



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Einfluss von Schwefelwasserstoff auf die Stabilisierung von
HIF-1 α Protein in THP-1 Makrophagen

Verfasserin

Monika Praschberger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Wien, im Juli 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuer: Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg

*In ungezählten Mühen
wächst das Schöne.*Euripides

Ich möchte mich bei all denjenigen bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Diplomarbeit zur Seite standen. Ganz gleich wie, ohne Euch hätte ich das niemals geschafft.

Besonders bedanken möchte ich mich aber bei meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben.

Mein Dank gilt Herrn Professor Goldenberg, der mir die Möglichkeit gab diese experimentelle Arbeit am Institut für Medizinische Chemie zu verfassen.

Auch bei Frau Dr. Hildegard Laggner möchte ich mich besonders bedanken, die mich mit Engelsgeduld in die Tücken der Laborarbeit einführte und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die vielen Stunden Korrekturlesen möchte ich mich bei Johanna und Matthias bedanken.

Meiner treuen Studienfreundin Lucy und meinem Freund Oliver ein großes Dankeschön.

Inhaltsverzeichnis

I.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
II.	TABELLENVERZEICHNIS	IX
III.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2	LITERATURÜBERBLICK	3
2.1	Atherosklerose	3
2.2	Pathogenese der Atherosklerose	3
2.2.1	Entstehung von Plaque	3
2.2.2	Die Rolle der Monozyten/Makrophagen in der Atherosklerose	4
2.2.3	Vom Monozyten zum Makrophagen in der Atherogenese	5
2.2.4	Bedeutung von oxidiertem LDL in atherosklerotischen Plaques	7
2.2.5	Toxische Formen des Sauerstoffes - reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	7
2.3	Hypoxie in Atherosklerose	9
2.3.1	Hypoxie induzierter Faktor-1 α (HIF-1 α)	11
2.3.2	Makrophagen und HIF-1 α	13
2.4	Biologisch aktive Gase	16
2.4.1	Schwefelwasserstoff (H ₂ S)	16
2.4.2	Biosynthese von H ₂ S	16
2.4.3	H ₂ S und seine Bedeutung im kardiovaskulären System	17
2.5	Erzeugung von H₂S mittels H₂S Releaser	18
2.5.1	NaHS als schneller H ₂ S Releaser	18
2.5.2	GY4137 als langsamer H ₂ S Releaser	19
2.5.3	Freisetzung von H ₂ S <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	20
2.6	Stickstoffmonoxid (NO)	21
2.6.1	Biosynthese von NO	21
2.6.2	NO und die Bedeutung im kardiovaskulären System	21
2.6.3	NO – Releaser	22
2.6.4	Zusammenspiel von H ₂ S, NO und HIF-1 α	22
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Zellkultur	24
3.1.1	Zelllinien	24

3.1.2	Herstellung eines Zellkulturmediums	24
3.1.3	Kultivierung der Zellen	24
3.1.4	Bestimmung von Zellzahl und Viabilität	25
3.1.5	Arbeiten mit Zellen	25
3.1.5.1	Differenzieren von THP-1 Zellen zu Makrophagen	25
3.1.5.2	Inkubation differenzierter THP-1 Zellen	25
3.1.5.3	Erzeugung einer hypoxischen Umgebung mittels Hypoxiekammer	26
3.1.5.4	Lysieren von Zellen	26
3.2	Elektrophorese & Western Blot	27
3.2.1	Western Transfer Blotting	29
3.2.2	Immunodetektion	31
3.3	2,7-Dichlorofluorescein	34
3.3.1	2,7- Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) als Nachweis für reaktive Sauerstoffe (ROS)	35
3.3.2	Versuchsaufbau	36
3.3.2.1	Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die AAPH-vermittelte DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen	36
3.3.2.2	Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	36
3.3.2.3	Einfluss der Belichtung von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz	37
3.3.2.4	Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die Eigenfluoreszenz von THP-1 Makrophagen	37
3.4	Statistische Auswertung	38
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	39
4.1	Einfluss von NaHS auf das HIF-1α Protein in THP-1 Makrophagen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen	39
4.2	Einfluss von GYY4137 auf HIF-1α Protein in THP-1 Makrophagen unter verschiedenen Sauerstoffkonditionen	41
4.3	Einfluss von DETA-NO auf das HIF-1α Protein in THP-1 Makrophagen unter verschiedenen Sauerstoffkonditionen	42
4.4	Messung von oxidativem Stress in THP-1 Makrophagen	44
4.5	Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die AAPH-vermittelte DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen	44
4.6	Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen unter normoxischen Bedingungen im Fluorimeter gemessen	47
4.7	Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	48
4.8	Einfluss der Belichtung von NaHS und GYY4137 auf die zellfreie DCF-Fluoreszenz	50

4.9	Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die Eigenfluoreszenz der THP-1 Makrophagen	52
5	SCHLUSSBETRACHTUNG	54
6	ZUSAMMENFASSUNG	62
7	SUMMARY	63
8	LITERATURVERZEICHNIS	64
9	LEBENS LAUF	73

I. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ABLAGERUNGEN (PLAQUES) IM BLUTGEFÄß MIT ERYTROZYTEN [RED, 2011]	3
ABBILDUNG 2: MONOZYTEN/ MAKROPHAGEN IN DER ATHEROSKLEROSE[MODIFIZIERT AUS LIBBY, 2002].	5
ABBILDUNG 3: HIF-1 α PATHWAY UNTER NORMOXIE UND HYPOXIE [STRÖBINGER, 2009]	12
ABBILDUNG 4: MUTMAßLICHE EFFEKTE VON HYPOXIE IN MAKROPHAGEN UND HIF-1 α IN DER ATHEROGENESE.	15
ABBILDUNG 5: MOLEKULARER AUFBAU VON GYY4137 [BIOTECHNOLOGY, 2007-2011]	19
ABBILDUNG 6: ZEITABHÄNGIGE ENZYMATISCHE FREISETZUNG VON H ₂ S [WHITEMAN ET AL., 2010].	20
ABBILDUNG 7: AUFBAU DES SANDWICHS [BIOTECHNOLOGY, 2007-2011]	30
ABBILDUNG 8: SIE ZEIGT DEN HYPOTHETISCHEN MECHANISMUS DES NICHT FLUORESZIERENDEN 2,7-DICHLOROFLUORESCHEIN DIACETAT (DCFH-DA) ZU DEM FLUORESZIERENDEN 2,7-DICHLOROFLUORESCHEIN (DCF). DIE ABBILDUNG WURDE MODULIERT AUS BASS ET AL., 1983.	35
ABBILDUNG 9: EINFLUSS VON NAHS AUF DAS HIF-1 α PROTEIN IN THP-1 MAKROPHAGEN UNTER NORMOXIE UND HYPOXIE.	40
ABBILDUNG 10: EINFLUSS VON GYY4137 AUF DAS HIF-1 α PROTEIN IN THP-1 MAKROPHAGEN UNTER NORMOXISCHEN UND HYPOXISCHEN BEDINGUNGEN.	41
ABBILDUNG 11: EINFLUSS VON DETA-NO AUF DAS HIF 1 α PROTEIN IN THP-1 MAKROPHAGEN UNTER NORMOXIE UND HYPOXIE.	43
ABBILDUNG 12: EINFLUSS VON NAHS UND GYY4137 AUF DIE AAPH-VERMITTELTE DCF-FLUORESZENZ IN THP-1 MAKROPHAGEN UNTER NORMOXIE.	45
ABBILDUNG 13: EINFLUSS VON NAHS UND GYY4137 IN THP-1 MAKROPHAGEN AUF DIE DCF-FLUORESZENZ UNTER NORMOXIE BEI EINER 4-STÜNDIGEN DAUERMESSUNG IM FLUOROMETER.	47
ABBILDUNG 14: DER EFFEKT VON NAHS UND GYY4137 IN THP-1 MAKROPHAGEN AUF DIE DCF-FLUORESZENZ UNTER NORMOXIE UND HYPOXIE.	49
ABBILDUNG 15: EINFLUSS DER BELICHTUNG VON NAHS UND GYY4137 AUF DIE ZELLFREIE DCF-FLUORESZENZ.	50
ABBILDUNG 16: WIRKUNG VON GYY4137 UND NAHS AUF DIE EIGENFLUORESZENZ VON THP1-MAKROPHAGEN.	52

II. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE HERSTELLUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN

28

III. Abkürzungsverzeichnis

AAPH	2,2'-Azobis- (2-amidinopropan)	2,2' azobis- (2-amidinopropane)
APS	Ammoniumpersulfat	ammonium persulfate
BID	BH3 interaktive Domäne des Zell-Todes	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Rinderserumalbumin	bovin serum albumin
CAT	Cysteinaminotransferase	cysteine amino transferase
CBS	Cystathionin- β -Synthase	cystathionine- β - synthase
CSE	Cystathionin- γ -Lyase	cystathionine- γ -lyase
DCF	2,7-Dichlorodihydrofluorescein	
DCF-DA	2,7-Dichlorofluorescein Diacetat	
DCFH	2',7'-Dichlorfluorescein	
DETA-NO	1-[N-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazon-1-ium-1,2- diolate	
FCS	fötales Kälberserum	fetal calf serum
GY4137	Morpholin-4-ium4methoxyphenyl(morpholino) phosphinodithionat	
HBSS	Hank's gepufferte Kochsalzlösung	Hank's buffered saline
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor	hypoxia inducible factor
HRE	Hypoxie responsive Elemente	hypoxic response elements
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	phosphate buffered saline
PDGFB		platelet-derived growth factor beta polypeptide
PMA	Phorbol 12-Myristat-13- Acetat	phorbol 12-myristate-13-acetate
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies	reactive oxygen species
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute	
SDS	Natriumdodecylsulfat	sodium dodecyl sulfate
TEMED	Tetramethylethyldiamin	tetramethylethyldiamine

TRIS	Tris- Hydroxymethylaminomethan	
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung und Fragestellung

Arterio- oder Atherosklerose ist die Ursache für mehr als die Hälfte aller Todesfälle in den westlichen Industrienationen. Hier handelt es sich um eine langsam fortschreitende Arterienerkrankung, bei der die Intima durch fibröse Einlagerungen verdickt ist. Durch subendotheliale Anhäufung von Schaumzellen bilden sich fibröse Plaques oder Atherome. Diese Plaques sind eine Ansammlung von Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen, T-Lymphozyten, Bindegewebe sowie von Gewebstrümmern und Cholesterinkristallen [SILBERNAGL und LANG, 2005]. Diese Einlagerungen engen zunehmend das Lumen ein und sind der Ort von Blutungen und Thrombusbildung.

In der atherosklerotischen Plaqueentstehung stellen die Angiogenese und inflammatorischen Reaktionen wichtige Bereiche dar.

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α) fungiert als Schlüsselregulator der Angiogenese und vermittelt die Expression von Genen, die unter anderem für die Vasodilatation, vaskuläre Permeabilität, Glukoseaufnahme und Glykolyse verantwortlich sind [VINK et al., 2007]. Eine erhöhte Produktion an HIF-1 α Proteinen wurde bei Entzündungen beobachtet [BILTON und BOOKER, 2003]. HIF-1 α registriert die Sauerstoffversorgung der Zellen [SEMENZA, 2003]. Es wird diskutiert, ob in den Plaques hypoxische Bedingungen herrschen [SILVOLA et al., 2011], und Sauerstoffmangel könnte maßgebend für eine Anreicherung des HIF-1 α Proteins in Plaques sein. Dadurch wäre die Nährstoffversorgung der Zellen in den Plaques verbessert, und es könnte somit auch, zum Beispiel durch erhöhte enzymatische Aktivität der Makrophagen, zu einer Destabilisierung der Plaques kommen [VINK et al., 2007].

Schwefelwasserstoff (H₂S), Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) sind biologisch aktive Gase, die natürlich in den Zellen des menschlichen Körpers vorkommen und für eine Reihe von biologischen Effekten verantwortlich gemacht werden. Aktuelle Studien zeigen, dass H₂S [BUDDE und ROTH, 2010] und NO Einfluss auf die Aktivität von HIF-1 α haben [BERCHNER-PFANNSCHMIDT et al., 2010].

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Wirkung von H_2S auf die Akkumulation des HIF-1 α Proteins in zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen zu untersuchen. Weiteres soll mittels der DCF-Methode der oxidative Stress der THP-1 Zellen nach Gabe von NaHS und GYY4137 unter Hypoxie (1% O_2) und Normoxie (20 % O_2) ermittelt werden.

2 Literaturüberblick

2.1 Atherosklerose

Atherosklerose wird auch als arterielle Verschlusskrankheit bezeichnet und stellt die Ursache für verschiedene Folgeerkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems dar. Laut Weltgesundheitsorganisation starben 2004 17,1 Millionen Menschen weltweit an den Folgeerkrankungen von Atherosklerose [WHO, 2011]. Bis 2030 soll die Zahl der Menschen, die an kardiovaskulären Erkrankungen sterben, bis auf 20,6 Millionen ansteigen [WHO, 2011].

2.2 Pathogenese der Atherosklerose

2.2.1 Entstehung von Plaque

Die Verletzung der Gefäße stellt einen zentralen Bereich der Pathogenese der Atherosklerose dar. Das Lipoprotein niedriger Dichte (LDL) ist für den Transport von Cholesterin, Cholesterinestern, Phospholipiden und Apolipoproteinen von der Leber zu extrahepatischen Geweben verantwortlich. Liegt eine Verletzung der Intima vor, kommt es zur Einwanderung von Monozyten, die zu Makrophagen differenzieren und modifiziertes LDL aufnehmen [HANSSON, 2005; LUSIS, 2000]. Durch die anhaltende Aufnahme von modifiziertem LDL kommt es zu einer Anhäufung von Schaumzellen [BOBRY SHEV, 2006]. Im fortschreitenden Stadium der Atherosklerose ist es kaum mehr möglich, dass die lipidbeladenen Makrophagen aus der Intima wieder in den Blutstrom gelangen, da sich eine sogenannte fibröse Kappe (fibrous cap) bildet [BOBRY SHEV, 2006]. Durch die intensive Anhäufung von Schaumzellen kommt es zur Bildung eines atheromatösen Kerns. In der Mitte dieses Kerns sterben die Zellen ab, wodurch zytotoxische Komponenten und auch Lipide freigesetzt werden.

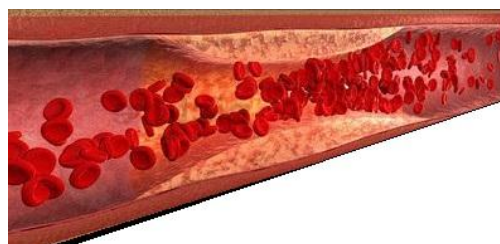


Abbildung 1: Ablagerungen (Plaques) im Blutgefäß mit Erythrozyten (RED, 2011)

Das vermehrte Vorkommen von Plaques ist keine Bedingung für Atherosklerose, sondern ist vielmehr die physiologische Antwort auf den pathophysiologischen Zustand der Gefäßwand [SLUIMER und DAEMEN, 2009].

2.2.2 Die Rolle der Monozyten/Makrophagen in der Atherosklerose

Bei Atherosklerose handelt es sich um einen chronisch entzündlichen Prozess, bei dem Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems, aber auch Gefäßendothelzellen und glatte Muskelzellen eine Rolle spielen [HANSSON et al., 2002; LIBBY, 2002].

Monozyten sind Zellen, die zum zellulären Immunsystem gehören und die im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen entstehen. Aus den Stammzellen entwickeln sich reife Monozyten, die in die Blutbahn entlassen werden. Werden diese von Zytokinen angelockt und aktiviert, migrieren sie ins Gewebe, wo sie sich zu sessilen Gewebsmakrophagen entwickeln und ihre Umgebung vor Infektionen und anderen Schäden schützen können.

2.2.3 Vom Monozyten zum Makrophagen in der Atherogenese

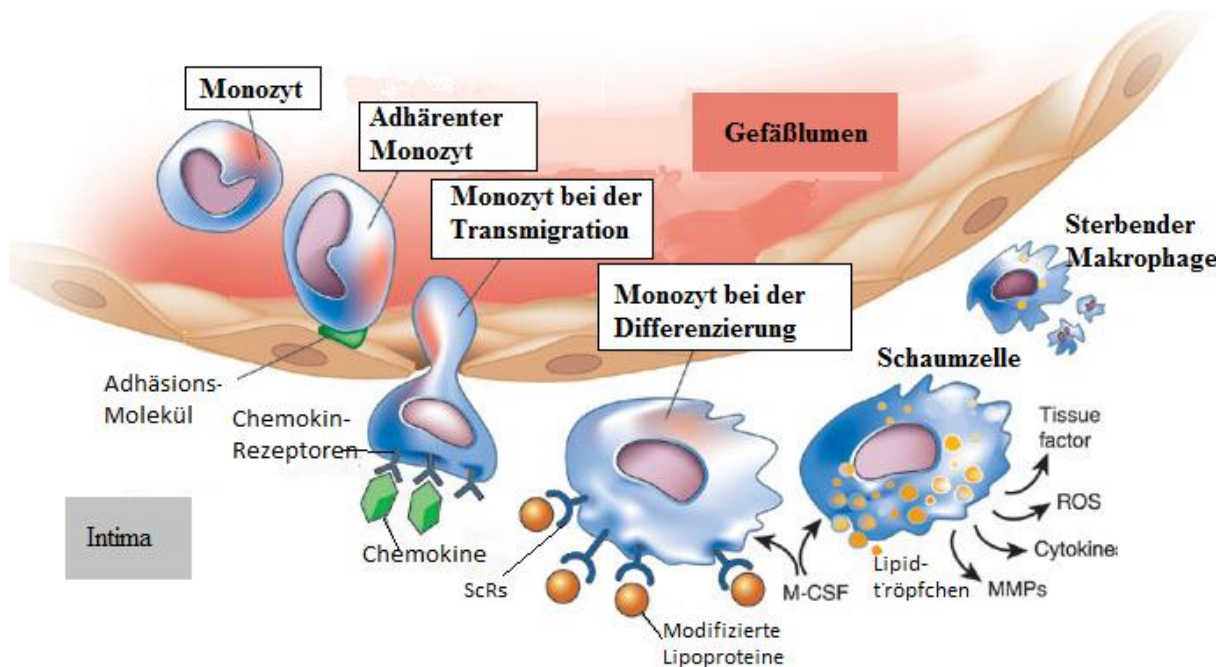


Abbildung 2: Monozyten/ Makrophagen in der Atherosklerose [modifiziert aus Libby, 2002].

Durch die chemotaktische Stimulierung (Chemokine) verlassen Monozyten den zentralen Blutstrom. Durch die Zytokine, welche in den atherosklerotischen Plaques produziert werden, findet eine Aktivierung der Monozyten statt. Daraus folgt eine Expression von Oberflächenmolekülen der Endothelzellen und so beginnen die Monozyten durch Verlangsamung der Flussgeschwindigkeit über die Oberfläche der geschädigten Endothelzellen zu rollen („rolling“) [ROSALES und JULIANO, 1995; PETRI und BIXEL, 2006].

Aufgrund der Entzündung exprimieren die Endothelzellen eine Reihe von Oberflächenmolekülen, die vom Monozyten erkannt werden und die Adhäsion an den Endothelzellen und ihre Einwanderung ermöglichen. Zu diesen Oberflächenmolekülen gehören ICAM-1 (CD54), PECAM-1 (CD31), VCAM-1 (CD106) und P-Selectin (CD62P) [BOGEN et al., 1994; CYBULSKY und GIMBRONE, 1991; JOHNSON-TIDEY et al., 1994; POSTON et al., 1992; ZIBARA, et al., 2000; DONG et al., 1998]. Zytokine werden auch in atherosklerotischen Läsionen produziert, welche aktivierend auf Makrophagen und Endothelzellen wirken. Zu den Zytokinen gehören unter anderen Interleukin IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [LINTON und FAZIO, 2003; TAKAHASHI et al., 2002].

