

Marie-Therese Frisch

**Mechanismen der Hämoxxygenase-1 (HO-1)
Induktion durch die Docosahexaensäure
(DHA) in vaskulären glatten Muskelzellen**

Masterarbeit

Betreuer:

Prof. Saša Frank¹; Prof. Andrea Olschewski²; Slaven Crnkovic, PhD²

¹Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Medizinische Universität Graz

²Zentrum für molekulare Grundlagenforschung (ZMF), Medizinische Universität Graz

Graz, Dezember 2013

Zusammenfassung

Zielsetzung: Hämoxxygenase-1 (HO-1), die induzierbare Isoform der HO ist ein zytoprotektives Enzym, das den Abbau von Häm zu Kohlenmonoxid, Bilirubin und freiem Eisen katalysiert. Diesen Produkten werden antioxidative, antiapoptotische, antiproliferative und antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Die Docosahexaensäure (DHA), eine Omega-3-Fettsäure, zeigt positive Wirkungen auf verschiedene vaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose und pulmonaler arterieller Hypertonie. Ziel meiner Masterarbeit war es, die Mechanismen der HO-1 Induktion in DHA-behandelten glatten Muskelzellen (SMC) zu erforschen.

Methoden: Experimente wurden in humanen primären glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie (hPASMC) sowie in humanen glatten Muskelzellen der Aorta (hASMC) durchgeführt. Die HO-1 Expression wurde auf mRNA-Ebene (qRT PCR) und Protein-Ebene (Westernblot) nach der Behandlung der Zellen mit i) Antioxidantien, ii) pharmakologischen Inhibitoren verschiedener Signal-Kaskaden oder iii) nach Inhibierung der Expression des Transkriptionsfaktors Nrf2 mittels siRNA untersucht. Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde fluorometrisch mit dem Farbstoff H₂DCFDA und die metabolische Aktivität der Zellen mit dem AlamarBlue-Assay gemessen.

Resultate: DHA induzierte die HO-1 in hPASMC und hASMC dosis- und zeitabhängig. HO-2 wurde durch DHA nicht induziert. Die metabolische Aktivität der hPASMC wurde von DHA nicht beeinflusst. Durch Nrf-2 knock down per siRNA in DHA behandelten SMC wurde die HO-1 Expression unterdrückt. Antioxidantien verringerten die DHA-vermittelte HO-1 Induktion. DHA induzierte die ROS-Bildung. Cyclooxygenase- und NADPH-Oxidase-Inhibitoren, der Calciumchelator BAPTA und auch PI3K- und MEK-Inhibitoren konnten die DHA-vermittelte HO-1 Induktion verhindern.

Schlussfolgerung: DHA induziert die HO-1 durch die Bildung von ROS und Aktivierung von Nrf2 unter Beteiligung der PI3K/AKT- und MAPK/ERK-Signalwege.

Abstract

Objective: Heme oxygenase-1 (HO-1), the inducible isoform of HO is a cytoprotective enzyme that catalyzes heme degradation into carbon monoxide, bilirubin and free iron. These products have antioxidant, anti-apoptotic, anti-proliferative and anti-inflammatory effects. Docosahexanoic acid (DHA), an omega-3 fatty acid, has positive effects on various vascular diseases, such as atherosclerosis and pulmonary arterial hypertension. The aim of my thesis was to investigate the mechanisms of HO-1 induction by DHA in smooth muscle cells (SMC).

Methods: Experiments were performed in primary human pulmonary artery SMC (hPASMC) and human aortic SMC line (hASMC). HO-1 expression on mRNA and protein level was determined by quantitative real time PCR and Western blots upon treatment of cells with i) antioxidants, ii) pharmacological inhibitors of various signaling pathways or iii) upon si RNA-mediated knock down - of transcription factor Nrf2. Generation of reactive oxygen species (ROS) was measured fluorometrically using the dye H₂DCFDA and the metabolic activity of cells was measured with AlamarBlue assay.

Results: DHA induced HO-1 in hPASMC and hASMC in a dose-and time-dependent manner. HO-2 was not induced by DHA. The metabolic activity of hPASMC could not be influenced by DHA. Nrf2 knockdown attenuated DHA-induced HO-1 expression. DHA-mediated HO-1 induction was reduced by antioxidants in line with DHA-induced ROS production. Cyclooxygenase- and NADPH-Oxidase inhibitors, calcium chelator BAPTA and PI3K- and MEK-inhibitors contributed to attenuation of the DHA-mediated HO-1 induction.

Conclusion: DHA induction of HO-1 is dependent on induction of ROS, activation of Nrf2 and PI3K/AKT- and MAPK/ERK- cascades.

Deutsche Fassung:

Beschluss der Curricula-Kommission für Bachelor-, Master- und Diplomstudien vom 10.11.2008
Genehmigung des Senates am 1.12.2008

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen / Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

(Unterschrift)

Englische Fassung:

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

.....

date

.....

(signature)

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Glossar/Abkürzungen	1
1.2	Hämoxygenase	3
1.2.1	HO-1	3
1.2.2	HO-2	4
1.2.3	HO-3	5
1.2.4	enzymatische Aktivität der HO-1	6
1.3	Biliverdin/ Bilirubin	7
1.4	Eisen	9
1.5	Kohlenmonoxid	10
1.6	Die Rolle der HO bei Erkrankungen	12
1.6.1	HO-1 und Atherosklerose	12
1.6.2	HO-1 und pulmonale Hypertonie	15
1.7	DHA	18
1.7.1	DHA in vaskulären Erkrankungen	19
1.7.2	DHA produziert ROS	21
1.7.3	DHA induziert HO-1	22
2	Methoden	24
2.1	Zellkultur	24
2.2	Gene Silencing	25
2.3	Zell-Lyse für RNA-Isolation und Reverse Transkription	25
2.4	Quantitative Real Time PCR (qRT PCR)	26
2.5	Westernblot	27
2.6	Zellvitalität	28
2.7	ROS Messung	28
2.8	Statistik	29
3	Material	30
4	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1	DHA induziert HO-1 in Abhängigkeit der Konzentration in hPASC MC	35
4.2	DHA induziert HO-1 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer in hPASC MC	36
4.3	HO-2 wird in hPASC MC durch DHA nicht beeinflusst	38
4.4	Die metabolische Aktivität der hPASC MC wird von DHA nicht beeinflusst	39

4.5	Tempol verringert die DHA-vermittelte HO-1 Induktion in hPASMC.....	39
4.6	Nrf2 Silencing verringert die DHA-induzierte HO-1 Expression in hPASMC	41
4.7	DHA induziert die HO-1 Expression in hASMC	44
4.8	Nrf2 silencing verringert die DHA-induzierte HO-1 Expression in hASMC ...	45
4.9	DHA induziert ROS in hASMC	47
4.10	ROS induziert HO-1 in hASMC	48
4.11	Die Rolle von NADPH-Oxidase und COX in DHA induzierter HO-1 Expression	53
4.12	Calcium ist bei der DHA-induzierten HO-1 Expression beteiligt	55
4.13	Die Rolle der PI3K/AKT und MAPK/ERK Signalwege für die DHA- abhängige Aktivierung der HO-1 Genexpression.....	57
5	Schlussfolgerung.....	59
6	Abbildungsverzeichnis.....	60
7	Tabellenverzeichnis.....	60
8	Referenzen.....	61

1 Einleitung

1.1 Glossar/Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ALA	α -Linolensäure
ARE	Antioxidant response element
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BR	Bilirubin
BV	Biliverdin
BVR	Biliverdin-Reduktase
B2mg	β -2-Mikroglobulin
CAD	Koronararterielle Erkrankung
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
COX	Cyclooxygenase
CVD	Cardiovaskuläre Erkrankung
DHA	Docosahexaensäure
DETCA	Diethylthiocarbamat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPA	Eicosapentaensäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
Fe	Eisen
FS	Fettsäure
hASMC	Humane glatte Muskelzellen der Aorta
HDL	High density lipoprotein
HNE	Hydroxynonenal
HO (-1, -2, -3)	Hämoxygenase (-1, -2, -3)
hPASMC	Humane glatte Muskelzellen der Pulmonalarterie
HSP	Hitzeschock-Protein
H ₂ DCFDA	2',7'-Dichlorhydrofluoresceindiacetat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

Indomethacin	1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LA	Linolsäure
LDL	Low density lipoprotein
MAP	Mitogen-activated Protein
MARE	Maf recognition element
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MetOH	Methanol
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
•OH	Hydroxyl-Radikal
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PHLHD	PAH aufgrund von linker Herzerkrankung
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
SMC	Smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)
SOD	Superoxid-Dismutase
StRE	Stress response element
Tempol	4-Hydroxy-2,2,6,6,-tetramethylpiperidin-N-oxyl
TF	Transkriptionsfaktor
TG	Triglyceride
Tiron	4,5-Dihydroxy-1,3-benzoldisulfonsäure
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
TMS	Transmembransegment
UCB	Unconjugated Bilirubin
UDP	Uridindiphosphat
UTR	Untranslated Region
VAS	3-benzyl-7-(2-benzoxazolyl)thio-1,2,3-triazolo(4,5-d)pyrimidin
VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzelle

1.2 Hämoxygenase

Zur Familie der Hämoxygenase gehören drei Isoformen (HO-1, HO-2, HO-3). Diese verschiedenen Formen konnten in Tieren und Bakterien, aber auch in Pflanzen und Pilzen detektiert werden. Da die HO stark konserviert ist, waren die Eigenschaften des Enzyms vermutlich schon früh in der Evolution sehr wichtig.

1.2.1 HO-1

Die HO-1, auch als Hitzeschock oder "Stress response Protein" (HSP32) bekannt, ist die vorherrschende der drei Isoformen. Sie stammt vom Gen *hmx1* ab, das sich auf dem Chromosom 22q12 befindet. Das HO-1 Protein ist circa 32 kDa schwer und wurde als ein integrales Typ-I Membranprotein des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER) identifiziert.^{1,2,3} Das hydrophobe und am C-Terminus befindliche Transmembransegment (TMS) ragt in das ER-Lumen und ist für die Verankerung der HO an der ER-Membran nötig. Die aktive Stelle des Enzyms ragt in das Zytoplasma.⁴ Lokalisiert ist die HO-1 in Mikrosomen, jedoch wurde auch gezeigt, dass das Enzym im Nukleus, in den Mitochondrien und in Caveolen vorhanden ist.^{5,6,7}

Lin et al. beschreiben, dass HO-1 Induktoren wie Hypoxie oder Häm die Migration des Proteins in den Nukleus fördern. Assoziiert ist dieser Transfer mit der proteolytischen Spaltung des Enzyms, wobei das C-terminale Ende entfernt wird. Für den nukleären Import der HO-1 ist die "nuclear shuttling sequence" (NSS) erforderlich. Aufgrund der Migration in den Kern verliert die HO ihre Aktivität, Häm zu degradieren. Die Hämoxygenase ist jedoch kein Transkriptionsfaktor (TF), wahrscheinlich gibt es im Kern einen indirekten Effekt durch Bindungsveränderungen bei Transkriptionsfaktoren. So könnte die Bindung der HO-1 mit TF, die in oxidativem Stress involviert sind, die Zelle vor beispielsweise Wasserstoffperoxid (H_2O_2) schützen.⁵

Die NADPH Cytochrom P450 Reduktase ist für die maximale enzymatische Aktivität der HO-1 außerhalb des Kerns sehr wichtig. Daher sind diese beiden Enzyme auch ganz nah lokalisiert. Der größte Anteil des HO-1 Proteins wurde in Geweben detektiert, die alte Erythrozyten abbauen, wie in der Leber, in der Milz und im Knochenmark. So zeigten sich bei *Hmx1*^{-/-} Mäusen eine Splenomegalie und eine fibrotische Milz, auch die Konzentration des freien Eisens ist in diesen Mäusen erhöht.⁸ In anderen Geweben ist die HO-1 normalerweise nicht

detektierbar, jedoch kann das Enzym induziert werden.^{1,9} Die Transkription des Gens *hmx1* kann gesteigert werden, wenn es zu einem Anstieg seines natürlichen Substrates Häm kommt, aber auch durch viele andere endogene Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Cytokine, Schwermetalle, Hormone, Hypoxie, Wachstumsfaktoren und weitere. Viele dieser Faktoren stehen im Zusammenhang mit oxidativem Stress und der Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) in der Zelle.¹⁰ Die Expression der HO-1 kann auch durch die Biliverdin-Reduktase, die das Biliverdin zu Bilirubin umwandelt, induziert werden. Auch durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) kann die HO-1 Expression angekurbelt werden. Daher wird vermutet, dass unterschiedliche Komponenten des Bilirubin-Systems die Expression von Genen regulieren.¹¹

Die Transkriptionsaktivierung kann also durch viele verschiedene Induktoren eingeleitet werden. Zwei Enhancer-Regionen wurden bei -4k b und -10 kb, relativ zur HO-1 Transkriptionsstart-Stelle im Mausgen gefunden. Ein wichtiges Sequenzelement ist das "Stress response element" (StRE), das strukturell und funktionell dem "Maf recognition element" (MARE) und dem "antioxidant response element" (ARE) ähnelt. Verschiedene Regulatoren der Transkription binden an diesen Sequenzen, auch der Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) und Bach1. Nrf2 enthält eine Transkriptionsaktivierungs-Domäne. Bach1 (BTB und CNC Homologie 1) konkurriert mit Nrf2 und kann die Transkription des *hmx1* unterdrücken.^{12,13} Noch viele weitere Sequenzen auf- und abwärts des *hmx1*-Promoters konnten als aktive Elemente identifiziert werden.¹⁰

1.2.2 HO-2

Das Gen der zweiten Isoform, das der HO-2 (*hmx2*), befindet sich auf dem Chromosom 16p13.3. Das HO-2 Protein hat ein Gewicht von etwa 36 kDa. Es wird kontinuierlich in den meisten Geweben exprimiert und kann nicht induziert werden. Eine Kopie des HO-2 Gens kodiert fünf verschiedene HO-2 Transkripte, die drei verschiedene 5' Untranslated Regions (UTR) und 2 verschiedene Polyadenylierungssignale benutzen. Alle 5 Transkripte sind innerhalb der kodierenden Region ident.^{14,18} Die humanen Gene, Maus- und Ratten-Gene der HO-1 (14 kb) und der HO-2 (12 kb) sind ähnlich organisiert, nämlich in 5 Exons und 4 Introns.

Sowohl die HO-1, als auch die HO-2 katalysieren den Häm-Abbau. Sie benötigen ähnliche Substrate und Co-Faktoren für die Hämoxydation, die Kinetik der enzymatischen Reaktion unterscheiden sich jedoch. Auch in der Primärstruktur und den biochemischen/-physikalischen Eigenschaften gibt es Unterschiede.¹⁵ Ähnlichkeiten der beiden Isoformen findet man in ihrer hydrophoben Region am C-Terminus, der als Anker der Proteine dient. Auch eine hoch konservierte Sequenz von 24 Aminosäure-Resten stimmt mit der Häm-katalytischen Domäne überein und wurde in beiden Isoformen gefunden.¹⁰

Die Rolle von HO-2 ist noch nicht ganz klar, aber man vermutet, dass das Enzym eine wichtige Rolle in epidermalen Zellen und Signaltransduktion in neuronalen Gewebe spielt. Die Konzentration von HO-2 ist in den Geweben unterschiedlich, wobei sie in humanen dermalen Fibroblasten sehr niedrig und in epidermalen Keratinozyten sehr hoch ist. Bei Ratten ist die HO-2 in der Retina, im Gehirn und in den Hoden am höchsten exprimiert.¹⁶ Eine gezielte Deletion des Häm-Oxygenase-2-Gens verringert oxidativen Stress in kultivierten Neuronen und zeigt eine zytoprotektive Wirkung. Die selektive Hemmung der neuronalen Hämoxygenase könnte auch eine positive Wirkung nach einer ZNS-Blutung haben.¹⁷

1.2.3 HO-3

Eine weitere Isoform (HO-3) der HO wurde in Rattengewebe detektiert. Diese gefundene HO-3 war ein Produkt eines einzelnen Transkripts von 2,4 kb, wobei das Protein 33 kDa schwer ist. Das Transkript konnte in verschiedenen Organen wie Leber, Milz, Gehirn und Niere gefunden werden, wobei das Expressionsmuster der HO-2 ähnelte. Zwischen den 5' UTR der HO-2 und der HO-3 cDNA gab es keine Ähnlichkeit. Die beiden Gene (*hmox3a*, *hmox3b*) sind jedoch fast homolog zu den Exons 2-5 von HO-2 und beinhalten keine Introns. Die Aminosäurestruktur ähnelte der HO-2 sogar sehr (90%). Das aufgereinigte HO-3 Protein zeigte nur eine sehr geringe enzymatische Aktivität. Im Endeffekt stellte sich heraus, dass es sich bei dieser Isoform um ein Pseudogen der HO-2 handelt. Bis heute wurde kein natürlich vorkommendes HO-3 Protein gefunden.^{18,19,20}

1.2.4 enzymatische Aktivität der HO-1

Aufgrund des enzymatischen Abbaus von Häm durch die Hämoxygenase wird Kohlenmonoxid (CO), Eisen (Fe) und Biliverdin (BV) gebildet. Sowohl die HO-1, als auch die HO-2 katalysieren den ersten Schritt in der oxidativen Degradation. Hierbei wird der Hämring geöffnet und eine der Methenbrücken zu CO umgewandelt. Das Eisen wird danach vom resultierenden linearen Tetrapyrrol (Biliverdin) entlassen. In Säugern wird das Biliverdin anschließend durch eine NAD(P)H-abhängige Biliverdin-Reduktase (BVR) in Bilirubin (BR) umgewandelt. Das Bilirubin wird danach durch die Uridindiphosphat (UDP)-Glucuronyl-Transferase konjugiert und über die Gallenblase ausgeschieden.

Die HO ist für das Recycling des Eisens von alten Erythrozyten und extrahematopoetischen Zellen, wie Leberzellen, verantwortlich. Das gebildete Eisen wird in Form von Eisen-II entlassen und die α -Methenbrücke des Kohlenstoffs vom Häm als Kohlenmonoxid entfernt. Die Hämoxygenase bindet Häm in einem 1:1 molaren Komplex, wobei pro Häm drei Moleküle Sauerstoff (O₂) und sieben Elektronen benötigt werden. Die Elektronen stammen von NADPH, die durch die Cytochrom P450 Reduktase geliefert werden.^{1,20}

Die Entfernung des toxischen Häms ist jedoch nicht die einzige Funktion der Hämoxygenase. Die Endprodukte (BR, CO, Fe) spielen eine signifikante Rolle in der vaskulären Biologie, im Eisen-Recycling und beim zellulären Schutz gegen oxidativen Stress und bei Erkrankungen, die mit derartigem Stress assoziiert werden.^{20,21} Eine antioxidative Rolle der HO-1 wurde in einigen wichtigen Experimenten bestätigt:

- i) Die Transfektion der Zelle mit dem HO-1 Gen oder die Induktion des HO-1-Proteins schützt das Gewebe vor Schäden, die durch Oxidantien verursacht werden.
- ii) HO-1 knockout-Mäuse zeigen eine reduzierte Stress-Abwehr, wenn sie oxidativen Stress ausgesetzt sind.
- iii) Die HO-1 Genexpression ist extrem sensitiv, sie wird bei oxidativem Stress in vielen verschiedenen Geweben bei Säugetieren stark erhöht.²²

1.3 Biliverdin/ Bilirubin

Das durch die Hämoxxygenase gebildete Biliverdin wird in Säugern rasch durch die Biliverdin-Reduktase in Bilirubin umgewandelt. Bilirubin ist eine endogene Komponente, die eine toxische Wirkung aufweist. Man hat jedoch entdeckt, dass unkonjugiertes Bilirubin (UCB) eine stark antioxidative Aktivität besitzt und dass eine leichte Hyperbilirubinämie sogar positive Effekte auf die Gesundheit haben könnte.

Das UCB IXa 4Z, 15Z-Molekül ist die Hauptkomponente in Säugern und hat eine sonderliche stereo-chemische Struktur, bestehend aus vier kovalent gebundenen Pyrrol-Ringen. Die hydrophilen Gruppen sind in starken Wasserstoff-Bindungen involviert, sodass das Molekül geschlossen wird. Aufgrund dieser Wasserstoff-Bindungen wird das UCB hydrophob. Abhängig vom pH-Wert des Plasmas, des Gallensaftes und des Harns kommt UCB als ungeladenes Diacid, als Monoanion oder als Dianion vor.²³ Albumin ist das wichtigste Bindungsprotein von UCB in Plasma und besitzt eine hochaffine Stelle um ein UCB zu binden und eine oder mehr nieder-affine Stellen.²⁴

Bilirubin ist lipophiler als Biliverdin und kann leicht durch Membranen wandern. In der Leber sind unter normalen Bedingungen 98-99% des Bilirubins durch UDP Glucuronyl-Transferase gebunden. In der Galle wird es als wasserlöslicher Diglucuronid- und Monoglucuronid-Ester ausgeschieden. In anderen Organen ist Bilirubin meist 1:1 an Serum-Albumin gebunden und wird im Plasma zur Leber transportiert.²⁶

BV und BR besitzen antioxidative Eigenschaften. Stocker et al. waren die ersten die zeigten, dass physiologische Konzentrationen von Bilirubin Lipidmembranen vor Oxidation schützen können. Sie zeigten auch, dass die BR-Aktivität als Radikalfänger und als Antioxidans die des Tocopherol und des Vitamin C übertrifft, die als sehr starkes Antioxidans gegen Lipid-Peroxidation bekannt sind.^{25,26} Doré et al. zeigten, dass eine verbesserte Bilirubin-Produktion die HO-2 aktiviert, diese schützt vor Neurotoxizität, die durch H₂O₂ hervorgerufen wird.²⁷ Viele weitere Studien mit Bilirubin bewiesen, dass es antioxidative Eigenschaften besitzt. Exogen angewandtes Bilirubin dämpft H₂O₂-induzierte Schäden in vaskulären Endothelzellen. Die Induktion der HO-1 und dadurch erhöhte BR-Konzentration soll bei glatten Muskelzellen (SMC) zytoprotektive Wirkungen gegen Oxidation haben.

Bilirubin kann oxidativen Schäden, die durch Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit und Peroxy-Radikalen verursacht werden, entgegenwirken.²² Öllinger et al. zeigten einen antiproliferativen Effekt von Bilirubin auf vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC).²⁸ Sie beschrieben auch, dass BR eine positive Wirkung als Behandlung gegen Atherosklerose haben kann und dass ein hoher, jedoch noch normaler Wert von BR mit einer verminderten Atherosklerose einhergeht.²⁹ Eine andere Gruppe zeigte, dass intrazelluläre Bilirubinkonzentrationen lokal und zeitlich durch Induktion von HO-1 oder schneller Aktivierung der HO-2 erhöht werden können und somit kurz- und lang-andauernden oxidativen Stress abfangen. Bilirubin schützte effizient gegen oxidative Schäden in der Rattenleber, die zuvor mit CoCl₂, CdCl₂, Cu₂SO₄, UV-Strahlung, Menadion und Acetaminophen behandelt wurden.

Bilirubin wurde in allen Arten der humanen Pathophysiologie relevant. Die Konzentration und Lokalisation des "Gallenfarbstoffes" und auch Binde- und Transport-Proteine und die Ausscheidung des BR sind wichtig, da dies zusammen die Balance zwischen gefährlicher Zytotoxizität und hilfreichem antioxidativem Effekt des Bilirubins bildet.

Die spezifische Induktion der HO-1 durch verschiedene Formen von oxidativem Stress könnte Teil des defensiven Mechanismus der Zellen gegen Stress-Schäden sein. Levels von wichtigen Pro-Oxidantien könnten somit erniedrigt und Konzentrationen von aktiven antioxidativ-wirkenden "Gallenfarbstoffen" könnten erhöht werden. Bilirubin spielt eine wichtige physiologische Rolle in der Zytoprotektion und wirkt gegen oxidativ-medierten Schäden.²⁶

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass BV/BR die anti-oxidativen Eigenschaften der HO-1 vermittelt. BV/BR spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen oxidativen Stress und dies trägt zu den zytoprotektiven Effekten des HO-Systems bei.

