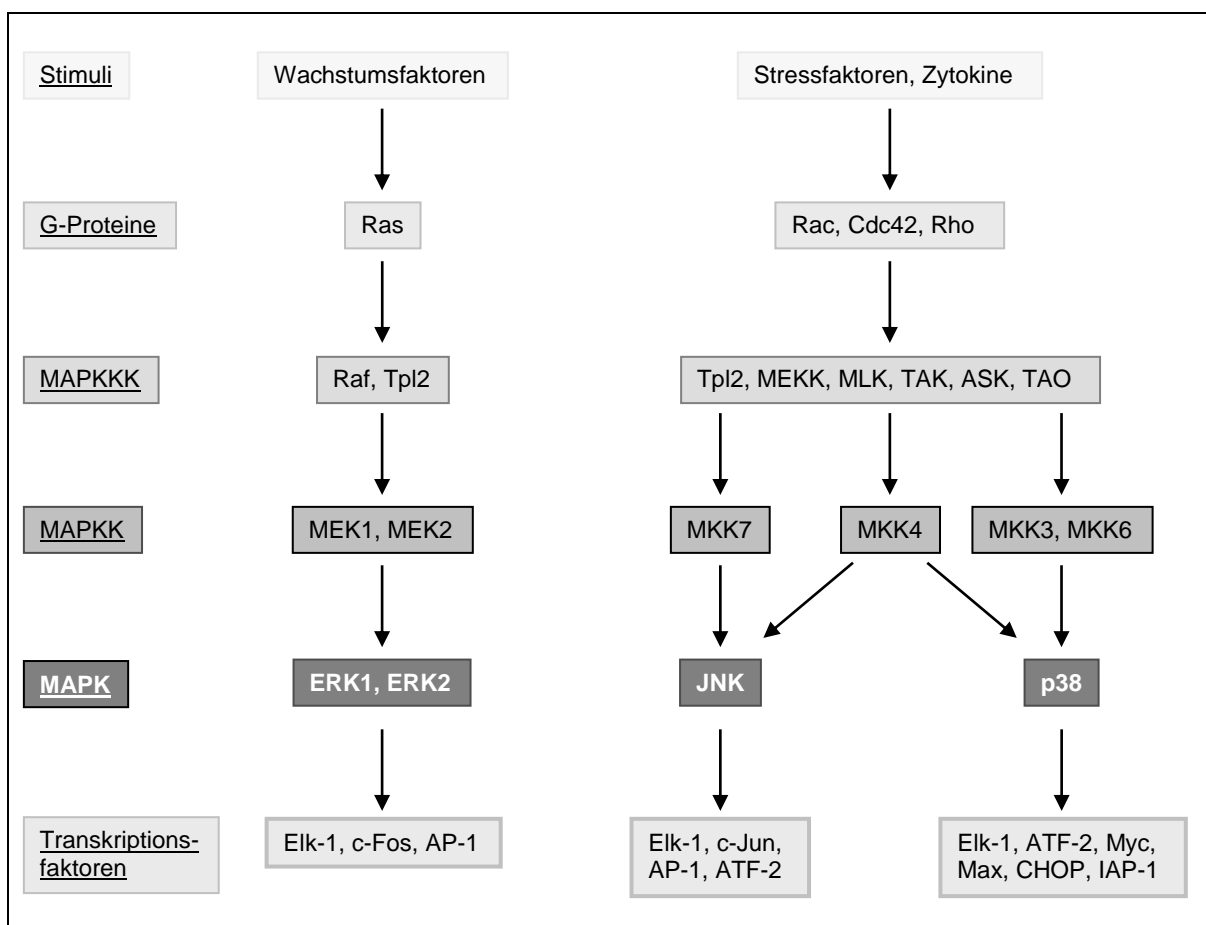


Abbildung 4: Schematische Übersicht des MAPK-Weges

Die p38-MAPK wird ebenso wie JNK hauptsächlich durch Stressfaktoren und Zytokine induziert, die zu einer Rac-Aktivierung führen. Die in vier Isoformen auftretende p38-MAPK (p38 α , β , δ , γ) wird innerhalb des Thr-Gly-Tyr-Bereiches phosphoryliert und kann die Transkriptionsfaktoren Elk-1, ATF-2, Myc, Max, CHOP und IAP-1 aktivieren (Ono 2000).

Der MAPK-Weg ist der häufigste Signalweg innerhalb der HO-1-Genregulation (Alam 2007). Verschiedene HO-1-Induktoren wie Arsenit, Cadmium und Lipopolysaccharide (LPS) sind in der Lage, alle drei MAPK-Wege zu aktivieren. Wird die Präsenz der drei MAPK-Wege untereinander verglichen, so spielt der JNK-Weg eine untergeordnete Rolle in der HO-1-Genregulation (Han 1994; Raingeaud 1995; Hambleton 1996; Elbirt 1998; Mrad 2012). Die meisten Stimuli wie z. B. Quercetin, NO-Donatoren, oxidierte Phospholipide und Hypoxie beeinflussen die HO-1-Genexpression über die Aktivierung des ERK- und p38-MAPK-Weges (Ryter 2002; Kronke 2007; Yao 2007; Hsieh 2008). Für andere Induktoren ist wiederum nur einer der MAPK-Signalwege relevant, wie es z. B. für Curcumin der Fall ist, welches die HO-1 über den p38-MAPK-Weg aktiviert (Balogun 2003; Rushworth 2006). Die für die HO-1-Genexpression essenziellen Signalwege können auch je nach Zelltyp variieren. In einer Krebszelllinie des Magens wurden sowohl ERK als auch p38 für die durch Cadmium induzierte HO-1-Expression benötigt, wogegen in Brustkrebszellen p38 ausreichte (Chang 2004; Mrad 2012). Weiterhin wurden auch Spezies-spezifische Effekte beobachtet. So beruhte die HO-1-Induktion von Natriumarsenit in Hepatozyten von Hühnern auf einer Stimulierung von ERK und p38, wogegen in Rattenhepatozyten die MAPK JNK und p38 essenziell waren (Elbirt 1998; Kietzmann 2003).

1.2.4.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase und Akt

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase-Familie (PI3K-Familie) besteht aus acht strukturell verwandten Isoenzymen, die entsprechend ihrer katalytischen Untereinheiten in drei funktionelle Klassen I (Ia und Ib), II und III eingeteilt werden (Tab. 1) (Cantley 2002). Am häufigsten beschrieben sind davon die Isoenzyme der Klasse I, da sie in viele zelluläre Prozesse integriert sind, sich durch extrazelluläre Stimuli aktivieren lassen und bei Fehlregulation zur Onkogenese beitragen.

Klasse	katalytische Untereinheit	regulatorische Untereinheit	Aktivierung	Produkte
Ia	p110 α	p85	RTK	PtdIns-3,4,5-P ₃
	p110 β		RAS	PtdIns-3,4,-P ₂
	p110 δ			PtdIns-3-P
Ib	p110 γ	p101	heterotrimere G-Proteine	PtdIns-3,4,5-P ₃ PtdIns-3,4,-P ₂ PtdIns-3-P
			II	PI3KC2 α PI3KC2 β
III	VSP34p			PtdIns-3-P

Tabelle 1: Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Familie

Die PI3K gehört zur Familie der Phospholipidkinasen und katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen (PtdIns) der Zellmembran (Wymann 1998). Die Synthese der Mono-, Di- und Triphosphate erfolgt durch Phosphorylierung der 3'OH-Position des Inositolrings. Die resultierenden PtdIns-Phosphate besitzen eine *second messenger* Funktion und können verschiedene Proteine, die an zellulären Prozessen wie der Transkription, Proliferation, Migration und Apoptose beteiligt sind, beeinflussen (Vanhaesebroeck 1999).

Eine Schlüsselfunktion des PI3K-Weges nimmt die Serin/Threoninkinase Akt ein. Akt, auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet, besitzt eine charakteristische Enzymstruktur, die sich aus einer zentralen katalytischen Domäne, einem C-terminalen hydrophoben Motiv und einer N-terminalen Pleckstrin-homologen Domäne (PH-Domäne) zusammensetzt. Die Aktivierung von Akt erfolgt durch Bindung von PtdIns-3,4,5-P₃ über die PH-Domäne und Phosphorylierung zweier Aminosäuren durch PDK1 (Thr308) und PDK2 (Ser473) (Vivanco 2002). Durch Regulation weiterer Zielmoleküle nimmt Akt Einfluss auf die Apoptose, den Zellzyklus, die Proliferation und den Glucosestoffwechsel. Der PI3K-Weg kann jedoch auch unabhängig von Akt Zielstrukturen wie z. B. die Proteinkinase C, die SGK (Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase) und kleine G-Proteine wie Rac-1 und Cdc-42 aktivieren (Vanhaesebroeck 2000).

Der PI3K/Akt-Weg ist ein antiapoptischer „Survival“ Signalweg, der ebenfalls in die Genregulation der zytoprotektiven HO-1 involviert sein kann. Ergänzend zum MAPK-Weg bildet er eine weitere wichtige Regulationseinheit, die für folgende HO-1-Induktoren essenziell ist: Häm, LPS, Nervenwachstumsfaktor, Carnosol, IL-10 und 15d-PGJ₂. (Nakaso 2003; Salinas 2003; Ricchetti 2004; Chung 2005).

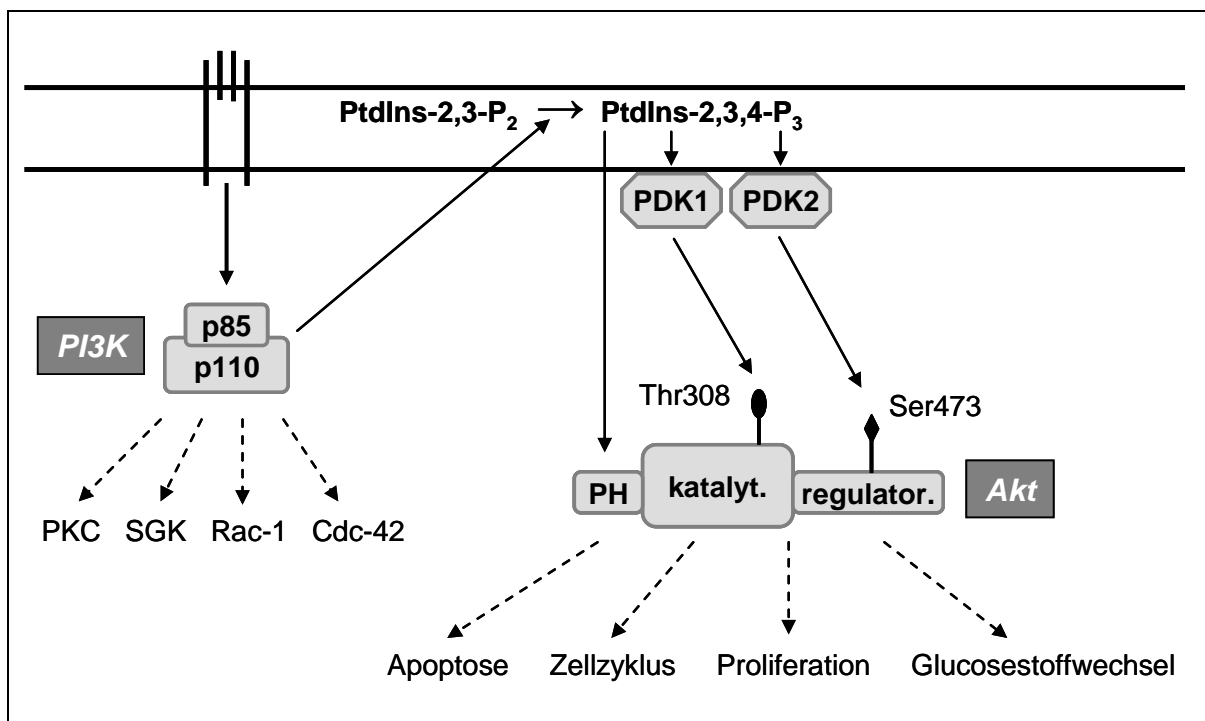


Abbildung 5: Schematische Übersicht des PI3K/Akt-Weges

Das Zusammenspiel zwischen PI3K/Akt- und MAPK-Signalweg, speziell der p38-MAPK scheint in der HO-1-Genregulation eine besondere Rolle einzunehmen. In Rattenphäochromozytomzellen (PC-12) konnte eine sowohl PI3K/Akt- als auch

p38-abhängige HO-1-Induktion durch Carnosol beobachtet werden (Martin 2004). Der chemische NADPH-Oxidase-Inhibitor AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzen-sulfonylfluorid) bewirkte ebenfalls eine PI3K-Aktivierung, die im Anschluss über p38 zur HO-1-Induktion führte (Wijayanti 2005). Auch der HO-1-Induktor 15d-PGJ₂ benötigte für die HO-1-Expression in humanen Lymphozyten beide Signalwege (Alvarez-Maqueda 2004).

1.2.4.3 Weitere Stoffwechselwege

Ergänzend zu MAPK und PI3K/Akt wurden weitere Proteinkinasen identifiziert, die in die HO-1-Regulation integriert sein können. Verschiedene Studien belegen eine Funktion der Proteinkinase A (cAMP-abhängige Kinase, PKA) und Proteinkinase G (cGMP-abhängige Kinase, PKG) an der HO-1-Genexpression. In Endothelzellen stimulierten oxidierte Phospholipide die HO-1 über PKA- und PKG-abhängige Signalwege (Kronke 2003). Die Beteiligung von PKA und PKG an der HO-1-Regulation konnte auch durch den Einsatz von cAMP bzw. cGMP bestätigt werden. Die Inkubation mit den cyclischen Nukleotiden und deren Analoga führte zu einer Induktion des HO-1-Enzyms in primären Leberzellen, Endothelzellen und Zellen der Nebennierenrinde (Immenschuh 2000; Polte 2000; Pomeraniec 2004). Weiterhin kann die zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen gehörende Proteinkinase C (PKC) Bestandteil der HO-1-Genexpression sein wie es z. B. bei den HO-1-Stimuli IL-1 α , TNF- α und des Phorbolesters TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) der Fall ist (Kurata 1990; Terry 1999). In Kardiomyozyten wurde die Hypoxie-induzierte HO-1-Expression ebenfalls über PKC vermittelt (Kacimi 2000).

Die Aktivierung der HO-1 kann weiterhin an redoxabhängige Signalwege gebunden sein. Das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System reguliert u. a. den Redoxstatus von Transkriptionsfaktoren wie Jun und Fos (Nikitovic 1998). Mithilfe von Hemmstoff- und siRNA-Versuchen konnte eine Beteiligung des Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase Systems an der HO-1-Expression durch LPS, IL-1 β und 15-HPETE (15-Hydroperoxyeicosatetraensäuren) nachgewiesen werden (Wiesel 2000; Trigona 2006).

1.2.4.4 Regulatorische Promotorelemente und Transkriptionsfaktoren

Für das HO-1-Gen konnten bislang vier regulatorische Abschnitte identifiziert werden, die sich aus dem Basalpromotor, einer proximalen und zwei distalen Enhancer-Regionen (E1, E2) zusammensetzen (siehe auch Abb. 7, Material und Methoden). 28 Basenpaare *upstream* vom Transkriptionsstart befindet sich die basale Promotorsequenz, an die sich der proximale Enhancer anschließt (Dennerly 2000). Die beiden distalen Enhancer sind bei -4 kb (E1) und -10 kb (E2) lokalisiert und stellen eine essenzielle Gensequenz für viele HO-1-Induktoren dar (Alam 1994; Inamdar 1996; Camhi 1998; Mrad 2012). Das HO-1-Gen verfügt innerhalb dieser vier Bereiche über verschiedene Regulationselemente, welche als Bindestellen für Transkriptionsfaktoren fungieren. Dominierendes Regulationselement ist das *Maf recognition element* (MARE), welches meist in mehreren Kopien vorliegt und auch als *stress response element* (StRE) oder *antioxidant response element* (ARE) bezeichnet wird (Ryter 2002). Transkriptionsfaktoren, die mit MARE reagieren, gehören hauptsächlich zur AP-1-Familie (Aktivatorprotein-1) und CNC-bZIP-Familie (Cap'n'Collar-basic leucine zipper). Die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie sind Dimere, welche durch

intra- oder interfamiliäre Assoziation aus Vertretern von Jun (c-Jun, JunB, Jun D) und Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra2) entstehen. Für verschiedene Stimuli, zu denen auch Arsenit, LPS, inflammatorische Zytokine und der Phorbolester TPA zählen, konnte eine AP-1-abhängige HO-1-Induktion nachgewiesen werden (Alam 1992; Camhi 1995; Terry 1998; Gong 2002). Die Aktivierung von Jun und Fos ist dabei meistens über den MAPK-Signalweg reguliert (Abb. 4) (Elbirt 1998; Kyriakis 2001; Weng 2003).

Zur Familie der CNC-bZip zählen die Transkriptionsfaktoren p45, Nrf-1, Nrf-2 und Bach-1. Im Gegensatz zur AP-1-Familie bilden sie keine intrafamiliären Dimere, sondern heterodimerisieren überwiegend mit kleinen Maf-Proteinen wie MafF, MafG und MafK (Motohashi 1997). Aus der CNC-bZip-Familie ist der Transkriptionsfaktor Nrf-2 am häufigsten an der HO-1-Transkription beteiligt und u. a. Bestandteil der HO-1-Induktion von Häm, Curcumin, Carnosol und Cadmiumchlorid (Huang 2000; Balogun 2003; Mrad 2012). Die Cadmium-abhängige HO-1-Induktion über Nrf-2 ist dabei an den p38-MAPK-Signalweg gebunden (Alam 2000). Die Transkriptionsfaktoren der CNC-bZip-Familie wirken jedoch nicht ausschließlich induzierend auf die HO-1. Bach-1, ebenfalls ein Transkriptionsfaktor der CNC-bZip-Familie, gilt als bislang einziger transkriptionaler Repressor des HO-1-Gens und liegt in aktivierter Form gebunden an die MARE-Region vor.

Weitere regulatorische Promotorelemente sind die im humanen -4 kb Enhancer-Bereich angeordneten Elemente *cadmium responsive element* (CdRE) und *cAMP responsive element* (CRE). CRE ist die Zielstruktur für den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP responsive element binding protein*), der vor allem bei der HO-1-Induktion durch oxidierte Phospholipide eine Rolle spielt. Die Aktivierung von CREB ist dabei an Signalwege der PKA, PKC und MAPK gebunden (Kronke 2003).

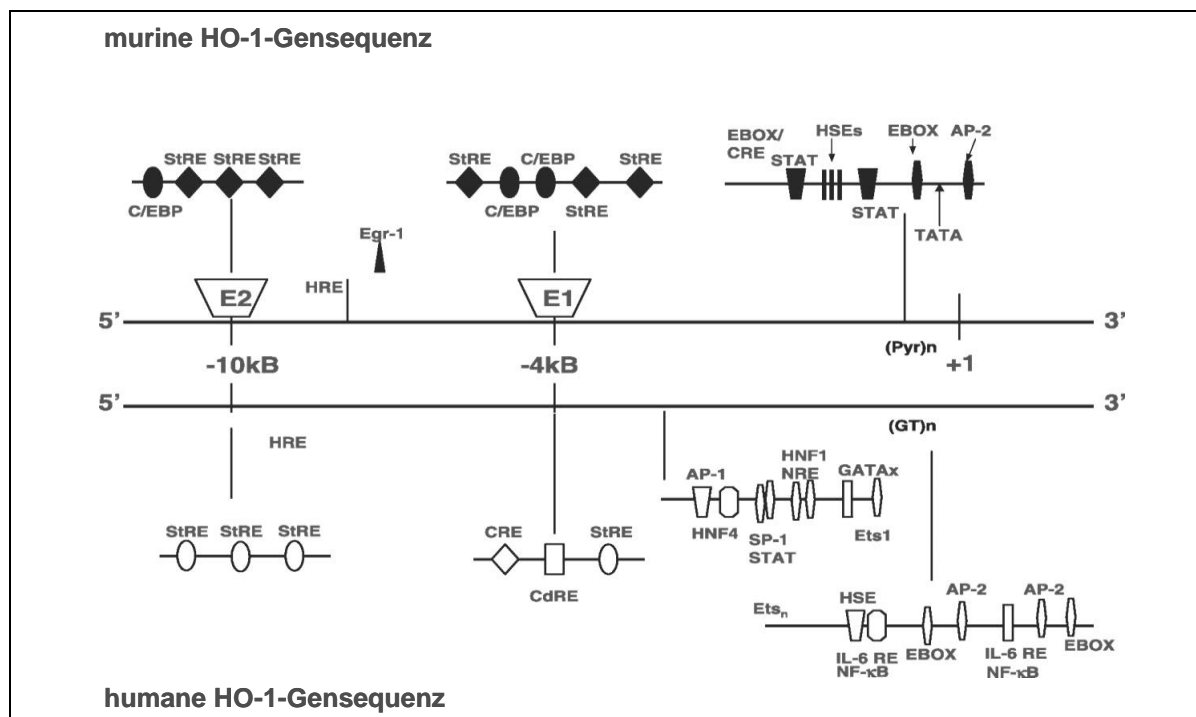


Abbildung 6: Regulatorische Domänen des murinen und humanen HO-1-Gens (Ryter 2002)

Schematische Darstellung der bekannten Regulationseinheiten innerhalb der -10 kb Promotorregion des Maus- und humanen HO-1-Gens. AP, Aktivatorprotein; CdRE, cadmium responsive element; C/EBP, CAAT/enhancer binding protein; CRE, cAMP responsive element; Egr1, early growth response factor-1; Ets1, ets binding site; GATAx, GATA binding proteins; (GT)_n, GT-rich repeat region; HNF1/4, hepatocyte nuclear factor 1/4; HRE, hypoxia responsive element; HSE, heat shock element; NF-κB, nuclear factor kappa-B; NRE, negative regulatory element; (Pyr)_n, pyrimidine-rich region; SP-1, specificity protein-1; STAT, signal transducer and activator of transcription; StRE, stress response element; TATA, TATA box; USF, upstream stimulatory factor

Eine ausschlaggebende Rolle für die Intensität der HO-1-Expression spielt die im proximalen Promotorbereich lokalisierte GT_(n)-reiche Domäne (~ -243/-198 bp). Eine geringe Anzahl an GT-Wiederholungen (< 25) ist mit einer verstärkten HO-1-Transkription verbunden. Als Konsequenz einer kurzen GT-Folge konnte ein geringeres Risiko gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen werden (Kaneda 2002; Dick 2005). Besonders bei Risikopatienten wie Diabetikern, Rauchern und adipösen Menschen verstärkt sich die Auswirkung des GT_(n)-Längen-Polymorphismus (Hsieh 2008). Auch die Gefahr einer angiographischen Restenose steigt bei längerer Dinukleotid-Sequenz an (Schillinger 2004; Hsieh 2008). Weiterhin wurde bei Transplantationspatienten mit langer GT_(n)-Sequenz eine verstärkte Organabstoßung beobachtet, die auf atherosklerotischen Veränderungen durch die verminderte HO-1-Produktion zurückgeführt wurde (Kronke 2007). Die Analyse der HO-1-Allelsequenz von Krebspatienten ergab ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (Magen-, Lungen-, orales Plattenepithelkarzinom) bei hoher Anzahl an GT-Wiederholungen im Genotyp (Chang 2004; Kikuchi 2005; Gelosa 2007). Als Ursache wird der verringerte Schutz vor oxidativer Schädigung durch die verminderte HO-1-Transkription diskutiert.

2 Aufgabenstellung

Statine gelten als hoch effektive Arzneistoffe zur Senkung des Cholesterolspiegels. Ihre Fähigkeit kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität zu reduzieren, führte zur Erweiterung des Indikationsbereiches, sodass sie zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse eingesetzt werden (Lim 2012). Interessanterweise ließ sich der beobachtete kardiovaskuläre Schutz jedoch nicht ausschließlich auf die Inhibition der Cholesterolsynthese zurückführen. Eine gleichintensive Reduktion des Plasmacholesterolspiegels durch andere cholesterolsenkende Arzneistoffe erbrachte nicht den erhofften Protektionseffekt (Takemoto 2001). Zusätzlich trat bei Patienten mit Statintherapie die vaskuläre Schutzwirkung früher als erwartet ein (Bellosta 2000). Als Konsequenz wurden pleiotrope Statineffekte vermutet, die ausschlaggebend an der kardiovaskulären Protektion beteiligt sein sollen. In der Literatur wird vor allem der endothelprotektive Charakter von Statinen beschrieben, der u. a. durch die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von NO und die antioxidativen Eigenschaften von Statinen vermittelt wird. (Mason 2003; Heeba 2009; Koh 2011).

Die HO ist ein zytoprotektiv wirkendes Enzym, welches an der Gewährleistung der Redoxhomöostase beteiligt ist. Durch ihre physiologische Funktion, bestehend aus dem katalytischen Abbau von Häm unter Freisetzung von Bilirubin und CO, besitzt die HO antiinflammatorische, antiapoptotische und antioxidative Eigenschaften (Ishikawa 2003; Son 2013). Das Enzym kommt in drei Isoformen vor, wovon die induzierbare Isoform HO-1 durch verschiedene exogene Stimuli reguliert werden kann.

Zielstellung der vorliegenden Dissertation war die Überprüfung, inwieweit eine Beeinflussung des HO-1-Stoffwechselweges zu den pleiotropen Effekten von Statinen gehört. Als Referenzsubstanz wurde das in Deutschland am häufigsten verordnete Statin, Simvastatin eingesetzt (Gerdemann 2008). Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen lag auf der Charakterisierung der Simvastatin-abhängigen HO-1-Induktion im Zellkultursystem einschließlich der dazugehörigen Signalwege. Im Anschluss galt es die gewonnenen Daten auf ihre *in vivo* Relevanz zu prüfen.

1. Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion

Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, ob die HO-1 prinzipiell eine Zielstruktur von Simvastatin in Endothelzellen darstellt. Die Untersuchung der Simvastatin-abhängigen HO-1-Induktion sollte mithilfe der Western-Blot-Methode auf translationaler und der Northern-Blot-Methode auf transkriptionaler Ebene erfolgen. Zusätzlich sollten Promotorstudien Aufschluss über die Transkriptionsaktivität des HO-1-Gens geben. Eine weitere Zielsetzung war die Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften von Simvastatin und die anschließende Analyse, ob diese in kausalem Zusammenhang mit der HO-1-Induktion stehen.

2. Mechanismen der HO-1-Genregulation

Als weiterer Schwerpunkt sollte der Mechanismus der Simvastatin-vermittelten HO-1-Induktion charakterisiert werden. In der Literatur sind verschiedene

Signalwege der HO-1 beschrieben, die je nach Stimuli variieren können. Ob die häufig beteiligten MAPK- und PI3K-Kaskaden oder die seltener integrierten PKA, PKC, PKG und THRX bei der Simvastatin-abhängigen HO-1-Induktion eine Rolle spielen, sollte mit Hemmstoffversuchen und einem Knockout-Modell untersucht werden (Immenschuh 2000; Ryter 2002). Ein weiteres Ziel war der Nachweis essenzieller HO-1-Promotorelemente durch den Einsatz von Deletionsmutanten. Obwohl die HO-1 ein hauptsächlich transkriptional reguliertes Enzym ist, werden vereinzelt auch post-transkriptionale Mechanismen beschrieben. Inwieweit mRNA-stabilisierende Prozesse die Simvastatin-abhängige HO-1-Induktion regulieren, sollte durch die Detektion des mRNA-Abbaus in Gegenwart eines Transkriptionshemmers ermittelt werden. Sofern post-transkriptionale Signalwege an der HO-1-Induktion beteiligt sind, sollten diese anschließend mithilfe von Hemmstoffen analysiert werden.

3. Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion *in vivo*

Die Relevanz der gewonnenen Daten sollte nachfolgend durch *in vivo* Testungen an einem Mausmodell überprüft werden. Hierfür sollte die HO-1-Promotoraktivität transgener Mäuse nach einer Bolusdosis von Simvastatin bestimmt werden. Inwieweit die Aktivität der HO-1-Promotorregion mit dem organspezifischen Gehalt an HO-1-mRNA korreliert, galt es im Anschluss mithilfe *real time* RT-PCR zu ermitteln. Darüber hinaus sollten Aussagen über die Enzymaktivität einzelner Organe anhand gaschromatographischer Detektion des HO-Reaktionsproduktes CO getroffen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Für die Untersuchungen am Zellmodell wurden drei humane und zwei murine Zelllinien verwendet. Humanen Ursprungs waren die Primärzellen HUVEC (human umbelical vein endothelial cells) sowie die aus Nabelschnurvenen gewonnenen, immortalisierten Endothelzelllinien ECV304 (ECACC 92091712) und EA.hy926. Letztere wurden freundlicherweise von Dr. Cora-Jean S. Edgell (Departement of Pathology and Laboratory Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA) zur Verfügung gestellt. Die tierischen Zelllinien NIH3T3 und MEF (mouse embrionic fibroblasts) sind von Mäuseembryonen abstammende Fibroblastenzelllinien.

Die Dauerkulturen der einzelnen Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kultivierung erfolgte in den jeweiligen Zellkulturmedien (Tab. 2) unter Zusatz von fetalem Rinderserum (FBS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte in einem Inkubator. Die Medien wurden zweimal pro Woche gewechselt.

Zusätzlich wurden genetisch veränderte Zellkulturen eingesetzt. Die verwendeten NIH3T3-Zellen sind stabil mit einem HO-1-Luc-Reportergenkonstrukt transfiziert. Das Transgen enthält die 15 kb der 5'-flankierenden Region des murinen HO-1-Gens gekoppelt an die Codierungssequenz des *firefly*-Luciferase-Gens (Hajdena-Dawson 2003). Die komplett enthaltene Promotorregion setzt sich aus dem Basalpromotor sowie zwei distalen und einem proximalen Enhancer zusammen (Abb. 7). Die HO-1-Luciferase-NIH3T3-Zellen (HO-1-Luc-NIH3T3) wurden freundlicherweise von Dr. Christopher H. Contag (Stanford University, Stanford, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

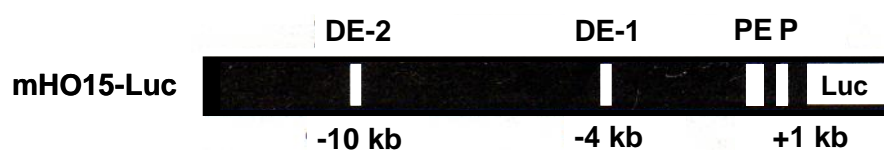


Abbildung 7: HO-1-Genkonstrukt in stabil transfizierten HO-1-Luc-NIH3T3-Zellen (Hajdena-Dawson 2003)

Schematische Darstellung des HO-1-Luc-Expressionsvektors, bestehend aus 15 kb 5'-regulatorischer Domäne des murinen HO-1-Gens gekoppelt an die codierende Sequenz des Luciferase-Reportergens. P, Basalpromotor; PE, proximaler Enhancer; DE-1, distaler Enhancer-1; DE-2, distaler Enhancer-2, Luc, Gensequenz der *firefly*-Luciferase

P38-defiziente MEF-Zellen, in denen die Isoform p38alpha dominant negativ (p38 α -MEF^{-/-}) vorlag, wurden freundlicherweise von PD Dr. Stephan Immenschuh (Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Für ein optimales Wachstum wurden dem Medium nicht essenzielle Aminosäuren (1 %) und Mercaptoethanol (0,05 %) zugesetzt.

Spezies	Zelllinie	Passage	Medium	FBS (%)
Mensch	HUVEC	1	DMEM	20
	Ea.hy926	63-81	DMEM+Glucose	10
	ECV304	3-16	Medium 199	10
Maus	HO-1-Luc-NIH3T3	63-74	DMEM+Glucose	10
	p38 MEF ^{+/+} ^{-/-}	3-7	DMEM	10

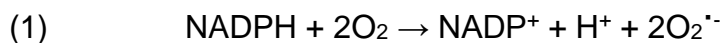
Tabelle 2: Passagedauer und Zellkulturmedien der verwendeten Zelllinien

3.2 Transgene HO-1-Luciferase-Mäuse

Weibliche, transgene FVB-Mäuse, welche als Expressionsvektor die *upstream* 5`-regulatorische HO-1-Gensequenz von 15 kb, gekoppelt an das *firefly*-Luciferase-Reportergen enthalten, wurden von dem *Stanford Transgenic Animal Facility Center* (Stanford University, Stanford, CA, USA) bezogen (Sparrow 2001). Die Haltung der Tiere erfolgte im *Department of Comparative Medicine* (Stanford University, CA, USA) unter Berücksichtigung des *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Council 1996). Die Durchführung der Tierversuche wurde vom *Institutional Animal Care and Use Committee* (Stanford University, Stanford, CA, USA) zugelassen. Nahrung und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Das Gewicht der sechs bis acht Wochen alten Mäuse lag zwischen 18,2 und 25,8 g.

3.3 Modell für oxidativen Stress

Durch Inkubation von Zellen mit NADPH wird die membranständige NADPH-abhängige Oxidase stimuliert Superoxidradikale zu bilden (1) (Griendling 2000; Guzik 2000).



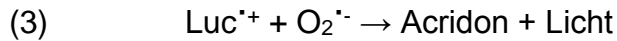
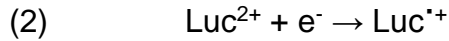
Die intrazelluläre und extrazelluläre Konzentration an Superoxidradikalen kann mithilfe von Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz am Luminometer gemessen werden (Tarpey 1999; Habeos 2008) und dient als Maßstab für die Charakterisierung der antioxidativen Effekte einer Substanz.

3.3.1 Inkubationsprotokoll

Für die Messung wurden Ea.hy926-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (wells) bis zur Konfluenz kultiviert. Das serumhaltige Medium wurde 24 Stunden vor der Inkubation gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Die Bestimmung der genomischen Effekte erfolgte nach einer 24stündigen Inkubationszeit mit verschiedenen Konzentrationen an Simvastatin. Für die Überprüfung eines möglichen HO-1-abhängigen Protektionseffektes durch Simvastatin wurden die Zellen 15 Minuten mit dem HO-1-Hemmstoff Chrom-Mesoporphyrin IX (CrMP) vorinkubiert. Zur Ernte wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und kurz mit Trypsin/EDTA versetzt. Durch Spülen mit PBS wurden die Zellen von den Zellkulturplatten gelöst und anschließend mit 100 µM NADPH und 50 µM Lucigenin für 15 Minuten inkubiert.

3.3.2 Bestimmung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz

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



Das Lucigenin-Kation (Luc^{2+}) nimmt zunächst ein Elektron auf und wird zum Radikal reduziert ($\text{Luc}^{\cdot+}$) (2). Dieses reagiert mit dem Superoxidradikal zu einem instabilen Dioxethan-Intermediat. Bei dessen Zerfall entsteht ein angeregtes Acridon, welches beim Rückfall in den Ruhezustand Licht emittiert (3) (Vasquez-Vivar 1997; Tarpey 1999). Die Photonen wurden mithilfe eines Photomultipliers ermittelt und als relative Lichteinheiten (RLU = relative light units) angegeben. Als Detektionsgerät wurde das Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold, Bad Wildbad) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

3.4 Western-Blot-Analyse

Das Western-Blot-Verfahren ist eine immunochemische Detektionsmethode für Proteine (Towbin 1979). Dazu wurden die Zellen nach der Inkubation lysiert, nach Bradford quantifiziert und das Gesamtprotein mittels denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli 1970). Anschließend folgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran durch das Blotting-Verfahren. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper unter Verwendung eines Chemilumineszenz-Systems eingesetzt.

3.4.1 Inkubationsprotokoll

HUVEC- und ECV304-Zellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Nüchternphase mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit Simvastatin über die jeweils angegebenen Zeiträume. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet und in PMSF-haltigem Lysispuffer resuspendiert. Als Positivkontrolle für den Nachweis des HO-1-Proteins wurde Cadmiumchlorid (10 μM , 24 Stunden) verwendet. Anisomycin (100 μM , 30 Minuten) diente bei der Phospho-MAPK-Detektion als Positivkontrolle.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mithilfe eines Kits der Firma Roth (Roti-Quant, Karlsruhe) durchgeführt. Der Nachweis erfolgt photometrisch ($\lambda=595 \text{ nm}$) über eine Komplexbildung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau. Der Proteingehalt wurde anschließend mithilfe einer Kalibriergeraden bestimmt, die sich aus den Absorptionswerten der Standardproben von Rinderserumalbumin (12,5-200 $\mu\text{g/ml}$) zusammensetzt.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein eindimensionales Trennverfahren, welches die Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße auftrennt. Das im Überschuss zugesetzte SDS wird in Abhängigkeit von dem Molekulargewicht des Proteins gebunden. Dadurch hängt die Laufgeschwindigkeit des SDS-Protein-Komplexes in der Gelmatrix ausschließlich von dem Molekulargewicht des Proteins ab.

Das Proteingemisch wurde mit 5-fach konzentriertem Ladepuffer und 2,5 M Dithiotreitol (DTT) versetzt und anschließend bei 95° C über zehn Minuten denaturiert. In Abhängigkeit des nachzuweisenden Proteins wurden folgende Proteinmengen aufgetragen: 100 µg Protein für HO-1, 40 µg Protein für Phospho- und Pan-MAPK. Bei der verwendeten Methode nach Lämmli (Laemmli 1970) werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid konzentriert und anschließend im 15 %igen Trenngel separiert. Die vertikalen Minigel-Elektrophoresekammern der Firma Biometra (Göttingen) wurden hierfür mit Laufpuffer gefüllt. Für die Kontrolle des Molekulargewichts wurde ein Marker (Peqlab, Erlangen) bestehend aus einem farbigen Proteingemisch mit definiertem Molekulargewicht verwendet.

3.4.4 Proteintransfer durch Western-Blot

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte nach dem Tank-Blot-Verfahren. In einem vertikalen Puffertank (Eigenbau) wurden die Proteine bei 80 mA und 4° C über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-ECL; GE Healthcare, Freiburg) übertragen. Die Transfereffizienz wurde anhand des gefärbten Molekulargewichtsmarker überprüft. Die Beladung der Gele wurde mit Hilfe der Coomassie-Brilliantblau-Färbung kontrolliert (Sambrook 1989) und fotografiert (Eagle Eye II, Stratagene, Heidelberg).

3.4.5 Immunodetektion

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung inkubiert. Der HO-1-Antikörper wurde von der Firma Axxora (Grünberg) bezogen. Die für die Detektion der Phospho-MAPK und -Akt sowie Pan-MAPK und -Akt verwendeten Antikörper stammten von Cell Signaling (New England Biolabs, Frankfurt). Die Verdünnung der Antikörper (Tab. 3) sowie der Inkubationsablauf (Tab. 4) erfolgten nach den Herstellerangaben.

	HO-1	Phospho-MAPK, Pan-MAPK, Phospho-Akt, Pan-Akt
Primärantikörper	1:1000 in 25 % Blockierungslösung 65 % Tris/Tween 10 % BSA (0,1 mg/ml)	1:2000 in 95 % Tris/Tween 5 % BSA (0,05 mg/ml)
Sekundärantikörper	1:5000 in 100 % Blockierungslösung	1:2000 in 100 % Blockierungslösung

Tabelle 3: Antikörperlösungen

	HO-1	Phospho-MAPK, Pan-MAPK, Phospho-Akt, Pan-Akt
Waschschritt	1x5 min Tris/Tween-Puffer	3x5 min Tris/Tween-Puffer
Primärantikörper	2 h; RT	über Nacht bei 4° C
Waschschritte	2x5 min Blockierungslösung	3x5 min Tris/Tween-Puffer
Sekundärantikörper	1:5000; 30 min; RT	1:2000; 1 h; RT
Waschschritte	2x5 min Blockierungslösung 2x10 min Tris/Tween-Puffer	3x5 min Tris/Tween-Puffer

Tabelle 4: Inkubationsprotokoll der verwendeten Antikörper

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

3.5 mRNA-Bestimmung mittels Northern-Blot-Analyse

Das Northern-Blot-Verfahren ist eine molekularbiologische Methode, die dem qualitativen als auch quantitativen Nachweis von RNA dient (Alwine 1977). Die aus dem Probenmaterial isolierte RNA wird zunächst durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden die RNA-Moleküle aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägerschicht (z. B. Nylonmembran) übertragen und durch Hitze fixiert. Der Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen erfolgt durch Hybridisierung mit geeigneten, markierten Sonden. Als Sonden wurden Fragmente der kodierenden Regionen des HO-1- und des β -Aktin-Gens eingesetzt. Diese lagen als Plasmid-DNA in *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5- α -Kulturen vor.