In der Anlockung von Makrophagen und deren Adhäsion an Endothelzellen spielt oxLDL eine zentrale Rolle. oxLDL wirkt einerseits chemotaktisch auf Monozyten, andererseits kann es auch die Expression anderer chemotaktischer Moleküle wie zum Beispiel MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) induzieren [NAVAB et al., 1996; STEINBERG et al., 1989]. MCP-1 scheint besonders wichtig für die Einwanderung von Monozyten in atherosklerotische Läsionen zu sein [BORING et al., 1998].

Ebenso wird der M-CSF (macrophage colony- stimulating factor) von oxLDL induziert und fördert so die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen [LIAO et al., 1991].

M-CSF ist ein wichtiges Zytokin, das die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen einleitet. Verschiedene Zellen in der Gefäßwand können M-CSF produzieren, die wichtigste Quelle in den atherosklerotischen Plaques aber sind wahrscheinlich die Makrophagen selbst [CLINTON et al., 1992; ROSENFELD et al., 1992].

Neito und seine Kollegen zeigten anhand eines Mausmodells, dass osteopetrosis Mäuse (op/op) M-CSF frei und dadurch auch weitgehend Atherosklerose-resistent sind. Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen in der atherosklerotischen Plaques ist also ein essentieller Schritt der Atherogenese ist [NAITO et al, 1991].

Sogenannte mustererkennende Rezeptoren (PRRs, pattern recognition receptors) werden von differenzierenden Monozyten exprimiert, welche Pathogene anhand bestimmter Strukturen erkennen können und damit Bestandteile der angeborenen Immunität sind.

Bei Atherosklerose sind dies vor allem die Scavenger Rezeptoren (ScRs) und die Toll-like Rezeptoren (TLRs) [HANSSON et al., 2002]. Über die Scavenger Rezeptoren Scavenger receptor A (SR-A), Scavenger receptor BI /SR-BI, CD36 und CD68 nehmen die Makrophagen oxidierte Lipoproteine auf und entwickeln sich dann zu Schaumzellen [BOULLIER, 2001; FEBBRAIO et al., 2001; LINTON und FAZIO, 2001].

2.2.4 Bedeutung von oxidiertem LDL in atherosklerotischen Plaques

Monozyten und Makrophagen in Verbindung mit modifizierten LDL sind pathophysiologisch gesehen maßgebend in der Entstehung der Atherosklerose.

LDL ist sowohl im Plasma, als auch an der Gefäßwand anzutreffen. Antioxidantien des Plasmas bieten guten Schutz gegen die oxidative Modifizierung des LDL [FREI et al., 1988]. Es wird angenommen, dass die Oxidation von LDL größtenteils im subendothelialen Raum stattfindet. Dort scheint jede bei Atherosklerose beteiligte Zellart, wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen, zur Oxidation befähigt zu sein [STEINBERG, 1997].

Wo und wie die Modifikation durch Oxidation von LDL *in vivo* stattfindet ist bisher aber noch nicht genau beantwortet [CHISOLM und STEINBERG, 2000].

OxLDL wirkt direkt chemotaktisch auf Monozyten ein und trägt so indirekt zur Einwanderung von Monozyten bei [NAVAB et al., 1996].

Makrophagen besitzen einen oxLDL-Rezeptor (Scavenger-Rezeptor), der oxLDL erkennt, und somit eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Schaumzellen spielt [HENRIKSEN et al., 1982; KODAMA et al., 1988].

Natives LDL wird von den Makrophagen nur in geringen Mengen aufgenommen. Es wird von zuständigen Rezeptoren überwacht, so dass es durch das native LDL zu keiner Schaumzellenbildung kommt [BROWN und GOLDSTEIN, 1986].

Oxidativer Stress spielt in der Entstehung und dem Fortschreiten der Atherosklerose ebenfalls eine wichtige Rolle [SLUIMER und DAEMEN, 2009].

2.2.5 Toxische Formen des Sauerstoffes - reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Sauerstoff dient als Oxidans und als Elektronenakzeptor für die Atmung in der Zelle und stellt somit einen wichtigen Teilbereich im Zellmetabolismus dar. Andererseits kann er, wenn sich seine Elektronenkonfiguration ändert, toxisch auf seine Umgebung wirken. Die so entstehenden Sauerstoffderivate werden auch als reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet. Dazu zählen unter anderen Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal ($OH^{\cdot}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Durch ein Ungleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien im Körper kann es zu oxidativem Stress kommen.

Das Enzym 12/15 Lipoxygenase, das von Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen exprimiert wird, oxidiert ungesättigte Fettsäuren zu Lipidperoxiden, die wiederum LDL oxidieren können [MERTENS und HOLVOET, 2001]. Eine Studie zeigt, dass in Mäusen, denen das Enzym 12/15 Lipoxygenase fehlt, viel weniger atherosklerotische Gefäßablagerungen gefunden werden. Dies dürfte auf eine verminderte LDL-Oxidation zurückzuführen sein [CYRUS et al., 1999].

Die Konzentration von oxLDL im Serum fungiert als Marker von oxidativem Stress in den Zellen. Weiteres wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten oxLDL Werten im Serum und einer erhöhten Inzidenz für Herz-Kreislauf Erkrankungen beobachtet [KOENIG et al., 2011].

Die Oxidation von LDL *in vivo* findet hauptsächlich in der Gefäßwand statt. Hier befinden sich Enzyme, die ROS produzieren. Sie sind für die Abwehr zuständig und oxidieren als Nebeneffekt LDL [BERLINER und HEINECKE, 1996].

NADPH Oxidase ist ein Schlüsselenzym für die Generierung von ROS aus molekularem Sauerstoff [WHITE et al., 1994]. Dieses membranständige Enzym besitzen vor allem Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid wird vom Enzym NADPH Oxidase katalysiert. Aus Superoxid entsteht Wasserperoxid und andere ROS, die alle zur Oxidation von LDL beitragen. Die tatsächliche Bedeutung der NADPH Oxidase in der Atherogenese ist jedoch noch nicht geklärt [KIRK et al., 2000].

Ebenso wird die Rolle von NO Synthase (iNOS) in der Generierung von oxLDL diskutiert [BUTTERY et al., 1996]. *In vivo* Studien liefern allerdings widersprüchliche Ergebnisse [NIU et al., 2001; DETMERS et al., 2000].

Ebenso hat der Sauerstoffgehalt der Umgebung Auswirkungen auf die Bildung von ROS, die Oxidation von LDL und die Aufnahme von oxidiertem LDL in die Zelle [BOSTROM et al., 2006; NAKANO et al., 2005; SAVRANSKY et al., 2007; SLUIMER und DAEMEN, 2009].

2.3 Hypoxie in Atherosklerose

Hypoxie (niedriger Sauerstoffgehalt) wird als Anregung von physiologischer und pathophysiologischer Angiogenese gesehen.

SLUIMER et al., 2008 zeigten, dass in atherosklerotischen Läsionen hypoxische Zustände herrschen. Auch wurde gezeigt, dass eine Korrelation von hypoxischen Sauerstoffbedingungen in Plaques mit dem Vorkommen von Makrophagen, Angiogenese und Thrombusbildung besteht.

Ein weiterer indirekter Nachweis, dass in menschlichen Plaquezellen hypoxische Bedingungen vorherrschen, ist das Umstellen vom aeroben zum anaeroben Glukosemetabolismus [COZZI et al., 1988].

Hypoxie wird nicht nur bei vermindertem Sauerstoffangebot sondern auch bei erhöhtem Bedarf an Sauerstoff festgestellt [SEMENZA 2003; PUGH und RATCLIFFE 2003; POELLINGER und JOHNSON 2004].

Es wird angenommen, dass in atherosklerotischen Läsionen durch die intimale Vergrößerung und die Verstopfung die Sauerstoffbereitstellung limitiert ist. Darüber hinaus kann es auch durch Erhöhung der Stoffwechselrate von aktiven Entzündungszellen zu vermehrtem Sauerstoffbedarf kommen, der nicht gewährleistet werden kann [MURDOCH et al., 2005].

Unter Hypoxie ausgesetzte Makrophagen weisen eine erhöhte Produktion an Zytokinen [MURDOCH et al., 2005] und Metalloproteinasen [BURKE et al., 2003] auf. Zytokine regulieren das Zellwachstum und die Differenzierung und spielen eine Rolle in immunologischen Reaktionen. Metalloproteinasen sind eine große Gruppe von Enzymen, die die Zellmatrix regulieren. Sie sind in normalen und pathologischen

Prozessen, wie Embryogenese, Wundheilung, Entzündung, Arthritis und Tumorerkrankungen involviert [MASSOVA et al., 1998].

2.3.1 Hypoxie induzierter Faktor-1 α (HIF-1 α)

Der Hypoxie induzierte Faktor-1 α ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle im Metabolismus der Zelle spielt und als Regelglied in hypoxischen Zellgegebenheiten fungiert [WENGER, 2002].

HIF-1 ist ein Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β - Untereinheit.

Unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) kommt HIF-1 α in kaum nachweisbaren Mengen vor, da ein rascher Abbau durch den Ubiquitin/Proteasom Stoffwechselweg erfolgt [SALCEDA und CARO, 1997]. Unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) wird der Abbau von HIF-1 α gehemmt und HIF-1 α wandert in den Zellkern um sich mit HIF-1 β zu verbinden [WANG und SEMENZA, 1995]. Es entsteht der aktive HIF-1 Komplex, der sich an Hypoxie responsive Elemente (hypoxic response elements, HRE), den regulativen Sequenzen der Zielgene bindet, und die Transkription von sauerstoffabhängigen Genen reguliert. Bisher sind über 200 Zielgene von HIF-1 α bekannt wie zum Beispiel der endotheliale Wachstumsfaktor, Erythropoietin, Glukosetransporter der GLUT-Familie. Diese Gene sind unter anderem an der Angiogenese, der Erythropoese und dem Glucosemetabolismus beteiligt [LIU et al., 1995]. Die nachstehende Abbildung 3 zeigt die Expression von HIF-1 α unter Normoxie und Hypoxie.

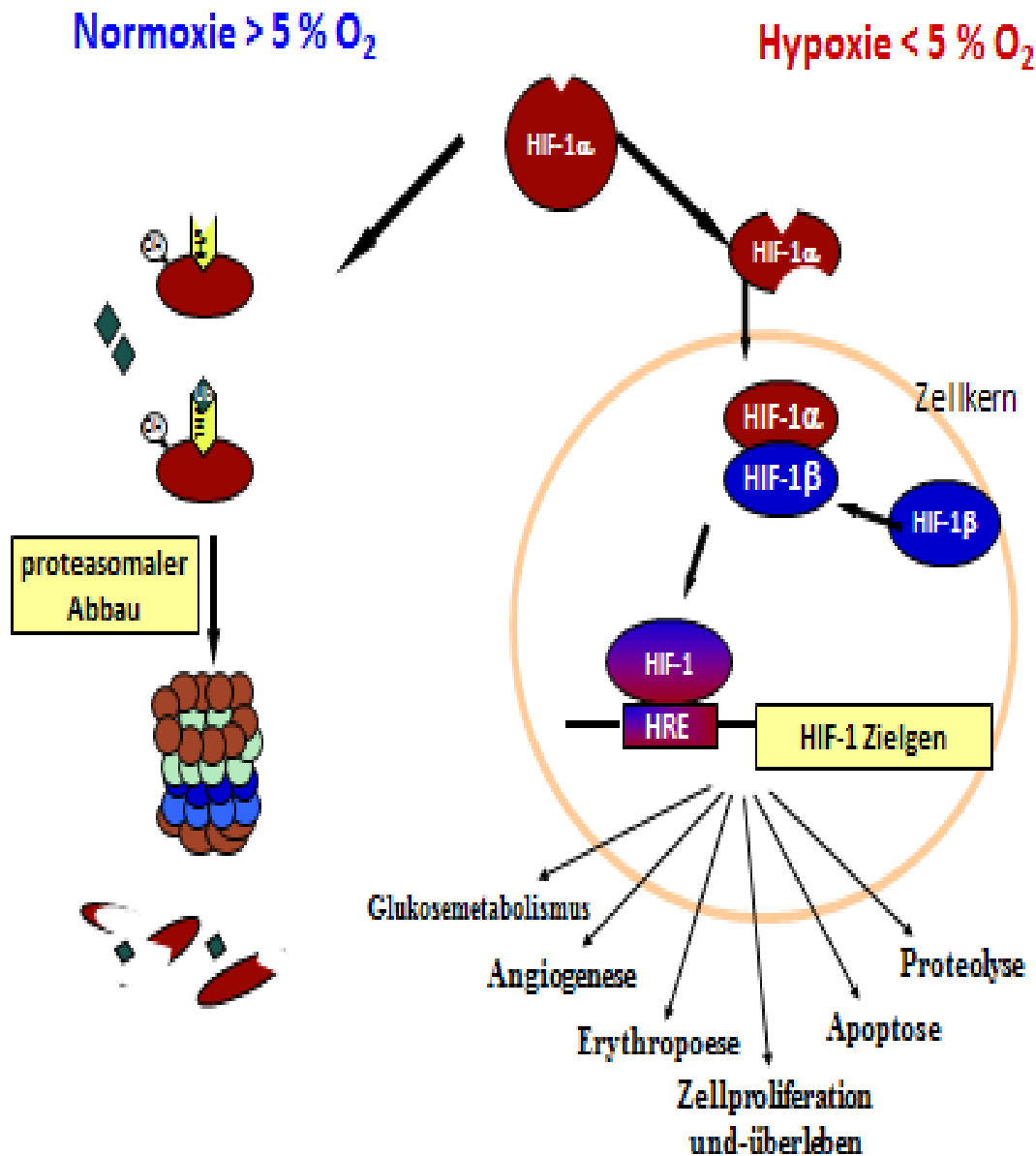


Abbildung 3: HIF-1 α Pathway unter Normoxie und Hypoxie (Ströbinger, 2009)

Unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) erfolgt ein rascher Abbau von HIF-1 α durch das Proteasom. Unter hypoxischen Bedingungen wird der Abbau von HIF-1 α gehemmt. HIF-1 α geht in den Zellkern um sich mit HIF-1 β zu verbinden. Ein aktiver HIF-1 Komplex bindet an Hypoxie responsive Elemente (hypoxic response elements, HRE) der regulativen Sequenzen der Zielgene. Dies führt zur Transkription von sauerstoffabhängigen Genen, die beispielsweise an der Angiogenese, der Erythropoese und dem Glukosemetabolismus beteiligt sind. [Liu et al., 1995].

2.3.2 Makrophagen und HIF-1 α

In Makrophagen wird eine Anpassung an die Sauerstoffbindungen der Umgebung durch Anreicherung von HIF-1 α nachgewiesen [SLUIMER et al., 2008]. Das Gen HIF-1 gilt dabei als Schlüsselfaktor für die Regulierung der Anpassung von Zellen und Geweben bei Hypoxie.

ROS sind Teile der intrazellulären Kommunikation und spielen in der Atherosklerose ebenfalls eine wichtige Rolle. Unter Sauerstoffmangel produzieren Zellen verstärkt ROS, besonders in den Mitochondrien. So zeigen die Ergebnisse einiger Studien eine Verbindung zwischen der HIF-1 α Stabilisierung und dem Vorkommen von ROS [CHANDEL et al., 1998; WOOD et al., 1999]. Dabei wird angenommen, dass ROS während einer Hypoxie am Komplex III der Atmungskette erhöht vorkommen. Diese ROS werden für die Aktivierung die Stabilisierung von HIF-1 α verantwortlich gemacht [GUZY et al., 2005]. ROS reguliert HIF-1 nicht nur unter Hypoxie sondern auch unter Normoxie [RICHARD et al., 2000].

HIF-1 α induziert den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und spielt deshalb im Bereich der Angiogenese eine Rolle [VINK et al., 2007]. Der VEGF induziert Migration und Proliferation von Endothelzellen, rekrutiert Monozyten und moduliert die Thrombusbildung [CELLETTI et al., 2001]. Auch andere Wachstumsfaktoren, wie PDGFB, FGF2 können von HIF-1 α beeinflusst werden [SLUIMER et al., 2008].

HIF-1 α beeinflusst auch die Aktivierung von BID, eines proapoptotischen Proteins, das zur Makrophagen Apoptose führt [SEENATH et al., 2008].

Hohe HIF-1 α Werte in Makrophagen unterstützen die Schaumzellenbildung durch die Aufnahme von oxLDL [JIANG et al., 2007].

Hypoxische Bedingungen in Makrophagen erhöhen die Cytokinproduktion (VCAM1, MGP1, IL1b) und die Metalloproteinase (z.B. MMP2) Sekretion und haben somit

Einfluss im Zellwachstum und in der Differenzierung der Zellen [MURDOCH et al., 2005; BURKE et al., 2003; SLUIMER et al., 2008].

Die nachstehende Abbildung 4 zeigt diese mutmaßlichen Effekte von Hypoxie in Makrophagen und HIF-1 α in der Atherogenese.

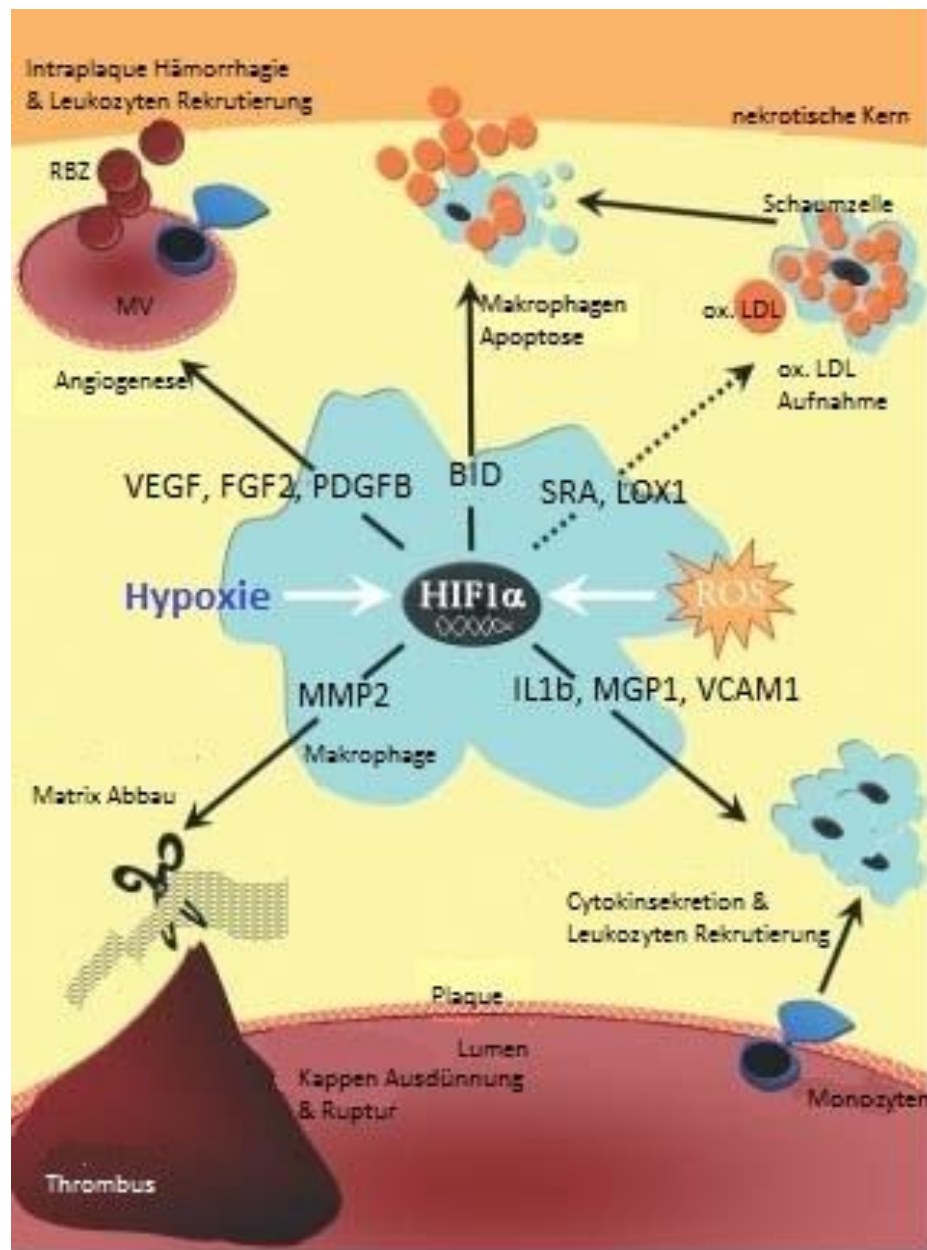


Abbildung 4: Mutmaßliche Effekte von Hypoxie in Makrophagen und HIF-1α in der Atherogenese.