1.4 Eisen

Die Hauptquelle von Eisen ist Häm, wobei etwa 375 mg Häm täglich durch die HO-1 abgebaut werden (80% des Häm stammt von Hämoglobin).³⁰ Erwachsene benötigen 4-5 mg Eisen pro Tag. Hauptsächlich wird es in dessen reduzierten Zustand Fe^{2+} , komplexiert in Häm, genutzt. Wenn rote Blutkörperchen lysiert werden, wird das Eisen des Hämoglobin zu Eisen-III (Fe^{3+}) oxidiert. Die hydrophobe Eigenschaft des freien Eisens erlaubt das Durchtreten durch Zellmembranen und erzeugt dadurch oxidativen Stress in der Zelle. Das Häm und dessen Eisen kann pro-oxidativ, durch Verstärkung von Oxidantien in der Zelle via Fenton-Chemie, entstehen. Die Verstärkung der Oxidantien-Produktion durch Redox-aktives Eisen kann direkt zu Lipid-, Protein- und DNA-Schäden und letztendlich zum Zelltod führen.¹

Ferritin spielt eine wichtige Rolle in der Speicherung von intrazellulärem Eisen in einen katalytisch inaktiven Zustand (4500 mol Eisen/ mol Ferritin). Es ist ein multimeres Protein, das aus 24 Untereinheiten besteht, die von zwei verschiedenen Ketten aufgebaut werden, einer schweren (H) und leichten (L) Kette. Die Gene, die für die schweren und leichten Untereinheiten des humanen Ferritins codieren, befinden sich auf den Chromosomen 11q und 19q. Die Fähigkeit Eisen zu binden, liegt in der Ferroxidase-Aktivität des Ferritins. Es katalysiert die Oxidation von Fe-II unter aeroben Bedingungen, um einen stabilen Eisen-III-Oxohydroxid-Kern zu bilden. Ferritin spielt somit eine kritische Rolle in der Regulierung der Eisenverfügbarkeit und bei der Katalyse schädlicher Reaktionen wie der Lipidperoxidation und der Fenton-Reaktion. In der Fenton-Reaktion wird das Fe-II mit H_2O_2 zu Fe-III oxidiert, wobei auch ein Hydroxy-Radikal ($\bullet\text{OH}$) und ein Hydroxy-Anion entstehen [$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$]. Die Ferritin-Synthese ist eng verbunden mit der intrazellulären Eisenkonzentration. So kann eine hohe Konzentration des schädigendem freien Eisens verhindert werden.^{31,32,33}

Wenn sich Häm in der Zelle befindet, kann es direkt zu oxidativen Schäden führen, oder die Schäden entstehen durch die Freisetzung von Eisen durch nicht-enzymatische, oxidative Degradation, oder enzymatisch durch die Hämoxygenase-katalysierte Hämspaltung. Das Eisen fügt sich in die hydrophoben Zwischenräume der Phospholipid-Doppelschicht ein und katalysiert so die Oxidation der Zellmembranbestandteile.³⁴

Einige Studien haben gezeigt, dass die HO-abhängige Freisetzung von Eisen, durch den Hämabbau, eine Erhöhung von Ferritin auslöst. Dies führt zu einer verbesserten zellulären Kapazität für Eisen-Bindung, wodurch es zu einer erhöhten Resistenz gegen oxidativen Stress kommt. Es wurde auch gezeigt, dass die HO-1 Induktion zellschützend gegen Lipid-Peroxidation und Vasospasmus wirkt.²⁶ Balla et al. zeigten, dass Endothelzellen, die mit Hemin behandelt wurden, eine erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress aufweisen. Der Schutz gegen endotheliale Lipid-Peroxidation wird mit HO-1 und der Induktion von Ferritin assoziiert.³⁵

Es konnte also bewiesen werden, dass freies Eisen schädlich ist, jedoch schnell durch Ferritin gebunden wird und dadurch eine zytoprotektive Wirkung bekommt. Der HO-1 abhängige Häm-Abbau induziert die Ferritin-Synthese aufgrund der Freisetzung von freiem Eisen. Eine wichtige Rolle der HO-1 abhängigen Zytoprotektion könnte mit der Regulation der Eisen-Homöostase in Zusammenhang gebracht werden.

1.5 Kohlenmonoxid

CO ist ein gasförmiges Monoxid und aufgrund seiner hohen Affinität zu Hämproteinen als schädliches und toxisches Molekül bekannt. Hohe Konzentrationen an CO verursachen Hypoxie aufgrund kompetitiver Bindung an die Sauerstoff-Bindestellen des Hämoglobins mit einer etwa 245x stärkeren Affinität als Sauerstoff.²⁰ In geringen Mengen kann CO jedoch zytoprotektiv sein und anti-apoptotische, anti-proliferative, anti-inflammatorische und vasodilatatorische Wirkungen aufweisen. CO agiert als Signaltransduktionsmolekül und ist in vielen pathologischen Erkrankungen involviert. Gleich wie Stickstoffdioxid, inhibiert auch CO die SMC-Proliferation und trägt zur Vasodilatation bei. Der größte CO-Anteil in Säugern entsteht beim Abbau von Häm durch die Hämoxygenase. Dies entspricht etwa 80% des endogen produzierten CO in Säugern, wobei die verbleibenden 20% der CO-Produktion durch Photooxidation, Autooxidation und Peroxidation von organischen Komponenten und Lipid-Doppelschichten gebildet werden.

Viele Studien haben gezeigt, dass Kohlenmonoxid, gebildet durch die Hämoxygenase-1, in vielen Prozessen zur vaskulären Kontrolle und Lebensfähigkeit des Gewebes beteiligt ist und, dass CO positive Wirkungen auf kardiovaskuläre Erkrankungen aufweist.¹⁶

Duckers und Kollegen zeigten beispielsweise, dass die HO-1 Expression in VSMC die vaskuläre Relaxation stimuliert, vermittelt durch die Guanylat-Cyclase und cyclische Guanosin-monophosphat (cGMP).³⁶ Auch Matsumi et al. beschrieben die CO-vermittelte Aktivierung der Guanylat-Cyclase und die dadurch erhöhte cGMP-Konzentration. Daraufhin konnte in SMC eine Relaxation beobachtet werden.³⁷ Auch eine antiproliferative Wirkung des Kohlenmonoxids wurde in unterschiedlichen Gruppen untersucht. Song et al. konnten zeigen, dass die SMC-Proliferation durch CO über Zellwachstums-Arrest (G1/S Transition-Arrest) inhibiert wird, ein Prozess der mit der Induktion des p21 und Herunterregulation von Cyclinen verbunden ist.³⁸ Eine andere Gruppe zeigte, dass durch Zugabe von CO-freisetzenden Molekülen die Proliferation von hPASMC inhibiert werden konnte.³⁹ Eine anti-apoptotische Wirkung konnte durch Queiroga und Kollegen beschrieben werden. Sie zeigten, dass ein Teil der antiapoptotischen Eigenschaft von Kohlenmonoxid auf der Fähigkeit beruht, die mitochondriale Membran-Permeabilisierung zu begrenzen und dadurch die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren ins Cytosol zu verhindern.⁴⁰ Weiters wurde gezeigt, dass CO die Kalzium-aktivierenden K⁺-Tunnel in SMC stimuliert.²¹

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass das HO/CO-System eine wichtige Rolle in der Pathologie von kardiovaskulären Erkrankungen spielen könnte, da CO ein endogener Vasodilatator ist und Entzündung, Apoptose und VSMC Proliferation inhibiert. Der exakte Mechanismus der anti-proliferativen Rolle des CO ist jedoch unklar.

1.6 Die Rolle der HO bei Erkrankungen

Wie bereits erwähnt, spielt die Hämooxygenase nicht nur im Metabolismus eine große Rolle, sondern auch in den Schutzmaßnahmen der Zelle bei schädlichen Reizen oder Stress. Die protektiven biologischen Aktivitäten der HO-1 beinhalten antioxidative, anti-inflammatorische, anti-apoptotische und pro-angiogene Eigenschaften.⁴¹ Das HO-1 System wird mit diesen Funktionen assoziiert und hat eine signifikante Wichtigkeit in einem breiten Spektrum von Krankheitszuständen, wie Diabetes, Entzündungen, neurologische Störungen, Krebs, Immundysfunktion, Herzerkrankungen, Transplantation, Hypertonie und Atherosklerose.⁴² Die Rolle der HO-1 in verschiedenen Krankheitszuständen ist komplex. Wir fokussieren uns primär auf ihre Auswirkungen auf vaskuläre Erkrankungen mit dem Schwerpunkt Atherosklerose und pulmonale Hypertonie.

1.6.1 HO-1 und Atherosklerose

Atherosklerose ist eine Veränderung der Blutgefäße und als "Arterienverkalkung" bekannt. In der westlichen Welt gehört diese Erkrankung zu den häufigsten Todesursachen. Sie entsteht über Jahre hinweg und bleibt meist sehr lange unerkannt. Während der langsam fortschreitenden Erkrankung kommt es zu Ansammlungen von Lipiden und fasrigen Elementen wie Bindegewebe in den großen Arterien. Dadurch verengen sich die Gefäße und die Elastizität nimmt mit der Zeit ab, wodurch die Blutversorgung verringert oder sogar völlig unterbrochen wird.

Die frühen Läsionen der Atherosklerose bestehen aus subendothelialen Ansammlungen von Cholesterin-angeschwollenen Makrophagen, die sogenannten Schaumzellen. Je nach Lebensalter können "Fettstreifen"-Läsionen in der Aorta, in den Koronararterien oder in zerebralen Arterien gefunden werden. Fettschichten sind klinisch nicht signifikant, aber die Vorläufer von fortgeschrittenen Läsionen. Sogenannte "Faser-Läsionen" haben in der Regel eine fasrige Kappe aus SMC und extrazellulärer Matrix, die einen lipidreichen, nekrotischen Kern umschließt. Plaques können später auch Verkalkungen und Ulzerationen an der luminalen Oberfläche und Blutungen aus kleinen Gefäßen beinhalten, die in die Läsionen wachsen. Durch Bildung eines Thrombus kann es zu einem Myokardinfarkt oder Schlaganfall kommen.⁴³

Epidemiologische Studien in den letzten 60 Jahren zeigten zahlreiche Risikofaktoren für die Entwicklung der Atherosklerose, wie beispielsweise Diabetes, das Rauchen von Zigaretten, Dyslipoproteinämie und Hypertonie (Hypertonie erhöht das Risiko für eine Atherosklerose um bis zu 60%). Durch Restenose nach Gefäßmanipulationen und bei chronischer Transplantatvaskulopathie kommt es zu einer ausgedehnten Proliferation der VSMC in der Neointima. Auch diese Proliferation verursacht eine Verengung der Gefäße und somit eine Ischämie der Organe. Es kann somit zu akuten (Bsp. Schlaganfall, Myokardinfarkt) oder chronischen (Bsp. chronische Transplantatabstoßung) Verschlechterungen der Organfunktion kommen.²⁹

Die Mechanismen, die zur Entwicklung der Atherosklerose beitragen, sind nicht völlig geklärt, jedoch sind Entzündung und Oxidation zwei wichtige Faktoren, die bei der Bildung atherosklerotischer Läsionen beteiligt sind. Juan et al. zeigten, dass das Innere der fortgeschrittenen Läsion im Menschen eine sehr pro-oxidative Umgebung mit redoxaktiven Eisen- und Kupfer-Ionen aufweist. Diese katalysieren Radikalreaktionen sowie die Lipidperoxidation.⁴⁴ Bei Atherosklerose werden Monozyten und Lymphozyten rekrutiert. Ausschlaggebend für diesen Prozess ist die Akkumulation von minimalen oxidierten LDL. Dies stimuliert Endothelzellen, viele proinflammatorische Moleküle und auch Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren (Bsp. Macrophage colony-stimulating factor = M-CSF) zu produzieren.⁴³

Die HO-1 wird, wie schon erwähnt, durch verschiedene Stimuli induziert. Zu diesen Stimuli gehören unter anderem Zytokine, Schwermetalle und Oxidantien, die inflammatorische Schäden verursachen. HO-1 wirkt anti-inflammatorisch, antioxidativ, vasodilatatorisch und inhibiert Aktionen die zur SMC-Proliferation führen.⁴¹ Agarwal et al. zeigten, dass oxidiertes, aber nicht natives "low density Lipoprotein" (LDL) die HO-1 Expression in VSMC und vaskulären Endothelzellen erhöht.⁴² Oxidiertes LDL spielt also eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose.

Eine hohe Anzahl von Studien bewiesen zytoprotektive Effekte der HO-1, die der Entwicklung von Atherosklerose entgegenwirken. Duckers et al. zeigten, dass die HO-1 Expression die vaskuläre Konstriktion reduziert und dass dieses Enzym die exzessive Proliferation in arterieller Wundreparatur bei Maus- und Schwein-Modellen aufhält.³⁶ Der Zusammenhang der HO mit atherosklerotischen

vaskulären Erkrankungen wurde jedoch bereits 1994 mit einer Studie bestätigt. Hierbei wurden geringe Serumkonzentrationen von Bilirubin mit einem erhöhten Risiko von koronarerteriellen Erkrankungen (CAD) assoziiert.⁴⁵ Die vaskulär schützenden Effekte der HO-1 konnten in vielen verschiedenen Modellen gezeigt werden. HO-1 knockout Mäuse wiesen, verglichen mit Wildtyp, eine beeinträchtigte Neovaskularisation während der Heilung in einer kutanen Wundverletzung auf, wohingegen hautspezifische HO-1 Überexpression in transgenen Mäusen die Neovaskularisation während der Wundheilung verbesserte.^{46,41} BV inhibiert die Entwicklung arteriosklerotischer Verletzungen in ApoE knockout Mäusen trotz der beschleunigten und schweren Form der Arteriosklerose bei diesen Tieren. Die Induktion der HO-1 wirkt sich in verschiedenen Krankheitsmodellen, wie Gefäßverengung durch VSMC-Proliferation, therapeutisch positiv aus. Der Mangel an HO-1 in HO-1^{-/-} ApoE^{-/-} Doppel-knockout Mäusen verschlechtert den Prozess der Atherogenese dramatisch.²⁹

Zahlreiche in vivo Modelle, in denen chemische Modulation und Gentransfer der HO-1 involviert waren, zeigten protektive Eigenschaften der HO-1 in vaskulären Erkrankungen. Es wurden auch Studien bei Menschen durchgeführt: Der humane HO-1 Polymorphismus, der verschiedene HO-1 Aktivitäten einzelner Individuen aufweist, steht mit vaskulären Erkrankungen in Zusammenhang. Erhöhte Blut-Bilirubin-Konzentrationen wurden mit dem Schutz gegen kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) assoziiert.^{41,47} Studien zeigten, dass CO eine anti-atherosklerotische Wirkung durch Hemmung der VSMC Proliferation aufweist. BR/BV inhibieren vaskuläre Stenose in vivo und auch die VSMC Proliferation. Signalwege, die in BR/BV involviert sind, verursachen einen Zellzyklus-Arrest.²⁹ Auch CO inhibiert die Proliferation von SMC und könnte einem vaskulären Remodelling während der Atherosklerose entgegenwirken. Die HO-1 Überexpression inhibiert die VSMC-Proliferation durch G1/S Zellzyklus-Arrest und Hochregulierung des p21-Proteins.³⁶ Kimm et al. bewiesen, dass es einen Zusammenhang zwischen Bilirubin Level und der Häufigkeit von ischämischen Schlaganfällen gibt.⁴⁸ Auch zwischen Bilirubin-Konzentrationen und Marker für Atherosklerose, wie endotheliale Dysfunktion und die Dicke der Intima-Media der Karotis, konnten Zusammenhänge gefunden werden.⁴⁹

Oxidativer Stress und Entzündung sind "Markenzeichen" in der Entwicklung von Atherosklerose. HO-1 hat anti-inflammatorische Eigenschaften, die durch Reduktion von oxidativem Stress und erhöhter Bildung von CO auch während des Häm-katabolismus entstehen.⁵⁰ Anti-inflammatorische Eigenschaften der HO-1 involvieren die Inhibierung der Expression von Adhäsionsmolekülen und erniedrigen die Expression von Entzündungsmediatoren wie Zytokine und Salpetersäure.⁵¹ CO inhibiert die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und verbessert die Expression anti-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-10 in Endothelzellen und Makrophagen.⁵² Es wurde auch gezeigt, dass CO-freisetzende Moleküle die Entzündungsreaktion in Mausmakrophagen dämpfen. CO blockiert die Freisetzung von NO durch induzierbare NO-Synthasen (iNOS) und dämpft dadurch die Reaktion.⁵¹

All diese Experimente zeigten, dass HO-1 eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt und dass die HO-1 Expression einer Atherosklerose entgegenwirken könnte.

1.6.2 HO-1 und pulmonale Hypertonie

Pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ist eine seltene kardiovaskuläre Erkrankung mit einer hohen Mortalitätsrate. Hypertonie ist ein Syndrom, das durch verminderten Durchfluss in der pulmonalarteriellen Zirkulation entsteht. Dies erhöht den pulmonalen vaskulären Widerstand und kann zu einem Rechtsherz-Versagen führen. Viele pathogene Signalwege wurden mit der Entwicklung von PAH in Verbindung gebracht, auch jene auf molekularer und genetischer Ebene in den SMC, Endothelzellen und Adventitia. Das Ungleichgewicht im Vasokonstriktion-/ Vasodilatation-Milieu wurde als Basis für aktuelle medizinische Therapien hergenommen, obwohl man jetzt erkannt hat, dass PAH auch in Zusammenhang mit dem Ungleichgewicht von Proliferation und Apoptose gebracht werden kann.⁵³ Die ursprüngliche klinische Klassifizierung von 1973 wurde definiert als primäre pulmonale Hypertonie (jetzt pulmonale arterielle Hypertonie). Um die Mechanismen der Erkrankung besser zu verstehen, wurde eine neue Klassifikation eingeführt, die die klinischen und pathophysiologischen Eigenschaften vereint:

- Gruppe 1) PAH, die idiopathisch (IPAH) ist oder mit anderen Bedingungen assoziiert werden kann, besonders mit systemischer Sklerose und angeborenem Herzfehler
- Gruppe 2) PAH aufgrund von linker Herzerkrankung (PH-LHD)
- Gruppe 3) PAH aufgrund von Lungenerkrankungen oder Hypoxie oder beides
- Gruppe 4) ungeklärte oder multifaktorielle Mechanismen^{54,55}

PAH ist charakterisiert durch verschiedene arterielle Abnormitäten, wie Hypertrophie der Media, Proliferation der Adventitia, Thrombose, Hyperplasie der Intima und auch Entzündungen. In PAH treten endotheliale Dysfunktion, verminderte Apoptose/Proliferations-Rate in hPASMC und eine Verdickung der Adventitia mit Verlust der Zellordnung auf. Wie es auch bei Atherosklerose der Fall ist, kommt es durch diese Veränderungen zu einer exzessiven Aktivierung verschiedener Metalloproteasen. Auch die Migration von Auto-Antikörper, proinflammatorischer Zytokine und inflammatorischer Infiltrate wurden in PAH-Patienten beobachtet.

Pulmonaler vaskulärer Widerstand wird durch die Reduktion der Apoptose-Rate und durch exzessive Zellproliferation produziert. Eine exzessive Vasokonstriktion spielt in etwa 20% der Patienten eine signifikante Rolle.⁵³

Durch den von der HO katalysierten Hämabbau werden unter anderem antioxidativ wirkendes Bilirubin und Kohlenmonoxid mit vasodilatatorischer Wirkung freigesetzt. Viele verschiedene Studien haben die protektiven Eigenschaften der Hämoxxygenase-1 dargestellt. Christou et al. untersuchten die Rolle der HO-1 in der Entwicklung von Hypoxie-induzierter PAH. Er konnte beweisen, dass die HO-1 in einer hypoxischen Lunge induziert wird und die Entwicklung der vaskulären Umstrukturierung und der pulmonalen Hypertonie durch chronische Hypoxie inhibiert werden kann.⁵⁶ Chronische Hypoxie verursacht jedoch nicht nur Zellproliferation und Umwandlung der Gefäßwände. Minamino beschreibt, dass durch Hypoxie in Wild-Typ-Mäusen eine pulmonalarterielle Hypertonie mit "vascular remodeling" und Entzündungen entstehen konnten. Zum Vergleich, die Überexpression der HO-1 schützte Mäuse gegen PAH-Entwicklung und gegen Hypoxie-induzierte inflammatorische Zellinfiltration. Außerdem schwächt die HO-1 Überexpression die hypoxische Induktion von proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen in der Lunge ab.⁵⁷ Stanford et

al. bewiesen, dass das CO-freisetzende Molekül Tricarbonyldichlororuthenium (II) Dimer die Proliferation hPASC inhibiert.⁵⁸

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass Polymorphismen des HO-1 Promoter für eine reduzierte HO-1 Expression verantwortlich sein könnten, die wiederum mit einem erhöhten Risiko an verschiedenen respiratorischen Erkrankungen wie Pneumonie und Lungenkrebs in Zusammenhang stehen. Zusätzliche Studien sind jedoch nötig, um die Auswirkungen dieser HO-1 Promoter Polymorphismen mit spezifischen Stimuli, bestimmten Zelltypen und bestimmten Lungenerkrankungen in Verbindung bringen zu können.⁵⁹

Man weiß, dass die HO-1 in der Entwicklung von pulmonaler arterieller Hypertonie und kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielt, jedoch ist der genaue Mechanismus, der die positiven Effekte der HO-1 auslöst, noch nicht genau bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass ER Stress die Genexpression der HO-1 in VSMC stimuliert und auch, dass erhöhter ER Stress mit erhöhter Apoptose in Zusammenhang steht. Korfei et al. zeigten beispielsweise, dass ER Stress vermutlich der Grund für den Zelltod der Alveolar-Epithelzellen in idiopathischer pulmonaler Fibrose (IPF) ist.^{60,61}

Die Regulation der Proliferation durch HO-1 konnten Choi et al. beweisen. Sie zeigten, dass Aprotinin die VSMC Proliferation in "Spontan hypertonen Ratten" inhibiert und den G1/G0 Zellzyklus-Arrest durch die Regulation von Cyclin D und p21 über die Induktion von HO-1 induziert.⁶² Weiters konnte gezeigt werden, dass Serum die HO-1 Genexpression in vaskulären SMCs induziert und dass die HO-1 katalysierte CO Bildung das Wachstum von SMC inhibiert. Wachstumsfaktoren könnten möglicherweise die CO-Synthese induzieren. Das könnte eine wichtige Rolle im negativen Feedback spielen, um SMC-Proliferation und auch die Entwicklung vaskulärer Erkrankungen zu limitieren.⁶³ Liu et al. bewiesen, dass die Überexpression von HO-1 die VSMC-Apoptose stimuliert. Dies ist assoziiert mit einem Anstieg des pro-apoptotischen Proteins p53. Die HO-1 Produkte Biliverdin und auch Bilirubin erhöhten die Rate der Apoptose in VSMC.⁶⁴

Die HO-1 beeinflusst also verschiedene biochemische Signalwege, die in Zusammenhang mit oxidativen Stress, Proliferation, Apoptose und ER-Stress stehen. Die Induktion der Hämoxxygenase-1 könnte also in PAH erkrankten Patienten eine gesundheitsfördernde Wirkung aufweisen.

1.7 DHA

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) sind organische Säuren, die mehr als eine Doppelbindung in deren aliphatischen Kette besitzen. Die Nummer und Position der Doppelbindung innerhalb der Kohlenwasserstoff-Kette gibt den PUFA ihren Namen. Ausgehend vom Methyl-Terminus kann man zwischen Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren (FS) unterscheiden, die als biologisch relevante Familie der PUFA genannt werden können.⁶⁵

Die Linolsäure (LA), die "Mutter" der ω -6-FS-Familie ist eine essentielle Fettsäure und kann von Säugetieren nicht endogen synthetisiert werden. LA befindet sich vorwiegend in Pflanzenölen, Samen und Nüssen. Auch ALA (α -Linolensäure), die "Mutter" der ω -3-FS-Familie muss über die Nahrung aufgenommen werden. Sie befindet sich unter anderem in Blattgemüse, Nüssen, Leinsamen und pflanzlichen Ölen. Sowohl LA und ALA können zu langkettigen PUFA metabolisiert werden. ALA kann zu Eicosapentaensäure (EPA 20:5n-3) und schließlich zu Docosahexaensäure (DHA) umgewandelt werden, jedoch ist dieser Anteil sehr gering und daher kein effizienter Prozess (etwa 1% in Säuglingen, in Erwachsenen noch weniger). Sowohl DHA als auch EPA sind PUFAs, die reichlich in Fisch und Fischöl vorhanden sind. Fische sind die Hauptquelle dieser Fettsäuren, demnach ist die Aufnahme von Fisch bzw. Fischöl für einen Anstieg der DHA- und EPA-Konzentration im Plasma entscheidend.^{66,67}

DHA gehört also zur Familie der ω -3-Fettsäuren und ist eine Carboxy-Säure mit einer Kette bestehend aus 22 Kohlenstoff-Atomen, die sechs cis-Doppelbindungen besitzt. Die Nomenklatur dafür lautet 22:6n-3. Die Struktur der DHA wird in der unteren Abbildung dargestellt. Der Begriff Omega-3 leitet sich von der Lokalisation der ersten Doppelbindung (am dritten Kohlenstoff) am Omega-Ende der DHA ab.

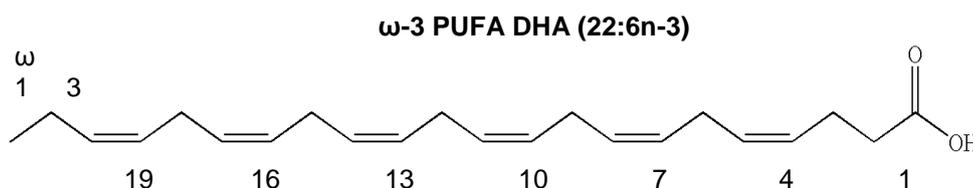


Abbildung: Struktur von DHA (22:6n-3)

Die Docosahexaensäure beinhaltet 22 Kohlenstoffatome und sechs Doppelbindungen. Die erste Doppelbindung befindet sich am dritten Kohlenstoffatom des Omega-Endes der Fettsäure. DHA ist also eine 22:6n-3 mehrfach ungesättigte Fettsäure.

