



universität
wien

Diplomarbeit

Einfluss von oxidiertem Lipoprotein geringer Dichte
(oxLDL) auf die intrazelluläre Cholesterolkonzentration und
die Auswirkung auf die Proteinexpression von SR-BI und
HIF-1 α in THP-1 Makrophagen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin: Caroline Tufaro

Matrikel-Nummer: 0301088

Studienrichtung: Ernährungswissenschaften

Betreuer: Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg

Wien, am 8. Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Atherosklerose	3
2.1.1 Definition und Risikofaktoren	3
2.1.2 Hypothesen zur Entstehung der Atherosklerose	4
2.1.3 Monozytenrekutierung und Migration in die Intima	4
2.1.4 Schaumzellbildung	6
2.1.5 Bildung von fibrösen Plaques	6
2.1.6 Bildung einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion	7
2.1.7 Transport und Metabolismus von Cholesterol	8
2.1.8 Die Rolle von oxidiertem LDL in der Entstehung der Atherosklerose	9
2.1.8.1 Low Density Lipoprotein (LDL)	9
2.1.8.2 Atherogene Wirkung von modifiziertem LDL	10
2.1.9 Verschiedene Mechanismen der LDL-Modifikation	11
2.1.9.1 LDL-Oxidation <i>in vivo</i>	11
2.1.9.2 LDL-Oxidation <i>in vitro</i>	12
2.1.10 Die oxLDL Aufnahme durch den Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI)	14
2.1.11 Die Bedeutung des HIF-1 α Proteins in der Atherosklerose	16
2.1.12 N-acetyl-L-cystein (NAC)	19
3 Material und Methoden	23
3.1 Zellkultur	23
3.1.1 THP-1 Zellen	23
3.1.2 Sterile Arbeitstechnik	23

3.1.3	Züchten der Zellen	23
3.1.4	Herstellen des Zellkulturmediums RPMI-1640	24
3.1.5	Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität	24
3.1.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
3.2	Bearbeitung der Zellen für Versuche	25
3.2.1	Verwendete Puffer und Stammlösungen	25
3.2.2	Differenzierung von THP-1 Zellen zu Makrophagen	26
3.2.3	Oxidative Modifizierung von LDL	26
	3.2.3.1 LDL-Oxidation mit Kupfersulfat	26
	3.2.3.2 LDL-Oxidation mit Natriumhypochlorit	26
3.2.4	Inkubation differenzierter THP-1 Zellen mit nLDL, oxLDL und NAC	27
3.2.5	Lysieren von Zellen für Western Blot	27
3.3	Isolierung und Analyse der Lipoproteine	28
3.3.1	Lipoprotein Präparation durch sequentielle Ultrazentrifugation	28
3.3.2	Entsalzen der Lipoproteine mittels Dialyse	29
	3.3.2.1 Durchführung	29
3.3.3	Proteinbestimmung des LDL mit der Bradford Methode	30
3.3.4	Reinheitsüberprüfung der Lipoproteine mittels Elektrophorese	30
	3.3.4.1 Etherextraktion für SDS-PAGE	31
	3.3.4.2 Trennung der Lipoproteine mit SDS Polyacrylamidgel	31
3.4	Messung der mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (TBARS)	33
3.4.1	Prinzip der Messung	33
3.4.2	Herstellung der Thiobarbitursäure-Lösung	33
3.4.3	Durchführung der TBARS-Messung	33
3.5	Proteinbestimmung nach der Bradford Methode	34
3.5.1	Prinzip der Messung	34
3.5.2	Durchführung der Proteinbestimmung	35
3.6	Intrazelluläre Cholesterolmessung mit HPLC	36
3.6.1	Prinzip der Messung	36
3.6.2	Verwendete Lösungen	36
3.6.3	Lipidextraktion	37
3.6.4	Verseifung	37
3.6.5	Vorbereitung der Proben für die HPLC-Messung	38
3.6.6	Bedienung des HPLC-Gerätes	38

3.6.7	Reinigung der HPLC-Säule nach einem Lauf	38
3.6.8	Messung der Reinsubstanzen	38
3.6.9	Messung von intrazellulärem und extrazellulärem Cholesterol . . .	39
3.7	Western Blot	40
3.7.1	SDS-Gel Elektrophorese	40
3.7.1.1	Herstellen von Polyacrylamidgelen	41
3.7.1.2	Vorbereitung der Proben	42
3.7.1.3	Beladung der Gele und Trennung der Proteine	42
3.7.2	Western Transfer Blotting	42
3.7.3	Immunoblotting	43
3.7.4	Detektion	45
3.7.5	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse	47
4.1	THP-1 Zelldifferenzierung mit PMA	47
4.2	Zellmorphologische Veränderung durch modifiziertes LDL in THP-1 Makrophagen	48
4.3	OxLDL-verursachte MDA Freisetzung in THP-1 Makrophagen	49
4.4	Einfluss von oxLDL auf die Proteinmenge von THP-1 Makrophagen . . .	50
4.5	Bestimmung von intrazellulärem Cholesterol in THP-1 Zellen mittels HPLC	51
4.5.1	Interner Standard Ergosterol	51
4.5.2	Messung der Reinsubstanz Cholesterol	52
4.5.3	Repräsentative Chromatogramme der mit LDL behandelten THP-1 Zellen	52
4.6	Bestimmung von freiem und totalem Cholesterol in THP-1 Zellen	54
4.7	Einfluss von oxLDL auf die intrazelluläre Cholesterolkonzentration . . .	56
4.8	Messung von intrazellulärem Cholesterol in der PBS-Waschlösung	57
4.9	Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen an NAC auf die HIF-1 α und SR-BI Proteinexpression in mit oxLDL-inkubierten THP-1 Makrophagen	59
4.9.1	Einfluss von NAC auf die oxLDL induzierte MDA-Freisetzung von THP-1 Makrophagen	60
4.9.2	Einfluss verschiedener Konzentrationen an NAC auf die Proteinexpression von SR-BI und HIF-1 α in THP-1 Makrophagen . . .	61
4.9.2.1	Expression von SR-BI Protein in THP-1 Makrophagen	61
4.9.2.2	Expression von HIF-1 α Protein in THP-1 Makrophagen	62

5	Schlussbetrachtung	63
6	Zusammenfassung	73
7	Summary	75
8	Danksagung	77
9	Curriculum Vitae	79
	Literaturverzeichnis	81

Abbildungsverzeichnis

2.1	<i>Adhäsion und Migration von Monozyten in die Intima [GLASS und WITZTUM, 2001]</i>	6
2.2	<i>Plaqueruptur und Thrombusbildung [GLASS und WITZTUM, 2001]</i> . . .	7
2.3	<i>Schematische Darstellung eines LDL-Partikels</i>	9
2.4	<i>HIF-1 Regulation unter Normoxie und Hypoxie [CARROLL und ASHCROFT, 2005]</i>	17
2.5	<i>Chemische Struktur von L-Cystein (links) und NAC (rechts)</i>	19
2.6	<i>Angriffspunkte von N-acetylcystein auf reaktive Sauerstoffspezies [TOSIOS und MEHLHORN, 2004]</i>	20
3.1	<i>Mit Coomassie-gefärbtes SDS-Gel einer HDL- und LDL-Fraktion</i>	32
3.2	<i>Reaktion von Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd</i>	33
3.3	<i>Repräsentative BSA-Standardgerade</i>	35
3.4	<i>HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von intrazellulärem Cholesterol</i> . .	36
3.5	<i>Chemische Struktur von Cholesterol und Ergosterol</i>	39
3.6	<i>Aufbau eines Western Blot-Sandwiches</i>	43
4.1	<i>THP-1 Monozyten (a) und durch PMA Stimulierung zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen (b)</i>	47
4.2	<i>THP-1 Makrophagen (a) nach einer Inkubation mit Cu²⁺-oxLDL (Schaumzellbildung) (b) und unbeeinflusste Zellmorphologie durch Inkubation mit HOCl-oxLDL und nLDL (c,d)</i>	48
4.3	<i>MDA-Freisetzung in differenzierten THP-1 Zellen nach einer 18 Stunden Inkubation mit nLDL, Cu²⁺- und HOCl-oxLDL (jeweils 100 µg/ml) bei 37 °C im Vergleich zu einer Kontrolle (2 mg/ml BSA). n = 4, MW ± SD</i> .	49
4.4	<i>Proteinkonzentration in differenzierten THP-1 Zellen nach 18-stündiger Behandlung mit 100 µg/ml nLDL, Cu²⁺- und HOCl-oxLDL im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA). n = 4, MW ± SD</i>	50
4.5	<i>HPLC-Peakfläche von Ergosterol in An- oder Abwesenheit von Zellen. n = 2, MW ± SD</i>	51
4.6	<i>HPLC-Messung von verschiedenen Cholesterolkonzentrationen</i>	52