Durch die Stimulation von Hypoxie und/oder ROS wird das HIF1α Protein akkumuliert und induziert eine Transkription von Genen, die in der Angiogenese, der Aufnahme von ox.LDL, Apoptose, Inflammation und Matrix Degradation involviert sind. Diese Prozesse spielen auch in der Destabilisierung von Plaques, Intraplaques, Hämorrhagie und Ruptur eine Rolle. Die schwarzen Pfeile deuten auf die HIF regulierten Genbereiche hin, die durch Knock-out Studien erhoben wurden. Der nicht durchgängige Pfeil zeigt eine Einzelstudie in der Verwendung der DNA microarray Technologie [JIANG et al., 2007].

Die Abbildung 4 wurde modifiziert [SLUIMER et al., 2008].

2.4 Biologisch aktive Gase

In den letzten Jahren ist das Interesse der Forschung an biologisch aktiven Gasen, die vom Körper selbst synthetisiert werden und an einer Reihe von biologischen Effekten beteiligt sind, gestiegen. Sauerstoff (O_2), Kohlenstoffdioxid (CO_2) und auch reaktive Sauerstoffverbindungen zeigten Einfluss auf die physiologische Regulation des Stoffwechsels, darüber hinaus sollen sie als „Regler“ in kranken Zellen fungieren. Stickstoffmonoxid (NO) und Schwefelwasserstoff (H_2S) werden positive Effekte im kardiovaskulären System zugeschrieben [LING et al., 2009].

2.4.1 Schwefelwasserstoff (H_2S)

H_2S ist ein durchsichtiges und entflammbares Gas, dessen Geruch an faule Eier erinnert. Ob H_2S positiv oder negativ auf den Organismus wirkt, hängt von der Konzentration, welche in der Umgebung herrscht und vom Metabolismus im betreffenden Organismus ab. In hohen Dosen ist Schwefelwasserstoff letal.

In der wissenschaftlichen Literatur wird die Bezeichnung „ H_2S “ generell für die Summe der drei Spezies (HS^- , H_2S und S^{2-}) verwendet [WEBB, et al., 2008; DOMBKOWSKI et al., 2004].

Bei physiologischem pH-Wert existiert H_2S zu zwei Drittel als HS^- und nur zu einem Drittel als undissoziiertes H_2S . Kleine Mengen an S^{2-} sind in Lösungen mitunter auch zu finden [WHITEMAN und MOORE, 2009].

2.4.2 Biosynthese von H_2S

H_2S wird vom Körper synthetisiert. Dies kann endogen durch enzymatische oder nicht enzymatische Vorgänge (Reduktion von Thiolen) ablaufen. Es sind vier verschiedene enzymatische Stoffwechselwege bekannt, die jeweils über die Bildung von L-Cystein führen.

Im ersten Stoffwechselweg wird L-Cystein von der Cystathionin β -Synthase (CBS) hydrolysiert. Dadurch entstehen gleiche Mengen an H_2S und Serin, wobei bei geringen Cysteinkonzentrationen diese Reaktion reversibel ist.

Der zweite Stoffwechselweg führt über zwei L-Cysteinmoleküle, unter Bildung von L-Cystin. Durch die Cystathionin- γ -Lyase (CSE) wird L-Cystin zu Thiocystein, Pyruvat

und NH_3 . Aus dem so erhaltenen Thiocystein kann nun H_2S generiert werden [STIPANUK, 1982; CAVALLINI et al., 1962].

Im dritten Stoffwechselweg fungiert das Enzym Cysteinaminotransferase (CAT) als Katalysator für L-Cystein mit Ketosäuren (zum Beispiel α -Ketoglutarat), um 3-Mercaptopyruvat und eine Aminosäure wie L-Glutamat zu bilden.

Das 3-Mercaptopyruvat wird durch das Enzym 3-Mercaptopyruvat Schwefeltransferase (MPST) zu H_2S und Pyruvat.

Im vierten Stoffwechselweg wandelt das Enzym Cysteinlyase, L-Cystein und Sulfid zu L-Cysteate und H_2S um. Der Cofaktor Pyridoxal 5'-Phosphat ist notwendig für CBS, CAT, CSE und Cysteinlyase [LI et al., 2009].

CBS und CSE werden organspezifisch exprimiert.

CBS gilt als Schwefelwasserstoff generierendes Enzym und wird im Gehirn, im Nervengewebe und vorrangig in der Leber und in den Nieren hergestellt. CSE wird in der Leber und in den glatten Muskelzellen gebildet [FIORUCCI et al., 2006].

Die Aktivität der H_2S -synthetisierenden Enzyme wird von vielen Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel glukocortikoiden Hormonen und cAMP [DOMBKOWSKI et al., 2004].

Die absolute Konzentration von H_2S in den verschiedenen Geweben ist sehr schwer zu messen und liegt im Plasma bei 20 bis 80 μM [WHITEMAN und MOORE, 2009]. Die Konzentration von H_2S in der Zirkulation scheint um einiges geringer zu sein [FURNE et al., 2008].

2.4.3 H_2S und seine Bedeutung im kardiovaskulären System

H_2S unterbindet die Proliferation der glatten Muskulatur, die mitunter maßgebend in der Entstehung von Atherosklerose ist. Es wurde gezeigt, dass es durch das Herabsetzen endogener H_2S -Produktion (bis 100 μM) durch DL-Propargylglycin (PPG) oder durch Ausschalten des CSE-Gens zur Apoptose von humanen glatten Muskelzellen in der Aorta kommt [YANG et al., 2004]. Ohne diese Regulierung des endogenen H_2S und die exogene Verabreichung von H_2S in der Höhe von 100 μM hatte es nur geringe Auswirkungen auf die Apoptose von humanen glatten Muskelzellen der Aorta. Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch Behandlungen mit H_2S zu einer Hemmung der

Proliferation von glatten Muskelzellen kommt und H_2S sich somit auf etwaige Neubildungen von Stenosen nach einer Gefäßerweiterung (Angioplastie) auswirken kann [BASKAR und BIAN, 2011].

Ob H_2S als Dilator oder Konstriktor von Gefäßen fungiert, ist von der verwendeten Konzentration abhängig [WEBB et al., 2008]. Darüber hinaus werden die unterschiedlichen Reaktionen den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen, in denen die verschiedenen Studien erhoben wurden, zugeschrieben. Eine Vasokonstriktion wird in hoher Sauerstoffumgebung beobachtet, bei niedriger Sauerstoffkonzentration kommt es zur Vasodilatation [KOENITZER et al., 2007].

Es wurde auch gezeigt, dass H_2S ein Herabsetzen von Homocystein-induzierter Gefäßwandschädigung bewirkt. Homocystein zählt als Risikofaktor in der Entstehung von Atherosklerose [WANG, 2009].

LAGGNER et al., 2007 zeigten, dass Schwefelwasserstoff das durch Myeloperoxidase/ HOCl/Cl^- -System modifizierte LDL vor den Veränderungen schützen kann.

2.5 Erzeugung von H_2S mittels H_2S Releaser

Um Schwefelwasserstoff im Körper freisetzen zu können und dadurch Wirkungen in der Zelle zu erforschen, sind einige Substanzen in der Literatur bekannt. In folgender Diplomarbeit wurden NaHS und GYY4137 verwendet.

2.5.1 NaHS als schneller H_2S Releaser

Natriumhydrogensulfid wird als schneller Schwefelwasserstoff Releaser eingesetzt. Von WHITEMAN et al., 2010 ist bekannt, dass die H_2S Freisetzung mit NaHS spontan in einer kurzen Zeitspanne (einige Sekunden) vor sich geht.

2.5.2 GYY4137 als langsamer H₂S Releaser

GY4137 ist eine langsame über Stunden H₂S freisetzende Substanz [LI et al., 2008].

Es handelt sich hier um ein Morphin-4-ium 4 methoxyphenyl(morpholino)phosphinodithionat.

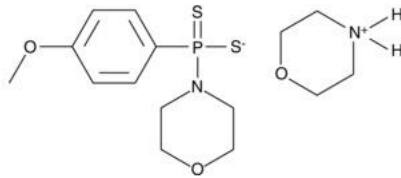


Abbildung 5: Molekularer Aufbau von GYY4137 (Biotechnology, 2007-2011)

Die molekulare Masse beträgt 376,5 g, die molekulare Formel lautet:
 $C_{11}H_{16}NO_2PS_2C_4H_{10}NO$

2.5.3 Freisetzung von H_2S *in vitro* und *in vivo*

Aus der Literatur ist ersichtlich, dass die Wirkung von H_2S komplex ist und nicht nur von der Konzentration des Gases sondern auch von der Geschwindigkeit der H_2S Freisetzung abhängig ist [WHITEMAN et al., 2010].

Die nachfolgende Tabelle zeigt die zeitabhängige Freisetzung von H_2S aus verschiedenen Schwefelwasserstoff freisetzenden Substanzen.

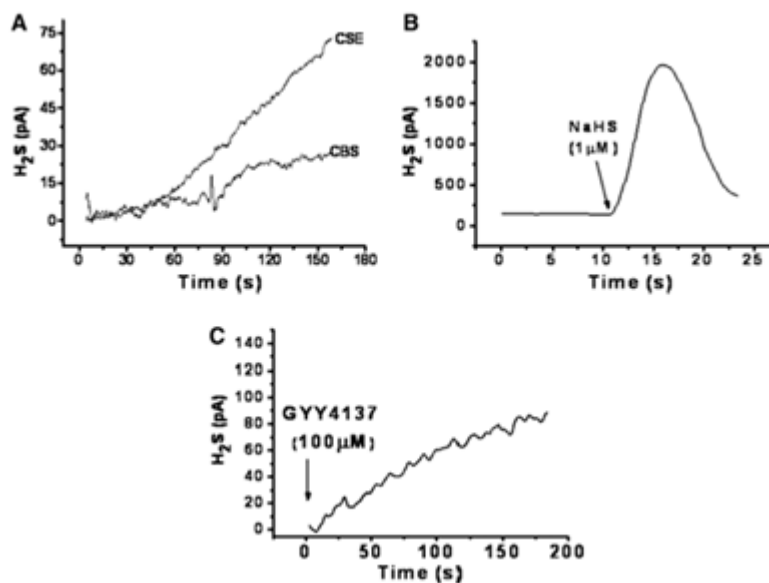


Abbildung 6: Zeitabhängige enzymatische Freisetzung von H_2S aus L-Cystein durch rekombinantes CSE und CBS *in vitro* (A)

Spontane H_2S Freisetzung von NaHS (1 µM) (B) und GYY4137 (100 µM) (C).

Die Konzentration von H_2S wurde mittels Elektrode ermittelt [WHITEMAN et al., 2010].

Wie aus der Tabelle 6 A ersichtlich ist, produziert CSE in einem Zeitraum von 180 Minuten größere Mengen an H_2S als CBS. Bei GYY4137 mit einer Anfangskonzentration von 100 µM zeigt sich eine gleichmäßige Freisetzung von H_2S in der gleichen Zeitspanne (Tabelle 6 B). Wird NaHS als H_2S Quelle genommen, ist ein deutlicher Unterschied bemerkbar. Die Freisetzung von NaHS war viel höher, dies aber in einer viel kürzeren Zeitspanne (einige Sekunden) (Tabelle 6 C).

Die durch die verschiedenen Releaser hervorgerufenen H_2S Konzentrationsunterschiede könnten ein Grund für die Diskrepanzen in der Literatur bezüglich der pro-versus antiinflammatorischen Rolle von H_2S sein [WHITEMAN et al., 2010].

2.6 Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein farbloses, brennbares und geruchloses Gas. Das Molekül besitzt ein ungepaartes Elektron und ist dadurch sehr reaktiv. Es wird zu NO^+ (Nitrosium) oxidiert oder zu HNO/NO^- (Nitroxyl) reduziert. Diese werden gemeinsam als reaktive Stickstoffspezies (RNS) zusammengefasst. Stickstoffmonoxid ist an sich ein toxisches Gas. Es wird in geringen Mengen im Organismus gebildet und wird für eine Reihe von physiologischen Prozessen verantwortlich gemacht. Es zeigte sich, dass Stickstoffmonoxid mit einem von vaskulären Endothelzellen gebildeten gefäßrelaxierenden Faktor (EDRF) gleich ist [MURAD, 2006]. Aus der Literatur ist bekannt, dass NO Schlüsselfunktionen für intrazelluläre Prozesse besitzt. Stickstoffmonoxid ist auch ein Regulator für intrazelluläre Botenstoffe, wie zum Beispiel cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP).

2.6.1 Biosynthese von NO

Die Synthese erfolgt mit Hilfe von L-Arginin durch NO-Synthasen [STUEHR, 2004; LING et al., 2009]. Bei diesem sogenannten L-Arginin-NO-Stoffwechselweg werden drei Synthasen unterschieden:

die endotheliale NO-Synthase (eNOS)

die neuronale NO-Synthase (nNOS)

und die induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Letztere wird im Gegensatz zu den anderen Synthasen in ihrer Aktivität kaum vom Körper reguliert. Die produzierten NO-Mengen sind zytotoxisch und dienen den Makrophagen zur Immunabwehr.

2.6.2 NO und die Bedeutung im kardiovaskulären System

NO reguliert den Muskeltonus. Es wurde gezeigt, dass es durch seine Über- bzw. Unterproduktion mit einer Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen verknüpft ist [ALI et al., 2006].

Aus der Literatur sind sowohl pro- als auch anti-angiogenetische Eigenschaften von NO bekannt. Es ist möglich, dass geringe Konzentrationen von NO pro-angiogenetisch, während hohe Konzentration anti-angiogenetisch wirken [LING et al., 2009].

Es wurde auch gezeigt, dass NO die Apoptose in Zellen hemmt, eine Stimulation der endothelialen Zellproliferation und die Synthese und die Freisetzung von VEGF unterstützt [DULAK et al., 2000]

Zusammenfassend ist NO ein Vasodilatator und seine direkten Effekte beeinflussen den endothelialen Zellmetabolismus. Auch begünstigt NO die Angiogenese durch die Erhöhung des lokalen Blutflusses [LING et al., 2009].

Die antientzündlichen Eigenschaften von NO sind mit der Aktivierung des nukleären Faktors KB (NF- κ B) verbunden [KANG et al., 2002].

2.6.3 NO – Releaser

Um die physiologische Wirksamkeit des Moleküls zu untersuchen, wurden sogenannte Stickstoffmonoxid-Releaser entwickelt, die unter physiologischen Bedingungen NO freisetzen. Zu den NO-Donatoren zählt unter anderem DETA-NO, das für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurde. DETA-NO zählt zu den NO-Releasern die eine hohe Halbwertszeit aufweisen und dadurch viele Stunden (20 – 23 h bei 37 °C) NO freisetzen können [HRABIE et al., 1993].

2.6.4 Zusammenspiel von H₂S, NO und HIF-1 α

Wie unter 2.3.1. ausführlich erklärt wurde, wird HIF-1 α unter Normoxie ständig abgebaut, unter Hypoxie findet eine Akkumulation des Proteins statt.

Es wurde beobachtet, dass in einer sauerstoffarmen Umgebung häufig hohe Werte an H₂S verzeichnet werden. Diese Gegebenheit bestätigt BUDDE und ROTH, 2010 durch ihren Versuch an *C.elegans*. Sie beobachteten, dass unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen die Exposition mit H₂S die Aktivität von HIF-1 erhöht, und es dadurch vor nachfolgenden Hypoxieschäden schützt.

Auch BLACKSTONE et al., 2005 bestätigen die protektive Rolle von H₂S unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen. Außerdem wurde durch einen erhöhten endogenen H₂S-Wert ein Schutz des Herzens beobachtet. Dieser erhöhte Wert ist auf eine Überproduktion des H₂S generierenden Enzymes (CSE) zurückzuführen [ELROD, 2007].

Eine Studie zeigt, dass H_2S die Angiogenese unter Hypoxie fördert, die auf den HIF-1 α /VEGF pathway *in vitro* zurückzuführen ist [LIU et al., 2010]

Diese Ergebnisse deuten auf einen nutzbringenden Einsatz von Hydrogensulfid in der Therapie von Krankheiten hin.

H_2S [BUDDE und ROTH, 2010] und NO [BERCHNER-PFANNSCHMIDT et al., 2010] greifen in die Aktivität von HIF-1 α ein. Das Protein HIF-1 α ist für die Regulation von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffverbrauch in der Zelle verantwortlich. Durch die mögliche Interaktion mit andere Gase wird in den Aktionsradius der Zelle auf die Verfügbarkeit von Sauerstoff eingegriffen.

3 Material und Methoden

Die verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind von Sigma-Aldrich, Merck oder Roth, falls nicht anders angegeben. GYY4137 wurde von Univ. Prof. Thomas Erker Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften synthetisiert.

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

THP-1 Zellen

Hier handelt es sich um eine humane monozytäre Zelllinie, die 1980 aus dem Blut eines einjährigen Knaben, der an der akuten monozytären Leukämie erkrankt war, isoliert wurde [TSUCHIYA et al., 1980]. Die Besonderheit dieser Zelllinie ist ihre Fähigkeit unter bestimmten Bedingungen zu Makrophagen zu differenzieren.

3.1.2 Herstellung eines Zellkulturmediums

Das Mediumpulver (RPMI 1640 Instamed 10,34 g/l, Biochrom AG) wird in 9 Liter Wasser gelöst und 10 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) dazugegeben. Ein pH-Wert von 7,25 wird mittels HCl eingestellt und auf ein Volumen von 10 Liter aufgefüllt. Über einem in der Laminar Air Flow (clanLAF) aufgebauten Glockenfilter (Satorius) wird das Medium mittels Pumpe in zuvor sterilisierten 0,5 l Glasflaschen über einen Vorfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm gepumpt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Kühlraum.

Um das Nährmedium für die Zellen zu erhalten, wird dem unkomplimentierten Medium 10 % fötales Kälberserum (FCS, Gibco), 2 ml L-Glutamin (PAA) und 100 U/ml Penicillin (PAA) sowie 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA) zugefügt.

3.1.3 Kultivierung der Zellen

Es werden sterile Kulturflaschen (TPP, 75 cm^2) mit rund 20 ml Zellsuspension im Brutschrank (Binder) bei 37 °C und 5 % iger CO_2 -Atmosphäre zur Kultivierung der Zellen verwendet. Alle zwei bis drei Tage werden die Zellen mit auf 37 °C erwärmtem Nährmedium auf eine Zelldichte von 0,6 Millionen Zellen/ml verdünnt.

Unter sterilen Bedingungen in einem Laminar Air Flow erfolgt die Fütterung, das Aussetzen und die Inkubation der Zellen. Die Sterilisation des Laminarhuts erfolgt über Nacht mit Hilfe eines UV-Lichtes. Alle verwendeten Materialien werden bei 180 °C sterilisiert, oder es werden sterile Einwegprodukte verwendet.

3.1.4 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Die Zellzahl und die Viabilität der Zellen werden mittels CASY[®] Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe Systeme GmbH, Reutlingen) gemessen.