Die Aufnahme von EPA und DHA ist in europäischen Ländern sehr gering, somit ist ALA die häufigste ω -3-FS, die in diesen Regionen zu sich genommen wird. Die Anzahl der Menschen mit Insulinresistenz, kardiovaskulären Erkrankungen und verschiedene Arten von Krebs ist in diesen Ländern höher als in Ländern, in denen viel Fisch gegessen werden, wie beispielsweise in Japan. Somit kann vermutet werden, dass ALA nicht die gleichen gesundheitsfördernden Eigenschaften besitzt wie EPA und DHA.⁶⁷ In den USA beträgt die Aufnahme von Omega-3-FS 1,6 g pro Tag (0,7% Energie). Von diesen sind 1,4 g/d ALA, und nur 0,1-0,2 g/d kommen von EPA und DHA. Das Verhältnis zwischen ω -6- und ω -3-FS der frühen Menschen lag bei 1:1. Heute gibt es in den USA ein Verhältnis von 10:1 aufgrund der reduzierten ω -3-FS-Zufuhr und des weit verbreiteten Einsatzes pflanzlicher Öle. Außerdem hängt der Inhalt an EPA und DHA von den Fischarten ab und auch, ob sie gezüchtet wurden oder wild lebten. Die EPA- und DHA-Konzentration als Beispiel in einem gezüchteten Wels beträgt weniger als in einem wildlebenden Wels. Kommerziell zubereiteter frittierter Fisch (etwa in Fast Food-Restaurants und viele gefrorene frittierte Fischprodukte) sollten vermieden werden, da der Omega-3-FS-Anteil sehr gering und der trans-Fettsäure-Anteil sehr hoch ist.⁶⁶

1.7.1 DHA in vaskulären Erkrankungen

Eine Entzündung ist ein Abwehrmechanismus des Körpers, um ihn unter anderem vor Infektionen zu schützen. Dieser Mechanismus initiiert die Tötung des Erregers, sowie die Reparatur von geschädigtem Geweben und hilft, die Homöostase bei beschädigten oder infizierten Stellen wiederherzustellen. Auch in vaskulären Erkrankungen sind Entzündungen präsent.

PUFAs sind wichtige Bestandteil der Phospholipide einer Zellmembran. Die Fettsäure-Verteilung in den Phospholipiden bei normaler Ernährung liegt bei einem hohen Anteil von Arachidonsäure (AA) (20:4n-6) und einem geringen Anteil von EPA und DHA in verschiedenen Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten. Durch erhöhte Zufuhr von n-3-PUFA aus Fisch kommt es zu einem Abfall des Arachidonsäure-Gehalts.⁶⁸

PUFAs können inflammatorische Zellfunktionen beeinflussen und somit auch inflammatorische Prozesse durch verschiedene Mechanismen verändern: Die Aufnahme von PUFAs kann unter anderem komplexe Lipid- und Lipoprotein-Konzentrationen beeinflussen, die wiederum Einfluss auf Entzündungen haben.

PUFAs können enzymatisch oder nicht-enzymatisch oxidiert werden. Die oxidierten Derivate und auch nicht-veresterte PUFAs können via intrazellulärer "Fettsäure-Rezeptoren" direkt mit entzündeten Zellen interagieren. PUFAs können in Phospholipiden der entzündeten Zellmembranen aufgenommen werden. Hier spielen sie eine wichtige Rolle in der Sicherstellung der richtigen Umgebung für Membranprotein-Funktionen, zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität und sie beeinflussen die Lipid-Raft-Formation. Membranphospholipide sind Substrate für die intrazelluläre Freigabe von PUFAs: Die freigesetzten PUFAs können als Signalmoleküle, Liganden für Transkriptionsfaktoren, oder Vorläufer für die Biosynthese von Lipid-Mediatoren agieren. Lipid-Mediatoren sind in der Regulation vieler Zell- und Gewebe-Antworten involviert, einschließlich Entzündungen und Immunität. Somit können Änderungen in der Phospholipid-FS-Zusammensetzung die Funktion von Zellen bei Entzündungen ändern.⁶⁸

Entzündungen der Arterienwand und vaskuläres Remodelling sind Kennzeichen in der Entwicklung von Atherosklerose und auch pulmonaler arterieller Hypertonie. Sowohl EPA als auch DHA wirken kardiovaskulären Erkrankungen entgegen. Dies wurde in einigen Studien mit klinischem Endpunkt bewiesen.⁶⁹ Es wurden nicht nur die Regulierung der Eicosanoid-Produktion aus AA, die Plasma-Triglycerid-senkende und die Blutdruck-senkende Wirkung nachgewiesen, sondern auch die Regulation des Ionenflusses in Herzzellen u die Regulation der Genexpression über das peroxisomalen Proliferationssystem. Es ist auch bekannt, dass EPA und DHA Serummarker von kardiovaskulären Erkrankungen positiv durch Verringerung von Triglyceriden (TG) und Anstieg von HDL-Cholesterin verändern.⁶⁷

Omega-3-FS haben einen geringen, dosisabhängigen blutdrucksenkenden Effekt. Das Ausmaß hängt vom Grad der Hypertonie ab. Morris et al. entdeckten, dass eine Aufnahme von 5,6 g Omega-3-FS pro Tag den Blutdruck von 3,4/2,00 mmHg reduziert. DHA scheint bei der Senkung des Blutdrucks wirksamer zu sein als EPA.⁷⁰ Jedoch im Hinblick auf die hohe Dosis, die zur Senkung des Blutdrucks erforderlich ist und der nachgewiesenen Wirkung von anderen Ernährungsfaktoren und blutdrucksenkenden Medikamenten, hat die Zufuhr von Omega-3-FS nur eine begrenzte positive Rolle in der Behandlung von Bluthochdruck.⁶⁶

Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Personen mit 6,5% Omega-3-FS-Anteil in den Erythrozyten-Membranen ein 90% geringeres Risiko für einen

plötzlichen Herztod haben, als Personen mit nur 3,3% ω -3-FS-Anteil. Andere Studien zeigten, dass die Einnahme von ω -3-FS die Herzfrequenz erniedrigen und die Häufigkeit von Vorhofflimmern reduzieren kann.⁶⁹ DHA und EPA verbessern außerdem die Stabilität von atherosklerotischen Plaques, wobei Omega-6-FS keine Wirkung auf Plaques zeigten. Omega-3-FS könnten also zur Erniedrigung von kardiovaskulären Ereignissen durch Plaque-Stabilisierung beitragen.⁸³

1.7.2 DHA produziert ROS

Es wurden schon viele Studien über die Entstehung von ROS in Zusammenhang mit DHA durchgeführt. Die Lipid-Peroxidation ist eine Ursache der ROS-Entstehung. PUFAs sind anfälliger auf Oxidation als gesättigte Fettsäuren. Freie Radikale können in PUFAs sehr einfach Wasserstoff von bis-allylen Methylen entfernen, was zur Bildung eines Kohlenstoff (C)-zentrierten Radikals innerhalb der PUFAs führt. Diese C-zentrierten Radikale reagieren sofort mit molekularem Sauerstoff, was wiederum Peroxyl-Radikale entstehen lässt. Die Peroxyl-Radikale reagieren wiederum mit bis-allylen Methylyengruppen anderer PUFA-Moleküle, das zur Umwandlung der Peroxyl-Radikale zu Hydroperoxiden und die Bindung neuer C-zentrierten Radikale führt. PUFA-Hydroperoxide produzieren wiederum reaktive Alkoxy- und Hydroxyl-Radikale über die Eisen- oder Kupfer-katalysierte Fenton-ähnliche Reaktion und breiten die Kettenreaktion weiter aus.

Die Oxidation von PUFAs kann durch organische und anorganische freie Radikale induziert werden, jedoch auch durch viele Enzyme und durch das Elektronentransport-System in Mitochondrien.⁷¹ Forscher, wie die Gruppe von Roig-Pérez haben bewiesen, dass durch DHA die zelluläre Lipid-Peroxidation in Caco-2 Zellen erhöht wird.⁷² Eine andere Gruppe zeigte, dass spezifische elektrophile Cyclopentenone und Hydroxynonenal (HNE), Produkte der Lipid-Peroxidation, in der Lage sind, mitochondriale ROS-Bildung zu induzieren. Vermutlich können elektrophile Lipide durch Organelle diffundieren und erhöhen dadurch die mitochondriale ROS-Bildung.⁷³ Larsson et al. beschrieben, dass DHA die Apoptose über ROS-Produktion und Caspase-3 Aktivierung induziert. N-3 PUFAs können Apoptose über verschiedene Prozesse initiieren, auch durch die Modulation freier Radikale und ROS Produktion.⁷⁴ Aires et al. konzentrierten sich auf die Relevanz des DHA-induzierten Calcium-Signalling. Sie vermuten, dass ROS durch DHA produziert, das Ergebnis des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) sei, da CCCP, ein mitochondrialer Entkoppler, die Effekte der FS

verminderte.⁷⁵ Arita et al. zeigten, dass durch PUFA Apoptose in HL-60 Zellen über die Aktivierung der Caspase-Kaskade, gekoppelt mit einer mitochondrialen Membran-Depolarisation, induziert wurde. Im apoptotischen Signalweg tritt ein Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials häufig auf. Dies führt zur mitochondrialen Dysfunktion und zur Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies.⁷⁶ Auch unsere Gruppe zeigte, dass in DHA-behandelten hPASCs die Calcium-abhängige Induktion von oxidativen Stress ein zentrales Geschehen ist, das für die Induktion von UPR, Zellzyklus-Arrest und Apoptose dargestellt werden kann.⁷⁷

ROS kann durch verschiedene endogene Quellen, wie Mitochondrien, Peroxisomen und inflammatorische Zell-Aktivierung produziert werden. Während des mitochondrialen oxidativen Metabolismus wird der Hauptteil des verbrauchten Sauerstoffs in Wasser reduziert. 4-5% werden jedoch zu ROS umgewandelt. Auch Peroxisomen sind Organelle, die Sauerstoff verbrauchen und auch dazu beitragen, ROS zu bilden. Die Produktion von ROS in Peroxisomen involviert die peroxisomale Oxidase mit Acyl-CoA Oxidase und Xanthine Oxidase, die Hydrogen-Peroxide und Superoxid-Anionen bilden.⁷⁸ Fettsäuren werden sowohl über mitochondrialer, als auch peroxisomaler β -Oxidation abgebaut. Die FS, die kürzer als C20 sind, werden hauptsächlich in den Mitochondrien, jene die größer als C22 sind und auch ungesättigte Fettsäuren (PUFA), werden hauptsächlich in Peroxisomen abgebaut. Langkettige FS und eine Vielzahl verwandter Verbindungen dienen als PPAR α -Liganden. Manche Gene codieren für peroxisomale (Acyl-CoA Oxidase) andere für mitochondriale Enzyme der FS-Oxidation.⁷⁹

1.7.3 DHA induziert HO-1

Die Wirkung von Oxidantien können mit Transkriptionsfaktoren in Zusammenhang gebracht werden. Einer der wichtigsten Effekte von Oxidationen auf Signalwege wurde mit dem "Nuclear factor erythroid 2-related factor 2" (Nrf2) beobachtet. Unter normalen Bedingungen bindet das "Kelch ECH associated Protein 1" (Keap1), ein zytosolisches Nrf2 Repressor-Protein, an Nrf2 und fördert den proteasomalen Abbau durch Cullin 3 (Cul-3)-basierter E3 Ligase. Jedoch bei Einwirkung von Umweltstressoren wie ROS oder Elektrophilen, erfährt Keap1 eine Konformationsänderung und lässt Nrf2 frei. Nrf2 kann in den Nukleus translozieren und dort mit den Mitgliedern der kleinen Maf Familie Heterodimere bilden. Das

Heterodimer kann dadurch an "Antioxidant Response Elements" (ARE) am Genpromoter binden und verursacht die Induktion von ARE-regulierten Genen. Die Aktivierung von Nrf2 resultiert in der transkriptionellen Expression von einem breiten Spektrum protektiver Enzyme, auch jene, die bei der antioxidativen Antwort beteiligt sind.⁷⁸ Eines dieser Enzyme ist die Hämoxigenase-1.

Wang et al. zeigten, dass in humanen Eierstock-Krebszellen DHA die HO-1 Genexpression induziert, wobei zwei ARE-Elemente in der Gentranskription involviert sind. DHA erhöht die Nrf2-Bindung an ARE-Elemente am HO-1 Genpromoter und verstärkt die Degradation vom Transkriptionsfaktor Bach1 (BTB und CNC Homologie 1), wobei dadurch die HO-1 Expression verstärkt wird. Der Bach1 Abbau ist somit ein wichtiger Bestandteil in der DHA-induzierten HO-1 Expression.⁸⁰ Es wurde gezeigt, dass während einer Entzündung die Bildung von elektrophilen Produkten in Makrophagen ansteigt. Die Cyclooxygenase 2 (COX-2) vermittelt die Bildung von elektrophilen Fettsäure-Oxo-Derivaten (EFOX) durch Omega-3-Fettsäuren wie DHA. Eine Rolle für EFOX als Signalmediator wurde durch die Beobachtung gestärkt, dass unter anderem 17-EFOX_{D6} PPAR γ -Agonisten sind und Nrf2-abhängige antioxidative Antworten aktiviert. Sie inhibieren auch die Cytokin-Produktion. EFOX sind Signalmoleküle, die durch die Umwandlung von Omega-3-FS klinisch positive Wirkungen aufweisen.⁸¹ Diese Umwandlung von DHA in ein elektrophiles Produkt könnte in Zusammenhang mit der Nrf2-vermittelten HO-1 Transkriptionsaktivierung stehen.

Durch die Aufnahme von Omega-3-Fettsäuren könnten somit gesundheitsfördernde Wirkungen in unterschiedlichen Erkrankungen hervorgerufen werden.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

Primäre glatte Muskelzellen wurden von humanen Zentralarterien der Lunge (hPASMC) von Patienten während Operationen isoliert, ohne Vorgeschichte einer pulmonalen Gefäßerkrankung oder eines Lungenkrebs. Das Protokoll wurde von der Medizinischen Universität Graz gemäß des nationalen Gesetzes genehmigt.⁸² hPASMC wurden in VascuLife Smooth Muscle Cell Complete Medium mit 5% FCS und Wachstumsfaktoren kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkultur-Flaschen unter Standardbedingungen (21% O₂, 5% CO₂, 37°C). Passage 2 bis 8 wurden für verschiedene Experimente verwendet.

Glatte Muskelzellen der humanen Aorta (hASMC) (zur Verfügung gestellt von Dr. W.F.Graier, Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Medizinische Universität Graz) wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 10% FCS, 1% PenStrep und 1% L-Glutamin unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zellen wuchsen bis zur Konfluenz, wurden anschließend mit 0,25% Trypsin in EDTA bzw. 0,05% Trypsin geerntet und in 6- und 12-well Platten ausplattiert. Vor der Behandlung mit DHA, siRNA oder verschiedener Inhibitoren wurden die Zellen für einen Tag inkubiert.

Zellen splitten

Beim Splitten wurde der Zellrasen mit PBS-Puffer gewaschen, von der Flaschenoberfläche mit 0,25% Trypsin in EDTA enzymatisch gelöst und die Trypsinierung durch Zugabe von Basalmedium (+ 10% FCS, 1% P/S, 1% Glu) gestoppt. Das nach Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde mit frischem vorgewärmten Zellkulturmedium resuspendiert und nach der Zellzahl-Bestimmung eine entsprechende Anzahl an Zellen in eine neue Flasche bzw. in Well-Platten überführt.

Zellzahl-Bestimmung

Gezählt wurden die Zellen mit dem Casy-Counter (SCHÄRFE-SYSTEM). Dazu wurde das Zellpellet während dem Splitten nach der Zentrifugation in 1 ml Vollmedium resuspendiert und davon 10 µl in 10 ml isotoner Casy-Lösung pipettiert und gemischt. Durch Zählen mit dem Casy-Counter konnte die Zellzahl pro Milliliter ermittelt werden.

2.2 Gene Silencing

hPASMIC bzw. hASMC kultiviert in 6- und 12-well-Platten wurde die Nrf2 siRNA, Kontroll-siRNA oder ddH₂O als Negativkontrolle transfiziert. Alle Proben wurden mit Effectene Transfektionsreagenz behandelt. Unter Verwendung der spezifischen siRNA und eines optimierten Protokolls konnte das Silencing effizient durchgeführt werden:

Transfektionsprotokoll (siRNA-Endkonzentration: 50 nM)⁸³:

1. Nach einem Tag Inkubation der SMC in 12-Well-Platten (45.000 Zellen/Well) wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und diese in 600 µl serumfreien Medium (DMEM) pro Well für 1 Stunde inkubiert.
2. 2,5 µl siRNA (20 µM) und 5,3 µl Enhancer verdünnte man in 67,2 µl EC-Puffer und inkubierte für 3 min bei Raumtemperatur.
3. Danach gab man 3 µl Effectene hinzu und inkubierte für weitere 7 min wieder bei Raumtemperatur.
4. Schließlich fügte man 322 µl serumfreies Medium hinzu und pipettierte das Gemisch zum bereits vorhandenen Medium in jedes Well.
5. Nach 4h Inkubation wurde das serumfreie Medium in Complete Medium (5% FCS, Wachstumsfaktoren) bzw. DMEM (10% FCS) getauscht.
6. Die Zellen wurden 48-72 h nach der siRNA-Transfektion für Experimente verwendet.

2.3 Zell-Lyse für RNA-Isolation und Reverse Transkription

Sowohl die Lyse der hPASMIC bzw. hASMC, als auch die RNA-Isolation wurde laut 'PEQGOLD total RNA Isolierungsprotokoll' mit dem 'PeqGOLD Total RNA Kit' durchgeführt. Zuerst saugte man das Medium ab, pipettierte RNA Lysis buffer T direkt auf die Zellen und transferierte sie in ein Eppendorf-Tube. Nun überführte man die lysierten Zellen in eine DNA Removing Column und zentrifugierte für eine Minute bei 12.000x g. Der Säulendurchfluss wurde mit identischem Volumen 70% Ethanol versetzt und in ein PerfectBind RNA Column pipettiert. Nach wiederholtem Waschen und Zentrifugieren eluierte man mit 30 µl RNase-freiem dH₂O.

Die RNA-Konzentration konnte anschließend mit dem Spektrophotometer NanoDrop 2000 (THERMOSCIENTIFIC) gemessen und die Reinheit der Probe durch den 260/280 ratio ermittelt werden. Der Wert sollte um 2,05 liegen.

Für die cDNA-Synthese wurde der 'iScript™ cDNA Synthesis Kit' (BIO-RAD) verwendet und laut iScript-Protokoll vorgegangen. Je nach RNA-Konzentration wurde für die cDNA-Synthese eine Endmenge von 225 ng, 400 ng oder 500 ng RNA eingesetzt, um anschließend ein Endvolumen von 15 µl zu erhalten. Pro RNA-Probe fügte man 4 µl 5x iScript Reaction Mix und 1 µl iScript Reverse Transcriptase hinzu.

Die Synthese erfolgte laut Reaktionsprotokoll:

- 5 Minuten 25°C
- 30 Minuten 42°C
- 5 Minuten 85°C
- Hold bei 4°C

Die cDNA wurde bei -25°C gelagert.

2.4 Quantitative Real Time PCR (qRT PCR)

Die durch Reverse Transkriptase erhaltene cDNA wurde je nach eingesetzter RNA 1:10 bzw. 1:20 verdünnt. Die qRT PCR erfolgte mit 'QuantiFast SYBR Green PCR Kit' (QUIAGEN) und wurde laut Anleitung verwendet: 2,5 µl SYBR Green, 0,5 µl Primer und 2,5 µl verdünnte cDNA. Die Proben wurden auf ein Totalvolumen von 10 µl (6 µl Primer + Mastermix mit 4 µl cDNA) gebracht und in Duplikaten zu 4 µl in 384-well Platten pipettiert. Die Platte zentrifugierte man eine Minute bei 1000 rpm und gab sie anschließend in den LightCycler 480 (ROCHE), mit folgendem Temperaturschema:

- 95°C 5min
- 40 Zyklen von: 10 Sekunden 95°C, 30 Sekunden 60°C
- Schmelzkurven-Analyse

Die mRNA-Level von HO-1 (Primer Assay QT00092645) und Nrf2 (QT00027384) wurden mit humanem Beta-2-Mikroglobulin (QT01665006) normalisiert. Die mRNA-Level wurden relativ zur negativen Kontrolle exprimiert oder Kontroll-siRNA behandelte Kontroll-Zellen auf 1 gesetzt. Alle Proben wurden in Duplikaten getestet und der Mittelwert für die Quantifizierung benutzt.

2.5 Westernblot

Für die Proteinanalyse wurden die Zellen mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und mit 200 µl pro Well 'M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent' (THERMO SCIENTIFIC) + Proteaseinhibitor bzw. 90 µl RIPA-Buffer + Proteaseinhibitor-Cocktail lysiert. Die hPASMIC bzw. hASMC wurden auf Eis von der Well-Platten-Oberfläche abgeschabt und in ein Eppendorf-Tube überführt. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde der 'BCA Protein Assay Kit' (NOVAGEN) laut Anleitung verwendet. Dazu setzte man 25 µl der Probe ein und inkubierte sie mit 200 µl von BCA-Kupfersulfat-Gemisch für 30 min bei 37°C. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mittels Bovinem Serum Albumin hergestellt. 20 µg Protein setzte man für die Trennung der Proteine ein. Diese wurden mit 'laemmli sample buffer' (1x) vermischt und für 10 min bei 95°C gekocht. Die Proteintrennung mit 10% SDS-PAGE erfolgte bei 150 Volt für circa eine Stunde.

Trenngel		Sammelgel	
Wasser	4,0 ml	Wasser	3,4 ml
30% Acrylamid	3,3 ml	30% Acrylamid	0,83 ml
1.5M Tris pH 8.8	2,5 ml	1.0M Tris pH 6.8	0,63 ml
10% SDS	100 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	100 µl	10% APS	50 µl
Temed	8 µl	Temed	8 µl

Tabelle 1: Protokoll für die Herstellung eines 10% SDS-Gels

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (BIORAD) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 100 Volt und wurde nach einer Stunde gestoppt. Um zu kontrollieren, ob der Transfer funktionierte, wurden die nun auf der Membran befindlichen Proteine mit PonceauS gefärbt. Nach dem Entfärben mit Leitungswasser wurden unspezifische Bindungen durch Schwenken in 5% non-fat dry Milk (ROTH) in TBS mit 0,1% Tween-20 für 30 min geblockt. Die Inkubation über Nacht mit dem 1:1000 in 5% BSA verdünnten polyklonalen Antikörper gegen HO-1, HO-2 oder Nrf2 und dem monoklonalen Antikörper gegen α-Tubulin erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween (Tris HCl, NaCl, pH7,5 mit 0,05% Tween-20). Als Sekundär-Antikörper wurde der Horseradish

Peroxidase-konjugierte Antirabbit Antikörper mit der 1:5000 Verdünnung in 2,5% Milch verwendet. Mit Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate (THERMO SCIENTIFIC) bzw. dem Millipore Immobilon™ Substrat konnte die Membran entwickelt werden. Der Westernblot konnte auf autoradiographischen Filmen (KODAK oder GE HEALTHCARE LIMITED) exponiert werden. Gestrippt wurde die Membran mittels Restore Plus Westernblot Stripping Buffer (THERMO SCIENTIFIC). Die densitometrischen Werte konnte mit α -Tubulin normalisiert werden, relativ zu den Werten der Kontroll-Zellen.

2.6 Zellvitalität

Die Vitalität der humanen Pulmonalarterienzellen (hPASC) konnte über die zelluläre metabolische Aktivität mittels 'AlamarBlue Cell Viability Assay' (THERMO SCIENTIFIC) laut Anleitung der Hersteller untersucht werden. hPASC wurden hierfür in 96-well-Platten (10.000 Zellen pro Well) ausplattiert und mittels DHA oder EtOH für 18 h behandelt. Das AlamarBlue-Reagenz gab man am Schluss des Experiments zu den Zellen und inkubierte diese für 4 h. Die Fluoreszenz wurde bei 590 nm gemessen.

2.7 ROS Messung

Die ROS-Produktion wurde unter Verwendung vom Farbstoff 2',7'-Dichlorhydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) (BIOTIUM) untersucht. Dafür wurden hPASC in 12-Well-Platten je nach Zellzahl einen oder zwei Tage bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit warmem PBS gewaschen, anschließend mit 600 μ l Farbstoff pro Well mit einer Endkonzentration von 10 μ M H₂DCFDA (in PBS) für 30 min inkubiert und danach mit DHA bzw. EtOH (in Medium mit 5% FCS) in unterschiedlicher Dauer bzw. mit unterschiedlicher DHA-Konzentration inkubiert. Bei einer DHA-Inkubation länger als einer Stunde, wurden die Zellen zuvor mit DHA behandelt und 30 min vor Reaktionsstopp mit DHA und Farbstoff inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 300 μ l 3% Triton X-100 in PBS pro Well lysiert. Nach 30 minütigem Schütteln der Platte auf Eis pipettierte man 50 μ l EtOH absolut pro Well hinzu und schüttelte weitere 15 Minuten. Das Lysat überführte man in ein Eppendorf-Tube und zentrifugierte bei 13.000 rpm, 4°C, 10 Minuten. 100 μ l Überstand wurde für die

Messung verwendet, wobei man diese in eine 96-Well-Platte pipettierte, stets als Duplikate. Die Messung erfolgte bei Ex/Em 485/540 nm. Um die Ergebnisse normalisieren zu können, wurde zuletzt eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels 'BCA™ Protein Assay Kit' durchgeführt. Alle Arbeitsschritte mit H₂DCFDA mussten unter lichtgeschützten Bedingungen stattfinden.