4.7	<i>Chromatogramm von THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 2 mg/ml BSA (Kontrolle)</i>	53
4.8	<i>Chromatogramm von THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml (nLDL)</i>	53
4.9	<i>Chromatogramm von THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml (Cu²⁺-oxLDL)</i>	54
4.10	<i>Chromatogramm von THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml (HOCl-oxLDL)</i>	54
4.11	<i>Die Menge des freien Cholesterols in THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml nLDL und Cu²⁺-oxLDL im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA). Dieser Versuchsansatz wurde keiner alkalischen Verseifung unterzogen. n = 3, MW ± SD</i>	55
4.12	<i>Die Menge des totalen Cholesterols in THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml nLDL und Cu²⁺-oxLDL im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA), nach alkalischer Verseifung. n = 3, MW ± SD</i>	55
4.13	<i>Die Menge der Cholesterylester in THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml nLDL und Cu²⁺-oxLDL im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA). Der Anteil der Cholesterylester ergibt sich durch die Differenz des freien Cholesterols von totalem Cholesterol. n = 3, MW ± SD</i>	56
4.14	<i>Auswirkungen einer Inkubation mit 100 µg/ml nLDL, Cu²⁺- und HOCl-oxLDL auf den Gesamtcholesterolgehalt von THP-1 Makrophagen. *** p <0,001 HOCl-oxLDL vs. Kontrolle; ** p <0,01 HOCl-oxLDL vs. nLDL; n = 4, MW ± SD</i>	57
4.15	<i>HPLC-Messung von intrazellulärem Cholesterol in der PBS-Waschlösung von nLDL, Cu²⁺- und HOCl-oxLDL (100 µg/ml) inkubierten Zellen im Vergleich mit dem Gesamtcholesterol.</i>	58
4.16	<i>Repräsentative Western Blot-Banden zur Detektion der Proteine HIF-1α, SR-BI und β-Aktin in THP-1 Makrophagen</i>	59
4.17	<i>Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen an NAC (0,1; 1; 10 mM) auf die oxLDL induzierte MDA-Entstehung in differenzierten THP-1 Zellen. n = 3, MW ± SD</i>	60
4.18	<i>Einfluss verschiedener Konzentrationen von NAC auf die SR-BI Proteinexpression bei Cu²⁺-oxLDL (100 µg/ml), BSA (2 mg/ml, Kontrolle) und mit nLDL (100 µg/ml) behandelten THP-1 Zellen im Vergleich zur 100 % gesetzten nLDL Probe ohne NAC. n = 3, MW ± SD</i>	61

4.19 *Einfluss verschiedener Konzentrationen von NAC auf die HIF-1 α Proteinexpression bei Cu²⁺-oxLDL (100 μ g/ml), BSA (2 mg/ml, Kontrolle) und mit nLDL (100 μ g/ml) behandelten THP-1 Makrophagen im Vergleich zur 100 % gesetzten Cu²⁺-oxLDL Probe ohne NAC. n = 3, MW \pm SD 62*

Tabellenverzeichnis

2.1	<i>Risikofaktoren der Atherosklerose [LUSIS, 2000]</i>	3
3.1	<i>unterschiedliche Dichte der Lipoproteinfraktionen</i>	28
3.2	<i>Pipettierschema: Standardgerade zur Bestimmung der LDL - Protein- konzentration</i>	30
3.3	<i>Pipettierschema zur Herstellung von 1,5 mm dicken SDS-Polyacrylamid- Gelen</i>	32
3.4	<i>Pipettierschema: Standardgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	34
3.5	<i>Pipettierschema eines SDS-Polyacrylamidgels mit einer Dichte von 0,75 mm</i>	41

Abkürzungsverzeichnis

acLDL	acetyliertes LDL (acetylated LDL)
AO	Antioxidantien
Apo	Apoprotein
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Bovine Serumalbumin
Cu ²⁺ -oxLDL	Kupfersulfat oxidiertes LDL
DMSO	Dimethylsulphoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure (ethyleneglycoltetraacetic acid)
FCS	fötale Kälberserum (fetal calf serum)
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (high-density lipoprotein)
HIF-1	Hypoxie induzierter Faktor 1 (hypoxia inducible factor 1)
HIF-1 α	Hypoxie induzierter Faktor 1 α (hypoxia inducible factor 1 α)
HOCl-oxLDL	Hypochlorit oxidiertes LDL
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (high pressure liquid chromatography)
HRE	Hypoxie responsive Elemente (hypoxia responsive elements)
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (intercellular adhesion molecule 1)
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor 1)
IL	Interleukine
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (low-density lipoprotein)
LO	Lipoxygenase
M-CSF	Makrophagen Koloniestimulierender Faktor (macrophage colony-stimulating factor)
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein 1 (monocyte chemotactic protein 1)
MDA	Malondialdehyd
mmLDL	minimal oxidiertes LDL (minimally oxidized LDL)
MPO	Myeloperoxidase

NAC	N-acetyl-L-cystein
nLDL	natives LDL (native LDL)
oxLDL	oxidiertes LDL (oxidized LDL)
PAVK	Peripher Arterielle Verschußkrankheit
PBS	Phosphat gepuffte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor)
PIC	Proteininhibitor-Cocktail
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat (phorbol 12-myristate 13-acetate)
PUFAs	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids)
pVHL	von Hippel Lindau Protein
RCT	Reverser Cholesterintransport (reverse cholesterol transport)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Retentionszeit (retention time)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SMCs	glatte Muskelzellen (smooth muscle cells)
SR-BI	Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (scavenger receptor class B type I)
TBARS	Thiobarbitursäure reagierende Substanzen (thiobarbituric acid reactive substances)
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (vascular-cell adhesion molecule 1)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VLDL	Lipoprotein sehr geringer Dichte (very low density lipoprotein)

1 Einleitung und Fragestellung

Schlaganfall, koronare Herzkrankheiten (KHK) und peripher arterielle Verschlusskrankheiten (PAVK) zählen zu den fatalen Auswirkungen der Atherosklerose. In den westlichen Industrieländern sind ungefähr 50 % aller Todesfälle darauf zurückzuführen. Atherosklerose ist eine progressive Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien, die mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung assoziiert ist [ROSS, 1999].

Eine Hypothese der Atheroskleroseentstehung welche die oxidative Modifikation des LDL (oxidized LDL, oxLDL) als das Schlüsselereignis in der Entstehung der Erkrankung sieht, wurde erstmals 1989 von Steinberg et al. formuliert und hat bis heute seine Gültigkeit [STEINBERG, 1989]. In der Gefäßwand vorhandene Oxidantien sind vorwiegend für die Modifikation des LDL-Partikels verantwortlich. Zu den bedeutendsten zählen reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und freie Radikale, die auch von körpereigenen Enzymen (Lipoxygenase, Myeloperoxidase) gebildet werden können. Durch eine Oxidation des Lipoproteins werden sowohl Lipid- als auch der Proteinanteil des Moleküls soweit verändert, dass es von den LDL-Rezeptoren der Zellen nicht mehr erkannt wird. Die unkontrollierte Aufnahme über Scavenger-Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche führt zu der Ausbildung von Schaumzellen, die den Hauptbestandteil der atherosklerotischen Plaques darstellen. Oxidativ modifiziertes LDL besitzt eine stark atherogene Wirkung, wodurch die Entwicklung der Atherosklerose beschleunigt wird [WITZUM und STEINBERG, 1991; YLÄ-HERTTUALA, 1999; LUSIS, 2000].

Der Transkriptionsfaktor Hypoxie induzierter Faktor 1α (hypoxia inducible factor 1α , HIF- 1α) rückte durch den Nachweis in atherosklerotischen Läsionen in den Mittelpunkt der Atheroskleroseforschung [VINK et al., 2007]. HIF- 1α wird unter normoxischen Bedingungen über den Ubiquitin/Proteasom-Weg abgebaut. Bei Sauerstoffmangel in der Zelle dimerisiert es mit HIF- 1β zu dem aktiven HIF Komplex und kann so eine Vielzahl von Genen aktivieren, die unter anderem an der Angiogenese, dem Energiestoffwechsel und dem Zellwachstum beteiligt sind. HIF- 1α kann jedoch auch unter Normoxie durch gewisse Bedingungen (wie oxidativer Stress) stabilisiert werden [SEMENZA, 2000].

N-acetyl-L-cystein (NAC) ist ein Antioxidans, welches mit Hilfe der Thiolgruppe fähig ist, freie Radikale direkt unschädlich zu machen. Es stellt die acetylierte Form der Aminosäure Cystein dar, welches für die Bildung des Tripeptids Glutathion benötigt wird. Dieses ist ein unverzichtbares intrazelluläres Antioxidans, welches die zellulären Makromoleküle vor Oxidation schützen kann. In der Studien von Zafarullah et al. konnte durch den Einsatz von NAC eine verbesserte endotheliale Funktion, durch die Unterdrückung der endogenen ROS-Levels, gezeigt werden. Dadurch wird vermutet, dass es Krankheiten wie Atherosklerose abschwächen kann [ZAFARULLAH et al., 2003].

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung von oxidativ modifiziertem LDL auf die Schaumzellbildung in THP-1 Makrophagen zu untersuchen, wobei besonders auf Effekte von oxLDL auf die Proteinexpression von HIF-1 α und Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (scavenger receptor class B type I, SR-BI) eingegangen werden soll. Weiters soll die Frage geklärt werden, ob das Antioxidans NAC eine atheroprotektive Wirkung hat. Ein weiteres Ziel ist die Messung des intrazellulären Cholesterols nach Inkubation von THP-1 Makrophagen mit nativem LDL (native LDL, nLDL), mit Kupfersulfat oxidiertem LDL (Cu²⁺-oxLDL) und Hypochlorit oxidiertem LDL (HOCl-oxLDL) mittels HPLC.

2 Literaturübersicht

2.1 Atherosklerose

2.1.1 Definition und Risikofaktoren

Bei der Atherosklerose handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, dem ein chronischer inflammatorischer Prozeß zugrunde liegt. Das präkäre an dieser Erkrankung ist der lange asymptomatische Verlauf, der sich erst langsam klinisch in koronaren Herzkrankheiten, peripheren arteriellen Verschußkrankheiten und zerebrovaskulären Erkrankungen manifestiert [ROSS, 1999].