3.1.5 Arbeiten mit Zellen

3.1.5.1 Differenzieren von THP-1 Zellen zu Makrophagen

Nicht adhärente Monozyten werden durch Zusatz von PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat; Stammlösung 810 µM in DMSO, gelagert bei -20 °C) zu Makrophagen differenziert [TSCHUCHIYA et al., 1982]. Morphologisch unterscheiden sich differenzierte THP-1 Zellen von ihrer monozytären Form dadurch, dass sie an der well-Oberfläche festsitzen und Ausläufer bilden.

3 ml Zellsuspension pro well mit je einer Dichte von 0,5 Mio Zellen/ml werden in 6 well-Platten ausgesetzt und mit PMA (160 µM) versetzt. Nach ca. 72 Stunden im Brutschrank ist die vollständige Ausdifferenzierung erreicht.

3.1.5.2 Inkubation differenzierter THP-1 Zellen

Verwendete Lösungen

HBSS- Hank's buffered salt solution:

Hierfür werden CaCl₂•2H₂O mit einer Konzentration von 1,26 mM, MgSO₄ (0,8 mM), KCl (5,4 mM), KH₂PO₄ (0,44 mM), NaHCO₃ (4,2 mM), NaCl (137 mM) und Na₂HPO₄ (0,34 mM) benötigt und in einem Liter bidestilliertem Wasser gelöst.

Nach viertägiger Differenzierung der Zellen in 6-well-Platten kann mit der Inkubation begonnen werden. Der Mediumüberstand wird abgesaugt und anschließend erfolgt das Waschen der Zellen mit HBSS (37 °C). NaHS, GYY4137 und Deta-NO (10 mM) werden in einer 0,9 % NaCl-Lösung gelöst und in unterschiedlichen Mengen auf die

Zellen aufgebracht. Unter Hypoxie gehaltene Zellen werden 5 Minuten bei 15-20 l/min begast und anschließend 4 Stunden inkubiert.

3.1.5.3 Erzeugung einer hypoxischen Umgebung mittels Hypoxiekammer

Die Zellkulturplatten mit den entsprechenden Reaktionsansätzen werden in die Hypoxiekammer (Billups-Rothenberg, MC-101) gegeben. Darin befinden sich noch zwei kleine Gefäße mit bidestilliertem Wasser. Die Kammer wird fünf Minuten lang mit einem Spezialgas (1 % O₂ und 5 % CO₂) und einer Durchflussrate von 15-20 l/min begast und anschließend dicht verschlossen. Die Kammer wird danach für 4 Stunden in den Brutschrank bei 37 °C gestellt.

3.1.5.4 Lysieren von Zellen

Eingesetzte Lösungen

Zell- Lysispuffer:

125 mM Tris-HCl, pH 6,5

2 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

10 % Glycerin

100 mM Dithiothreitol

Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank bei 4 °C.

Vor der Zelllyse wird dem Lysispuffer ein Protease Inhibitor Cocktail im Verhältnis 1:100 zugesetzt.

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgen auf Eis.

Der Überstand wird abgesaugt, und die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Im Anschluss werden die Zellen fünf Minuten mit Lysispuffer (70 µl) inkubiert. Mit dem Zellschaber werden die Zellen abgeschabt, und anschließend mit einer Pipette in frische Eppis transferiert. Die Eppis werden für 60 Minuten auf Eis gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lysate für zwei Sekunden mit Ultraschall (Inula) behandelt und bei 14.000 rpm zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in frische Eppis transferiert und bei -20 °C tiefgefroren.

3.2 Elektrophorese & Western Blot

Eingesetzte Lösungen

10 % SDS- Lösung

10 g Natriumdodecylsulfat (SDS) wird in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

10 x Tris/Glycin Puffer

30 g Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris Base), 144 g Glycin und 100 ml einer 10 % SDS-Lösung werden in einem Gesamtvolumen von einem Liter destillierten Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Um den Tris/Glycin Puffer für die Elektrophorese zu erhalten wird der 10-fach Puffer 1:10 verdünnt.

3 M Tris-HCl, pH 8,45 / 0,3 % SDS

182 g Tris-Base wird in 400 ml destilliertem Wasser gelöst und mit HCl auf pH 8,45 eingestellt. Anschließend wird 1,5 g SDS zugegeben und auf 500 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

TEMED (N,N- Tetramethylethylendiamin, Fluka)

10 % APS

500 mg Ammoniumpersulfat (APS, PharmaciaBiotech) werden in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und aliquotiert. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

Probenpuffer

200 µl Glycerin (Merck)

160 µl Puffer (85µl 0,5M Tris-HCL pH 6,8; 75µl Aqua dest.; 8 % SDS)

40 µl Mercaptoethanol (BioRad)

eine Spatelspitze Bromphenolblau

Der Probenpuffer wird vor jeder Verwendung frisch hergestellt.

Bevor mit der Herstellung der Gele begonnen wird, müssen die Glasplatten mit bidestilliertem Wasser und Ethanol gereinigt, mit einem Mikrofasertuch getrocknet und in den Glasplattenständer gegeben und fixiert werden. Im Anschluss werden die Ständer in einer Vorrichtung fixiert, um den Zwischenraum der Glasplatten gut mit dem Gel befüllen zu können.

Herstellung von Polyacrylamid Gelen:

	10 % Trenngel für 2 Gele	4 % Sammelgel für 2 Gele
Aqua bidest.	2,7 ml	2,2 ml
30 % Acrylamid	2,7 ml	0,6 ml
3 M Tris – HCl ph 8,45; 0,3 % SDS	2,7 ml	1,4 ml
10 % APS	60 µl	40 µl
TEMED	6 µl	4 µl

Tabelle 1: Pipettierschema für die Herstellung von Polyacrylamidgelen

Zur Herstellung des Trenngels werden die ersten drei Reagenzien in das Röhrchen pipettiert. Nun wird die Lösung gevortext und die letzten zwei Reagenzien beigegeben. TEMED und 10 % APS starten die Polymerisation des Gels, daher muss nach Zugabe dieser Reagenzien zügig gevortext und weitergearbeitet werden.

Mit einer Pipette wird die erhaltene Lösung in den Zwischenraum der Glasplatten gespritzt bis noch ein halber Zentimeter unter dem Kamm frei bleibt. Um das Austrocknen des polymerisierenden Gels zu verhindern, wird noch mit Isopropanol überschichtet und eine halbe Stunde gewartet.

Nach der Wartezeit wird das Isopropanol mit bidestilliertem Wasser vom Gelrand gewaschen. Das noch vorhandene Wasser wird mittels Filterpapier aus dem Glasplattenzwischenraum entfernt.

Die Herstellung des Sammelgels erfolgt nach Pipettierschema und zusätzlich wird noch Bromphenolblau beigegeben um das Trenngel und somit die Kammern, die zur Befüllung der vorbereiteten Zelllysate dient, besser zu sehen.

Das Trenngel wird nun auch in den Glasplattenzwischenraum bis zum Abschluss der kleinen Glasplatte eingebracht. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen im Gel befinden. Im Anschluss wird ein Kamm eingefügt und eine Wartezeit von 20 Minuten eingehalten, damit das Trenngel Zeit zum Polymerisieren hat.

Proberechnungen und Herstellung der aufzutragenden Zelllysate

Die Probe muss vor der Auftrennung mittels Elektrophorese mit 4-fach-Probenpuffer versetzt werden.

3 Teile Zelllysate werden mit 1 Teil Probenpuffer versetzt und anschließend im Thermoblock bei 90 °C fünf Minuten lang erhitzt. Danach werden sie auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach diesem Schritt sind die Proben soweit vorbereitet, dass diese in die Ladekammern der Elektrophorese eingebracht werden können. In einer Kammer wird nun auch ein Marker aufgetragen, damit später das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine festgestellt werden kann.

Die Elektrophorese läuft in den Versuchen für den Nachweis von HIF-1 α und β -Actin zwei Stunden bei einer Spannung von 180 Volt.

Nach beendeter Elektrophorese werden die Gele mittels Sandwich auf die Nitrocellulose übertragen.

3.2.1 Western Transfer Blotting

Eingesetzte Lösungen

Transfer-Puffer

100 ml 10 x Tris/ Glycin Puffer (siehe Kapitel 3.2.) und 200 ml Methanol werden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der Puffer kann mehrmals wiederverwendet werden und die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

Ponceau S

10 g Ponceau S, 300 g Trichloressigsäure und 300 g Sulfosalicylsäure wird mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von einem Liter aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur, und die Lösung kann mehrere Male verwendet werden.

Für den Western Blot werden ein kalter Transferpuffer (mindestens 1 l) und das Zubehör für das Herstellen des Sandwichs benötigt.

Der Aufbau des Sandwichs:

weiße Platte
dicker Schwamm
Filterpapier
Nitrocellulose
Gel
Filterpapier
dünner Schwamm
schwarze Platte

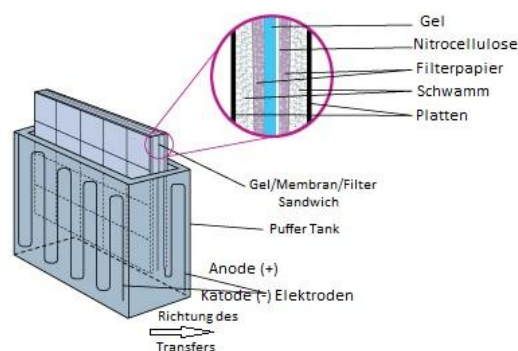


Abbildung 7: Aufbau des Sandwichs [Biotechnology, 2007-2011]

Filterpapier und Schwämme werden in eine kleine Wanne mit Transferpuffer gelegt. Die Nitrocellulosemembran wird laut Muster zugeschnitten und auch in eine extra Wanne mit Transferpuffer gelegt.

Vor dem Transfer wird das Trenngel mittels Rasierklinge entfernt.

Das Sandwich wird verriegelt und in die Transferkammer gegeben, wobei darauf zu achten ist, dass die schwarze Seite des Sandwichs zur schwarzen Seite der Kammer zeigt. Danach wird ein Eisblock in die Transferwanne gegeben und mit Transferpuffer gefüllt. Die Transferwanne wird 50-55 Minuten in den Kühlschrank gestellt.

Der Transfer erfolgt bei 0,4 Ampere, dies entspricht einer Spannung von ≥ 100 V.

3.2.2 Immunodetektion

Reagenzien und Lösungen

10 x TBS Puffer

24,2 g Tris- Base und 84,8 g NaCl werden in rund 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,4 eingestellt. Nun wird mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von einem Liter aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

Washing Buffer (TBS-T)

100 ml 10 xTBS werden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und mit 1ml Tween20 versetzt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

Blocking Buffer

2,5 g Milchpulver (Fixmilch) werden in einem 50 ml Röhrchen in Washing Buffer aufgelöst. Die Lösung wird frisch hergestellt.

Primär Antikörper

HIF-1 α : 120 kDa, Mouse IgG1, BD-Transduction Laboratories, 1:300 in 3 % BSA in TBS-T

β -Actin: 42 kDa, Mouse IgG2a, 1:3000 in 3 % BSA in TBS-T

Die primären Antikörper werden mehrmals verwendet.

Durchführung der Immunodetektion

Nach dem Transfer wird die Nitrocellulose mit Ponceaurot gefärbt und somit die Banden der Proteine sichtbar gemacht. Die Nitrocellulose wird mit Hilfe des Größenmarkers über und unter 120 kD für HIF-1 α in Streifen geschnitten und ebenso über und unter 42 kD für β -Actin. Danach werden die erhaltenen Streifen mit Wasser gewaschen und mit Blocking Buffer 60 Minuten auf den Belly Dancer inkubiert. Anschließend wird zweimal mit Washing Buffer je 5 Minuten gewaschen.

HIF-1 α Streifen werden nun in eine extra Wanne gelegt und mit dem primären Antikörper versetzt. Es handelt sich hier um einen Mouse IgG1 von BD-Transduction Laboratories, 1:300 in 3% BSA in TBS-T.

Die β -Actin Streifen werden ebenfalls in eine Wanne gelegt und der primäre Antikörper (Mouse IgG2a, 1:3000 in 3 % BSA in TBS-T) wird zugegeben.

Die Wannen werden verschlossen, auf den Belly Dancer in den Kühlschrank gestellt und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Wannen aus dem Kühlschrank genommen und die Antikörper zurück in ihre Behälter geleert. Die Nitrocellulosestreifen werden dreimal je 10 Minuten mit Washing Puffer gewaschen und anschließend mit einem sekundären Antikörper 1 Stunde inkubiert. Der sekundäre Antikörper besteht aus Ziegen- Anti-Maus IgG-HRP Konjugat; 1:10 000 in 50 ml Blocking Buffer und reicht für 2 Gele und dem Nachweis für HIF-1 α und β -Actin.

Danach werden die Streifen nochmals dreimal je 10 Minuten gewaschen und zur Messung der Chemilumineszenz zum Imager gebracht.

Proteine, die durch Elektrophorese in einem Gel aufgetrennt werden und nach einer Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran fixiert werden, werden unter Verwendung eines Chemilumineszenz Substrates auswertbar gemacht. Dieses Substrat bindet sich an das HRP Konjugat des Antikörpers. Bei dieser chemischen Reaktion wird eine elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts emittiert.

Bei β -Actin wird Super Signal (Alpha Innotech) eingesetzt, wobei die Streifen damit benetzt und mittels Chemilumineszenz im Imager gemessen werden.

HIF-1 α Streifen werden mit ChemiGlow (Alpha Innotech) benetzt und ebenfalls gemessen.

Die benetzten Blots werden in eine Plastikfolie gegeben, damit sie nicht austrocknen. Danach werden sie in die Imagerkammer gelegt, ein Foto wird gemacht, und die weiteren Belichtungszeiten werden eingestellt. Die erhaltenen Bilddaten werden ausgewertet.

Die Signalstärke der Banden wird mit dem Programm AlphaEase FC (ChemiImager 4400) bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgt über Excel und GraphPadPrism.

3.3 2,7-Dichlorofluorescein

Als ROS bezeichnet man eine Reihe von reaktiven Molekülen, die von molekularem Sauerstoff abstammen. Sie spielen bei der Immunabwehrreaktion und den Signaltransduktionen eine bedeutende Rolle. Diese Verbindungen sind hochreaktiv, kurzlebig und in niedrigen Konzentrationen in der Zelle vorhanden. Durch eine unkontrollierte ROS Produktion kommt es zum oxidativen Stress, der in der Pathogenese von Krankheiten eine tragende Rolle spielt.

Um den Stress in der Zelle zu erheben, ist die Messung des fluoreszierenden Farbstoffes 2,7-Dichlorofluorescein (DCF) eine gebräuchliche Methode. Es ist bekannt, dass dieser Farbstoff neben den verschiedenen Sauerstoffderivaten der Zelle auch mit anderen Oxidantien wie RNS reagiert. [CHEN et al., 2010].

Die Zellen werden mit 2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFH-DA), welches selbst nicht fluoresziert und membrandurchlässig ist, inkubiert. Durch Esterasen wird es deacyliert und es entsteht 2,7-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH). Dieses Molekül ist nicht mehr membrangängig und kann somit die Zelle nicht mehr verlassen. Durch eine nachfolgende Oxidation durch ROS entsteht 2,7-Dichlorofluorescein (DCF), welches fluorimetrisch bestimmt werden kann [BASS et al., 1983].

Die nachstehende Abbildung 8 zeigt den zugrundeliegenden Mechanismus.

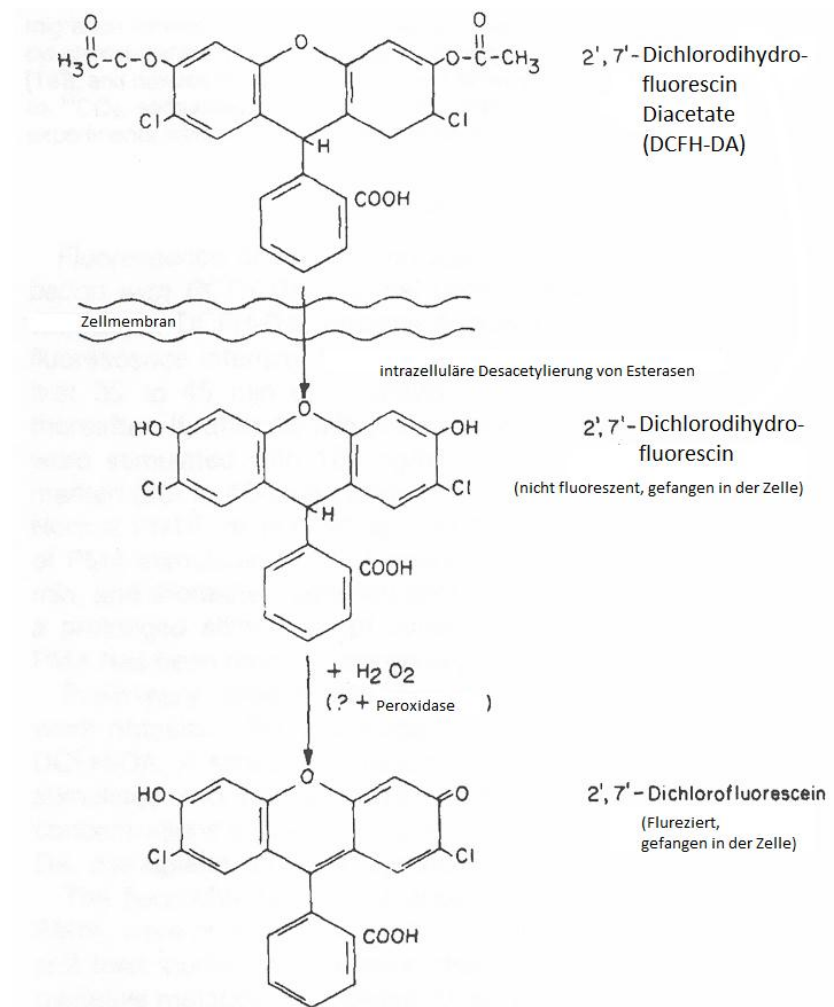


Abbildung 8: Sie zeigt den hypothetischen Mechanismus des nicht fluoreszierenden 2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFH-DA) zu dem fluoreszierenden 2,7-Dichlorofluorescein (DCF). Die Abbildung wurde modifiziert aus BASS et al., 1983.

3.3.1 2,7- Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) als Nachweis für reaktive Sauerstoffe (ROS)

Für diese Nachweismethode werden zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen verwendet. (siehe Differenzieren von THP-1 Zellen zu Makrophagen Kapitel 3.1.5.1.)

Eingesetzte Lösungen

HBSS

DCFH-DA (60 mM in Dimethylformamid, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

AAPH

2,2'-Azobis-2-Methyl-Propanimidamid-Dihydrochlorid ist eine wasserlösliche Azoverbindung welche als Generator von freien Radikalen fungiert. Meist wird sie in Studien zur Lipidperoxidation und für die Charakterisierung von Antioxidantien [NAGUCHI,et al. 1998] verwendet.

3.3.2 Versuchsaufbau

3.3.2.1 Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die AAPH-vermittelte DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen

Nach viertägiger Differenzierung der Zellen in einer 96-well Platte kann mit der Inkubation mit GYY4137 und NaHS begonnen werden. Der Mediumüberstand wird entfernt und anschließend erfolgt das Waschen der Zellen mit HBSS (37 °C). Anschließend werden die Zellen mit 20 µM DCF-DA in HBSS 30 Minuten bei 37 °C beladen. Danach folgt ein weiterer Waschschrift mit HBSS (37 °C). Die zur Inkubation verwendeten Substanzen werden in HBSS Lösung gelöst und in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellen aufgebracht und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. AAPH (2 mM) wird eingewogen und in HBBS gelöst. Nach der Inkubation wird AAPH als Startlösung aufgebracht und die Fluoreszenz unverzüglich mit dem Plattenlesegerät (Multilabel Counter, WallacVictor 1420) bei 37 °C gemessen. Die Messung erfolgt bei einer 0,1 Sekunden langen Anregung der Proben bei einer Wellenlänge von 485 nm, die Emission erfolgt bei 535 nm und wiederholt sich alle drei Minuten über eine Dauer von 4 Stunden.