2.8 Statistik

Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und die Daten als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Unter Anwendung von one-way Anova oder t-Test konnten die Mittelwerte verglichen werden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Gruppen wurden über den p-Wert < 0.05 (*), < 0.01 (**) oder < 0.001 (***) angegeben.

3 Material

Hersteller	Name	Bezeichnung
Heraeus	Megafuge 1.0	Zentrifuge
Heraeus	Multifuge 3 L-R	Zentrifuge
Heraeus	Pico 17	kleine Zentrifuge
Eppendorf	Minispin	Eppifuge
Eppendorf	5417R	Zentrifuge
cTan LAF	VFR 1206	Zelllabor-Bench
Kika Werke	REO basic C	Magnetrührer
P Selecta	Unitronic or	Wasserbad
Julabo	ED 19A	Wasserbad
Heraeus Instruments	BBD 6220	Inkubator
BioRad	MyCycler™ Thermal Cycler	für cDNA-Synthese
Combi-Spin	FVL-2400N	Zentrifuge+Vortexer
Thermo Scientific	Nano Drop 2000c	Spektrophotometer
Roche	LightCycler® 480	für qRT PCR
	LightCycler® 480 Software Release 1.5.0 SP4	Software für qRT PCR
Agfa	Curix60	Filmentwicklung WB
Schärfe System	Casy	Zellcounter
Molecular Devices	SpectraMax Plus 384	Photometer
Mettler	PM 4600 delta range	Waage
IKA	KS 260 basic	Schüttler
Hofer	Red Rocker	Schüttler
Biorad	Powerpac HC™	Westernblot

Zellkultur

- CORNING® Flask 75 m² Zellkultur-Flaschen
- SARSTEDT Tissue Culture Plate: 6-well, 12-well und 96-well mit Deckel
- THERMO SCIENTIFIC: Biolite 12 well multidish
- ROCHE, Casy®ton, Lot # 11687300
- LIFE LINE CELL TECHNOLOGY: Complete Medium VascuLife SMC, Lot # 02883, beinhaltet 5% FCS (GIBCO), Wachstumsfaktoren und:
 - Antibiotikum (1 ml) (Cell Systems®)
 - Phenolrot (100 µl) (Cell Systems®)
- GIBCO, DMEM/F-12, Dulbecco's Modified Eagle Medium, F-12 Nutrient Mixture (Ham)
 - Lot # 1230246
 - beinhaltet: 10% FCS, 1% L-Glutamin (Invitrogen), Penicillin G Natrium Sulfat (100 Units/ml) (Invitrogen), Streptomycin-Sulfat (100 µg/ml) (Invitrogen)
- GIBCO, DMEM (1x) Dulbecco's Modified Eagle Medium
 - [+] 1g/L D-Glucose, [+] L-Glutamine, [+] Pyruvat
 - Lot # 1322531
 - beinhaltet Penicillin G Natrium Sulfat (100 Units/ml) (Invitrogen), Streptomycin-Sulfat (100 µg/ml) (Invitrogen) und 5% bzw. 10% FCS
- GIBCO, DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
 - [-] CaCl₂, [-] MgCl₂
 - Lot # 1378876
 - beinhaltet: Penicillin G Natrium Sulfat (100 Units/ml) (Invitrogen), Streptomycin-Sulfat (100 µg/ml) (Invitrogen)
- GIBCO, 0,05% Trypsin

Gene Silencing

- Nrf2 siRNA: QUIAGEN FlexiTube siRNA 5 nmol
 - Order # 2757325, Cat # SI03246614, Lot # 112652435
 - Target Sequenz: 5'-AAGGATTATTATGACTGTTAA-3'
 - Sense Strang: 5'-GGAUUAUUAUGACUGUUAATT-3'
 - Antisense Strang: 5'-UUAACAGUCAUAAUAAUCCTT-3'
- Control siRNA-A: SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY sc-37007

- QUIAGEN Effectene transfection reagent Cat # 301425
 - enthält Effectene, Enhancer, EC-Buffer

Zellyse für RNA-Isolation und reverser Transkriptase

- PEQLAB Gold total RNA Kit # 12-6634
 - RNase freies Wasser
 - RNA Wash Buffer I
 - RNA Wash Buffer II (20 ml + 80 ml EtOH)
 - RNA Lysis Buffer T
- BIORAD iScript™ cDNA Synthesis Kit # 170-8891
 - 5x iScript reaction mix
 - Nuclease freies Wasser
 - iScript Reverse Transkriptase

Quantitative Real Time PCR

- Hämoxygenase-1 Primer: Hs_HMOX1_1_SG
 - QUIAGEN QuantiTect® Primer Assay, Cat # QT00092645
- β -2 Mikroglobulin Primer: Hs_B2mg_1_SG
 - QUIAGEN QuantiTect® Primer Assay, Cat # QT01665006
- Nrf2 Primer: Hs_NFE2L2_1_SG
 - QUIAGEN QuantiTect® Primer Assay, Cat # QT00027384
- QuantiFast SYBR PCR MM 2x, QUIAGEN Cat # 204054
 - enthält Hotstar Taq Plus DNA Polymerase, Quantifast SYBR Green PCR Buffer, dNTP Mix und ROX (passiver Referenzfarbstoff)

Western Blot

- M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent:
 - THERMO SCIENTIFIC, # 78501
- Pierce® RIPA Buffer: THERMO SCIENTIFIC, Lot # NF172920
- Pierce Protease Inhibitor Tablets: THERMO SCIENTIFIC, Lot # MK 165981
- Protease Inhibitor Cocktail: SIGMA, P8340-1ML, 111M4009
- BCA Protein Assay Kit: NOVAGEN, Lot # D00140805, Cat # 71285-3
- Temed: N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine
 - SIGMA LifeScience, Lot # BCBH1254V
- Acrylamide-Bis Fertiglösung

- MERCK, Lot # L012043739 217, 30% (37,5:1) für Elektrophorese
- SDS: Na-dodecylsulfat 10% in Aqua bidest.
 - Apotheke LKH-Univ.Klinikum Graz
- BSA: Albumin from bovine serum
 - SIGMA LifeScience, Lot # SLBC9771V, Inophilized powder
- Glycine: SIGMA LifeScience, Lot # BCBG8531V
- Glycine: MERCK, 1.04169.100
- Tris Base: SIGMA LifeScience, Lot # 040M54251V
- Tris Pufferan: ROTH, Art # 4855.2
- Milchpulver: ROTH, Art # T145.2
- Restore™ Plus Westernblot Stripping Buffer:
 - THERMO SCIENTIFIC, Prod # 46430, Lot # LD144488
- Precision Plus Protein Standards, Dual Color
 - BIORAD, Cat # 161-0374
- Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate
 - THERMO SCIENTIFIC, Prod # 34080, Lot # NI177944
 - Luminol/Enhancer Solution, Stable Peroxide Solution
- Millipore, Immobilon™ Western
 - Chemoluminescent HRP Substrate
 - Cat # SBKLS0100, Lot # 1301402
- GE HEALTHCARE LIMITED Amersham Hyperfilm™ ECL
 - High performance chemoluminescence film
- KODAK Film 18x24 cm T-MAT G/RA Film
- Tween 20 (Polyoxyethylene sobitan monolaureate)
 - BIORAD, Cat # 170-6531
- Trans-Blot pure nitrocellulose membrane, BIORAD, Cat # 162-0112

1. Antikörper:

- HO-1 (Hsp 32) Rabbit polyklonaler Antikörper
 - ASSAY DESIGNS, Lot # 08010917, Cat # SPA 895
- Nrf-2 Rabbit pAB
 - ENZO LifeSciences, Lot # 09011029
 - SANTA CRUZ, sc-722
- HO-2 Rabbit pAB
 - ENZO LifeSciences, BML-HC 3002, Lot # 700781

- α -Tubulin Rabbit mAB (11H10): CELL SIGNALING, # 2125S

2. Antikörper:

- α -Rabbit IgG: HRP linked Antibody: CELL SIGNALING, # 7074

Chemikalien

- Ethanol absolut: MERCK EMSURE®
- PBS-Lösung: Apotheke LKH-Univ. Klinikum Graz
 - phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4
- DMSO (Dimethylsulfoxid): MERCK, K33960231 508
- Triton X-100: SIGMA, Lot # 42K0217
- DHA (Cis-4,7,10,13,16,19- Docosahexaenoic acid) SIGMA Life Science
 - Lot # SLBB6915V, Endkonzentration 200mmol in Ethanol
- SB 203580: CALBIOCHEM, Lot # D00059210
- PD 98059: CALBIOCHEM, Lot # D00048465
- Wortmannin from Penicillium funiculosum: SIGMA, W1628-1MG, 029K4035
- JNK Inhibitor: CALBIOCHEM, Lot # D00057825
- VAS 2870: ENZO, Lot # 03291303
- Tiron: SIGMA ALDRICH, Lot # S38314-107
- DETCA, NAC, Indomethacin: CALBIOCHEM
- Trolox: FLUKA
- Tempol: SIGMA ALDRICH, Cas # 2226-96-2

ROS- und Zellvitalitätsmessung

- 2'7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA), BIOTIUM, Cat # 10058
- alamarBlue™ Cell Viability Assay Reagent, THERMO SCIENTIFIC, # 88951

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 DHA induziert HO-1 in Abhängigkeit der Konzentration in hPASMC

Um den Einfluss von DHA auf die HO-1 Expression in hPASMC untersuchen zu können, wurden die Zellen mit ansteigender Konzentration von 25 μM - 100 μM DHA in einem Vollmedium (+ 5% FCS) für 16 Stunden inkubiert. Sowohl bei der HO-1 mRNA (**Abb. 1A**), als auch der HO-1 Protein-Expression (**Abb. 1B,C**) kam es zu einem Anstieg mit allen angewandten DHA-Konzentrationen, mit einem Maximum bei 100 μM DHA.

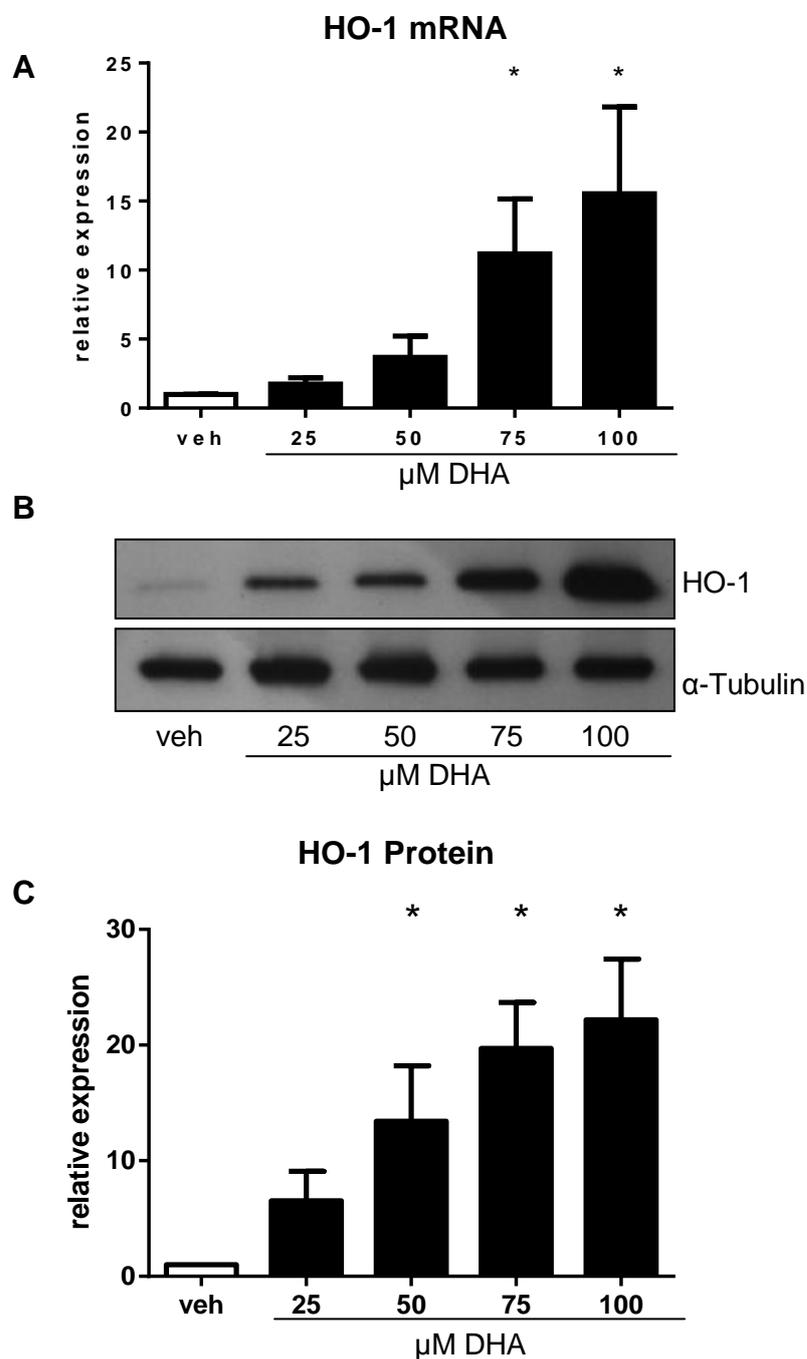
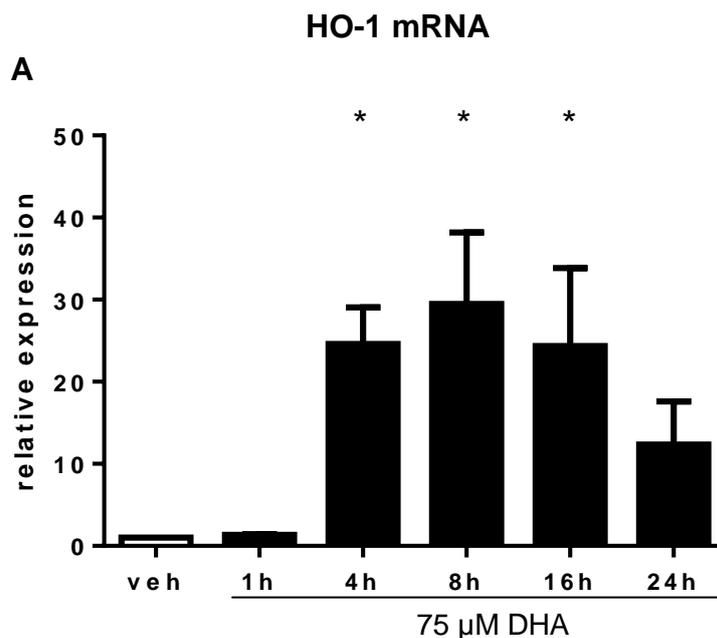


Abbildung 1. Auswirkung der ansteigenden DHA-Konzentration auf die HO-1 Expression in hPASC

hPASC wurden in einer 6-Well- bzw. 12-Well-Platte über Nacht kultiviert (75.000 Zellen/ml) und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen von DHA oder EtOH (veh) für 16 h inkubiert. (A) qRT PCR Bestimmung der HO-1 mRNA Expression relativ zu β -2 Mikroglobulin. (B) HO-1 Proteinexpression (Donor # w44p7) wurde mittels Westernblot untersucht. α -Tubulin wurde als Kontrolle mitgeführt. (C) Densitometrische Evaluierung der Westernblot-Daten. Signale wurden mit α -Tubulin normalisiert und mit der 16 h-Kontrolle (veh) verglichen.

4.2 DHA induziert HO-1 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer in hPASC

Die Behandlung von hPASC mit 75 μ M DHA bei unterschiedlicher Inkubationsdauer (1 - 24 h) zeigte einen zeitabhängigen Anstieg sowohl der HO-1 mRNA (Abb. 2A), als auch der HO-1 Protein-Expression (Abb. 2B,C). Die DHA-Behandlung führte zu einem deutlichen Anstieg der HO-1 mRNA Konzentration nach 4 h Inkubation und zeigte ein Maximum bei einer Inkubationszeit von 8 h (Abb. 2A). Die HO-1 Protein-Expression stieg nach 4 h Inkubation nicht so rapide an wie die der mRNA und erreichte ein Maximum erst bei 16 h Inkubation, gefolgt von einem Abfall nach 24 h. (Abb. 2B,C).



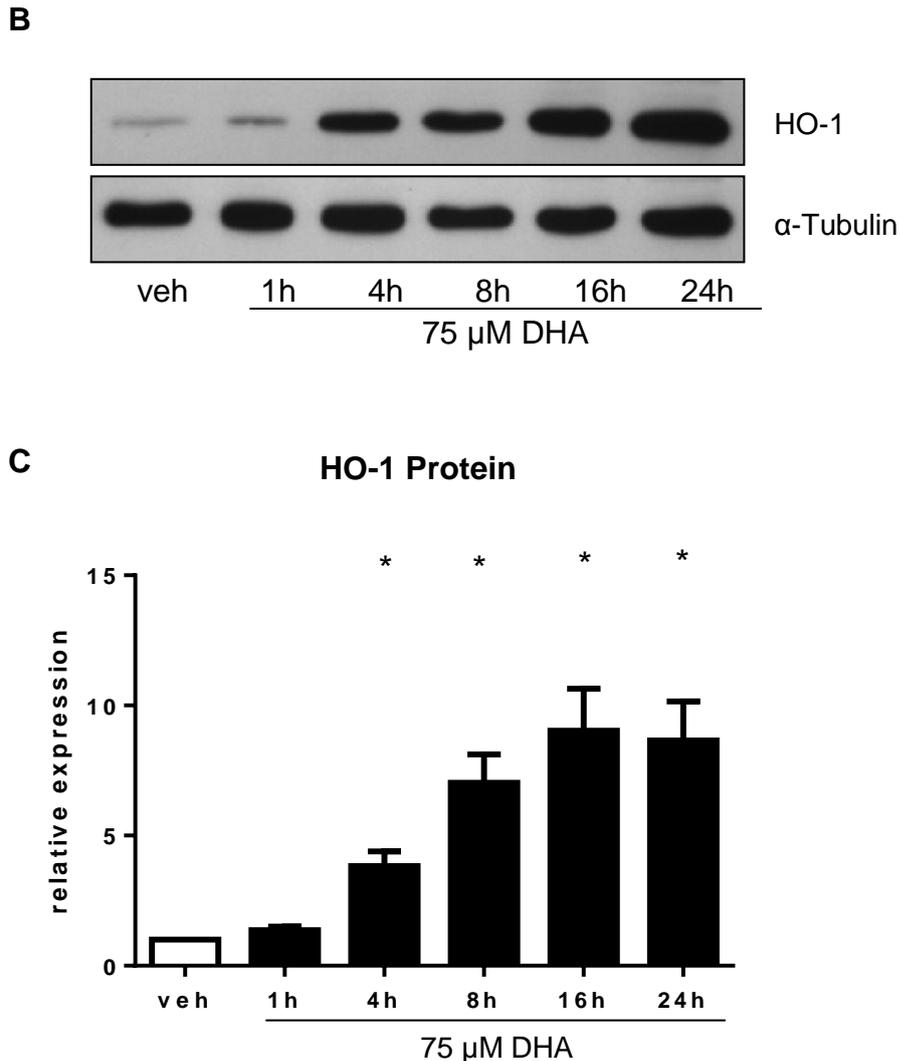


Abbildung 2. Auswirkung einer ansteigenden Dauer der DHA-Inkubation auf HO-1 Expression in hPASMC

hPASMC wurden wie in Abbildung 1 erklärt, kultiviert. Die Zellen wurden danach mit 75 μM DHA oder EtOH (veh) unterschiedlich lange inkubiert, angegeben als unterschiedliche Zeitpunkte. (A) qRT PCR für HO-1 mRNA Bestimmung relativ zu β-2 Mikroglobulin. (B) Für die HO-1 Proteinbestimmung (Donor # w79p7) wurde ein Westernblot durchgeführt. α-Tubulin wurde als Kontrolle mitgeführt. (C) Densitometrische Evaluierung der Westernblot-Daten. Signale konnten mit α-Tubulin normalisiert und mit der 1h-Kontrolle (veh) verglichen werden.

Der verspätete Anstieg der HO-1-Protein-Expression im Vergleich zur HO-1 mRNA ergibt sich aufgrund der Translation von mRNA in Protein. Die HO-1 Expression verringerte sich nach einer Inkubationszeit von länger als 16 h. Vermutlich lassen die DHA-Effekte nach etwa einem Tag Behandlung nach, das eine Abschwächung der HO-1 Expression zur Folge hat.

4.3 HO-2 wird in hPASMC durch DHA nicht beeinflusst

Die verwendeten Proben (hPASMC) wurden zur Untersuchung des Proteins der HO-2 unter gleichen Bedingungen wie zur HO-1 Proteinbestimmung mit DHA bzw. EtOH (veh) behandelt. Sowohl bei der konzentrationsabhängigen Behandlung mit 25 μ M - 100 μ M DHA (**Abb. 3A,B**), als auch bei verschiedenen langer Inkubationsdauer von 1 h - 24 h (**Abb. 3C,D**) war kein signifikanter Unterschied der HO-2 Expression sichtbar. Im Gegensatz zur Proteinexpression der HO-1, konnte die des HO-2 Proteins durch DHA nicht beeinflusst werden. Somit konnte bestätigt werden, dass HO-2 nicht induziert werden kann und diese Isoform in hPASMC dauerexprimiert vorhanden sein muss.

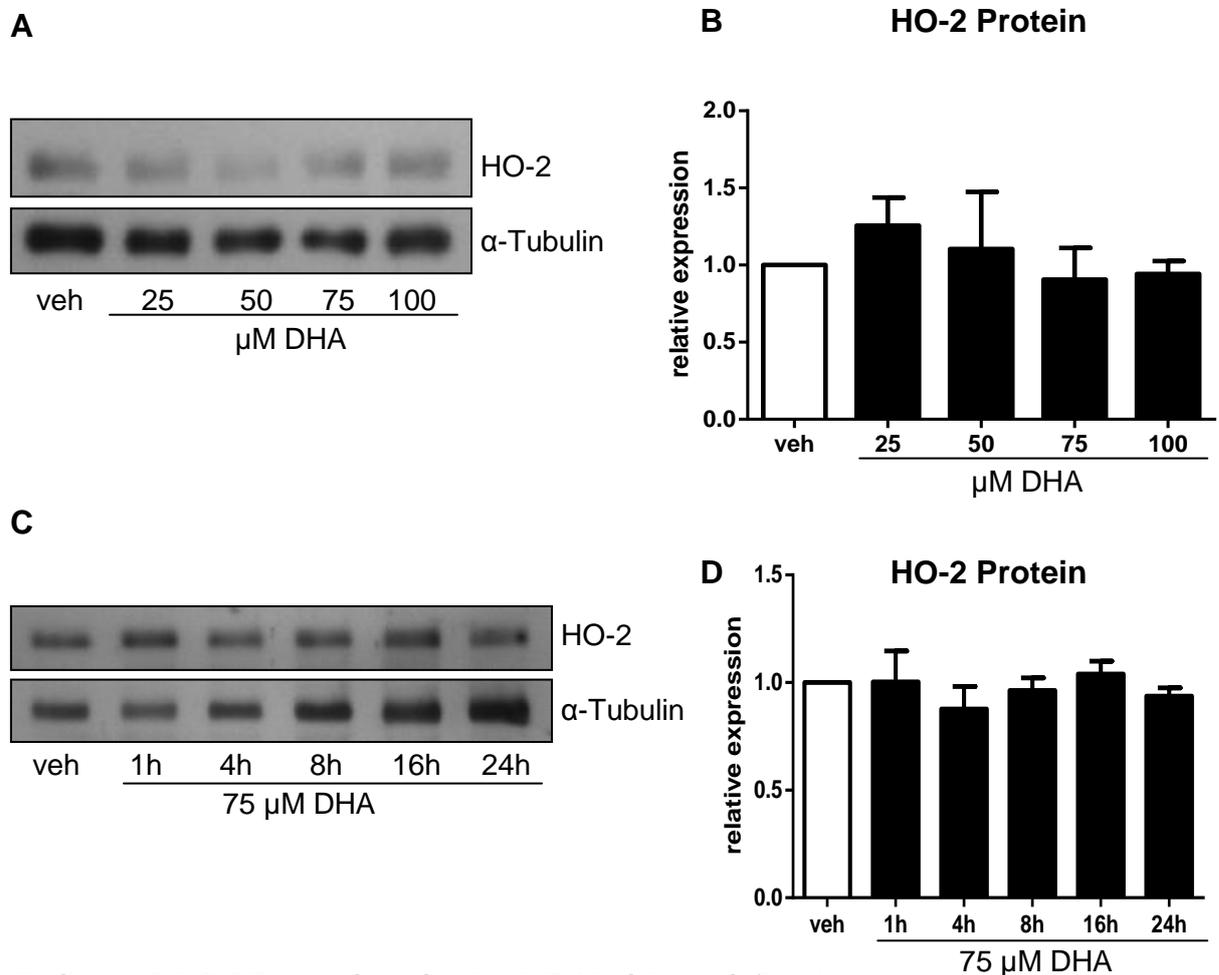


Abbildung 3. HO-2 Expression wird durch DHA nicht beeinflusst

hPASMC wurden wie in Abbildung 1 über Nacht kultiviert und anschließend mit (A) unterschiedlichen Konzentrationen von DHA (Donor # w71p9) bzw. (C) unterschiedlich lange mit DHA inkubiert (Donor # w44p8). HO-2 Proteinexpression wurde mittels Westernblot untersucht. α -Tubulin führte man als Kontrolle mit. (B,D) Densitometrische Evaluierung der Westernblot-Daten. Signale wurden mit α -Tubulin normalisiert und mit der 1h-Kontrolle (veh) D bzw. 16h-Kontrolle (veh) B verglichen.