3.5.1 Gewinnung der Sonden-DNA

Die transformierte *E. coli* DH5- α -Dauerkultur wurde zunächst auf LB-Ampicillin-Agarplatten (100 μ g/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37° C aufbewahrt. Die verwendeten Plasmide enthielten alle ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Mit den über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien wurden 50 ml Hauptkultur (LB-Medium, 100 μ g/ml Ampicillin) angeimpft. Nach ca. 10-12 Stunden bei 37° C und 80 rpm im Schüttelinkubator erfolgte eine Zugabe von Chloramphenicol (170 μ g/ml), um die Replikationseffizienz zu erhöhen. Die Ernte der Bakterien erfolgte am nächsten Tag durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4° C. Die Pellets wurden entweder bei -20° C gelagert oder sofort aufgeschlossen.

Die Plasmidisolierung erfolgte mithilfe des Plasmid-Midi-Isolations-Kits der Firma Qiagen (Hilden). Dieses System basiert auf einer modifizierten alkalischen Zellyse (Birnboim 1979), gefolgt von einer spezifischen DNA-Bindung an eine

Anionenaustauschersäule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. Die Isolation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Die Spaltung in die benötigten DNA-Fragmente erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Tab. 5). Die DNA-Sonde für die Detektion der HO-1-RNA wurde über die EcoR I-Schnittstellen isoliert und ist ein Restriktionsfragment der HO-1 cDNA (Klon 2/10), welches ursprünglich von Dr. Rex Tyrrell (School of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath, Bath, UK) zur Verfügung gestellt wurde. Für die Plasmidspaltung des kommerziell bezogenen β -Aktinfragments (Firma Boehringer, Mannheim) wurden die Endonukleasen Nco I und Pst I verwendet. Der Restriktionsansatz wurde gemäß Produktinformationen über zwei Stunden bei 37° C inkubiert (Roche, Mannheim).

Gensonde	Größe	Restriktionsenzym
HO-1 (human)	1000 bp	EcoR I
β -Aktin (human)	450 bp	Nco I, Pst I

Tabelle 5: Gensonden

Die Sonden-DNA wurde nach dem Restriktionsverdau elektrophoretisch in einem 0,8 %igen TAE-Agarosegel (60 mV) über Nacht der Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA enthielt das Gel den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25 μ g/ml. Für die Identifikation der spezifischen DNA-Fragmente im Gel wurde ein DNA-Standard (Invitrogen, Karlsruhe) definierter Größe eingesetzt. Mithilfe von UV-Licht wurden die DNA-Banden detektiert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Für die Isolierung der DNA aus den Gelbanden wurde der Gel-Extraction-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und die Extraktion nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte am UV-Spektrometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 260 nm.

3.5.2 Inkubationsprotokoll

ECV304-Zellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24-stündigen Nüchternphase mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit Simvastatin über die jeweils angegebenen Zeiträume. Für Hemmstoffexperimente wurden die Zellen für 20 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorbehandelt. Danach wurde die Inkubation mit Simvastatin für acht Stunden fortgesetzt. Der HO-1-Induktor Cadmiumchlorid (10 μ M, acht Stunden) diente als Positivkontrolle. Für die Versuche zur RNA-Stabilität wurden die Zellen für sechs Stunden mit Simvastatin (100 μ M) vorinkubiert, um die Bildung von HO-1-mRNA anzuregen. Anschließend wurden das Medium entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gespült und frisches Medium ohne Serum zugegeben. Nach einer 25-minütigen Vorbehandlung mit dem Transkriptionshemmstoff Aktinomycin D (AD 1 μ g/ml) wurde die Inkubation mit Simvastatin (100 μ M) für zwei bis sechs Stunden fortgesetzt. Die Applikation von Hemmstoffen erfolgte zeitgleich mit AD.

Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA geerntet, in kaltem PBS resuspendiert und bei 7000 rpm für zehn Minuten bei 4° C zentrifugiert. Die Pellets wurden im Anschluss bei -80° C aufbewahrt.

3.5.3 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den Pellets wurde nach der Single-Step-Methode (Chomczynski 1987) mithilfe des peqGOLD TriFast-Reagenz (Peqlab, Erlangen) isoliert und erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Das gebrauchsfertige Reagenz besteht aus einer einphasigen Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung, welche das Zellpellet lysiert ohne die RNA zu spalten. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten wurden die Ansätze für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennte sich die Lösung in drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose, wässrige Phase und eine dazwischen liegende Interphase. Die sich in der wässrigen Phase befindende RNA wurde in einem neuen Eppendorfgefäß durch Isopropanol gefällt. Nach verschiedenen Zentrifugations- und Reinigungsschritten wurde die isolierte Menge an Gesamt-RNA in DEPC-Wasser (20-35 µl) aufgenommen. Die Proben wurden vor der Quantifizierung mindestens für eine Stunde bei -80° C aufbewahrt.

3.5.4 RNA-Quantifizierung und -Gelelektrophorese

Der Gesamtgehalt an RNA wurde mit einem UV-Spektrometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 260 nm bestimmt. Anschließend wurden je 25 µg RNA mit 4-fach konzentriertem Ladepuffer versetzt und zehn Minuten bei 60° C denaturiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 1 %igen Formaldehyd-Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen bei 16 V über Nacht (Rave 1979).

3.5.5 RNA-Transfer durch Northern-Blot

Mit der Methode des Northern-Blots kann RNA aus einem Agarosegel über Vakuum-verstärkte Diffusion auf eine Nylonmembran transferiert werden. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst fotografiert (Eagle Eye II, Stratagene, Heidelberg). Anschließend folgten Waschschriffe mit in DEPC-Wasser gelöstem NaOH (0,05 N), reinem DEPC-Wasser und konzentriertem Transferpuffer (20x SSC). Mithilfe eines Vakuum-Blotters (Biometra, Göttingen) erfolgte der 90-minütige Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺; GE Healthcare, Freiburg). Die Fixierung der RNA-Basen auf die Nylonmembran erfolgte in einem Inkubator (80° C, 30 Minuten).

3.5.6 Markierung der Sonden mit ³²P-Desoxycytidintriphosphat

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

Die als Sonde verwendete doppelsträngige DNA (45 ng) wurde zunächst für fünf Minuten bei 95° C denaturiert und anschließend mit dem Reaktionsgemisch versetzt. Sobald sich ein Hexanukleotid aus dem Reaktionsgemisch als Primer an den DNA-Strang binden kann, wird der komplementäre Strang durch das Klenow-

Fragment der DNA-Polymerase synthetisiert. Durch Zugabe von ^{32}P -Desoxycytidintriphosphat (^{32}P -dCTP, Hartmann Analytic, Braunschweig) und einer Mischung der übrigen Nukleotide wurde der komplementäre DNA-Strang als radioaktiv markierte Sonde synthetisiert.

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

3.5.7 Hybridisierung

Die Membranen wurden zunächst über zwei Stunden bei 65°C mit $100\ \mu\text{g/ml}$ Fisch-DNA enthaltender Hybridisierungslösung vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen der Sonde zu minimieren. Anschließend wurde die Haupthybridisierung über 24 Stunden bei 65°C mit der jeweiligen Sonde in Hybridisierungslösung durchgeführt. Danach wurden ungebundene Nukleotidreste durch Waschschriffe mit SSC (2x15 Minuten 2xSSC bei RT; 2x15 Minuten $0,5\times\text{SSC}$ bei 65°C) von der Membran entfernt.

3.5.8 Autoradiographische Detektion

Die Detektion der radioaktiven Strahlung erfolgte über einen Autoradiographiefilm (Kodak BioMax MS Film; Sigma, Taufkirchen), der über mindestens 24 Stunden mit einem sogenannten Hyperscreen bei -80°C exponiert wurde. Dieser Schirm absorbiert die Strahlung starker β -Strahler und gibt sie in Form von Licht wieder ab, welches den Film schwärzt. Die densitometrische Auswertung wurde mithilfe des Programms Quantity One Basic (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durchgeführt.

3.6 mRNA-Bestimmung mittels *real-time* RT-PCR

Die Methode der PCR (*polymerase chain reaction*) dient der Vermehrung von definierten Nukleotidsequenzen durch thermostabile DNA-Polymerasen. Im Anschluss können die amplifizierten DNA-Sequenzen durch Fluoreszenzreaktion quantifiziert werden. Für die organspezifische Detektion des HO-1-mRNA-Gehalts von HO-1-Luc-Mäusen wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt, bei der die cDNA-Synthese und *real-time* PCR in einem Schritt ablief (*One-Step* RT-PCR). Die einzelnen Schritte der *real-time* RT-PCR wurden durch einen Thermozykler (Mx3005P QPCR System, Stratagene, La Jolla, CA, USA) geregelt.

3.6.1 Orale Applikation

Die Einteilung der HO-1-Luc-Mäuse in Simvastatin- und Vehikel-behandelte Kontrollgruppen erfolgte randomisiert. Es wurde einmalig eine Simvastatindosis von $100\ \text{mg/kg}$ KG oder das Vehikel (1:66,6 Tween20 in isotonischer NaCl-Lösung) peroral appliziert. Das Volumen betrug maximal $260\ \mu\text{l}$ und wurde durch eine $1,0\ \text{ml}$ -Spritze mit stumpfer Kanüle verabreicht. Die Inkubationszeit betrug sechs Stunden.

3.6.2 Gewebeaufbereitung

Nach dem Tod der Mäuse wurden Gehirn, Leber, Herz, Lunge, Milz und Nieren entnommen. Die Organe wurden mit kaltem KPO_4^{2-} -Puffer gespült und 100 mg des Gewebes sofort in RNAlater-gefüllte (Qiagen, Valencia, CA, USA) Eppendorfgefäße gelegt. Die Proben wurden über Nacht bei 4° C aufbewahrt bevor sie am darauf folgenden Tag dauerhaft bei -20° C gelagert wurden.

3.6.3 RNA-Isolation

Die RNA-Gesamtmenge des Gewebes wurde mithilfe des *RNAeasy Plus Mini Kits* (Qiagen, Valencia, CA, USA) isoliert. Nach dem Auftauen der Proben wurden 20-30 mg des Gewebes zerkleinert und in 600 μl β -Mercaptoethanol-haltigem RLT-Puffer aufgenommen. Für die Homogenisierung wurde ein Ultraschallprozessor (XL2000, Misonics, Farmingdale, NY, USA) verwendet. Die im Anschluss folgenden Trennungs- und Reinigungsschritte wurden exakt nach dem Handbuch der Firma Qiagen durchgeführt. Die isolierte RNA-Menge wurde zum Schluss mit 30 μl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.6.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Gesamt-RNA wurde am UV-Spektrometer durch Absorptionsmessung ($\lambda=260$ nm) bestimmt. Die Reinheit der Proben wurde anhand des Quotienten aus der optischen Dichte bei 260 und 280 nm überprüft und war stets größer als 1,6.

3.6.5 cDNA-Synthese

Für die Amplifikation von RNA wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) benötigt, welche die RNA-Sequenz zunächst in cDNA (complementary DNA) umschreibt. Die Reverse Transkriptase ist namensgebend für die RT-PCR. Das 3'-Poly(A)-Segment der mRNA dient dabei als Hybridisierungspartner für ein Oligo-(dT)-Fragment, an dessen 3'-Ende die reverse Transkriptase starten kann. Es entsteht ein doppelsträngiger mRNA-DNA-Hybrid. Die cDNA-Synthese lief bei einer Temperatur von 50° C über 30 Minuten im Thermozykler ab (Tab. 7).

3.6.6 PCR

Direkt nach der cDNA-Synthese folgte die PCR bestehend aus den Teilschritten Denaturierung, Annealing und Elongation. Durch die anfängliche Denaturierung liegen die Nukleotidsequenzen als Einzelstränge vor. Die zu amplifizierende Zielsequenz wird durch zwei spezifische Oligonukleotide, sogenannten *sense (forward)* und *antisense (reverse)* Primer (Tab. 6) begrenzt. Bei diesem als Annealing bezeichneten Vorgang lagert sich einer der Primer an den einen Strang, der andere an den komplementären Strang der DNA-Matrize an. Im Anschluss folgt die Elongation (DNA-Synthese). Die zu verlängernden 3'-Enden der Primer sind aufeinander zuorientiert, sodass die DNA-Synthese zusammenführend verläuft. Durch den Einsatz der thermostabilen Taq-Polymerase konnte diese Methode vollautomatisiert werden (Mullis 1987). Die neu synthetisierte DNA wird

als Matrize für weitere Amplifikationszyklen verwendet, wodurch eine exponentielle Vermehrung der DNA-Sequenz stattfindet.

	sense Primer (forward)	antisense Primer (reverse)
HO-1	5'-CCT-TCC-CGA-ACA-TCG-ACA-GCC-3'	5'-GCA-GCT-CCT-CAA-ACA-GCT-CAA-3'
β-Aktin	5'-AAG-GAG-ATT-ACT-GCT-CTG-GCT-CCT-A-3'	5'-ACT-CAT-CGT-ACT-CCT-GCT-TGC-TGA-T-3'

Tabelle 6: Primersequenzen

Die verwendeten Primer wurden freundlicherweise von Dr. Stacy Burns-Guydish und Dr. Hui Zhao (Department of Pediatrics, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

Die *One-Step* RT-PCR wurde in einer *MicroAmp* optischen 96-well-Platte unter Gebrauch des *QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kits* (Qiagen, Valencia, CA) durchgeführt. Die Verdünnung der Proben und des HO-1-mRNA-Standards wurden so gewählt, dass ein Volumen von 4 µl 40 ng Template-RNA entsprachen. Der HO-1-mRNA-Standard wurde freundlicherweise von Dr. Hui Zhao (Department of Pediatrics, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle wurden 4 µl RNase-freies Wasser verwendet. Das Gesamtvolumen betrug 25 µl pro well. Der Reaktionsansatz (Tab. 8) wurde gemäß Tabelle 7 im Thermozykler inkubiert.

	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Reverse Transkription	cDNA-Synthese	50° C	30 min	1
PCR	initiale Denaturierung	95° C	15 min	1
	Denaturierung	95° C	15 sek	40
	Annealing	60° C	30 sek	
	Elongation	72° C	30 sek	

Tabelle 7: Thermozyklus der cDNA-Synthese und der Amplifikation

Reagenzien	Volumen (µl)/well	Endkonzentration
<i>2xQuantiTectSYBRGreen</i>	12,5	1x
sense Primer	2,5	0,6 µM
antisense Primer	2,5	0,6 µM
QuantiTect RT Mix	0,25	0,25 µl/Reaktion
RNase-freies Wasser	3,25	-
Template-RNA	4,0	40 ng/Reaktion

Tabelle 8: Reaktionsansatz der real-time RT-PCR

3.6.7 Quantifizierung

Die gleichzeitige Quantifizierung der DNA-Menge während der PCR-Zyklen wird als *real-time* PCR bezeichnet. Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* bindet an doppelsträngige DNA-Moleküle, wodurch es zu einer detektierbaren Fluoreszenzbildung kommt. Somit ist die Fluoreszenzemission proportional zu der gebildeten Menge an PCR-Produkten. Ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff *ROX* diene als interne Kontrolle. Die Fluoreszenzemission von *ROX* ist unabhängig von

der PCR-Reaktion, wodurch mögliche *SYBR Green I*-Schwankungen korrigiert werden können. Der organspezifische Gehalt an HO-1-mRNA wurde anhand der Kalibriergeraden des HO-1-mRNA-Standards (Kopie/ μg RNA) kalkuliert, gegen β -Aktin abgeglichen und als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. Alle Proben wurden 3-fach bestimmt.

3.7 Bestimmung der Hämoxxygenase-Aktivität

Die Messung der totalen Hämoxxygenase-Aktivität (HO-Aktivität) kann durch den quantitativen Nachweis eines der Reaktionsprodukte erfolgen. In diesem Fall wurde die CO-Produktion des Gewebes gaschromatographisch bestimmt. Die Menge an nachgewiesenem CO korreliert mit der enzymatischen Aktivität der HO. CO kann auch auf anderem Weg z. B. durch Fotooxidation organischer Verbindungen entstehen, weshalb alle Versuchsschritte möglichst unter Ausschluss von Licht durchgeführt wurden. Die HO-Aktivität ergab sich letztendlich aus der Differenz des Gesamtbetrages an gemessenem CO zu der Menge an nicht durch HO gebildetes CO.

3.7.1 Orale Applikation

Die Einteilung der HO-1-Luc-Mäuse in Simvastatin- und Vehikel-behandelte Kontrollgruppen erfolgte randomisiert. Es wurde einmalig eine Simvastatindosis von 100 mg/kg KG oder das Vehikel (1:66,6 Tween20 in isotonischer NaCl-Lösung) peroral appliziert. Das Volumen betrug maximal 260 μl und wurde durch eine 1,0 ml-Spritze mit stumpfer Kanüle verabreicht. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden.

3.7.2 Gewebeaufbereitung

Nach dem Tod der Mäuse wurden Gehirn, Leber, Herz, Lunge, Milz und Nieren entnommen. Die Messung der HO-Aktivität erforderte 100-150 mg Gewebe, welches mit kaltem KPO_4^{2-} -Puffer gespült wurde. Die Gewebeproben wurden zerkleinert und im Anschluss mit einem Ultraschallprozessor (Modell XL2000, Misonics, Farmingdale, NY, USA) im Eisbad homogenisiert. Vorversuche ergaben ein Optimum der Zellzerstörung unter gleichzeitiger Schonung des HO-Enzyms bei einer Prozessorintensität von 50 %. Die durch Ultraschall gewonnenen Homogenisate wurden auf Eis gestellt und innerhalb einer Stunde vermessen.

3.7.3 Enzymreaktion

Als Substrat wurde das stabilere Methämalbumin anstelle von Häm eingesetzt. Der in 2 ml-Braunglasfläschchen (Vials) pipettierte Reaktionsansatz setzte sich aus Gewebehomogenisat, Methämalbumin und NADPH zusammen (Tab. 9). Die Detektion von basalem, bereits vorhandenem CO erfolgte durch den Austausch des Substrates NADPH gegen inerten 0,1 M KPO_4^{2-} -Puffer (20 μl). Pro Versuchstier und Gewebe wurde der Gesamt-CO-Gehalt 3-fach und der basale, nicht durch HO gebildete CO-Gehalt 2-fach bestimmt.

Reagenzien	Volumen/Fläschchen	Einsatzkonzentration
Gewebehomogenisat	20 μ l	0,1 mg Gewebe/ μ l
Methämalbumin	20 μ l	150 μ M
NADPH	20 μ l	4,5 μ M

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die Bestimmung der HO-Aktivität

Die verschlossenen Vials wurden für fünf Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert und für zwei Sekunden mit CO-freier Luft bei einer Flussrate von 200-300 ml/Minute gespült, um bereits vorhandenes CO zu entfernen. Die CO-freie Luft entstand mithilfe eines Hopcalite-Katalysators (CuO/MnO) bei 120° C und wurde über ein Zwei-Kanülensystem (Abb. 8) durch den Gummistopfen in das Reaktionsgefäß transportiert. Beim Entfernen des Zwei-Kanülensystems wurde über die längere Nadel der Druck im Vial automatisch an den Atmosphärendruck angeglichen.

Die Enzymreaktion lief im Dunkeln bei 37° C im Wasserbad ab und endete nach 15 Minuten durch den Zusatz von 30 %iger (m/V) Sulfosalicylsäure (5 μ l/Vial).

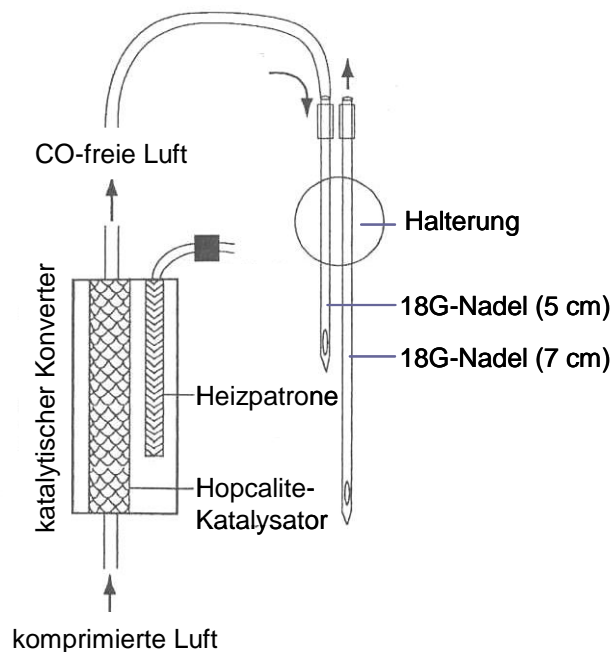


Abbildung 8: Zwei-Kanülensystem für das Entfernen von vorhandenem CO (Appleton 1999)

3.7.4 Gaschromatographische CO-Detektion

Nach Ablauf der Enzymreaktion wurden die Proben auf Eis gelagert und die gebildete CO-Menge gaschromatographisch bestimmt (Vreman 1988). Vor jeder Messung wurde eine Kalibriergerade über einen Bereich von 24 bis 120 pmol (entspricht 50 bis 250 μ l) Standardgas erstellt. Das Standardgas wurde unmittelbar vor der Messung aus 20 μ l reinem CO (99,9 % Matheson Gas Products, Montgomeryville, Pennsylvania, USA) und 1000 μ l CO-freier, synthetischer Luft in einer Hamilton-Spritze hergestellt. Die chromatographische Trennung erfolgte in einer Edelstahlsäule mit integriertem Molekularsieb (40-60

mesh, Alltec Associates, Deerfield, IL, USA) bei 140° C. Die Vials waren über ein Zwei-Kanülensystem mit der Gaschromatographie verbunden. Die Kanülensysteme für das Entfernen von vorhandenem CO und für die gaschromatographische Detektion unterschieden sich nur in der Strömungsrichtung der jeweiligen Gase (Abb. 9). Als Trägergas wurde synthetische Luft mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 ml/Minute und einer Injektionszeit von 15 Sekunden eingesetzt. Die Elutionszeit für CO betrug 90 Sekunden.

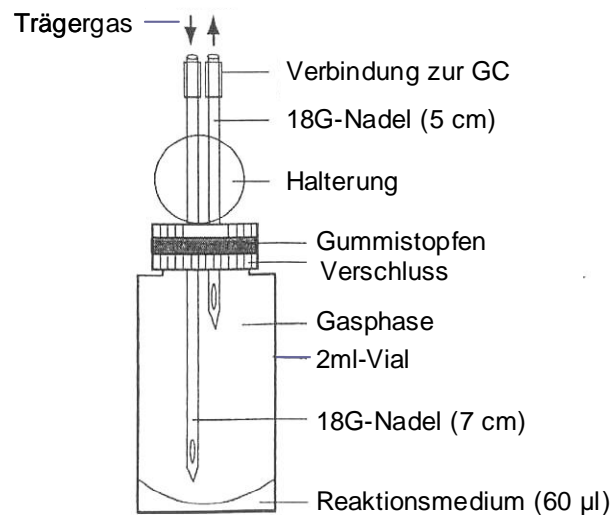
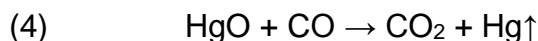


Abbildung 9: Zwei-Kanülensystem für die gaschromatographische CO-Detektion (Appleton 1999)

Die CO-Bestimmung erfolgte mit einem reduzierenden Gasdetektor. 270° C heißes Quecksilberoxid (HgO) oxidiert CO zu CO₂ unter Freisetzung von äquimolaren Mengen an Quecksilberdampf (Hg).



Das entstandene Quecksilber wurde im Anschluss mithilfe eines UV-Photometers durch Absorptionsmessung detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die entstandene Peakfläche ist in mVxSekunde angegeben. Über die Kalibriergerade ließ sich die zugehörige CO-Menge in pmol berechnen. Die Sensitivität der Methode beträgt durch den hohen Absorptionskoeffizienten von Hg 1 pmol. Nicht durch HO gebildetes CO wurde durch die KPO₄²⁻-Kontrolle als Doppelbestimmung erfasst und von der dazugehörigen, 3-fach bestimmten Menge an Gesamt-CO subtrahiert (5). Die HO-Aktivität ist als pmol CO/h/mg Nassgewicht angegeben und als Vielfaches zu den mit PBS-behandelten Kontrolltieren dargestellt.

(5) HO-Aktivität (nmol CO/h/mg Nassgewicht)

$$= \text{Gesamt-CO} - \text{KPO}_4^{2-}\text{-CO (pmol)} \times \frac{\text{nmol}}{1000 \text{ pmol}} \times \frac{60 \text{ min/h}}{15 \text{ min}} \times \frac{\text{ml}}{\text{mg Gewebe}} \times \frac{1}{0,02 \text{ ml}}$$

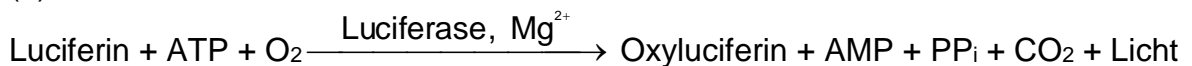
Die 15 Minuten entsprechen der Zeit für die HO-Enzymreaktion mit einem Probenvolumen von 0,02 ml.

3.8 Luciferase-vermittelte Chemilumineszenz

Die Fähigkeit von Lebewesen selbst oder mithilfe von Symbionten Licht zu erzeugen, wird als Biolumineszenz bezeichnet. Die Biolumineszenz ist ein Spezialfall der Chemilumineszenz. In der Gentechnik werden Lumineszenz-Enzyme wie z. B. die *firefly*-Luciferase in Form von Reporter genen für die Analyse regulatorischer DNA-Sequenzen (Promotoren) eingesetzt (Mrad 2012). Das Luciferase-Gen wird dafür vor die Promotorregion kloniert und in Abhängigkeit zum Promotor exprimiert. Charakteristisch ist die leichte Nachweisbarkeit des Genproduktes, dessen Aktivität mit der des Zielpromotors korreliert.

Der Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Promotorregion wurde sowohl in transient und stabil transfizierten Zellsystemen als auch in transgenen Mäusen untersucht. Alle Genkonstrukte enthielten die *firefly*-Luciferase des nordamerikanischen Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) als Reporter gen. Das Substrat Luciferin wird in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesium-Ionen durch die Luciferase oxidiert (6). Unter Bildung von Oxyluciferin wird dabei Licht der Wellenlänge 562 nm frei.

(6)



3.8.1 Reporter gen-Assay in stabil transfizierten Zellen

Für den Einfluss von Simvastatin auf die 15 kb 5'-flankierende Promotorregion des murinen HO-1-Gens, wurden stabil transfizierte HO-1-Luc-NIH3T3-Zellen verwendet (Abb. 7).

3.8.1.1 Inkubationsprotokoll

Die stabil transfizierten Mausfibroblastenzellen wurden in 96-well-Platten ausgesät und bis zu 80 %iger Konfluenz kultiviert. Nach einer 6-stündigen Nüchternphase in Medium ohne Serum folgte die Inkubation mit Simvastatin (10 µM) über einen Zeitraum von 1-24 Stunden. Der HO-1-Induktor Cadmiumchlorid (10 µM) wurde als Positivkontrolle verwendet.

3.8.1.2 Luciferase-Assay

Das Inkubationsmedium wurde entfernt und 100 µl Luciferinlösung (300 µg/ml) pro Vertiefung zugesetzt. Die Reporter genaktivität wurde anhand der emittierten Photonen über eine sensitive CCD-Kamera (*charged-coupled device*, Model C2400-32, Hamamatsu, Japan) fünf Minuten detektiert. Die Messung lief unter Ausschluss von Licht ab. Die Auswertung des Flux (emittierte Photonen/Sekunde) erfolgte mit dem Programm *LivingImage 2.5* der Firma Xenogen (Alameda, CA, USA). Die Ergebnisse wurden als Vielfaches der unbehandelten Kontrollzellen dargestellt und korrelieren mit der Aktivität des HO-1-Promotors.

3.8.2 Reporteragen-Assay in transient transfizierten Zellen

Für die transiente Transfektion von ECV304-Zellen wurde ein Genkonstrukt, bestehend aus den *upstream* liegenden 4900 bp der humanen HO-1-Promotorregion (hHO-1, Abb. 10) einschließlich codierendem Luciferase-Reporteragen verwendet. Weiterhin wurden Mutanten dieses hHO-1-Konstrukts eingesetzt, welche Mutationen im CRE (*cAMP-responsive element*, Mutante1), MARE (*Maf recognition element*, Mutante2) oder in beiden Bereichen (Mutante1/2) enthielten (Abb. 10) (Kronke 2003). Die humanen Konstrukte enthielten einen pGL3-Grundvektor.

Das für die p38 α -defizienten MEF-Zellen sowie deren Wildtyp eingesetzte Luciferase-Reporteragenkonstrukt enthielt die proximalen 4045 bp der murinen HO-1-Promotorregion. Der Grundvektor des murinen Konstrukts war pGL2. Alle Genkonstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Norbert Leitinger (Robert M. Berne Cardiovascular Research Center, University of Virginia, VA, USA) zur Verfügung gestellt.

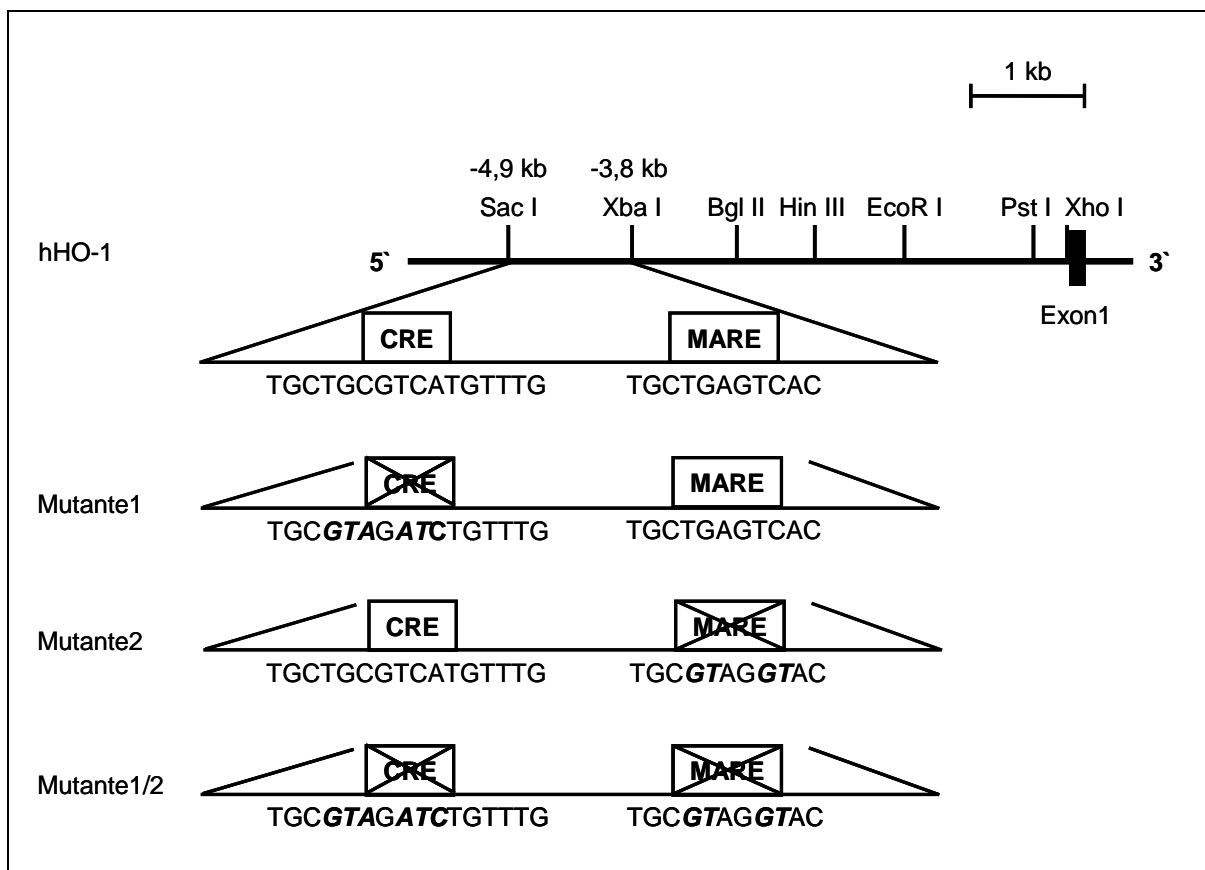


Abbildung 10: Schematische Darstellung der humanen HO-1-Reporteragenkonstrukte

Abgebildet sind Wildtyp und Mutanten der hHO-1-Reporteragenkonstrukte (hHO-1=Wildtyp; CRE-Mutante = Mutante1; MARE-Mutante = Mutante2; CRE/MARE-Mutante = Mutante1/2). Die Mutationen sind an der kursiven und hervorgehobenen Schreibweise der veränderten Nukleotide zu erkennen.

3.8.2.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Die bei -70°C gelagerten *E. coli* DH5- α -Kulturen wurden auf Eis aufgetaut. 100 μl des Bakterienstamms wurden mit 1 μg Plasmid-DNA versetzt, sanft invertiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte ein kurzer Hitzeschock für 30 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad mit anschließender 2-minütiger Lagerung auf Eis. Nach Zusatz von 900 μl LB-Medium wurde das Gemisch für eine Stunde bei 37°C unter ständigem Schütteln (225-250 rpm) inkubiert. Von der transformierten DH5- α -Bakterienkultur wurden 10 μl auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Die verwendeten Plasmide enthielten alle ein Resistenzgen gegen Ampicillin.

Von den über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien wurde ein einzelner Klon ausgewählt und in 5 ml LB-Medium überführt. Nach weiterer Schüttelinkubation (37°C , 80 rpm) über Nacht wurden 900 μl transformierte *E. coli*-Kultur mit 100 μl Glycerol als Dauerkultur bei -70°C eingefroren.

Der qualitative Transformationsnachweis erfolgte durch Spaltung der Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Tab. 11) und anschließender elektrophoretischen Trennung. Die für den Restriktionsverdau benötigten Enzyme und Puffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Der Restriktionsansatz wurde nach Firmenangaben hergestellt und bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurde das Restriktionsgemisch in einem 0,8 %igen TAE-Agarosegel (60 mV) über Nacht der Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA enthielt das Gel den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Für die Identifikation der spezifischen DNA-Fragmente im Gel wurde ein DNA-Standard (Invitrogen, Karlsruhe) definierter Größe eingesetzt. Mithilfe von UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und fotografiert (Eagle Eye II, Stratagene, Heidelberg).

Promotor	Organismus	Größe	Grundvektor	Restriktionsenzyme
hHO-1	Mensch	4900 bp	pGL3	Kpn I, Sal I
mHO-1	Maus	4045 bp	pGL2	Kpn I, Sal I

Tabelle 10: Promotorkonstrukte

3.8.2.2 Plasmidgewinnung und -isolierung

Für die Plasmidgewinnung wurden 50 ml LB-Medium mit 10 μl der transformierten Stammkultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator (80 rpm) aufbewahrt. Die Plasmidisolierung wurde am darauffolgenden Tag mit Hilfe des Plasmid-Midi-Isolations-Kits der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Dieses System basiert auf einer modifizierten alkalischen Zellyse (Birnboim 1979), gefolgt von einer spezifischen DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. Die Isolation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am UV-Spektrometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 260 nm.

3.8.2.3 Transfektion

Als Transfektionsmittel wurde das aus mehreren Komponenten bestehende, nicht liposomale *FuGENE6*-Reagenz (Roche, Mannheim) verwendet. Das auf Lipidbasis beruhende Reagenz bildet mit der negativ geladenen Plasmid-DNA Komplexe, die durch Endozytose in die Zelle gelangen. Obwohl *FuGENE6* keine Liposomen im eigentlichen Sinne bildet, wird es wie ein liposomales Transfektionsmittel verwendet (Nagy 2006).

ECV304- und MEF-Zellen wurden zu 80 %iger Konfluenz in 6-well-Platten ausgesät. Eine optimale Transfektionseffizienz wurde mit 3 μ l *FuGENE6* und 1,5 μ g Promotorplasmid pro Vertiefung erzielt. Entsprechend den Herstellerangaben wurde das Transfektionsmittel mit 100 μ l Antibiotika-freiem Medium für fünf Minuten bei RT inkubiert bevor das Promotorkonstrukt zugesetzt wurde. Nach kurzem Vortexen und weiteren 15 Minuten Inkubation erfolgte dann die tropfenweise Zugabe zu den Zellen. Die Transfektionszeit betrug 24 Stunden.

3.8.2.4 Inkubationsprotokoll

Das Transfektionsmedium wurde nach 24 Stunden entfernt und durch Medium ohne Serum ersetzt. Nach einer Nüchternphase von vier Stunden wurden die Zellen für 18 Stunden mit Simvastatin inkubiert. Für Hemmstoffexperimente wurden die Zellen für 25 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorbehandelt. Danach wurde die Inkubation mit Simvastatin für 18 Stunden fortgesetzt. Als Positivkontrolle wurde Cadmiumchlorid in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug ebenfalls 18 Stunden.

3.8.2.5 Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit warmen PBS gespült, mit 600 μ l PLB (*passive lysis buffer*, Promega, Mannheim) pro Vertiefung versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das erhaltene Zelllysat wurde in Eppendorfgefäße überführt und für zwei Minuten bei 14 000 rpm (4° C) zentrifugiert. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 μ l des Überstandes in 100 μ l Luciferase-Assay-Puffer (Promega, Mannheim) gegeben und direkt im Anschluss im Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold, Bad Wildbad) für zehn Sekunden vermessen. Die emittierten Photonen sind als RLU angegeben und auf den Proteingehalt der Proben (siehe Proteinbestimmung 3.4.2) normiert. Die erhaltenen Ergebnisse korrelieren mit der Luciferase-Aktivität und geben dadurch Auskunft über die Aktivität des HO-1-Promotors.

3.8.3 Reporteragen-Assay mit HO-1-Luc-Mäusen

Die *in vivo* Untersuchungen der HO-1-Promotorregion erfolgte mit transgenen HO-1-Luc-Mäusen, welche als Expressionsvektor die gesamte 5'-regulatorische HO-1-Gensequenz (15 kb) gekoppelt an ein Luciferase-Reporteragen enthielten (McCaffrey 2003). Die HO-1-abhängige Luciferase-Expression wurde nicht-invasiv anhand der Lichtfreisetzung bei der Metabolisierung des Substrats Luciferin bestimmt. Photonreiche Körperregionen weisen eine erhöhte HO-1-Promotoraktivität auf.

3.8.3.1 Orale Applikation

Die Einteilung der HO-1-Luc-Mäuse in Simvastatin- und Vehikel-behandelte Kontrollgruppen erfolgte randomisiert. Es wurde einmalig eine Simvastatindosis von 100 mg/kg KG oder das Vehikel (1:66,6 Tween20 in isotonischer NaCl-Lösung) peroral appliziert. Das Volumen betrug maximal 260 µl und wurde durch eine 1,0 ml-Spritze mit stumpfer Kanüle verabreicht. Die Inkubationszeit betrug sechs Stunden.

3.8.3.2 Luciferase-Assay

Für die Biolumineszenz-Messung (bioluminescence imaging; BLI) wurde das *in vivo* Imaging System 200 (IVIS) der Firma Xenogen (Alameda, CA, USA) verwendet. Die basale HO-1-Promotoraktivität der transgenen Mäuse wurde zwei Tage vor dem Versuch bestimmt. Die HO-1-Luc-Mäuse erhielten zehn Minuten vor der Messung intraperitoneal Natriumpentobarbital (Nembutal, 50 mg/kg KG) und Luciferin (150 mg/kg KG) (Hsu 2006). Die von den sedierten Mäusen emittierten Photonen wurden im IVIS über einen Zeitraum von fünf Minuten detektiert. Die Kalkulation des Flux (emittierte Photonen/Sekunde) erfolgte mit dem Programm *LivingImage* 2.5 der Firma Xenogen. Die Ergebnisse wurden als Vielfaches der Basalstimulation dargestellt und gegen die Kontrolltiere normalisiert. Die Messung wurde aus ventraler, lateraler und dorsaler Lage durchgeführt.