3.3.2.2 Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Es werden THP-1 Makrophagen in zwei 96-well Platten mit jeweils 20 µM DCF-DA in HBSS bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Zellen gewaschen und NaHS und GYY4137 in unterschiedlichen Konzentrationen (62,5; 125; 250; 500; 1000 µM) zugefügt. Die Anfangswerte werden mit dem Fluorimeter gemessen. Sodann wird eine 96-well Platte unter Hypoxie gesetzt. Dies erfolgt durch Einsatz der Hypoxiekammer. In ihr herrscht eine hypoxische Atmosphäre von 1 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid und 94 % Stickstoff. Die Hypoxiekammer wird für vier Stunden in den

Zellinkubator gestellt. Die zweite Platte wird nach der Messung gleich in den Zellinkubator gestellt. Nach Ablauf der vier Stunden wird eine Endpunktmessung der Platten durchgeführt.

3.3.2.3 Einfluss der Belichtung von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz

Es wird 0,5 ml DCF-DA (1 mM) und 2 ml einer 10 mM NaOH 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert, um die Diacetatgruppen abzuspalten. Währendessen werden 4 mM NaHS und GYY4137 eingewogen und mit HBSS seriell verdünnt. 25 µl je well vorgewärmter HBSS (37 °C) wird in den 96-well Platten vorgelegt. Danach wird mit 25 µl je well HBSS, NaHS oder GYY4137 besetzt. Nun wird 10 ml einer 25 mM PBS mit pH 7,2 in die lichtgeschützte Lösung dazugegeben, dies entspricht einer 40 µM DCFH-Lösung.

Beide Platten werden direkt beim Fluorimeter mit 50 µl pro well DCFH versetzt. Die erste Platte wird gemessen und anschließend vier Stunden in den Zellinkubator gestellt. Nach Ablauf der vier Stunden erfolgt eine Endpunktmessung. Die zweite Platte wird im Fluorimeter fortlaufend vier Stunden lang gemessen (Extinktion 485 nm / Emission 535 nm).

3.3.2.4 Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die Eigenfluoreszenz von THP-1 Makrophagen

Die Zellen werden nach der viertägigen Differenzierung mit HBSS (37 °C) gewaschen und mit verschiedenen Konzentrationen (62,5; 125; 250; 500; 1000 µM) von NaHS und GYY4137 inkubiert. Danach wird die 96-well Platte alle drei Minuten bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm vier Stunden lang gemessen.

3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wird das Programm GraphPadPrism (Version 5) herangezogen. Der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung wird von mindestens drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Die Ergebnisse für die Proteintrennung, werden aus der Bandenintensität über das Programm Alpha EaseFC (ChemieImager 4400) ermittelt, und auf β -Aktin im Western Blot normiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

Für die Analysen werden die Methoden Western Blot und DCF-Fluoreszenz durchgeführt. Der Western Blot dient dem Nachweis bestimmter Proteine, die DCF-Methode wird verwendet um allgemein oxidativen Stress zu messen.

4.1 Einfluss von NaHS auf das HIF-1 α Protein in THP-1 Makrophagen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

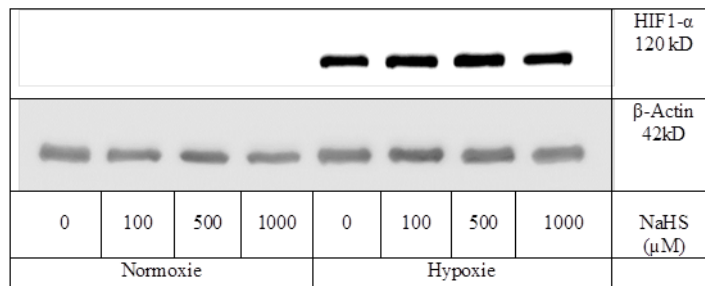
NaHS, ein Natriumsalz der Schwefelwasserstoffsäure, ist in der Lage H₂S unter physiologischen Bedingungen freizusetzen. NaHS dient als schneller Releaser für H₂S, das zu den Gasotransmittern im Körper zählt und für verschiedene physiologische Effekte im Körper verantwortlich gemacht wird.

THP-1 Zellen wurden mit PMA (160 nM) zu Makrophagen differenziert und mit verschiedenen Konzentrationen an NaHS inkubiert. Die Zellen wurden 4 Stunden parallel unter Normoxie und Hypoxie (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) im Brutschrank (5 % CO₂) gehalten.

Die relative Intensität des Signals ohne Zusatz und nach vierstündiger Inkubation unter Hypoxie wurde für die folgenden Abbildungen 1 gesetzt und dient als Bezugsgröße für die Auswertungen.

Die nachfolgende Abbildung 9 A zeigt einen repräsentativen Western Blot und 9 B die statistische Auswertung der Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (n=3), die jeweils im Dreifachansatz durchgeführt wurden.

A



B

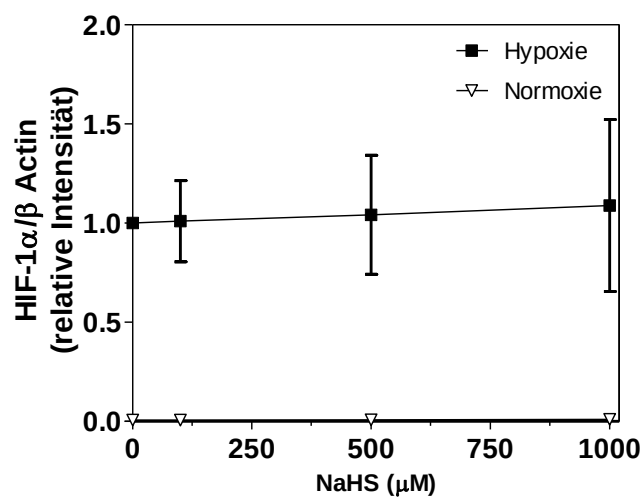


Abbildung 9: Einfluss von NaHS auf das HIF-1 α Protein in THP-1 Makrophagen unter Normoxie und Hypoxie. A) Zeigt einen repräsentativen Blot. B) Die Symbole zeigen die MW $\pm$ SD, n= 3.

Mittels Western Blot wird der Einfluss von NaHS auf die Stabilisierung vom HIF-1 α Protein unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen untersucht. Das ubiquitär vorkommende β -Aktin dient als Ladekontrolle. Unter Normoxie kann das HIF-1 α Protein nahezu nicht detektiert werden. Ein Einfluss von NaHS auf das HIF-1 α Protein kann nicht beobachtet werden. Eine vierstündige Inkubation der Zellen unter Hypoxie führt bis zu einer 147-fachen Anreicherung des HIF-1 α Proteins gegenüber jener unter Normoxie. Ein Einfluss von NaHS auf die Menge von HIF-1 α kann auch unter Hypoxie nicht beobachtet werden.

4.2 Einfluss von GYY4137 auf HIF-1 α Protein in THP-1 Makrophagen unter verschiedenen Sauerstoffkonditionen

GYY4137 ist ein langsamer H₂S Releaser sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. [WHITEMAN et al., 2010].

Für Western Blot Analysen werden THP-1 Zellen mit PMA (160 nM) zu Makrophagen differenziert und mit verschiedenen Konzentrationen an GYY4137 inkubiert. Die Zellen werden 4 Stunden parallel unter Normoxie und Hypoxie im Brutschrank gehalten. Die Zelllysate werden für Western Blot Analysen aufbereitet und die Proteine HIF-1 α und β -Actin werden detektiert. Die nachfolgende Abbildung 10 zeigt den Einfluss von GYY4137 auf die Stabilisierung von HIF-1 α Proteinen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen sowie die Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten.

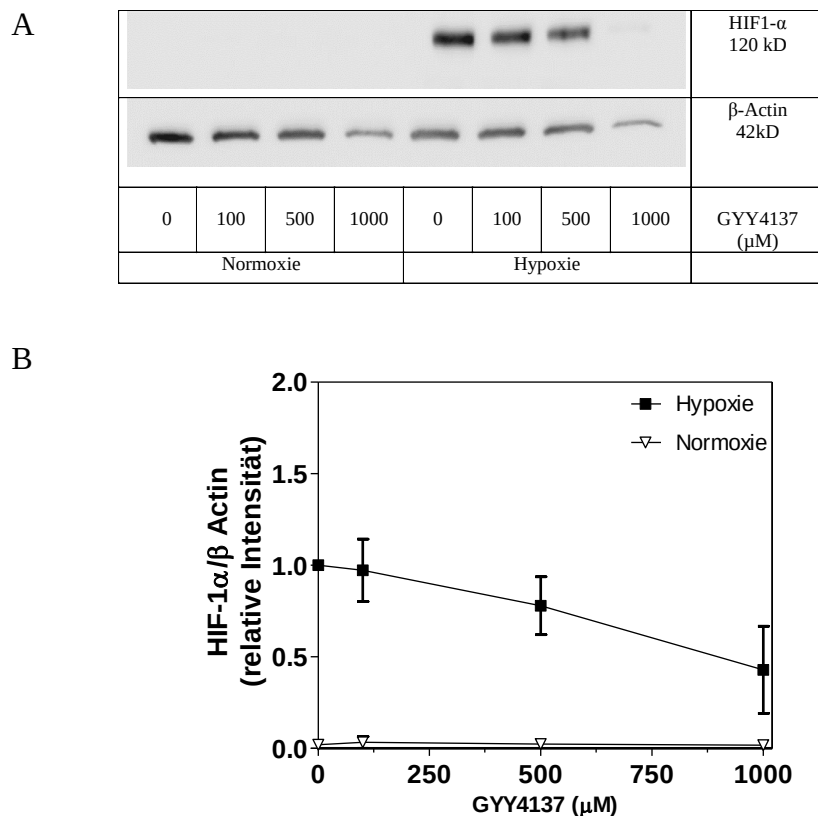


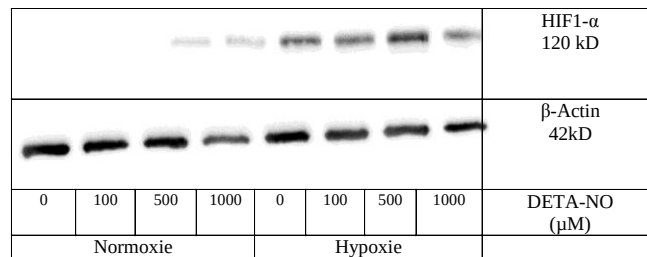
Abbildung 10: Einfluss von GYY4137 auf das HIF-1 α Protein in THP-1 Makrophagen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. A) Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von drei unabhängigen Experimenten. B) Die Symbole zeigen den MW $\pm$ SD (n=3).

GY4137 zeigt keinen Einfluss auf das HIF-1 α Protein unter Normoxie. Im Falle einer Hypoxie zeigt sich eine konzentrationsabhängige Verminderung der Anreicherung des HIF-1 α Proteins durch GY4137. Nach Inkubation der THP-1 Makrophagen mit 500 μ M GY4137 zeigt sich bereits eine deutlich geringere Akkumulation des HIF-1 α Proteins im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer GY4137 Konzentration von 1 mM unter Hypoxie sieht man einen Rückgang der Ansammlung des HIF-1 α Proteins um 43 ± 23 % der relativen Intensität im Vergleich zur Kontrolle des Proteins ohne Einsatz von GY4137.

4.3 Einfluss von DETA-NO auf das HIF-1 α Protein in THP-1 Makrophagen unter verschiedenen Sauerstoffkonditionen

Um einen möglichen Einfluss von DETA-NO auf das HIF-1 α Protein festzustellen, werden zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen (160 nM) mit verschiedenen Konzentrationen an DETA-NO inkubiert. Die Zellen werden 4 Stunden parallel unter Normoxie und Hypoxie (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) im Brutschrank (5 % CO₂) gehalten. Die nachfolgende Abbildung 11 zeigt den Einfluß von DETA-NO auf die Stabilisierung vom HIF-1 α Proteins unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen sowie die Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten.

A



B

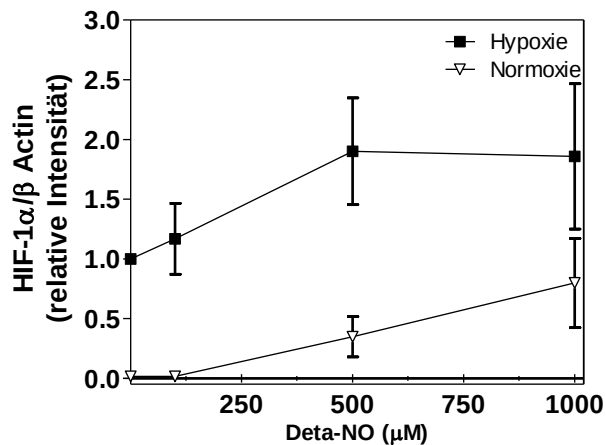


Abbildung 11: Einfluss von DETA-NO auf das HIF-1 α Protein in THP-1 Makrophagen unter Normoxie und Hypoxie. A) Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von drei unabhängigen Experimenten. B) Die Symbole zeigen den MW $\pm$ SD (n=3).

Unter Hypoxie steigt die Akkumulation des HIF-1 α Proteins bei Zusatz von 1 mM DETA-NO auf 186 ± 60 % der relativen Intensität der Kontrolle. Auch unter Verwendung von geringeren DETA-NO Konzentrationen ist ein Anstieg des HIF-1 α Proteins zu verzeichnen. Bei Einsatz von 100 μ M DETA-NO ist eine Steigerung von 17 ± 30 % und bei Einsatz von 500 μ M DETA-NO sogar eine Steigerung von 90 ± 45 % gegenüber der Kontrolle zu beobachten.

Unter Normoxie zeigt sich ein Anstieg des HIF-1 α Proteins durch Einsatz von DETA-NO ab einer Konzentration von 100 μ M. Bei Konzentrationen von 500 μ M DETA-NO beträgt der Anstieg des Proteins 35 ± 17 % der Menge, die unter hypoxischen Bedingungen ohne Zusatz gemessen wird (Kontrolle) und bei 1 mM DETA-NO werden bereits 80 ± 37 % der Kontrolle unter Hypoxie erreicht.

4.4 Messung von oxidativem Stress in THP-1 Makrophagen

Um den Stress in der Zelle zu erheben, ist die Messung des fluoreszierenden Farbstoffes 2,7-Dichlorofluorescein (DCF) eine gebräuchliche Methode.

4.5 Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die AAPH-vermittelte DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen

Um oxidativen Stress der verschiedenen Zellen zu simulieren wird AAPH als Radikalgenerator verwendet.

Die Zellen werden mit fluoreszierendem DCF-DA 30 Minuten inkubiert, gewaschen, und anschließend werden die verschiedenen Konzentrationen von NaHS und GYY4137 zugesetzt, um ihren Einfluss auf das oxidative Potential von AAPH über einen Zeitraum von vier Stunden mit dem Fluorimeter (Multilabel Counter, Wallac Victor 1420) zu messen. Die Messung findet bei einer Wellenlänge von 485 nm statt. Die Proben werden hier 0,1 Sekunden lang angeregt und die Messung der Emission erfolgt bei 535 nm und wird alle drei Minuten wiederholt.

Die Abbildung 12 zeigt die Wirkung von NaHS (linke Spalte) und GYY4137 (rechte Spalte) auf die AAPH-vermittelte DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen im Zeitverlauf. Aufgezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen im Fünffachansatz.

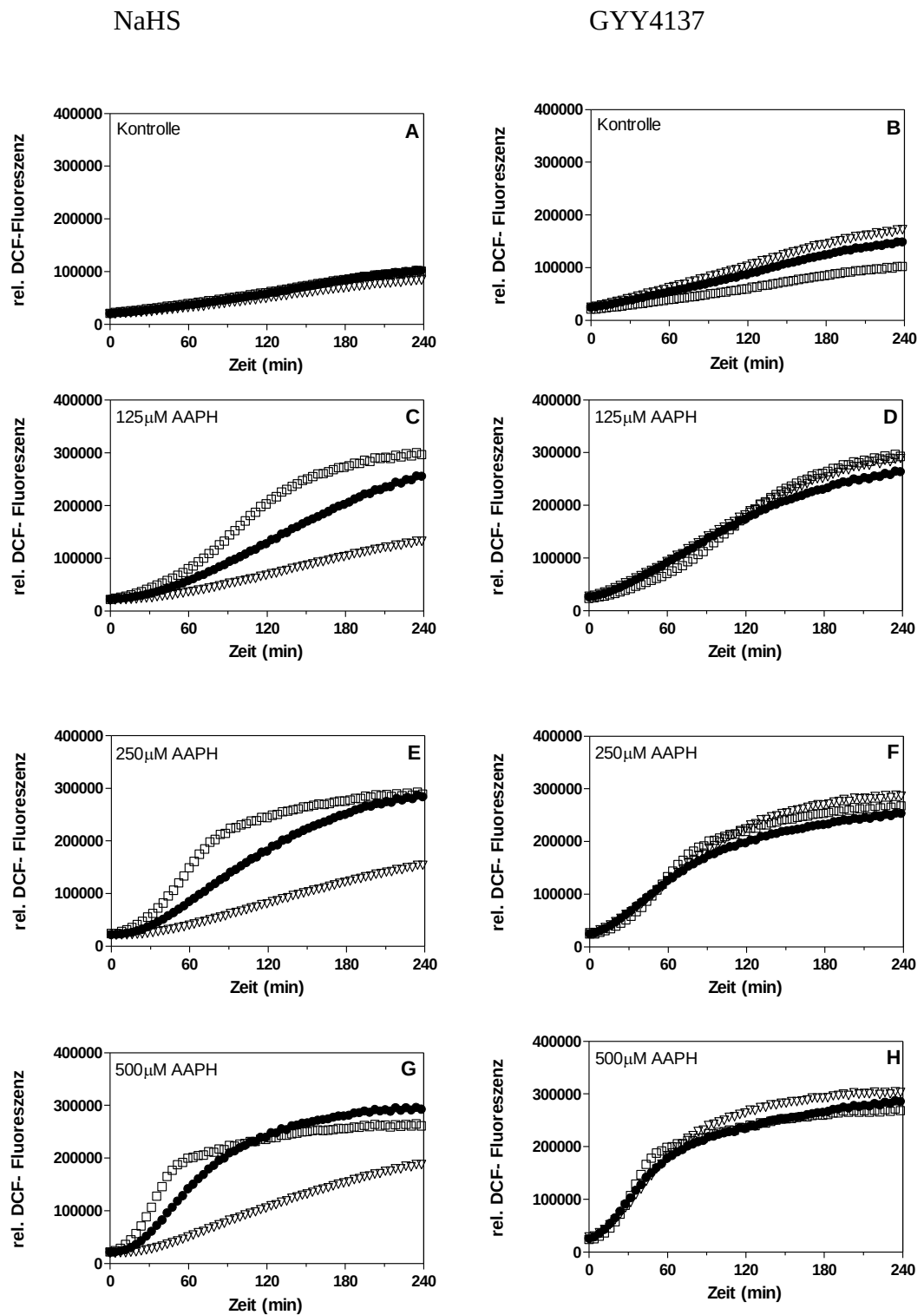


Abbildung 12: Einfluss von NaHS (A,C,E,G) und GYY4137 (B,D,F,H) auf die AAPH-vermittelte DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen unter Normoxie. Die Symbole stellen die unterschiedlichen Konzentrationen von NaHS und GYY4137 [(□) ohne, mit 100 μM NaHS bzw. GYY4137 (●) oder 1 mM (▽)] dar. Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments aus drei durchgeführten Versuchen.