4.4 Die metabolische Aktivität der hPASC MC wird von DHA nicht beeinflusst

Um den Einfluss von DHA auf die Zellvitalität untersuchen zu können, wurde die metabolische Aktivität der hPASC MCs mit dem AlamarBlue-Assay gemessen. Es gab keine signifikante Veränderung der Zellvitalität nach einer 24 h Inkubationsdauer mit maximal 100 μM DHA, verglichen mit den Kontroll-Zellen (veh) (**Abb. 4**). Es konnte kein Einfluss der Docosahexaensäure auf die Zellvitalität der hPASC MCs festgestellt werden.

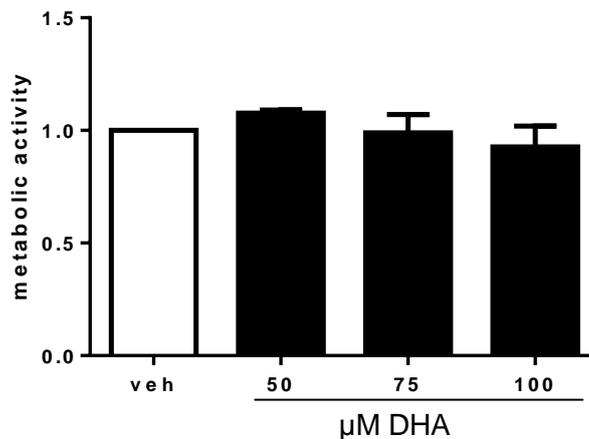


Abbildung 4. Die metabolische Aktivität in hPASC MC wird von DHA nicht beeinflusst

Die Zellen (hPASC MC) wurden mit unterschiedlichen DHA-Konzentrationen oder EtOH (veh) für 18 h und anschließend weitere 4 h mit dem AlamarBlue-Reagenz inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei 590 nm gemessen. Die Ergebnisse konnten mit Einbezug der EtOH-behandelten Zellen normalisiert werden.

4.5 Tempol verringert die DHA-vermittelte HO-1 Induktion in hPASC MC

Wie in unserer Gruppe schon gezeigt wurde, ist die Erzeugung von ROS Voraussetzung für DHA-vermittelte Induktion der HO-1.⁸³ Um dies nochmal zu bestätigen, wurden hPASC MCs mit 75 μM DHA inkubiert und anschließend diese Zellen mit dem starken Radikalfänger 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-N-oxyl (Tempol) mitbehandelt. Die mRNA- (**Abb. 5A**) und Protein-Expression (**Abb. 5B,C**) von HO-1 konnte in DHA-behandelten Zellen durch die Co-Inkubation mit Tempol statistisch signifikant verringert werden.

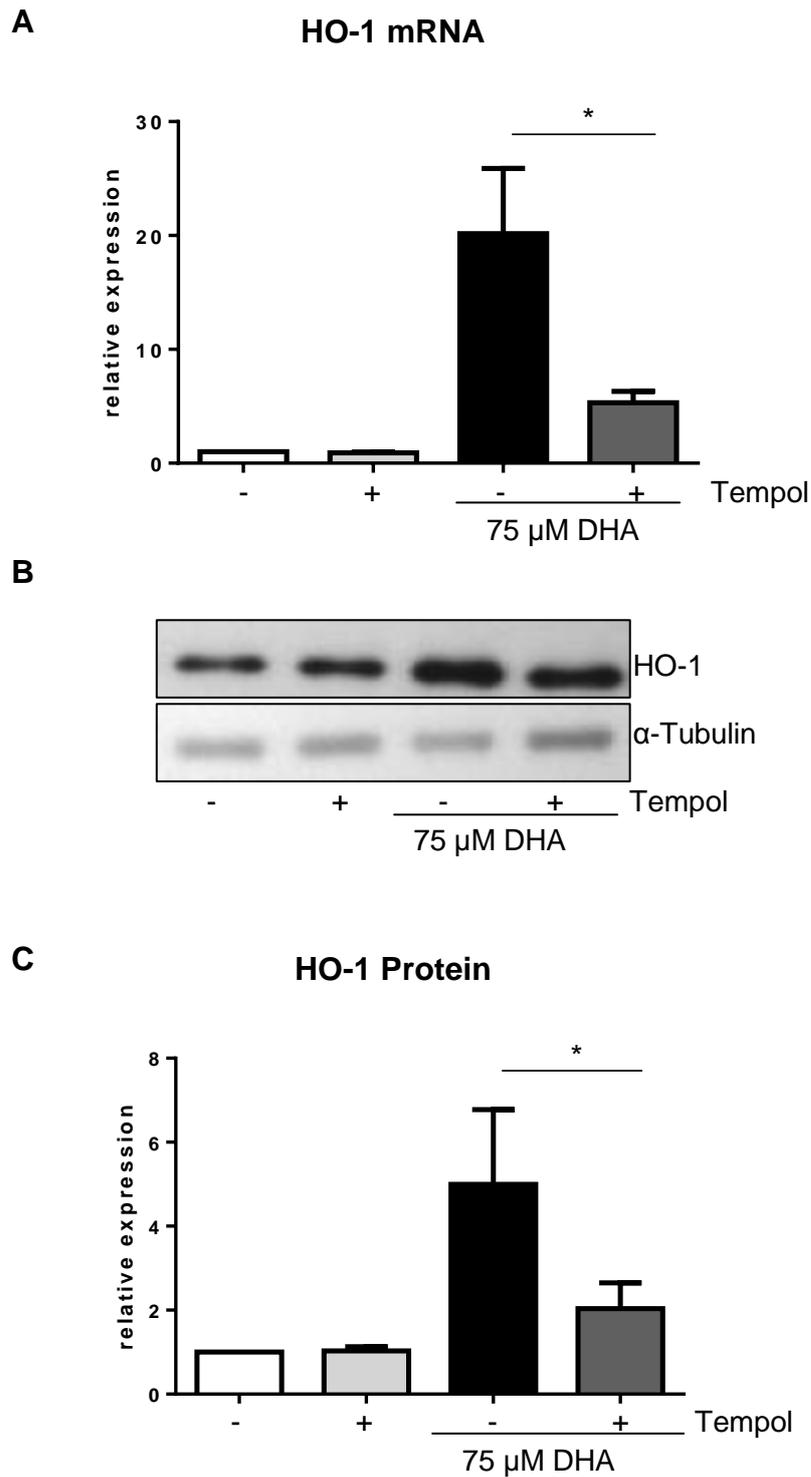


Abbildung 5. Tempol verringert die DHA-vermittelte Induktion von HO-1

hPASCs wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit DMSO (- Tempol) oder 150 μM Tempol für 1 h und anschließend mit 75 μM DHA oder EtOH (veh) in An- oder Abwesenheit von Tempol für 4 h inkubiert. (A) qRT-PCR Messung der relativen HO-1 mRNA Expression, normalisiert mit β-2 Mikroglobulin. (B) Repräsentativer Westernblot (Donor # w53p7) für Darstellung der HO-1 Proteinexpression. α-Tubulin führte man als Kontrolle mit. (C) Densitometrische Evaluierung der Westernblot-Daten, die Signale wurden mit α-Tubulin normalisiert und mit der Kontrolle (- Tempol, -DHA) verglichen.

Tempol ist ein stabiles Zellmembran-permeables Nitroxid und hat ein relativ geringes Molekulargewicht. Es reduziert die Bildung von Hydroxyl-Radikalen entweder durch das Einfangen von Superoxid-Anionen, oder durch Reduktion der intrazellulären Konzentrationen von Eisen und somit auch die Bildung von Hydroxyl-Radikalen über die Fenton-Reaktion. Außerdem dismutiert Tempol Sauerstoff-Radikale katalytisch und ermöglicht die Metabolisierung von Wasserstoffperoxid, somit ist es auch unter dem Namen Superoxid-Dismutase (SOD)-Mimetikum bekannt.^{84,85}

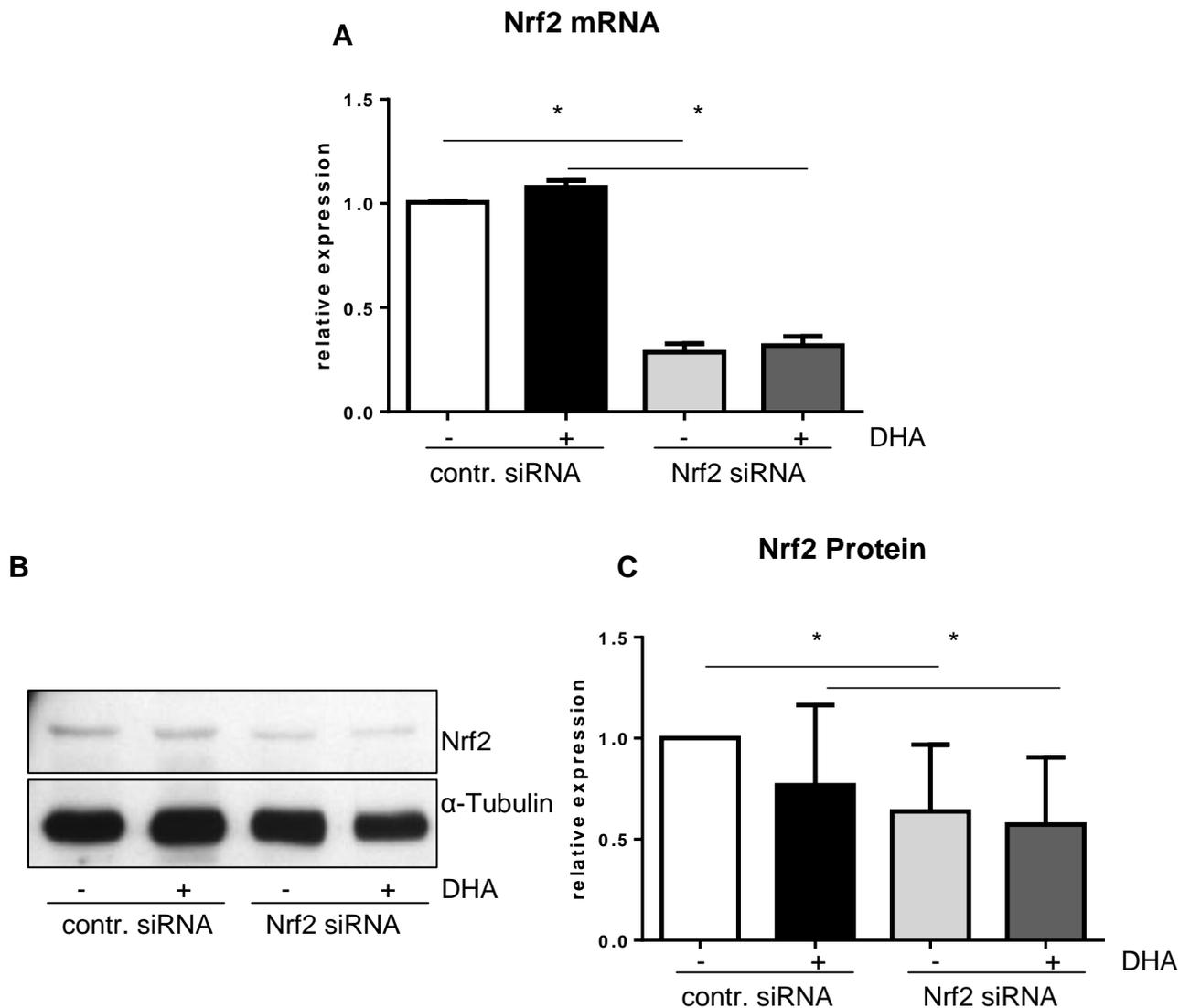
Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass der durch DHA induzierte oxidative Stress die Hauptursache der HO-1 Expression in hPASC ist. Jedoch ist der Mechanismus der DHA-abhängigen ROS-Bildung nicht vollständig verstanden, da in diesem Mechanismus vermutlich noch viele weitere Prozesse involviert sind.

4.6 Nrf2 Silencing verringert die DHA-induzierte HO-1 Expression in hPASC

Der "Nuclear factor E2-related factor 2" (Nrf2) ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Bindung an das "Antioxidant responsive element" (ARE) auf zytotoxische Effekte, ausgelöst durch oxidativen Stress, antwortet. ARE befindet sich upstream des Promoters verschiedener Gene. Nach Bindung von Nrf2 an ARE wird die Expression vieler antioxidativer Enzyme wie zum Beispiel die NAD(P)H:quinone Oxidoreduktase 1 und auch die Hämoxigenase 1 induziert.⁸⁶

Um zu zeigen, dass Nrf2 in der DHA-vermittelten Regulation von HO-1 in hPASC beteiligt ist, wurde eine Nrf2 siRNA bzw. Kontroll-siRNA in die Zellen transfiziert. Die höchste Silencing-Effizienz zeigte sich mit einer 50 nM siRNA-Endkonzentration und einer Analyse der Nrf2 mRNA- und Protein-Expression drei Tage nach der Transfektion (Daten nicht gezeigt).

Verglichen mit Kontroll-Zellen, die mit negativer siRNA transfiziert wurden (contr. siRNA), wurden Nrf2 mRNA- (**Abb. 6A**) und Nrf2 Proteinexpression (**Abb. 6B,C**) mittels Nrf2 siRNA-Behandlung verringert. Die vier stündige Inkubation der Zellen mit 75 µM DHA hatte keinen Einfluss auf die Nrf2-Expression (**Abb. 6A-C**).



Die DHA-vermittelte Induktion der HO-1 konnte jedoch durch das Nrf2-Silencing abgeschwächt werden (**Abb. 6D-F**). Die HO-1 mRNA (**Abb. 6D**) und das HO-1 Protein (**Abb. 6E,F**) wurden bei einer 75 μ M DHA-Behandlung für 4 h ohne Nrf2 Silencing stark exprimiert. Zum Vergleich, die HO-1 mRNA- und Protein-Expression fiel drastisch durch das Nrf2 Silencing mit 50 nM Nrf2-siRNA ab. Verglichen wurden die Ergebnisse mit Kontroll-Zellen, die mit negativer siRNA transfiziert wurden (contr. siRNA). Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die HO-1 durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert wird und dass oxidativer Stress, ein bekannter Aktivator des Nrf2¹⁰ bei der Aktivierung dieses Enzyms eine Rolle spielen muss. Unter basalen Bedingungen, in der Abwesenheit von DHA, werden HO-1 mRNA und Protein ganz schwach exprimiert, woraus geschlossen werden kann, dass die HO-1 Expression nach Bedarf, unter besonderen pathophysiologischen Bedingungen wie z.B. durch DHA-induzierten oxidativen Stress, induziert wird.

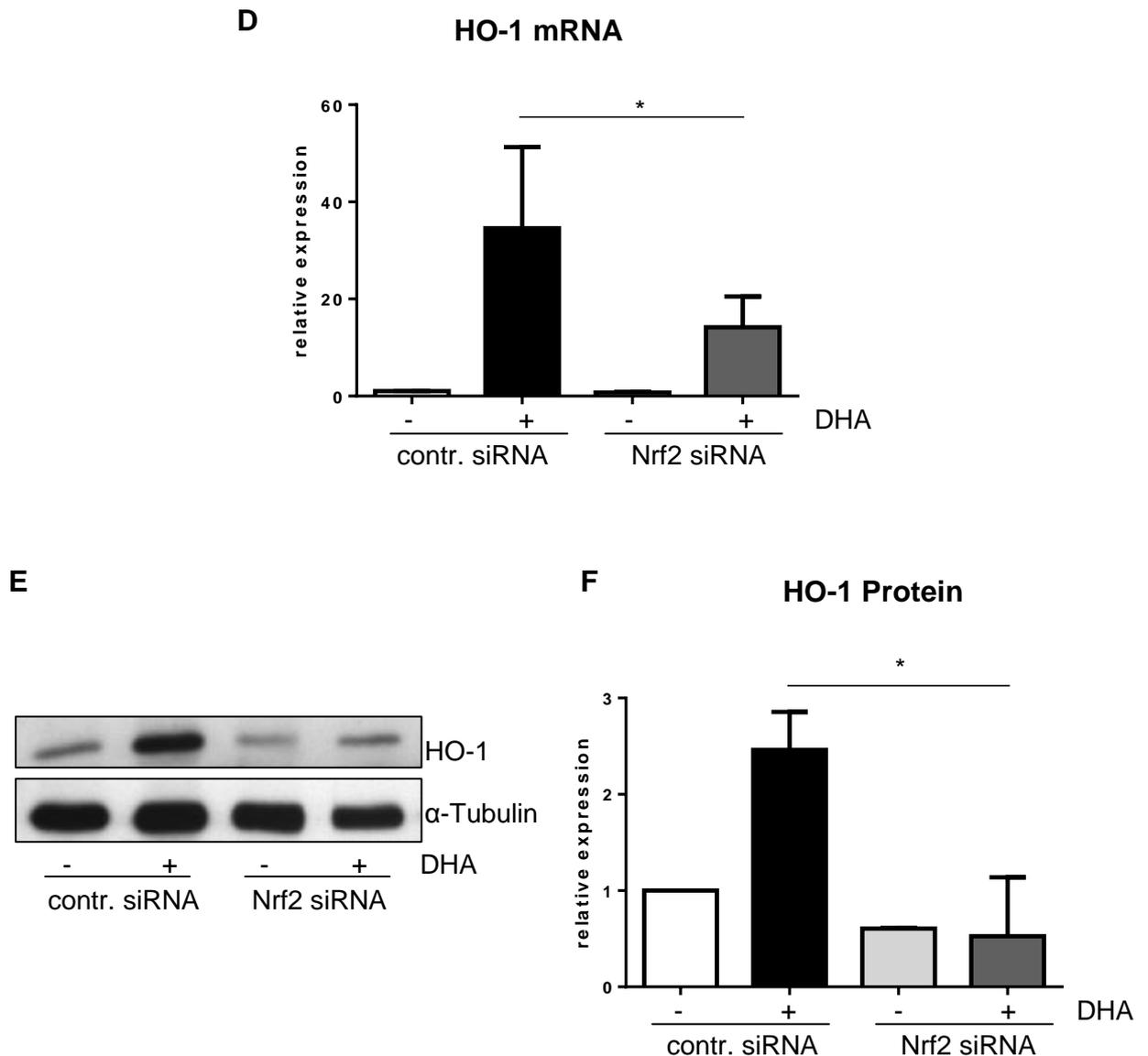


Abbildung 6. Nrf2 Silencing schwächt die DHA-induzierte HO-1 Expression in hPASC

hPASC wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. 72 Stunden nach der Transfektion mit 50 nM Endkonzentration Nrf2 siRNA oder negativer Kontroll-siRNA (contr. siRNA) wurden die hPASC mit 75 μ M DHA oder EtOH (- DHA, contr. siRNA) für 4 h inkubiert und anschließend für RNA-Extraktion lysiert, gefolgt von der Bestimmung der (A) relativen Nrf2 mRNA Expression (D) und der relativen HO-1 mRNA Expression. Das Zelllysate für die Proteinbestimmung wurde für die Durchführung des Westernblots verwendet, (B) mit anti-Nrf2 und (E) mit anti-HO-1 bzw. α -Tubulin Antikörper. Nrf2 und HO-1 densitometrische Werte wurden mit α -Tubulin normalisiert und konnten mit den Kontroll-Zellen verglichen werden (C,F).

4.7 DHA induziert die HO-1 Expression in hASMC

Auch in humanen glatten Muskelzellen der Aorta (hASMC) kam es nach einer Behandlung der Zellen mit 75 μ M DHA zu einem deutlichen Anstieg sowohl der HO-1 mRNA- (**Abb. 7A**), als auch der HO-1 Protein-Expression (**Abb. 7B,C**) nach 4-stündiger Inkubation. Eine acht stündige Inkubation mit DHA zeigte einen weiteren Anstieg der HO-1 mRNA und des Proteins (**Abb. 7A-C**).

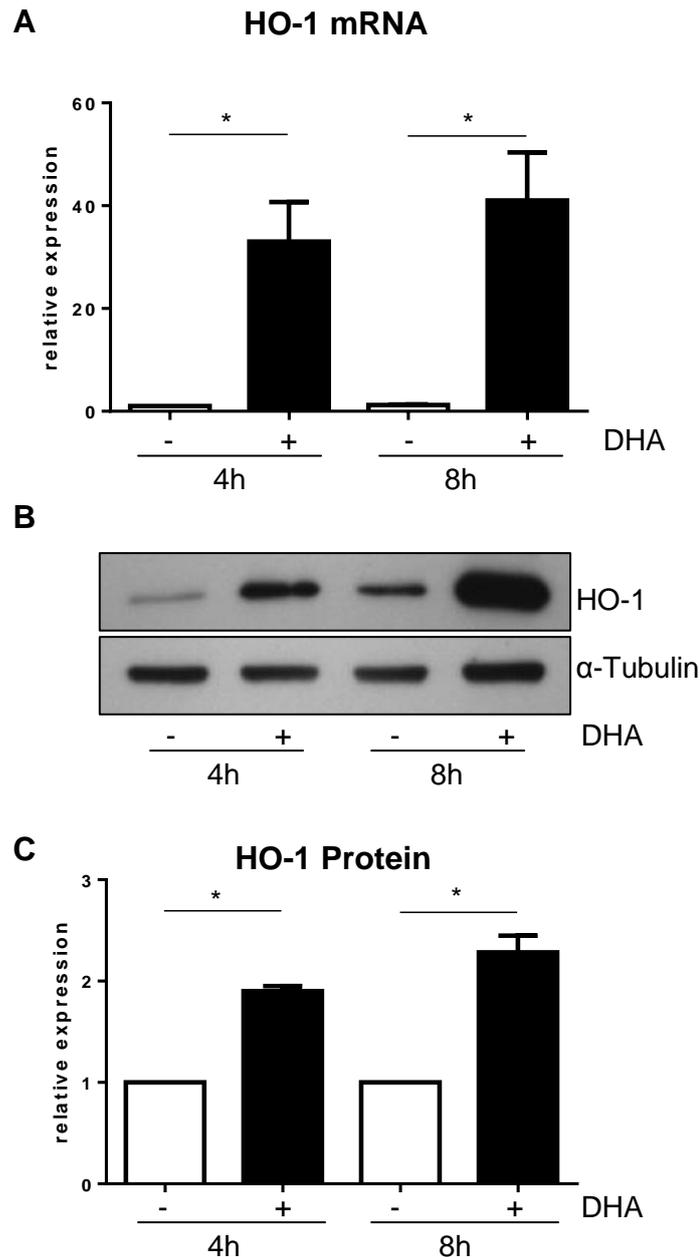
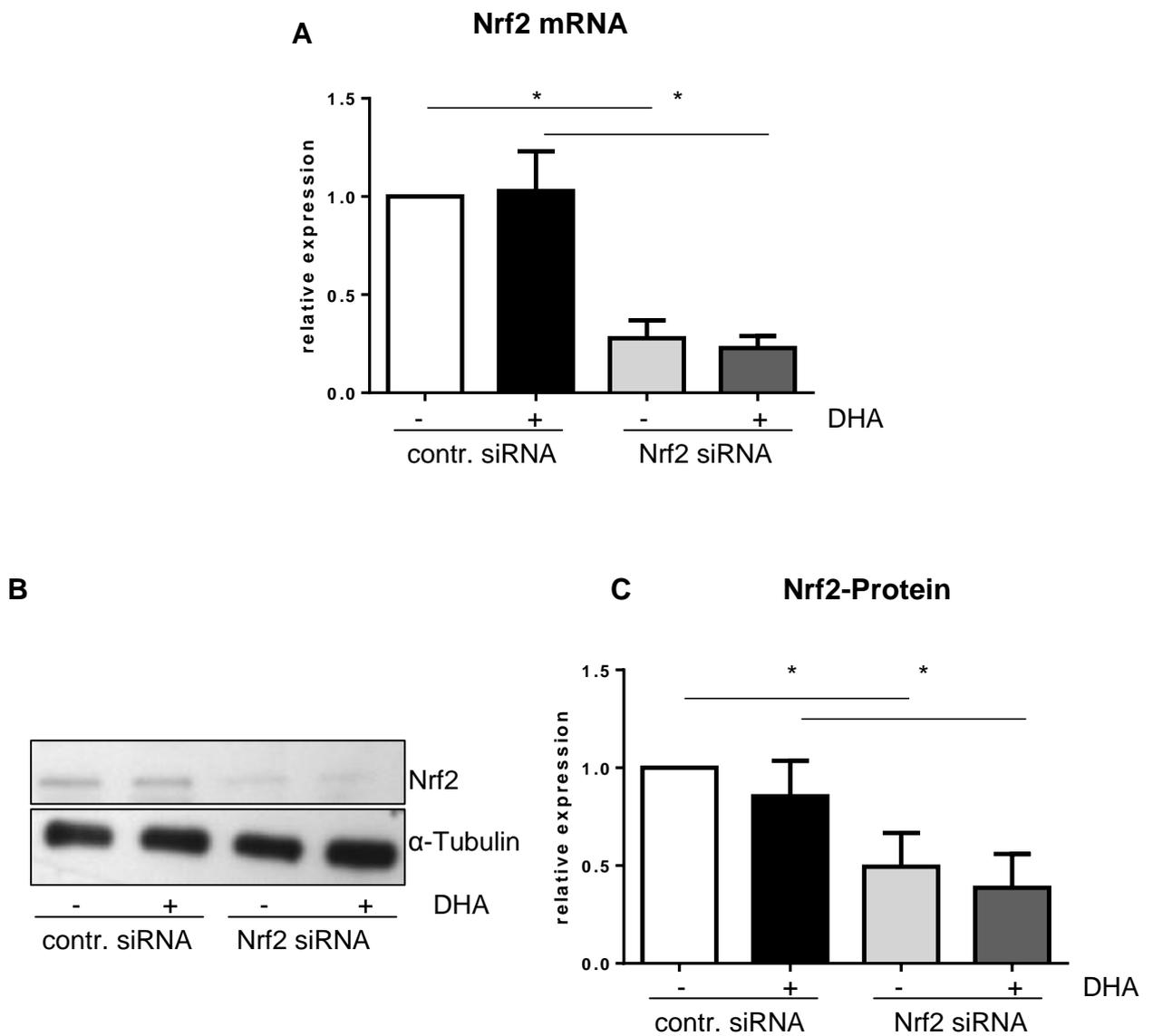


Abbildung 7. DHA induziert die HO-1 Expression in hASMC

hASMC wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. Mit 75 μ M DHA oder EtOH (Kontrolle) inkubierte man anschließend die Zellen 4 bzw. 8 Stunden. (**A**) Relative HO-1 mRNA Expression (qRT PCR), normalisiert mit β -2 Mikroglobulin. (**B**) Westernblot mit anti HO-1 oder anti-Tubulin Antikörper. (**C**) Densitometrische Auswertung des HO-1 Proteinlevels.