Die WHO (World Health Organisation) definiert Atherosklerose als eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Aterien, bestehend aus einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, fibrösem Gewebe und Calciumablagerungen, welche von Veränderungen der Media begleitet werden. Schätzungsweise 17,5 Millionen Menschen starben alleine im Jahr 2005 an den Folgeerkrankungen der Atherosklerose. Der WHO zufolge wird diese Zahl bis ins Jahr 2015 auf 20 Millionen Menschen ansteigen [WHO, 2007].

Dieser chronisch fortschreitenden, degenerativen Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien liegen zahlreiche Risikofaktoren (Tab. 2.1) zu Grunde, die sich in genetische und umweltbedingte Faktoren einteilen lassen [LUSIS, 2000].

Umweltbedingte Risikofaktoren	Genetische Risikofaktoren
niedrige Antioxidantienspiegel	erhöhte Lipoprotein (a)- Level
Fettreiche Ernährung	positive Familienanamnese
Bewegungsmangel	Hyperhomocysteinämie
Infektionserreger	niedrige Level an HDL
Übergewicht	Geschlecht (männlich)
Lebensalter	erhöhte LDL-Spiegel
Rauchen	Hypertonie

Tabelle 2.1: *Risikofaktoren der Atherosklerose [LUSIS, 2000]*

2.1.2 Hypothesen zur Entstehung der Atherosklerose

In den letzten Jahrzehnten sind verschiedene Modelle zur Entstehung der Atherosklerose postuliert worden. Die 1976 aufgestellte "response-to-injury" Theorie von Russell Ross stellt die Verletzung der Endothelschicht durch mechanische, metabolische, toxische, immunologische oder virale Faktoren als initiales Ereignis in der Entwicklung der Erkrankung dar. Eine Dysfunktion des Gewebes führt zu einer erhöhten Permeabilität der Endothelzellen für atherogene Lipoproteine und Plasmabestandteile [ROSS, 1977; 1999].

Ein weiteres Modell zur Entstehung der Atherosklerose ist die "response to retention" Hypothese, die von einer Akkumulation atherogener Lipoproteine in der Arterienwand ausgeht. Das Schlüsselereignis hier ist also die Retention von Lipoproteinen und nicht die erhöhte endotheliale Permeabilität [WILLIAMS, 1995; GUSTAFSSON et al., 2004].

Die Verknüpfung und mehrfache Modifikation der erwähnten Hypothesen führte schließlich zu der heute verbreiteten Auffassung zur Entstehung der Atherosklerose. Diese geht von einem chronisch entzündlichen Prozeß der Arterienwand aus, der von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten, sowie pro-inflammatorischen Mediatoren (Chemokine, Cytokine) in allen Stadien der Erkrankung initiiert und aufrecht erhalten wird [ROSS, 1999].

2.1.3 Monozytenrekrutierung und Migration in die Intima

Bereits im frühen Stadium der Atherosklerose kommt es durch die endotheliale Dysfunktion zu einer erhöhten Permeabilität von Lipoproteinen geringer Dichte (low-density lipoprotein, LDL) und deren Migration aus dem Blutstrom in die Gefäßwand [DAVIGNON und GANZ, 2004].

LDL diffundiert passiv durch die Endothelzellschicht und wird dabei umso mehr zurückgehalten, je mehr zirkulierendes LDL im Blutstrom vorhanden ist [SHASHKIN et al., 2005]. Das Lipoprotein häuft sich im subendothelialen Raum an und unterliegt dabei verschiedenen Modifikationen. Dabei spielt die oxidative Modifikation eine wichtige Rolle, bei der das LDL durch die Interaktion mit ROS in der Gefäßwand oxidiert wird (Abb. 2.1). Das dabei entstehende minimal oxidierte LDL (minimally oxidized LDL, mmLDL) besitzt zwar pro-inflammatorische Aktivität, aber deren Modifikation

reicht nicht aus, um von den Rezeptoren der Makrophagen erkannt und aufgenommen zu werden. Es ist jedoch in der Lage, die Adhärenz und Penetration von Monozyten durch die Stimulation des Monozyten chemotaktischen Proteins (monocyte chemotactic protein, MCP-1) zu erhöhen und ist weiters an der Differenzierung zu Makrophagen beteiligt [BERLINER et al., 1995; YLÄ-HERTTUALA, 1999; LUSIS, 2000].

Es besitzt auch die Fähigkeit, die Endothelschicht zur Produktion von Adhäsionsmolekülen, chemotaktischen Proteinen und Wachstumsfaktoren anzuregen. Zu den Zelladhäsionsmolekülen zählen Vertreter der Immunglobulin Superfamilie wie das intrazelluläre Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule, ICAM-1) und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (vascular-cell adhesion molecule, VCAM-1), welche an der Endotheloberfläche exprimiert werden [MESTAS und LEY, 2008].

Diese stimulieren die Anheftung von Monozyten und Lymphozyten an das Endothel und deren Eindringen in die Gefäßintima. Monozyten interagieren mit diesen Rezeptoren durch ihre spezifischen Oberflächenliganden, wie den β 1- und β 2- Integrinen. Um eine starke Bindung zwischen Rezeptor und Ligand zu gewährleisten, benötigt es einer zusätzlichen Aktivierung durch Chemokine [QUEHENBERGER, 2005].

Eine wichtige Rolle spielt das MCP-1, welches zur weiteren Anheftung von Monozyten an das Endothel und deren Migration in die Intima beiträgt. Als weitere Antwort auf die Lipidinfiltration, werden durch die Intima pro-inflammatorische Cytokine wie die Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) produziert, wodurch weitere zirkulierende Monozyten zu dem Geschehen angelockt werden [CHARO und TAUBMAN, 2004; BOBRY SHEV, 2006].

Unter dem Einfluß des Makrophagen koloniestimulierende Faktors (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) proliferieren und differenzieren die Monozyten in der Intima zu Makrophagen aus. Außerdem ist er für die erhöhte Expression von Scavenger-Rezeptoren an der Makrophagenoberfläche beteiligt. Makrophagen verstärken ihrerseits den Entzündungsprozess durch Bildung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen (TNF- α , IL-1 β) [PACKARD und LIBBY, 2008].

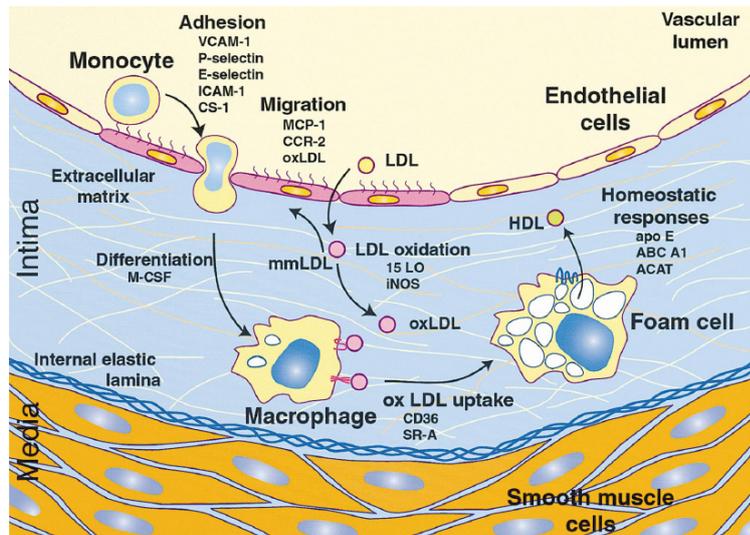


Abbildung 2.1: Adhäsion und Migration von Monozyten in die Intima [GLASS und WITZTUM, 2001]

2.1.4 Schaumzellbildung

In der Gefäßwand kommt es zur weiteren Oxidation des LDL durch ROS und verschiedene Enzyme wie die Lipoxygenase (LO), NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase (MPO), die in atherosklerotischen Läsionen zu finden sind. Das oxidierte LDL wird durch eine Rezeptorvermittelte Endozytose durch spezifische Scavenger-Rezeptoren (SR-A, CD36, SR-BI, CD68) an der Makrophagenoberfläche erkannt und unkontrolliert aufgenommen [CHISOLM und STEINBERG 2000; LI und GLASS 2002]. Durch die hohe Aufnahme von modifiziertem LDL entstehen lipidgefüllte Schaumzellen, die makroskopisch als Fettstreifen (fatty streaks) im Gefäß sichtbar werden. Diese setzen wiederum verschiedene pro-inflammatorische Mediatoren (IL-1, IL-6, TNF- α), sowie das MCP-1 Protein und Zelladhäsionsmoleküle frei, die den inflammatorischen Prozess weiter ankurbeln [LIBBY, 2002].

Eine solche atherosklerotische Frühläsion kann bereits in der ersten Lebensdekade entstehen und schreitet mit zunehmendem Alter fort [McMILLAN, 1995].

2.1.5 Bildung von fibrösen Plaques

Nach einer gewissen Zeit sterben die Schaumzellen ab und setzen Lipide, Cholesterin und Zelldebris in die Intima frei, was die Entstehung eines nekrotisch verkalkten Kerns zur Folge hat [LIBBY und THEROUX, 2005].

Durch die aktivierten Makrophagen und Endothelzellen kommt es zur Migration der glatten Muskelzellen in die Intima, wobei hier der Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF) und der Insulinähnliche-Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor, IGF-1) verantwortlich sind. Die glatten Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs) sezernieren Kollagen, elastische Fasern und extrazelluläre Matrixproteine, wodurch sich eine fibröse Kappe bildet [PACKARD und LIBBY, 2008]. Diese bedeckt den nekrotischen Kern, der aus Makrophagen, Lymphozyten, abgestorbenen Schaumzellen, glatten Muskelzellen, Bindegewebe, Lipiden und nekrotischen Zellbruchstücken besteht. Solche fortgeschrittenen Läsionen können jahrzehntelang ohne weitere Folgeschäden bestehen bleiben [ROSS, 1997].