3.9 Material

Axxora, Grünberg	HO-1-Antikörper, LY294002, NADPH, ODQ, Ultra Pure Water, Wortmannin
Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA	Ultra Pure Water
DIFCO Laboratories, Detroit (USA)	Trypton
European collection of Cell Cultures (ECACC), Wiltshire (UK)	ECV304 (ECACC 92091712)
GE Healthcare, Freiburg	Dextransulfat, ECL Plus Detektionsreagenz, Hyperfilm ECL, Nitrocellulosemembran Hybond-ECL, Nylonmembran Hybond N ⁺ , ProbeQuant G50 Mikrosäulen
Hartmann Analytic, Braunschweig	³² P-dCTP
Invitrogen, Karlsruhe	Agarose, DMEM, DNA-Standard, Ethidiumbromid, FBS, Heringssperma DNA-Lösung, Medium 199, Mercapto-ethanol, nicht essenzielle Aminosäuren 100x, PBS
Merck, Darmstadt	Ethanol, Isopropanol, Kaliumchlorid,

	Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Methanol, Natriumhydrogenphosphat, Natriumphosphat
MSD Merck Sharp & Dohme GmbH, Haar	Simvastatin
New England Biolabs, Frankfurt am Main	Akt-Antikörper, 10x Cell Lysis Buffer, Kpn I, MAPK-Antikörper, Phospho-Akt-Antikörper, Phospho-MAPK-Antikörper, Sal I
Peqlab, Erlangen	Protein-Marker IV, peqGOLD TriFast
Promega, Mannheim	Luciferase-Assay-System, 5x PLB, pGL2- Basisvektor, pGL3-Basisvektor
Qiagen, Hilden	HiSpeed Plasmid Midi Kit, Plasmid Midi Isolation Kit, Gel Extraction Kit, RNAeasy Plus Mini Kit, QuantiTect SYBR Green RT- PCR Kit
Roche, Mannheim	FuGENE 6 Transfektionsreagenz, Random Primed DNA Labeling Kit, Restriktionsenzyme
Roth, Karlsruhe	Bradford-Reagenz Roti-Quant, Chloroform, Coomassie-Brillantblau, DEPC, DMSO, EDTA, Essigsäure, Formaldehyd, Formamid, Glycin, Hefeextrakt, LB-Agar, MOPS, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumhydroxid, Tween 20
Serva, Heidelberg	Acrylamid
Sigma, Taufkirchen	Aktinomycin D, Ampicillin, APS, β -Aktin- Antikörper, BSA, Cadmiumchlorid, Chloramphenicol, DDA, DNCB, DTT, Gel Loading Solution Type 1, GF109203X, Glycerol, GW9662, KT5720, KT5823, L- NAME, Lucigenin, LY294002, Peroxidase- gekoppelter Sekundärantikörper, PD098059, PMSF, SB203580, SB202190, Simvastatin, SP600125, TEMED, Triton-X 100, Trypsin/EDTA 10x,
TSI GmbH, Zeven	Trockenmilchpulver

3.10 Puffer, Lösungen, Medien

3.10.1 Puffer und Lösungen

Blockierungslösung für HO-1-Antikörper: 4 % fettfreies Trockenmilchpulver in Tris-Puffer

Blockierungslösung für Phospho-MAPK- und Pan-MAPK-Antikörper: 5 % fettfreies Trockenmilchpulver in Tris/Tween-Puffer

Coomassie-Brillantblau-Lösung: 2,5 g/l Coomassie-Brillantblau, 10 % Essigsäure, 45 % Methanol in demineralisiertem Wasser

Entfärber: 10 % Essigsäure, 45 % Methanol in demineralisiertem Wasser

1 %iges Formaldehyd-Agarosegel: 10 g/l Agarose, 10 % 10x MOPS in DEPC-Wasser, vor dem Gießen 17 % Formaldehyd zugeben

Hybridisierungslösung für Northern-Blot-Analyse: 10 % Dextransulfat, 1 M NaCl, 1 % SDS in DEPC-Wasser, 100 µg/ml Fisch-DNA frisch zugeben

Ladepuffer für SDS-PAGE: 100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2 % SDS, 20 % Glycerol, 2,5 M DTT frisch zugeben

Ladepuffer für RNA-Agarose-Gelelektrophorese: 400 µl Formamid, 140 µl Formaldehyd, 80 µl 10x MOPS, 8 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml), 3 µl Gel Loading Solution

Laufpuffer für DNA-Agarose-Gelelektrophorese: 1x TAE

Laufpuffer für RNA-Agarose-Gelelektrophorese: 1x MOPS

Laufpuffer für SDS-PAGE: 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1 % SDS

Lysispuffer zur Proteinisolation: 25 mM Tris, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7,4 bei 37° C, 1 µM PMSF frisch zugeben

MOPS: 20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0 bei 37° C

PBS: 138 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 8,1 mM Natriumhydrogenphosphat, 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,3 bei 37° C

PBS-Mg-Puffer: 100 mM Kaliumhydrogenphosphat, 4,3 mM Magnesiumchlorid, pH 7,4 bei 37° C

PLB: 5x PLB 1:5 mit Ultra Pure Water verdünnt

Sammelgel für SDS-PAGE: 5% Acrylamid, 20 % Sammelgelpuffer, 1 % APS (0,1 g/ml), 0,1 % TEMED in bidestilliertem Wasser

Sammelgelpuffer: 334 mM Tris, 17 mM SDS, pH 6,8 bei 37° C

SSC: 150 mM Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0 bei 37° C

0,8 %iges TAE-Agarosegel: 8 g/l Agarose in 1x TAE

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 % Essigsäure, pH 8,0 bei 37° C

Transferpuffer für Western Blot: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

Trenngel für SDS-PAGE: 15 % Acrylamid, 20 % Trenngelpuffer, 1 % APS (0,1 g/ml), 0,1 % TEMED in bidestilliertem Wasser

Trenngelpuffer: 1 M Tris, 17 mM SDS, pH 8,8 bei 37° C

Tris-Puffer: 20 M Tris, pH 7,4 bei 37° C

Tris/Tween-Puffer für HO-1-Detektion: 0,5 % Tween, 20 M Tris, pH 7,4 bei 37° C

Tris/Tween-Puffer für Phospho-MAPK- und Pan-MAPK-Antikörper: 0,1 % Tween, 20 M Tris, pH 7,4 bei 37° C

3.10.2 Substanzlösungen

Folgende Stammlösungen wurden in DMSO bei -20° C gelagert: Aktinomycin D (1 mg/ml), DDA (10 mM), GW9662 (10 mM), KT5729 (2,5 mM), KT5823 (1 mM), LY294002 (20 mM), ODQ (1 mM), PD098059 (22,5 mM), SB202190 (20 mM), SB203580 (20 mM), SP600125 (45 mM), Wortmannin (10 mM). Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

Chloramphenicol wurde in reinem Ethanol gelöst und als Stammlösung (34 mg/ml) bei -20° C gelagert.

Luciferin (30 mg/ml) wurde mit steriler 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt.

Methämalbumin (1,5 mM Häm/0,15 mM BSA) wurde wie folgt hergestellt: 9,9 mg Hemin wurden in 2,5 ml 0,4 M Na₃PO₄ gelöst, 100 mg BSA zugesetzt und das Volumen auf 8 ml mit destilliertem Wasser erhöht. Der pH-Wert 7,4 wurde mit 1 M HCl eingestellt bevor auf das Endvolumen von 10 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde. Vor Gebrauch wurde die Stammlösung 1:10 mit 0,1 M KPO₄²⁻-Puffer verdünnt.

NADPH (4,5 mM) wurde aus 4,2 mg NADPH gelöst in 1 ml 0,1 M KPO₄²⁻-Puffer hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Natriumpentobarbital (Nembutal 50 mg/ml) wurde 1:10 mit steriler NaCl-Lösung (0,9 %) verdünnt.

Simvastatin (20 mM) wurde durch alkalische Hydrolyse aus dem Simvastatinlaktone hergestellt. 8 mg Laktone wurden in 0,2 ml Ethanol und 0,3 ml NaOH (0,1 N) für zwei Stunden bei 50° C erhitzt. Nach Einstellen des pH-Wertes 7,2 wurde das Volumen auf 1 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Simvastatinlösung zur oralen Applikation: die Stammlösung setzte sich aus 20 mg Simvastatin, 30 µl Tween20 und 1970 µl isotonischer Kochsalzlösung zusammen.

Vehikel für die orale Applikation war eine Lösung bestehend aus Tween20 und isotonischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:66,6.

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

3.10.3 Medien

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

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

3.11 Statistik

Bei den Messungen der Chemilumineszenz und *real time* RT-PCR sind alle Messdaten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ($x \pm$ SEM) von n=3-6 unabhängigen Experimenten angegeben. Die densitometrischen Daten der Northern- und Western-Blot-Analysen basieren auf n=3-6 unabhängigen Experimenten.

Für die *in vivo* Untersuchungen zur Bestimmung der HO-Aktivität, Biolumineszenz und des mRNA-Gehalts wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt mit je einem 1 Kontroll- (Vehikelapplikation) und 3 Versuchstieren (Substanzapplikation). Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni's multipler Vergleichstest angewendet. Für die Auswertung der *in vivo* Daten am Mausmodell wurde der zweiseitige t-Test verwendet. Bei allen Experimenten wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3.12 Kooperationen

Alle *in vivo* Daten sind während der Auslandsaufenthalte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. D. K. Stevenson, (Departement of Pediatrics, School of Medicine, Stanford University, CA, USA) an der Stanford University entstanden. Im Vordergrund standen vor allem die *in vivo* Biolumineszenz-Messung der transgenen HO-1-Luc-Mäuse sowie die von Herrn Dr. H. J. Vreman (Departement of Pediatrics, School of Medicine, Stanford University, CA, USA) etablierte gaschromatographische CO-Detektion. Die Bestimmung der organspezifischen HO-Aktivität wurde von Frau Dr. L. Muchova und Herrn M. Hsu (Departement of Pediatrics, School of Medicine, Stanford University, CA, USA) durchgeführt. Alle weiteren *in vivo* Daten sowie die Untersuchung der Promotoraktivität in stabil transfizierten NIH3T3-Zellen wurden ebenfalls in den USA generiert.

In Kooperation mit Herrn PD Dr. S. Immenschuh (Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen) wurde die Methode des Reporter-gen-Assays erlernt und zusammen mit Herrn Dr. S. Schürger am Institut für Pharmakologie in Halle etabliert. Die HO-1-Promotorkonstrukte wurden ursprünglich von Herrn Dr. N. Leitinger (Robert M. Berne Cardiovascular Research Center, University of Virginia, VA, USA) zur Verfügung gestellt. Die in HUVEC- sowie MEF-Zellen dargestellten Versuche wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. S. Immenschuh u. a. von Frau Dr. N. Wijayanti (Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion

4.1.1 Antioxidative Effekte von Simvastatin in einem Modell für oxidativen Stress

Statine werden neben ihren cholesterolsenkenden auch antioxidative und zytoprotektive Eigenschaften zugesprochen (Shishehbor 2003; Davignon 2004b; Greenwood 2007). Mithilfe eines Modells für oxidativen Stress sollte dieses Charakteristikum am Beispiel von Simvastatin in der Endothelzelllinie ECV304 überprüft werden.

In Entzündungsprozessen ist die membranständige NADPH-Oxidase hochreguliert und produziert vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Der unter pathophysiologischen Umständen erhöhte Sauerstoffradikalspiegel wurde durch die Zugabe von NADPH simuliert. Die membranständige NADPH-Oxidase metabolisiert das Substrat NADPH unter Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die gebildeten ROS lassen sich mithilfe von Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz in relativen Lichteinheiten (RLU) messen (Tarpey 1999; Habeos 2008). Die Stimulation der ROS-Bildung durch NADPH in unbehandelten Kontrollzellen wurde als maximal erreichbarer RLU-Wert (RLU_{max}) zu 100 % gesetzt.

Endothelzellen wurden für 24 Stunden mit Simvastatin inkubiert. Um direkte, antioxidative Effekte von Simvastatin auszuschließen, wurden die Zellen vor der Messung mit PBS gespült. Die gemessenen relativen Lichteinheiten korrelieren mit der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies.

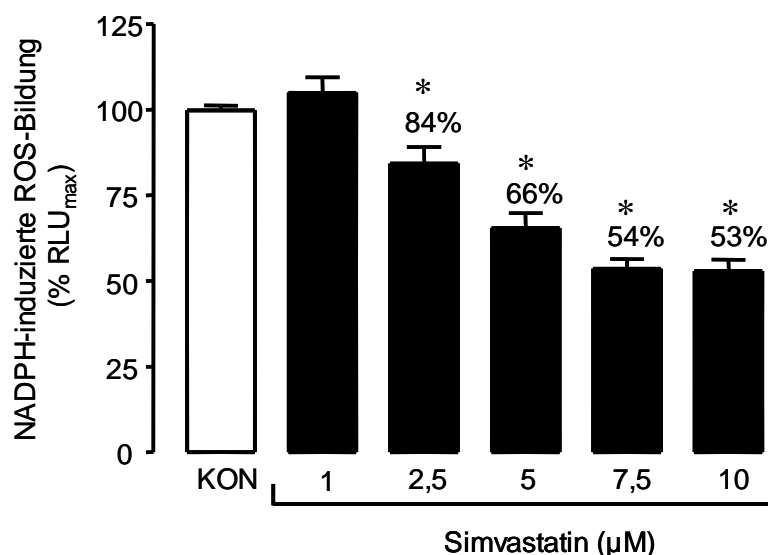


Abbildung 11: Effekt von Simvastatin auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen

ECV304-Zellen wurden mit Simvastatin in verschiedenen Konzentrationen für 24 h inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelerperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferronis multipler Vergleichstest.

In dem gewählten Modell für oxidativen Stress zeigt Simvastatin eine konzentrationsabhängige Reduktion der gebildeten Menge an ROS. Bereits ab einer Konzentration von 2,5 μM ist eine signifikante Verringerung der freien Radikalmenge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle detektierbar. In dem gewählten Konzentrationsbereich wird eine maximale Senkung des Sauerstoffradikalspiegels (53 %) bei einer Konzentration von 10 μM Simvastatin erreicht. Simvastatinkonzentrationen über 10 μM führten nicht zu einer Verstärkung der radikalsenkenden Wirkung (nicht abgebildet).

4.1.2 Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Proteinexpression

Die zytoprotektive Wirkung von Simvastatin im Modell für oxidativen Stress lässt eine Aktivierung antioxidativer Mechanismen vermuten. Verschiedene endogene Enzyme sind in der Lage zellulären Stress zu minimieren. Eine Vielzahl von Studien belegt eine zytoprotektive Wirkung der induzierbaren HO-1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Foresti 1999). Für die Überprüfung eines möglichen Effektes von Simvastatin auf die HO-1-Translation wurde die Western-Blot-Methode gewählt. Primäre humane Endothelzellen (HUVEC) sowie ECV304-Zellen wurden für 24 Stunden mit Simvastatin inkubiert.

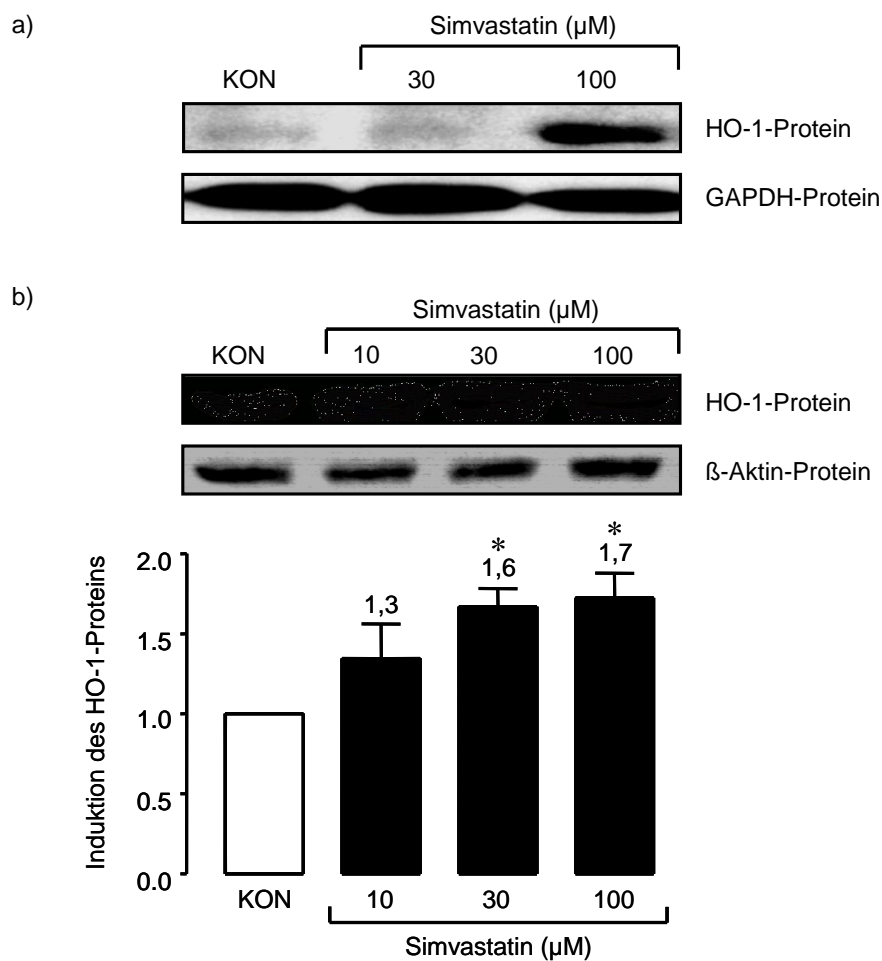


Abbildung 12: Effekt von Simvastatin auf die HO-1-Proteinexpression in HUVEC- und ECV304-Zellen

a) HUVEC und b) ECV304 wurden 24 Stunden mit Simvastatin inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Western-Blots mit den dazugehörigen Ladungskontrollen sowie die

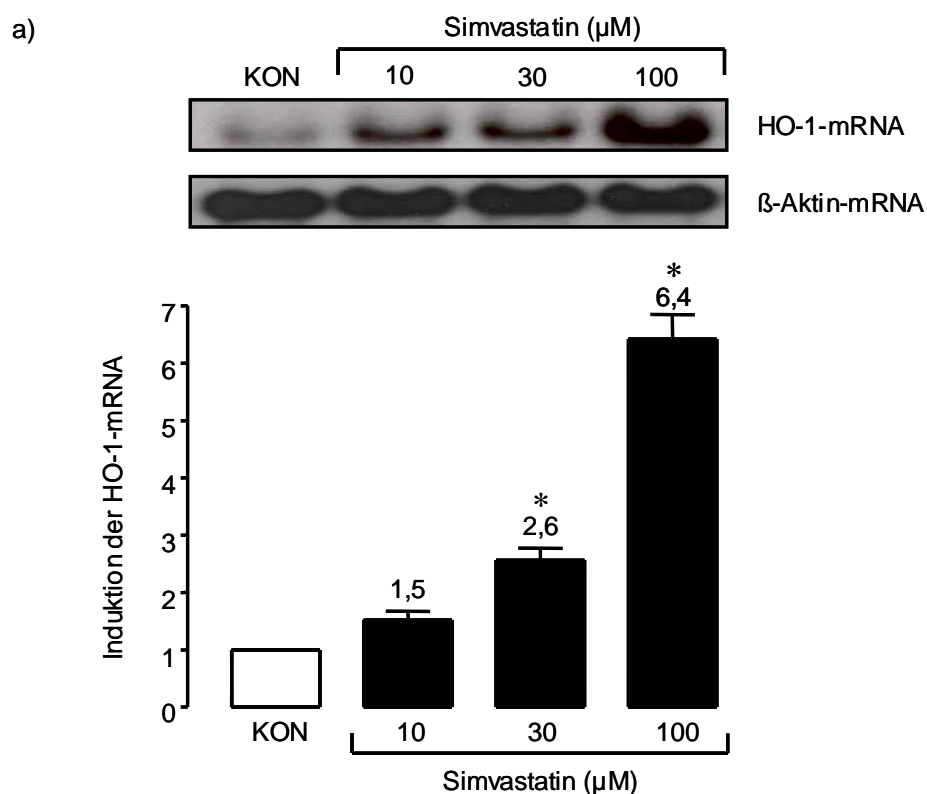
densitometrische Auswertung von b). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Simvastatin zeigt sowohl in den Primärzellen als auch in der Zelllinie ECV304 eine Induktion des HO-1-Proteins. In ECV304-Zellen erhöht Simvastatin (100 μM) die Proteinexpression um das 1,7-fache. Eine signifikante HO-1-Induktion tritt in der endothelialen Zelllinie ab einer Konzentration von 30 μM ein. In den primären Endothelzellen (HUVEC) sind höhere Konzentrationen (100 μM) nötig, um eine Induktion des HO-1-Proteins nachzuweisen.

4.1.3 Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-mRNA-Expression

Die HO-1 wird in erster Linie als ein transkriptional reguliertes Enzym beschrieben (Shibahara 1987; Kitamuro 2003; Mrad 2012). Verschiedene Stimuli der HO-1 sind in der Lage durch Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren eine Stimulation der HO-1-Promotorregion zu bewirken und dadurch zu einer Steigerung der Transkriptionsrate und vermehrten mRNA-Produktion zu führen. Die Simvastatin-bedingte Proteininduktion könnte somit Folge eines solchen transkriptionalen Effektes sein. Mithilfe des radioaktiven Northern-Blots wurde deshalb die Wirkung von Simvastatin auf die HO-1-mRNA untersucht.

Endothelzellen wurden für acht Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Simvastatin inkubiert. Neben dem konzentrationsabhängigen Effekt wurde auch der Einfluss der Inkubationszeit auf die mRNA-Expression untersucht. Dafür wurden die Endothelzellen über einen Zeitraum von 2-12 Stunden mit 100 μM Simvastatin versetzt.



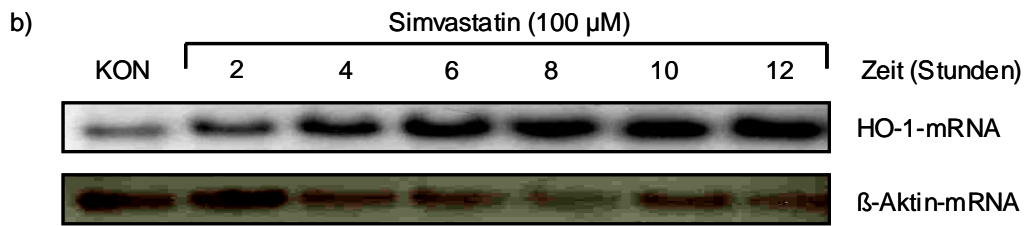


Abbildung 13: a) Konzentrations- und b) zeitabhängiger Effekt von Simvastatin auf die Expression der HO-1-mRNA in ECV304-Zellen

ECV304-Zellen wurden a) acht Stunden mit Simvastatin in verschiedenen Konzentrationen bzw. b) mit Simvastatin (100 µM) über verschiedene Zeiträume inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Northern-Blots mit β -Aktin-Ladungskontrollen sowie die densitometrische Auswertung von a). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Inkubation vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferronis multipler Vergleichstest.

Simvastatin zeigt eine sowohl konzentrations- als auch zeitabhängige Stimulation der HO-1-mRNA in ECV304-Zellen. Die maximale mRNA-Induktion wurde nach einer Inkubationszeit von acht Stunden erreicht und war bei einer Konzentration von 100 µM Simvastatin um das ca. 6-fache erhöht.

4.1.4 Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Promotoraktivität

Bei der transkriptional-regulierten Genexpression spielt die Beeinflussung der Promotorregion eine wichtige Rolle. Mithilfe des Luciferase-Reportergen-Assays konnte der Einfluss von Simvastatin auf den HO-1-Promotor untersucht werden. Die in Abhängigkeit zur HO-1-Promotoreinheit exprimierte Luciferase kann dabei photometrisch detektiert werden.

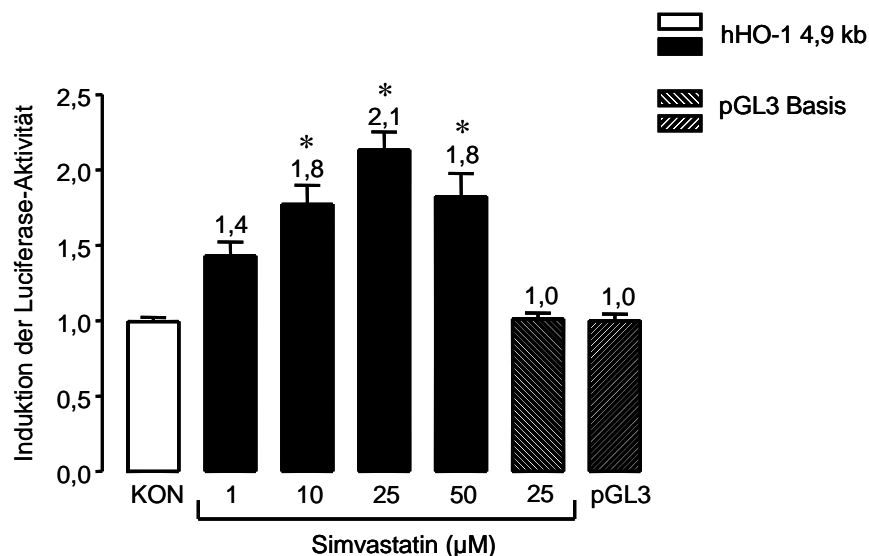


Abbildung 14: Effekt von Simvastatin auf die hHO-1-Promotoraktivität in transient transfizierten ECV304-Zellen

ECV304-Zellen wurden transient mit einem humanen HO-1-Reportergenkonstrukt transfiziert, welches die 5'-flankierenden 4900 bp der humanen HO-1-Promotorregion

enthält. Die Inkubationszeit betrug 18 h. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

In Gegenwart von Simvastatin zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der RLU im Vergleich zu den unbehandelten, transfizierten Kontrollzellen. Das Maximum liegt bei einer 2,1-fachen Induktion und wird bei einer Simvastatinkonzentration von 25 μM erreicht. Stimulierende Effekte von Simvastatin auf den pGL3 Grundvektor sind nicht vorhanden, wodurch die gemessenen RLU der aktivierten HO-1-Promotorregion zugesprochen werden können.

Neben der Beeinflussung der Promotoraktivität in transient transfizierten Zellen wurde auch der Effekt auf die gesamte 5'-flankierende Regulationseinheit des murinen HO-1-Gens (15 kb) untersucht. Hierfür wurden stabil transfizierte HO-1-Luc-NIH3T3-Zellen über einen Zeitraum von 1-24 Stunden mit Simvastatin inkubiert. Die Konzentration an Simvastatin betrug 10 μM . Im Anschluss wurde die Luciferase-Aktivität in Gegenwart von Luciferin bestimmt.

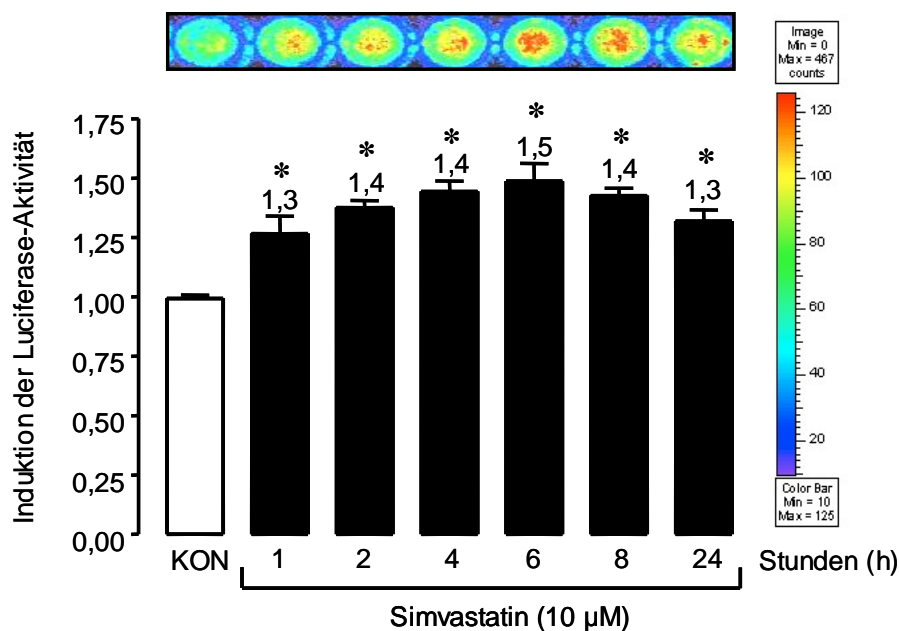


Abbildung 15: Effekt von Simvastatin auf die mHO-1-Promotoraktivität in stabil transfizierten HO-1-Luc-NIH3T3-Zellen

HO-1-Luc-NIH3T3-Zellen wurden über einen Zeitraum von 1-24 Stunden mit Simvastatin (10 μM) inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin vs. Kontrolle (KON); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest

Simvastatin (10 μM) zeigt eine zeitabhängige Stimulation der murinen HO-1-Promotorsequenz mit einem 1,5-fachen Maximum nach sechs Stunden Inkubationszeit. Die Luciferaseaktivität wurde über die Detektion des Flux (emittierte Photonen/Sekunde) bestimmt. Die Aktivitäten des Luciferase-Enzyms und der HO-1-Promotorregion korrelieren miteinander.

4.1.5 Stabilisierung der HO-1-mRNA durch Simvastatin

Simvastatin ist in der Lage sowohl die Promotorregion des HO-1-Gens zu aktivieren als auch den mRNA-Gehalt der HO-1 zu erhöhen. Werden beide Effekte miteinander verglichen, fällt auf, dass die Aktivierung der Promotorregion um das 2-fache erhöht wird (Abb. 15, 16), wogegen der Gehalt der HO-1-mRNA um das 6-fach steigt (Abb. 13). Die relativ geringe Stimulation der HO-1-Promotorregion, im Vergleich zu dem Gehalt an HO-1-mRNA, ließ post-transkriptionale Prozesse innerhalb der HO-1-Genregulation vermuten. Daher wurde im folgenden Experiment der Effekt von Simvastatin auf die Stabilität der HO-1-mRNA untersucht.

Die Steigerung der basalen HO-1-mRNA erfolgte durch eine 6-stündige Vorinkubation mit Simvastatin. Eine weitere mRNA-Synthese wurde durch einen Mediumwechsel und die Zugabe des Transkriptionsinhibitors Aktinomycin D (AD) verhindert. Inwieweit eine mRNA-Stabilisierung an der HO-1-Induktion von Simvastatin beteiligt ist, wurde durch Beobachtung des mRNA-Abbaus untersucht.

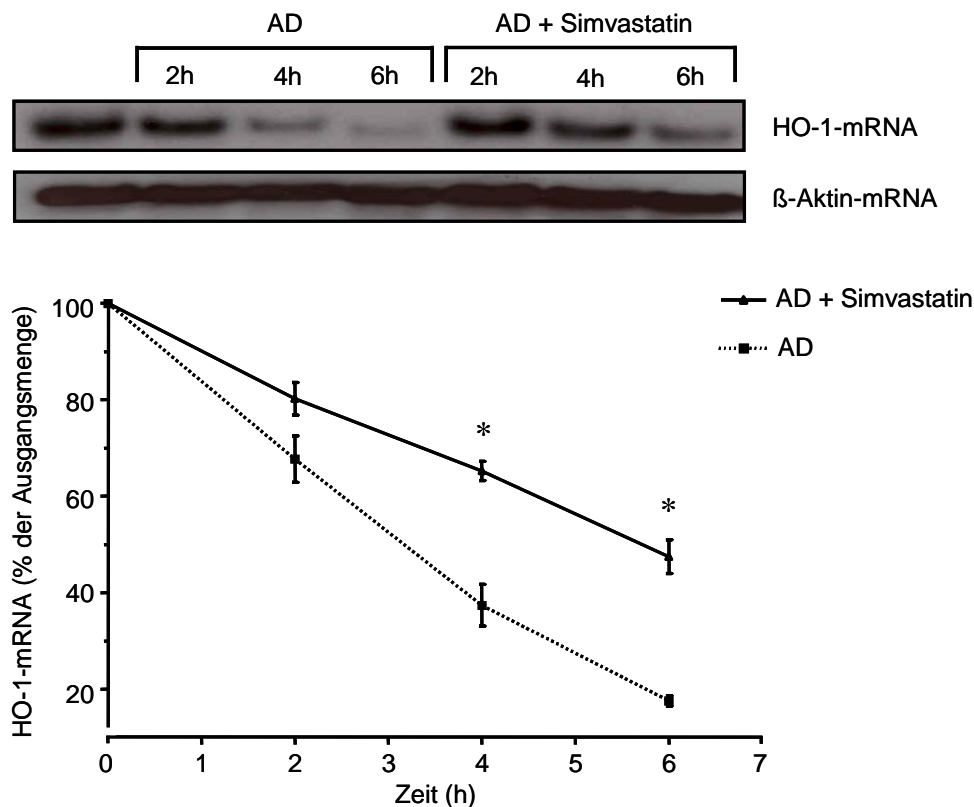


Abbildung 16: Effekt von Simvastatin auf die HWZ der HO-1-mRNA in ECV304-Zellen

ECV304-Zellen wurden für sechs Stunden mit Simvastatin (100 μ M) vorinkubiert. Nach Auswaschen der Substanzen erfolgte die Zugabe von AD (1 μ g/ml) und 20 Minuten später die erneute Zugabe von Simvastatin (100 μ M). Die Zellen wurden nach zwei, vier und sechs Stunden geerntet. Abgebildet sind ein repräsentativer Northern-Blot mit β -Aktinabgleich sowie die densitometrische Auswertung der Gesamtversuche. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ AD + Simvastatin vs. AD; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die jeweiligen HWZ wurden aus der graphischen Abbildung bestimmt.

Der Gehalt an HO-1-mRNA war in Gegenwart von Simvastatin nach vier und sechs Stunden signifikant erhöht im Vergleich zu den unbehandelten AD-Kontrollzellen. Der stabilisierende Effekt von Simvastatin wird auch durch die verlängerte HWZ von 3,4 auf 5,7 Stunden deutlich.

4.1.6 Einfluss der HO-1 auf die antioxidativen Effekte von Simvastatin

Simvastatin besitzt radikalsenkende Eigenschaften (Abb. 11) und ist außerdem in der Lage das zytoprotektiv wirkende Enzym HO-1 (Abb.12, 13) zu induzieren. Mithilfe eines HO-1-Inhibitors sollte nun untersucht werden, ob diese beiden Effekte in kausalem Zusammenhang zueinander stehen. Die klassischen HO-Inhibitoren sind Metalloporphyrine, die eine kompetitive Hemmung der HO bewirken (Vreman 1996). Teilweise können jedoch auch andere Enzyme mit einer Hämgruppe wie die NO-Synthase, Cytochrom-P450-Enzyme und die lösliche Guanylatzyklase beeinflusst werden (Grundemar 1997). Um diese Nebeneffekte auszuschließen wurde der HO-Inhibitor Chrom-Mesoporphyrin IX (CrMP) gewählt, da er im Gegensatz zu anderen HO-Inhibitoren in Konzentrationen unter 5 μM selektiv die HO-Aktivität inhibiert und auch keine photochemischen Eigeneffekte zeigt (Vreman 1993; Appleton 1999).

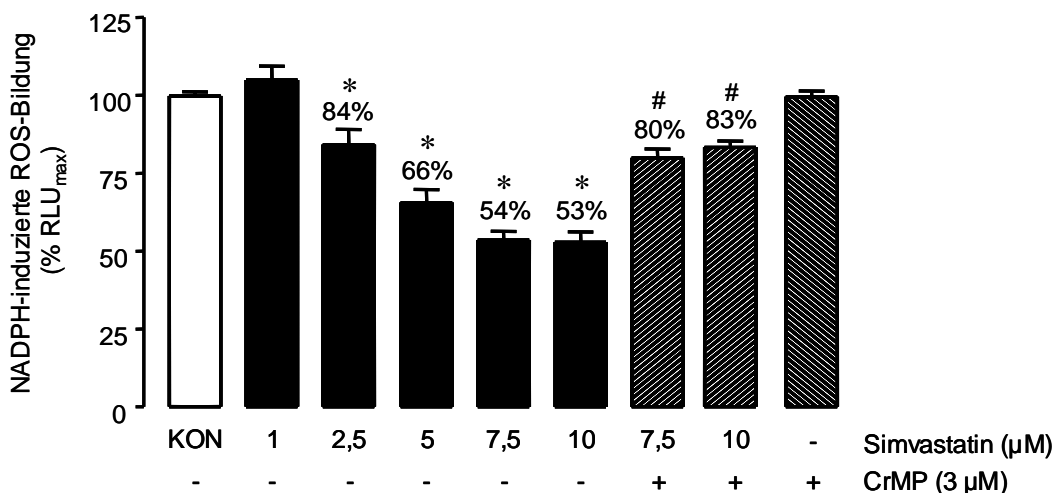


Abbildung 17: Effekt des HO-1-Inhibitors CrMP auf die radikalsenkende Wirkung von Simvastatin in Endothelzellen

ECV304-Zellen wurden mit CrMP (3 μM) für 25 Minuten vorbehandelt und anschließend für 24 h mit Simvastatin inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelerperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin vs. Kontrolle (KON); # $p \leq 0,05$ Simvastatin + CrMP vs. Simvastatin; einseitige ANOVA und Bonferronis multipler Vergleichstest.

Der HO-Inhibitor CrMP konnte die Simvastatin-bedingte Senkung des Sauerstoffradikalspiegels teilweise aufheben. Der radikalsenkende Effekt von Simvastatin bei einer Konzentration von 10 μM wurde in Gegenwart des HO-Inhibitors CrMP zu ca. 50 % antagonisiert. Somit wird ein Teil der antioxidativen Eigenschaften von Simvastatin über die HO-1 vermittelt.

4.1.7 Zusammenfassung

In primären Endothelzellen als auch in der Zelllinie ECV304 bewirkt Simvastatin eine Erhöhung der HO-1-Proteinexpression. Simvastatin zeigt weiterhin eine zeit- und konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA, die sowohl transkriptional als auch post-transkriptional reguliert ist. Zum einen aktiviert Simvastatin die Promotorregion des humanen HO-1-Gens (4,9 kb) sowie den 15 kb-Bereich der murinen Gensequenz, und zum anderen kommt es durch post-transkriptionale mRNA-Stabilisierung zu einer Verlängerung der HWZ. Die für Simvastatin nachgewiesene Induktion der HO-1-Genexpression steht außerdem in kausalem Zusammenhang mit der für Simvastatin beschriebenen antioxidativen Wirkung. Somit stellt Simvastatin einen potenten Induktor der HO-1 dar, dessen antioxidativer Effekt teilweise über die Beeinflussung der HO-1 erklärbar ist.

4.2 Transkriptionale Mechanismen der HO-1-Genregulation

Die HO-1 ist ein in der Regel transkriptional reguliertes Enzym. Veränderungen in der HO-1-Genexpression werden überwiegend durch die Beeinflussung der HO-1-Promotorregion erzielt. Eine wichtige Rolle spielen dabei Transkriptionsfaktoren, welche mit der Promotorregion interagieren. Eine entscheidende Funktion kommt dabei den *upstream* gelegenen Enhancerregionen E1 und E2 zu. Beide Bereiche weisen verschiedene *antioxidant response elements* (ARE) auf, die auch als *Maf recognition element* (MARE) bezeichnet werden und charakteristische Sequenzen antioxidativer Gene darstellen (Nguyen 2003). Die Signalkaskaden, die letztendlich Initiator der Genexpression sind, können je nach Stimuli variieren. Häufig sind phosphorylierungsabhängige Mechanismen beschrieben, zu denen u. a. der MAPK- und PI3K-Weg zählt (Immenschuh 2000). Ziel der folgenden Untersuchungen war es, den für Simvastatin spezifischen Signalweg und die dazugehörigen Promotorelemente der HO-1-Induktion zu identifizieren.

4.2.1 Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Die MAPK-Kaskade ist für eine Vielzahl von HO-1-Induktoren essenziell für die Enzymexpression (Elbirt 1998; Masuya 1998; Mrad 2012). Ob dies auch für die Simvastatin-vermittelte HO-1-Induktion zutrifft, sollte mithilfe von spezifischen MAPK-Inhibitoren, Phospho-MAPK-Antikörpern sowie Versuchen in p38 α -defizienten Zellen überprüft werden.

4.2.1.1 Einfluss von MAPK-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA-Induktion

Für die mRNA-Untersuchungen wurden spezifische, zellpermeable MAPK-Inhibitoren eingesetzt. Der Hemmstoff PD098059 (2-Amino-3-Methoxyflavon) verhindert die Aktivierung von ERK durch Blockade der vorgeschalteten MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 (Alessi et al. 1995). Das Anthrapyrazolon-Derivat SP600125 wurde für die Hemmung der MAPK JNK eingesetzt. SP600125 bindet kompetitiv an der ATP-Bindungstasche von JNK und senkt dadurch die katalytische Aktivität des Enzyms (Bennett et al 2001). Für die Blockade der p38-MAPK wurde das Pyridinylimidazol-Derivat SB203580 verwendet, welches ebenfalls einen spezifischen ATP-kompetitiven Inhibitor darstellt (Lee et al. 1999).