4.8 Nrf2 silencing verringert die DHA-induzierte HO-1 Expression in hASMC

Um hPASC mit hASMC vergleichen zu können, wurden auch die Aorta-Zellen unter gleichen Bedingungen wie in Kapitel 4.6 behandelt. Die Nrf2-siRNA wurde dafür in hASMC transfiziert und sowohl die Nrf2- als auch die HO-1-Expression untersucht. Auch in hASMC konnte die basale Nrf2 mRNA- (**Abb. 8A**) und Proteinexpression (**Abb. 8B,C**) mittels 50 nM Nrf2-siRNA unterdrückt werden. DHA hat auch in diesen Zellen keinen Einfluss auf die Nrf2-Expression.



Wie in hPASCs wurde ebenso in DHA-behandelten hASC die HO-1 Expression auf mRNA- (**Abb. 8D**) und Protein-Ebene (**Abb. 8E,F**) durch Nrf2-Silencing herunterreguliert, was auf ähnliche DHA-induzierte Mechanismen der HO-1 Induktion in diesen Zellen hindeutet.

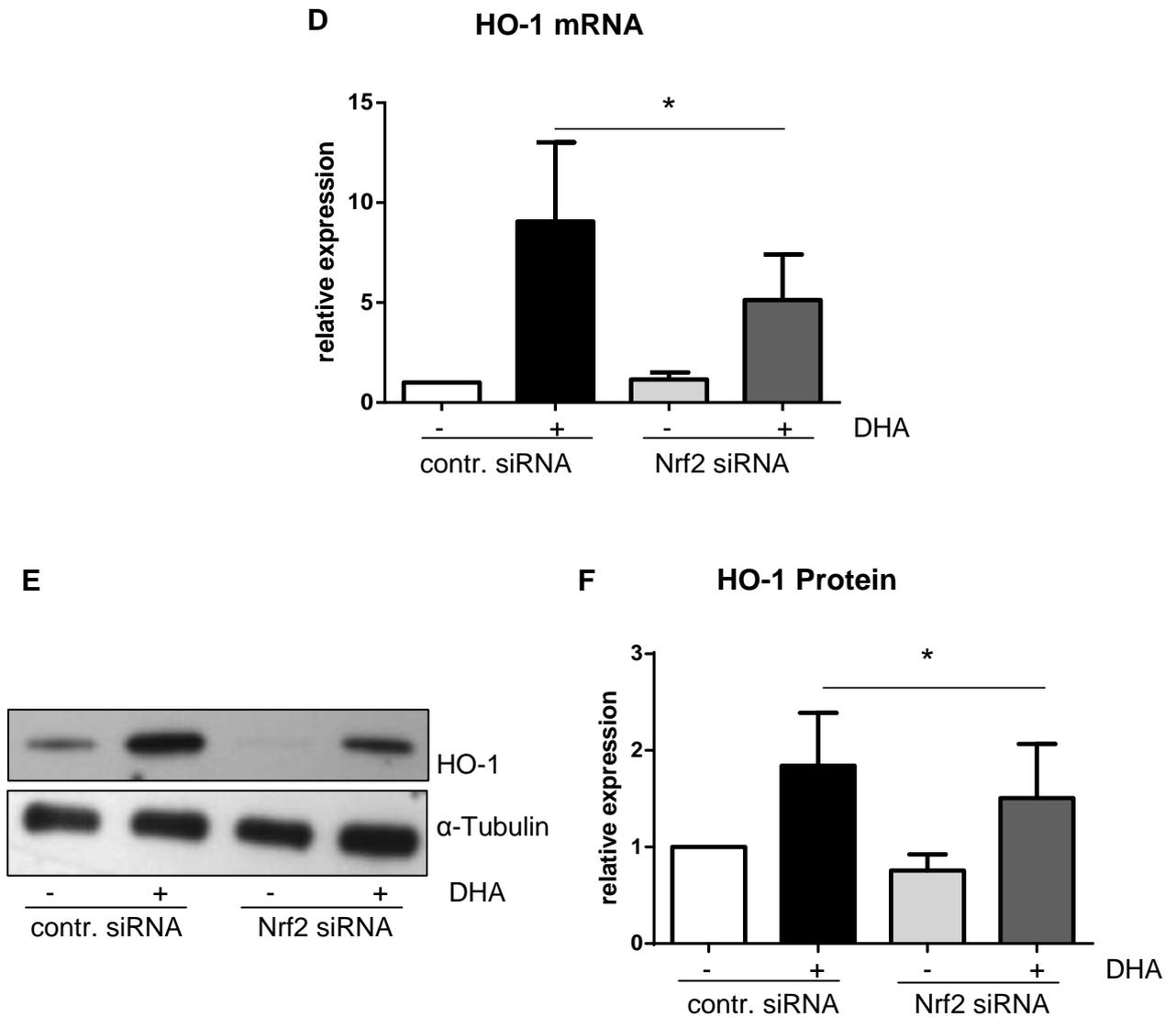


Abbildung 8. Nrf2 Silencing schwächt die DHA-induzierte HO-1 Expression in hASC

hASC wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. 72 Stunden nach der Transfektion mit Nrf2 siRNA oder negativer Kontroll-siRNA (contr. siRNA) wurden die hASC mit 75 μ M DHA oder EtOH (veh) für 4 h inkubiert und anschließend für RNA-Extraktion lysiert, gefolgt von der Bestimmung der (A) relativen Nrf2 mRNA Expression (D) und der relativen HO-1 mRNA Expression. Das Zelllysat für die Proteinbestimmung wurde für die Durchführung des Westernblots verwendet, (B) mit anti-Nrf2 und (E) mit anti-HO-1 oder α -Tubulin Antikörper. Nrf2 und HO-1 densitometrische Werte wurden mit α -Tubulin normalisiert und mit den Kontroll-Zellen verglichen (C,F).

4.9 DHA induziert ROS in hASMC

Wie in Abbildung 2A-C (hPASMC) und 7A-C (hASMC) gezeigt wurde, induziert DHA die HO-1 Expression schon nach einigen Stunden. Um zu untersuchen, ob und wann die DHA-induzierte ROS-Bildung beginnt, wurden hASMC mit 120 μ M DHA behandelt und auf die ROS-Entstehung nach unterschiedlich langer DHA-Behandlung untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass die intrazelluläre ROS-Konzentration schon nach 15 min signifikant angestiegen ist (**Abb. 9**). Nach 40 min Inkubation kommt es zu einem Absturz der ROS-Bildung, wobei danach (1 h - 5 h Inkubation) die ROS-Konzentration in etwa gleich hoch blieb wie jene nach 15 Minuten.

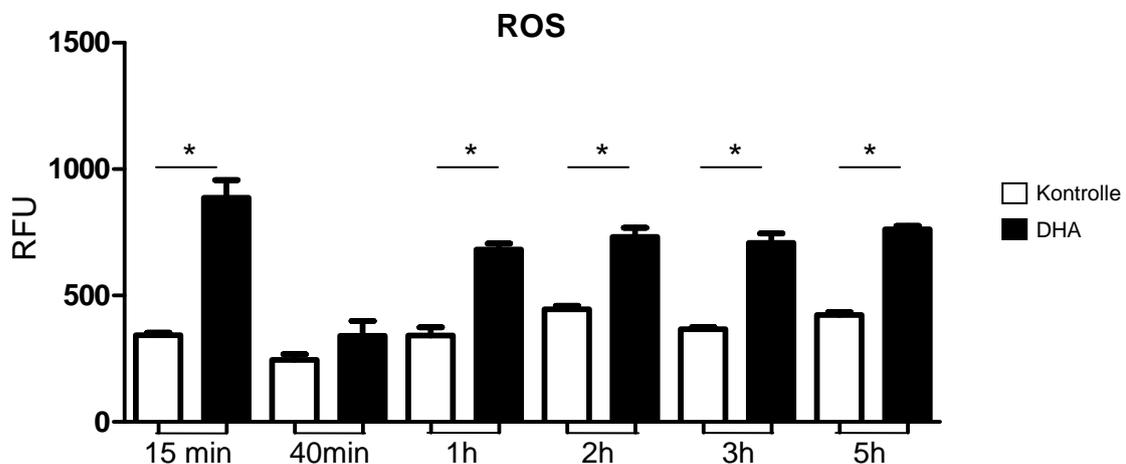


Abbildung 9. DHA induziert oxidativen Stress

hASMC wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit 10 μ M H₂DCFDA für 30 min und anschließend mit 120 μ M DHA oder Kontrolle (EtOH) unterschiedlich lange (15 min - 40 min) inkubiert. Für längere Inkubation wurden die Zellen vorerst mit 120 μ M DHA oder Kontrolle (EtOH) inkubiert und in den letzten 30 min fügte man 10 μ M H₂DCFDA hinzu. Gemessen wurde mittels Spektrofluorometer bei Ex/Em 485/540 nm und unter Einbeziehung der Proteinkonzentration auf "relative fluorescence unit" normalisiert.

Aufgrund eines Zeitmangels konnte nur ein Experiment (als Dreifach-Ansatz) zur ROS-Bestimmung durchgeführt werden. Das Experiment müsste noch mehrmals wiederholt werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können, warum nach 40 min keine ROS Entstehung durch DHA nachgewiesen werden konnte. Die letzten Ergebnisse unserer Gruppe zeigten eine zeitabhängige ROS-Bildung in hPASMC durch DHA ohne Abfall zwischen 10 min und 1h, jedoch wurde nach

genau 40min Inkubation keine ROS-Messung durchgeführt.⁸³ Vermutlich war dies ein Fehler, der während der Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff passierte.

Der Grund für die erhöht eingesetzte DHA-Konzentration (bis zu 180 μ M) in den kommenden Ergebnissen liegt bei der Herstellung neuer Medien. Durch das Hinzufügen von neuem fetalen Kälberserum (FCS) in eine neue Flasche Medium befindet sich stets eine unterschiedlich hohe Konzentration an Albumin im Medium. Je mehr Albumin im Medium vorhanden ist, desto geringer ist die Wirkung von DHA auf die Zellen, da das Albumin mit DHA komplexiert und somit die Effekte von DHA abschwächt. Zusätzlich kann der Sättigungsgrad des Albumins mit freien Fettsäuren (Albumin besitzt 6 Bindungsstellen für Fettsäuren) in verschiedenen FCS unterschiedlich sein, was wiederum die Bindung von DHA an das Albumin und die Verfügbarkeit an freier DHA, die auf die Zellen wirkt, beeinflussen kann. Um repräsentative Ergebnisse zu bekommen, wurde daher die DHA-Konzentration auf das entsprechend verwendete FCS angeglichen.

4.10 ROS induziert HO-1 in hASMC

Um die Rolle von ROS in DHA-vermittelter Induktion von HO-1 zu untersuchen, wurde zuerst die DHA-induzierte ROS-Bildung in mit 180 μ M DHA behandelten Zellen gemessen. Die Co-Inkubation der DHA-behandelten Zellen mit den SOD-Mimetika Tempol und Sodium 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonat (Tiron) kam es zu einer erniedrigten ROS-Bildung (**Abb. 10A**). Auch durch Co-Inkubation der hASMC mit dem SOD-Inhibitor Diethyldithiocarbamat (DETCA) zeigte sich eine geringere ROS-Bildung in DHA-behandelten Zellen, jedoch auch in den Kontrollzellen (EtOH) (**Abb. 10A**). Die HO-1 Protein-Expression in mit 120 μ M DHA behandelten Zellen und Co-Inkubation mit Tempol oder Tiron war geringer als in den Kontrollzellen (veh, +DHA) (**Abb. 10B,C**). In DHA-behandelten hASMC und Co-Inkubation mit DETCA oder DETCA+Tiron konnte ein Anstieg der HO-1 Protein-Expression nachgewiesen werden.

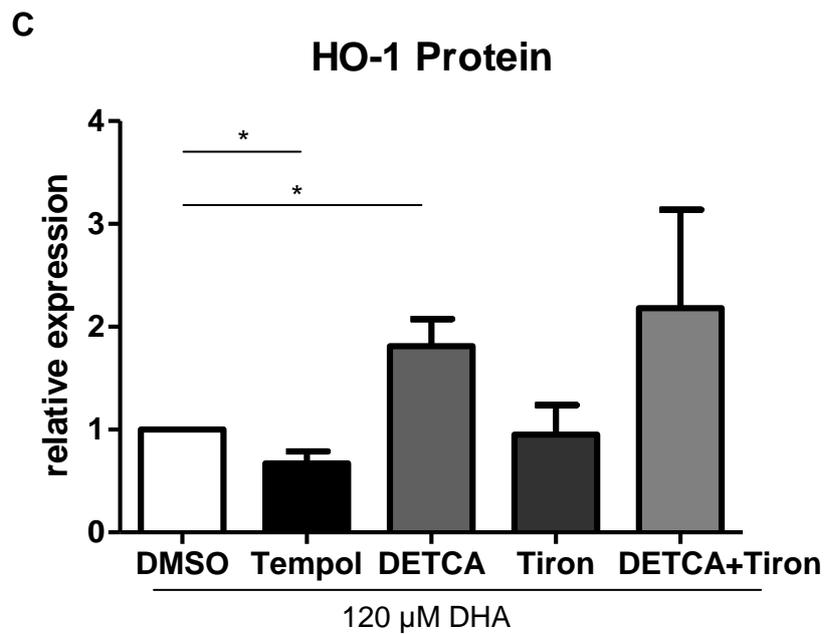
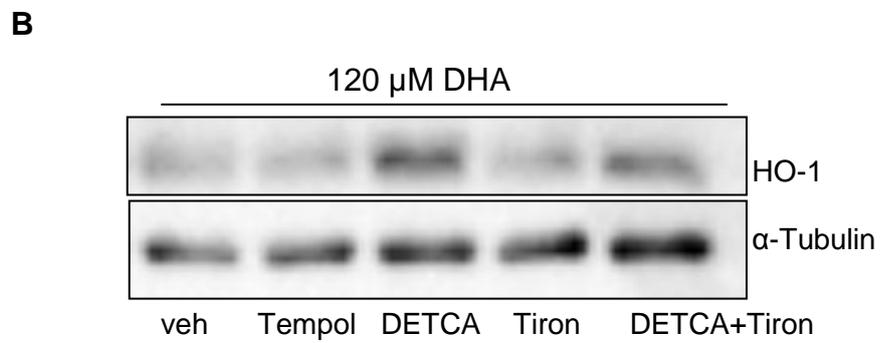
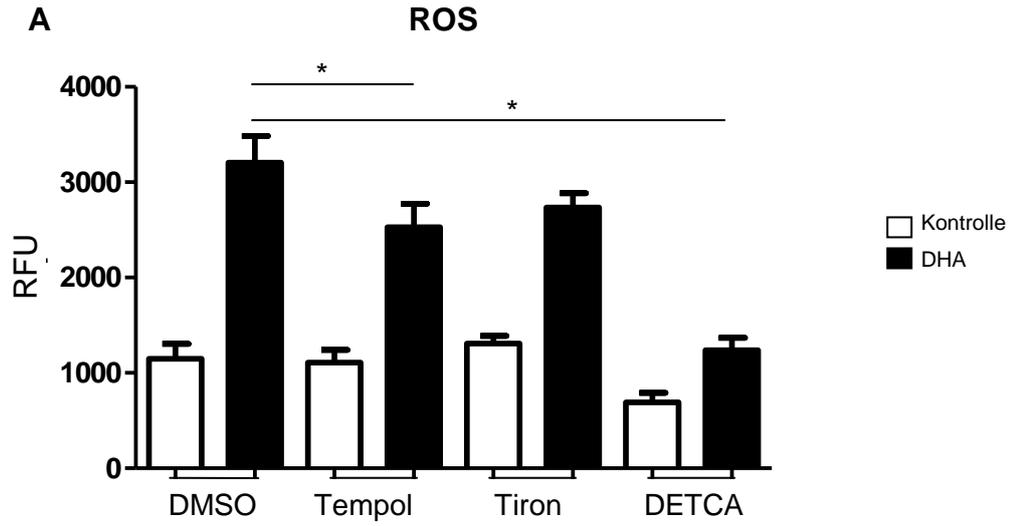


Abbildung 10. Auswirkung von SOD und SOD-Inhibitor in DHA-behandelten hASMC auf die HO-1 Expression

hASMC wurden in 12-well Platten über Nacht kultiviert. **(A)** ROS-Messung: Die Zellen wurden mit Radikalfängern 150 μM Tempol und 100 μM Tiron, sowie SOD-Inhibitor 10 μM DETCA oder Kontrolle (DMSO) für 30 min mit 10 μM H₂DCFDA inkubiert und anschließend 15 min lang mit 180 μM DHA oder EtOH und den gleichen Konzentrationen von Tempol, Tiron und DETCA. Die Messung erfolgte mittels Spektrofluorometer bei Ex/Em 485/540 nm und normalisiert unter Einbeziehung der Proteinkonzentration auf "relative fluorescence unit" (RFU). **(B)** Die Zellen wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. Die Vorinkubation mit Tiron, Tempol, DETCA erfolgte 1 h, danach behandelte man die Zellen mit 120 μM DHA für 5 h. Das Zellysate für die Proteinbestimmung wurde für die Durchführung des Westernblots verwendet, mit anti-HO-1 oder α -Tubulin Antikörper. **(C)** Die HO-1 densitometrischen Werte wurden zu α -Tubulin normalisiert und relativ zu den Mittelwerten mit den Kontroll-Zellen (DMSO) verglichen.

Tiron ist ein effizienter Chelator verschiedener Metallionen und fungiert als Substrat in Elektronentransfer-Reaktionen. Aufgrund seiner geringen Größe ist Tiron zellpermeabel und wird daher bevorzugt als Radikalfänger eingesetzt.⁸⁷ DETCA ist ein Inhibitor von Superoxid-Dismutasen und verhindert somit die Umwandlung von Superoxid-Anionen in Wasserstoffperoxid, das wiederum von Katalasen zu Sauerstoff und Wasser umgewandelt werden kann.⁸⁸ Da der Farbstoff H₂DCFDA nur in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid fluoresziert, jedoch nicht bei Superoxid-Anionen, zeigt das Ergebnis einen deutlichen Abfall des ROS-Signals in DETCA-behandelten Zellen, obwohl die Superoxid-Radikal-Konzentration hoch sein könnte. **(Abb. 10A)**. Um dies untersuchen zu können, müsste man einen anderen Farbstoff für die ROS-Messung verwenden, der spezifisch Superoxide detektieren kann. HO-1 Expression in DHA-behandelten Zellen steigt in DETCA-Anwesenheit **(Abb. 10B,C)**, da die Superoxid-Radikale durch SOD nicht abgebaut werden können und somit die HO-1 durch sie induziert wird. Der Anstieg der HO-1 Protein-Expression nach Co-Inkubation mit DETCA+Tiron ergibt sich durch die unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen von DETCA und Tiron. Um die Wirkung der beiden Chemikalien aufheben zu können, hätte man wahrscheinlich die Konzentration von Tiron erhöhen müssen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann stark vermutet werden, dass die HO-1 durch die DHA-vermittelte Entstehung von ROS und zwar von Superoxid-Radikalen induziert wird.

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox) und N-Acetyl-Cystein (NAC), zwei weitere Antioxidantien, wurden mit DHA-behandelnden Zellen Co-inkubiert, um deren Auswirkung auf die HO-1 Proteinexpression zu untersuchen. 100 μ M DHA bzw. Kontrolle (EtOH) wurde für die Induktion eingesetzt. **Abb. 11A** zeigt einen repräsentativen Blot für die Darstellung der HO-1 Protein-Expression. Durch die Co-Inkubation mit Trolox ist sowohl in den Kontrollzellen (EtOH), als auch in DHA-behandelten Zellen eine erhöhte HO-1 Protein-Expression ersichtlich.

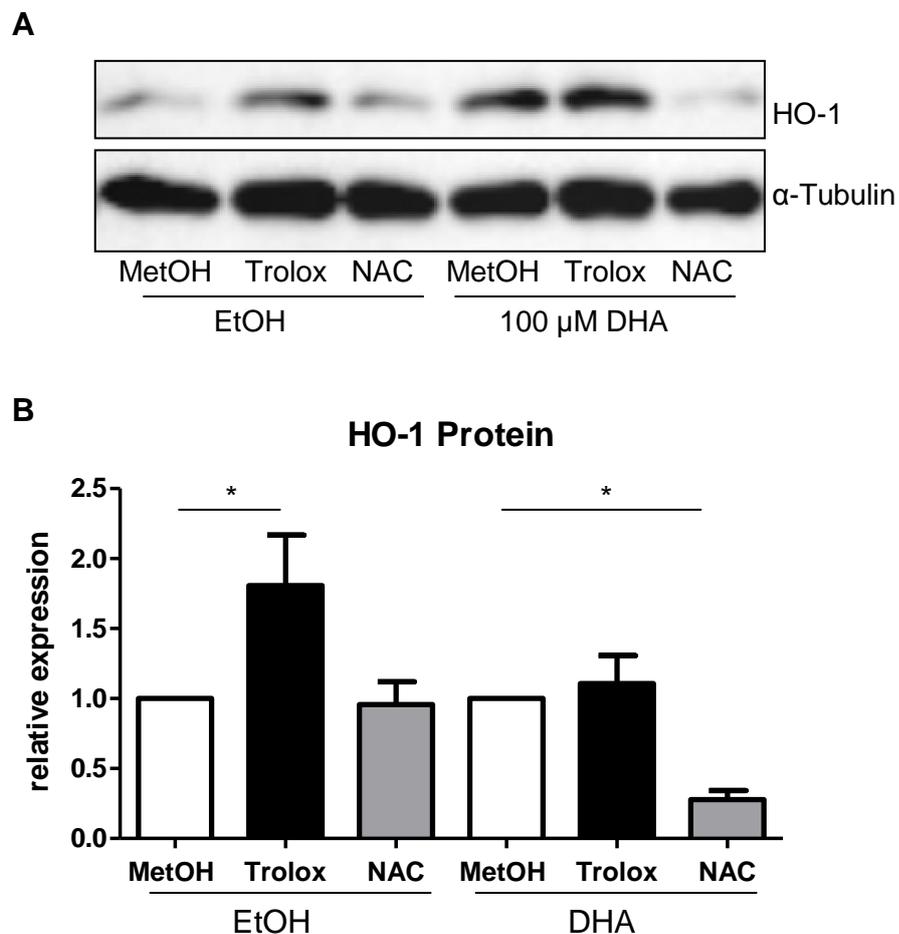


Abbildung 11. Auswirkung der Antioxidantien Trolox und NAC auf die HO-1 Expression in DHA-behandelten hASMC

hASMC wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit 0,5 mM Trolox oder 10 mM NAC bzw. Kontrolle (MetOH, - Trolox, -NAC) für 1 h vorinkubiert und anschließend mit 100 μ M DHA oder EtOH (veh) in An- oder Abwesenheit von Trolox bzw. NAC für 4 h behandelt. **(A)** Repräsentativer Westernblot für die Darstellung der HO-1 Proteinexpression. α -Tubulin führte man als Kontrolle mit. **(B)** Densitometrische Evaluierung der Westernblot-Daten, die Signale wurden mit α -Tubulin normalisiert und relativ zur Kontrolle (MetOH) exprimiert.