2.1.6 Bildung einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion

Makrophagen und T-Lymphozyten produzieren pro-inflammatorische Cytokine, Proteasen (Matrix Metalloproteinase) und vasoaktive Moleküle, welche die Plaque durch den Abbau der fibrösen Kappe destabilisieren können. Durch einen Riss in der Kappe kommen Blutbestandteile in Kontakt mit dem thrombotischen Material, und so werden Thrombozyten aktiviert, welche in weiterer Folge den Blutfluss blockieren können. Die Entleerung des atheromatösen Inhalts kann also maßgeblich die Blutzirkulation beeinflussen (Abb. 2.2). Ein gebildeter Thrombus kann am Gefäß festsitzen und das Lumen weiter verengen oder er kann sich lösen und führt dann zu Infarkt, Schlaganfall und Lungenembolien [HANSSON, 2005].

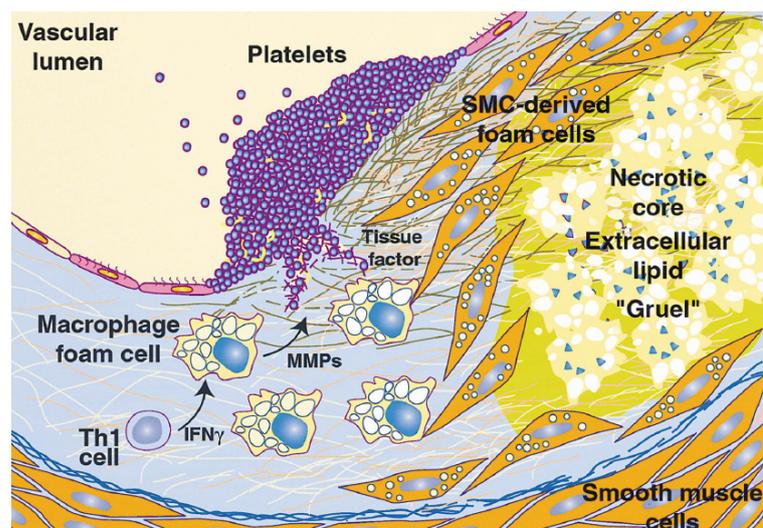


Abbildung 2.2: Plaqueruptur und Thrombusbildung [GLASS und WITZTUM, 2001]

2.1.7 Transport und Metabolismus von Cholesterol

Cholesterol ist ein tierisches Stoffwechselprodukt und kommt daher nur in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs in größeren Mengen vor. Alle Zellen des Organismus sind befähigt, Cholesterol selbst zu synthetisieren, wodurch die Biosynthese auf die Nahrungsmenge abgestimmt werden muss, um eine Cholesterolüberladung zu vermeiden.

Eine Vielzahl von Studien konnte eine Korrelation zwischen der Höhe des Cholesterolspiegels und der Mortalität an KHK zeigen [HU et al., 2001].

Cholesterol ist im Zellstoffwechsel an vielen lebenswichtigen Vorgängen beteiligt. Es ist essentieller Bestandteil aller Zellmembranen und Vorstufe für die Biosynthese der Steroidhormone sowie der Gallensäuren. Es ist unlöslich in wässrigem Milieu und wird dadurch hauptsächlich mit Hilfe des LDL, welches zu rund 50 % aus Cholesterylestern und freiem Cholesterol besteht, im Blut zu den extrahepatischen Geweben transportiert.

LDL-Partikel aus dem Blut binden an spezifische LDL-Rezeptoren in der Plasmamembran der Zielzelle, wodurch es zur Endozytose vom LDL/LDL-Rezeptor-Komplex kommt. In frühen Endosomen wird durch den niedrigen pH-Wert eine Dissoziation von LDL und Rezeptor bewirkt. Die in den LDL-Partikel enthaltenen Cholesterylester werden in Lysosomen durch eine lysosomale saure Lipase hydrolysiert, wodurch freies Cholesterol entsteht. Dieses steht der Zelle für die Membranbiosynthese zur Verfügung und kann bei Bedarf durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) verestert werden und liegt dann als Speicher in Form von Lipidtröpfchen in der Zelle vor [LÖFFLER et al., 2007].

Makrophagen besitzen zusätzlich zu den normalen LDL-Rezeptoren Scavenger-Rezeptoren, die chemisch modifiziertes LDL erkennen und unkontrolliert in das Zellinnere aufnehmen. Das aufgenommene Cholesterol wird in den Makrophagen verestert und als Lipidtröpfchen in Vakuolen gespeichert. Dieser LDL-Abbauweg soll den Körper vor einer Cholesterolüberladung schützen, führt aber bei übermäßiger Aufnahme zur Ausbildung von Schaumzellen, die eine Vorstufe atherosklerotischer Plaques darstellen [DEVILLIERS und SMART, 1999].

Ein weiteres wichtiges Transportvehikel für Cholesterol ist das HDL, das zu den kleinsten und dichtesten Lipoproteinen des Menschen gezählt wird. Im hydrophoben

Kern von HDL befinden sich vor allem Cholesterylester und ein geringer Anteil an Triglyceriden, wohingegen die hydrophile Hülle vor allem aus Phospholipiden, Proteinen und unverestertem Cholesterol gebildet wird. Eine der Hauptfunktionen der HDL besteht im reversen Cholesteroltransport (reverse cholesterol transport, RCT), also dem Transport von extrahepatischen Cholesterol zur Leber. Durch diese Fähigkeit wird ihm eine besondere Bedeutung in der Prävention von Atherosklerose zugesprochen [ASSMANN und GOTTO, 2004].

2.1.8 Die Rolle von oxidiertem LDL in der Entstehung der Atherosklerose

2.1.8.1 Low Density Lipoprotein (LDL)

Menschliche LDL sind Plasmalipoproteine mit einer geringen Dichte zwischen 1,019 - 1,063 g/ml und haben einen Durchmesser von 18-25 nm. Sie bestehen aus Triglyceriden (6 %), Phospholipiden (22 %), Cholesterol und Cholesterylestern (50 %) und aus Apolipoproteinen (22 %), wobei der größte Anteil das Apoprotein B100 ist. An der Lipoproteinoberfläche befinden sich Phospholipide und freies Cholesterol, welche den lipophilen Kern aus Cholesterylestern und Triglyceriden umgeben (Abb. 2.3). Die Hälfte der vorhandenen Fettsäuren sind mehrfach ungesättigt und bestehen zu 86 % aus Linolsäure, 12 % Arachidonsäure und 2 % Docosahexaensäure [ESTERBAUER und GEBICKI, 1992; ESTERBAUER und RAMOS, 1996].

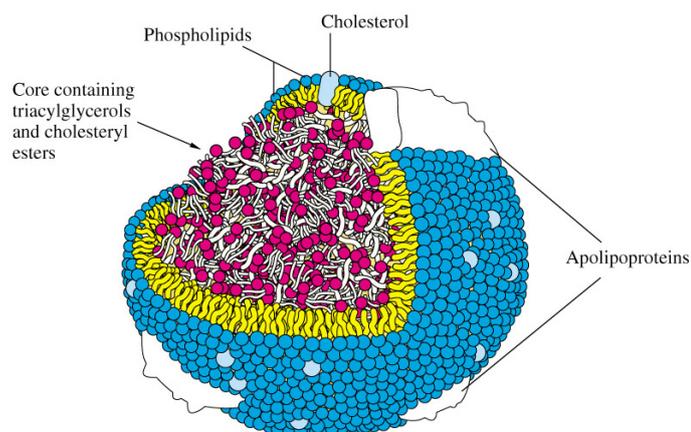


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines LDL-Partikels

Die physiologische Aufgabe des LDL-Moleküls ist der Transport von Cholesterol aus der Leber zu den extrahepatischen Geweben. Dabei bindet das im Blut zirkulierende LDL an LDL-Oberflächenrezeptoren, wobei die Partikel durch das charakteristische Apoprotein B100 erkannt werden und durch Endozytose aufgenommen werden. Eine Herunterregulierung der LDL-Rezeptorsynthese verhindert einen Cholesterolüberschuss in der Zelle [GLASS und WITZTUM, 2001].

Besteht ein genetisch bedingter Mangel an LDL-Rezeptoren, kommt es zu einer massiven Akkumulation von LDL im Blut. In der Folge kann es bereits im Kindesalter zu Herzinfarkten kommen. Diese Patienten mit einer familiären homozygoten Hypercholesterinämie zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen zu hohem LDL-Spiegel und Atherosklerose, da sie sonst keine weiteren Risikofaktoren aufweisen [STEINBERG, 1987].

2.1.8.2 Atherogene Wirkung von modifiziertem LDL

Bei der LDL-Oxidation handelt es sich um einen komplexen Prozess, bei dem sowohl der Lipid-, als auch der Proteinanteil des LDL verändert wird [ESTERBAUER et al., 1990]. Abhängig vom Ausmaß der Oxidation haben oxidiertes LDL und seine Bestandteile eine Vielzahl von Auswirkungen auf die beteiligten Zellfunktionen in der Atherogenese. In der nachstehenden Auflistung ist eine Auswahl der atherogenen Effekte von oxLDL zusammengefasst [WITZTUM und STEINBERG, 1991; 2001].