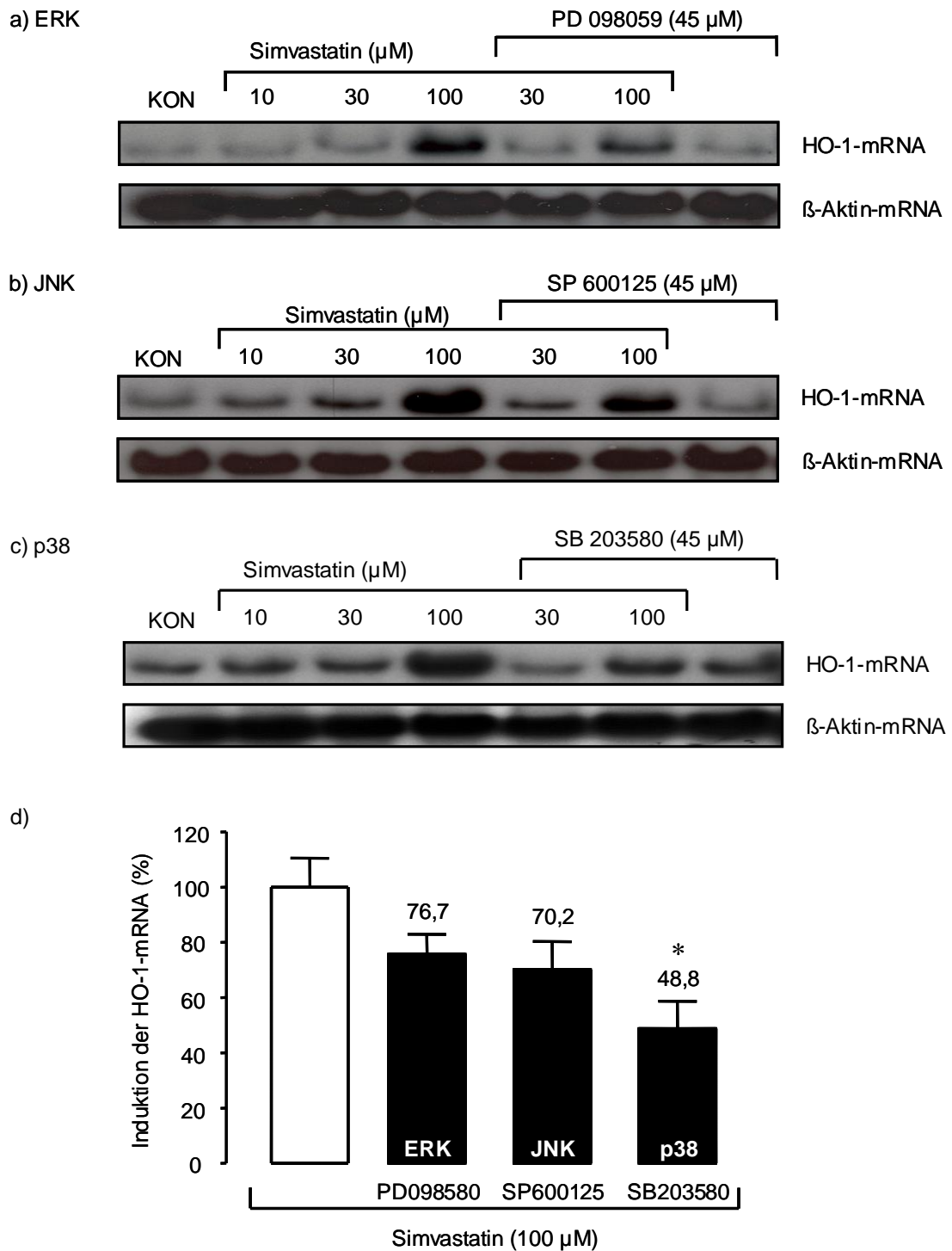


Abbildung 18: Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA

ECV304-Zellen wurden nach 20-minütiger Vorinkubation mit a) PD098059 (45 μM), b) SP600125 (45 μM) oder c) SB203580 (45 μM) für weitere acht Stunden mit Simvastatin (100 μM) inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Northern-Blots mit β -Aktinladungskontrollen sowie d) die densitometrische Auswertung. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin + SB203580 vs. Simvastatin; einseitige ANOVA und Bonferronis multipler Vergleichstest.

ECV304-Zellen wurden für 20 Minuten mit dem jeweiligen MAPK-Inhibitor vorbehandelt und anschließend mit Simvastatin inkubiert. Die auf HO-1-mRNA-

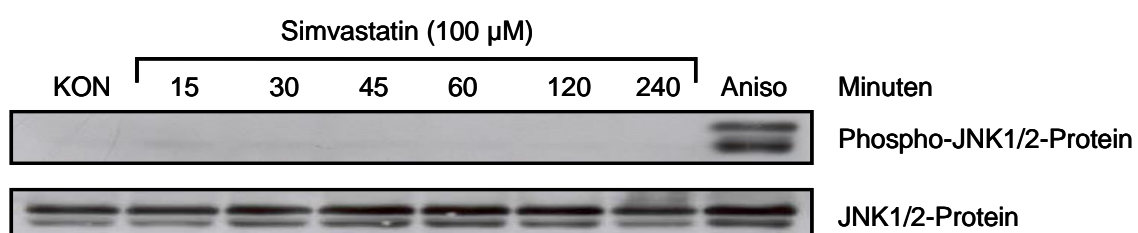
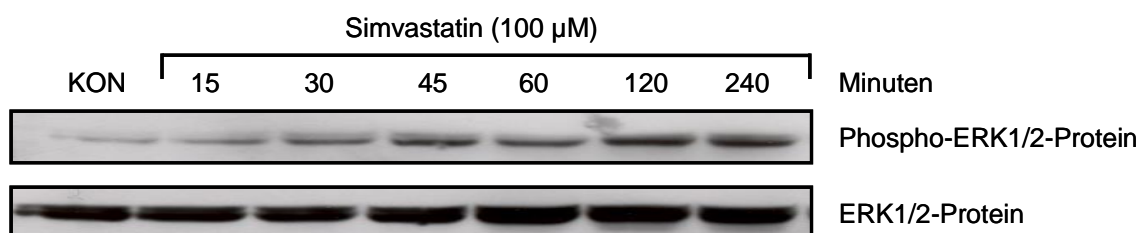
Ebene beobachtete Maximalstimulation von Simvastatin nach 8 Stunden wurde als Standardinkubationszeit gewählt (Abb. 13).

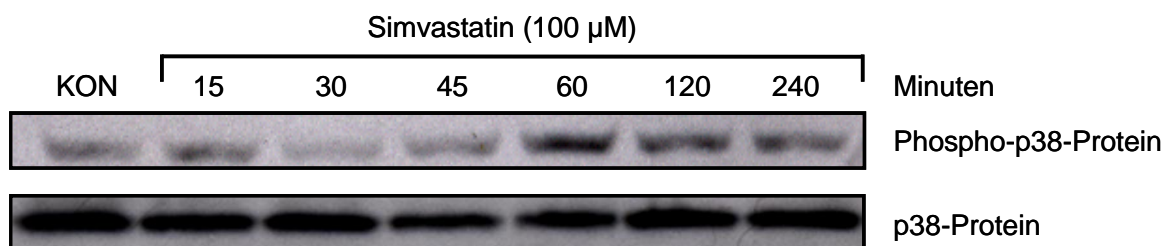
Der ERK-Hemmstoff PD098059 (45 μM) und der JNK-Hemmstoff SP600125 bewirkten eine durchschnittlich 25 bis 30-prozentige Senkung der mRNA-Menge, die jedoch im Vergleich zu den Simvastatin-behandelten Kontrollzellen statistisch nicht signifikant war. Die Blockade des p38-Signalweges mittels SB203580 (45 μM) reduzierte die mRNA-Stimulation durch Simvastatin signifikant um ca. die Hälfte (51,2 %).

4.2.1.2 Einfluss von Simvastatin auf die Aktivierung von MAPK

Die Aktivierung des MAPK-Weges erfolgt über hintereinander geschaltete Phosphorylierungsschritte. Mithilfe von phospho-spezifischen Antikörpern kann auf translationaler Ebene nachgewiesen werden, ob Simvastatin in der Lage ist MAPK zu stimulieren. Die Aktivierungszeit des MAPK-Systems liegt in der Regel im Minutenbereich. ECV304-Zellen wurden deshalb über einen Zeitraum von 15 bis 240 Minuten mit Simvastatin (100 μM) inkubiert. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung der terminalen MAPK mithilfe der Western-Blot-Methode überprüft.

Der Nachweis der aktivierten Form von ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa) erfolgte mit einem phosphospezifischen p44/p42-(pT202/pY204)-Antikörper, der mit dem aktivierten Threonin-Glutamat-Tyrosin-Motiv (T^PEY^P-Motiv) in der Aktivierungsschleife von ERK reagiert (Samuel and Ellis 2002). JNK1 (46 kDa) und JNK2 (54 kDa) wurden über das konservierte Threonin-Prolin-Tyrosin-Aktivierungsmotiv (T^P-P-Y^P-Motiv) nachgewiesen. Im aktiven Zustand ist diese Struktur phosphoryliert und über einen spezifischen p46/p54-(pT183/pY185)-Antikörper detektierbar. Für den Aktivierungsnachweis der dritten terminalen MAPK p38 (38 kDa) wurde die biphosphorylierte Threonin-Glycin-Tyrosin-Struktur (T^PGY^P-Motiv, pT180/pY182), welche sich im aktiven Zentrum von p38 befindet, nachgewiesen. Die Detektion der unphosphorylierten MAPK (Pan-MAPK) diene als Ladungskontrolle.





	KON	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min	240 min
Phospho-ERK1/2	1	2,01 ± 0,02	2,83 ± 0,17	2,90 ± 0,47	3,49 * ± 0,66	3,05 * ± 0,98	3,91 * ± 0,36
Phospho-p38	1	1,02 ± 0,04	1,03 ± 0,06	1,18 ± 0,08	1,75 * ± 0,3	1,83 * ± 0,21	1,6 * ± 0,16

Abbildung 19: Effekt von Simvastatin auf die Phosphorylierung von MAPK in ECV304-Zellen

Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 15 bis 240 Minuten mit Simvastatin (100 µM) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Anisomycin (100 µM; 30 Minuten) verwendet (nur teilweise abgebildet). Dargestellt sind repräsentative Western-Blots mit den dazugehörigen Ladungskontrollen sowie die densitometrische Auswertung. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n≥3 Einzelexperimenten. * p≤0,05 Simvastatin vs. KON; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Simvastatin ist in der Lage die MAPK ERK1/2 und p38 durch Phosphorylierung des jeweiligen TXY-Motivs zu aktivieren. Die Aktivierung von ERK erfolgte nach 60 Minuten. Für p38 betrug die Aktivierungszeit ebenfalls 60 Minuten. In dem gewählten Zeitraum von 15 bis 120 Minuten konnte keine Phosphorylierung von JNK1/2 beobachtet werden.

4.2.1.3 Einfluss von p38-Stoffwechselwegen auf die HO-1-Promotoraktivität

Simvastatin ist in der Lage den p38-Signalweg zu aktivieren (Abb. 19). Weiterhin ist die Simvastatin-bedingte Induktion der HO-1-mRNA abhängig von p38-Stoffwechselwegen (Abb. 18). Basierend auf diesen Ergebnissen sollte nun untersucht werden, ob die durch Simvastatin erhöhte HO-1-Promotoraktivität ebenfalls an p38 gebunden ist. Als Hemmstoffe der p38-MAPK wurden die Pyridinylimidazol-Derivate SB203580 (20 µM) sowie SB202190 (1 µM) eingesetzt. Der spezifisch und kompetitiv wirkende Inhibitor SB202190 bindet ebenso wie SB203580 an der ATP-Bindungstasche des aktiven Zentrums von p38α und p38β (Lee et al. 1999).

Für die Charakterisierung des Einfluss von p38 auf die Stimulation der HO-1-Promotoraktivität (Abb. 15) wurden die transient transfizierten Zellen für 20 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorbehandelt und dann mit Simvastatin inkubiert.

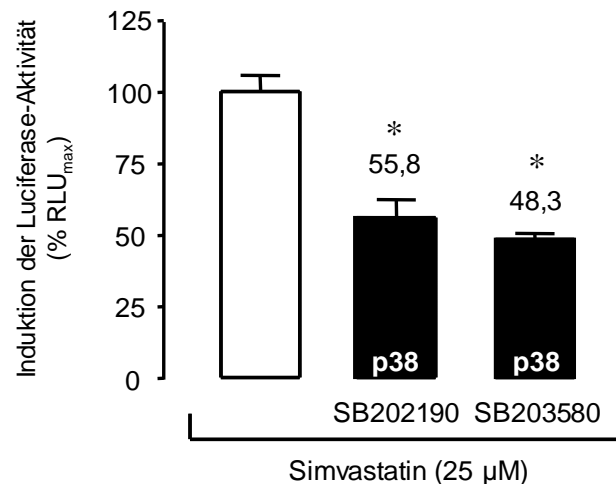


Abbildung 20: Effekt von p38-Inhibitoren auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-Promotoraktivität in ECV304-Zellen

ECV304-Zellen wurden transient mit einem humanen HO-1-Reportergenkonstrukt, welches die proximalen 4900 bp der humanen HO-1-Promotorregion enthält, transfiziert. ECV304-Zellen wurden für 18 Stunden mit Simvastatin (25 µM) inkubiert. Die Zugabe der p38-Inhibitoren SB203580 (20 µM) und SB202190 (1 µM) erfolgte 20 Minuten vor der Simvastatininkubation. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n≥3 Einzelexperimenten. * p≤0,05 Simvastatin + Hemmstoff vs. Simvastatin; einseitige ANOVA und Bonferronis multipler Vergleichstest.

Beide p38-Hemmstoffe konnten die durch Simvastatin-bedingte Stimulation der Luciferaseaktivität um ca. die Hälfte senken. In Gegenwart von SB202190 (1 µM) verringerten sich die relativen Lichteinheiten auf 55,8 %. Der Hemmstoff SB203580 (20 µM) bewirkte eine Reduktion auf 48,3 % im Vergleich zu den nicht vorinkubierten Kontrollzellen. Die Stimulation der HO-1-Promotorregion durch Simvastatin scheint demzufolge an p38-abhängige Signalwege gebunden zu sein.

Die MAPK p38 ist ein universell exprimiertes Signalmolekül, welches in den vier Isoformen p38α, p38β, p38δ und p38γ vorkommt und an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen in der Zelle beteiligt ist. Die Proteinkinase kann dabei sowohl in Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptosemechanismen integriert sein als auch stressbedingt durch u. a. proinflammatorische Zytokine oder reaktive Sauerstoffspezies aktiviert werden. Für die Induktion der HO-1 ist vor allem eine Beteiligung der Isoform p38α beschrieben. So konnten Immenschuh und Mitarbeiter die Notwendigkeit von p38α für die HO-1-Induktion in MEF-Zellen nachweisen (Naidu 2009). Ebenso wurde durch extrazelluläre Azidose in glatten Muskelzellen der Aorta eine p38α-abhängige Stimulation der HO-1 nachgewiesen (Guan 2008).

Neben dem Einsatz spezifischer Inhibitoren können auch durch Knockout-Modelle Regulationsschritte und mechanistische Zusammenhänge untersucht werden. Der Einsatz von p38α-defizienten MEF-Zellen (p38α-MEF^{-/-}), in denen die Isoform p38α überexprimiert dominant negativ vorlag, sollte als Kontrolle der bereits mit p38-Antagonisten gewonnenen Daten dienen. Für die Promotorstudien wurden in Wildtyp- (p38-MEF^{+/+}) und p38-defizienten MEF-Zellen die proximalen 4045 bp des murinen HO-1-Promotors in Form eines Luciferase-gekoppelten Reportergenkonstrukts transient transfiziert.

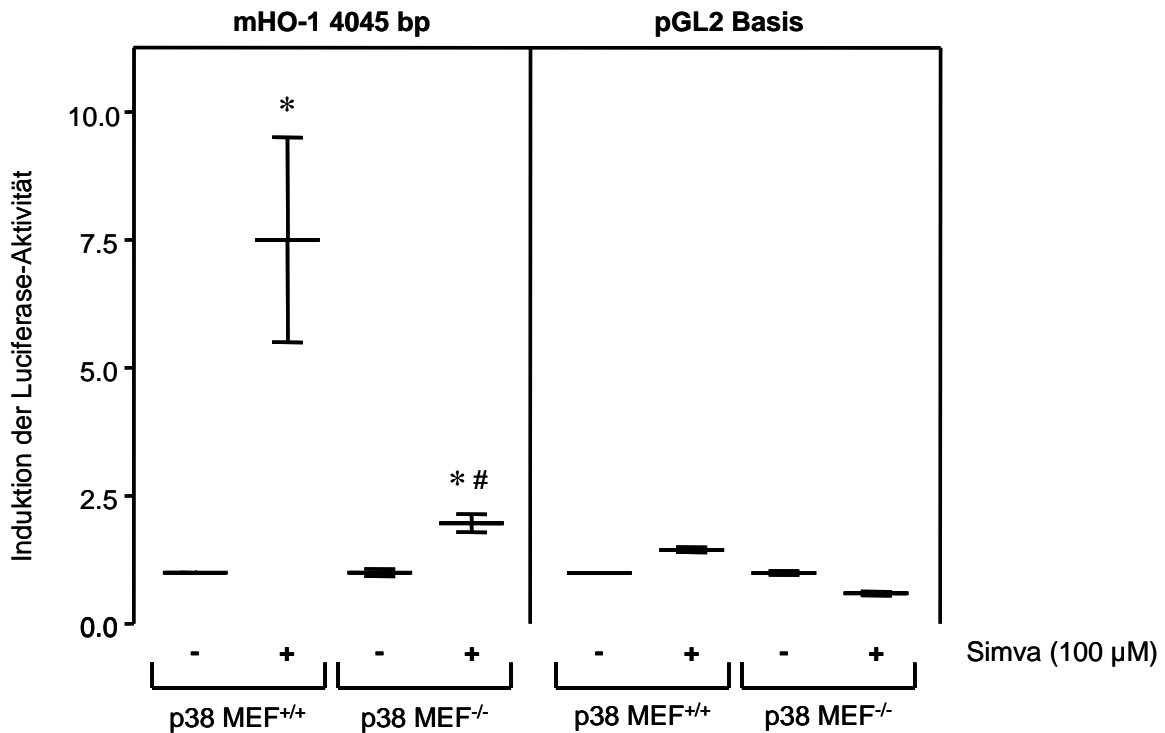


Abbildung 21: Effekt von Simvastatin auf die HO-1-Promotoraktivität in transient transfizierten Wildtyp- und p38 α -defizienten MEF-Zellen

p38-MEF^{+/+} und p38-MEF^{-/-} wurden transient mit dem murinen HO-1-Reportergenkonstrukt transfiziert, welches die proximalen 4045 bp HO-1-Promotorregion der Maus enthält. Die Inkubationszeit von Simvastatin betrug 18 Stunden. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin vs. KON; # $p \leq 0,05$ Simvastatin p38-MEF^{+/+} vs. Simvastatin p38-MEF^{-/-}; einseitige ANOVA und Bonferronis multipler Vergleichstest.

In Wildtyp-MEF-Zellen (p38-MEF^{+/+}) erhöhte Simvastatin die Promotoraktivität um das 7,5-fache im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. In p38-dominant negativen MEF-Zellen (p38-MEF^{-/-}) konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Luciferase-Aktivität in Gegenwart von Simvastatin beobachtet werden, der jedoch deutlich geringer ausfiel (2-fach). Der Vergleich des Simvastatineffektes in Wildtyp- und p38-defizienten Zellen ergab eine signifikant verringerte Luciferase-Aktivität in der dominant-negativen Zelllinie, wodurch die mit p38-Inhibitoren beobachteten Effekte bestätigt werden konnten. Eine Stimulation des pGL2-Basisvektors war nicht vorhanden.

4.2.1.4 Einfluss von p38-Stoffwechselwegen auf die HO-1-Proteininduktion

Nachfolgende Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob p38-abhängige Signalwege nicht nur für die HO-1-Promotraktivität und HO-1-mRNA-Synthese essenziell sind, sondern ob sie auch für die translationale Regulation der HO-1-Proteinexpression benötigt werden. Hierfür wurden Wildtyp- (p38-MEF^{+/+}) und p38 α -dominant negative (p38-MEF^{-/-}) MEF-Zellen mit Simvastatin für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde mithilfe der Western-Blot-Methode das HO-1-Protein detektiert.

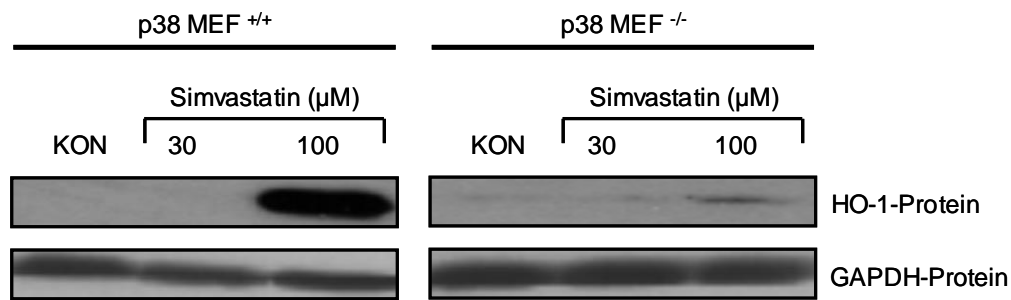


Abbildung 22: Effekt von Simvastatin auf die HO-1-Proteinexpression in Wildtyp- und p38 α -defizienten MEF-Zellen

p38-MEF^{+/+} und p38-MEF^{-/-} wurden 24 Stunden mit Simvastatin inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Western-Blots mit den dazugehörigen GAPDH-Ladungskontrollen von n \geq 3 Einzelexperimenten.

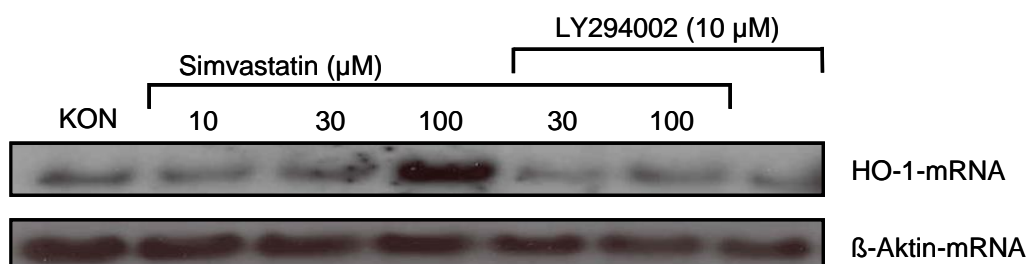
Simvastatin stimuliert in einer Konzentration von 100 μ M die HO-1-Proteinexpression im Fibroblastenwildtyp. In p38 α -defizienten MEF-Zellen konnte bei gleicher Konzentration keine Induktion des HO-1-Proteins festgestellt werden, sodass p38-abhängige Stoffwechselwege auch für die Simvastatin-vermittelte HO-1-Proteinexpression benötigt werden.

4.2.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Akt

Eine weitere Phosphorylierungskaskade, die häufig in der HO-1-Genexpression eine Rolle spielt, ist der Signalweg der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Mithilfe eines Phospho-Akt-Antikörpers sollte überprüft werden, ob Simvastatin in der Lage ist den PI3K/Akt-Weg zu aktivieren und inwieweit spezifische Inhibitoren einen Einfluss auf die Simvastatin-abhängige HO-1-Expression haben.

4.2.2.1 Einfluss von PI3K/Akt-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA-Induktion

Ein spezifischer PI3K-Inhibitor ist das synthetische Quercetinderivat LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on), welches durch Blockade der ATP-Bindungsstelle eine kompetitive Hemmung des Enzyms bewirkt (Vlahos 1994). Für die Wirkung von LY294002 auf die Simvastatin-vermittelte HO-1-mRNA-Induktion wurden ECV304-Zellen mit dem Inhibitor LY294002 vorinkubiert und der mRNA-Gehalt anschließend mit der Northern-Blot-Methode detektiert.



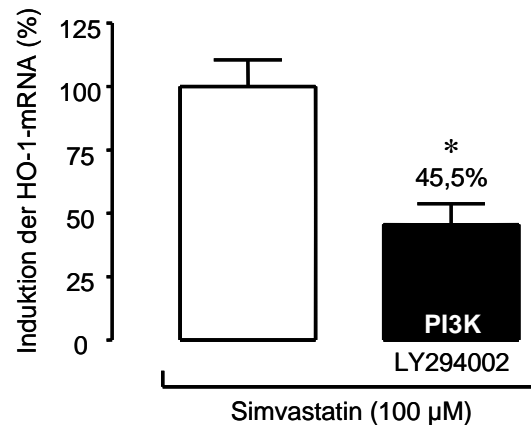


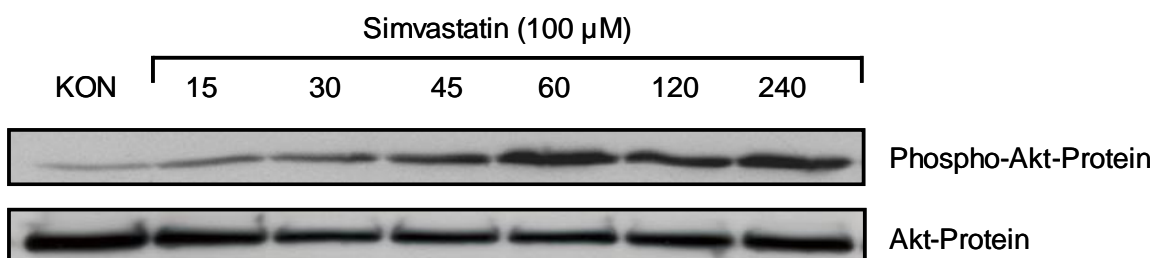
Abbildung 23: Effekt des PI3K-Inhibitors LY294002 auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA

ECV304-Zellen wurden nach 20-minütiger Vorinkubation mit LY294002 (10 µM) für weitere acht Stunden mit Simvastatin (100 µM) inkubiert. Dargestellt sind ein repräsentativer Northern-Blot mit der dazugehörigen Ladungskontrolle sowie die densitometrische Auswertung der Gesamtexperimente. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin + LY294002 vs. Simvastatin; einseitige ANOVA und Bonferronis multipler Vergleichstest.

Die Simvastatin-bedingte HO-1-mRNA-Expression ist in Gegenwart des PI3K-Inhibitors LY294002 verringert. Die densitometrische Auswertung der Experimente ergibt eine 55 %ige Senkung des mRNA-Gehalts bei Co-Inkubation mit LY294002 im Vergleich zu den mit Simvastatin-behandelten Kontrollzellen.

4.2.2.2 Einfluss von Simvastatin auf die Aktivierung von Akt

Die Aktivierung von Akt erfolgt durch Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und dualer Phosphorylierung (Thr308, Ser473) durch PDK1 und PDK2. Diese Stimulation kann durch phosphospezifische Antikörper auf translationaler Ebene nachgewiesen werden. Die Aktivierungszeit liegt wie bei den MAPK im Minutenbereich. ECV304-Zellen wurden deshalb über einen Zeitraum von 15 bis 240 Minuten mit Simvastatin (100 µM) inkubiert. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung von Akt mit einem phosphospezifischen Akt-Antikörper gegen Threonin308 (Thr308) überprüft.



	KON	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min	240 min
Phospho-Akt	1	1,18 ± 0,06	1,16 ± 0,05	1,3 ± 0,08	1,87 * ± 0,18	2,63 * ± 0,74	1,91 * ± 0,28

Abbildung 24: Effekt von Simvastatin auf die Phosphorylierung von Akt in ECV304-Zellen

Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 15 bis 240 Minuten mit Simvastatin (100 μ M) inkubiert. Dargestellt sind ein repräsentativer Western-Blot mit der dazugehörigen Akt-Ladungskontrolle sowie die densitometrische Auswertung. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin + Hemmstoff vs. Simvastatin; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Die Aktivierungszeit betrug wie bei p38 und ERK 60 Minuten. Simvastatin ist somit in der Lage durch Phosphorylierungsschritte Akt zu aktivieren.

4.2.2.3 Einfluss von PI3K/Akt-Stoffwechselwegen auf die HO-1-Promotoraktivität

Für die Untersuchung der HO-1-Promotoraktivität hinsichtlich des PI3K/Akt-Weges wurde neben dem Hemmstoff LY294002 auch Wortmannin eingesetzt, welches mit der katalytischen p110 α -Untereinheit interagiert und PI3K irreversible hemmt.

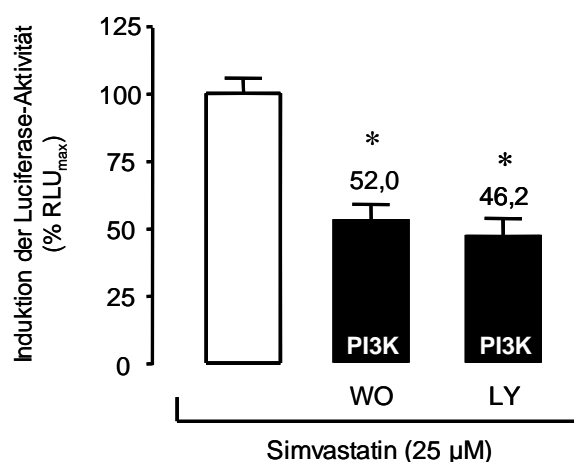


Abbildung 25: Effekt von PI3K-Inhibitoren auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-Promotoraktivität in ECV304-Zellen

ECV304-Zellen wurden transient mit dem humanen HO-1-Reportergenkonstrukt transfiziert, welches die proximalen 4900 bp der humanen HO-1-Promotorregion enthält. Die Inkubationszeit von Simvastatin betrug 18 Stunden. Die Zugabe der PI3K-Inhibitoren Wortmannin (10 nM) und LY294002 (10 μ M) erfolgte 20 Minuten vor der Simvastatininkubation. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin + Hemmstoff vs. Simvastatin; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Sowohl LY294002 als auch das Pilzgift Wortmannin antagonisieren den stimulierenden Effekt von Simvastatin auf die HO-1-Promotorregion. Die durch Simvastatin-induzierte Luciferase-Aktivität wurde bei beiden PI3K-Inhibitoren um ca. 50 % verringert.

4.2.3 Weitere Stoffwechselwege und Regulationselemente

Die HO-1-Genexpression kann über verschiedene Transduktionswege aktiviert werden. Neben den Phosphorylierungskaskaden der MAPK und PI3K/Akt spielen je nach Stimuli u. a. die Proteinkinase A, C, G sowie das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System für die HO-1-Induktion eine Rolle (Wiesel 2000; Wijayanti 2005; Kocanova 2007; Lee 2008). Ob diese Enzyme auch an der Signalvermittlung durch Simvastatin beteiligt sind, wurde mit spezifischen Inhibitoren auf mRNA-Ebene untersucht. Mithilfe mutierter Reportergenkonstrukte sollten die Bereiche der HO-1-Promotorregion nachgewiesen werden, die für die Simvastatin-vermittelte Promotoraktivierung essenziell sind.

4.2.3.1 Adenylatcyclase und Proteinkinase A

Der *second messenger* cAMP wird durch die Adenylatcyclase (AC) gebildet und besitzt wichtige Funktionen für den Stoffwechsel und die Genexpression in der Zelle. Die Proteinkinase A (cAMP-abhängige Kinase, PKA) wird als Zielstruktur von cAMP aktiviert und ist ebenfalls ein bedeutendes Transduktionsmolekül zellulärer Vorgänge. In den vergangenen Jahren konnten diverse Arbeitsgruppen eine cAMP-Abhängigkeit sowie eine Beteiligung der PKA an der HO-1-Induktion nachweisen (Durante 1997; Kronke 2003; Grosser 2004c).

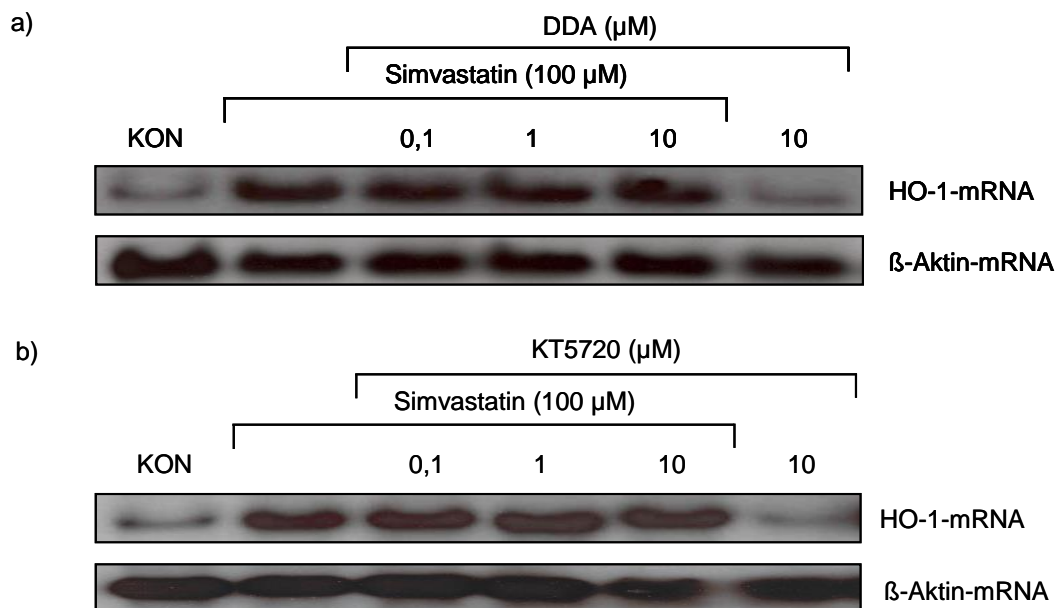


Abbildung 26: Effekt des AC-Inhibitors a) DDA und b) PKA-Inhibitors KT5720 auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA

ECV304-Zellen wurden nach 20-minütiger Vorinkubation mit a) DDA bzw. b) KT5720 für weitere acht Stunden mit Simvastatin (100 µM) inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Northern-Blots mit der dazugehörigen Ladungskontrolle von $n \geq 3$ Einzelexperimenten.

Inwieweit die Simvastatin-abhängige HO-1-Induktion ebenfalls über cAMP-abhängige Signalwege reguliert wird, sollte mithilfe des AC-Inhibitors 2',5'-Dideoxyadenosin (DDA) und des PKA-Inhibitors KT5720 untersucht werden. DDA bewirkt eine kompetitive Hemmung der AC, indem es als Agonist mit der

Adenosin-Bindestelle reagiert (Florio 1983; Johnson 1989). Die PKA wird durch den spezifischen Hemmstoff KT5720 ebenfalls kompetitiv inhibiert (Kase 1987).

Die Endothelzellen ECV304 wurden mit dem jeweiligen Hemmstoff vorinkubiert und im Anschluss mit Simvastatin versetzt. In dem gewählten Konzentrationsbereich konnte weder in Gegenwart des AC-Inhibitor DDA noch des PKA-Inhibitor KT5720 ein Einfluss auf die Simvastatin-abhängige Induktion der HO-1-mRNA nachgewiesen werden.

4.2.3.2 Guanylatcyclase und Proteinkinase G

Die Guanylatcyclase (GC) katalysiert die Bildung des *second messengers* cGMP, der in der Lage ist die Proteinkinase G (cGMP-abhängige Kinase, PKG) zu aktivieren. Verschiedene Studien belegen eine Beteiligung cGMP-abhängiger Signalwege an der HO-1-Induktion (Immenschuh 1998; Polte 2000; Polte 2002). Mithilfe von ODQ, einem Inhibitor der löslichen GC (sGC) und KT5823, einem PKG-Inhibitor, sollte die Bedeutung cGMP-abhängiger Mechanismen für die Simvastatin-vermittelte HO-1-Induktion untersucht werden (Kase 1987; Garthwaite 1995). Die Inhibition der häm-haltigen sGC durch ODQ erfolgt durch Oxidation des Zentralions Fe^{2+} (Zhao 2000). Der PKG-Hemmstoff KT5823 reagiert mit der ATP-Bindungsstelle der katalytischen Untereinheit und verhindert somit eine weitere Aktivität des Enzyms (Burkhardt 2000).

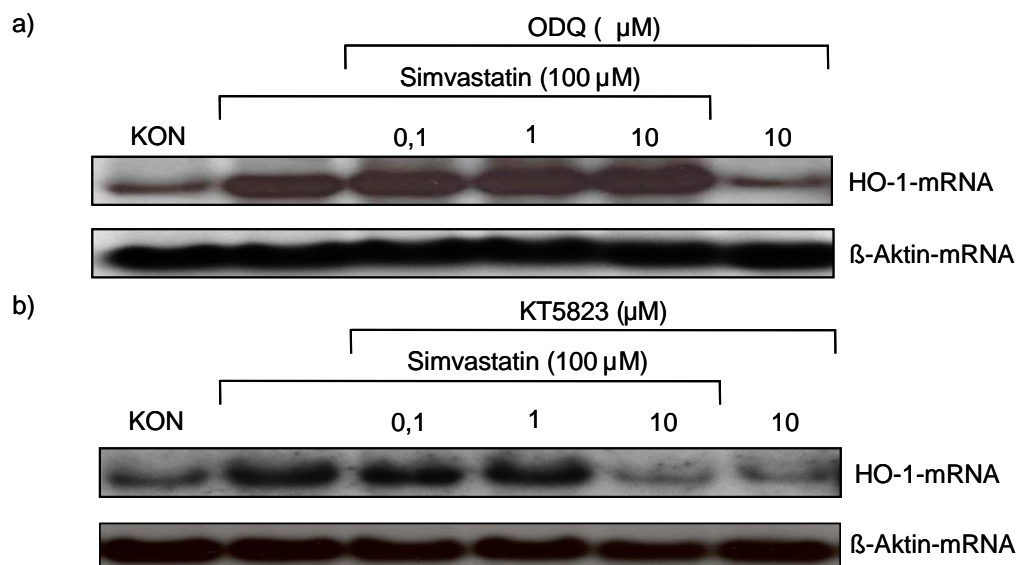


Abbildung 27: Effekt des Guanylatcyclase-Inhibitors a) ODQ und des PKG-Inhibitors b) KT5823 auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA

ECV304-Zellen wurden nach 20-minütiger Vorinkubation mit a) DDA bzw. b) KT5720 für weitere acht Stunden mit Simvastatin (100 μM) inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Northern-Blots mit der dazugehörigen Ladungskontrolle von $n \geq 3$ Einzelexperimenten.

Die Induktion der HO-1-mRNA durch Simvastatin konnte durch den sGC-Inhibitor ODQ nicht antagonisiert werden. Interessanterweise bewirkte jedoch der PKG-

Inhibitor KT5823 bei einer Konzentration von 10 μM eine Verringerung der mRNA-Expression.

4.2.3.3 Proteinkinase C

Für verschiedene Induktoren wie z. B. TNF- α und IL-1 α konnte eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) an der HO-1-Expression nachgewiesen werden (Terry 1999). Das Bisindolylmaleimid GF109203X ist ein selektiver, kompetitiver Inhibitor, der mit der katalytischen Untereinheit der PKC reagiert (Toullec 1991).

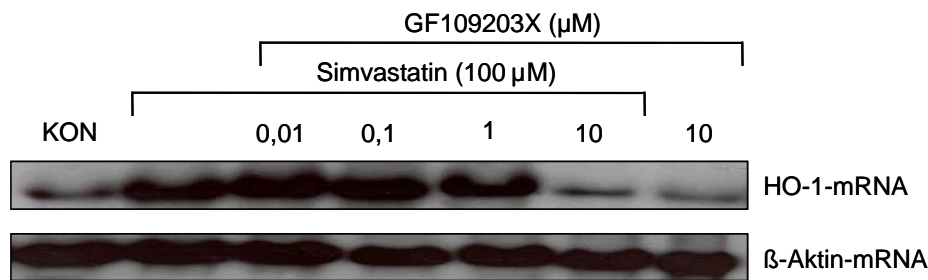


Abbildung 28: Effekt des PKC-Inhibitors GF109203 auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA

ECV304-Zellen wurden nach 20-minütiger Vorinkubation mit GF109203 für weitere acht Stunden mit Simvastatin (100 μM) inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Northern-Blot mit der dazugehörigen Ladungskontrolle von $n \geq 3$ Einzelexperimenten.

Der PKC-Inhibitor GF109203X zeigte ab einer Konzentration von 10 μM eine Verringerung der Simvastatin-vermittelten Induktion der HO-1-mRNA.

4.2.3.4 Thioredoxin/Thioredoxinreduktase System

Die HO-1 ist ein ROS-sensitives Enzym, dessen Induktion auch über redox-abhängige Signalwege reguliert werden kann. Verschiedene Studien konnten eine Beteiligung des intrazellulären Redoxsystems der Thioredoxin/Thioredoxinreduktase an der HO-1-Induktion nachweisen (Trigona 2006).