Wie erwartet, wurde die DHA-induzierte HO-1-Expression durch NAC aufgrund der antioxidativen Wirkung unterdrückt (**Abb. 11A,B**). NAC ist die acetylierte Form von L-Cystein und des reduzierten Glutathion. Es inhibiert unter anderem die Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinase, der p38 MAP-Kinase und NfκB Transkriptionsfaktor-Aktivitäten, die die Expression verschiedener Gene regulieren. Durch ihre reduzierende Aktivität modifiziert NAC direkt die Aktivität verschiedener Proteine.⁸⁹ Durch die Inkubation mit NAC konnte die Vermutung, dass DHA durch die Induktion der ROS-Bildung die HO-1 Expression induzieren kann, bestärkt werden.

Trolox, das wasserlösliche Vitamin E-Derivat, ist als Antioxidans bestens bekannt. Der Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC) Assay wird eingesetzt, um die antioxidative Kapazität einer Probe (meist Nahrungsmittel) zu untersuchen. Der Assay basiert auf der Suppression von absorbierten Radikal-Kationen von 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) (ABTS), durch die in den Proben vorhandenen Antioxidantien, bei Inkubation von ABTS mit Peroxydase und H₂O₂.^{90,91} Wie jedoch publiziert, hat Trolox nicht nur antioxidative Effekte, sondern unter bestimmten Umständen auch pro-oxidative Effekte. In Anwesenheit freier Übergangsmetalle wie Cr(VI), bildet Trolox Hydroxyl-Radikale in einer Fenton-ähnlichen Reaktion.⁹² Ein potenter Eisen-Chelator konnte die prooxidativen Effekte von Trolox unterdrücken. Eine mögliche Beteiligung von Eisenchelation in der prooxidativen Wirkung von Trolox in Eisenionen-stimulierten Lipidperoxidationsreaktionen ist nicht auszuschließen.⁹³ In Anwesenheit von Arsentrioxid konnte eine Trolox-induzierte HO-1 nachgewiesen werden.⁹⁴

Grund für die Trolox-induzierte HO-1 Expression könnte die prooxidativen Effekte unter verschiedenen Bedingungen sein. Vermutlich hat man auch eine zu hohe Konzentration von Trolox eingesetzt, da bekannt ist, dass hohe Dosen antioxidativ wirkender Substanzen auch pro-oxidative Wirkungen zeigen können.⁹⁵ Um herauszufinden, warum Trolox die HO-1 in hASMC wirklich induziert, müsste man noch weitere Experimente durchführen.

4.11 Die Rolle von NADPH-Oxidase und COX in DHA induzierter HO-1 Expression

In mit 120 μM DHA behandelten Zellen und Co-Inkubation mit 10 μM VAS (NADPH-Oxidase Inhibitor) kam es zu einem deutlichen Anstieg der HO-1 Protein-Expression. Indomethacin (COX-Inhibitor) unterdrückte die DHA-induzierte Expression der HO-1 (**Abb. 12A,B**). Die HO-1 Expression konnte durch Co-Inkubation mit 10 μM VAS auch in den Kontrollzellen (EtOH) induziert werden. Durch die Behandlung mit 20 μM und 40 μM VAS konnte weder in EtOH- noch in DHA-behandelten Zellen HO-1 Protein detektiert werden (**Abb. 12C,D**).

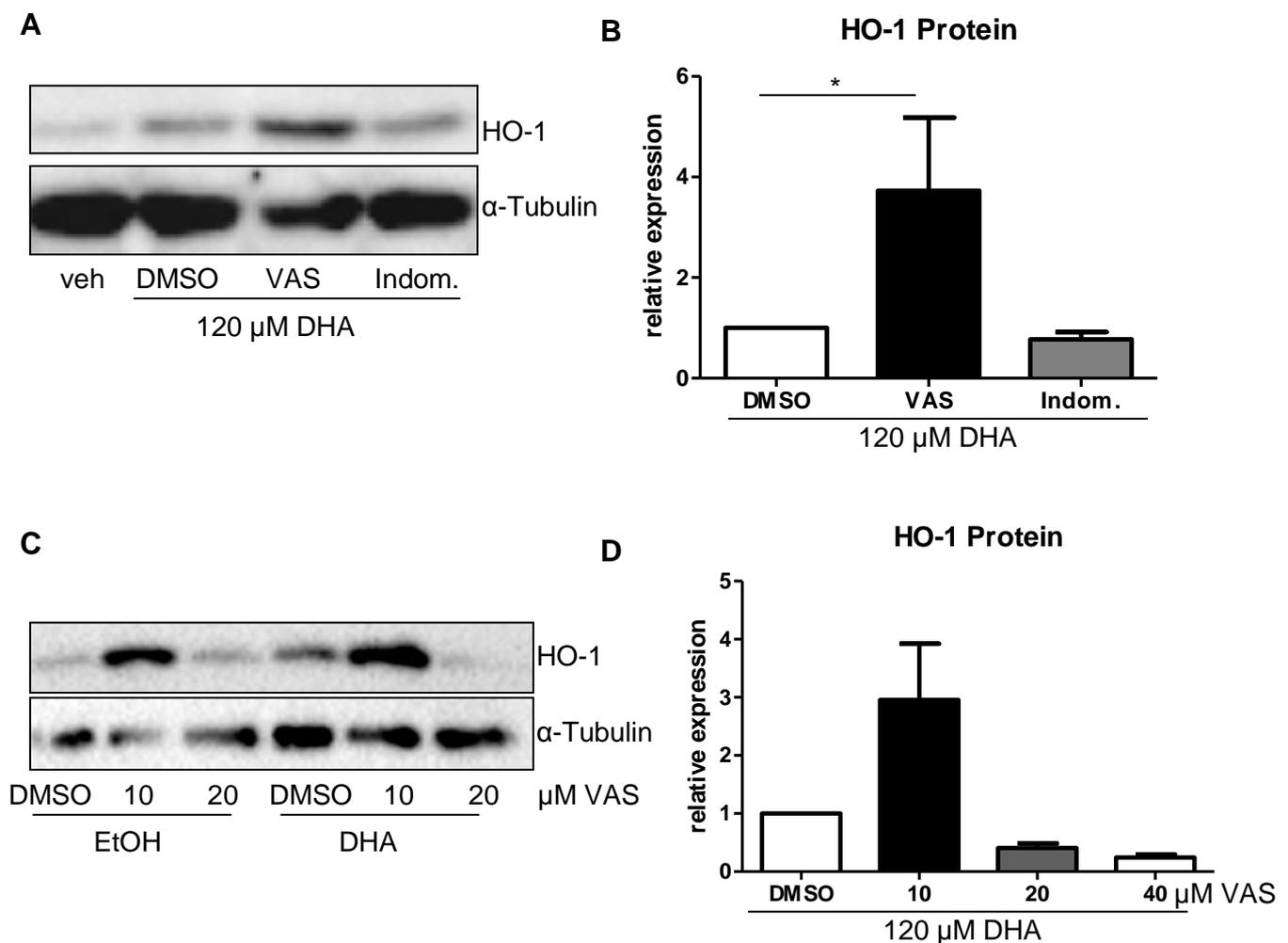


Abbildung 12. Genregulation der HO-1

hASMC wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit 10 μM - 40 μM VAS bzw. 10 μM Indomethacin oder Kontrolle (DMSO) für 1 h und anschließend mit 120 μM DHA oder EtOH (veh) in An- oder Abwesenheit von VAS bzw. Indomethacin für 4 h behandelt. (**A,C**) Repräsentativer Westernblot für die Darstellung der HO-1 Proteinexpression. α -Tubulin führte man als Kontrolle mit. (**B,D**) Densitometrische Evaluierung der Westernblot-Daten, die Signale wurden mit α -Tubulin normalisiert und mit der Kontrolle (DMSO) verglichen.

Das Enzym NADPH-Oxidase (NOX) katalysiert die Produktion von Superoxid (O_2^-) durch Sauerstoff und Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH) nach der Reaktion $[2 O_2 + NADPH \rightarrow H^+ + 2 O_2^-]$. Die NADPH Oxidase wird unter anderem in professionellen Phagozyten, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen gefunden.⁹⁶ Die häufigste NOX-Isoform in Menschen ist NOX4, mit einer hohen Expression in Endothelzellen und VSMC. Die Expression von beispielsweise NOX1 ist in humanen VSMC vom Gefäßtyp abhängig. In humanen renalen Arterien wurde NOX1 nicht gefunden, jedoch in humanen Aorta-SMC.⁹⁷

Die Cyclooxygenase (COX) ist das Schlüsselenzym, das für die Umwandlung der Arachidonsäure zu Prostaglandinen benötigt wird. Zwei COX-Isoformen (COX-1 und COX-2) sind bekannt, wobei das COX-1 Enzym konstitutiv exprimiert wird und COX-2 die induzierbare Form darstellt.⁹⁸ Weil DHA sowohl die Cyclooxygenase, die als Nebenprodukt die Superoxid-Radikale produziert, als auch die NADPH-Oxidase aktiviert, vermutete man, dass der NADPH Oxidase-Inhibitor VAS2870 und der Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin die Induktion der HO-1 Genexpression erniedrigen.^{99,100} Wie jedoch schon untersucht wurde, können auch NOX-Inhibitoren die HO-1 Expression induzieren. Wijayanti et. al konnte beweisen, dass der NOX-Inhibitor 4-(2-Aminoethyl) Benzenesulfonyl Fluoride (AEBSF) die HO-1 aktiviert.¹⁰¹

Auch die Behandlung der hASMC mit VAS2870 zeigte einen unerwarteten Anstieg der HO-1 Expression. Nicht nur in DHA-behandelten Zellen, sondern auch in Kontrollzellen (EtOH) wurde die HO-1 Expression durch 10 μ M VAS induziert (**Abb. 12C**). Warum die HO-1 mit 10 μ M VAS induziert wird, jedoch mit höheren Konzentrationen an VAS wiederum unterdrückt wird, lässt sich nur vermuten. Eventuell überträgt bei höheren VAS-Konzentrationen die inhibitorische Wirkung auf die NADPH-Oxidase, wobei dadurch auch der Signalweg für die Induktion durch VAS unterdrückt wird. Um zu untersuchen, über welchen Signalweg die HO-1 durch VAS2870 überhaupt induziert wird, müsste man noch weitere Experimente durchführen. Der PI3K/PKB Signalweg spielt beispielsweise eine entscheidende Rolle in der AEBSF-abhängigen Aktivierung der HO-1 Genexpression.¹⁰¹

Zum Vergleich wurde auch die HO-1 Genexpression in DHA-behandelten Zellen mit Co-Inkubation von Indomethacin untersucht. Es konnte kein Einfluss auf die HO-1 Expression durch Indomethacin in DHA-behandelten Zellen festgestellt werden

(**Abb. 12A,B**). Die protektiven biologischen Aktivitäten der HO-1 beinhalten antioxidative, anti-apoptotische und pro-angiogene Eigenschaften. Die HO-1 hat aber auch anti-inflammatorische Wirkungen.⁴¹ Der Einfluss von COX-2 auf die Regulierung der HO-1 Expression ist von großer physiologischer Bedeutung. Gloria et al. zeigten eine Assoziation der Inhibierung von COX mit einer reduzierten HO-1 Expression unter hypoxischen Bedingungen.¹⁰² Der positive Effekt von Indomethacin scheint in der Regulierung der Chemokine-Produktion involviert zu sein.¹⁰² COX könnte vermutlich den Stimulus für die HO-1 Expression darstellen.¹⁰²

4.12 Calcium ist bei der DHA-induzierten HO-1 Expression beteiligt

Da der Mechanismus der DHA-induzierten ROS-Bildung noch nicht vollständig geklärt ist, wurde auch der Einfluss vom Calcium-Chelator 1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane *N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA) auf die Regulierung der HO-1 in DHA-behandelten Zellen untersucht. hASMC wurden hierfür mit 100 μ M DHA inkubiert. Durch Co-Inkubation mit 5 μ M BAPTA zeigte sich eine verminderte HO-1 Proteinexpression sowohl in den Kontrollzellen (EtOH), als auch in DHA-behandelten Zellen (**Abb. 13A,B**).

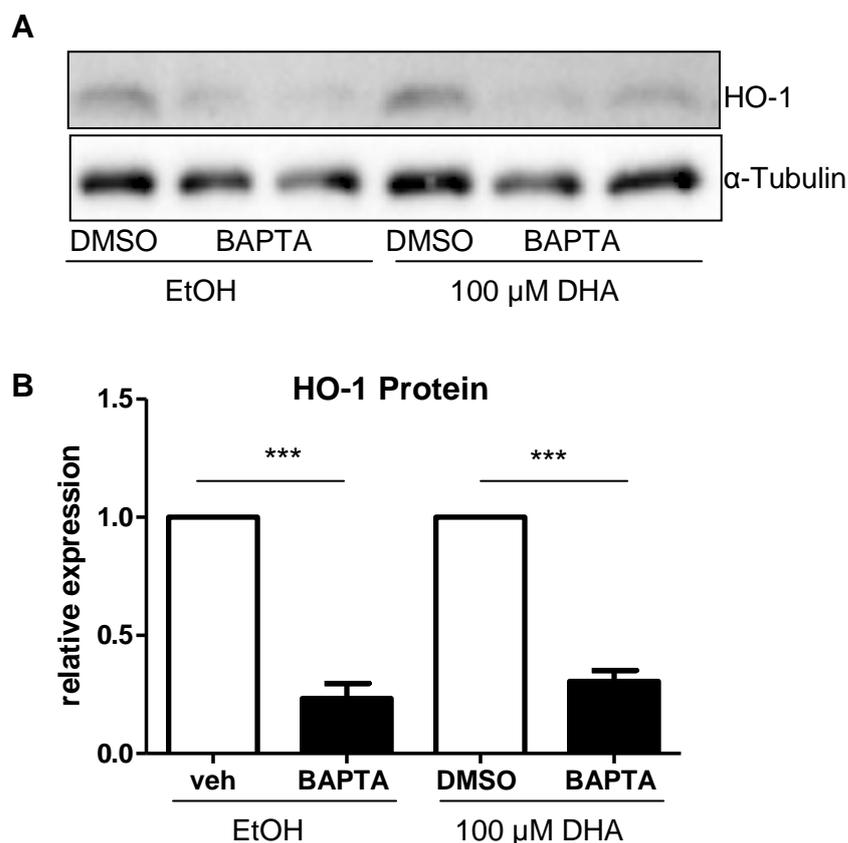


Abbildung 13: BAPTA verringert die HO-1 Expression in DHA-behandelten Zellen

hASMC wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit 5 μ M BAPTA oder Kontrolle (DMSO) für 1 h und anschließend mit 100 μ M DHA oder EtOH (veh) in An- oder Abwesenheit von BAPTA für 4 h behandelt. **(A)** Repräsentativer Westernblot für die Darstellung der HO-1 Proteinexpression. α -Tubulin führte man als Kontrolle mit. **(B)** Densitometrische Evaluierung der Westernblot-Daten, die Signale wurden mit α -Tubulin normalisiert und mit der Kontrolle (- Inhibitor) verglichen.

BAPTA ist ein intrazellulärer Calcium-Chelator und reduziert durch die Calcium-Bindung die Konzentration an freiem Calcium in der Zelle. PUFAs lösen in Thymozyten eine Freisetzung von Calcium aus dem ER aus, dies setzt wiederum ROS aus Mitochondrien frei und führt in weiterer Folge zum Zelltod. BAPTA schützt die Zelle dadurch auch vor dem ROS-Anstieg.¹⁰³ Es ist bekannt, dass die Calcium-Freisetzung aus dem ER die ROS-Bildung nach einer PUFA-Behandlung erhöht und dass der Zelltod, ausgelöst durch PUFA, durch die Anwesenheit von BAPTA unterdrückt wird.¹⁰³ BAPTA könnte also die Bildung von ROS durch die Calcium-Bindung abschwächen und somit auch die HO-1 Expression erniedrigen. Einige Experimente ergaben, dass ROS die Freisetzung von intrazellulärem Calcium induziert.¹⁰⁵ Andere Experimente zeigten wiederum, dass bei post-ischämischen Gewebsschäden durch erhöhtes zytosolisches Calcium eine Überproduktion freier Radikale stattfand.¹⁰⁴ Ob nun Calcium-Überschuss die Bildung von oxidativem Stress induziert, oder ob oxidativer Stress einen Calcium-Überschuss auslöst, ist noch nicht gänzlich geklärt. Tatsache ist jedoch, dass verschiedene Calcium-Blocker die Lipid-Peroxidation inhibierten und die ROS-Bildung dadurch verhindern.¹⁰⁵ Jüngste Daten unserer Gruppe zeigen, dass die ROS-Bildung durch Co-Inkubation DHA-behandelter Zellen mit BAPTA stark erniedrigt wurde.⁷⁷ Es konnte gezeigt werden, dass DHA-induzierte ROS-Bildung sowohl von der intrazellulären Calcium-Freisetzung, als auch vom extrazellulären Calcium-Einstrom abhängt.⁷⁷ Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Inhibierung vom Calcium-Einlass in die Mitochondrien die ROS-Bildung in DHA-behandelten Zellen erniedrigt.⁷⁷ Zusammenfassend, DHA induzierter, Calcium-abhängiger ROS-Anstieg ist verantwortlich für die Induktion der HO-1 Expression in DHA-behandelten Zellen.

4.13 Die Rolle der PI3K/AKT und MAPK/ERK Signalwege für die DHA-abhängige Aktivierung der HO-1 Genexpression

Um die Rolle verschiedener Signalwege für die DHA-abhängige Induktion der HO-1 Expression untersuchen zu können, wurden verschiedene pharmakologische Inhibitoren eingesetzt. Die Hochregulation der HO-1 Expression durch DHA konnte durch die Co-Behandlung mit dem Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Inhibitor Wortmannin und dem "Mitogen-activated Protein Kinase Kinase" (MEK)-Inhibitor PD98059 signifikant reduziert werden (**Abb. 14A,B**). Auch der PI3K-Inhibitor LY294003 konnte die HO-1 Expression etwas verringern, jedoch nicht signifikant. Der p38-Inhibitor SB203580 und der c-Jun N-terminale Kinase II (JNK II)-Inhibitor bewirkten keine Veränderung in der HO-1 Protein-Expression (**Abb. 14A,B**).

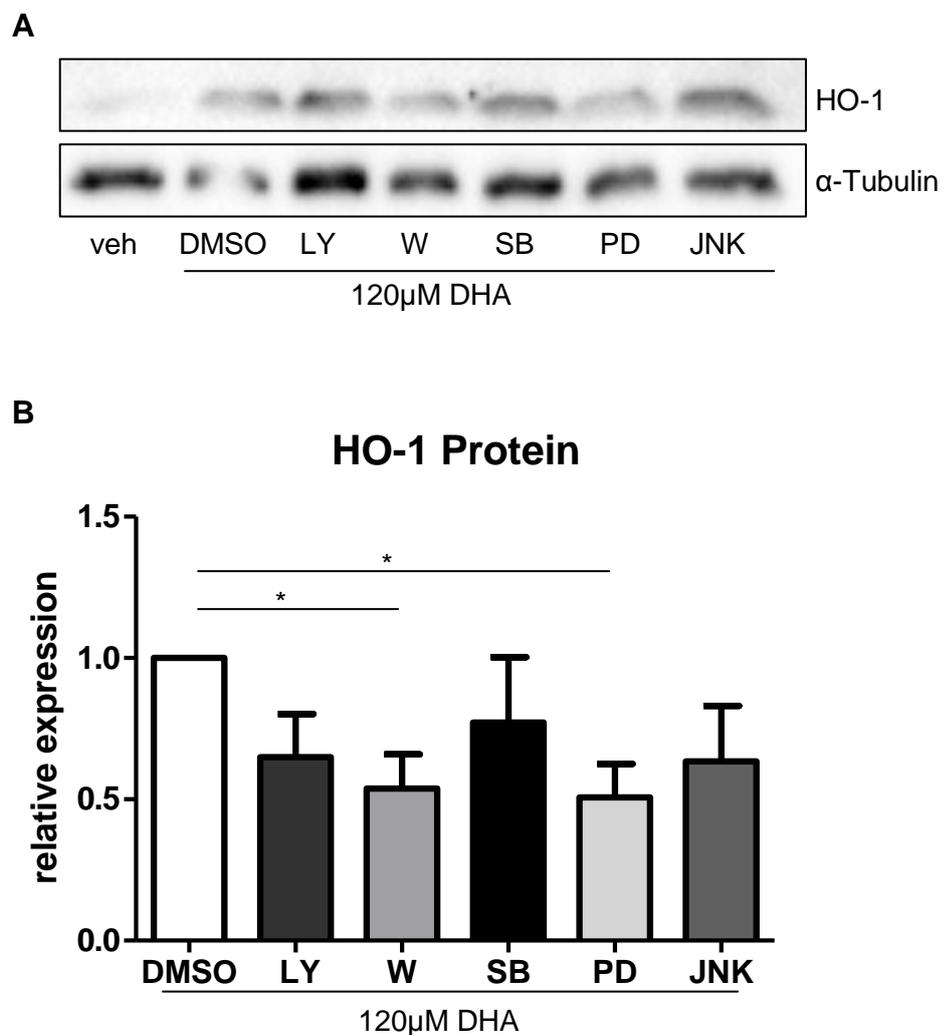


Abbildung 14: Wortmannin und PD 98059 reduzieren die DHA-induzierte HO-1 Expression

hASMC wurden wie in Abbildung 1 beschrieben, über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit 10 μ M LY294002, 1 μ M Wortmannin (W), 10 μ M SB203580, PD98059, JNK II-Inhibitor oder Kontrolle (DMSO) für 1 h inkubiert und anschließend mit 120 μ M DHA oder EtOH (veh) in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren für 4 h behandelt. **(A)** Repräsentativer Westernblot für die Darstellung der HO-1 Proteinexpression. α -Tubulin führte man als Kontrolle mit. **(B)** Densitometrische Evaluierung der Westernblot-Daten, die Signale wurden mit α -Tubulin normalisiert und mit der Kontrolle (- Inhibitor) verglichen.

Die Signalmechanismen für die Aktivierung der HO-1 Transkription sind nicht geklärt. Die meisten Studien fokussierten sich auf die Aktivierung der MAP-Kinasen. In Säugern gibt es 3 verschiedenen MAPK-Signalwege, die ERK, JNK und p38 aktivieren. Alle drei Signalwege scheinen in der Regulation der HO-1 Expression beteiligt zu sein. Arsenit induziert HO-1 beispielsweise über den ERK und p38 Signalweg in Huhn-Hepatomzellen.¹⁰⁶ In Ratten-Hepatozyten wird die Natriumarsenit-induzierte HO-1 Expression wiederum über den Ras und JNK Weg induziert.¹⁰⁷ Ischämische Reperfusion in der Lunge aktiviert die HO-1 über JNK und p38.¹⁰⁸ Wie DHA hat auch die Ölsäure (OA) anti-atherosklerotische Effekte, die vermutlich mit der Induktion der HO-1 zusammenhängen. Feng et. al zeigten, dass die HO-1 Expression in Ratten-VSMCs durch OA erhöht werden kann.¹⁰⁹ Außerdem bewiesen sie, dass die Aktivierung von Akt und ERK für eine OA-induzierte Aktivierung von Nrf2 und in weiterer Folge für die HO-1 Induktion benötigt wird.¹⁰⁹ Basierend auf die bereits erwähnten publizierten und auch unseren Daten scheint die unterschiedliche Beteiligung der Signalwege an HO-1 Induktion vom Stimulus und Zelltypus abhängig zu sein.

5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der HO-1-Induktion durch die ω -3-Fettsäure DHA in hPASMC und hASMC untersucht. Die Erkenntnisse dieser Masterarbeit sind:

- Die Hämoxxygenase-1 Expression wird durch DHA in hPASMC und hASMC in Abhängigkeit der Inkubationsdauer und der Konzentration induziert.
- Die ROS-Bildung induziert HO-1 Expression in DHA-behandelten hPASMC und hASMC unter Beteiligung des oxidativen Stress-induzierten Transkriptionsfaktor Nrf2 und der PI3K/Akt- und MAPK/ERK- Signalwege (in hASMC).