- OxLDL wirkt chemotaktisch auf zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten und hemmt die Beweglichkeit von Gewebsmakrophagen
- OxLDL wird unkontrolliert von Makrophagen aufgenommen und führt zur Schaumzellbildung
- OxLDL verändert die Genexpression von Zellen und induziert die Bildung von MCP-1 und M-CSF
- OxLDL ist zytotoxisch und führt zur Expression von Adhäsionsmolekülen an der Endotheloberfläche
- OxLDL hemmt die endotheliale Gefäßrelaxation
- OxLDL fördert die Gerinnungskaskade
- OxLDL ist immunogen und induziert Antikörperbildung

2.1.9 Verschiedene Mechanismen der LDL-Modifikation

Die LDL-Oxidationstheorie wurde 1989 von Steinberg et al. beschrieben und geht davon aus, dass oxidiertes LDL maßgeblich an der Atheroskleroseentstehung beteiligt ist [STEINBERG et al., 1989]. Es ist schon oft erfolgreich belegt worden, dass natives LDL von den Makrophagen nicht schnell genug aufgenommen wird, um lipidgefüllte Schaumzellen zu produzieren. Daher wurde vermutet, dass LDL irgendeiner Art Modifikation in der Gefäßwand unterzogen werden muss, um von bestimmten Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt und unkontrolliert aufgenommen zu werden [BROWN und GOLDSTEIN, 1983; LUC und FRUCHART, 1991].

2.1.9.1 LDL-Oxidation *in vivo*

Bestimmte Enzyme im menschlichen Organismus gelten als fähig, LDL *in vivo* zu modifizieren. Dabei spielt die Myeloperoxidase (MPO), eine Häm-Peroxidase, welche unter anderem von aktivierten Makrophagen gebildet wird und in atherosklerotischen Läsionen lokalisiert ist, eine große Rolle. Zu ihren Aufgaben zählen die Pathogenabwehr durch die Bildung von ROS und dem starken Oxidationsmittel HOCl in Gegenwart von H₂O₂ und Chloridionen [PODREZ et al., 2000]. Das Enzym als auch die Anwesenheit von HOCl-oxidierten Proteinen und Lipiden konnte in großen Mengen in atherosklerotischen Läsionen durch Immunreaktionen gefunden werden. Diese Beobachtung legt den Verdacht nahe, dass HOCl ein wahrscheinlicher Kandidat der *in vivo* LDL-Oxidation ist [HAZELL et al., 1996].

Durch die Oxidation des Proteinanteils Apo B100 ist es in der Lage, LDL in ein atherogenes Molekül zu verwandeln, wodurch LDL seine positiven Ladungen verliert und eine erhöhte elektrophoretische Mobilität aufweist. Durch die Modifikation von LDL durch NaOCl kommt es zu einer Cholesterol- und Cholesterylesterakkumulation in Makrophagen [MALLE et al. 2006; HAZELL und STOCKER 1993].

Das zytosolische Enzym 15-Lipoxygenase (LO) ist ebenfalls an der LDL-Oxidation *in vivo* beteiligt, was durch verschiedene Studien belegt werden konnte [HEYDECK et al., 2001; ZHU et al., 2003]. Es wird von Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen exprimiert und kann mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) direkt oxidieren. Die dadurch gebildeten Hydroperoxide können wiederum die Oxidation von LDL fördern [CHISOLM et al., 1999]. Weiters wurde festgestellt,

dass LO-Hemmer eine zellvermittelte Modifikation von LDL *in vitro* hemmen können [RANKIN et al., 1991].

Weiters ist es möglich, dass verschiedene Zelltypen natives LDL *in vivo* oxidieren können. Dazu können Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen gezählt werden [STEINBERG, 1997].

Es sprechen viele Tatsachen für das Vorhandensein von oxidiertem LDL in der Gefäßwand. Wird LDL aus atherosklerotischen Läsionen isoliert, gleicht es in seinen physikalischen, chemischen und immunologischen Eigenschaften dem *in vitro* oxidiertem LDL [YLÄ-HERTTUALA, 1991]. Sowohl Epitope, welche charakteristisch für oxLDL sind, als auch Immunglobuline (IgG), welche oxLDL erkennen, wurden in atherosklerotischen Läsionen gefunden. Weiters wurden sowohl im menschlichen als auch im tierischen Serum Autoantikörper nachgewiesen, welche mit oxLDL reagieren. Ferner zeigen Tierstudien eine hemmende Wirkung von Antioxidantien auf das Fortschreiten der Atherosklerose [YLÄ-HERTTUALA, 1999; WITZTUM und STEINBERG, 2001].

Eine LDL-Oxidation im Plasma ist eher unwahrscheinlich, da die dort vorhandenen Antioxidantien (AO) und Proteine, welche Metallionen binden können, die LDL-Moleküle vor einer Oxidation schützen. Viel wahrscheinlicher ist die LDL-Oxidation in der Arterienwand, wo sie oxidativem Stress ausgesetzt sind und die AO herabgesetzt sind [BERLINER und HEINECKE, 1996].

Tierversuche an Ratten und Kaninchen konnten zeigen, dass injiziertes oxLDL durch Rezeptoren der Kupfferschen Leberzellen sehr schnell aufgenommen und aus dem Plasma entfernt werden. Daher wird angenommen dass die LDL-Oxidation nicht im Plasma lokalisiert ist [STEINBERG, 1997].

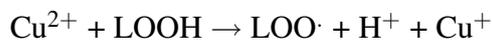
2.1.9.2 LDL-Oxidation *in vitro*

Ein oft verwendetes Modell für die LDL-Oxidationsreaktion stellt die *in vitro* Oxidation von isoliertem LDL mit Kupferionen dar [ESTERBAUER et al., 1989].

Der zeitliche *in vitro* Oxidationsverlauf von LDL mit CuSO₄ wird in 3 Phasen eingeteilt [JIALAL, 1998].

1. lag-Phase: Im Lipoprotein vorhandene Antioxidantien (Tocopherol, β -Carotin, Ubichinon), welche den LDL-Partikel vor Radikalen schützen sollen, werden aufgebraucht.
2. Propagations-Phase: Hier werden die vorhandenen ungesättigten Fettsäuren zu Lipidperoxiden oxidiert.
3. Dekompositions-Phase: Die Hydroperoxide werden zu reaktiven Aldehyden umgeformt (Malondialdehyd, Hexanal, 4-Hydroxynonenal). Zusätzlich kommt es zu einer Veränderung des Proteinanteils Apo B100, wodurch die Affinität für Scavenger-Rezeptoren zunimmt.

Die chemische Reaktion von zweiwertigem Kupfer mit ungesättigten Fettsäuren:



Peroxy (LOO \cdot)- und Alkoxy (LO \cdot)- Radikale sind sehr reaktiv und können die Initiation und Propagation der Lipidperoxidation weiter vorantreiben [THOMAS und JACKSON, 1990]. Bei der kupferinduzierten LDL-Modifikation wird vor allem die Lipidkomponente des Moleküls oxidiert [RADHIKA et al., 2007].

Der Antioxidantiengehalt ist ein entscheidender Indikator für die Oxidationsempfindlichkeit des LDL-Partikels und spiegelt die Dauer der lag-Phase wieder. Weiters spielen die Zusammensetzung der Fettsäuren und die Größe der LDL-Moleküle bei der Oxidation eine Rolle, wobei kleine dichte LDL-Partikel anfälliger für eine Oxidation sind. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die einen Großteil des LDL-Partikels ausmachen, sind anfälliger für eine Oxidation als einfach ungesättigte Fettsäuren [YLÄ-HERTTUALA, 1998].

Fraglich ist jedoch weiterhin, ob extrazelluläre freie Metallionen überhaupt bei einer *in vivo* Oxidation beteiligt sind und ob diese im Plasma vorhanden sind. Das Plasmaprotein Albumin kann eine Metallionen-induzierte LDL-Oxidation hemmen und ist auch in der Lage, freies Kupfer zu binden.

Patienten mit der genetisch vererbten Krankheit Morbus Wilson haben einen erhöhten Kupferspiegel in Leber, Plasma und Zentralnervensystem. Sie scheinen jedoch kein erhöhtes Risiko für Atherosklerose zu haben. Berliner et al. meinten, dass Metallionen unter speziellen pathologischen Bedingungen, wie die Gewebsschädigung eine ist, in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen vorhanden sein können [BERLINER und HEINECKE, 1996].

Eine weitere beliebte Methode, LDL *in vitro* zu oxidieren, ist die Inkubation mit Natriumhypochlorit (NaOCl). Es ist ein starkes Oxidans, welches vor allem Lysin-, Cystein- und Tryptophanreste des Apo B100 oxidiert. Die Lipide des LDL-Partikels werden dabei kaum angegriffen. Weiters wurde festgestellt, dass lipidlösliche Antioxidantien keinen effektiven Schutz gegen HOCl-oxLDL haben [HAZELL und STOCKER, 1993].

Die oxidierten Aminosäuren werden in instabile Chloramine umgewandelt und zerfallen zu Stickstoffradikalen. Dies erhöht den Anteil an sekundären Radikalen und fördert damit weiter die Lipidoxidation. Eine Inkubation von LDL mit dem Oxidans NaOCl führt zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der freien Aminogruppen des Apo B100 [MALLE et al., 2006].

Viele *in vitro* Studien konnten eindeutig demonstrieren, dass eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen, wie zum Beispiel Endothelzellen [STEINBRECHER et al., 1987], glatte Muskelzellen [MOREL et al., 1984] oder Makrophagen/Monozyten [HIRAMATSU et al., 1987] imstande sind, LDL oxidativ zu modifizieren.

Steinbrecher et al. konnte in seiner *in vitro* Studie eine Ähnlichkeit zwischen Kupfer oxidiertem LDL und durch Endothelzellen modifiziertem LDL nachweisen, wobei die physikalischen Eigenschaften, die Lipoproteinzusammensetzung und das biologische Verhalten analysiert wurden [STEINBRECHER et al., 1987].