AAPH ist eine wasserlösliche Azoverbindung welche als Generator von freien Radikalen fungiert. In Abbildung 12 zeigt sich, dass durch Erhöhung der AAPH Konzentration, DCFH schneller verbraucht wird und somit das Plateau früher erreicht ist. Durch Einsatz von NaHS findet eine konzentrationsabhängig Hemmung der AAPH vermittelten DCF-Fluoreszenz statt. Bei GYY4137 ist dies nicht zu beobachten. Allerdings ist bei Einsatz von GYY4137 ohne AAPH sogar eine konzentrationsabhängige Steigerung der Fluoreszenz (Abbildung 12 B) zu beobachten. Diese Beobachtung wird im folgenden näher untersucht.

4.6 Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1

Makrophagen unter normoxischen Bedingungen im Fluorimeter gemessen

THP-1 Zellen werden in 96-well Platten ausgesetzt und zu Makrophagen (PMA 160 μM) differenziert. Anschließend werden die Zellen mit DCF-DA in HBSS bei 37 °C 30 Minuten vorinkubiert. Danach werden die Zellen gewaschen und mit NaHS und GYY4137 in unterschiedlichen Konzentrationen (62,5 μM ; 125 μM ; 250 μM ; 500 μM ; 1 mM) inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung im Fluorimeter über einen Zeitraum von vier Stunden.

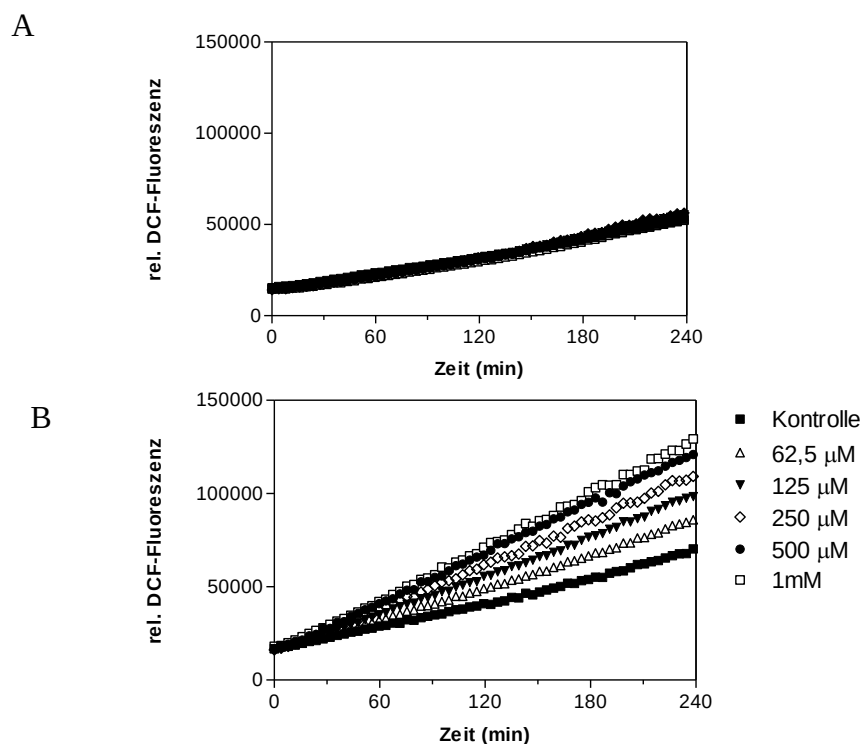


Abbildung 13: Einfluss von NaHS (A) und GYY4137 (B) in THP-1 Makrophagen auf die DCF-Fluoreszenz unter Normoxie bei einer 4-stündigen Dauermessung im Fluorometer. Die Symbole stellen die unterschiedlichen Konzentrationen von NaHS und GYY4137 dar. Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments aus drei durchgeführten Versuchen.

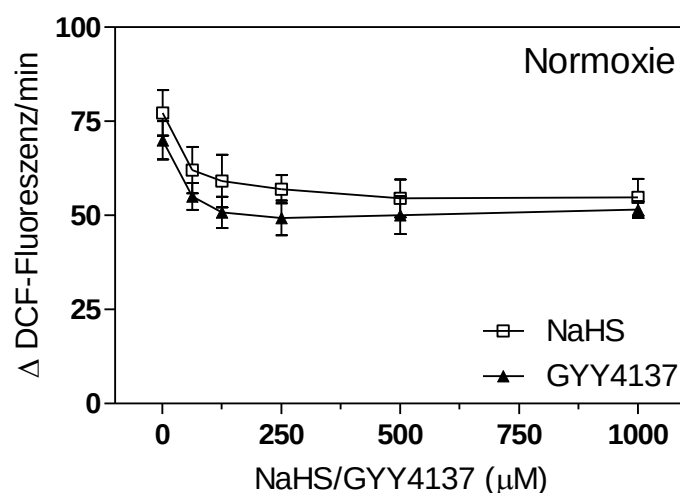
Diese Versuche zeigen bei Inkubation mit unterschiedlichen NaHS Konzentrationen (Abbildung 13 A) keinen Einfluss auf die DCF- Fluoreszenz. Im Gegensatz zeigt sich bei GYY4137 (Abbildung 13 B) ein konzentrationsabhängiger Anstieg der DCF-Fluoreszenz.

4.7 Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Im folgenden Versuch wurde überprüft, ob eine Inkubation unter Hypoxie einen Einfluss auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen hat.

THP-1 Makrophagen werden in zwei 96-well Platten mit jeweils 20 μ M DCF-DA in HBSS bei 37 °C 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend werden die Zellen gewaschen und mit NaHS und GYY4137 in unterschiedlichen Konzentrationen (62,5; 125; 250; 500; 1000 μ M) inkubiert. Die Anfangswerte werden mit dem Fluorimeter (Multilabel Counter, Wallac Victor 1420) gemessen. Dann wird eine von zwei 96-well Platten unter Hypoxie durch Einsatz einer Hypoxiekammer gesetzt. Dort herrscht eine hypoxische Atmosphäre von 1 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid und 94 % Stickstoff. Die Hypoxiekammer wird vier Stunden in den Zellinkubator gestellt. Die zweite Platte wird nach der Messung gleich in den Zellinkubator gestellt. Nach Ablauf von vier Stunden wird eine Endpunktmessung der Platten durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung 14 zeigt die DCF-Fluoreszenz pro Minute von drei voneinander unabhängigen Versuchen unter normoxischen (Abbildung 14 A) und hypoxischen (Abbildung 14 B) Bedingungen.

A



B

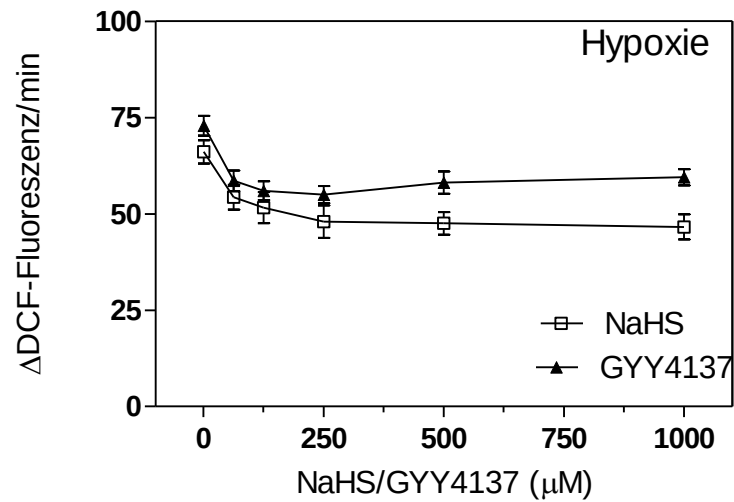


Abbildung 14: Der Effekt von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen unter Normoxie (A) und Hypoxie (B). Die Symbole zeigen den MW+/-SD von drei unabhängigen Experimenten.

Sowohl NaHS als auch GYY4137 zeigen bereits bei der niedrigsten Konzentration (62,5 μM) eine Abnahme der Fluoreszenzrate, die jedoch bei den höheren Konzentrationen nicht noch weiter abnimmt. Die Sauerstoffbedingungen (Normoxie oder Hypoxie) scheinen keinen Einfluss auf die DCF- Fluoreszenz zu haben.

4.8 Einfluss der Belichtung von NaHS und GYY4137 auf die zellfreie DCF-Fluoreszenz

Unter Punkt 4.6 wurde gezeigt, dass durch Einsatz von GYY4137 ein konzentrationsabhängiger Anstieg der DCF-Fluoreszenz erfolgt. Im folgenden Versuch wird die Belichtung von NaHS und GYY4137 auf die DCF-Fluoreszenz ohne Zellen gemessen. 0,5 ml DCF-DA (1 mM) und 2 ml einer 10 mM NaOH werden 30 Minuten lang lichtgeschützt inkubiert. Währenddessen wird 4 mM NaHS und GYY4137 eingewogen und mit HBSS seriell verdünnt. Nun wird 10 ml einer 25 mM PBS mit pH-Wert von 7,2 in die lichtgeschützte Lösung dazugegeben, damit man 40 μ M DCFH erhält.

Beide Platten werden direkt beim Fluorimeter mit 50 μ l pro well DCFH versetzt. Die erste Platte wird gemessen und für vier Stunden in den Zellinkubator gestellt. Nach Ablauf der vier Stunden erfolgt eine Endpunktmessung. Die zweite Platte wird im Fluorimeter fortlaufend vier Stunden lang bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen. Die nachstehende Abbildung 15 zeigt die DCF-Fluoreszenzrate/min von zwei unabhängigen Versuchen unter Normoxie im Zellinkubator mit Anfangs- und Endpunktbestimmung beziehungsweise bei einer vier-Stunden-non-stop-Messung im Fluorimeter. (n=2)

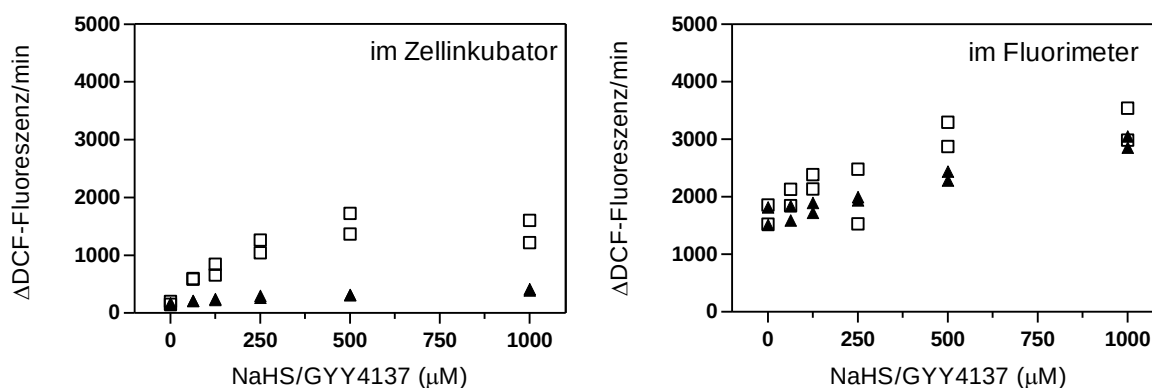


Abbildung 15: Einfluss der Belichtung von NaHS(□) und GYY4137(▲) auf die zellfreie DCF-Fluoreszenz. Links im Zellinkubator 37 °C, 5 % CO₂. Rechts im Fluorimeter (Viktor) bei 37 °C Umgebungsluft. Gezeigt werden Resultate von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Versuchsreihen, die im Zellinkubator mit Anfangs- und Endpunktmessungen durchgeführt werden, zeigen bei der Kontrolle ohne GYY4137 und NaHS eine Fluoreszenzrate von 183 ± 20 . GYY4137 (▲) zeigt im Zellinkubator keinen

Unterschied, in der DCF-Fluoreszenzrate. Hingegen führt NaHS ($\square$) zu einer erhöhten DCF- Fluoreszenz und zeigt die 4-fache Fluoreszenzrate bei 125 μM und die 6-fache bei 250; 500 und 1000 μM gegenüber der Kontrolle.

Im Fluorimeter unter Dauermessung und Belichtung alle 3 Minuten sind unterschiedliche Effekte zu beobachten. Die Kontrolle zeigt bereits eine höhere DCF-Fluoreszenz/min als bei den Versuchen im Zellinkubator. Liegen die Kontrollwerte von NaHS und GYY4137 im Zellinkubator bei ca. 180 Fluoreszenzeinheiten, so erreichen sie im Fluorimeter 1705 ± 219 Fluoreszenzeinheiten, sind also knapp um das Zehnfache höher. Ferner ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der DCF-Fluoreszenz bei beiden Substanzen im Fluorimeter zu erkennen. Dieser wurde im Zellinkubator nur bei NaHS gesehen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Versuchsreihen im Fluorimeter, unabhängig von den inkubierten Substanzen, eine viel höhere allgemeine DCF-Fluoreszenz aufweisen als im Zellinkubator. Dies lässt den Schluss zu, dass die Anregung bei 485 nm zu einer erhöhten Umwandlung von DCFH zu DCF führt und dies sowohl durch NaHS als auch GYY4137 verstärkt wird.

4.9 Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die Eigenfluoreszenz der THP-1 Makrophagen

Die Zellen werden nach 4-tägiger Differenzierung mit HBSS (37 °C) gewaschen und mit verschiedenen Konzentrationen (62,5; 125; 250; 500; 1000 μM) NaHS und GYY4137 inkubiert. Danach wird die 96-well Platte alle drei Minuten bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm vier Stunden lang gemessen. Es zeigt sich, dass die Eigenfluoreszenz der Zellen bei ca. 7000 Fluoreszenzeinheiten liegt. Die Abbildung 16 zeigt ein Experiment im Fünffachansatz aus zwei voneinander unabhängigen Versuchsreihen.

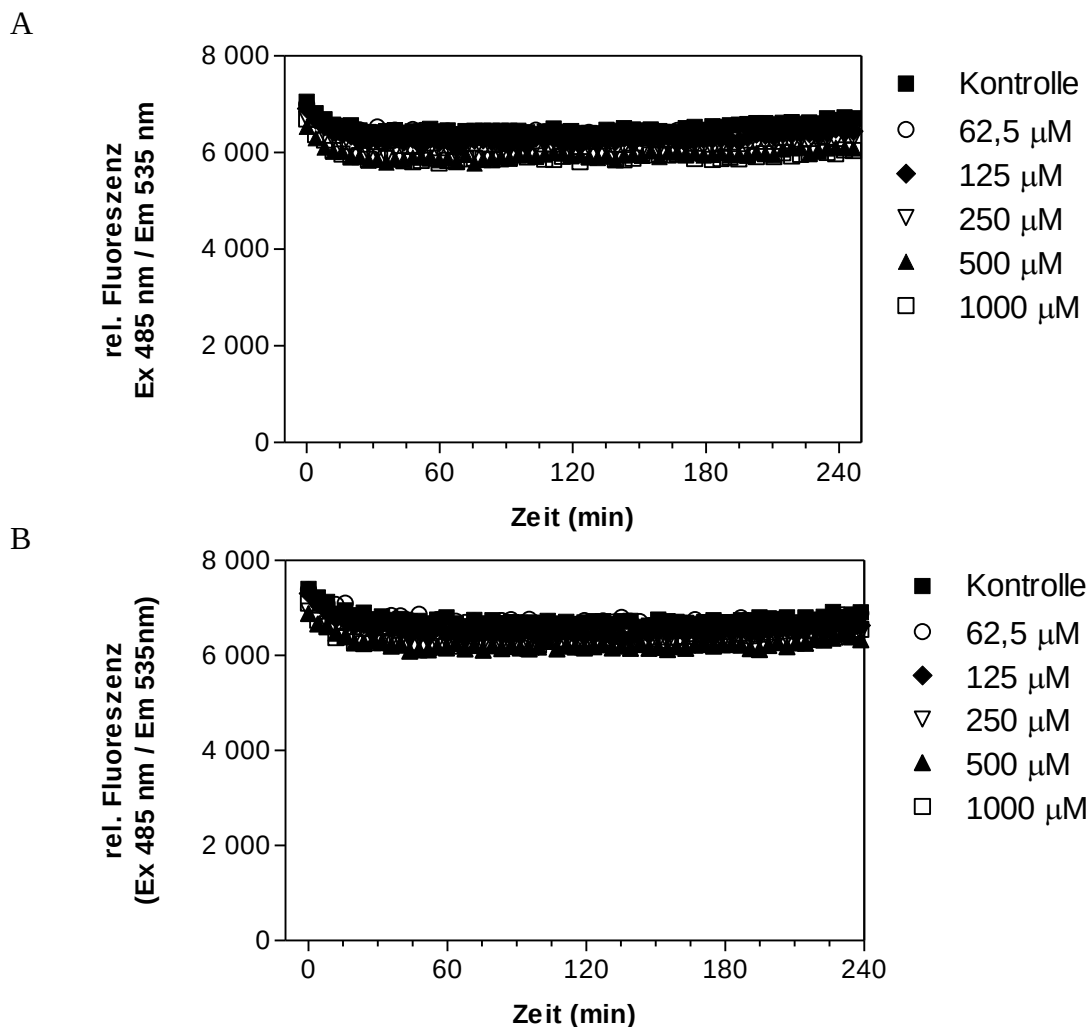


Abbildung 16: Wirkung von GYY4137 (A) und NaHS (B) auf die Eigenfluoreszenz von THP1-Makrophagen. Die Tabelle zeigt die MW eines Experiments von zwei durchgeführten im Fünffachansatz.

In den ersten 30 Minuten der Messung wird ein allgemeiner Abfall der Fluoreszenz beobachtet, welcher konzentrationsunabhängig von GYY4137 und NaHS ist. Danach bleiben die Werte über die gesamte Messperiode (vier Stunden) stabil und die Zusätze von NaHS beziehungsweise GYY4137 zeigen keinen Einfluss auf die Eigenfluoreszenz der Zelle.

5 Schlussbetrachtung

Die Ursache von Atherosklerose wird heute als multifaktorielles, chronisch-inflammatorisches Geschehen angesehen.

Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques. Sie nehmen Lipoproteine auf, werden in Schaumzellen umgewandelt und tragen zu einem lokalen, chronischen entzündlichen Prozess bei.

Es wird diskutiert, ob in den Plaques hypoxische Bedingungen herrschen [COZZI et al., 1988]. Diese Sauerstoffbedingungen könnten maßgebend an einer gemessenen Steigerung des HIF-1 α Proteins in Plaques sein.

Für die vorliegende Arbeit wurden zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen verwendet und verschiedenen Sauerstoffbedingungen ausgesetzt. Dabei wurde besonders auf die Expression von HIF-1 α Protein geachtet. Aus der Literatur ist bekannt, dass das HIF-1 α Protein als Schaltzentrale und Indikator für die Sauerstoffverfügbarkeit der Zelle fungiert. Unter normoxischen Sauerstoffbedingungen wird HIF-1 α ständig abgebaut, und unter hypoxischen Bedingungen wird dieser Abbau gehemmt und es findet eine Akkumulation des Proteins statt. Bisher sind über 200 Zielgene von HIF-1 α bekannt wie zum Beispiel der endotheliale Wachstumsfaktor, Erythropoietin, Glukosetransporter der GLUT-Familie. Diese Gene sind unter anderem an der Angiogenese, der Erythropoese und dem Glucosemetabolismus beteiligt [LIU et al., 1995].

Hypoxie, HIF und Angiogenese werden als neue Ansatzmöglichkeiten in der Behandlung von Atherosklerose gesehen, da sie stark mit der Entwicklung von Atherosklerose und Plaqueruptur in Zusammenhang gebracht werden. Ob sie eine reaktive oder kausale Rolle in der Atherogenese spielen, kann noch nicht beantwortet werden. Es wird auch diskutiert, ob die Erhöhung der adventitialen und intraplaquen Mikrogefäße eine physiologische Reaktion auf den pathophysiologischen Zustand der Arterienwand darstellt, oder ob die abweichende Struktur der Mikrogefäße zu einer Destabilisierung des Plaques führen. Hypoxie, HIF, ROS und Inflammation könnten zur Angiogenese führen [SLUIMER und DAEMEN, 2009].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen mit biologisch aktiven Gasen inkubiert und dabei wurde wiederum auf die Expression von HIF-1 α geachtet. In den Zellen des menschlichen Körpers sind biologisch aktive Gase zu finden. Diese sind für eine Reihe von biologischen Effekten verantwortlich. Stickstoffmonoxid (NO) und Schwefelwasserstoff (H₂S) gehören zu diesen Gasen. In den Versuchsreihen wurde der Einfluss von NO und H₂S auf das HIF-1 α Protein in zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen unter Normoxie als auch unter Hypoxie gemessen.