Um die positiven Effekte der DHA-vermittelten HO-1 Induktion auf kardiovaskuläre Erkrankungen und PAH beziehen zu können, müssen die Vorgänge und Signalwege von der DHA-Behandlung der Zellen bis zur HO-1 Induktion genau begriffen werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnte HO-1 ein therapeutisches Ziel für die Vorsorge und Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen darstellen und die positiven Wirkungen von DHA erklären.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Auswirkung der ansteigenden DHA-Konzentration auf die HO-1 Expression in hPASMC	36
Abbildung 2. Auswirkung einer ansteigenden Dauer der DHA-Inkubation auf HO-1 Expression in hPASMC	37
Abbildung 3. HO-2 Expression wird durch DHA nicht beeinflusst.....	38
Abbildung 4. Die metabolische Aktivität in hPASMC wird von DHA nicht beeinflusst	39
Abbildung 5. Tempol verringert die DHA-vermittelte Induktion von HO-1.....	40
Abbildung 6. Nrf2 Silencing schwächt die DHA-induzierte HO-1 Expression in hPASMC.....	43
Abbildung 7. DHA induziert die HO-1 Expression in hASMC	44
Abbildung 8. Nrf2 Silencing schwächt die DHA-induzierte HO-1 Expression in hASMC.....	46
Abbildung 9. DHA induziert oxidativen Stress	47
Abbildung 10. Auswirkung von SOD und SOD-Inhibitor in DHA-behandelten hASMC auf die HO-1 Expression.....	50
Abbildung 11. Auswirkung der Antioxidantien Trolox und NAC auf die HO-1 Expression in DHA-behandelten hASMC	51
Abbildung 12. Genregulation der HO-1	53
Abbildung 13: BAPTA verringert die HO-1 Expression in DHA-behandelten Zellen	56
Abbildung 14: Wortmannin und PD 98059 reduzieren die DHA-induzierte HO-1 Expression.....	58

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokoll für die Herstellung eines 10% SDS-Gels	27
---	----

8 Referenzen

-
- ¹ Stuart T. Fraser, R.G. Midwinter, B.S. Berger, R. Stocker. *Heme Oxygenase-1: A Critical Link between Iron Metabolism, Erythropoiesis, and Development*. *Advances in Hematology*. 2011. 473709. 6
- ² S. Shibahara, M. Sato, R.M. Muller, T. Yoshida. *Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter*. *Eur J Biochem*. 1989. 179: 557–563
- ³ Chau Chinpan Chen, R. Shieh, L. Chou, C. Suen, M. Hwang, H. Hwang, J. Lee, Kuan-Yu. *Endoplasmic Reticulum and Function of Heme Oxygenase-1 in the Oligomerization Is Crucial for the Stability*. *J. Biol. Chem*. 2009. 284: 22672-22679
- ⁴ Tadashi Yoshida, P. Biro, T. Cohen, R.M. Muller, S. Shibahara. *Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin*. *Eur. J. Biochem*. 1988. 171: 457-461
- ⁵ Q. Lin, S. Weis, G. Yang, Y.H. Weng, R. Helston, K. Rish, A. Smith, J. Bordner, T. Polte, F. Gaunitz, P.A. Dennerly. *Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress*. *J. Biol. Chem*. 2007. 282: 20621–20633
- ⁶ D.P. Converso, C. Taille, M.C. Carreras, A. Jaitovich, J.J. Poderoso, J. Boczkowski. *HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism*. *FASEB J*. 2006. 20: 1236–1238
- ⁷ H.P. Kim, X. Wang, F. Galbiati, S.W. Ryter, A.M. Choi. *Caveolae compartmentalization of hemeoxygenase-1 in endothelial cells*. *FASEB J*. 2004. 18: 1080–1089
- ⁸ G. Kovtunovych, M.A. Eckhaus, M.C. Ghosh, H. Ollivierre-Wilson, T.A. Rouault. *Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution*. *Blood*. 2010. 116(26): 6054–6062
- ⁹ Meng-Ling Wu, Y. Ho, C. Lin, S. Yet. *Heme oxygenase-1 in inflammation and cardiovascular disease*. *Am J Cardiovasc Dis*. 2011. 1(2): 150-158
- ¹⁰ Danielle Morse, L. Lin, A.M.K. Choi, S.W. Ryter. *Heme Oxygenase-1, a Critical Arbitrator of Cell Death Pathways in Lung Injury and Disease*. *Free Radic Biol Med*. 2009. 47(1): 1–12
- ¹¹ Anatoliy Kravets, Z. Hu, T. Miralem, M.D. Torno, M.D. Maines. *Biliverdin Reductase, a Novel Regulator for Induction of Activating Transcription Factor-2 and Heme Oxygenase-1*. *J. Biol. Chem*. 2004. 279: 19916-19923
- ¹² Inamdar NM, Ahn YI, Alam J. *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*. 1996. 221: 570–576
- ¹³ J. Sun, H. Hoshino, K. Takaku, O. Nakajima, A. Muto, H. Suzuki, S. Tashiro, S. Takahashi, S. Shibahara, J. Alam, M.M. Taketo, M. Yamamoto, K. Igarashi. *Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene*. *EMBO J*. 2002. 21: 5216–5224

-
- ¹⁴ Sandile E.J, Williams et al. *Hemoxygenase-2 Is an Oxygen Sensor for a Calcium-Sensitive Potassium Channel*. Science. 2004. 306: 2093
- ¹⁵ I. Cruse, M.D. Maines. *Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes*. Journal of Biological Chemistry 1988. 263(7): 3348–3353
- ¹⁶ N. G. Abraham, A.K. *Pharmacological and Clinical Aspects of Heme Oxygenase*. Pharmacol Rev. 2008. 60: 79-127
- ¹⁷ Raymond F Regan, J. Chen, L. Benvenisti-Zarom. *Heme oxygenase-2 gene deletion attenuates oxidative stress in neurons exposed to extracellular hemin*. BMC Neuroscience. 2004. 5: 34
- ¹⁸W.K. McCoubrey, T.J. Huang, M.D. Maines. *Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3*. Eur J Biochem. 1997. 247: 725–732
- ¹⁹ S. Hayashi, Y. Omata, H. Sakamoto, Y. Higashimoto, T. Hara, Y. Sagara, M. Noguchi. *Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene*. 2004. 336(2): 241-50
- ²⁰ S.W. Ryter, J.A., A.M.K. Choi. *Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications*. Physiol Rev. 2006. 86: 583–650
- ²¹ Roland Stocker, A. Mark, Perrella. *Heme Oxygenase-1: A Novel Drug Target for Atherosclerotic Diseases?* Circulation. 2006. 114: 2178-2189
- ²² James E. Clark, R. Foresti, C.J. Green, R. Motterlini. *Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress*. Biochem. J. 2000. 348: 615-619
- ²³ Johan Fevery. *Bilirubin in clinical practice: a review*. Liver International. 2008. 592-605
- ²⁴ J. Donald Ostrow, P. Mukerjee, C Tiribellis. *Structure and binding of unconjugated bilirubin: relevance for physiological and pathophysiological function*. Journal of Lipid Research. 1994. 35: 1715-1737
- ²⁵ R. Stocker, Y. Yamamoto, A.F. Mc Donagh, A.N. Glazer, B.N. Ames, *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science. 1987. 235: 1043–1046
- ²⁶ Maria L. Tomaro, Alcira M. del C. Batlle. *Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2002. 34: 216–220
- ²⁷ Sylvain Dore, M. Takahashi, C.D. Ferris, L.D. Hester, D. Guastella, S.H. Snyder. *Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress*. injury.Proc. Natl. Acad. Sci. 1999. 96: 2445-2450
- ²⁸ Robert Öllinger, M. Bilban, A. Erat, A. Froio, J. McDaid, S. Tyagi, E. Csizmadia, A.V. Graça-Souza, A. Liloia, M.P. Soares, L.E. Otterbein, A. Sheva, K. Yamashita, F.H. Bach. *Bilirubin: A Natural Inhibitor of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation*. Circulation. 2005. 112: 1030-1039
- ²⁹ Robert Öllinger, K. Yamashita, M. Bilban, A. Erat, P. Kogler, M. Thomas, E. Csizmadia, A. Usheva, R. Margreiter, F.H. Bach. *Bilirubin and Biliverdin Treatment of Atherosclerotic Diseases*. Cell Cycle. 2007. 6(1): 39-43

-
- ³⁰ Enika Nagababu, J.M. Rifkind. *Heme Degradation by Reactive Oxygen Species*. Antioxidants & Redox Signaling. 2004. 6: 967-978
- ³¹ P.M. Harrison, P. Arosio. *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochim Biophys. Acta. 1996. 1275: 161–203
- ³² Wei Wang, M. Knovich, L.G. Coffman, F.M. Torti, S.V. Torti. *Serum Ferritin: Past, Present and Future*. Biochim Biophys Acta. 2010. 1800(8): 760–769
- ³³ Mark B. Juckett, J. Balla, G. Balla, J. Jessurun, H.S. Jacob, G.M. Vercellotti. *Ferritin Protects Endothelial Cells from Oxidized Low Density Lipoprotein in Vitro*. Am J Pathol. 1995. 147: 782-789
- ³⁴ J. Balla, G. Balla; V. Jeney, G. Kakuk, H.S. Jacob, G.M. Vercellotti. *Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword - promotion of oxidation and induction of cytoprotectants*. Blood. 2000. 95: 3442–3450
- ³⁵ György Balla, H.S. Jacob, J. Balla, M. Rosenberg, K. Nath, F. Apple, J.W. Eaton, G.M. Vercellotti. *Ferritin: A Cytoprotective Antioxidant Strategem of Endothelium*. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 297(25): 18148-18153
- ³⁶ H.J. Duckers, M.B., A.L. True, S. Yet, H. San, J.L. Park, R.C. Webb, M. Lee, G.J. Nabel, E.G. Nabel. *Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation*. Nature Medicine. 2001. 7: 693-698
- ³⁷ M. Matsumi, T.T., H. Fujii, I. Ohashi, R. Kaku, H. Nakatsuka, H. Shimizu, K. Morita, M. Hirakawa, M. Inagaki, H. Sadamori, T. Yagi, N. Tanaka, R. Akagi. *Increased Heme Oxygenase-1 Gene Expression in the Livers of Patients with Portal Hypertension due to Severe Hepatic Cirrhosis*. The Journal of International Medical Research. 2002. 30: 282-288
- ³⁸ R. Song, R.S.M., F. Liu, W. Ning, L. E. Otterbein, A. M. K. Choi. *Carbon Monoxide Inhibits Human Airway Smooth Muscle Cell Proliferation via Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2002. 27: 603-610
- ³⁹ S.J. Stanford, M.J. Walters, A.A. Hislop et al. *Heme oxygenase is expressed in human pulmonary artery smooth muscle where carbon monoxide has an anti-proliferative role*. European Journal of Pharmacology. 2003. 473(2-3): 135–141
- ⁴⁰ Cláudia SF Queiroga, A.S Almeida, P.M Alves, C. Brenner, H.LA Vieira. *Carbon monoxide prevents hepatic mitochondrial membrane permeabilization*. BMC Cell Biology. 2011. 12: 10
- ⁴¹ K.H. Chan, M.K.C. NG, R. Stocker. *Heme Oxygenase-1 and Cardiovascular Disease: Mechanism and Therapeutic Potential*. Clinical Science Rev. 2011. 120: 493-504
- ⁴² Jessy Deshane, Marcienne Wright and Anupam Agarwal. *Heme oxygenase-1 expression in disease states*. Acta Biochimica Polonica. 2005. 52: 273–284
- ⁴³ Aldons J. Lusis. *Atherosclerosis*. Nature. 2000. 407(6801): 233–241
- ⁴⁴ Shu-Hui Juan, T.L., K. Tseng, J. Liou, S. Shyue, K. Wu, L. Chau. *Adenovirus-Mediated Heme Oxygenase-1 Gene Transfer Inhibits the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice*. Circulation. 2001. 104: 1519-1525

-
- ⁴⁵ H.A. Schwertner, W.G. Jackson, G. Tolan. *Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease*. Clin Chem. 1994. 40: 18–23
- ⁴⁶ J. Deshane, S. Chen, S. Caballero, A. Grochot-Przeczek, H. Was, S.L. Calzi, R. Lach, T. Hock, B. Chen, N. Hill-Kapturczak, et al. *Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism*. J. Exp. Med. 2007. 204: 605–618
- ⁴⁷ J. Lin, L. Vitek, H. Schwertner. *Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentrations as biomarkers for cardiovascular disease*. Clin. Chem. 2010. 56: 1535–1543
- ⁴⁸ H. Kimm, J. Yun, J. Jo, S. Jee. *Low serum bilirubin level as an independent predictor of stroke incidence: a prospective study in Korean men and women*. Stroke. 2009. 40: 3422–3427
- ⁴⁹ D. Erdogan, H. Gullu, E. Yildirim, D. Tok, I. Kirbas, O. Ciftci, S. Baycan, H. Muderrisoglu. *Low serum bilirubin levels are independently and inversely related to impaired flow-mediated vasodilation and increased carotid intima-media thickness in both men and women*. Atherosclerosis. 2006. 184: 431–437
- ⁵⁰ B. Bussolati, J.M., *Dual Role of VEGF-Induced Heme-Oxygenase-1 in Angiogenesis*. Antioxid. Redox Signal. 2006. 8: 1153-1163
- ⁵¹ P. Sawle, R.F., B. Mann, T. Johnson, C. Green, R. Motterlini. *Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages*. British Journal of Pharmacology. 2005. 145: 800-810
- ⁵² L. Otterbein, F.B., J. Alam, M. Soares, H. Lu, M. Wysk, R. Davis, R. Flavell, A. Choi. *Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway*. Nature Medicine. 2000. 6: 422-428
- ⁵³ Vallerie V. McLaughlin, S.L. Archer, D.B. Badesch, R.J. Barst, H.W. Farber, J.R. Lindner, M.A. Mathier, M.D. McGoon, M.H. Park, R.S. Rosenson, L.J. Rubin, V.F. Tapson, J.Varga. *ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association*. JACC. 2009. 53(17): 1573–1619
- ⁵⁴ David G Kiely, C.A. Elliot, I. Sabroe, R. Condliffe. *Pulmonary hypertension: diagnosis and management*. BMJ. 2013. 346: f2028. 1-12
- ⁵⁵ Gérald Simonneau, I.M. Robbins, M. Beghetti, R.N. Channick, M. Delcroix, C.P. Denton, C.G. Elliott, S.P. Gaine, M.T. Gladwin, Z.-C. Jing, M.J. Krowka, D. Langleben, N. Nakanishi, R. Souza. *Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension*. JACC. 2009. 54(1): 43–54
- ⁵⁶ Helen Christou, T. Morita, C-M. Hsieh, H. Koike, B. Arkonac, M.A. Perrella, S. Kourembanas. *Prevention of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension by Enhancement of Endogenous Heme Oxygenase-1 in the Rat*. Circ Res. 2000. 86: 1224-1229
- ⁵⁷ Tohru Minamino, H. Christou, C-M. Hsieh, Y. Liu, V. Dhawan, N.G. Abraham, M.A. Perrella, S.A. Mitsialis, S. Kourembanas. *Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia*. PNAS. 2001. 98(15): 8798-8803

-
- ⁵⁸ S.J. Stanford. *Heme oxygenase is expressed in human pulmonary artery smooth muscle where carbon monoxide has an anti-proliferative role*. European Journal of Pharmacology. 2003. 473: 135-141
- ⁵⁹ Laura E. Fredenburgh, M.A. Perrella, S.A. Mitsialis. *The Role of Heme Oxygenase-1 in Pulmonary Disease*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007. 36: 158–165
- ⁶⁰ Xiao-ming Liu, K.J. Peyton, D. Ensenat, H. Wang, A.I. Schafer, J. Alam, W. Durante. *Endoplasmic Reticulum Stress Stimulates Heme Oxygenase-1 Gene Expression in Vascular Smooth Muscle*. The Journal of Biological Chemistry. 2005. 280: 872-877
- ⁶¹ Martina Korfei et al. *Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med. 2008. 178: 838-846
- ⁶² Hyoung Chul Choi, K.Y. Lee, D.H. Lee, Y.J. Kang. *Heme Oxygenase-1 Induced by Aprotinin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Through Cell Cycle Arrest in Hypertensive Rats*. Korean J Physiol Pharmacol. 2009. 13: 309-313
- ⁶³ Kelly J. Peyton, S.V. Reyna, G.B. Chapman, D. Ensenat, X-m. Liu, H. Wang, A.I. Schafer, W. Durante. *Heme oxygenase-1–derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth*. BLOOD. 2002. 99: 4443-4448
- ⁶⁴ Xiao-ming Liu, G.B. Chapman, H. Wang, W. Durante. *Adenovirus-Mediated Heme Oxygenase-1 Gene Expression Stimulates Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells*. Circulation. 2002. 105: 79-84
- ⁶⁵ M. Massaro, E. Scoditti, M.A. Carluccio, M.R. Montinari, R. De Caterina. *Omega-3 Fatty Acids, Inflammation and Angiogenesis: Nutrigenomic Effects as an Explanation for Anti-Atherogenic and Anti-Inflammatory Effects of Fish and Fish Oils*. J. Nutrigenet Nutrigenomics. 2008. 1: 4-23
- ⁶⁶ Kris-Etherton, P.M. *Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003. 23: 20-31
- ⁶⁷ Breanne M Anderson, D. WL. *Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal?* Lipids in Health and Disease. 2009. 8: 33
- ⁶⁸ Philip C. Calder. *Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes*. Nutrients. 2010. 2: 355-374
- ⁶⁹ Clemens von Schacky, W.S. Harris. *Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids*. Cardiovascular Research. 2007. 73: 310 – 315
- ⁷⁰ M.C. Morris, F. Sacks, B. Rosner. *Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials*. Circulation. 1993. 88: 523–533
- ⁷¹ Valery N. Bochkov, O.V. Oskolkova, K.G. Birukov, A-L. Levonen, C.J. Binder, J. Stöckl. *Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids*. Antioxidants & Redox Signaling. 2010. 12(8): 1009-1059
- ⁷² Sònia Roig-Pérez, F. Guardiola, M. Moretó, R. Ferrer. *Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine*. Journal of Lipid Research. 2004. 45: 1418-1428
- ⁷³ Aimee Landar, J.W. Zmijewski, D.A. Dickinson, C. Le Goffe, M.S. Johnson, G.L. Milne, G. Zaroni, G. Vidari, J.D. Morrow, V.M. Darley-Usmar. *Interaction of*

electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and formation of reactive oxygen species. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006. 290: H1777–H1787

⁷⁴ Susanna C Larsson, M. Kumlin, M. Ingelman-Sundberg A. Wolk. *Dietary long-chain n.3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms.* Am J. Clin Nutr. 2004. 79: 935–45

⁷⁵ Virginie Aires, A. Hichami, R Filomenko, A. Plé, C. Rébé, A. Bettaieb, N.A. Khan. *Docosahexaenoic Acid Induces Increases in $[Ca^{2+}]_i$ via Inositol 1,4,5-Triphosphate Production and Activates Protein Kinase $C\gamma$ and δ via Phosphatidylserine Binding Site: Implication in Apoptosis in U937 Cells.* Mol Pharmacol. 2007. 72: 1545–1556

⁷⁶ K. Arita, H. Kobuchi, T. Utsumi, Y. Takehara, J. Akiyama, A.A. Horton, K. Utsumi. *Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids.* Biochem Pharmacol. 2001. 62: 821–828

⁷⁷ Slaven Crnkovic, M. Riederer, M. Lechleitner, S. Hallström, R. Malli, W.F. Graier, J. Lindenmann, H. Popper, H. Olschewski, A. Olschewski, S. Frank. *Docosahexaenoic acid-induced unfolded protein response, cell cycle arrest, and apoptosis in vascular smooth muscle cells are triggered by Ca^{2+} -dependent induction of oxidative stress.* Free Radical Biology & Medicine. 2012. 52: 1786–1795

⁷⁸ James E. Klaunig, L.M. Kamendulis, B.A. Hocevar. *Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis.* Toxicologic Pathology. 2010. 38: 96-109

⁷⁹ Lianguo Hou, K. Lian, M. Yao, Y. Shi, X. Lu, L. Fang, T. He, L. Jiang. *Reduction of n-3 PUFAs, specifically DHA and EPA, and enhancement of peroxisomal beta-oxidation in type 2 diabetic rat heart.* Cardiovascular Diabetology. 2012. 11: 126

⁸⁰ Shuai Wang, B.N. Hannafon, J.E. Avery, S.E. Lind, W-Q. Ding. *Docosahexanoic Acid (DHA) increases Heme Oxygenase-1 (HO-1) Expression by Enhancing BTB and CNC Homology 1 (Bach1) Degradation in human Cancer Cells.* Department of Pathology. University of Oklahoma Health Sciences Center [Abstract]

⁸¹ Alison L. Groeger, C. Cipollina, M.P. Cole, S.R. Woodcock, G. Bonacci, T.K. Rudolph, V. Rudolph, B.A. Freeman, F.J. Schopfer. *Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids.* Nat Chem Biol. 2010. 6(6): 433–441

⁸² A. Olschewski, Y. Li, B.T., J.H., B.E., RM. Bohle, et al. *Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells.* Circ Res, 2006. 98(8): 1072-1080

⁸³ Gabriel Stulnig, S. Frank, et al. *The Role of Heme Oxygenase-1 in DHA treated hPASMOC.* Diploma Thesis. 2011

⁸⁴ Prabal K. Chatterjee, S. Cuzzocrea, P.A.J. Brown, K. Zacharowski, K.N. Stewart, H. Mota-Filipe, C. Thiemermann. *Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat.* Kidney International. 2000. 58: 658–673

⁸⁵ Christopher S. Wilcox, A. Pearlman. *Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides.* Pharmacol Rev. 2008. 60(4): 418–469

-
- ⁸⁶ Emilie E. Vomhof-DeKrey, M.J. Picklo Sr. *The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism*. Journal of Nutritional Biochemistry. 2012. 23: 1201–1206
- ⁸⁷ Fatai A. Taiwo. *Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons*. Spectroscopy. 2008. 22: 491–498
- ⁸⁸ Hee Jong Lee, J.K. Suh, H.H. Song, M.A. Jeong, J.H. Yeom, D.W. Kim. *Antioxidant effects of methylprednisolone and hydrocortisone on the impairment of endothelium dependent relaxation induced by reactive oxygen species in rabbit abdominal aorta*. Korean J Anesthesiol. 2013. 64(1): 54-60
- ⁸⁹ M. Zafarullah, L. WQ, J. Sylvester, M. Ahmad. *Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions*. Cell Mol Life Sci. 2003. 60(1): 6-20
- ⁹⁰ Resat Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K.M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü. *Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)*. Pure Appl. Chem. 2013. 85(5): 957–998
- ⁹¹ Chi Chiu Wang, C.Y. Chu, K.O. Chu, K.W. Choy, K.S. Khaw, M.S. Rogers, C.P. Pang. *Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay Versus Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay in Plasma*. Clinical Chemistry. 2004. 50(5): 952-954
- ⁹² Poljsak B, Raspor P. *The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study*. J Appl Toxicol. 2008. 28(2): 183-8
- ⁹³ Ko KM, Y. PK, P. MK, I. SP. *Prooxidant and antioxidant effects of Trolox on ferric ion-induced oxidation of erythrocyte membrane lipids*. Mol Cell Biochem. 1994. 141(1): 65-70
- ⁹⁴ Zuanel Diaz, M. Colombo, K.K. Mann, H. Su, K.N. Smith, D.S. Bohle, H.M. Schipper, W.H. Miller. *Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in APL and other malignant cell lines*. Blood. 2005. 105: 1237-1245
- ⁹⁵ P. Pearson, S.A. Lewis, J. Britton, I.S. Young, A. Fogarty. *The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo*. BioDrugs. 2006. 20(5): 271-3
- ⁹⁶ Bernard M. Barbior. *NADPH Oxidase*. Current Opinion in Immunology. 2004. 16: 42–47
- ⁹⁷ K. Wingler, J. Hermans, P. Schiffers, A. Moens, M. Paul, H. Schmidt. *NOX1,2,4,5: counting out oxidative stress*. British Journal of Pharmacology. 2011. 164: 866–883
- ⁹⁸ Raymond N. Dubois, S.B. Abramson, L. Crofford, R.A. Gupta, L.S. Simon, L.B.A. Van De Putte, P.E. Lipsky. *Cyclooxygenase in biology and disease*. The FASEB Journal. 1998. 12: 1063-1073
- ⁹⁹ Li X, Yu Y, Funk CD. *Cyclooxygenase-2 induction in macrophages is modulated by docosahexaenoic acid via interactions with free fatty acid receptor 4 (FFA4)*. FASEB J. 2013. 13-235333
- ¹⁰⁰ Guey-Shuang Wu, N.A. Rao. *Activation of NADPH Oxidase by Docosahexaenoic Acid Hydroperoxide and Its Inhibition by a Novel Retinal Pigment Epithelial Protein*. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1999. 40(5): 831-839

-
- ¹⁰¹ Nastiti Wijayanti, T. Kietzmann, S. Immenschuh. *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.* The Journal of Biological Chemistry. 2005. 280 (23): 21820–21829
- ¹⁰² Gloria, Cenedeze, Pacheco-Silva, Camara. *The blockade of cyclooxygenases-1 and -2 reduces the effects of hypoxia on endothelial cells.* Braz J Med Biol Res. 2006. 39(9): 1189-1196
- ¹⁰³ Aparna Prasad. *Role of Calcium and ROS in Cell Death Induced by Polyunsaturated Fatty Acids in Murine Thymocytes.* J. Cell. Physiol. 2010. 225: 829-836
- ¹⁰⁴ I. Juránek, Š. Bezek. *Controversy of Free Radical Hypothesis: Reactive Oxygen Species – Cause or Consequence of Tissue Injury?* Gen. Physiol. Biophys. 2005. 24: 263—278
- ¹⁰⁵ Marian Valko, D.L. J. Moncola, M.T. Cronin, M. Mazura, J. Telser. *Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007. 39: 44-84
- ¹⁰⁶ Y. Shan, J. Pepe, T.H. Lu, K.K. Elbirt, R.W. Lambrecht, H.L. Bonkovsky. *Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins.* Arch Biochem Biophys. 2000. 380(2): 219-27
- ¹⁰⁷ T. Kietzmann, A. Samoylenko, S. Immenschuh. *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. 2003. 278(20): 17927-36
- ¹⁰⁸ Daniel Martin, A.I. Rojo, M. Salinas, R. Diaz, G. Gallardo, J. Alam, C.M. Ruiz de Galarreta, A. Cuadrado. *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. 2004. 279: 8919-8929
- ¹⁰⁹ Jian Feng, P. Zhang, X. Chen, G. He. *PI3K and ERK/Nrf2 pathways are involved in oleanolic acid-induced heme oxygenase-1 expression in rat vascular smooth muscle cells.* Journal of Cellular Biochemistry. 2011. 112(6): 1524–1531