2.1.10 Die oxLDL Aufnahme durch den Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI)

Als Erste haben Goldstein und Brown eine modifizierte Form des LDL, das acetylierte LDL (acetylated LDL, acLDL), beschrieben, welches von den Makrophagen rasch und unkontrolliert aufgenommen wird. Sie gingen der Frage nach, wie es zu dieser massiven Akkumulation von LDL-Cholesterol in den Makrophagen kommen konnte. Im Jahre 1979 entdeckten sie einen Rezeptor, der für die Aufnahme von modifiziertem LDL verantwortlich ist. Dieser acLDL-Rezeptor wurde später in SR-A umbenannt und konnte acLDL *in vitro* in Makrophagen aufnehmen [GOLDSTEIN et al., 1979].

Eine weitere Entdeckung stammte von Henriksen et al., welche Endothelzellen und

glatte Muskelzellen über Nacht mit LDL inkubierten und eine rasche Aufnahme des LDLs durch die anschließende LDL-Inkubation mit Makrophagen feststellen konnten. Hierbei wurde herausgefunden, dass LDL oxidativ modifiziert wurde und deswegen über Scavenger-Receptor aufgenommen wurde [HENRIKSEN et al., 1981]. Der endotheliale Rezeptor, der für die LDL-Aufnahme verantwortlich ist, wird als LOX-1 Rezeptor (Lectin-like oxidized LDL receptor) bezeichnet und wird auch in Makrophagen und vaskulären Muskelzellen exprimiert [SAWAMURA et al., 1997].

Acton et al. beschrieben erstmals 1994 den Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-BI) aus Hamster-Ovarialzellen und identifizierte ihn als physiologisch relevanten HDL-Rezeptor [ACTON et al., 1996].

Das 82 kDa schwere Glykoprotein besteht aus einer großen extrazellulären Schleife und 2 Transmembrandomänen und fungiert als eine Art Lipidaustauscher in der Plasmamembran. Scavenger bedeutet aus dem englischen übersetzt Aufräumer und beschreibt die Fähigkeit des Rezeptors, eine Vielzahl von strukturell unterschiedlichen Liganden zu binden und aufzunehmen. Darunter zählt man modifizierte Lipoproteine (acLDL, oxLDL), Lipoproteine hoher Dichte (high-density lipoprotein, HDL), Lipoproteine sehr geringer Dichte (very low density lipoprotein, VLDL), anionische Phospholipide und apoptotische Zellen [DEVILLIERS und SMART, 1999].

Eine hohe SR-BI Expression findet man je nach Ausmaß des Cholesterollowerstandes beim Menschen vor allem in Hoden, Nebennieren, Ovarien, Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, Schaumzellen, Kupffer Zellen und Hepatozyten [TRIGATTI et al., 2004].

Der Rezeptor bindet HDL mit hoher Affinität und vermittelt die selektive Aufnahme von Cholesterylestern aus dem HDL in Zellen von Geweben mit hohem Cholesterollowerstand. Der Transfer von Cholesterylestern erfolgt aus dem hydrophoben Kern des Lipoproteins, wobei unter selektiver Aufnahme keine Aufnahme des ganzen intakten Lipoproteinpartikels oder dessen Degradation verstanden wird [KRIEGER, 2001; TRIGATTI et al., 2003].

Die SR-BI vermittelte Lipidaufnahme scheint einen zweistufigen Prozess darzustellen, in welchem einer Lipoprotein-Bindung ein Rezeptor-vermittelter Transfer von Lipiden aus

dem Lipoproteinpartikel folgt. Anschließend wird der Rest des Lipoproteinpartikels von der Zelle in den extrazellulären Raum freigelassen [KRIEGER, 2001].

Weiters scheint SR-BI ein Hauptbeteiligter im reversen Cholesteroltransport zu sein. Darunter wird der Cholesterolrücktransport von peripheren Geweben zur Leber verstanden. Durch seine Anwesenheit auf der Zelloberfläche von Makrophagen und Hepatozyten könnte er an frühen und späten Mechanismen des RCT, durch die Vermittlung des bidirektionalen Flux von freiem Cholesterol zwischen HDL und Zellen, beteiligt sein. Deshalb wird in vielen Studien von einer antiatherogenen Aktivität von SR-BI gesprochen [CONNELLY und WILLIAMS, 2004].

Eine Überexpression von SR-BI in Mäusen führte einerseits zu verminderten atherosklerotischen Läsionen, andererseits auch zu erniedrigten HDL-Cholesterolspiegeln im Plasma und einem erhöhten Cholesterolanteil in der Galle [KOZARSKY et al., 1997]. Ein erhöhtes Atheroskleroserisiko konnte durch die Ausschaltung des Rezeptors im Mausmodell erreicht werden. Die Resultate dieser Ergebnisse lassen sich auf den antiatherogenen Effekt des Rezeptors und seine Beteiligung am RCT zurückführen [DEVILLIERS und SMART, 1999].

Hirano et al. konnten in ihrer Studie erstmals eindeutig zeigen, dass SR-BI in humanen atherosklerotischen Läsionen der Aorta verstärkt exprimiert wird. Eine Inkubation mit Cu^{2+} -oxLDL ($5 \mu\text{mol/l}$) in THP-1 Makrophagen für 24 Stunden führte ebenfalls zu einer erhöhten SR-BI Expressionsrate [HIRANO et al., 1999].

Han et al. zeigten in ihrer Studie eine dosis- und zeitabhängige Verminderung der SR-BI Expression durch die Inkubation von Makrophagen mit oxLDL. Dies resultiert in einer Verminderung der HDL Cholesterylester-Aufnahme und des HDL vermittelten Cholesterolefflux [HAN et al., 2001].

2.1.11 Die Bedeutung des HIF-1 α Proteins in der Atherosklerose

Der Hypoxie induzierte Faktor 1 (HIF-1) ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, welcher als einer der Hauptregulatoren der Sauerstoffhomöostase betrachtet wird (Abb. 2.4). Er setzt sich aus einer α - (120 kDa) und einer β - (91-94 kDa) Untereinheit zusammen und kann nur in dieser Zusammensetzung die Transkription im Zellkern aktiv

beeinflussen [VINK et al., 2007].

Unter normoxischen Bedingungen ist HIF-1 α in der Zelle kaum vorhanden, da es sehr rasch über den Ubiquitin/Proteasom-Weg abgebaut wird. Dabei wird die α - Untereinheit, welche eine Sauerstoff-abhängige Zersetzungsdomäne besitzt, hydroxyliert und bindet das von Hippel Lindau Protein (pVHL). Dies führt zum Abbau von HIF-1 α über das Proteasom. Im Gegensatz dazu wird HIF-1 β kontinuierlich in vielen Zellen exprimiert [SALCEDA und CARO, 1997].

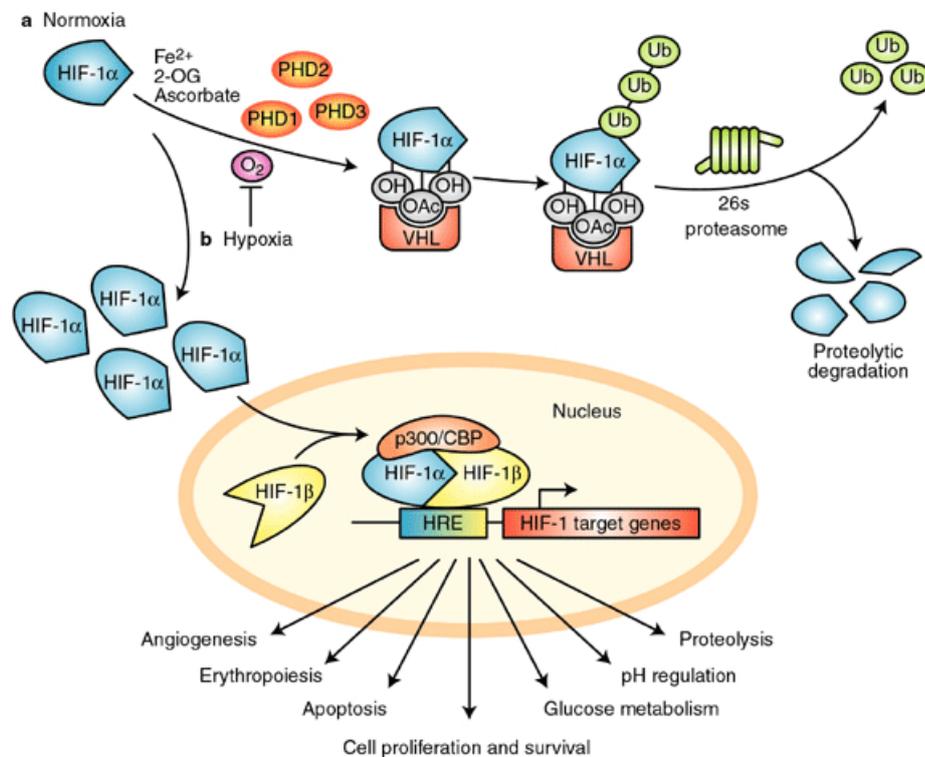


Abbildung 2.4: HIF-1 Regulation unter Normoxie und Hypoxie [CARROLL und ASHCROFT, 2005]

Bei Hypoxie unterstützt HIF-1 α die Zellen, sich an einen niedrigen O₂-Partialdruck anzupassen, indem der Abbau der α -Untereinheit gehemmt wird und in der Zelle akkumuliert. Das Protein wandert in den Nucleus und dimerisiert dort mit HIF-1 β , wodurch der aktive HIF-1 Komplex entsteht. Durch die Bindung an Hypoxie responsive Elemente (hypoxic response elements, HRE) der DNA-Promoterregion induziert HIF-1 die Transkription einer Vielzahl von Sauerstoff-abhängigen Genen. Die Transkription dieser Zielgene sind unter anderem beteiligt an der Angiogenese,

dem Energiestoffwechsel, der Erythropoese und dem Zellwachstum [LEE et al., 2004; VINK et al., 2007]. HIF-1 reguliert dabei die Transkription von hunderten Genen, die an wichtigen physiologischen Prozessen in der Zelle beteiligt sind [SEMENZA, 2000].