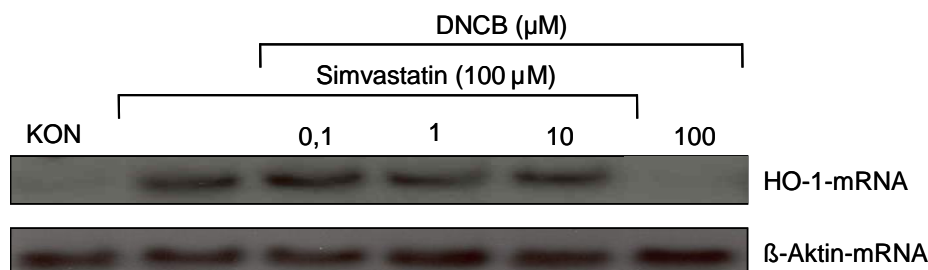


Abbildung 29: Effekt des TRX-Reduktase-Inhibitors DNCB auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA

ECV304-Zellen wurden nach 20-minütiger Vorinkubation mit DNCB für weitere acht Stunden mit Simvastatin (100 μM) inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Northern-Blot mit der dazugehörigen Ladungskontrolle von $n \geq 3$ Einzelexperimenten.

Durch Hemmung des TRX/TRX-Reduktase-Systems mithilfe des spezifischen Hemmstoff DNCB (1-Chlor-2,4-Dinitrobenzen) sollte ein möglicher Zusammenhang zur Simvastatin-abhängigen HO-1-Induktion untersucht werden. DNCB alkyliert die SH-Gruppe der TRX-Reduktase und bewirkt dadurch eine irreversible Hemmung des Enzyms (Arner 1995). Entsprechend den anderen Hemmstoffversuchen wurden die Endothelzellen ECV304 mit DNCB vorinkubiert und nach 20 Minuten für weitere acht Stunden mit Simvastatin versetzt. Nach Bestimmung des HO-1-mRNA-Gehalts konnte keine Veränderung der HO-1-mRNA-Expression Gegenwart des Thioredoxinreduktase-Inhibitors DNCB beobachtet werden.

4.2.3.5 Regulationselemente der Promotorregion

Verschiedene Studien belegen eine Beteiligung der Promotorelemente CRE und MARE an der Genregulation des HO-1-Enzyms (Kitamuro 2003; Kronke 2003). Mithilfe von Mutanten des humanen HO-1-Promotorkonstrukts (hHO-1-4,9 kb) sollte die Rolle von CRE und MARE in der Simvastatin-abhängigen Promotorstimulation untersucht werden.

Die Promotorstudien ergaben eine Beteiligung von MARE an der Aktivierung der humanen HO-1-Promotorregion durch Simvastatin. Mutationen im CRE-Bereich (Mutante1) hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität. Bei gleichzeitiger Mutation von MARE und CRE (Mutante1/2) wurde zwar numerisch die geringste Promotoraktivität detektiert, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zur Promotoraktivität der reinen MARE-Mutante (Mutante2) festgestellt werden.

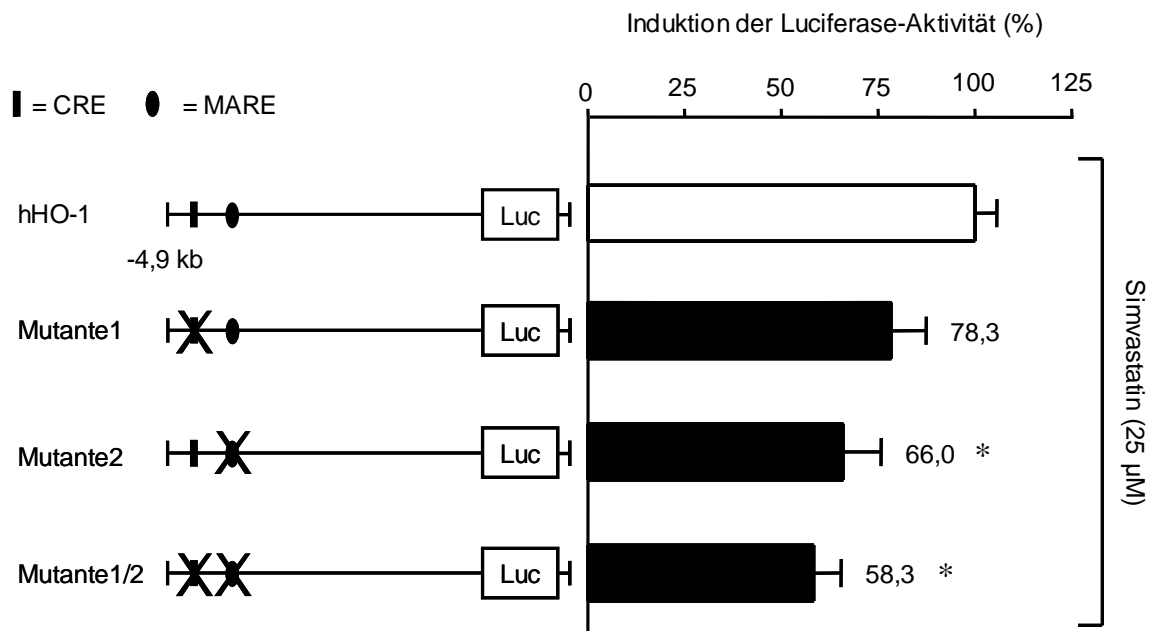


Abbildung 30: Effekt von Simvastatin auf die hHO-1-Promotoraktivität in transient transfizierten ECV304-Zellen

ECV304-Zellen wurden transient mit einem Reporter-genkonstrukt, welches die 5'-flankierenden 4900 bp der humanen HO-1-Promotorregion (hHO-1) enthält, transfiziert.

Weiterhin wurden Konstrukte eingesetzt, die Mutationen im CRE (Mutante1), MARE (Mutante2) sowie in beiden Bereichen (Mutante1/2) aufwiesen. Nach 18-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, lysiert und in Gegenwart von Luciferin vermessen. Die Stimulation von 25 μ M Simvastatin auf die Promotoraktivität des gesamten hHO-1-Konstrukts (4900 bp) wurde 100% gesetzt (siehe Abb. 15). Die Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt abgeglichen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelexperimenten. * $p \leq 0,05$ Simvastatin hHO-1 vs. Simvastatin Mutante; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

4.2.4 Zusammenfassung

Eine wichtige Rolle in der Simvastatin-vermittelten HO-1-Induktion scheint die p38-MAPK einzunehmen. Neben der Aktivierung von p38 durch Simvastatin konnte eine Senkung des Gehalts an HO-1-mRNA sowie der Promotoraktivität durch p38-Inhibitoren beobachtet werden. Versuche mit p38 α -defizienten Zellen bestätigten diese Ergebnisse. Die Induktion des HO-1-Proteins war im Wildtyp signifikant höher als in der p38 α -defizienten Zelllinie.

Eine geringere Bedeutung scheinen dagegen die MAPK ERK und JNK einzunehmen. Simvastatin war zwar in der Lage ERK zu aktivieren, jedoch besteht anscheinend kein kausaler Zusammenhang zur HO-1-Induktion, da der ERK-Inhibitor PD098590 die Simvastatin-induzierte mRNA-Expression nicht signifikant senken konnte. Für JNK konnte weder eine Proteinaktivierung noch ein signifikanter Inhibitoreinfluss auf die Simvastatin-abhängige HO-1-Genexpression nachgewiesen werden.

Neben der p38-MAPK scheint auch der PI3K/Akt-Weg ein weiterer Bestandteil der HO-1-Genregulation durch Simvastatin zu sein. Simvastatin führte zu einer Aktivierung von Akt auf Proteinebene. Zusätzlich konnten PI3K-Inhibitoren die Simvastatin-abhängigen Effekte auf die HO-1-Genexpression antagonisieren.

Untersuchungen weiterer potentieller Transduktionswege mithilfe von spezifischen Inhibitoren ergaben eine mögliche Beteiligung der PKC und PKG an der Simvastatin-abhängigen HO-1-Induktion. Weiterhin konnte durch den Einsatz von Mutanten des humanen HO-1-Promotors in Promotorstudien die regulatorische Einheit MARE als wichtiges Element für die transkriptionale Aktivierung der HO-1-Promotoraktivität identifiziert werden.

4.3 Post-transkriptionale Mechanismen der HO-1-Genregulation

Statine sind in der Lage durch mRNA-stabilisierende Effekte nicht nur die HO-1 zu beeinflussen, sondern auch andere Zielstrukturen zu regulieren. Eine Verlängerung der mRNA-HWZ konnte u. a. für die eNOS, iNOS und knochenmorphogenetische Proteine durch Statine nachgewiesen werden (Laufs 1998; Hu 2006; Habara 2008). Zu den Signalkaskaden, die häufig in die Stabilisierung von mRNA involviert sind, gehören u. a. der MAPK- und PI3K-Weg sowie die PKC (Winzen 1999; Lasa 2000; Cao 2007). Auch Stickstoffmonoxid-abhängige Schritte der HWZ-Verlängerung sind bekannt. In humanen Fibroblastenzellen konnte unter direkter Einwirkung von NO die HO-1-mRNA stabilisiert werden (Bouton 2000). Auch in humanen Gefäßmuskelzellen wurde unter Exposition mit NO-Donoren eine HWZ-Verlängerung der HO-1-mRNA beobachtet. (Hartsfield 1997). Ziel der folgenden Untersuchungen war es, den Mechanismus für die Simvastatin-vermittelte Stabilisierung der HO-1-mRNA (siehe Abb. 16) zu identifizieren.

4.3.1 Einfluss von NO-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA-Stabilität

Um Stickstoffmonoxid (NO) als möglichen Botenstoff der Simvastatin-bedingten HO-1-mRNA-Stabilisierung auszuschließen, wurde die NO-Synthase (NOS) durch den Hemmstoff N^G-Nitro-L-arginin-methylester (L-NAME) blockiert (Rees 1990). L-NAME ist ein am terminalen Guanidin-Stickstoff substituiertes Argininderivat und bewirkt eine kompetitive Hemmung der NOS.

Für die Untersuchung der simvastatin-vermittelten HWZ-Verlängerung wurden die Endothelzellen ECV304-Zellen für 20 Minuten mit dem Hemmstoff L-NAME vorinkubiert.

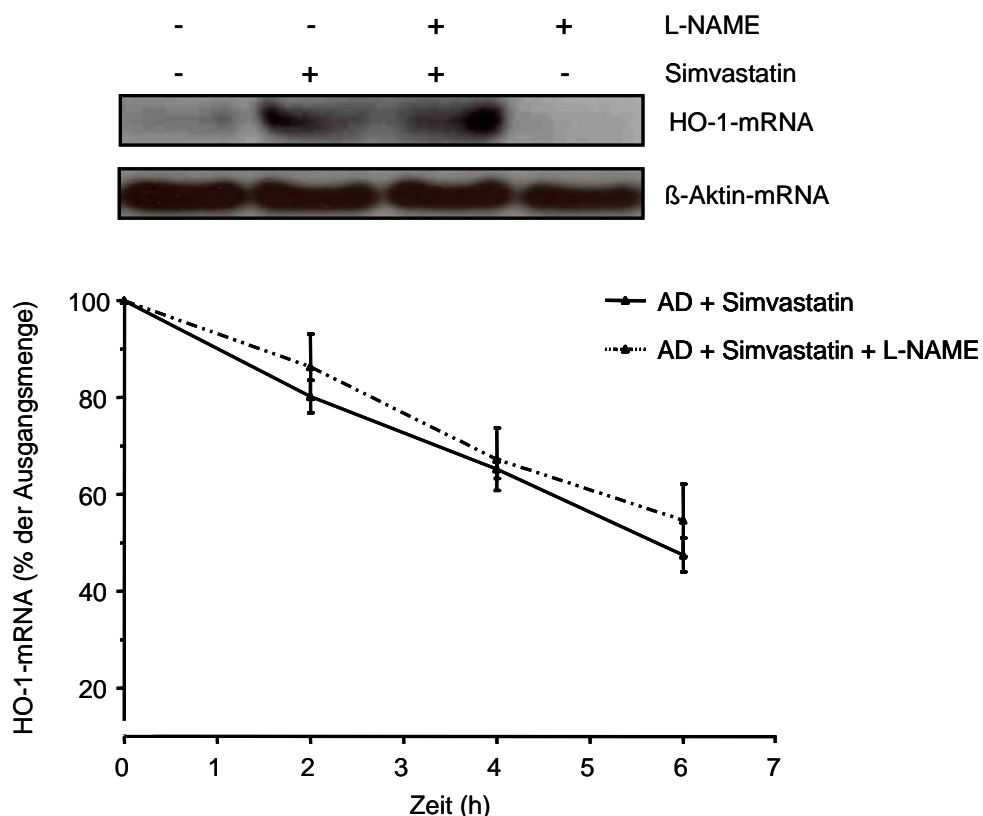


Abbildung 31: Effekt des NO-Synthasehemmstoffes L-NAME auf die Simvastatin-vermittelte HWZ-Verlängerung der HO-1-mRNA

ECV304-Zellen wurden für sechs Stunden mit Simvastatin (100 µM) vorinkubiert. Im Anschluss wurde das Medium gewechselt, AD (1 µg/ml) und L-NAME (1 mM) zu gegeben sowie 20 Minuten später Simvastatin (100 µM). Die Zellen wurden nach zwei, vier und sechs Stunden geerntet. Abgebildet sind ein repräsentativer Northern-Blot nach sechs Stunden Inkubationszeit mit β-Aktinabgleich sowie die densitometrische Auswertung des mRNA-Abbaus. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n≥3 Einzelerperimenten; einseitige ANOVA und Bonferronis multipler Vergleichstest. Die jeweiligen HWZ wurden aus der graphischen Abbildung bestimmt.

In Gegenwart des NO-Synthasehemmers L-NAME konnte zu den untersuchten Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied des HO-1-mRNA-Abbaus im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Die HWZ bei Simvastatininkubation ohne Hemmstoff betrug 5,7 Stunden und in Gegenwart des Inhibitors L-NAME 6,5 Stunden.

4.3.2 Einfluss von p38-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA-Stabilität

Eine Vielzahl von Studien belegt eine p38-Beteiligung an der post-transkriptionalen Stabilisierung von mRNA. Die p38-MAPK ist u. a. essenziell für die mRNA-Stabilisierung der COX-2 (Ridley 1998), IL-6 (Miyazawa 1998) und TNF- α , (Brook 2006). Für die Untersuchung, ob der p38-Signalweg in die Stabilisierung der HO-1-mRNA durch Simvastatin involviert ist, wurde der Hemmstoff SB203580 verwendet.

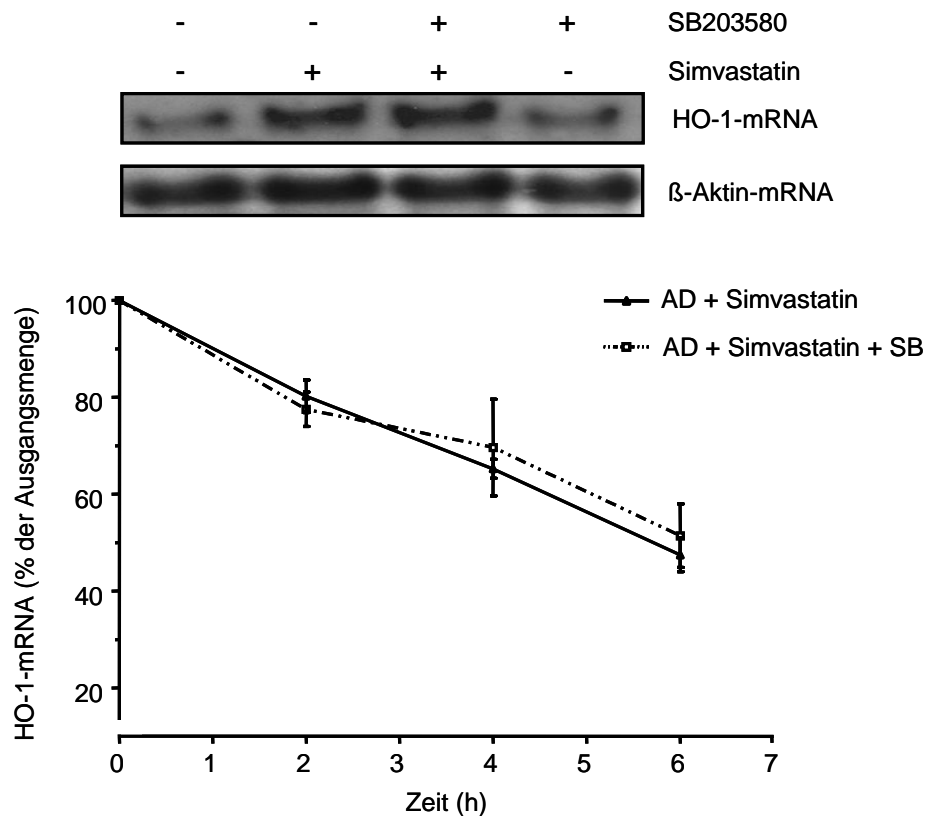


Abbildung 32: Effekt des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 auf die Simvastatin-vermittelte HWZ-Verlängerung der HO-1-mRNA

ECV304-Zellen wurden für sechs Stunden mit Simvastatin (100 μ M) vorinkubiert. Im Anschluss wurde das Medium gewechselt, AD (1 μ g/ml) und SB203580 (20 μ M) zu gegeben sowie 20 Minuten später Simvastatin (100 μ M). Die Zellen wurden nach zwei, vier und sechs Stunden geerntet. Abgebildet sind ein repräsentativer Northern-Blot nach sechs Stunden Inkubationszeit mit β -Aktinabgleich sowie die densitometrische Auswertung des mRNA-Abbaus. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelerperimenten; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die jeweiligen HWZ wurden aus der graphischen Abbildung bestimmt.

Die Co-Inkubation mit dem p38-Inhibitor SB203580 zeigte keine signifikante Veränderung auf den Verlauf des mRNA-Abbaus im Vergleich zu den mit Simvastatin-behandelten Kontrollzellen. In Gegenwart des p38-Inhibitors war die Hälfte der HO-1-mRNA nach 6,3 Stunden abgebaut. Die HZW für die mit Simvastatin-behandelten Kontrollzellen betrug 5,7 Stunden.

4.3.3 Einfluss von PI3K/Akt-Stoffwechselwegen auf die HO-1-mRNA-Stabilität

Der PI3K-Weg ist Bestandteil der HO-1-mRNA-Induktion durch Simvastatin (Abb. 23). Inwieweit die Verringerung des mRNA-Gehalts in Gegenwart des PI3K-Inhibitors LY294002 ausschließlich auf Transkriptionsabläufe zu beschränken ist oder ob auch post-transkriptionale Prozesse beteiligt sind, sollte am Stabilitätsmodell untersucht werden.

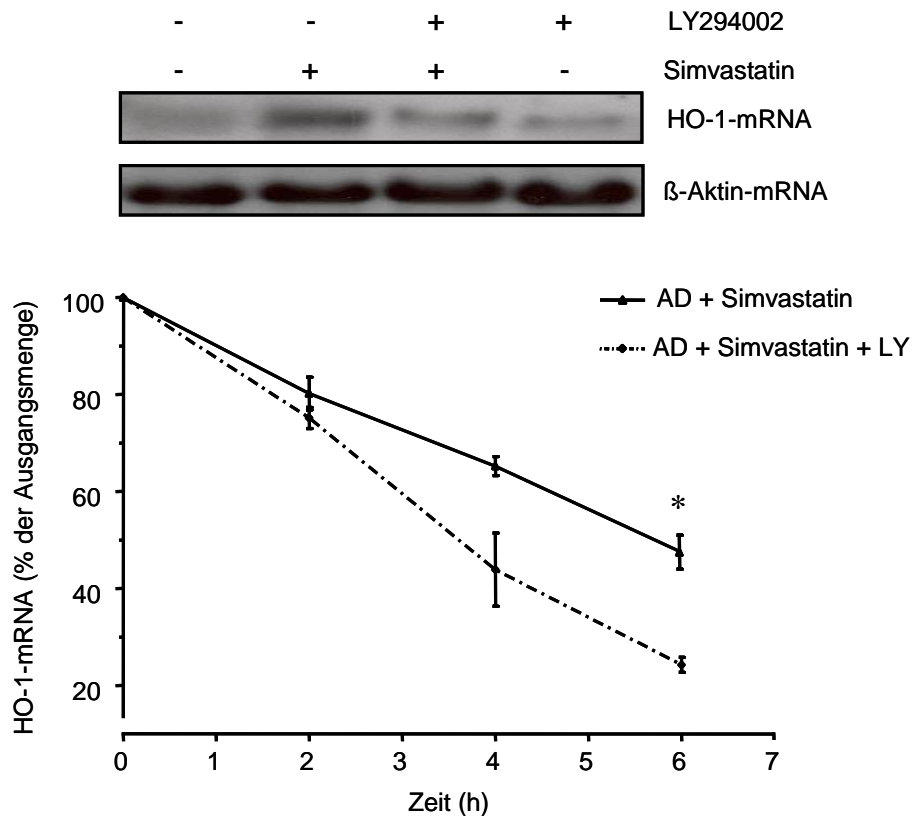


Abbildung 33: Effekt des PI3K-Inhibitors LY294002 auf die Simvastatin-vermittelte HWZ-Verlängerung der HO-1-mRNA

ECV304-Zellen wurden für sechs Stunden mit Simvastatin (100 μ M) vorinkubiert. Im Anschluss wurde das Medium gewechselt, AD (1 μ g/ml) und LY294002 (10 μ M) zugegeben sowie 20 Minuten später Simvastatin (100 μ M). Die Zellen wurden nach zwei, vier und sechs Stunden geerntet. Abgebildet sind ein repräsentativer Northern-Blot nach sechs Stunden Inkubationszeit mit β -Aktinabgleich sowie die densitometrische Auswertung des mRNA-Abbaus. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n \geq 3$ Einzelerperimenten. * $p \leq 0,05$ AD + Simvastatin vs. AD + Simvastatin + LY294002; einseitige ANOVA und Bonferronis multipler Vergleichstest. Die jeweiligen HWZ wurden anhand der graphischen Abbildung bestimmt.

Der PI3K-Inhibitor LY294002 antagonisiert die stabilisierende Wirkung von Simvastatin auf die HO-1-mRNA. Bei Blockade des PI3K-Weges (HWZ 3,9 Stunden; Abb. 33) entspricht der mRNA-Gehalt nach sechs Stunden in etwa der AD-Kontrolle (HWZ 3,4 Stunden Abb. 16), sodass der stabilisierende Effekt von Simvastatin (HWZ 5,7 Stunden Abb. 16, 33) nahezu vollständig aufgehoben wurde.

4.3.4 Zusammenfassung

Die für p38 häufig beschriebene Beteiligung an der mRNA-Stabilisierung konnte für die Simvastatin-vermittelte HWZ-Verlängerung der HO-1-mRNA nicht bestätigt werden. In Gegenwart des p38-Inhibitor SB203580 wurde keine Veränderung im Abbau der HO-1-mRNA beobachtet, sodass p38-abhängige Mechanismen verstärkt auf translationaler und transkriptionaler Ebene (siehe 4.2.1.2.-4.) der Simvastatin-vermittelten HO-1-Induktion eine Rolle zu spielen scheinen. Auch der NO-Synthasehemmers L-NAME zeigte keinen Einfluss auf HO-1-mRNA-Stabilität in Gegenwart von Simvastatin.

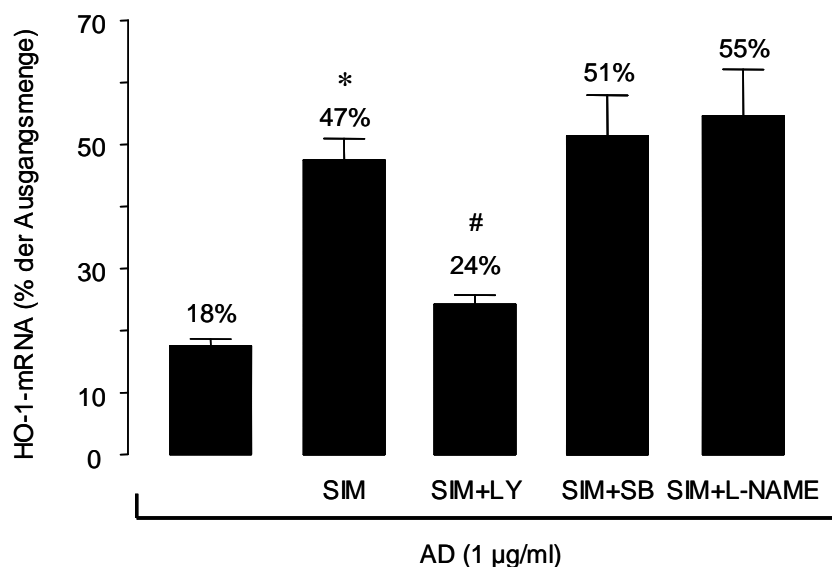


Abbildung 34: Zusammenfassung der Inhibitoreffekte auf die Simvastatin-vermittelte Stabilisierung der HO-1-mRNA

Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Wirkung von LY294002 (10 µM), SB203580 (20 µM) und L-NAME (1 mM) auf die HO-1-mRNA-Stabilisierung durch Simvastatin (100 µM) nach 6 h Inkubationszeit. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n≥3 Einzelexperimenten. * p≤0,05 AD + Simvastatin vs. AD; # * p≤0,05 AD + Simvastatin vs. AD + Simvastatin + LY294002; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Die mechanistischen Untersuchungen ergaben jedoch eine Beteiligung des PI3K-Weges an den post-transkriptionalen Simvastatineffekten. Die stabilisierende Wirkung von Simvastatin auf die HO-1-mRNA war in Gegenwart des PI3K-Inhibitors LY294002 signifikant verringert im Vergleich zu den mit Simvastatin behandelten Kontrollzellen. Somit scheint der Signalweg der PI3K/Akt sowohl für die transkriptionale als auch post-transkriptionale HO-1-Regulation durch Simvastatin eine wichtige Rolle zu spielen. Die densitometrischen Auswertungen der einzelnen Inhibitoreffekte auf den HO-1-mRNA-Abbau sind in Abb. 34 zusammenfassend dargestellt. Der HO-1-mRNA-Gehalt nach 6-stündiger Vorinkubation mit Simvastatin wurde als Bezugswert 100 % gesetzt.

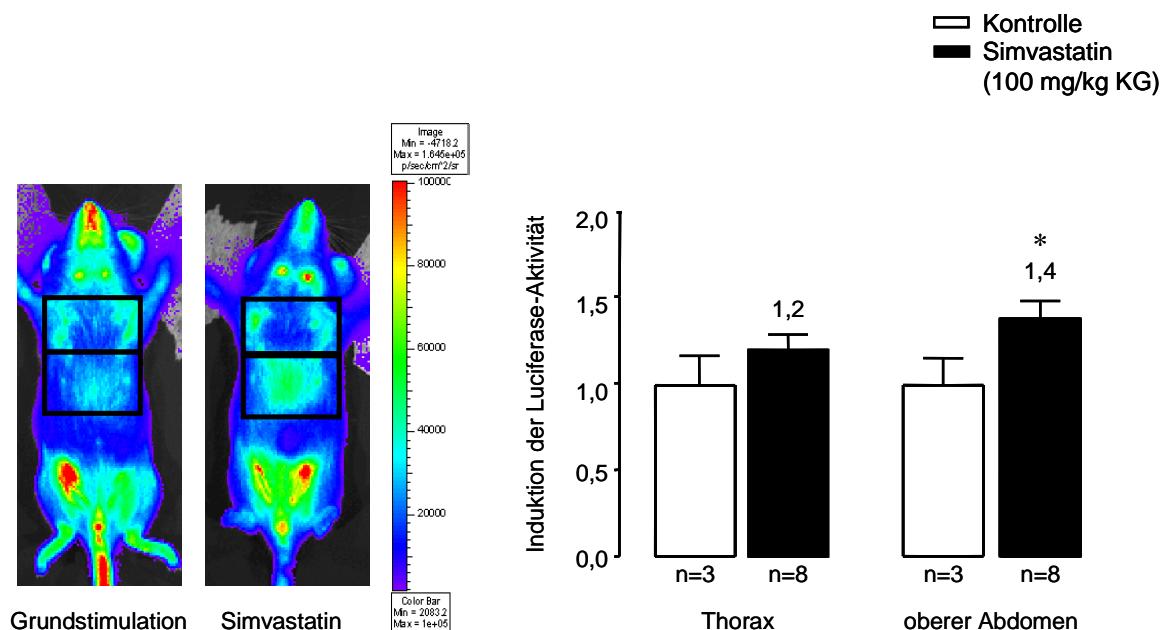
4.4 Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion *in vivo*

Für die Überprüfung der *in vivo* Relevanz der bisherigen Ergebnisse wurde an einem Mausmodell die Wirkung von Simvastatin auf die HO-Enzymaktivität sowie HO-1-mRNA untersucht. Der Einsatz transgener HO-1-Luc-Mäuse ermöglichte zusätzlich eine Charakterisierung des Simvastatineffektes auf die HO-1-Promotoraktivität in verschiedenen Körperregionen. Basierend auf bereits publizierten Dosierungsschemen von Simvastatin im Mausmodell wurde eine Bolusdosis von 100 mg Simvastatin/kg KG gewählt (Eckert 2001; Park 2003; Hsu 2006).

4.4.1 Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Promotoraktivität im Mausmodell

Mithilfe des *in vivo* Imaging System (IVIS) können zelluläre und genetische Aktivitäten am lebenden Organismus durch Biolumineszenz-Messung (BLI) untersucht werden. Transgene HO-1-Luc-Mäuse bilden in Abhängigkeit zur HO-1-Promotorregion das Lumineszenz-Enzym Luciferase, dessen Aktivität mit einem IVIS detektiert werden kann.

Für die Untersuchung möglicher Effekte von Simvastatin auf die HO-1-Promotoraktivität erhielten die transgenen Mäuse einmalig einen peroral applizierten Bolus von 100 mg Simvastatin/kg KG. Nach 6 Stunden erfolgte die intraperitoneale Gabe des Substrats Luciferin und die Messung der Photonenemission. Die Mäuse wurden für die Aufnahmen mit Natriumpentobarbital sediert. Die Grundstimulation an HO-1-Promotoraktivität wurde zwei Tage vor Versuchsdurchführung erfasst.



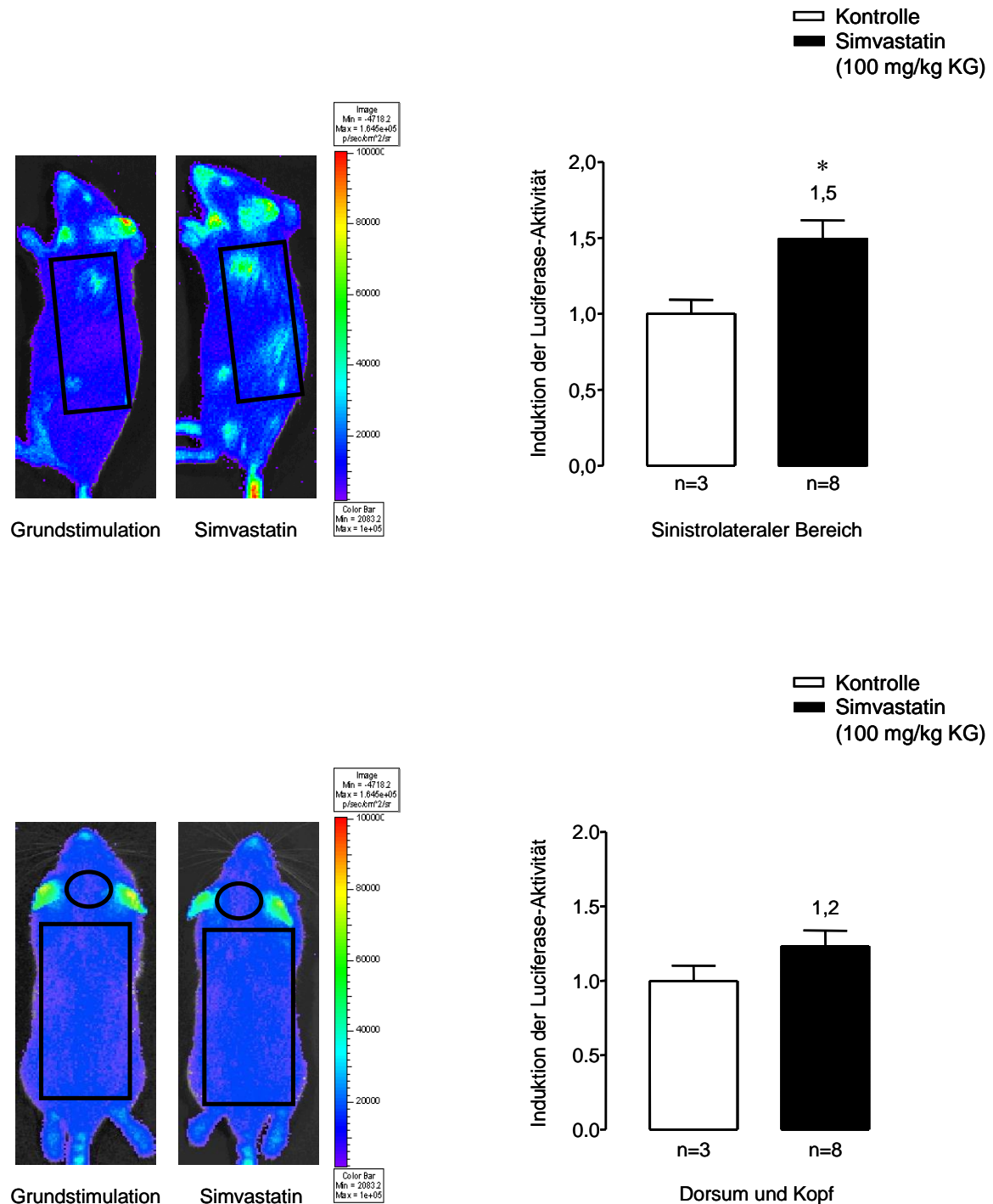


Abbildung 35: Effekt von Simvastatin auf die HO-1-Promotoraktivität in HO-1-Luc-Mäusen

HO-1-Luc-Mäuse erhielten peroral eine Dosis von 100 mg Simvastatin/kg KG. Nach sechs Stunden wurde Luciferin (150 mg/kg KG) und Natriumpentobarbital (50 mg/kg KG) intraperitoneal appliziert. Die Photonenemission der sedierten Mäuse wurde über einen Zeitraum von fünf Minuten im IVIS gemessen. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen des *in vivo* BLI aus dorsaler, lateraler und ventraler Lage. Die Ergebnisse des angegebenen Messbereiches sind als Vielfaches der Basalstimulation dargestellt und gegen die Kontrolltiere normalisiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Kontrolltieren und n=8 Simvastatin-behandelten Tieren. * $p \leq 0,05$ Simvastatin vs. KON; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

Im oberen Abdomen sowie im sinistrolateralen Bereich der transgenen Mäuse konnte eine signifikante ca. 1,5-fache Erhöhung der HO-1-Promotoraktivität nach Simvastatingabe festgestellt werden. Im Thorax-, Dorsum- und Kopfbereich waren hingegen keine signifikanten Unterschiede der HO-1-Promotoraktivität im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrolltieren nachweisbar.

4.4.2 Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-mRNA-Induktion im Mausmodell

Die im oberen Abdomen und im sinistrolateralen Bereich detektierte HO-1-Promotorstimulation nach Simvastatingabe ließ eine erhöhte HO-1-Transkription in dieser Körperregion vermuten. Im Anschluss an das *in vivo* BLI wurde deshalb der organspezifische Gehalt an HO-1-mRNA mittels real time RT-PCR bestimmt. Die Gewebeentnahme erfolgte sechs Stunden nach oraler Simvastatinapplikation (100 mg/kg KG).

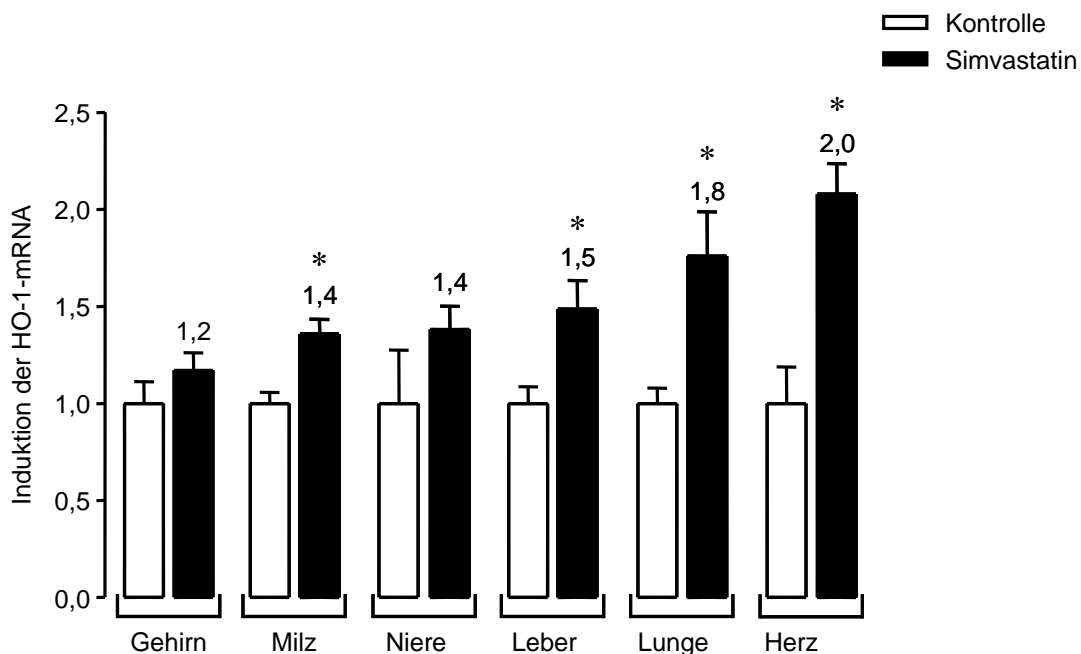


Abbildung 36: Organspezifischer Effekt von Simvastatin auf die HO-1-mRNA-Induktion im Mausmodell

HO-1-Luc-Mäuse erhielten peroral eine Dosis von 100 mg Simvastatin/kg KG. Die Inkubationszeit betrug sechs Stunden. Der HO-1-mRNA-Nachweis erfolgte mithilfe *real time* RT-PCR. Die Ergebnisse wurden gegen β -Aktin-mRNA abgeglichen und gegen die Kontrolltiere normalisiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ Kontrolltieren und $n \geq 6$ Simvastatin-behandelten Tieren (Herz $n=6$; Lunge, Leber, Gehirn, Milz, Niere $n=8$). * $p \leq 0,05$ Vehikel-behandelte Kontrolltiere vs. Simvastatin-behandelte Tiere; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

Im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrolltieren konnte in Milz, Leber und Lunge ein signifikanter Anstieg des HO-1-mRNA-Gehalts nach Simvastatingabe beobachtet werden. Der stärkste Effekt einer 2-fach erhöhten mRNA-Expression war im Herzgewebe detektierbar.

4.4.3 Einfluss von Simvastatin auf die HO-Aktivität im Mausmodell

Für die Klärung, ob der nachgewiesene Anstieg der HO-1-mRNA und HO-1-Promotoraktivität auch mit einer erhöhten Enzymaktivität korreliert, wurde das Reaktionsprodukt CO gaschromatographisch detektiert. Die Inkubationszeit von Simvastatin (100 mg/kg KG) wurde hierfür auf 24 Stunden erhöht, bevor die Gewebeentnahme erfolgte. Für die Detektion von nicht enzymatisch-gebildetem CO wurde das HO-Substrat NADPH gegen einen KPO_4^{2-} -Puffer ausgetauscht.