Für die Simulation von Hypoxie wurde eine Hypoxiekammer verwendet. Die Kammer wurde fünf Minuten lang mit einem Spezialgas (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) und einer Durchflussrate von 15/20 l pro Minute begast und anschließend dicht verschlossen. Diese Methode zur Generierung von hypoxischen Sauerstoffbedingungen ist in der derzeitigen Literatur häufig zu finden.

Dass erhöhte HIF-1 α Proteinwerte unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen in Makrophagen anzutreffen sind, konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden.

Unter Normoxie ist HIF-1 α nahezu gar nicht nachzuweisen. Durch Inkubation der Zellen in einer Hypoxiekammer reichert sich HIF-1 α Protein um das 50 bis 150 fache des Ausgangswertes an.

Stickstoffmonoxid (NO) steht schon lange im Fokus der Wissenschaft. Im Zusammenhang mit dem kardiovaskulären System ist NO vasodilatorisch [LI et al., 2009]. Außerdem greift NO in die Aktivität von HIF-1 α ein [BERCHNER et al., 2010].

Der Einfluss von NO auf das redox-sensitive Zielgen HIF-1 wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren berichten von einer Hemmung der Hypoxie- oder der CoCl₂-induzierten HIF-1 Aktivierung in Verbindung mit NO Donatoren [LIU et al., 1998; SOGAWA, et al., 1998] während andere eine verstärkte HIF-1 Aktivität verzeichnen [KIMURA et al., 2000]. Es ist auch bekannt, dass unter normoxischen Sauerstoffbedingungen nur eine sehr geringe Menge des HIF-1 α Proteins gefunden werden kann [BRUENE und ZHOU, 2007].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei THP-1 Makrophagen durch Inkubation mit DETA-NO (500 μM ; 1000 μM) über einen Zeitverlauf von vier Stunden und unter normoxischen Sauerstoffbindungen eine Akkumulation des HIF-1 α Proteins zu verzeichnen ist. Bei einer DETA-NO Konzentration von 100 μM konnte noch keine Akkumulation festgestellt werden.

Der Einsatz von DETA-NO führt zu einer NO-Freisetzung von $1/1000$ der Anfangskonzentration und DETA-NO hat eine Halbwertszeit von 20 Stunden. Man kann daher davon ausgehen, dass die Zugabe von 1 mM DETA-NO 1 μM NO freisetzt [KÖHL et al., 2006].

Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich wiederum eine dosis-abhängige Akkumulation des HIF-1 α Proteins. Die Mehrzahl der bis dato wissenschaftlichen Publikationen berichten über eine Hemmung des HIF-1 α Proteins unter Einsatz von NO und Hypoxie.

SANDAU et al., 2001 zeigen, dass eine HIF-1 α Akkumulation stark mit der Freisetzung von NO aus den verwendeten NO Releasern korreliert. Durch Einsatz von DETA-NO besteht eine transiente Akkumulation von HIF-1 α über einen Zeitraum von 24 Stunden, wobei das Protein nach vier Stunden die stärkste Präsenz zeigt.

NO führt in einer anderen Studie bei niedrigen Konzentrationen (unter 400 nM) zu einer Steigerung des HIF-1 α Proteins bei einer Sauerstoffkonzentration von 3 % (Hypoxie). Hingegen bleiben bei hohen Konzentrationen von NO ($> 1 \mu\text{M}$) die HIF-1 α Proteine gleich, sowohl bei normoxischen als auch bei hypoxischen Sauerstoffbedingungen [HAGEN et al., 2003].

In dieser Arbeit konnte eine Stabilisierung des HIF-1 α Proteins unter hypoxischen Bedingungen nicht beobachtet werden.

H₂S zählt auch zu den biologisch aktiven Gasen. Das Wissen über die Produktion, den Metabolismus von H₂S und deren Funktion in physiologischer und pathophysiologischer Hinsicht gewinnt immer mehr an Bedeutung.

H₂S wird als anti-apoptotisch, entzündungshemmend, antioxidativ und als kardioprotektiv beschrieben. Schwefelwasserstoff spielt auch eine kritische Rolle in mehreren pathophysiologischen Bereichen der Zellerhaltung [PAN, 2009].

Ob H₂S am Leben hält oder es schädigt, hängt von der Konzentration ab, welche in der Umgebung herrscht und vom Metabolismus im betreffenden Organismus. In hohen Dosen ist Schwefelwasserstoff letal.

Die exakte physiologische Konzentration von H₂S in den verschiedenen Geweben ist jedoch noch nicht geklärt [SZABO, 2007; OLSON, 2009].

Die unterschiedlichen Effekte von H₂S sind unter anderen auch auf die Sauerstoffkonzentrationen in der Umgebung zurückzuführen [KOENITZER et al., 2007].

Um den Einfluss von H₂S *in vitro* auf die Akkumulation von HIF-1 α in THP-1 Makrophagen unter Hypoxie und Normoxie zu messen, wurden zwei unterschiedliche H₂S Releaser verwendet.

NaHS fungiert als schneller Releaser. Er weist eine spontane H₂S Freisetzungsrate auf, die aber von geringer Zeitspanne (einige Sekunden oder Minuten) ist [WHITEMAN et al., 2010].

GY4137 ist ein langsamer Releaser und zeigt eine sukzessive Freisetzung von Schwefelwasserstoff [WHITEMAN et al., 2010]. Dadurch erfolgt eine Imitierung der biologische Freisetzung von endogenem H₂S in den Zellen [LI, et al., 2008].

Durch die unterschiedlichen Freisetzungsraten entstehen unterschiedliche Konzentrationen von H₂S. Dies führt zu Diskrepanzen für die pro- versus antiinflammatorische Rolle von H₂S in der Literatur [WHITEMAN et al., 2010].

Es besteht die Annahme, dass dies mitunter ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Akkumulation von HIF-1 α unter der Verwendung von NaHS oder GY4137 darstellt, die in dieser Arbeit festgestellt wurden.

NaHS hat auf die Akkumulation des HIF-1 α Proteins in THP-1 Makrophagen unter Normoxie keinen Einfluss.

Es zeigte sich, dass unter Hypoxie eine Anreicherung des HIF-1 α Proteins stattfindet, aber ein Einfluss von NaHS auf die Menge von HIF-1 α konnte auch unter Hypoxie nicht beobachtet werden.

Unter Normoxie zeigt GYY4137 keinen Einfluss auf das HIF-1 α Protein. Bei Inkubation mit GYY4137 unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen zeigt sich eine konzentrationsabhängige Verminderung der Anreicherung des HIF-1 α Proteins und eine 50 % ige Hemmung der HIF-1 α Anreicherung in der Gegenwart von 1 mM GYY4137.

LIU und seine Kollegen berichten über eine Steigerung von HIF-1 α bei Einsatz von H₂S unter hypoxischen Zuständen [LIU et al., 2010].

Sie wählten ein Zellmodell mit Endothelzellen aus dem Rattenhirn für ihre Experimente und die Simulation der Hypoxie wurde durch Einsatz von Cobaltchlorid generiert.

Durch die unterschiedliche Art, wie Hypoxie simuliert wurde, können diese Daten nicht mit unseren verglichen werden.

BUDDE und ROTH beobachteten eine Steigerung des HIF-1 α durch H₂S bei einer Versuchsreihe mit *C. elegans* [BUDDE und ROTH, 2010].

In dieser Arbeit wurde ein Zellmodell mit humanen zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen zur Durchführung der Experimente verwendet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Effekte von H₂S vom Metabolismus des Organismus abhängig sind [LAVU et al., 2011]. Das könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

Bei der Entstehung von Atherosklerose spielen Entzündungsreaktionen eine Rolle. Durch die Endothelschädigung in der Pathogenese der Atherosklerose kommt es zur Infiltration von Makrophagen, die im Verlauf der Krankheit zu atherosklerotischen Läsionen heranreifen. Es wird angenommen, dass in atherosklerotischen Läsionen, durch die Vergrößerung der Intima und die Verstopfung, die Sauerstoffbereitstellung

limitiert ist. Darüber hinaus kann es auch durch Erhöhung der Stoffwechselrate von aktiven Entzündungszellen zu vermehrtem Sauerstoffbedarf kommen. [MURDOCH et al., 2005]

Der Sauerstoffgehalt der Umgebung hat Auswirkungen auf die Bildung von ROS [LABONOVA und TAHANOVICH, 2006], auf die Oxidation und auf die Aufnahme von oxLDL [BOSTROM et al., 2006] in der Zelle.

Es ist wissenschaftlich anerkannt, dass bei geringem Sauerstoffvorkommen ROS gebildet werden und ein Anstieg der ROS Produktion unter hypoxischen Bedingungen zu beobachtet ist. Dies führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien im Körper und somit zu oxidativem Stress [NAKANO et al., 2005, SAVRANSKY et al., 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurde der oxidative Stress von THP-1 Makrophagen in Reaktion auf die Inkubation mit NaHS und GYY4137 unter Normoxie und Hypoxie gemessen.

Um ROS in der Zelle nachzuweisen, wurde die Messung des fluoreszierenden Farbstoffes 2,7 Dichlorofluorescein (DCF) über einen Zeitraum von vier Stunden durchgeführt. AAPH wurde als Radikalgenerator verwendet um den oxidativen Stress zu simulieren. Die Zellen wurden mit DCF-DA beladen, und AAPH führte konzentrationsabhängig zu einer Oxidation des intrazellulären DCFH zu DCF.

Die Wirkung von NaHS und GYY4137 auf die AAPH vermittelte DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen zeigte einen wesentlichen Unterschied.

NaHS hemmt konzentrationsabhängig die AAPH vermittelte DCF-Fluoreszenz bei jeder verwendeten AAPH Konzentration (125 - 500 μ M).

Unter Verwendung von GYY4137 zeigte sich unabhängig von der Höhe des generierten oxidativen Stresses durch AAPH keine Hemmung der DCF-Fluoreszenz. Ohne AAPH Einsatz führt es durch Inkubation mit GYY4137 sogar zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der DCF-Fluorezenz.

Um die Wirkung der verschiedenen Releaser in den zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen auf die DCF-Fluoreszenz aufzuzeigen, wurden 4-stündige Dauermessungen im Fluorometer durchgeführt. GYY4137 zeigte auch hier ohne AAPH eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenz, während NaHS keine zeigte.

Um einen möglichen Einfluss der Belichtung der Substanzen im Fluorometer (alle 3 Minuten erfolgte eine Anregung bei $\lambda = 485 \text{ nm}$) zu untersuchen, wurde DCF-DA mit NaOH zu DCFH gespaltet und mit NaHS beziehungsweise GYY4137 inkubiert. Ein Versuchsansatz erfolgte unter Dauermessung in Fluorimeter, eine andere wurde in den Zellinkubator gestellt und die Fluoreszenz zu Beginn und am Ende der 4 stündigen Inkubation gemessen.

Die DCF-Fluoreszenz der bloßen DCFH Lösung war bereits um das 10 fache höher, wenn sie im Fluorimeter fortlaufend belichtet und gemessen wurde. Ein zusätzlicher Anstieg kann sowohl in Gegenwart von NaHS als auch GYY4137 beobachtet werden.

Im Zellinkubator bei Anfangs- und Endpunktmessungen konnte beobachtet werden, dass NaHS die DCF-Fluoreszenz steigert, GYY4137 aber keinen Einfluss hat. Um zu überprüfen, ob NaHS beziehungsweise GYY4137 Auswirkung auf die Eigenfluoreszenz der Zellen haben, wurden diese ohne DCF-DA Beladung verfolgt. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Dies belegt die Vermutung, dass die Belichtung und die Releaser im Fluorometer Auswirkungen auf die DCF-Fluoreszenz hat.

H₂S ist ein reaktives Molekül und reagiert leicht mit anderen Verbindungen, speziell mit ROS und RNS. Es zeigte sich, dass durch diese Interaktion der beiden Moleküle ein Schutz für Proteine und Lipide entsteht, der einer Schädigung durch freie ROS/RNS entgegenwirkt [BELTOWSKI et al., 2010].

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei einer Homocystein induzierten Toxizität in glatten Gefäßmuskelzellen aber auch eine Behandlung mit NaHS eine Steigerung von ROS bewirkt [YAN et al., 2006]. Über die Wirkung von NaHS bei lichtinduzierten Stress ist bislang nichts bekannt. GYY4137 ist eine neuartige H₂S Releasersubstanz, die erst in einigen wenigen Studien verwendet wurde.

Weiters wurde überprüft, ob eine Inkubation unter Hypoxie einen Einfluss auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen hat. Da zeigte sich weder unter Normoxie noch unter Hypoxie ein Unterschied zwischen NaHS und GYY4137.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass der Effekt von H_2S auf das HIF-1 α Protein in differenzierten THP-1 Makrophagen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen abhängig vom verwendeten H_2S -Releaser ist. Bei Inkubation mit GYY4137 zeigt sich eine konzentrationsabhängige Abnahme von HIF-1 α Protein unter Hypoxie. Unter Normoxie sind keine Effekte auf das HIF-1 α Protein erkennbar. NaHS zeigt keinen Einfluss auf die Stabilisierung des HIF-1 α Proteins unter Hypoxie, und es finden sich keine Effekte von NaHS auf HIF-1 α unter Normoxie.

NO aus DETA-NO erzeugt vermehrt HIF-1 α Protein sowohl unter Normoxie als unter Hypoxie.

Ob NaHS oder GYY4137 sich pro- oder antioxidativ auf zellulären Stress auswirken können, kann mit dieser Arbeit nicht gesagt werden, da die beobachteten Effekte stark von den gewählten Experimentienbedingungen abhängen. Allerdings scheint eine 4 stündige Hypoxie keinen Einfluss auf die Zellintegrität zu haben.

6 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α ist für die Messung der Sauerstoffversorgung der Zellen verantwortlich [SEMENZA, 2003] und es wird diskutiert, ob in atherosklerotischen Plaques hypoxische Bedingungen herrschen [SILVOLA et al., 2011]. Aus der Literatur ist bekannt, dass biologisch aktive Gase wie zum Beispiel H₂S [BUDDE und ROTH, 2010] und NO [BERCHNER-PFANNSCHMIDT et al., 2010] Einfluss auf die Aktivität von HIF-1 α haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von H₂S und NO auf zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen erhoben. Dabei wurde gezielt auf die Anreicherung des Proteins HIF-1 α unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen geachtet. Zur Generierung von H₂S wurden NaHS und GYY4137 und von NO wurde DETA-NO verwendet. Weiters wurde oxidativer Stress in Zellen nach Einsatz der beiden H₂S Releaser untersucht.

Erhöhte HIF-1 α Proteinwerte unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen in Makrophagen konnten auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Eine vierstündige Inkubation der Zellen unter Hypoxie führte zu einer bis 150-fachen Anreicherung des HIF-1 α Proteins gegenüber jener unter Normoxie. Je nach verwendetem H₂S Releaser, wurden unterschiedliche Auswirkungen auf das HIF-1 α Protein beobachtet. Ein Einfluss von NaHS auf die Menge von HIF-1 α konnte nicht beobachtet werden. GYY4137 zeigte dagegen eine hemmende Wirkung auf das HIF-1 α Protein unter Hypoxie. Durch die Verwendung von DETA-NO konnte sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie ein Anstieg des HIF-1 α Proteins verzeichnet werden.

Die verschiedenen H₂S Releaser zeigten Unterschiede im Einfluss auf die DCF-Fluoreszenz in THP-1 Makrophagen. Allein die Methoden führten zu unterschiedlichen Ergebnissen, und es kann keine klare Aussage über mögliche pro- oder antioxidative Eigenschaften von NaHS und GYY4137 getroffen werden.

7 Summary

The transcription factor HIF-1 α is well known to respond to alterations in oxygen availability in cells [SEMENZA, 2003] and there is strong evidence for plaque hypoxia [SILVOLA et al., 2011]. It is known from the literature that biologically active gases such as H₂S [BUDDE and ROTH, 2010] and NO [BERCHNER-PFANNSCHMIDT et al., 2010] can influence the activity of HIF-1 α .

In the present work, we investigated the role of H₂S and NO on the expression of HIF-1 α protein under different oxygen conditions in THP-1 macrophages. We compared the effect of the fast-releasing H₂S donor, NaHS and the slow-releasing H₂S donor, GYY4137 on HIF-1 α protein in THP-1 macrophages. These donors release H₂S at different rates and therefore give rise to different concentrations of the gas over different time periods. The influence of NO generated by DETA-NO on THP-1 macrophages was also investigated. Furthermore, oxidative stress was examined in cells after the use of different H₂S releasers.

Increased HIF-1 α protein levels in macrophages due to hypoxia were confirmed in this work. We observed an accumulation of HIF-1 α protein when cells were under hypoxia for 4 hours leading to an up to 150-fold enrichment compared with cells incubated under normoxia. There was an important difference in the effect of the two H₂S donors on the HIF-1 α protein levels of cultured macrophages. Treatment of THP-1 cells with NaHS caused no effect on the amount of HIF-1 α protein, whereby administration of GYY4137 decreased HIF-1 α protein under hypoxia concentration dependently. DETA-NO showed an increase of HIF-1 α independent from oxygen conditions.

We monitored several effects of the H₂S donors on DCF-fluorescence in THP-1 macrophages. It seems that different methods led to different results, and we cannot make a clear statement concerning pro- or antioxidative properties of NaHS and GYY4137.

8 Literaturverzeichnis

- ALI, M. Y., PING, C. Y., MOK, Y. Y., LI, L., WHITEMAN, M., BHATIA, M., ET AL. (2006). Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol*, 149,625-634.
- BASKAR, B., & BIAN, J. (2011). Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *European Journal of Pharmacology*, doi:10.1016/j.ejphar.2011.01.052.
- BASS, D. A., WALLACE PARCE, J., DECHATELET, L. R., SZEJDA, P., SEEDS, M. C., & THOMAS, M. (1983). flow cytometric studies of oxidative product formation by neutophils:a graded response to membrane stimulation. *J of Immunology*, 130(4),1910-1917.
- BELTOWSKI, J., JAMROZ-WISNIEWSKA, A., & TOKARZEWSKA, D. (2010). Hydrogen Sulfide and its Modulation in Arterial Hypertension and Atherosclerosis. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 8(4),173-186.
- BERCHNER-PFANNSCHMIDT, U., TUG, S., KIRSCH, M., & FANDREY, J. (2010). Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Elsevier,Cellular Signalling*, 22,349-356.
- BERLINER, J., & HEINECKE, J. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, 20:707-727.
- BILTON, R. L., & BOOKER, G. W. (2003). The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF alpha) regulation. *Biochem*, 270,791-798.
- BIOTECHNOLOGY, S. C. (2007-2011). *www.scbt.com*. Abgerufen am 15. März 2011 von Santa Cruz Biotechnology: <http://www.scbt.com/images/gels/82698.jpg>
- BOBRYSHEV, Y. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*, 37,208-222.
- BOGEN, S., PAK, J., GARIFALLOU, M., DENG, X., & MULLER, W. (1994). Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med*, 179: 1059-1064.
- BORING, L., GOSLING, J., CLEARY, M., & CHARO, I. (1998). Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394: 894-897.
- BOSTROM, P., MAGNUSSON, B., SVENSSON, P. A., WIKLUND, O., BOREN, J., & CARRLSON, L. M. (2006). Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(8),1871-1876.
- BOULLIER, A. E. (2001). Scavenger receptors,oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 947: 214-222.