Die hypoxische Zelle hat verschiedene Möglichkeiten, sich an die neue Situation anzupassen. Es kommt zu einer Erhöhung der Konzentration glykolytischer Enzyme und einer verbesserten Glukoseaufnahme in der Zelle. Durch eine Steigerung der Erythropoese und einer verbesserten Eisenausnutzung kann der Körper besser mit Sauerstoff versorgt werden. Weiters versucht die Zelle durch eine pH- Regulation eine Gewebsazidose zu verhindern. Außerdem ist HIF-1 imstande, die Neovaskularisation bzw. die Angiogenese durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) zu fördern. VEGF ist eines der wichtigsten und bestbeschriebenen HIF-1 induzierte Gene [SEMENZA, 2002; VINK et al., 2007].

Die O₂-Homöostase muss also genau reguliert werden, denn wird das Gleichgewicht gestört, hat dies weitreichende Folgen auf die Pathophysiologie von KHK, Krebs, zerebrovaskuläre- und pulmonale Erkrankungen [SEMENZA, 2001].

In einer Studie von Shatrov et al. wurde herausgefunden, dass es zu einer Anreicherung von HIF-1 α durch einen ROS-abhängigen Signalweg in Makrophagen kommt, wenn diese oxLDL ausgesetzt sind [SHATROV et al., 2003].

Diese Entdeckung könnte darauf hinweisen, dass HIF-1 α eine Rolle bei der Schaumzellbildung und in der Pathogenese der Atherosklerose spielt. Wird der HIF-1 Weg in oxLDL inkubierten Makrophagen durch siRNA unterdrückt, kann eine verminderte Schaumzellbildung beobachtet werden [JIANG et al., 2007].

In Tierversuchen wurden hypoxische Regionen in atherosklerotischen Läsionen eindeutig nachgewiesen. Wobei besonders der Kern der fortgeschrittenen Läsionen bei einer Kaninchenaorta stark hypoxisch war [BJORNHEDEN et al., 1999; LEPPANEN et al., 2006].

Hypoxie konnte auch in humanen atherosklerotischen Läsionen, besonders im makrophagenreichen Plaueinneren, demonstriert werden [SLUIMER et al., 2008].

2.1.12 N-acetyl-L-cystein (NAC)

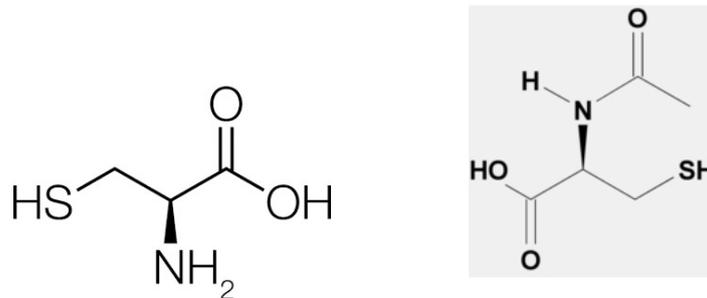


Abbildung 2.5: Chemische Struktur von L-Cystein (links) und NAC (rechts)

N-acetyl-L-cystein (2-Acetylamino-3-sulfanylpropansäure) ist die acetylierte Form der schwefelhaltigen Aminosäure L-Cystein und eine ausgezeichnete Quelle von Sulfhydryl (SH)-Gruppen. Cystein spielt wegen seiner funktionellen Thiolgruppe eine wichtige Rolle bei Entgiftungsprozessen im Körper und ist ein wesentlicher Bestandteil des Antioxidans Glutathion, welches in fast allen Zellen in hoher Konzentration enthalten ist. Dieses schützt die zellulären Makromoleküle vor reaktiven Sauerstoffspezies [AITIO, 2005].

In vivo konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von NAC die intrazelluläre Konzentration von Glutathion in Erythrozyten, Leber und Lungenzellen erhöhen kann. Nach experimenteller Entleerung der Speicher konnte Glutathion durch die Zugabe von NAC wieder aufgefüllt werden [DE FLORA et al., 1985; NAKATA et al., 1996].

NAC wird im medizinischen Bereich als Arzneistoff zur Schleimlösung von Atemwegserkrankungen eingesetzt. Weiters wird es bei akuter Paracetamol-Überdosierung eingesetzt, um Leberschäden zu vermindern. Dabei wirkt NAC als SH-Donator der Vergiftung entgegen und hilft die Glutathionspeicher aufzufüllen [KELLY, 1998].

Die antioxidative Wirkung von NAC beruht auf der Tatsache, dass es ROS direkt durch seine SH-Gruppe unschädlich machen kann. Dabei kann es direkt mit OH[•] und H₂O₂ wechselwirken (Abb. 2.6). Aufgrund dieser Tatsache wird NAC bei verschiedenen Krankheiten wie Krebs, KHK, HIV und Schwermetallvergiftung eingesetzt und

steht durch seine antioxidative Fähigkeit im Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten. [ZAFARULLAH et al., 2003]

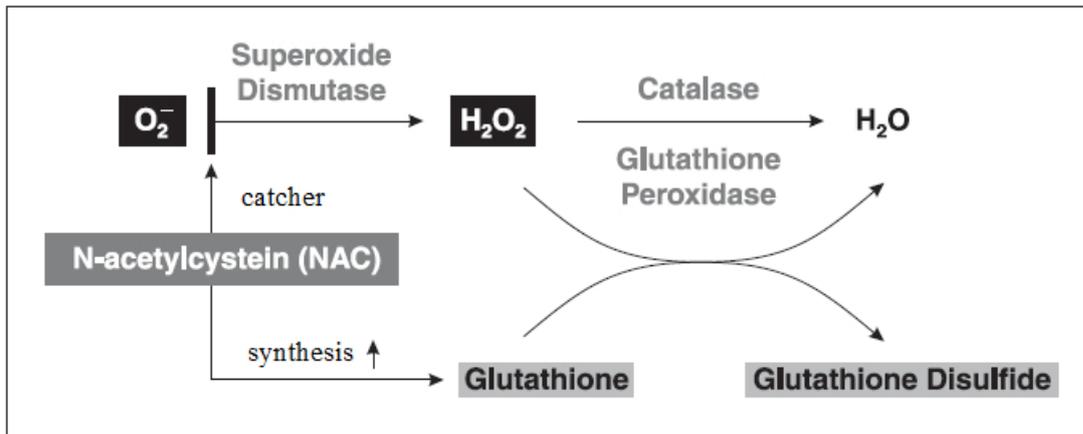


Abbildung 2.6: Angriffspunkte von N-acetylcystein auf reaktive Sauerstoffspezies [TOSSIOS und MEHLHORN, 2004]

Eine Studie konnte durch den Einsatz von 10 mM NAC, eine 60 %ige Hemmung der Metalloproteinasen in Schaumzellen feststellen, wodurch eine gewisse Plaquestabilität erreicht werden konnte. Die Makrophagen wurden dabei aus einer atheromatösen Kaninchenaorta isoliert [GALIS et al., 1989].

Ein hoher Plasmalipoprotein (a)- Level ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert. Das Lipoprotein a liegt mit seiner Molekülmasse zwischen dem von HDL und LDL. Eine orale Gabe von NAC (2 g täglich über 4 Wochen und danach 4 g über 4 Wochen) für Patienten mit erhöhtem Lipoprotein (a)- Level führte zu einer 70 %igen Senkung der Lipoproteinwerte. Dies weist darauf hin, dass NAC fähig ist, Risikofaktoren für Herzerkrankungen zu vermindern, wodurch ihm eine therapeutische Rolle nachgesagt werden kann [GAVISH und BRESLOW, 1991].

NAC fördert die vasorelaxierende Eigenschaft von Gefäßen durch die Unterdrückung der endogenen ROS-Levels und erhöht dabei die vasoaktive Substanz Stickstoffmonoxid (NO). Studien zeigten durch den Einsatz von NAC eine verbesserte endotheliale Funktion, wodurch vermutet werden kann, dass es Gefäßentzündungen (Atherosklerose) abschwächen kann. Dies wird einerseits durch das Entgegenwirken von intrazellulären ROS-Effekten bewerkstelligt, andererseits durch eine verminderte Leukozytenadhäsion

an das Endothel. Die Expression von VCAM-1 und E-Selectin wird dabei von NAC gehemmt [FARUQI et al., 1997; ZAFARULLAH et al., 2003].

NAC kann die Wirkung von oxLDL auf die Proliferation von glatten Muskelzellen teilweise hemmen, wodurch eine Reduktion von progressiver Atherosklerose bei Patienten mit Bluthochdruck und Hypercholesterolämie möglich wäre. [WATANABE et al., 2001]

3 Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck oder Roth.

3.1 Zellkultur

3.1.1 THP-1 Zellen

Die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 wurde ursprünglich aus dem Blut eines einjährigen Jungen mit akuter monozytischer Leukämie isoliert [TSUCHIYA et al., 1980]. Durch die Zugabe von Phorbol 12-myristat 13-acetat (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) differenzieren die THP-1 Monozyten zu reifen Makrophagen mit ihren typischen Funktionen aus [AUWERX et al., 1991].