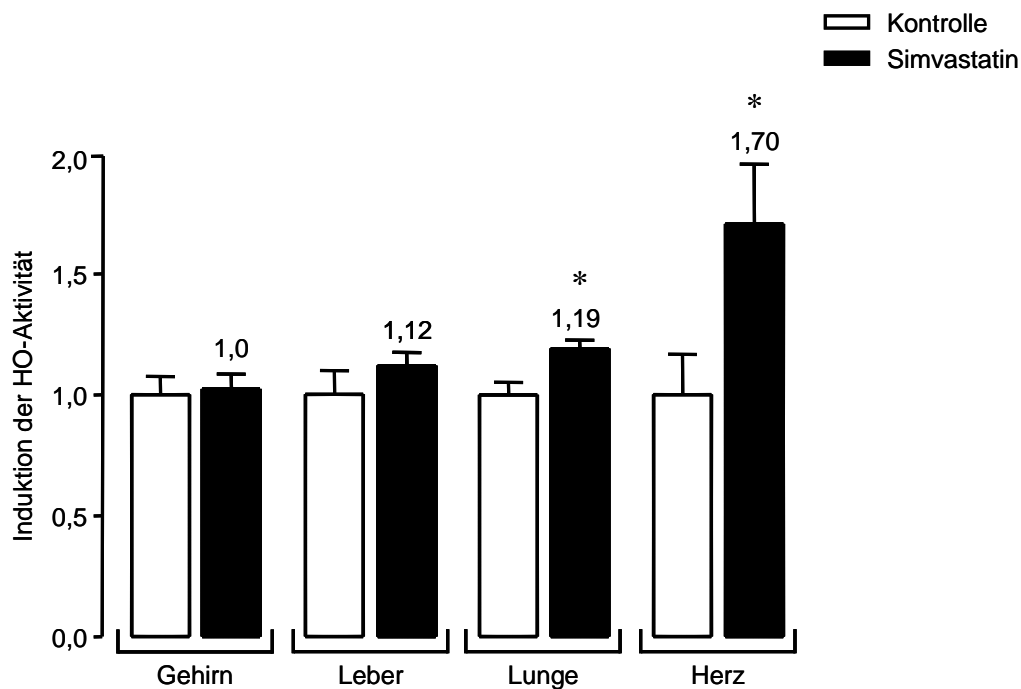


Abbildung 37: Organspezifische Effekte von Simvastatin auf die HO-Aktivität im Mausmodell (Hsu 2006)

HO-1-Luc-Mäuse erhielten peroral eine Bolusdosis von 100 mg/kg KG Simvastatin. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Die HO-Gesamtaktivität wurde durch gaschromatographische Detektion von CO (pmol CO/h/mg KG) bestimmt und gegen die Kontrolltiere normalisiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ Kontrolltieren und $n \geq 9$ Simvastatin-behandelten Tieren (Herz $n=9$; Lunge, Leber, Gehirn, $n=11$). * $p \leq 0,05$ Vehikel-behandelte Kontrolltiere vs. Simvastatin-behandelte Tiere; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

Im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrolltieren konnten im Lungen- und Herzgewebe ein signifikanter Anstieg der HO-Gesamtaktivität nach Simvastatingabe beobachtet werden, wobei die höchste Enzymaktivität (1,7-fach) im Herzgewebe zu beobachten war (Hsu 2006). Im Gehirn und in der Leber waren hingegen keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zu den vehikel-behandelten Kontrolltieren nachweisbar.

4.4.4 Zusammenfassung

Für die Überprüfung der *in vivo* Relevanz der bisherigen Ergebnisse wurde die Wirkung von Simvastatin an einem Mausmodell untersucht. Transgene HO-1-Luc-Mäuse erhielten eine perorale Bolusdosis von 100 mg Simvastatin/kg KG.

Promotoruntersuchungen der transgenen Mäuse zeigten eine Stimulation der HO-1-Promotoraktivität im oberen Abdomen und im sinistrolateralen Bereich. Die organspezifische Detektion des HO-1-mRNA-Gehalts ergab eine erhöhte Expression in Milz, Leber, Lunge und Herz. Weiterhin wurde die HO-Aktivität mithilfe gaschromatographischer CO-Detektion bestimmt. Nach Simvastatingabe konnte eine Erhöhung der totalen Enzymaktivität in der Lunge und im Herz beobachtet werden. Die *in vitro* nachgewiesene HO-1-Induktion von Simvastatin konnte somit auch *in vivo* bestätigt werden.

5 Diskussion

5.1 Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion

In den Industrieländern zählen kardiovaskuläre Erkrankungen zu den Hauptursachen von Morbidität und Mortalität, wobei vor allem atherosklerotische Gefäßveränderungen für die Mehrzahl der Todesfälle verantwortlich sind (Lusis 2000). Ein erhöhter Cholesterolspiegel, speziell von LDL-Cholesterol, gilt dabei als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung von KHK. Für die Therapie der Hypercholesterinämie sind Statine aufgrund ihrer hohen Effektivität und ihres Sicherheitsprofils Mittel der Wahl (Baigent 2005). Ihr Anwendungsbereich beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Pathogenese einer Hypercholesterinämie. Verschiedene Studien belegen eine Senkung des Risikos gegenüber KHK sowohl bei Patienten mit erhöhtem als auch normalem Cholesterolspiegel (Cannon 2006). Die zunächst skeptisch betrachtete These, Statine könnten neben ihrem cholesterolsenkenden Haupteffekt weitere protektive Wirkungen zeigen, entwickelte sich seit der Sixth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics (1996 in Buenos Aires) zunehmend zu einem wissenschaftlich anerkannten Faktum (Davignon 2004a). Der klinische Nutzen der cholesterolumabhängigen, pleiotropen Statineffekte ließ sich sowohl für die Primär- als auch Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse bestätigen (Takemoto 2001; Heeba 2009). Entscheidend ist dabei, dass Statine atherogenen Prozessen entgegenwirken indem sie den oxidativen Stress senken und zur Endothelprotektion beitragen. Die kardiovaskuläre Funktionsfähigkeit wird zusätzlich durch eine verstärkte Angiogenese, verringerte ischämische Belastung, Stabilisierung atherosklerotischer Plaques und Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen verbessert (Davignon 2004a).

Körpereigene Dysbalancen des Lipidstoffwechsels können die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen fördern. Ein Mangel an endogenen Schutzmechanismen kann den Krankheitsverlauf zusätzlich beschleunigen (Ross 1993). Sowohl Tierversuche als auch Humanstudien ergaben ein erhöhtes proatherosklerotisches Risiko bei einer verminderten HO-1-Expression bzw. HO-1-Defizienz (Durante 2011; Grochot-Przeczek 2013). Begründet wurde dies mit der verringerten Freisetzung des Vasodilatators CO und des Antioxidanz Biliverdin, welches im Anschluss in das potentere Bilirubin umgewandelt wird (Hoekstra 2003). Als Umkehrschluss wurde vermutet, dass sich bei einer atherosklerotischer Diathese eine HO-1-Stimulation protektiv auf das kardiovaskuläre System auswirkt. Auch die bei Atherosklerosepatienten beobachtete Verringerung der NO-Sensibilität könnte durch die HO-1-abhängige CO-Freisetzung kompensiert werden. Für die Stimulation der HO-1 steht prinzipiell eine Vielzahl von Induktoren zur Verfügung, von denen jedoch aufgrund ihrer Toxizität nur eine geringe Anzahl therapeutisch relevant ist. Verschiedene übereinstimmende Charakteristika von HO-1 und Statinen, wie z. B. antioxidative, antiproliferative, immunsuppressive und antiatherosklerotische Eigenschaften, ergaben die Vermutung, dass Statine Induktoren der HO-1 darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die HO-1 als Zielstruktur von Simvastatin nachgewiesen werden. In endothelialen Primärzellen und in der Zelllinie ECV304 induzierte Simvastatin die HO-1-Proteinsynthese. Weiterhin stimulierte Simvastatin die HO-1-mRNA zeit- und konzentrationsabhängig mit einem 6-fachen

Maximum nach acht Stunden Inkubationszeit. Inwieweit der erhöhte Gehalt an HO-1-mRNA mit einer gesteigerten Transkriptionsaktivität korreliert, sollte mithilfe von Promotorstudien untersucht werden. In ECV304-Zellen wurden die proximalen 4,9 kb der humanen HO-1-Promotorregion transient eingebracht. Der zunächst konzentrationsabhängige Anstieg erreichte jedoch nur ein 2-faches Maximum. Die geringe Steigerung der Promotoraktivität im Vergleich zum Gesamtgehalt an HO-1-mRNA kann entweder auf das Fehlen von Schlüsselstrukturen im 4,9 kb HO-1-Konstrukt oder auf post-transkriptionale Mechanismen zurückgeführt werden. Die daraufhin durchgeführten Reporterstudien in stabil transfizierten NIH3T3-Zellen, welche die gesamte HO-1-Promotorregion enthielten, ergaben vergleichbare Promotorstimulationen, sodass die HO-1-Transkriptmenge nicht allein über die Promotoraktivität reguliert wird. Folglich wurde eine Erhöhung der HO-1-mRNA-Stabilität als Simvastatineigenschaft vermutet. Die HO-1 ist ein hauptsächlich transkriptional reguliertes Enzym, bei dessen Genexpression post-transkriptionale Wege seltener in der Literatur beschrieben sind (Ryter 2002; Ali 2009). Einige Studien sind jedoch bekannt, in denen eine gesteigerte Transkriptionsrate und die mRNA-Stabilisierung den Gesamtgehalt an HO-1-mRNA ausmachen (Leautaud 2007). Ein typischer Induktor, der über transkriptionale und post-transkriptionale Mechanismen die HO-1 beeinflusst, ist NO (Bouton 2000). In geringerem Umfang sind auch CdCl₂ und H₂O₂ in der Lage die HWZ der HO-1-mRNA zu verlängern (Leautaud 2007). Der dipeptidische Induktor Met-Tyr scheint sogar ausschließlich über post-transkriptionale Mechanismen die HO-1-Genexpression zu regulieren (Erdmann 2006). Für die Überprüfung, ob post-transkriptionale Mechanismen auch an der Genregulation beteiligt sind, wurde der Transkriptionshemmer AD eingesetzt. Durch Blockierung der mRNA-Synthese kann der zeitliche Verlauf des mRNA-Abbaus beobachtet werden. Die vermutete post-transkriptionale Stabilisierung der HO-1-mRNA durch Simvastatin konnte bestätigt werden. Die HWZ der HO-1-mRNA wurde in Gegenwart von Simvastatin von 3,4 auf 5,7 Stunden verlängert. Demzufolge scheint Simvastatin zu den HO-1-Stimulatoren zu gehören, die sowohl die Transkriptionsrate erhöhen als auch die HO-1-Genexpression über post-transkriptionale Mechanismen regulieren. Inwieweit diese Eigenschaft charakteristisch für alle Statine ist, müsste noch gepüft werden, da F. Ali und Mitarbeiter in humanen Endothelzellen trotz HO-1-Induktion keine stabilisierenden Effekte von Atorvastatin auf die HO-1-mRNA nachweisen konnten (Ali 2009). Eine Erklärung könnten unterschiedliche Induktionsmechanismen aufgrund der verschiedenen Zellsysteme sein. Verschiedene Studien belegen, dass trotz gleichem Stimulus sowohl die HO-1-Stimulation als auch der Mechanismus zellabhängig sein kann (Hsu 2006; Mouawad 2013). So konnte in NIH3T3 Zellen die HWZ unter NO-Präposition über das 6-fache verlängert werden, wogegen in HeLa- und HepG2-Zellen zwar die HO-1 induziert wurde, jedoch der mRNA-stabilisierende Effekt vollständig ausblieb (Leautaud 2007). Zusätzlich sollte in Erwägung gezogen werden, dass Statine neben ihren gruppenspezifischen Gemeinsamkeiten auch individuelle Unterschiede besitzen, sodass je nach Arzneistoff verschiedene Induktionswege im gleichen Zellsystem möglich wären (Jones 1998; Wierzbicki 2003; Kim 2012).

Eine Beeinflussung der HO-1-Genexpression durch Simvastatin konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. T.-S. Lee und Mitarbeiter beobachteten sowohl in humanen als auch murinen Gefäßmuskelzellen eine Simvastatin-abhängige Erhöhung der HO-1-Proteinexpression. Nach intraperitonealer Applikation von Simvastatin wurde in glatten Gefäßmuskelzellen von Mäusen ebenfalls ein Anstieg der HO-1-Proteinmenge beobachtet (Lee 2004). In

Endothelzellen, abstammend aus Rinderaorten und der Makrophagen-Zelllinie THP-1, wurde hingegen keine Proteininduktion durch Simvastatin nachgewiesen. Dies steht im Gegensatz zu den beobachteten Effekten der Arbeitsgruppe um J.-C. Chen, welche in Makrophagen (RAW264.7) eine signifikante Erhöhung des HO-1-Proteingehalts durch Simvastatin feststellten. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten die verschiedenen Zellsysteme sein. Die Effekte von HO-1-Induktoren sind stark zelltypspezifisch, wodurch die in der Literatur zu findenden Angaben bezüglich der HO-1-Induktion je nach Zelltyp variieren. Eine weitere Begründung der unterschiedlichen Resultate wäre die verwendete Simvastatinkonzentration. Bei einer Konzentration von 30 μM Simvastatin wurde in der Endothelzelllinie ECV304 ein signifikanter Proteinanstieg nachgewiesen. Die gleiche Konzentration wird von der Arbeitsgruppe von J.-C. Chen für die Simvastatin-abhängige HO-1-Induktion in RAW264.7 Makrophagen angegeben (Hsieh 2008). Die von T.-S. Lee und Mitarbeitern verwendete Simvastatinkonzentration betrug hingegen 10 μM . Um *in vitro* HMG-CoA-Reduktase-abhängige und -unabhängige Statineffekte zu erzielen, werden meist Konzentrationen im mikromolaren Bereich benötigt (Weitz-Schmidt 2002). Die *in vivo* gemessenen Plasmakonzentrationen einer Statintherapie liegen hingegen im nanomolaren Bereich (Bellosta 2004). Die Abweichung der Konzentrationsangaben könnte an der höheren Sensibilität von Lebewesen im Vergleich zu immortalisierten Zellsystemen liegen. Somit müsste mithilfe von *in vivo* Studien überprüft werden, ob die in Zellkultur gewonnenen Ergebnisse auch *in vivo* nachweisbar sind. So konnte z. B. die zunächst *in vitro* im mikromolaren Konzentrationsbereich festgestellte Verringerung der Monozytenadhäsion durch Statine *in vivo* mit Plasmakonzentrationen im nanomolaren Bereich bestätigt werden (Weitz-Schmidt 2002). Als Ursache für die verringerte *in vivo* Konzentration wurde diskutiert, ob Zelladhäsion und Migration unter dynamischen Bedingungen möglicherweise eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Statinen besitzen als unter statischen *in vitro* Gegebenheiten. Weiterhin wurde *in vivo* ein stärkerer cholesterinsenkender Effekt beobachtet, der wahrscheinlich im Zusammenhang mit der antiadhäsiven Wirkung steht (Weitz-Schmidt 2002).

Neben Simvastatin sind auch andere Vertreter aus der Statingruppe in der Lage die HO-1 zu induzieren (Kwok 2012; Mrad 2012; Mouawad 2013). Sowohl Lovastatin als auch Atorvastatin und Rosuvastatin stimulieren die Protein- und mRNA-Synthese der HO-1 in Endothelzellen (Grosser 2004a; Grosser 2004b). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in Makrophagen eine HO-1-Induktion durch Lovastatin, Fluvastatin, Pravastatin, Simvastatin, Mevastatin und Atorvastatin nachweisen (Chen 2006; Hsieh 2008; Mouawad 2013). Auch in primären Endothelzellen (HUVEC) zeigte Atorvastatin eine Stimulation der HO-1-Genexpression (Ali 2007). Somit scheint die Induktion des protektiven HO-1-Enzyms ein Klasseneffekt der Statine zu sein. Für andere cholesterolsenkende Arzneistoffklassen wurde diese Wirkung bislang nicht nachgewiesen. Einzig in einer Studie von Kronke und Mitarbeitern, welche die Wirkung von Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptoragonisten (PPAR-Agonisten) auf die HO-1-Induktion untersuchten, konnte der Cholesterolsenker Fenofibrat (PPAR- α -Agonist) bei einer Konzentration von 200 μM die HO-1-Proteinmenge erhöhen (Kronke 2003). Der in der Veröffentlichung abgebildete Western-Blot ist jedoch die einzige Darstellung der HO-1-Induktion durch Fibrate. Für alle weiteren Untersuchungen der Studie wurde anstelle von Fenofibrat der PPAR- α -Agonist WY14643 ausgewählt, welcher jedoch keine Zulassung als Arzneimittel besitzt. Eigene Untersuchungen ergaben, dass Gemfibrozil, ein weiterer

cholesterolsenkender PPAR- α -Agonist, keinen Einfluss auf die HO-1-Genexpression in ECV304-Zellen ausübt (Daten nicht abgebildet). Somit müssten weitere Untersuchungen folgen, um eine eindeutige Aussage über die Effekte von Fenofibrat und anderen PPAR- α -Agonisten auf die HO-1-Genexpression treffen zu können. Bis dahin besteht jedoch die These, dass die für Statine nachgewiesene HO-1-Stimulation maßgeblich an dem hohen Therapieerfolg der Arzneistoffklasse beteiligt ist. Statine reduzieren als einzige Arzneistoffklasse aus der Gruppe der Cholesterolsenker sowohl die kardiovaskuläre als auch die Gesamtmortalität (Bucher 1999). Sie besitzen den stärksten cholesterolsenkenden Effekt, der jedoch nicht allein für den therapeutischen Nutzen einer Statintherapie verantwortlich zu sein scheint (Studer 2005). Chironi und Mitarbeiter konnten in einer Dyslipidämie-Studie zeigen, dass Statin-behandelte Patienten eine signifikant geringere Intima-Media-Dicke der Arteria carotis aufwiesen im Vergleich zur Fibrat-behandelten Patientengruppe (Chironi 2005). Die Unterschiede in der Intima-Media-Dicke, welche bei einem Wert ≥ 1 mm den Risikofaktor eines Myokardinfakts um das 2 bis 4-fache erhöht, standen nicht im Zusammenhang mit der Senkung des LDL-Cholesterolspiegels. Eine randomisierte und placebo-kontrollierte Doppelblindstudie, welche die Effekte von Atorvastatin und Gemfibrozil bei chronischen Nierenerkrankungen vergleicht, ergab nur bei Atorvastatin eine verbesserte Elastizität der kleinen Blutgefäße (Dogra 2007). In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass Statine, jedoch nicht Fibrate das Thromboembolierisiko im venösen Gefäßsystem senken (Lacut 2004). PPAR- α -Agonisten wie Gemfibrozil, Fenofibrat und Benzofibrat scheinen jedoch ebenfalls protektive Eigenschaften zu besitzen, die ergänzend zu der cholesterolsenkenden Wirkung auftreten und weitestgehend auf die vielseitigen Funktionen der PPAR zurückzuführen sind (Simpson 1985; Staels 1998). Interessanterweise wurde sogar eine Beteiligung von PPAR an den pleiotropen Statineffekten beobachtet (Paumelle 2007). Yano und Mitarbeiter konnten mit siRNA-Versuchen zeigen, dass eine Statin-abhängige COX-2-Aktivierung und folgende 15d-PGJ₂-Synthese zu einer Aktivierung von PPAR- α und PPAR- γ führte (Yano 2007). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen ergaben eine Beteiligung von PPAR- α an der antiinflammatorischen Statinwirkung im LPS-induzierten Entzündungsmodell (Paumelle 2006). In Makrophagen wurde weiterhin eine PPAR- γ -abhängige Expression des HDL-Rezeptors ABCA-1 beobachtet (Argmann 2005). Für die HO-1-Induktion von Simvastatin scheint PPAR- γ jedoch weniger von Bedeutung zu sein, da Hemmstoffversuche mit dem PPAR- γ -Inhibitor GW9662 keine Veränderung in der HO-1-Genexpression ergaben (Daten nicht gezeigt).

Die Vielzahl an strukturell unterschiedlichen HO-1-Induktoren lässt neben der Funktion des Hämabbaus weitere lebenswichtige Funktionen des Enzyms u. a. zur Gewährleistung der Zellhomöostase vermuten (Choi 1996). Bei der Suche nach therapeutisch relevanten HO-1-Induktoren sollte jedoch beachtet werden, dass eine HO-1-Stimulation verschiedene Ursachen haben kann. Zum einen kann sie eine endogene Reaktion auf Stress und zum anderen einen therapeutischen Schutz bei pathologischen Abläufen darstellen. Um zu überprüfen, inwieweit die Simvastatin-abhängige HO-1 durch oxidativen Stress verursacht ist, wurden ECV304-Zellen mit 1 mM NAC für 20 Minuten vorinkubiert. Die Ergebnisse des Gehalts an HO-1-mRNA nach acht Stunden Inkubationszeit mit 100 μ M Simvastatin allein und in Anwesenheit von NAC ergaben keinen signifikanten Unterschied (Daten nicht gezeigt). Somit scheint eine Freisetzung von freien Sauerstoffspezies nicht die Ursache für die HO-1-Induktion zu sein. Ebenso

ergaben Toxizitätstests mit LDH und Kristallviolett keine messbaren nekrotischen und apoptotischen Veränderungen. Sowohl makro- als auch mikroskopisch waren keine Unterschiede zwischen Simvastatin-behandelten und Kontrollzellen erkennbar.

Kann eine stressbedingte HO-1-Stimulation bei therapeutisch relevanten Induktoren ausgeschlossen werden, wird die Effektivität des Therapeutikums durch einen zusätzlichen physiologischen Faktor beschränkt. Nicht jede HO-1-Induktion führt zwangsläufig zu einem Konzentrationsanstieg an CO und Biliverdin/Bilirubin. Nur das Vorhandensein von ausreichend Häm als Substrat gewährleistet die enzymatische Synthese der protektiven Reaktionsprodukte CO und Biliverdin/Bilirubin. Demzufolge könnte sich der Einsatz von HO-1-Induktoren besonders bei Krankheitsbildern mit erhöhtem Hämgehalt, wie z. B. bei hämorrhagischem Apoplex, positiv auswirken (Giannopoulos 2012). Neben der Zytoprotektion durch den Hämabbau basiert der Haupteffekt einer HO-1-Induktion jedoch vorrangig auf dem Schutz vor oxidativer Schädigung. In einem Modell für oxidativen Stress konnte für Simvastatin eine Senkung der gebildeten ROS-Menge ab einer Konzentration von 2,5 μM nachgewiesen werden. Die maximale antioxidative Wirkung von ca. 50 % wurde bei 10 μM Simvastatin erreicht. Für die Überprüfung, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen radikalsenkendem und HO-1-stimulierendem Statineffekt besteht, wurde eine Vorbehandlung mit dem HO-Inhibitor CrMP durchgeführt. Die antioxidative Simvastatinwirkung konnte in Gegenwart des HO-Inhibitors über die Hälfte reduziert werden, sodass eine Induktion der HO-1 zumindest teilweise Voraussetzung für die antioxidativen Eigenschaften von Simvastatin ist. Die trotz CrMP verbleibende Radikalsenkung könnte auf die Beeinflussung des NAD(P)H-Oxidasesystems durch Simvastatin zurückzuführen sein. Statine verhindern die Bildung von Superoxidanionen durch eine verringerte Expression der Untereinheiten p47phox und NOX2 (Wagner 2000; Al-Shabrawey 2008). Weiterhin inhibieren Statine die Isoprenylierung der Untereinheit p21 Rac. Interessanterweise wurde sogar nach Absetzen von Statinen eine endotheliale Dysfunktion beobachtet, die auf eine verstärkte Aktivierung des NADP(H)-Oxidasesystems durch Rac-1 zurückgeführt wurde (Greenwood 2007). Neben der Beeinflussung der NAD(P)H-Oxidase wurde auch eine erhöhte SOD- und Katalaseaktivität beobachtet (Davignon 2004b).

5.2 Transkriptionale Mechanismen der HO-1-Genregulation

Die Regulation von Enzymen und anderen endogenen Effektoren kann über verschiedene Signalwege vermittelt sein. Das Wissen über diese mechanistischen Abläufe ist Grundlage, um physiologische sowie pathophysiologische Reaktionen zu verstehen. Erst dadurch kann eine exakte und effiziente Arzneimitteltherapie ermöglicht werden. In der HO-1-Genregulation scheinen vor allem phosphorylierungsabhängige Signalwege beteiligt zu sein, von denen vorrangig die MAPK, aber auch Akt/PI3K-, PKA-, PKC- und PKG-abhängige Mechanismen eine Rolle spielen.

Für die Untersuchung der MAPK-Signalwege wurden Hemmstoffversuche durchgeführt und die Kinaseaktivierung auf translationeller Ebene geprüft. Simvastatin war zwar in der Lage ERK zu aktivieren, jedoch besteht anscheinend kein kausaler Zusammenhang zur HO-1-Induktion, da der ERK-Inhibitor PD098590 keine signifikante Senkung der Simvastatin-induzierten mRNA-Expression bewirkte. Ein weiterer ERK-Inhibitor UO126 konnte ebenfalls den

Simvastatineffekt nicht antagonisieren (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von T.-S. Lee und Mitarbeitern. In glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten führte Simvastatin zwar zu einer Phosphorylierung von ERK, jedoch blieb die HO-1-Proteinstimulation in Gegenwart des ERK-Hemmstoffs PD098059 ebenfalls unbeeinflusst (Lee 2004). Untersuchungen von J.-C. Chen und Mitarbeitern ergaben hingegen eine Verringerung der HO-1-Proteininduktion durch PD098059 in Makrophagen (Hsieh 2008). Es wurde jedoch anstelle von Simvastatin Lovastatin eingesetzt und auch die Zelllinie variierte. Der MAPK-Weg JNK scheint ebenfalls nicht für die HO-1-Induktion durch Simvastatin notwendig zu sein, da weder der JNK-Hemmstoff SP600125 die HO-1-Genexpression verringerte, noch Simvastatin in der Lage war JNK zu aktivieren. Auch diese Ergebnisse konnten im Nachhinein durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (Lee 2004; Hsieh 2008). Die meisten Stimuli induzieren die HO-1 über p38-abhängige Signalwege (Ryter 2002). Die vorwiegend an Entzündungsprozessen beteiligte p38-Kaskade ist somit von den MAPK der wichtigste Signalweg in der Genregulation des antiinflammatorischen Enzyms. Auch Simvastatin scheint ein Vertreter der p38-abhängigen HO-1-Induktoren zu sein. Der am häufigsten eingesetzte p38-Inhibitor SB203580 verringerte sowohl die mRNA-Expression als auch die Promotoraktivität der HO-1 nach Simvastatininkubation. SB203580 inhibiert die Isozyme p38 α - und p38 β , deren IC₅₀ bei 50 nM und 500 nM liegen (Davies 2000). Eine Inhibierung von PKB α , GSK3 β (Glykogensynthasekinase-3 β) und LCK (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) durch SB203580 kann ausgeschlossen werden, weil dies erst bei einer 100 bis 500-fachen Überschreitung der IC₅₀ beobachtet wurde (Davies 2000). Ab einer Konzentration von 10 μ M wird jedoch mit einer zusätzlichen Beeinflussung von PDK1 gerechnet. Die für die Versuche gewählte Inhibitorkonzentration lag über 10 μ M, weshalb ein weiterer p38-Hemmstoff SB202190 und p38 α -defiziente MEF-Zellen eingesetzt wurden, um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können. Der inhibierende Effekt auf die HO-1-Transkription konnte auch in Gegenwart des Hemmstoffs SB202190 reproduziert werden. Die mit p38 α -defizienten MEF-Zellen gewonnenen Daten bestätigen ebenfalls, dass p38 ein essenzieller Bestandteil für die Simvastatin-abhängige HO-1-Aktivierung ist. So konnte nur im MEF-Wildtyp eine HO-1-Proteinexpression nachgewiesen werden. Ebenso war die Promotoraktivität in p38 α -defizienten MEF-Zellen deutlich geringer als im Wildtyp. Die Defizienz der p38-MEF-Zellen bezog sich ausschließlich auf die α -Isoform. Inwieweit auch andere p38-Isoformen eine Rolle in der Simvastatin-abhängigen HO-1-Induktion spielen, kann aus diesen Versuchen nicht abgeleitet werden. Hierfür könnten Versuche mit überexprimierten dominant negativen p38 β , p38 γ - und p38 δ -Zellen weiteren Aufschluss geben. Insgesamt lässt sich jedoch zusammenfassend festhalten, dass die Untersuchungen der MAPK-Signalwege eine Beteiligung von p38 an der Simvastatin-vermittelten HO-1-Genexpression ergaben und diese Ergebnisse im Einklang mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen stehen (Lee 2004; Hsieh 2008).

In den letzten Jahren konnte vermehrt ein Zusammenspiel zwischen der MAPK- und PI3K/Akt-Kaskade in der HO-1-Regulation nachgewiesen werden. HO-1-Stimulatoren wie Carnesol, AEBSF, 15d-PGJ₂, Kahweol, Rosmarinsäure und Nikotin benötigten für eine HO-1-Induktion sowohl p38 als auch PI3K/Akt (Alvarez-Maqueda 2004; Martin 2004; Wijayanti 2005; Hwang 2008; Lee 2008). Somit lag die Frage nahe, ob der PI3K/Akt-Weg für Simvastatin ein ebenso essenzieller Transduktionsweg ist. Zunächst wurde in Gegenwart des PI3K-Hemmstoffs

LY294002 eine Verringerung der Simvastatin-abhängigen HO-1-Transkription festgestellt. LY294002 besitzt eine IC_{50} von 1,2 μ M und wird als selektiver PI3K-Inhibitor angegeben (Vlahos 1994). Als zusätzlicher Nachweis wurde ein weiterer PI3K-Hemmstoff eingesetzt. Der Simvastatin-abhängige Einfluss auf die HO-1-Promotoraktivität konnte durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin in ähnlichem Umfang wie durch LY294002 antagonisiert werden. Als Aktivierungskontrolle des PI3K/Akt-Weges wurde die Enzymform Phospho-Akt nach 45 Minuten Simvastatinexposition detektiert. Die Ergebnisse waren konform mit Untersuchungen der Arbeitsgruppe von T.-S. Lee. Simvastatin aktivierte in glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta die PI3K/Akt-Kaskade. Ebenso ließ sich die HO-1-Proteininduktion durch LY294002 reduzieren (Lee 2008). Eine weitere Studie konnte in humanen Epithelzellen des Auges ebenfalls PI3K/Akt-abhängige Signalwege für die HO-1-Induktion durch Simvastatin nachweisen (Kim 2012). Somit stellt die PI3K/Akt-Kaskade neben p38 einen weiteren Signalweg der Simvastatin-abhängigen HO-1-Induktion dar. Im Anschluss könnten nun Versuche folgen, die Aufschluss über die Reihenfolge der Aktivierung geben d. h. welcher Transduktionsweg sich *upstream* und *downstream* befindet. S. Immenschuh und Mitarbeiter untersuchten für die AEBF-abhängige HO-1-Induktion mithilfe eines p38-abhängigen pGal4-CHOP-Konstrukts die Aktivierungsreihenfolge von p38 und PI3K. Durch Zusatz von p38- und PI3K-Inhibitoren konnte eine vorangehende PI3K-Aktivierung als Voraussetzung für die Stimulation des p38-Signalweges nachgewiesen werden (Wijayanti 2005).

Für die Induktion eines Gens wird ein Zusammenspiel aus mehreren Signalwegen und Botenstoffen, vergleichbar mit einem Netzwerk benötigt. Im Rahmen der Simvastatin-abhängigen Charakterisierung der HO-1-Genregulation wurden deshalb auch andere, für die HO-1 relevante Signalwege untersucht. Ergänzend zu p38 und PI3K/Akt benötigt z. B. Rosmarinsäure cAMP/PKA-abhängige Schritte für die HO-1-Induktion in dopaminergen Nervenzellen (Lee 2008). Der NO-Donor Nitroprussid-Natrium induziert die HO-1 ebenfalls über eine Kombination aus MAPK- und PKA-abhängigen Mechanismen (Kim 2006). Für Simvastatin konnte jedoch keine PKA-Beteiligung für die HO-1-Induktion nachgewiesen werden, da sowohl der cAMP-Hemmstoff DDA als auch der PKA-Hemmstoff KT5720 keinen Einfluss auf die HO-1-mRNA-Expression ausübten. Experimente mit KT5720 in glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta ergaben ebenfalls keine Verringerung der HO-1-Proteininduktion in Gegenwart von Lovastatin (Hsieh 2008). Auch eine Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels wurde für Simvastatin bisher nicht beobachtet (van Nieuw Amerongen 2000). Anders verhält es sich mit dem cGMP-Gehalt. Statine sind in der Lage die intrazelluläre cGMP-Menge zu erhöhen (Salinas 2004). cGMP und dessen Analoga stellen des Weiteren Induktoren der HO-1 dar (Immenschuh 1998; Polte 2000). Somit lag die Vermutung nahe, dass cGMP/PKG-abhängige Signalwege an der HO-1-Genexpression durch Simvastatin beteiligt sein könnten. Auf mRNA-Ebene wurde deshalb die Wirkung des sGC-Hemmstoffs ODQ und des PKG-Hemmstoffs KT5823 auf die Simvastatin-abhängige HO-1-Induktion untersucht. In Gegenwart des PKG-Hemmstoffs KT5823 konnte eine Inhibition der HO-1-Transkription beobachtet werden. Überraschenderweise blieb der HO-1-mRNA-Gehalt in Anwesenheit des sGC-Inhibitors ODQ unverändert im Vergleich zu den Simvastatin-behandelten Kontrollzellen. Unter physiologischen Bedingungen entsteht cGMP durch Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu cGMP und Pyrophosphat. Katalysiert wird diese Reaktion durch Guanylylzyklasen (GC), welche unterschieden werden können in lösliche GC (sGC) und membrangebundene GC

(pGC). Der Hemmstoff ODQ inaktiviert nur das Isozym sGC, wodurch die cGMP-Bildung durch pGC weiterhin gewährleistet ist und im Anschluss zu einer PKG-Aktivierung führen kann. Für Statine wären sGC-abhängige Schritte jedoch eher vorstellbar, da Statine zu einer verstärkten Freisetzung der klassischen sGC-Aktivatoren CO und NO führen. Die Wahrscheinlichkeit einer cGMP-Freisetzung durch pGC kann dadurch jedoch nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren bestände die Möglichkeit, dass die Basalaktivität von PKG für eine Statin-abhängige HO-1-Induktion bereits ausreichend ist. Diese Überlegung ergab sich für T.-S. Chen und Mitarbeiter aus den inhibierenden Effekten von ODQ und KT5823 auf die Lovastatin-abhängige HO-1-Induktion, da keine Veränderung des cGMP-Spiegels nachgewiesen werden konnte (Hsieh 2008). Eine weitere Erklärung der unterschiedlichen Effekte von ODQ und KT5823 könnte eine cGMP-unabhängige PKG-Stimulation durch Phosphorylierung sein, wie es z. B. in Anwesenheit des Phorbol-ester PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) beobachtet wurde (Chu 1998; LaFevre-Bernt 1998; Hou 2003). Eine entscheidende Funktion nimmt dabei die PKC ein, deren Gegenwart essenziell für die PKG-Stimulation durch PMA ist. Interessanterweise ergaben Hemmstoffversuche mit der höchsten Konzentration des PKC-Inhibitors GF109023X (10 μ M) eine Verringerung der Simvastatin-abhängigen HO-1-mRNA-Induktion. Inwieweit ein Zusammenspiel von PKC und PKG zur HO-1-Expression führt, müsste jedoch durch weitere Versuche noch geprüft werden. Betrachtet man die Spezifität von KT5823, so besitzt der Hemmstoff für PKG eine IC_{50} von 2,5 nM (Kase 1987). In höheren Konzentrationen sinkt die Spezifität und eine zusätzliche Hemmung von PKC (IC_{50} 4 μ M) und PKA (IC_{50} 10 μ M) ist möglich (Valenti 2003). Der auf die HO-1-Expression inhibitorisch wirkende KT5823-Effekt konnte erst bei einer Konzentration von 10 μ M beobachtet werden. Der PKC-Hemmstoff GF109203X (IC_{50} 0,02 μ M) inhibierte ebenfalls erst ab einer Konzentration von 10 μ M die HO-1-Induktion und beeinflusst in diesem Konzentrationsbereich bereits andere Proteinkinasen (Toullec 1991). Somit könnten die beobachteten Inhibitionseffekte von KT5823 und GF109203X auch durch die Inhibition anderer Enzyme verursacht sein. Für eine sichere und zufriedenstellende Aussage bezüglich der Bedeutung von PKG und PKC für die Simvastatin-abhängige HO-1-Transduktion sind weitere Untersuchungen notwendig.

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass vor allem Transkriptionsfaktoren der CNC-bZip-Familie am Schutz vor oxidativem Stress beteiligt sind. Die an MARE bindenden Transkriptionsfaktoren Nrf-1 und Nrf-2 konnten als wichtige Mediatoren für die Induktion zytoprotektiver Enzyme wie der Glutathion-S-Transferase, NADPH-Quinon-Oxidoreduktase, Glutamatcysteinylase und Aldo-Keto-Reduktase nachgewiesen werden (Itoh 1997; Venugopal 1998; Mrad 2012). Die MARE-Sequenz ist auch Bestandteil des HO-1-Gens und kann durch Heterodimere der CNC-bZip-Familie und Dimere der AP-1-Familie aktiviert werden. Die meist in mehreren Kopien vorliegende MARE-Region gilt als häufige Regulationseinheit von HO-1-Stimulatoren. Auch für die Simvastatin-vermittelte Erhöhung der HO-1-Promotoraktivität konnte eine Abhängigkeit von MARE festgestellt werden. Promotorstudien mit MARE-Mutationen in der HO-1-Promotorregion ergaben eine verringerte Promotoraktivität im Vergleich zum Genkonstrukt mit nativer HO-1-Promotorsequenz. Interessanterweise konnten weder Lovastatin noch Simvastatin ein Reportergenkonstrukt aktivieren, welches als codierende Sequenz drei Kopien von MARE (entspricht 3xStRE) enthielt (Grosser 2004b). Mögliche Gründe könnten die Notwendigkeit weiterer MARE-Kopien oder zusätzlicher HO-1-Genbereiche für die Aktivierung sein. Andere Arbeitsgruppen bestätigten hingegen

die beobachtete Beteiligung von MARE an der HO-1-Induktion durch Statine. So ergaben Untersuchungen mit Atorvastatin eine Aktivierung von sechs verschiedenen MARE-Bereichen innerhalb der HO-1-Promotorregion (Kwok 2012). Weiterhin konnte in zwei Studien festgestellt werden, dass Simvastatin die HO-1 mithilfe des Transkriptionsfaktors Nrf-2 aktiviert, welcher u. a. an die MARE-Region bindet (Habeos 2008; Hsieh 2008).

Ein weiteres regulatorisches Promotorelement ist CRE, welches wie MARE im -4 kb Enhancer-Bereich angeordnet ist und u. a. für die HO-1-Induktion durch oxidierte Phospholipide essenziell ist (Kronke 2003). Reporterexperimente mit CRE-Mutation im HO-1-Promotor ergaben, dass für die Simvastatin-abhängige HO-1-Stimulation in ECV304-Zellen die CRE-Gensequenz anscheinend nicht erforderlich ist.

5.3 Post-transkriptionale Mechanismen der HO-1-Genregulation

Der mRNA-Gehalt einer Zelle wird nicht nur durch die Transkriptionsrate sondern auch durch den Abbau festgelegt. Der mRNA-Abbau reguliert daher, wie schnell sich nach veränderter Transkription wieder ein *steady state* bildet oder wieviel Zielprotein letztendlich codiert wird (Wang 2002). Die Stabilität der mRNA wird dabei durch Interaktion von Strukturelementen (cis-Elemente) und RNA-bindenden Proteinen (trans-Elemente) bestimmt. Die Halbwertszeit einer mRNA kann stark variieren und ist durch verschiedene Faktoren wie Zytokine, Hormone, Temperaturänderungen, aber auch durch äußere Einflüsse wie Hypoxie, Gewebeschäden und virale Infekte beeinflussbar. Eine Deregulation der mRNA-Stabilität kann zu einer erhöhten Akkumulation an mRNA und codierendem Protein führen, das wiederum Bestandteil von Krankheitsbildern wie Alzheimer, Neoplasie und Thalassämie sein kann (Guhaniyogi 2001). Somit bietet das Wissen über post-transkriptionale Vorgänge eine Möglichkeit, Krankheitsabläufe besser zu verstehen und dementsprechend zu therapieren.