- BROWN, M., & GOLDSTEIN, J. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232:34-47.
- BRUENE, B., & ZHOU, J. (2007). Nitric oxide and superoxide: Interference with hypoxic signaling. *Cardiovascular Research*, 75,275-282.
- BUDDE, M. W., & ROTH, M. B. (2010). Hydrogen Sulfide Increases Hypoxia-inducible Factor-1 Activity Independently of von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-1 in *C.elegans*. *Molecular Biology of the Cell*, 21,212-217.
- BURKE, B., GIANNOUDIS, A., CORKE, K. P., GILL, D., WELLS, M., & ZIEGLER-HEITBROCK, L. (2003). Hypoxia-induced gene expression in human macrophages;implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol*, 163(4),1233-1243.
- BUTTERY , L., SPRINGALL, D., CHESTER, A., EVANS , T., STANDFIELD, E., PARUMS , D., ET AL. (1996). Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest*, 75: 77-85.
- CAVALLINI, D., MODOVI, B., DE MARCO, C., & SCIOSCIASANTORO, A. (1962). Inhibitory effect of mercaptoethanol and hypotauine on the desulfhydration of cysteine by cystathionase. *Arch Biochem Biophys*, 96,456-457.
- CELLETTI, F., WAUGH, J. M., AMABILE, P. G., BRENDOLAN, A., HILFIKER , P. R., & DAKE, M. D. (2001). Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*, 7,425-429.
- CHANDEL , N., MALTEPE, E., GOLDWASSER, E., MATHIEU, C., SIMON, M., & SCHUMACKER, P. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20):11715-20.
- CHEN, ZHONG, XU, CHEN, & WANG. (2010). 2'7'- Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*, 44(6),587-604.
- CHISOLM, G., & STEINBERG, D. (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic. Biol. Med.* , 28 (12), 1815-1826.
- CLINTON, S., UNDERWOOD, S., HAYES, L., SHERMAN, M., KUFE, D., & LIBBY, P. (1992). Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental. *Am J Pathol*, 140: 301-316.
- COZZI, P. J., LYON, R. T., DAVIS, H. R., SYLORA, J., GLAGOV, S., & ZARINS, C. K. (1988). Aortic wall metabolism in relation to susceptibility and resistance to experimental atherosclerosis. *J Vasc Surg*, 7(5),706-714.
- CYBULSKY, M., & GIMBRONE, JR, M. (1991). Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 251: 788-791.

- CYRUS, T., WITZTUM, J., RADER, D., TANGIRALA, R., FAZIO, S., LINTON, M., ET AL. (1999). Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest*, 103 (11),1597-604.
- DETMERS, P., HERNANDEZ, M., MUDGETT, J., HASSING, H., BURTON, C., MUNDT, S., ET AL. (2000). Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol.*, 165(6):3430-5.
- DOMBKOWSKI, R. A., RUSSELL, M. J., & OLSON, K. R. (2004). Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286,R678-R685.
- DONG, Z., CHAPMAN, S., BROWN, A., FRENETTE, P., HYNES, R., & WAGNER, A. (1998). The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 102:145–152.
- DULAK, J., JÓZKOWICZ, A., DEMBINSKA-KIEC, A., GUEVARA, I., ZDZIENICKA, A., ZMUDZINSKA-GROCHOT, D., ET AL. (2000). Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thomb Vasc Biol*, 20,659-666.
- ELROD, J. W. (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, USA39,15560-15565.
- FEBBRAIO, M., HAJJAR, D., & SILVERSTEIN, R. (2001). CD36: a class B scavengerreceptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.*, 108, 785–79.
- FIORUCCI, S., DISTRUTTI, E., CIRINO, G., & WALLACE, J. L. (2006). The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology*, 131,259-271.
- FREI, B., STOCKER, R., & AMES, B. (1988). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 85 (24), 9748-9752.
- FURNE, J., SAEED, A., & LEVITT, M. D. (2008). Whole tissue hydrogensulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol*, 295,R1479-R1485.
- GLASS, C., & WITZTUM, J. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 104: 503-516.
- GUZY, R., HOYOS, B., ROBIN, E., CHEN, H., LIU, L., MANSFIELD, K., ET AL. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab*, 1(6):401-8.
- HAGEN, T., TAYLOR, C. T., LAM, F., & MONCADA, S. (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science*, 302,1975-8.
- HANSSON, G., LIBBY, P., SCHÖNBECK, U., & YAN, Z. (2002). Innate and adaptive immunity. *Circ Res.*, 91(4):281-91.

- HENRIKSEN, T., MAHONEY, E., & STEINBERG, D. (1982). Interactions of plasma lipoproteins with endothelial cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci*, 401, 102-116.
- HRABIE, J. A., KLOSE, J. R., WINK, D. A., & ET AL. (1993). New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J Org Chem*, 58,1472-1476.
- JIANG, G., LI, T., QIU, Y., RUI, Y., CHEN, W., & LOU, Y. (2007). RNA interference for HIF-1 α inhibits foam cells formation in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 183-190.
- JIANG, G., LI, T., QIU, Y., RUI, Y., CHEN, W., & LOU, Y. (2007). RNA interference for HIF-1 α inhibits foam cells formation in vitro. *Eur J Pharmacol*, 562(3),183-190.
- JOHNSON-TIDEY, R., MCGREGOR, J., TAYLOR, P., & POSTON, R. (1994). Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol*, 144: 952-961.
- KANG, J. L., PARK, W., PACK, I. S., LEE, H. S., KIM, M. J., LIM, C. M., ET AL. (2002). Inhaled nitric oxide attenuates acute lung injury via inhibition of nuclear factor kappa B and inflammation. *J Appl Physiol*, 92,795-801.
- KIRK, E., DINAUER, M., ROSEN, H., CHAIT, A., HEINECKE, J., & LEBOEUF, R. (2000). Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 1529-1535.
- KODAMA, T., REDDY, P., KISHIMOTO, C., & KRIEGER, M. (1988). Purification and characterization of bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 85(23), 9238-9242.
- KOENIG, W., KARAKAS, M., ZIERER, A., HERDER, C., BAUMERT, J., MEISINGER, C., ET AL. (2011). Oxidized LDL and the Risk of Coronary Heart Disease: Results from the MONICA/KORA Augsburg Study. *clin. Chem.*, June-ahead of print .
- KOENITZER, J. R., ISBELL, T. S., PATEL, H. D., BENAVIDES, G. A., DICKINSON, D. A., PATEL, R. P., ET AL. (2007). Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in O₂-dependent manner . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292,H1953-H1960.
- KÖHL, R., ZHOU, J., & BRÜNE, B. (2006). Reactive oxygen species attenuate nitric-oxide-mediated hypoxia-inducible factor-1 α stabilization. *Free Radic Biol Med.*, 40(8):1430-42.
- LABONOVA, E. M., & TAHANOVICH, A. D. (2006). Hydrogen peroxide metabolism in alveolar macrophages after exposure to hypoxia and heat. *Physiol Res*, 55(5),569-575.
- LAGGNER, H., MUELLNER, M. K., SCHREIER, S., HERMANN, M., EXNER, M., GMEINER, B. M., ET AL. (2007). Hydrogen sulphide: a novel physiological inhibitor of LDL atherogenic modification by HOCl. *Free Radic Res.*, 41,741-747.

- LAVU, M., BHUSHUAM, S., & LEFER, D. J. (2011). Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*, 120, 210-219.
- LI, L., HSU, A., & MOORE, P. K. (2009). Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation- a tale of three gases! *Pharmacology & Therapeutics*, 386-400.
- LI, L., WHITEMAN, M., GUAN, Y., NEO, K., CHENG, Y., LEE, S., ET AL. (2008). Characterisation of a novel, water soluble hydrogen sulfide releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulphide. *Circulation*, 117, 2351-2360.
- LIAO, F., BERLINER, J., MEHRABIAN, M., NAVAB, M., DEMER, L., LUSIS, A., ET AL. (1991). Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. *J Clin Invest*, 87: 2253-2257.
- LIBBY, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868-74.
- LING, L., HSU, A., & MOORE, P. (2009). Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and inflammation - a tale of three gases! *Pharmacology & Therapeutics*, 123, 386-400.
- LINTON, M., & FAZIO, S. (2001). Class A scavenger receptors, macrophages, and. *Curr. Opin. Lipidol.*, 12: 489-495.
- LINTON, M., & FAZIO, S. (2003). Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27 Suppl 3: S35-S40.
- LIU, X., PAN, L., ZHUO, Y., GONG, Q., ROSE, P., & ZHU, Y. (2010). Hypoxia-Inducible Factor-1 α Is Involved in the Pro-angiogenic Effect of Hydrogen Sulfide under Hypoxic Stress. *Biol Pharm Bull*, 33(9), 1150-1154.
- LIU, Y., COX, S. R., MORITA, T., & KOUREMBANAS, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 77: 638-643.
- MASSOVA, I., KOTRA, L. P., FRIDMAN, R., & MOBASHERY, S. (1998). Matrix metalloproteinases: Structures, evolution, and diversification. *Faseb J*, 12, 1075-1095.
- MERTENS, A., & HOLVOET, P. (2001). Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *Faseb J*, 15(12); 2073-84.
- MURAD, F. (2006). Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*, 355, 2003-11.
- MURDOCH, C., MUTHANA, M., & LEWIS, C. E. (2005). Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol*, 175(10), 6257-6263.

- NAITO, M., HAYASHI, S., YOSHIDA, H., NISHIKAWA, S., SHULTZ, L., & TAKAHASHI, K. (1991). Abnormal differentiation of tissue macrophage populations in 'osteopetrosis' (op) mice. *Am J Pathol*, 139:657-667.
- Nakano, D., Hayashi, T., Tazawa, N., Yamashita, C., Inamoto, S., Okuda, N., et al. (2005). Chronic hypoxia accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Hypertens Res*, 28(10),837-845.
- NAVAB, M., BERLINER, J., WATSON, A., HAMA, Y., TERRITO, M., LUSIS, A., ET AL. (1996). The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review basedon the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 16:831-842.
- NIU, X., YANG, X., HOSHIAI , K., TANAKA, K., SAWAMURA, S., KOGA, Y., ET AL. (2001). Inducible nitric oxide synthase deficiency does not affect the susceptibility of mice to atherosclerosis but increases collagen content in lesions. *Circulation*, 103: 1115-1120.
- PAN, T. T., CHEN, Y. Q., & BIAN, J. S. (2009). All in the timing: A comparison between the cardioprotection induced by H2S preconditioning and post-infarction treatment. *Eur J Pharmacol*, 616,160-165.
- PETRI, B., & BIXEL, M. (2006). Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS. j.*, 273(19):4399-407.
- POSTON, R., HASKARD, D., COUCHER , J., GALL , N., & JOHNSON-TIDEY , R. (1992). Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* , 140(3):665-73.
- RED. (2011). *DocCheck Medical Services GmbH*. Abgerufen am 11. März 2011 von <http://www.medicalpicture.de/medicalPicture/images/results.cfm?currentPage=3&imagesInRow=4&EXCLUDEAGENCIES=0&SEARCHWITHIN=false&LANGUAGE=1&ISDISTRIBUTED=0&PHONO=1059&AGENCY=0&imagesOnPage=100>
- RICHARD, D., BERRA, E., & POUYSSEGUR, J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 275(35):26765-71.
- ROSALES, C., & JULIANO, R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leukoc Biol.*, 57(2):189-98.
- ROSENFELD, M., YLÄ-HERTTUALA, S., LIPTON, B., ORD , V., WITZTUM, J., & STEINBERG, D. (1992). Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol*, 140(2):291-300.
- SALCEDA, S., & CARO, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1-alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions.Its

- stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, 272:22642-22657.
- SAVRANSKY, V., NANAYAKKARA, A., LI, J., BEVANS, S., SMITH, P. L., RODRIGUEZ, A., ET AL. (2007). Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 175(12),1290-1297.
- SEENATH, M., ROBERTS, D., CAWTHORNE, D., SAUNDERS, M., ARMSTRONG, G., O'DWYER, S., ET AL. (2008). Reciprocal relationship between expression of hypoxia inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and the pro-apoptotic protein bcl-2 in ex vivo colorectal cancer. *Br J Cancer*, 99(3):459-63.
- SEMENZA, G. (2003). Targeting HIF1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3:721-32.
- SILBERNAGL, S., & LANG, F. (2005). Atherosklerose. In S. Silbernagl, & F. Lang, *Taschenatlas der Pathophysiologie* (S. 236-238). Stuttgart: Thieme Verlag.
- SILVOLA, J., SARASTE, A., FORSBÄCK, S., LAINE, V., SAUKKO, P., HEINONEN, S., ET AL. (2011). Detection of hypoxia by [18F]EF5 in atherosclerotic plaques in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 31(5):1011-5.
- SLUIMER, J. C., & DAEMEN, M. J. (2009). Novel concepts in atherogenesis:angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol*, 218,7-29.
- SLUIMER, J. C., GASC, J. M., VAN WANROIJ, J. L., KISTERS, N., GROENEWEG, M., SOLLEWIJN GELPKE, M. D., ET AL. (2008). Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol*, 51(13),1258-1265.
- SLUIMER, J. C., GASC, J. M., VAN WANROIJ, J. L., KISTERS, N., GROENEWEG, M., SOLLEWIJN GELPKE, M. D., ET AL. (2008). Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol*, 51(13);1258-65.
- STEINBERG, D. (1997). Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, 95 (4), 1062-1071.
- STEINBERG, D., PARTHASARATHY, S., CAREW, T., KHOO, J., & WITZTUM, J. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 320: 915-924.
- STIPANUK, M. H. (1982). Characterisation of the enzymatic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J.*, 206,267-277.
- STRÖBINGER, N. (2009). *Stabilisierung von HIF-1alpha durch oxidativ modifiziertes LDL in THP-1 Zellen und seine Auswirkung auf die Expression ausgewählter Zielgene*. Wien: Diplomarbeit Universität Wien.

- STUEHR, D. J. (2004). Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr*, 134(10Suppl),2748S-2751S.
- TAKAHASHI, K., TAKEYA, M., & SAKASHITA, N. (2002). Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc*, 35: 179-203.
- TSCHUCHIYA S, Y. M., YAMAGUCHI Y, K. Y., T, K., & K., T. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res*, 42:1530-1536.
- TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, Y., KONNO, T., & TADA, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 275: 11278-11283.
- VINK, A., SCHOENEVELD, A. H., LAMERS, D., HOUBEN, A. J., VAN DER GROEP, P., VAN DIEST, P. J., ET AL. (2007). HIF-1alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages. *Atherosclerosis*, 195,e69-e75.
- VINK, A., SCHONEVELD, A. H., LAMERS, D., HOUBEN, A. J., VAN DER GROEP, P., VAN DIEST, P. J., ET AL. (2007). HIF-1alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages. *Elsevier*, 195,e69-e75.
- WANG, R. (2009). Is H₂S a Stinky Remedy for Atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 29,156-157.
- WANG, X., & SEMENZA, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 117:2216-2224.
- WEBB, G. D., LIM, L. H., OH, V. M., YEO, S. B., CHEONG, Y. P., ALI, M. Y., ET AL. (2008). Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery. *J Pharmacol Exp Ther*, 324,876-882.
- WHITE, C., BROCK, T., CHANG, L., CRAPO, J., BRISCOE, P., KU, D., ET AL. (1994). Superoxide and peroxynitrite in. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1044-1048.
- WHITEMAN, M., LI, L., ROSE, P., TAN, C.-H., PARKINSON, D., & MOORE, P. K. (2010). The Effect of Hydrogen Sulfide Donors on Lipopolysaccharide-Induced Formation of Inflammatory Mediators in Macrophages. *Antioxid Redox Signal*, 12(10):1147.
- WHITEMAN, M., & MOORE, P. K. (2009). Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? *J Cell Mol Med*, 13,488-507.

- WHITEMAN, M., & MOORE, P. K. (2009). Hydrogen sulfide and the vasculature: A novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? *J Cell Mol Med*, 13, 488-577.
- WHITEMAN, M., LING, L., ROSE, P., CHOON-HONG, T., PARKINSON, D. B., & MOORE, P. K. (2010). The Effect of Hydrogen Sulfide Donors on Lipopolysaccharide-Induced Formation of Inflammatory Mediators in Macrophages. *Antioxidants & Redox signaling*, 12(10), 1147-1154.
- WHO. (09. Jänner 2011). *WHO, Cardiovascular diseases (CVDs) Fact sheet N°317 January 2011*. Abgerufen am 09. März 2011 von <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
- WOOD, J., JOHNSON, J., MATTIOLI, L., & GONZALEZ, N. (1999). Systemic hypoxia promotes leukocyte-endothelial adherence via reactive oxidant generation. *J Appl Physiol*, 87(5):1734-40.
- YAN, S. K., CHANG, T., WANG, H., WU, L., WANG, R., & MENG, Q. H. (2006). Effects of hydrogensulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 351, 485-491.
- YANG, G., SUN, X., & WANG, R. (2004). Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *FASEB J*, 18, 1782-1784.
- ZIBARA, K., CHIGNIER, E., COVACHO, C., POSTON, R., CANARD, G., HARDY, P., ET AL. (2000). Modulation of expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in aortic arch lesions of apolipoprotein E-deficient compared with wild-type mice. *Thromb Vasc Biol*, 20: 2288-2296.

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Praschberger Monika
Adresse: Simmeringer Hauptstraße 88
1110 Wien
Telefonnummer: 0660/25 26 454
E-mail: moni@ersterstock.com
Geburtsdatum: 02.05.1984
Geburtsort: Kufstein
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1998 – 2003 HBLA für Land- und Ernährungswissenschaft Kematen (Tirol)

2003 Juni Reifeprüfung

2003 Oktober Lehramt für ernährungswissenschaftlichen und hausökonomischen
Fachunterricht

2004 März Studium der Ernährungswissenschaft Universität Wien

Wahlschwerpunkt im 2.Abschnitt Psychologie der
Ernährung/Ernährungsberatung

2010 April - laufend Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Medizinische Chemie
und Pathobiochemie, Medizinische Universität Wien

Studienbezogene Tätigkeiten und Erfahrungen:

- Zeitraum: Diätologenkongress 15. - 16. März 2007 und
Diätologenkongress 13. - 14. März 2008
- Firma: Kelloggs Österreich
- Tätigkeit: Betreuung und Beratung
-
- Zeitraum: 12. März 2008
- Firma: Edith Kubiena Diätologien
- Tätigkeit: Kochworkshop für Lehrlinge der Ersten Bank
-
- Zeitraum: Mitte Juli – Anfang August 2008 (20 Tage) und
Mitte Juli – Anfang August 2009 (20 Tage)
- Firma: Sozialversicherungsanstalt der Bauern
- Tätigkeit: Gruppengespräche für richtige Ernährung in Theorie und
Praxis für übergewichtige Kinder (Fit ins Leben Camp)
-
- Zeitraum: Wintersemester 2010 – 2 monatiges Praktikum
- Firma: Institut für Medizinische Chemie und Pathobiochemie,
Medizinische Universität Wien
- Methoden: Western Blot, Zellkultur, Messung von reaktiven
Sauerstoffspezien
-
- Zeitraum: Oktober 2010 – laufend
- Firma: Medizinische Universität Wien und Hauptuniversität
Wien
- Tätigkeit: Tutor
- Methoden: Biochemische Übungen für Ernährungswissenschaftler
und Praktikum im Block 13 (Ernährung und Verdauung für
Mediziner)

Sprachkenntnisse:

Englisch: fließend in Wort und Schrift

Italienisch: Grundkenntnisse

Sonstiges:

Auslandsaufenthalt: Juni 2001 – Oktober 2001
Housekeeping USA/ Oregon

EDV-Kenntnisse: Word, Excel und Power Point
Graph Pad Prism, Chemi Imager 4400
Internet und E-mail