Die Untersuchung des mRNA-Abbaus mithilfe von Transkriptionshemmern ist eine häufig angewandte und wissenschaftlich anerkannte Methode, die jedoch auch ihre Nachteile besitzt. Durch die Toxizität der Verbindungen können trotz niedriger Konzentrationen keine physiologischen Bedingungen gewährleistet werden. Alternative Untersuchungsmethoden z. B. mit radioaktiv-markierten Nukleosiden (*pulse-chase* Methode) weisen zwar eine geringere Toxizität auf, aber auch diese Verfahren besitzen Nachteile (Ross 1995). So besteht bei der *pulse-chase* Methode die Schwierigkeit, die zur Verfügung gestellten radioaktiven Nukleoside ausschließlich in der *pulse*-Phase in die RNA einzubauen. Teilweise können auch durch RNA-Katabolismus bereits eingebaute radioaktive Nukleotide erneut zur Verfügung stehen. Somit werden Transkriptionshemmer weiterhin für die Charakterisierung des mRNA-Abbaus z. B. bei Stabilitätsuntersuchungen der HO-1-mRNA unter Exposition von CdCl₂, NaAsO₂, Methylmethansulfonat (MMS) und NO als Standardvariante verwendet (Leautaud 2007). Verschiedene Mechanismen können dabei der mRNA-Stabilisierung zugrunde liegen. Der HO-1-Induktor MMS verzögert den HO-1-mRNA-Abbau vor allem durch Regulierung früher Deadenylierungsstadien. NO stabilisiert die HO-1-mRNA hingegen durch Hemmung der Deadenylierungsendphase, indem es die Kürzung des Poly(A)-Schwanzes zwischen 30-50 Nukleotiden stoppt. Statine können den NO-Stoffwechsel durch Steigerung der eNOS-Aktivität beeinflussen, indem sie die mRNA des Enzyms stabilisieren und somit die Bioverfügbarkeit von NO erhöhen

(Wassmann 2002). Somit lag die Vermutung nahe, dass die mRNA-stabilisierende Statinwirkung über NO vermittelt sein könnte. Die Beobachtung des HO-1-mRNA-Abbaus unter Zusatz des spezifischen NOS-Inhibitors L-NAME ergab jedoch keinen Unterschied im zeitlichen Verlauf der HO-1-mRNA-Degradierung im Vergleich zu den Simvastatin-behandelten Kontrollzellen. Auch in Gegenwart des NOS-Hemmstoffs N^G-Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) blieb der Gehalt an HO-1-mRNA unverändert (Daten nicht abgebildet). Somit scheint NO nicht an dem Mechanismus der Simvastatin-abhängigen HO-1-mRNA-Stabilisierung beteiligt zu sein. Für die Aktivierung des eNOS-Systems durch Statine, in die mRNA-stabilisierende Mechanismen integriert sind, konnte eine PI3K/Akt-Abhängigkeit festgestellt werden (Kureishi 2000). Der PI3K/Akt-Signalweg ist auch entscheidend für die transkriptionale HO-1-Induktion bei Simvastatinexposition. Die daraufhin durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen in Gegenwart des PI3K-Inhibitors LY294002 ergaben eine deutliche Verringerung des stabilisierenden Simvastatineffektes auf die HO-1-mRNA (Hinkelmann 2010). Somit konnte die PI3K/Akt-Kaskade als ein mechanistischer Bestandteil der post-transkriptionalen HO-1-Regulation von Simvastatin nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass der häufig an post-transkriptionalen Prozessen beteiligte MAPK-Signalweg p38 auch für die HO-1-HWZ-Verlängerung durch Simvastatin entscheidend ist, ließ sich nicht bestätigen. Der p38-Inhibitor SB203580 konnte die Statin-abhängige HO-1-mRNA-Stabilisierung nicht antagonisieren.

5.4 Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion *in vivo*

Verschiedene Studien mit Antisense- und Knockout-Modellen sowie klinische Untersuchungen des HO-1-Promotorpolymorphismus konnten eine essenzielle Funktion der HO-1 für die antioxidative Abwehr nachweisen (Chen 2002; Otterbein 2003; Yet 2003). Gerade im vaskulären Bereich tragen oxidative und inflammatorische Vorgänge zur Entstehung von Gefäßerkrankungen wie Atherosklerose bei (Ridker 2014). Der Einsatz eines HO-1-Induktors, wie z. B. Simvastatin wäre somit eine zu prüfende Therapiemöglichkeit für die Unterstützung von Krankheitsabläufen, bei denen oxidative und entzündliche Prozesse eine Rolle spielen. Im Zellkulturmodell konnten Statine bereits als HO-1-Induktoren nachgewiesen werden (Grosser 2004a; Grosser 2004b; Hsieh 2008). *In vivo* Daten liegen hingegen nur begrenzt vor. Lee und Mitarbeiter konnten nach intraperitonealer Simvastatinapplikation eine HO-1-Induktion in der *Tunica media* von Mäuseaorten nachweisen (Lee 2004). Weiterhin stellten sie fest, dass die HO-1-Induktion das proinflammatorische Ausmaß des Stressors LPS reduziert. Die HO-1-Protektion beschränkt sich jedoch nicht nur auf den vaskulären Bereich. Das Enzym wird ubiquitär exprimiert, sodass auch für andere Gewebe wie Leber, Lunge, Herz und Nervensystem HO-1-Effekte nachgewiesen werden konnten (Ryter 2002). An einem Mausmodell wurde deshalb geprüft, inwieweit die gewonnenen Zellkulturdaten eine *in vivo* Relevanz besitzen und in welchem Gewebe Simvastatin zu einer HO-1-Induktion führt. In transgenen HO-1-Luc-Mäusen konnte nach Simvastatinexposition eine HO-1-Promotorstimulation im oberen abdominalen und im sinistrolateralen Bereich nachgewiesen werden. Im Thorax sowie im dorsalen und zerebralen Bereich blieb die HO-1-Promotoraktivität unverändert. Zur näheren Charakterisierung der Simvastatin-abhängigen HO-1-Wirkung wurden im Anschluss einzelne Organe auf ihren HO-1-mRNA-Gehalt untersucht. Die beim *in vivo* BLI im oberen Abdomen nachgewiesene Stimulierung der HO-1-Promotoraktivität konnte in einer erhöhten mRNA-Expression der Leber

wiedergefunden werden. Der mRNA-Gehalt des Lungengewebes war ebenfalls erhöht im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrolltieren. Dies steht im Gegensatz zu der Lumineszenzmessung, da in der Thoraxregion keine signifikant erhöhte Promotoraktivität nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Ursache könnte eine geringere Sensivität der BLI-Methode im Vergleich zur *real time* RT-PCR sein. Der detektierbare Flux hängt u. a. von dem zu durchdringenden Gewebe ab. Untersuchungen ergaben, dass pro Zentimeter Gewebe die Lichtintensität um das 10-fache reduziert wird, wobei die Beschaffenheit des Gewebes zusätzlich eine Rolle spielt (Contag 2001). Eine Lungenentnahme und anschließendes BLI könnte den Emissionsverlust zwar reduzieren, jedoch wäre eine Bestimmung des mRNA-Gehalts im Anschluss an das BLI nicht mehr möglich, da die Messung das Gewebe austrocknet. Untersuchungen des sinistrolateralen Bereichs ergaben ebenfalls eine Stimulierung der HO-1-Promotoraktivität, welche durch einen erhöhten mRNA-Gehalt in den Organen Herz und Milz bestätigt werden konnte. Im Herzgewebe wurde insgesamt der stärkste Anstieg der HO-1-Transkriptionsrate (2-fach) beobachtet. Sowohl im renalen als auch im zerebralen Gewebe blieb der HO-1-mRNA-Gehalt unverändert im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Daten sind konform mit den BLI-Ergebnissen des Dorsums und der Kopfregion. Zusätzliche Untersuchungen zur Enzymaktivität, welche von Mark Hsu und Dr. Lucie Muchova an der Stanford University durchgeführt wurden, ergaben eine erhöhte HO-Aktivität von Lunge und Herz nach Simvastatinapplikation. Die stärkste katalytische Aktivität konnte, wie auf transkriptionaler Ebene, im Herzgewebe (1,7-fach) nachgewiesen werden. Die HO-Aktivität des Gehirns und der Leber wurde hingegen nicht beeinflusst. Für die Organe Milz und Nieren wurden keine Aktivitätsuntersuchungen durchgeführt. Somit konnten erste *in vivo* Untersuchungen am Mausmodell eine Simvastatin-abhängige Aktivierung des HO-1-Systems auch außerhalb des vaskulären Systems belegen. Die *in vivo* Ergebnisse sind jedoch als präliminäre Daten zu verstehen und sollten in erster Linie als Screening für weitere Untersuchungen dienen. Die Inkubationszeit wurde deshalb auf 24 Stunden beschränkt und eine Simvastatinkonzentration von 100 mg/kg KG gewählt. Die Wahl der Boluskonzentration orientierte sich an bereits publizierten Studien und lag aufgrund der Einmalgabe oberhalb der therapeutischen Dosis (Eckert 2001; Park 2003). Im Anschluss an die 24h-Experimente wurden Langzeituntersuchungen durchgeführt, die ebenfalls eine Beeinflussung des HO-1-Systems durch Statine bestätigten. Stärker an das therapeutische Regime angepasst, erhielten FvB-Mäuse täglich über einen Zeitraum von eins, zwei oder drei Wochen 5 mg Atorvastatin oder Rosuvastatin/kg KG intraperitoneal appliziert. Sowohl Atorvastatin als auch Rosuvastatin erhöhten die HO-Aktivität und den CO-Gehalt im Herzgewebe (Muchova 2007). Auch die antioxidative Kapazität des kardialen Bereiches wurde durch beide Statine positiv beeinflusst. Ebenso stiegen die Spiegel von Carboxyhämoglobin und Plasmabilirubin an. Ein erhöhter Plasmabilirubinspiegel aufgrund von Lebertoxizität durch chronische Statingabe konnte nach Überprüfung der Leberenzyme ausgeschlossen werden. Im Vergleich zur präliminären Studie mit Bolusapplikation wurde nach dem 3-wöchigen Dosisregime nur eine sehr geringe HO-1-Resonanz der untersuchten Gewebearten festgestellt. Einzig im Herzgewebe und nicht mehr im pulmonalen Bereich konnte eine signifikant erhöhte HO-Aktivität nachgewiesen werden. Das Studiendesign näherte sich zwar durch die Konzentration von 5 mg Statin/kg KG und das längere Dosisregime humanen Therapierichtlinien, dennoch lag die gewählte Statinkonzentration um das ca. 5-fache oberhalb der humanen Dosis. Muchova und Mitarbeiter begründen die therapeutisch abweichende Konzentration

mit der kürzeren Anwendungsdauer, welche für den Versuch auf drei Wochen beschränkt war und beim Menschen Jahre beträgt. In einer weiteren Studie mit Ratten als Versuchstiere konnte durch die Gabe von Simvastatin eine induzierte pulmonale Hypertonie um 20 mm Hg gesenkt werden, (Zhang 2011). Die Tiere erhielten über einen Zeitraum von vier Wochen täglich 2 mg Simvastatin/kg KG. Der Simvastatineffekt war dabei an das HO-System gebunden, da die zusätzliche Gabe eines HO-Inhibitors den Effekt antagonisierte.

Werden verschiedene Studien hinsichtlich der Wirkung von Statinen auf die HO-1 verglichen, so wird deutlich, dass sowohl das jeweilige Statin als auch die Gewebeart eine entscheidende Rolle für die HO-1-Induktion spielen. Wird z. B. der Einfluss von Simvastatin, Lovastatin, Rosuvastatin und Atorvastatin nach Bolusapplikation auf die HO-Aktivität im murinen Lebergewebe betrachtet, so konnte nur für die lipophileren Statine Simvastatin und Lovastatin eine Steigerung der katalytischen Aktivität beobachtet werden (Hsu 2006). Für die weniger lipophilen Verbindungen Atorvastatin und Rosuvastatin wurde keine hepatische Enzymaktivierung nachgewiesen. Als mögliche Ursache wurde der hohe *First-Pass-Effekt* diskutiert. Simvastatin und Lovastatin werden als Prodrugs verabreicht, die in der Leber erst in ihre Wirkform umgewandelt werden. Weiterhin diffundieren Simvastatin und Lovastatin als lipophile Substanzen besser durch die Hepatozytenmembran als Atorvastatin und Rosuvastatin. Einheitlich scheint hingegen die Statinwirkung auf die kardiale und pulmonale Enzymaktivität zu sein. Alle Statine erhöhten die HO-Aktivität im Herz und in der Lunge, wobei Lovastatin mit einer 2,25-fachen Aktivitätssteigerung das Maximum darstellt. Im zerebralen Bereich stimulierten alle Statine außer Simvastatin die Enzymaktivität. Somit könnte weiterhin untersucht werden, ob die HO-1 bei verschiedenen zerebralen Erkrankungen von Relevanz ist und möglicherweise ein Bindeglied darstellt. Im neuronalen System wird die HO-1 u. a. als Schutzenzym unter pathologischen Bedingungen wie Hypoxie und zerebraler Ischämie induziert. Untersuchungen an transgenen HO-1-überexprimierenden Mäusen ergaben nach ischämischem Apoplex eine verringerte zerebrale Schädigung im Vergleich zum Wildtyp (Panahian 1999). Als Ursache für die geringeren Folgeschäden konnte ein konstitutiv erhöhter neuronaler cGMP-Spiegel, eine Inhibition der nuklearen Lokalisation des p53-Proteins und eine verstärkte antioxidative Wirkung durch die HO-1-Überexpression festgestellt werden. Auch bei Demenzerkrankungen wie Alzheimer wurde in ersten *in vivo* Studien ein Nutzen von Statinen beobachtet, der u. a. auf die Senkung der Amyloid- β -Synthese durch eine verringerte Cholesterolsynthese zurückgeführt wurde (Sparks 2005). Aber auch cholesterolonabhängige Mechanismen scheinen eine Rolle zu spielen, da das Demenzrisiko in Gegenwart von Statinen, jedoch nicht durch andere Cholesterolsenker, reduziert werden konnte (Jick 2000). Weiterhin konnte an Hunden durch die Applikation von 80 mg Atorvastatin/d nach 14,5 Monaten die Fehlerrate im Lernverhalten signifikant gesenkt werden. Die Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten wurde dabei mit einem Anstieg des zerebralen HO-1-Niveaus in Verbindung gebracht (Butterfield 2011). Die Lipophilie, die u. a. für die Überwindung der Blut-Hirnschranke entscheidend ist, scheint dabei kein begrenzendes Kriterium zu sein, da der protektive Effekt bei allen Statinen beobachtet wurde (Haag 2009). Haag und Mitarbeiter führten pharmakokinetische Eigenschaften und mögliche Transportmechanismen als Ursache an.

Durch die antioxidative und zytoprotektive Wirkung des HO-1-Systems ist ein vielseitiger Einsatz von HO-1-Induktoren denkbar. Somit könnte bei Erkrankungen mit HO-Defizienz wie es z. B. im pulmonalen Bereich bei Lungenkrebs, Asthma, bronchopulmonarer Dysplasie und idiopathischer pulmonarer Fibrose der Fall ist,

eine gezielte HO-1-Aktivierung zur Verbesserung des Krankheitsverlaufs führen (Sadikot 2004; Raval 2010; Constantin 2012). Bei der organspezifischen HO-1-Induktion sollte jedoch beachtet werden, dass die unter Lipidtherapie festgestellte Effizienz einzelner Statine nicht zwangsläufig mit der Intensität der pleiotropen Eigenschaften korreliert (Koh 2011). Somit müsste individuell untersucht werden, welches Statin für den jeweiligen Wirkungsbereich am effektivsten ist. In der CURVES-Studie wurden Atorvastatin, Simvastatin, Lovastatin, Fluvastatin und Pravastatin bezüglich ihrer LDL-Cholesterol- und Gesamtcholesterol-senkenden Eigenschaften verglichen (Jones 1998). Für Atorvastatin ließ sich die stärkste Wirkung auf den Cholesterolspiegel nachweisen. Anders verhält es sich bei der Beeinflussung des HO-1-Systems, wo für Atorvastatin geringere Effekte beobachtet wurden im Vergleich zu anderen Statinen (Dulak 2005).

Wenn auch in unterschiedlicher Intensität konnte für alle Statine eine Beeinflussung des HO-1-Systems nachgewiesen werden (Li 2007; Ferrandiz 2008; Hinkelmann 2010; Kwok 2012). Somit könnte das HO-1-System mitverantwortlich für die cholesterolumabhängige, antioxidative und endothelprotektive Wirkung von Statinen sein. Inwieweit sich diese pleiotrope Eigenschaft von Statinen gezielt für therapeutische Zwecke nutzen lässt, müsste in weiteren Studien untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung einer möglichen HO-1-Induktion als pleiotrope Eigenschaft von Statinen. Für die Untersuchungen wurde Simvastatin als Beispielsubstanz ausgewählt.

1. Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion

Simvastatin konnte als potenter Induktor der HO-1 nachgewiesen werden. Der Arzneistoff stimuliert dabei nicht nur die HO-1-Proteinbiosynthese in Primär- und Endothelzellen, sondern fungiert auch als Aktivator der HO-1-Transkription. Die Transkriptionssteigerung erfolgt durch Anregung der HO-1-Promotorregion und Induktion der HO-1-mRNA-Synthese in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit. Interessanterweise korreliert die verhältnismäßig geringe HO-1-Promotoraktivität nicht mit dem detektierten mRNA-Gehalt, sodass zusätzliche post-transkriptionale Mechanismen vermutet und bestätigt werden konnten. Simvastatin stabilisiert die HO-1-mRNA und verlängert dadurch die HWZ um 2,6 Stunden. Somit wird der HO-1-mRNA-Gehalt durch Simvastatin zum einen direkt über transkriptionale Mechanismen und zum anderen über den verzögerten mRNA-Abbau reguliert.

Inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse mit einer funktionellen Konsequenz verbunden sind, wurde in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress überprüft. Die unter Simvastatinexposition beobachtete Radikalsenkung konnte in Gegenwart des HO-1-Inhibitors CrMP antagonisiert werden. Somit steht die Induktion der HO-1 in kausalem Zusammenhang mit den antioxidativen Eigenschaften von Simvastatin.

2. Mechanismen der HO-1-Genregulation

Simvastatin ist in der Lage die Transduktionswege der MAPK ERK, p38 und der PI3K in Endothelzellen zu aktivieren. Für die Regulierung der Simvastatin-abhängigen HO-1-Expression konnten jedoch nur die MAPK p38 und die PI3K als essenzielle Bestandteile nachgewiesen werden. Spezifische Inhibitoren von p38 und PI3K antagonisierten die Induktion der HO-1-mRNA und die HO-1-Promotoraktivierung. Der Einsatz überexprimierter dominant negativer p38 α -MEF-Zellen bestätigt die Ergebnisse. Die im Wildtyp beobachtete Induktion der HO-1-Proteinbiosynthese blieb in der p38 α -defizienten Zelllinie aus.

Des Weiteren ergaben Untersuchungen mit Deletionsmutanten von HO-1-Promotorkonstrukten eine essenzielle Funktion der Regulationseinheit MARE für die Simvastatin-abhängige HO-1-Promotoraktivierung. Mutationen innerhalb der CRE-Region bewirkten hingegen keine Veränderung der HO-1-Promotoraktivität, so dass dieses Element nicht in die HO-1-Genregulation von Simvastatin involviert zu sein scheint.

Mechanistische Untersuchungen der HO-1-mRNA-Stabilität konnten die häufig beschriebene Beteiligung der MAPK p38 an mRNA-stabilisierenden Vorgängen für Simvastatin nicht bestätigen. Auch NO-abhängige Prozesse wurden als post-transkriptionale Signalwege ausgeschlossen. Notwendig hingegen scheint die Funktion von PI3K zu sein, da in Gegenwart eines PI3K-Inhibitors die HWZ der

HO-1-mRNA um 1,8 Stunden verkürzt wurde. Der PI3K-Signalweg fungiert somit transkriptional und post-transkriptional als bedeutender Bestandteil der Simvastatin-abhängigen HO-1-Induktion.

3. Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Induktion *in vivo*

Erste *in vivo* Untersuchungen am Mausmodell belegen den Einfluss von Simvastatin auf die HO-1-Genexpression. An transgenen HO-1-luc-Mäusen konnte nach Simvastatinapplikation eine erhöhte HO-1-Promotoraktivität im oberen abdominalen und sinistrolateralen Bereich festgestellt werden. Anschließende mRNA-Untersuchungen ergaben eine organspezifische HO-1-Induktion in der Leber, Lunge, Milz und im Herz. Zusätzlich wurde durch gaschromatographische Detektion des HO-Produktes CO eine gesteigerte katalytische HO-Aktivität im Herz- und Lungengewebe nachgewiesen.

Zusammenfassend konnte die HO-1-Induktion als pleiotrope Eigenschaft von Simvastatin nachgewiesen, molekularbiologische Mechanismen identifiziert und ein Zusammenhang zur antioxidativen Statinwirkung hergestellt werden. Dem HO-System wird eine zentrale Rolle bei der Gefäßprotektion zu geschrieben, so dass ein Teil der cholesterolumabhängigen *in vivo* Wirkungen von Simvastatin darüber vermittelt sein könnte. Weitere Studien sollten sich an diese Untersuchungen anschließen, um das therapeutische Potential einer HO-1-Induktion durch Simvastatin beurteilen zu können und das Indikationsspektrum möglicherweise zu erweitern.

Literaturverzeichnis

- Abraham N.G. und Kappas A. (2008): Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 60(1): 79-127.
- Aikawa M., Rabkin E., Sugiyama S., Voglic S.J., Fukumoto Y., Furukawa Y., Shiomi M., Schoen F.J. und Libby P. (2001): An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 103(2): 276-283.
- Al-Shabrawey M., Bartoli M., El-Remessy A.B., Ma G., Matragoon S., Lemtalsi T., Caldwell R.W. und Caldwell R.B. (2008): Role of NADPH oxidase and Stat3 in statin-mediated protection against diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(7): 3231-3238.
- Alam J. (1994): Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals. *J Biol Chem* 269(40): 25049-25056.
- Alam J. und Cook J.L. (2007): How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(2): 166-174.
- Alam J. und Den Z. (1992): Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 267(30): 21894-21900.
- Alam J., Wicks C., Stewart D., Gong P., Touchard C., Otterbein S., Choi A.M., Burow M.E. und Tou J. (2000): Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J Biol Chem* 275(36): 27694-27702.
- Albert M.A., Danielson E., Rifai N. und Ridker P.M. (2001): Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *Jama* 286(1): 64-70.
- Ali F., Hamdulay S.S., Kinderlerer A.R., Boyle J.J., Lidington E.A., Yamaguchi T., Soares M.P., Haskard D.O., Randi A.M. und Mason J.C. (2007): Statin-mediated cytoprotection of human vascular endothelial cells: a role for Kruppel-like factor 2-dependent induction of heme oxygenase-1. *J Thromb Haemost* 5(12): 2537-2546.
- Ali F., Zakkar M., Karu K., Lidington E.A., Hamdulay S.S., Boyle J.J., Zloh M., Bauer A., Haskard D.O., Evans P.C. und Mason J.C. (2009): Induction of the cytoprotective enzyme heme oxygenase-1 by statins is enhanced in vascular endothelium exposed to laminar shear stress and impaired by disturbed flow. *J Biol Chem* 284(28): 18882-18892.
- Alvarez-Maqueda M., El Bekay R., Alba G., Monteseirin J., Chacon P., Vega A., Martin-Nieto J., Bedoya F.J., Pintado E. und Sobrino F. (2004): 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes. *J Biol Chem* 279(21): 21929-21937.
- Alwine J.C., Kemp D.J. und Stark G.R. (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5350-5354.
- Appleton S.D., Chretien M.L., McLaughlin B.E., Vreman H.J., Stevenson D.K., Brien J.F., Nakatsu K., Maurice D.H. und Marks G.S. (1999): Selective inhibition of heme oxygenase, without inhibition of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations. *Drug Metab Dispos* 27(10): 1214-1219.

- Argmann C.A., Edwards J.Y., Sawyez C.G., O'Neil C.H., Hegele R.A., Pickering J.G. und Huff M.W. (2005): Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 280(23): 22212-22221.
- Arner E.S., Bjornstedt M. und Holmgren A. (1995): 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. Loss of thioredoxin disulfide reductase activity is accompanied by a large increase in NADPH oxidase activity. *J Biol Chem* 270(8): 3479-3482.
- Aviram M., Dankner G., Cogan U., Hochgraf E. und Brook J.G. (1992): Lovastatin inhibits low-density lipoprotein oxidation and alters its fluidity and uptake by macrophages: in vitro and in vivo studies. *Metabolism* 41(3): 229-235.
- Bach F.H. (2005): Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel. *Faseb J* 19(10): 1216-1219.
- Baigent C., Keech A., Kearney P.M., Blackwell L., Buck G., Pollicino C., Kirby A., Sourjina T., Peto R., Collins R. und Simes R. (2005): Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366(9493): 1267-1278.
- Balogun E., Hoque M., Gong P., Killeen E., Green C.J., Foresti R., Alam J. und Motterlini R. (2003): Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 371(Pt 3): 887-895.
- Barone E., Di Domenico F. und Butterfield D.A. (2013): Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer Disease: their pleiotropic functions as potential therapeutic TARGETS. *Biochem Pharmacol.*
- Becker J.C., Grosser N., Waltke C., Schulz S., Erdmann K., Domschke W., Schroder H. und Pohle T. (2006): Beyond gastric acid reduction: proton pump inhibitors induce heme oxygenase-1 in gastric and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345(3): 1014-1021.
- Bellosta S., Ferri N., Bernini F., Paoletti R. und Corsini A. (2000): Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 32(3): 164-176.
- Bellosta S., Paoletti R. und Corsini A. (2004): Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation* 109(23 Suppl 1): III50-57.
- Bellosta S., Via D., Canavesi M., Pfister P., Fumagalli R., Paoletti R. und Bernini F. (1998): HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(11): 1671-1678.
- Berndt G., Grosser N., Hoogstraate J. und Schroder H. (2005): AZD3582 increases heme oxygenase-1 expression and antioxidant activity in vascular endothelial and gastric mucosal cells. *Eur J Pharm Sci* 25(2-3): 229-235.
- Birnboim H.C. und Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Bouton C. und Demple B. (2000): Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. Translation-independent stabilization of the mRNA and evidence for direct action of nitric oxide. *J Biol Chem* 275(42): 32688-32693.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brook M., Tchen C.R., Santalucia T., McIlrath J., Arthur J.S., Saklatvala J. und Clark A.R. (2006): Posttranslational regulation of heme oxygenase-1 subcellular

- localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Mol Cell Biol* 26(6): 2408-2418.
- Bucher H.C., Griffith L.E. und Guyatt G.H. (1999): Systematic review on the risk and benefit of different cholesterol-lowering interventions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(2): 187-195.
- Burkhardt M., Glazova M., Gambaryan S., Vollkommer T., Butt E., Bader B., Heermeier K., Lincoln T.M., Walter U. und Palmeshofer A. (2000): KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *J Biol Chem* 275(43): 33536-33541.
- Butterfield D.A., Barone E., Di Domenico F., Cenini G., Sultana R., Murphy M.P., Mancuso C. und Head E. (2011): Atorvastatin treatment in a dog preclinical model of Alzheimer's disease leads to up-regulation of haem oxygenase-1 and is associated with reduced oxidative stress in brain. *Int J Neuropsychopharmacol* 15(7): 981-987.
- Camhi S.L., Alam J., Otterbein L., Sylvester S.L. und Choi A.M. (1995): Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13(4): 387-398.
- Camhi S.L., Alam J., Wiegand G.W., Chin B.Y. und Choi A.M. (1998): Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(2): 226-234.
- Campbell J.S., Seger R., Graves J.D., Graves L.M., Jensen A.M. und Krebs E.G. (1995): The MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 50: 131-159.
- Cannon C.P., Steinberg B.A., Murphy S.A., Mega J.L. und Braunwald E. (2006): Meta-analysis of cardiovascular outcomes trials comparing intensive versus moderate statin therapy. *J Am Coll Cardiol* 48(3): 438-445.
- Cantley L.C. (2002): The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573): 1655-1657.
- Cao Z., Liu L.Z., Dixon D.A., Zheng J.Z., Chandran B. und Jiang B.H. (2007): Insulin-like growth factor-I induces cyclooxygenase-2 expression via PI3K, MAPK and PKC signaling pathways in human ovarian cancer cells. *Cell Signal* 19(7): 1542-1553.
- Chang K.W., Lee T.C., Yeh W.I., Chung M.Y., Liu C.J., Chi L.Y. und Lin S.C. (2004): Polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) promoter is related to the risk of oral squamous cell carcinoma occurring on male areca chewers. *Br J Cancer* 91(8): 1551-1555.
- Chen J.C., Huang K.C. und Lin W.W. (2006): HMG-CoA reductase inhibitors upregulate heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 macrophages via ERK, p38 MAPK and protein kinase G pathways. *Cell Signal* 18(1): 32-39.
- Chen J.C., Huang K.C., Wingerd B., Wu W.T. und Lin W.W. (2004): HMG-CoA reductase inhibitors induce COX-2 gene expression in murine macrophages: role of MAPK cascades and promoter elements for CREB and C/EBPbeta. *Exp Cell Res* 301(2): 305-319.
- Chen K. und Maines M.D. (2000): Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46(3): 609-617.
- Chen Y.H., Lin S.J., Lin M.W., Tsai H.L., Kuo S.S., Chen J.W., Charng M.J., Wu T.C., Chen L.C., Ding Y.A., Pan W.H., Jou Y.S. und Chau L.Y. (2002): Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is

- associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet* 111(1): 1-8.
- Chironi G., Simon A., Gariepy J., Balice M., Del-Pino M. und Levenson J. (2005): Differential associations of statin and fibrate treatment with carotid arterial remodeling. *Am J Hypertens* 18(11): 1476-1481.
- Choi A.M. und Alam J. (1996): Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(1): 9-19.
- Chomczynski P. und Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-159.
- Chu D.M., Francis S.H., Thomas J.W., Maksymovitch E.A., Fosler M. und Corbin J.D. (1998): Activation by autophosphorylation or cGMP binding produces a similar apparent conformational change in cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273(23): 14649-14656.
- Chung S.W., Chen Y.H. und Perrella M.A. (2005): Role of Ets-2 in the regulation of heme oxygenase-1 by endotoxin. *J Biol Chem* 280(6): 4578-4584.
- Cojocaru L., Rusali A.C., Suta C., Radulescu A.M., Suta M. und Craiu E. (2013): The role of simvastatin in the therapeutic approach of rheumatoid arthritis. *Autoimmune Dis* 2013: 326258.
- Constantin M., Choi A.J., Cloonan S.M. und Ryter S.W. (2012): Therapeutic potential of heme oxygenase-1/carbon monoxide in lung disease. *Int J Hypertens* 2012: 859235.
- Contag C.H. und Stevenson D.K. (2001): In vivo patterns of heme oxygenase-1 transcription. *J Perinatol* 21 Suppl 1: S119-124; discussion S125-117.
- Council N.R. (1996): Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *National Academy Press Washington, D.C.* .
- Crisby M., Nordin-Fredriksson G., Shah P.K., Yano J., Zhu J. und Nilsson J. (2001): Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 103(7): 926-933.
- Davies S.P., Reddy H., Caivano M. und Cohen P. (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351(Pt 1): 95-105.
- Davignon J. (2004a): Emphasis on pleiotropic effects, a new paradigm shift? *Coron Artery Dis* 15(5): 223-225.
- Davignon J., Jacob R.F. und Mason R.P. (2004b): The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis* 15(5): 251-258.
- Dennerly P.A. (2000): Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr Top Cell Regul* 36: 181-199.
- Dichtl W., Dulak J., Frick M., Alber H.F., Schwarzacher S.P., Ares M.P., Nilsson J., Pachinger O. und Weidinger F. (2003): HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(1): 58-63.
- Dick P., Schillinger M., Minar E., Mlekusch W., Amighi J., Sabeti S., Schlager O., Raith M., Endler G., Mannhalter C., Wagner O. und Exner M. (2005): Haem oxygenase-1 genotype and cardiovascular adverse events in patients with peripheral artery disease. *Eur J Clin Invest* 35(12): 731-737.
- Djousse L., Levy D., Cupples L.A., Evans J.C., D'Agostino R.B. und Ellison R.C. (2001): Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the

- Framingham offspring study. *Am J Cardiol* 87(10): 1196-1200; A1194, 1197.
- Dogra G., Irish A., Chan D. und Watts G. (2007): A randomized trial of the effect of statin and fibrate therapy on arterial function in CKD. *Am J Kidney Dis* 49(6): 776-785.
- Dulak J., Loboda A., Jazwa A., Zagorska A., Dorler J., Alber H., Dichtl W., Weidinger F., Frick M. und Jozkowicz A. (2005): Atorvastatin affects several angiogenic mediators in human endothelial cells. *Endothelium* 12(5-6): 233-241.
- Durante W. (2011): Protective role of heme oxygenase-1 against inflammation in atherosclerosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16: 2372-2388.
- Durante W., Christodoulides N., Cheng K., Peyton K.J., Sunahara R.K. und Schafer A.I. (1997): cAMP induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 273(1 Pt 2): H317-323.
- Durante W. und Schafer A.I. (1998): Carbon monoxide and vascular cell function (review). *Int J Mol Med* 2(3): 255-262.
- Eckert G.P., Kirsch C. und Mueller W.E. (2001): Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and apoE-deficient mice. *Neuroreport* 12(5): 883-887.
- Eisenstein R.S., Garcia-Mayol D., Pettingell W. und Munro H.N. (1991): Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(3): 688-692.
- Elbirt K.K., Whitmarsh A.J., Davis R.J. und Bonkovsky H.L. (1998): Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 273(15): 8922-8931.
- Erdmann K., Grosser N., Schipporeit K. und Schroder H. (2006): The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *J Nutr* 136(8): 2148-2152.
- Erdmann K., Grosser N. und Schroder H. (2005): L-methionine reduces oxidant stress in endothelial cells: role of heme oxygenase-1, ferritin, and nitric oxide. *Aaps J* 7(1): E195-200.
- Fassbender K., Simons M., Bergmann C., Stroick M., Lutjohann D., Keller P., Runz H., Kuhl S., Bertsch T., von Bergmann K., Hennerici M., Beyreuther K. und Hartmann T. (2001): Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10): 5856-5861.
- Feinberg A.P. und Vogelstein B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132(1): 6-13.
- Feron O., Dessy C., Desager J.P. und Balligand J.L. (2001): Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 103(1): 113-118.
- Ferrandiz M.L. und Devesa I. (2008): Inducers of heme oxygenase-1. *Curr Pharm Des* 14(5): 473-486.
- Florio V.A. und Ross E.M. (1983): Regulation of the catalytic component of adenylate cyclase. Potentiative interaction of stimulatory ligands and 2',5'-dideoxyadenosine. *Mol Pharmacol* 24(2): 195-202.

- Foresti R. und Motterlini R. (1999): The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic Res* 31(6): 459-475.
- Furchgott R.F. und Jothianandan D. (1991): Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28(1-3): 52-61.
- Garthwaite J., Southam E., Boulton C.L., Nielsen E.B., Schmidt K. und Mayer B. (1995): Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48(2): 184-188.
- Gelosa P., Cimino M., Pignieri A., Tremoli E., Guerrini U. und Sironi L. (2007): The role of HMG-CoA reductase inhibition in endothelial dysfunction and inflammation. *Vasc Health Risk Manag* 3(5): 567-577.
- Gerdemann A., Griese N. und Schulz M. (2008): Statine und Makrolide. *Pharmazeutische Zeitung* 03.
- Giannopoulos S., Katsanos A.H., Tsvigoulis G. und Marshall R.S. (2012): Statins and cerebral hemodynamics. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(11): 1973-1976.
- Girona J., La Ville A.E., Sola R., Plana N. und Masana L. (1999): Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein oxidation. *Am J Cardiol* 83(6): 846-851.
- Giroux L.M., Davignon J. und Naruszewicz M. (1993): Simvastatin inhibits the oxidation of low-density lipoproteins by activated human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1165(3): 335-338.
- Gong P., Stewart D., Hu B., Vinson C. und Alam J. (2002): Multiple basic-leucine zipper proteins regulate induction of the mouse heme oxygenase-1 gene by arsenite. *Arch Biochem Biophys* 405(2): 265-274.
- Gortney J.S. und Sanders R.M. (2007): Impact of C-reactive protein on treatment of patients with cardiovascular disease. *Am J Health Syst Pharm* 64(19): 2009-2016.
- Gozzelino R., Jeney V. und Soares M.P. (2010): Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 323-354.
- Greenwood J. und Mason J.C. (2007): Statins and the vascular endothelial inflammatory response. *Trends Immunol* 28(2): 88-98.
- Griendling K.K., Sorescu D. und Ushio-Fukai M. (2000): NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86(5): 494-501.
- Grochot-Przeczek A., Dulak J. und Jozkowicz A. (2013): Therapeutic angiogenesis for revascularization in peripheral artery disease. *Gene* 525(2): 220-228.
- Grosser N., Abate A., Oberle S., Vreman H.J., Dennerly P.A., Becker J.C., Pohle T., Seidman D.S. und Schroder H. (2003): Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin. *Biochem Biophys Res Commun* 308(4): 956-960.
- Grosser N., Erdmann K., Hemmerle A., Berndt G., Hinkelmann U., Smith G. und Schroder H. (2004a): Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 325(3): 871-876.
- Grosser N., Hemmerle A., Berndt G., Erdmann K., Hinkelmann U., Schurger S., Wijayanti N., Immenschuh S. und Schroder H. (2004b): The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 37(12): 2064-2071.
- Grosser N., Hemmerle A., Berndt G., Erdmann K., Hinkelmann U., Schurger S., Wijayanti N., Immenschuh S. und Schroder H. (2004c): The antioxidant

- defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 37(12): 2064-2071.
- Grundemar L. und Ny L. (1997): Pitfalls using metalloporphyrins in carbon monoxide research. *Trends Pharmacol Sci* 18(6): 193-195.
- Guan J., Wu X., Arons E. und Christou H. (2008): The p38 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the regulation of heme oxygenase-1 by acidic extracellular pH in aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 105(5): 1298-1306.
- Guengerich F.P., Ballou D.P. und Coon M.J. (1975): Purified liver microsomal cytochrome P-450. Electron-accepting properties and oxidation-reduction potential. *J Biol Chem* 250(18): 7405-7414.
- Guhaniyogi J. und Brewer G. (2001): Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265(1-2): 11-23.
- Gullotta F., di Masi A., Coletta M. und Ascenzi P. (2013): CO metabolism, sensing, and signaling. *Biofactors* 38(1): 1-13.
- Guzik T.J., West N.E., Black E., McDonald D., Ratnatunga C., Pillai R. und Channon K.M. (2000): UltraRapid communications : vascular superoxide production by NAD(P)H Oxidase Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86(9): 1008.
- Haag M.D., Hofman A., Koudstaal P.J., Stricker B.H. und Breteler M.M. (2009): Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(1): 13-17.
- Habara K., Hamada Y., Yamada M., Tokuhara K., Tanaka H., Kaibori M., Kamiyama Y., Nishizawa M., Ito S. und Okumura T. (2008): Pitavastatin up-regulates the induction of iNOS through enhanced stabilization of its mRNA in pro-inflammatory cytokine-stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide* 18(1): 19-27.
- Habeos I.G., Ziros P.G., Chartoumpekis D., Psyrogiannis A., Kyriazopoulou V. und Papavassiliou A.G. (2008): Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver. *J Mol Med* 86(11): 1279-1285.
- Hajdena-Dawson M., Zhang W., Contag P.R., Wong R.J., Vreman H.J., Stevenson D.K. und Contag C.H. (2003): Effects of metalloporphyrins on heme oxygenase-1 transcription: correlative cell culture assays guide in vivo imaging. *Mol Imaging* 2(3): 138-149.
- Hambleton J., Weinstein S.L., Lem L. und DeFranco A.L. (1996): Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2774-2778.
- Han J., Lee J.D., Bibbs L. und Ulevitch R.J. (1994): A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265(5173): 808-811.
- Harrison P.M. und Arosio P. (1996): The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275(3): 161-203.
- Hartsfield C.L., Alam J., Cook J.L. und Choi A.M. (1997): Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 273(5 Pt 1): L980-988.
- Hayashi S., Omata Y., Sakamoto H., Higashimoto Y., Hara T., Sagara Y. und Noguchi M. (2004): Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 336(2): 241-250.

- Heeba G., Moselhy M., Hassan M., Khalifa M., Gryglewski R. und Malinski T. (2009): Anti-atherogenic effect of statins: role of nitric oxide, peroxy-nitrite and haem oxygenase-1. *Br J Pharmacol*.
- Hernandez-Perera O., Perez-Sala D., Navarro-Antolin J., Sanchez-Pascuala R., Hernandez G., Diaz C. und Lamas S. (1998): Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101(12): 2711-2719.
- Hinkelmann U., Grosser N., Erdmann K., Schroder H. und Immenschuh S. (2010): Simvastatin-dependent up-regulation of heme oxygenase-1 via mRNA stabilization in human endothelial cells. *Eur J Pharm Sci* 41(1): 118-124.
- Hoekstra K.A., Godin D.V., Kurtu J. und Cheng K.M. (2003): Heme oxygenase and antioxidant status in cultured aortic endothelial cells isolated from atherosclerosis-susceptible and -resistant Japanese quail. *Mol Cell Biochem* 252(1-2): 253-262.
- Hopkins P.N., Wu L.L., Hunt S.C., James B.C., Vincent G.M. und Williams R.R. (1996): Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(2): 250-255.
- Hou Y., Lascola J., Dulin N.O., Ye R.D. und Browning D.D. (2003): Activation of cGMP-dependent protein kinase by protein kinase C. *J Biol Chem* 278(19): 16706-16712.
- Hsieh C.H., Rau C.S., Hsieh M.W., Chen Y.C., Jeng S.F., Lu T.H. und Chen S.S. (2008): Simvastatin-induced heme oxygenase-1 increases apoptosis of Neuro 2A cells in response to glucose deprivation. *Toxicol Sci* 101(1): 112-121.
- Hsu M., Muchova L., Morioka I., Wong R.J., Schroder H. und Stevenson D.K. (2006): Tissue-specific effects of statins on the expression of heme oxygenase-1 in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 343(3): 738-744.
- Hu H., Sung A., Zhao G., Shi L., Qiu D., Nishimura T. und Kao P.N. (2006): Simvastatin enhances bone morphogenetic protein receptor type II expression. *Biochem Biophys Res Commun* 339(1): 59-64.
- Huang Y.Y., Martin K.C. und Kandel E.R. (2000): Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* 20(17): 6317-6325.
- Hwang Y.P. und Jeong H.G. (2008): The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress. *FEBS Lett* 582(17): 2655-2662.
- Immenschuh S., Hinke V., Katz N. und Kietzmann T. (2000): Transcriptional induction of heme oxygenase-1 gene expression by okadaic acid in primary rat hepatocyte cultures. *Mol Pharmacol* 57(3): 610-618.
- Immenschuh S., Hinke V., Ohlmann A., Gifhorn-Katz S., Katz N., Jungermann K. und Kietzmann T. (1998): Transcriptional activation of the haem oxygenase-1 gene by cGMP via a cAMP response element/activator protein-1 element in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 334 (Pt 1): 141-146.
- Inamdar N.M., Ahn Y.I. und Alam J. (1996): The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 221(3): 570-576.

- Ishikawa K. (2003): Heme oxygenase-1 against vascular insufficiency: roles of atherosclerotic disorders. *Curr Pharm Des* 9(30): 2489-2497.
- Istvan E.S. (2002): Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J* 144(6 Suppl): S27-32.
- Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M. und Nabeshima Y. (1997): An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236(2): 313-322.
- Jacobson T.A., Miller M. und Schaefer E.J. (2007): Hypertriglyceridemia and cardiovascular risk reduction. *Clin Ther* 29(5): 763-777.
- Jick H., Zornberg G.L., Jick S.S., Seshadri S. und Drachman D.A. (2000): Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356(9242): 1627-1631.
- Johnson R.A., Yeung S.M., Stubner D., Bushfield M. und Shoshani I. (1989): Cation and structural requirements for P site-mediated inhibition of adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 35(5): 681-688.
- Jones P., Kafonek S., Laurora I. und Hunninghake D. (1998): Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 81(5): 582-587.
- Kacimi R., Chentoufi J., Honbo N., Long C.S. und Karliner J.S. (2000): Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection. *Cardiovasc Res* 46(1): 139-150.
- Kaneda H., Ohno M., Taguchi J., Togo M., Hashimoto H., Ogasawara K., Aizawa T., Ishizaka N. und Nagai R. (2002): Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(10): 1680-1685.
- Kase H., Iwahashi K., Nakanishi S., Matsuda Y., Yamada K., Takahashi M., Murakata C., Sato A. und Kaneko M. (1987): K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 142(2): 436-440.
- Kietzmann T., Samoylenko A. und Immenschuh S. (2003): Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 278(20): 17927-17936.
- Kikuchi A., Yamaya M., Suzuki S., Yasuda H., Kubo H., Nakayama K., Handa M., Sasaki T., Shibahara S., Sekizawa K. und Sasaki H. (2005): Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism. *Hum Genet* 116(5): 354-360.
- Kim H.J., Tsoy I., Park M.K., Lee Y.S., Lee J.H., Seo H.G. und Chang K.C. (2006): Iron released by sodium nitroprusside contributes to heme oxygenase-1 induction via the cAMP-protein kinase A-mitogen-activated protein kinase pathway in RAW 264.7 cells. *Mol Pharmacol* 69(5): 1633-1640.
- Kim K.J., Kim K.S., Kim N.R. und Chin H.S. (2012): Effects of simvastatin on the expression of heme oxygenase-1 in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(10): 6456-6464.
- Kitamuro T., Takahashi K., Ogawa K., Uono-Fujimori R., Takeda K., Furuyama K., Nakayama M., Sun J., Fujita H., Hida W., Hattori T., Shirato K., Igarashi K. und Shibahara S. (2003): Bach1 functions as a hypoxia-inducible

- repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J Biol Chem* 278(11): 9125-9133.
- Kocanova S., Buytaert E., Matroule J.Y., Piette J., Golab J., de Witte P. und Agostinis P. (2007): Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38MAPK and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy. *Apoptosis* 12(4): 731-741.
- Koh K.K., Sakuma I. und Quon M.J. (2011): Differential metabolic effects of distinct statins. *Atherosclerosis* 215(1): 1-8.
- Koizumi S. (2007): Human heme oxygenase-1 deficiency: a lesson on serendipity in the discovery of the novel disease. *Pediatr Int* 49(2): 125-132.
- Kronke G., Bochkov V.N., Huber J., Gruber F., Bluml S., Furnkranz A., Kadl A., Binder B.R. und Leitinger N. (2003): Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 278(51): 51006-51014.
- Kronke G., Kadl A., Ikonomu E., Bluml S., Furnkranz A., Sarembock I.J., Bochkov V.N., Exner M., Binder B.R. und Leitinger N. (2007): Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(6): 1276-1282.
- Kurata S. und Nakajima H. (1990): Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by TPA in mouse M1 cells during their differentiation to macrophage. *Exp Cell Res* 191(1): 89-94.
- Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I., Bialik A., Fulton D., Lefer D.J., Sessa W.C. und Walsh K. (2000): The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6(9): 1004-1010.
- Kwok S.C., Samuel S.P. und Handal J. (2012): Atorvastatin activates heme oxygenase-1 at the Stress Response Elements. *J Cell Mol Med*.
- Kyriakis J.M. und Avruch J. (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2): 807-869.
- Lacut K., Oger E., Le Gal G., Couturaud F., Louis S., Leroyer C. und Mottier D. (2004): Statins but not fibrates are associated with a reduced risk of venous thromboembolism: a hospital-based case-control study. *Fundam Clin Pharmacol* 18(4): 477-482.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- LaFevre-Bernt M., Corbin J.D., Francis S.H. und Miller W.T. (1998): Phosphorylation and activation of cGMP-dependent protein kinase by Src. *Biochim Biophys Acta* 1386(1): 97-105.
- Lasa M., Mahtani K.R., Finch A., Brewer G., Saklatvala J. und Clark A.R. (2000): Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol* 20(12): 4265-4274.
- Laufs U. und Liao J.K. (1998): Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273(37): 24266-24271.
- Leautaud V. und Demple B. (2007): Regulation of heme oxygenase-1 mRNA deadenylation and turnover in NIH3T3 cells by nitrosative or alkylation stress. *BMC Mol Biol* 8: 116.
- Lee H.J., Lee J., Min S.K., Guo H.Y., Lee S.K., Kim H.R., Pae H.O., Chung H.T., Hong S.H., Lee S.K. und Kim E.C. (2008): Differential induction of heme oxygenase-1 against nicotine-induced cytotoxicity via the PI3K, MAPK, and

- NF-kappa B pathways in immortalized and malignant human oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med*.
- Lee T.S., Chang C.C., Zhu Y. und Shyy J.Y. (2004): Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. *Circulation* 110(10): 1296-1302.
- Lennernas H. und Fager G. (1997): Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* 32(5): 403-425.
- Leon M.M., Cojocaru E., Cobzaru R., Didi A. und Mitu F. (2013): The role of statins in deep vein thrombosis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 116(3): 817-822.
- Li C., Hossieny P., Wu B.J., Qawasmeh A., Beck K. und Stocker R. (2007): Pharmacologic induction of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal* 9(12): 2227-2239.
- Liao J.K. und Laufs U. (2005): Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 89-118.
- Libby P. und Aikawa M. (2003): Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol* 91(4A): 4B-8B.
- Lim S., Sakuma I., Quon M.J. und Koh K.K. (2012): Potentially important considerations in choosing specific statin treatments to reduce overall morbidity and mortality. *Int J Cardiol*.
- Lusis A.J. (2000): Atherosclerosis. *Nature* 407(6801): 233-241.
- Maines M.D. (1988): Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *Faseb J* 2(10): 2557-2568.
- Maines M.D. (1997): The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554.
- Martin D., Rojo A.I., Salinas M., Diaz R., Gallardo G., Alam J., De Galarreta C.M. und Cuadrado A. (2004): Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* 279(10): 8919-8929.
- Mason J.C. (2003): Statins and their role in vascular protection. *Clin Sci (Lond)* 105(3): 251-266.
- Masuya Y., Hioki K., Tokunaga R. und Taketani S. (1998): Involvement of the tyrosine phosphorylation pathway in induction of human heme oxygenase-1 by hemin, sodium arsenite, and cadmium chloride. *J Biochem* 124(3): 628-633.
- Mayer M. (2000): Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 46(11): 1723-1727.
- McCaffrey A., Kay M.A. und Contag C.H. (2003): Advancing molecular therapies through in vivo bioluminescent imaging. *Mol Imaging* 2(2): 75-86.
- McCoubrey W.K., Jr., Huang T.J. und Maines M.D. (1997a): Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem* 272(19): 12568-12574.
- McCoubrey W.K., Jr., Huang T.J. und Maines M.D. (1997b): Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247(2): 725-732.
- Miyazawa K., Mori A., Miyata H., Akahane M., Ajisawa Y. und Okudaira H. (1998): Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273(38): 24832-24838.

- Morita T., Mitsialis S.A., Koike H., Liu Y. und Kourembanas S. (1997): Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272(52): 32804-32809.
- Motohashi H., Shavit J.A., Igarashi K., Yamamoto M. und Engel J.D. (1997): The world according to Maf. *Nucleic Acids Res* 25(15): 2953-2959.
- Mouawad C.A., Mrad M.F., Al-Hariri M., Soussi H., Hamade E., Alam J. und Habib A. (2013): Role of nitric oxide and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor in statin-dependent induction of heme oxygenase-1 in mouse macrophages. *PLoS One* 8(5): e64092.
- Mrad M.F., Mouawad C.A., Al-Hariri M., Eid A.A., Alam J. und Habib A. (2012): Statins modulate transcriptional activity of heme-oxygenase-1 promoter in NIH 3T3 Cells. *J Cell Biochem* 113(11): 3466-3475.
- Muchova L., Wong R.J., Hsu M., Morioka I., Vitek L., Zelenka J., Schroder H. und Stevenson D.K. (2007): Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice: a novel mechanism of in vivo antioxidant protection. *Can J Physiol Pharmacol* 85(8): 800-810.
- Mullis K.B. und Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Nagy V. und Watzele M. (2006): FuGENE® 6 Transfection Reagent: minimizing reagent-dependent side effects as analyzed by gene-expression profiling and cytotoxicity assays *Nature Methods* 3(10.1038/nmeth879).
- Naidu S., Vijayan V., Santoso S., Kietzmann T. und Immenschuh S. (2009): Inhibition and genetic deficiency of p38 MAPK up-regulates heme oxygenase-1 gene expression via Nrf2. *J Immunol* 182(11): 7048-7057.
- Nakaso K., Yano H., Fukuhara Y., Takeshima T., Wada-Isoe K. und Nakashima K. (2003): PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 546(2-3): 181-184.
- Nguyen T., Sherratt P.J. und Pickett C.B. (2003): Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 233-260.
- Nikitovic D., Holmgren A. und Spyrou G. (1998): Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 242(1): 109-112.
- O'Driscoll G., Green D. und Taylor R.R. (1997): Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 95(5): 1126-1131.
- Oberle S., Abate A., Grosser N., Vreman H.J., Dennery P.A., Schneider H.T., Stalleicken D. und Schroder H. (2002): Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythryl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun* 290(5): 1539-1544.
- Ono K. und Han J. (2000): The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12(1): 1-13.
- Otterbein L.E., Soares M.P., Yamashita K. und Bach F.H. (2003): Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24(8): 449-455.
- Paine A., Eiz-Vesper B., Blasczyk R. und Immenschuh S. (2010): Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 80(12): 1895-1903.
- Panahian N., Yoshiura M. und Maines M.D. (1999): Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem* 72(3): 1187-1203.

- Park I.H., Hwang E.M., Hong H.S., Boo J.H., Oh S.S., Lee J., Jung M.W., Bang O.Y., Kim S.U. und Mook-Jung I. (2003): Lovastatin enhances Abeta production and senile plaque deposition in female Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 24(5): 637-643.
- Paumelle R., Blanquart C., Briand O., Barbier O., Duhem C., Woerly G., Percevault F., Fruchart J.C., Dombrowicz D., Glineur C. und Staels B. (2006): Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 98(3): 361-369.
- Paumelle R. und Staels B. (2007): Peroxisome proliferator-activated receptors mediate pleiotropic actions of statins. *Circ Res* 100(10): 1394-1395.
- Pedersen T.R., Kjekshus J., Berg K., Haghfelt T., Faergeman O., Faergeman G., Pyorala K., Miettinen T., Wilhelmsen L., Olsson A.G. und Wedel H. (1994): Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl* 5(3): 81-87.
- Polte T., Abate A., Dennery P.A. und Schroder H. (2000): Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1209-1215.
- Polte T., Hemmerle A., Berndt G., Grosser N., Abate A. und Schroder H. (2002): Atrial natriuretic peptide reduces cyclosporin toxicity in renal cells: role of cGMP and heme oxygenase-1. *Free Radic Biol Med* 32(1): 56-63.
- Pomeranec Y., Grion N., Gadda L., Pannunzio V., Podesta E.J. und Cymeryng C.B. (2004): Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells. *J Endocrinol* 180(1): 113-124.
- Poss K.D. und Tonegawa S. (1997a): Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10919-10924.
- Poss K.D. und Tonegawa S. (1997b): Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10925-10930.
- Radhakrishnan N., Yadav S.P., Sachdeva A., Pruthi P.K., Sawhney S., Piplani T., Wada T. und Yachie A. (2011): Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *J Pediatr Hematol Oncol* 33(1): 74-78.
- Raingaud J., Gupta S., Rogers J.S., Dickens M., Han J., Ulevitch R.J. und Davis R.J. (1995): Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270(13): 7420-7426.
- Ramos-Nino M.E., Haegens A., Shukla A. und Mossman B.T. (2002): Role of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in cell injury and proliferation by environmental particulates. *Mol Cell Biochem* 234-235(1-2): 111-118.
- Raval C.M. und Lee P.J. (2010): Heme oxygenase-1 in lung disease. *Curr Drug Targets* 11(12): 1532-1540.
- Rave N., Crkvenjakov R. und Boedtker H. (1979): Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzoyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acids Res* 6(11): 3559-3567.
- Ray K.K., Cannon C.P., Cairns R., Morrow D.A., Rifai N., Kirtane A.J., McCabe C.H., Skene A.M., Gibson C.M., Ridker P.M. und Braunwald E. (2005): Relationship between uncontrolled risk factors and C-reactive protein levels in patients receiving standard or intensive statin therapy for acute coronary syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol* 46(8): 1417-1424.

- Rees D.D., Palmer R.M., Schulz R., Hodson H.F. und Moncada S. (1990): Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101(3): 746-752.
- Riad A., Du J., Stiehl S., Westermann D., Mohr Z., Sobirey M., Doehner W., Adams V., Pauschinger M., Schultheiss H.P. und Tschope C. (2007): Low-dose treatment with atorvastatin leads to anti-oxidative and anti-inflammatory effects in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 569(3): 204-211.
- Ricchetti G.A., Williams L.M. und Foxwell B.M. (2004): Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 76(3): 719-726.
- Ridker P.M. und Luscher T.F. (2014): Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *Eur Heart J*.
- Ridley S.H., Dean J.L., Sarsfield S.J., Brook M., Clark A.R. und Saklatvala J. (1998): A p38 MAP kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA. *FEBS Lett* 439(1-2): 75-80.
- Rifai N. und Ridker P.M. (2002): Inflammatory markers and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 13(4): 383-389.
- Ross J. (1995): mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59(3): 423-450.
- Ross R. (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362(6423): 801-809.
- Roux P.P. und Blenis J. (2004): ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 320-344.
- Rushworth S.A., Ogborne R.M., Charalambos C.A. und O'Connell M.A. (2006): Role of protein kinase C delta in curcumin-induced antioxidant response element-mediated gene expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 341(4): 1007-1016.
- Ryter S.W. und Choi A.M. (2013): Carbon monoxide: present and future indications for a medical gas. *Korean J Intern Med* 28(2): 123-140.
- Ryter S.W., Morse D. und Choi A.M. (2007): Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(2): 175-182.
- Ryter S.W., Otterbein L.E., Morse D. und Choi A.M. (2002): Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235(1-2): 249-263.
- Ryter S.W. und Tyrrell R.M. (2000): The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28(2): 289-309.
- Sadikot R.T., Christman J.W. und Blackwell T.S. (2004): Molecular targets for modulating lung inflammation and injury. *Curr Drug Targets* 5(6): 581-588.
- Salinas M., Diaz R., Abraham N.G., Ruiz de Galarreta C.M. und Cuadrado A. (2003): Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 278(16): 13898-13904.
- Salinas M., Wang J., Rosa de Sagarra M., Martin D., Rojo A.I., Martin-Perez J., Ortiz de Montellano P.R. und Cuadrado A. (2004): Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 578(1-2): 90-94.
- Sambrook J., Fritsch E. und Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York*.

- Schillinger M., Exner M., Minar E., Mlekusch W., Mullner M., Mannhalter C., Bach F.H. und Wagner O. (2004): Heme oxygenase-1 genotype and restenosis after balloon angioplasty: a novel vascular protective factor. *J Am Coll Cardiol* 43(6): 950-957.
- Schwertner H.A., Jackson W.G. und Tolan G. (1994): Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 40(1): 18-23.
- Schwertner H.A. und Vitek L. (2008): Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis* 198(1): 1-11.
- Shibahara S., Muller R.M. und Taguchi H. (1987): Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262(27): 12889-12892.
- Shishehbor M.H., Brennan M.L., Aviles R.J., Fu X., Penn M.S., Sprecher D.L. und Hazen S.L. (2003): Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 108(4): 426-431.
- Simpson I.A., Lorimer A.R., Walker I.D. und Davidson J.F. (1985): Effect of Ciprofibrate on platelet aggregation and fibrinolysis in patients with hypercholesterolaemia. *Thromb Haemost* 54(2): 442-444.
- Soares M.P. und Bach F.H. (2007): Heme oxygenase-1 in organ transplantation. *Front Biosci* 12: 4932-4945.
- Son Y., Lee J.H., Chung H.T. und Pae H.O. (2013): Therapeutic Roles of Heme Oxygenase-1 in Metabolic Diseases: Curcumin and Resveratrol Analogues as Possible Inducers of Heme Oxygenase-1. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 639541.
- Sparks D.L., Sabbagh M.N., Connor D.J., Lopez J., Launer L.J., Browne P., Wasser D., Johnson-Traver S., Lochhead J. und Ziolkowski C. (2005): Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Arch Neurol* 62(5): 753-757.
- Sparrow C.P., Burton C.A., Hernandez M., Mundt S., Hassing H., Patel S., Rosa R., Hermanowski-Vosatka A., Wang P.R., Zhang D., Peterson L., Detmers P.A., Chao Y.S. und Wright S.D. (2001): Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(1): 115-121.
- Staels B., Koenig W., Habib A., Merval R., Lebret M., Torra I.P., Delerive P., Fadel A., Chinetti G., Fruchart J.C., Najib J., Maclouf J. und Tedgui A. (1998): Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393(6687): 790-793.
- Stark H. (2003): Medizinisch-chemische Aspekte von Statinen: Wirkmechanismus von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. *Pharmazie in unserer Zeit* 32(6): 464-470.
- Steffens S. und Mach F. (2006): Drug insight: Immunomodulatory effects of statins--potential benefits for renal patients? *Nat Clin Pract Nephrol* 2(7): 378-387.
- Studer M., Briel M., Leimenstoll B., Glass T.R. und Bucher H.C. (2005): Effect of different antilipidemic agents and diets on mortality: a systematic review. *Arch Intern Med* 165(7): 725-730.
- Takemoto M. und Liao J.K. (2001): Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(11): 1712-1719.
- Tamboli I.Y., Barth E., Christian L., Siepmann M., Kumar S., Singh S., Tolksdorf K., Heneka M.T., Lutjohann D., Wunderlich P. und Walter J. (2010): Statins promote the degradation of extracellular amyloid {beta}-peptide by microglia

- via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *J Biol Chem* 285(48): 37405-37414.
- Tarpey M.M., White C.R., Suarez E., Richardson G., Radi R. und Freeman B.A. (1999): Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res* 84(10): 1203-1211.
- Tenhunen R., Marver H.S. und Schmid R. (1968): The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61(2): 748-755.
- Terry C.M., Clikeman J.A., Hoidal J.R. und Callahan K.S. (1998): Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol* 274(3 Pt 2): H883-891.
- Terry C.M., Clikeman J.A., Hoidal J.R. und Callahan K.S. (1999): TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca²⁺, and phospholipase A2 in endothelial cells. *Am J Physiol* 276(5 Pt 2): H1493-1501.
- Toullec D., Pianetti P., Coste H., Bellevergue P., Grand-Perret T., Ajakane M., Baudet V., Boissin P., Boursier E., Loriolle F. und et al. (1991): The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266(24): 15771-15781.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Trigona W.L., Mullarky I.K., Cao Y. und Sordillo L.M. (2006): Thioredoxin reductase regulates the induction of haem oxygenase-1 expression in aortic endothelial cells. *Biochem J* 394(Pt 1): 207-216.
- Tsiara S., Elisaf M. und Mikhailidis D.P. (2003): Early vascular benefits of statin therapy. *Curr Med Res Opin* 19(6): 540-556.
- Valenti L., Mathieu J., Chancerelle Y., Levacher M., Chanaud B., De Sousa M., Strzalko S., Dinh-Xuan A.T., Giroud J.P. und Florentin I. (2003): Nitric oxide inhibits spleen cell proliferative response after burn injury by inducing cytostasis, apoptosis, and necrosis of activated T lymphocytes: role of the guanylate cyclase. *Cell Immunol* 221(1): 50-63.
- Van Aelst L. und D'Souza-Schorey C. (1997): Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11(18): 2295-2322.
- van Nieuw Amerongen G.P., Vermeer M.A., Negre-Aminou P., Lankelma J., Emeis J.J. und van Hinsbergh V.W. (2000): Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 102(23): 2803-2809.
- Vanhaesebroeck B. und Alessi D.R. (2000): The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3: 561-576.
- Vanhaesebroeck B. und Waterfield M.D. (1999): Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 253(1): 239-254.
- Vasquez-Vivar J., Hogg N., Pritchard K.A., Jr., Martasek P. und Kalyanaraman B. (1997): Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett* 403(2): 127-130.
- Vaughan C.J., Gotto A.M., Jr. und Basson C.T. (2000): The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 35(1): 1-10.
- Venugopal R. und Jaiswal A.K. (1998): Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17(24): 3145-3156.

- Verma A., Hirsch D.J., Glatt C.E., Ronnett G.V. und Snyder S.H. (1993): Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 259(5093): 381-384.
- Violi F., Calvieri C., Ferro D. und Pignatelli P. (2013a): Statins as antithrombotic drugs. *Circulation* 127(2): 251-257.
- Violi F. und Pignatelli P. (2013b): Statins as Regulators of Redox Signaling in Platelets. *Antioxid Redox Signal*.
- Vivanco I. und Sawyers C.L. (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7): 489-501.
- Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y. und Brown R.F. (1994): A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269(7): 5241-5248.
- Volpe J.A., O'Toole M.C. und Caughey W.S. (1975): Quantitative infrared spectroscopy of CO complexes of cytochrome c oxidase, hemoglobin and myoglobin: evidence for one CO per heme. *Biochem Biophys Res Commun* 62(1): 48-53.
- Vreman H.J., Cipkala D.A. und Stevenson D.K. (1996): Characterization of porphyrin heme oxygenase inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol* 74(3): 278-285.
- Vreman H.J., Ekstrand B.C. und Stevenson D.K. (1993): Selection of metalloporphyrin heme oxygenase inhibitors based on potency and photoreactivity. *Pediatr Res* 33(2): 195-200.
- Vreman H.J. und Stevenson D.K. (1988): Heme oxygenase activity as measured by carbon monoxide production. *Anal Biochem* 168(1): 31-38.
- Wagner A.H., Kohler T., Ruckschloss U., Just I. und Hecker M. (2000): Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(1): 61-69.
- Wang Y., Liu C.L., Storey J.D., Tibshirani R.J., Herschlag D. und Brown P.O. (2002): Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 5860-5865.
- Wassmann S., Laufs U., Muller K., Konkol C., Ahlbory K., Baumer A.T., Linz W., Bohm M. und Nickenig G. (2002): Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(2): 300-305.
- Weber C.M., Eke B.C. und Maines M.D. (1994): Corticosterone regulates heme oxygenase-2 and NO synthase transcription and protein expression in rat brain. *J Neurochem* 63(3): 953-962.
- Weitz-Schmidt G. (2002): Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* 23(10): 482-486.
- Weitz-Schmidt G., Welzenbach K., Brinkmann V., Kamata T., Kallen J., Bruns C., Cottens S., Takada Y. und Hommel U. (2001): Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 7(6): 687-692.
- Weng Y.H., Yang G., Weiss S. und Dennerly P.A. (2003): Interaction between heme oxygenase-1 and -2 proteins. *J Biol Chem* 278(51): 50999-51005.
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B. und Johnson G.L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79(1): 143-180.
- Wierzbicki A.S., Poston R. und Ferro A. (2003): The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther* 99(1): 95-112.
- Wiesel P., Foster L.C., Pellacani A., Layne M.D., Hsieh C.M., Huggins G.S., Strauss P., Yet S.F. und Perrella M.A. (2000): Thioredoxin facilitates the

- induction of heme oxygenase-1 in response to inflammatory mediators. *J Biol Chem* 275(32): 24840-24846.
- Wijayanti N., Kietzmann T. und Immenschuh S. (2005): Heme oxygenase-1 gene activation by the NAD(P)H oxidase inhibitor 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride via a protein kinase B, p38-dependent signaling pathway in monocytes. *J Biol Chem* 280(23): 21820-21829.
- Winzen R., Kracht M., Ritter B., Wilhelm A., Chen C.Y., Shyu A.B., Muller M., Gaestel M., Resch K. und Holtmann H. (1999): The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J* 18(18): 4969-4980.
- Wolozin B., Kellman W., Ruisseau P., Celesia G.G. und Siegel G. (2000): Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57(10): 1439-1443.
- Wong R.J., Zhao H. und Stevenson D.K. (2012): A deficiency in haem oxygenase-1 induces foetal growth restriction by placental vasculature defects. *Acta Paediatr* 101(8): 827-834.
- Wymann M.P. und Pirola L. (1998): Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436(1-2): 127-150.
- Yano M., Matsumura T., Senokuchi T., Ishii N., Murata Y., Taketa K., Motoshima H., Taguchi T., Sonoda K., Kukidome D., Takuwa Y., Kawada T., Brownlee M., Nishikawa T. und Araki E. (2007): Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res* 100(10): 1442-1451.
- Yao P., Nussler A., Liu L., Hao L., Song F., Schirmeier A. und Nussler N. (2007): Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J Hepatol* 47(2): 253-261.
- Yet S.F., Layne M.D., Liu X., Chen Y.H., Ith B., Sibinga N.E. und Perrella M.A. (2003): Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling. *Faseb J* 17(12): 1759-1761.
- Yet S.F., Perrella M.A., Layne M.D., Hsieh C.M., Maemura K., Kobzik L., Wiesel P., Christou H., Kourembanas S. und Lee M.E. (1999): Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest* 103(8): R23-29.
- Zhang W.H., Zhang Y.J., Liu C.P., Yu B.X. und Lu W.X. (2011): Simvastatin protects against the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats via a heme oxygenase-1-dependent pathway. *Exp Lung Res* 37(8): 492-499.
- Zhao Y., Brandish P.E., DiValentin M., Schelvis J.P., Babcock G.T. und Marletta M.A. (2000): Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* 39(35): 10848-10854.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Effekt von Statinen auf die Cholesterolsynthese	1
Abbildung 2:	Strukturformeln	4
Abbildung 3:	Hämoxygenase-Enzymreaktion	5
Abbildung 4:	Schematische Übersicht des MAPK-Weges	10
Abbildung 5:	Schematische Übersicht des PI3K/Akt-Weges	12
Abbildung 6:	Regulatorische Domänen des murinen und humanen HO-1-Gens (Ryter 2002)	14
Abbildung 7:	HO-1-Genkonstrukt in stabil transfizierten HO-1-Luc-NIH3T3-Zellen (Hajdena-Dawson 2003)	18
Abbildung 8:	Zwei-Kanülensystem für das Entfernen von vorhandenem CO (Appleton 1999)	29
Abbildung 9:	Zwei-Kanülensystem für die gaschromatographische CO-Detektion (Appleton 1999)	30
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der humanen HO-1-Reportergenkonstrukte	32
Abbildung 11:	Effekt von Simvastatin auf die NADPH-induzierte ROS-Bildung in Endothelzellen	41
Abbildung 12:	Effekt von Simvastatin auf die HO-1-Proteinexpression in HUVEC- und ECV304-Zellen	42
Abbildung 13:	a) Konzentrations- und b) zeitabhängiger Effekt von Simvastatin auf die Expression der HO-1-mRNA in ECV304-Zellen	44
Abbildung 14:	Effekt von Simvastatin auf die hHO-1-Promotoraktivität in transient transfizierten ECV304-Zellen	44
Abbildung 15:	Effekt von Simvastatin auf die mHO-1-Promotoraktivität in stabil transfizierten HO-1-Luc-NIH3T3-Zellen	45
Abbildung 16:	Effekt von Simvastatin auf die HWZ der HO-1-mRNA in ECV304-Zellen	46
Abbildung 17:	Effekt des HO-1-Inhibitors CrMP auf die radikalsenkende Wirkung von Simvastatin in Endothelzellen	47
Abbildung 18:	Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA	49
Abbildung 19:	Effekt von Simvastatin auf die Phosphorylierung von MAPK in ECV304-Zellen	51

Abbildung 20:	Effekt von p38-Inhibitoren auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-Promotoraktivität in ECV304-Zellen	52
Abbildung 21:	Effekt von Simvastatin auf die HO-1-Promotoraktivität in transient transfizierten Wildtyp- und p38 α -defizienten MEF-Zellen.....	53
Abbildung 22:	Effekt von Simvastatin auf die HO-1-Proteinexpression in Wildtyp- und p38 α -defizienten MEF-Zellen	54
Abbildung 23:	Effekt des PI3K-Inhibitors LY294002 auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA.....	55
Abbildung 24:	Effekt von Simvastatin auf die Phosphorylierung von Akt in ECV304-Zellen.....	56
Abbildung 25:	Effekt von PI3K-Inhibitoren auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-Promotoraktivität in ECV304-Zellen.....	56
Abbildung 26:	Effekt des AC-Inhibitors a) DDA und b) PKA-Inhibitors KT5720 auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA	57
Abbildung 27:	Effekt des Guanylatcyclase-Inhibitors a) OEQ und des PKG-Inhibitors b) KT5823 auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA.....	58
Abbildung 28:	Effekt des PKC-Inhibitors GF109203 auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA.....	59
Abbildung 29:	Effekt des TRX-Reduktase-Inhibitors DNCB auf die Simvastatin-vermittelte Induktion der HO-1-mRNA.....	59
Abbildung 30:	Effekt von Simvastatin auf die hHO-1-Promotoraktivität in transient transfizierten ECV304-Zellen	60
Abbildung 31:	Effekt des NO-Synthasehemmstoffes L-NAME auf die Simvastatin-vermittelte HWZ-Verlängerung der HO-1-mRNA.....	62
Abbildung 32:	Effekt des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 auf die Simvastatin-vermittelte HWZ-Verlängerung der HO-1-mRNA	63
Abbildung 33:	Effekt des PI3K-Inhibitors LY294002 auf die Simvastatin-vermittelte HWZ-Verlängerung der HO-1-mRNA	64
Abbildung 34:	Zusammenfassung der Inhibitoreffekte auf die Simvastatin-vermittelte Stabilisierung der HO-1-mRNA.....	65
Abbildung 35:	Effekt von Simvastatin auf die HO-1-Promotoraktivität in HO-1-Luc-Mäusen	67
Abbildung 36:	Organspezifischer Effekt von Simvastatin auf die HO-1-mRNA-Induktion im Mausmodell	68
Abbildung 37:	Organspezifische Effekte von Simvastatin auf die HO-Aktivität im Mausmodell (Hsu 2006)	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Familie	11
Tabelle 2:	Passagedauer und Zellkulturmedien der verwendeten Zelllinien	19
Tabelle 3:	Antikörperlösungen	21
Tabelle 4:	Inkubationsprotokoll der verwendeten Antikörper	22
Tabelle 5:	Gensonden	23
Tabelle 6:	Primersequenzen.....	27
Tabelle 7:	Thermozyklus der cDNA-Synthese und der Amplifikation.....	27
Tabelle 8:	Reaktionsansatz für die real-time RT-PCR	27
Tabelle 9:	Reaktionsansatz für die Bestimmung der HO-Aktivität	29
Tabelle 10:	Promotorkonstrukte.....	33

Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen

Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, Erdmann K, Hinkelmann U, Schürger S, Wijayanti N, Immenschuh S, Schröder H (2004)

The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 37:2064-2071.

Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Hinkelmann U, Smith G, Schröder H (2004)

Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 325:871-876.

Hinkelmann U, Grosser N, Erdmann K, Schroder H, Immenschuh S (2010)

Simvastatin-dependent up-regulation of heme oxygenase-1 via mRNA stabilization in human endothelial cells. *Eur J Pharm Sci* 41(1): 118-124.

In Kurzform publizierte Vorträge und Poster (Abstracts)

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

Hinkelmann U, Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Smith G, Schröder H (2005) Rosuvastatin increases heme oxygenase-1 expression and antioxidant activity in endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371 (Suppl 1):R13

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

Grosser N, Hemmerle A, Erdmann K, Hinkelmann U, Wijayanti N, Immenschuh S, Smith G, Schröder H (2005) Heme oxygenase-1 and ferritin induction by rosuvastatin: a protective antioxidant stratagem in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:e69 Washington, DC., USA

Hinkelmann U, Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Oberle-Plümpe S, Smith G, Schröder H (2005) Antioxidant actions of rosuvastatin: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *4th International Congress Heme Oxygenase, Boston, MA, USA*

Grosser N, Hinkelmann U, Hemmerle A, Erdmann K, Berndt G, Schürger S, Wijayanti N, Immenschuh S, Schröder H (2005) Heme oxygenase-1 as target and mediator of pleiotropic statin actions. *4th International Congress Heme Oxygenase, Boston, MA, USA*

Hinkelmann U, Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Schürger S, Wijayanti N, Immenschuh S, Schröder H (2006) Regulation of heme oxygenase-1 expression by statins via MAP-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:e75 Denver, CO, USA

Schulz S, Grosser N, Erdmann K, Hinkelmann U, Wong RJ, Stevenson DK and Schröder H (2008) Upregulation of the HO-1 Gene by proton pump inhibitors – molecular mechanisms and functional consequences. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377 (Suppl 1): 60

Hinkelmann U, Schulz S, Grosser N, Wong RJ, Morisawa T, Stevenson DK, Muchova L and Schröder H (2008) Heme oxygenase-1 and simvastatin: molecular mechanisms and in vivo effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377 (Suppl 1): 58

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Henning Schröder danke für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und für den Freiraum, den er mir während der Promotionszeit und bei der Gestaltung meiner Arbeit gab. Unvergessen werden die Forschungsaufenthalte an der Stanford University und die Teilnahme an internationalen Kongressen bleiben.

Für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung bis zum Abschluss der Arbeit danke ich vor allem Frau Dr. Nina Großer. Sie hatte jederzeit ein offenes Ohr und war eine wunderbare Betreuerin. Frau Dr. Kati Erdmann, Herrn Dr. Stephan Schürger und Frau Dr. Stephanie Kourula bin ich sowohl für die fachliche Hilfe als auch die freundschaftliche Zusammenarbeit während der Promotionszeit, für die Durchsicht der Arbeit und für die gemeinsame Zeit auch außerhalb des Labors dankbar. Den guten Seelen Frau Kathrin Born, Frau Petra Schwartz und Frau Astrid Nemitz danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung im Zelllabor und bei den Versuchen.

Herrn Prof. Dr. David K. Stevenson danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor an der Stanford University, School of Medicine Experimente durchführen zu dürfen. Durch die wundervolle Art seiner Mitarbeiter Herrn Dr. Hendrik J. Vreman, Herrn Ronald J. Wong, Frau Dr. Lucie Muchova, Frau Dr. Hui Zhao, Frau Dr. Stacy Burns-Guydisch, Herrn Dr. Takeshi Mohisawa und Frau Stella Gengania-Dina sind die Forschungsaufenthalte zu einer Bereicherung in meinem Leben geworden. Einzigartig war die gemeinsame Zeit vor allem aber auch durch Frau Dr. Stephanie Kourula. Ihre Unterstützung im Labor und die vielen wundervollen Erlebnisse werden unvergessen bleiben.

Für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, die Einweisung in den Genreporter-Assay und die Bereitstellung der Reportergenkonstrukte bedanke ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. Stephan Immenschuh und Frau Dr. Nastitii Wijayanti, Universitätsklinikum Gießen. Frau Dr. Lucie Muchova bin ich für ihr enormes Entgegenkommen und ihre Hilfe bei den *in vivo* Versuchen dankbar. Die radioaktiven Untersuchungen konnten freundlicherweise im Isotopenlabor des Biozentrums Weinbergweg unter Anleitung von Dr. Margret Köck und Frau Karin Klar durchgeführt werden.

Dem Land Sachsen-Anhalt danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines dreijährigen Graduiertenstipendiums. Die Auslandsaufenthalte wurden vom Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) und der GlaxoSmithKline-Stiftung gefördert.

Allen großen und kleinen, bewussten und unbewussten Helfern, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, danke ich ebenfalls von ganzem Herzen.

Ein ganz besonderer Dank gilt den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Mann und meiner Tochter, denen ich für ihre wundervolle Art, ihre Liebe und den enormen Halt, den sie mir in meinem Leben geben, zutiefst dankbar bin.

Selbständigkeitserklärung

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

Weimar, den 01.06.2014

Urte Hinkelmann

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Urte Hinkelmann
Geburtsdatum: 23. Juni 1979
Geburtsort: Arnstadt
Familienstand: ledig
Kinder: Tochter, geboren am 04.09.2011

Berufliche Tätigkeit

seit Juni 2012 Inhaberin der Apotheke am Wiesenhügel, Erfurt

seit Jan. 2009 Inhaberin der Wilhelm-Hey-Apotheke, Amt
Wachsenburg, Ictershausen

Aug. - Dez. 2008 Apothekerin in der König-Heinrich-Apotheke,
Merseburg

April 2004 - Mai 2008 Doktorandin am Institut für Pharmazie, Abteilung
Pharmakologie und Toxikologie für Natur-
wissenschaftler, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg

Okt. 2003 - März 2004 Pharmazeut im Praktikum am Institut für
Pharmazie, Abteilung Pharmakologie und
Toxikologie für Naturwissenschaftler, Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

Dez. 2002 - Mai 2003 Pharmazeut im Praktikum in der Prenz´l-Apotheke,
Berlin

Stipendien und Forschungsaufenthalte

Nov. 2006 - Jan. 2007 Forschungsaufenthalt an der Stanford University,
School of Medicine, CA, USA
Stipendium der GlaxoSmithKline-Stiftung

Mai - Juni 2006 Forschungsaufenthalt an der Stanford University,
School of Medicine, CA, USA
Stipendium des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes

Okt. 2003 - Sept. 2006 Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz
des Landes Sachsen-Anhalt

Hochschulbildung

Juni 2004 Approbation als Apothekerin
Mai 2004 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Aug. 2002 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Aug. 2000 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Sept. 1998 - April 2004 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther
Universität, Halle-Wittenberg

Schulbildung

1991-1998 Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium in Arnstadt
Abschluss Allgemeine Hochschulreife
1986-1990 Clara-Zetkin-Grundschule in Arnstadt

Weimar, den 01.06.2014

Urte Hinkelmann