3.1.2 Sterile Arbeitstechnik

Alle zellbiologischen Arbeiten werden in einer sterilen Werkbank (clanLAF VFB1206) als Prophylaxe gegen bakterielle Kontaminationen durchgeführt. Die gefilterte Luft in dem Laminar Air Flow garantiert, dass angesaugte Luft von außen unter den Rost der Arbeitsfläche gelenkt wird. Arbeitsfläche und getragene Handschuhe werden mit 70 %igem Ethanol gründlich gereinigt. Verwendete Glaspipetten und Plastikpipettenspitzen werden vor der Arbeit in der Werkbank sterilisiert bzw. autoklaviert. Die nächtliche Desinfektion mittels UV-Licht trägt weiters zur Verminderung von Keimen bei.

3.1.3 Züchten der Zellen

Die undifferenzierten THP-1 Zellen sind Suspensionszellen, welche in einer Kulturflasche (75 cm²) mit circa 25 ml Nährmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt im Brutschrank (Binder) kultiviert werden. Um den gewünschten Gasaustausch zu gewährleisten, wird die Flasche im Brutschrank leicht geöffnet. Die Zellen werden jeden zweiten Tag mit frischem Medium, welches auf 37 °C erwärmt wird, versorgt. Mit Zugabe des Mediums wird die Zelldichte auf 0,5 Millionen Zellen pro ml eingestellt.

3.1.4 Herstellen des Zellkulturmediums RPMI-1640

Für das Wachstum der Zellen wird das Medium RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Biochrom AG, Instament 10,43 g/l) verwendet. Ein 10 Liter Becherglas wird dreiviertel voll mit bidestilliertem Wasser befüllt. Es werden unter ständigem Rühren 20 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) und 104,3 g Mediapulver hinzugefügt. Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,25 eingestellt und dann das Volumen auf 10 Liter aufgefüllt. Das fertige Medium wird in der Laminar Air Flow über einen Vorfilter und einen Glockenfilter (Sartorius) mit einer Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$, steril filtriert und zu 450 ml in zuvor sterilisierten 500 ml Glasflaschen abgefüllt. Die Mediumflaschen werden lichtgeschützt bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zu ihrem Gebrauch gelagert.

Vor Zugabe zu den Zellen wird das unkomplementierte Zellkulturmedium mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS, Gibco), 2 mM L-Glutamin (PAA), 100 U/ml Penicillin (PAA), und 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA) komplementiert und auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt.

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Die Zellzählung erfolgt alle 2-3 Tage, bevor man frisches Medium den Zellen zusetzt. Das CASY[®]1 Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) misst sowohl die Zellzahl als auch die Zellviabilität und die durchschnittliche Zellgröße im Messröhrchen. Dafür füllt man 10 ml Casyton-Lösung in den CASY[®] Cup und pipettiert $50 \mu\text{l}$ Zellsuspension in die Flüssigkeit. Das Gerät wird vor und nach der Benützung dreimal mit Casyton Flüssigkeit gereinigt, und dann wird das passende Programm für THP-1 Zellen eingestellt. Nach vorsichtigem Schwenken wird das Cup in der CASY[®] Apparatur positioniert und die Zellzahl gemessen. Die Viabilität der Zellen sollte stets über 95 % liegen.

3.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

THP-1 Zellen können, mit Friermedium versetzt, über einen längeren Zeitraum konserviert werden. Sie können entweder dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei $-196 \text{ }^\circ\text{C}$, oder kurzfristig bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. Mit einer Konzentration von 20-25 Mio. Zellen/ml werden sie unter sterilen Bedingungen in 50 ml Falcons überführt und 5 Minuten lang bei 1750 rpm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5403). Der Überstand wird bis auf das Pellet abgesaugt und dieses in

0,5 ml unkomplementiertem RPMI-Medium resuspendiert. Hinzugefügt werden 0,5 ml Einfriermedium, welches aus 50 % FCS, 30 % unkomplementiertem RPMI-Medium und 20 % DMSO (Dimethylsulphoxid) besteht. Dann pipettiert man die Lösung in ein steriles Kryoröhrchen (Greiner Bio-one). Um ein langsames Gefrieren der Zellen zu erreichen, wird das Röhrchen zuerst in eine Styroporbox bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, und nach ein paar Tagen kann es in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Die eingefrorenen Zellen müssen rasch aufgetaut und in circa 30 ml erwärmtes Medium überführt werden. Die Zellsuspension wird bei 1750 U/min bei Raumtemperatur 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich das DMSO befindet, wird abgesaugt. Das Zellpellet wird in 10 ml erwärmtem Medium resuspendiert und vorerst in einer kleinen Kulturflasche (25 cm^2) gezogen. Nach drei Tagen können die Zellen in eine größere Kulturflasche (75 cm^2) überführt werden.

3.2 Bearbeitung der Zellen für Versuche

3.2.1 Verwendete Puffer und Stammlösungen

- 5x PBS (phosphate buffered saline):
ist eine phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, die zum Waschen der Zellen und zum Lösen verschiedener Substanzen eingesetzt wird. 40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH_2PO_4 , 15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ werden in einem Liter bidestilliertem Wasser gelöst und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Der Puffer muss 1:5 verdünnt werden, um einen Puffer mit physiologischer Salzkonzentration zu erhalten.
- BSA (Bovines Serumalbumin; Sigma):
wird vor jedem Experiment frisch eingewogen und in sterilem PBS gelöst. Die Lagerung des BSA-Pulvers erfolgt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat):
Stammlösung $810\text{ }\mu\text{M}$ in DMSO gelöst. Die Lagerung erfolgt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- N-acetyl-cysteine (NAC):
Stammlösung 10 mM, wird vor jedem Experiment frisch eingewogen und in sterilem PBS gelöst. Die Lagerung erfolgt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA):
Stammlösung 1 mM. Die Lagerung erfolgt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Kupfersulfat (CuSO_4):
Stammlösung 2 mM. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

3.2.2 Differenzierung von THP-1 Zellen zu Makrophagen

Die THP-1 Zellen werden mit Phorbol ester 72 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Für die Ausdifferenzierung zu Makrophagen wird hierfür 1 μl PMA pro 5 ml Zellsuspension verwendet (Endkonzentration 160 nM). Dadurch reifen die Monozyten zu adhärenen Makrophagen aus, welche an der Well-Oberfläche festsitzen und Ausläufer gebildet haben.

Für die Western Blot-Versuche werden 6-well Platten (Durchmesser 3 cm) verwendet, die jeweils 3 ml Zellsuspension enthalten, welche auf 0,5 Mio. Zellen/ml verdünnt worden sind. Für die Hochdruckflüssigchromatographie (high pressure liquid chromatography, HPLC) Messungen werden Kulturschalen mit dem Durchmesser von 6 cm verwendet, die mit 9 ml Zellsuspension befüllt werden. Nach 3 Tagen haben sich durch das PMA Makrophagen gebildet, die dann mit modifiziertem Lipoprotein inkubiert werden können.

3.2.3 Oxidative Modifizierung von LDL

3.2.3.1 LDL-Oxidation mit Kupfersulfat

Das enthaltene EDTA im Low density Lipoprotein (LDL) muss vor dem Oxidationsschritt entfernt werden, da es ein Komplexbildner ist und die Kupferionen abfangen kann. Dies wird durch NICK Säulen erreicht, bei denen 100 μl LDL mit 400 μl PBS eluiert werden. Das LDL soll eine Endkonzentration von 0,5 mg/ml haben, weshalb das LDL vor Auftragen auf die Säule mit PBS vermischt werden muss, um eine Ausgangskonzentration von 2 mg/ml zu erhalten. Die Verdünnung mit PBS erfolgt abhängig von der Proteinkonzentration des LDLs. Nach Eluation des LDLs wird es im Wasserbad 4 Stunden lang mit 10 μM CuSO_4 bei 37 °C in Glasröhrchen (Corning) oxidiert. Die Oxidation wird durch die Zugabe von 50 μM EDTA gestoppt.

3.2.3.2 LDL-Oxidation mit Natriumhypochlorit

LDL wird mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und Natriumhypochlorit (NaOCl) wird in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt. Diethylentriaminpentaessigsäure (Diethylene triamine pentaacetic acid, DTPA), welches

den Lipidanteil des LDL vor Oxidation schützt, wird in einer Konzentration von 100 μM zugegeben. Die Oxidation erfolgt 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad. Die Reaktion wird durch eine 1:2 Verdünnung mit Phosphatpuffer gestoppt.

3.2.4 Inkubation differenzierter THP-1 Zellen mit nLDL, oxLDL und NAC

Nach der dreitägigen Inkubation mit PMA können die Zellen mit modifiziertem Lipoprotein unter dem Laminar Air Flow behandelt werden. Zuerst wird der Mediumüberstand, in dem auch abgestorbene Zellen schwimmen, abgesaugt.

Für die HPLC-Versuche werden die Zellen mit unkomplementiertem Medium gewaschen und dann mit 100 $\mu\text{g/ml}$ oxidiertem LDL (oxLDL) versetzt, damit es zu der gewünschten Schaumzellbildung kommt. Die Kontrollzellen erhalten BSA mit einer Konzentration von 2 mg/ml. Zusätzlich werden Zellen mit 100 $\mu\text{g/ml}$ nativem LDL (nLDL) und 100 $\mu\text{g/ml}$ HOCl bzw. Cu^{2+} -oxidiertem LDL behandelt. Die Inkubation erfolgt 18 Stunden, bei 37 °C und 5 %igem CO_2 Gehalt. Für die Western Blot-Bestimmungen werden die Zellen vor der oxLDL Behandlung mit N-acetyl-cystein (NAC) beladen. Dabei werden verschiedene Konzentrationen des Antioxidans (0,1; 1; 10 mM NAC) auf die Zellen aufgetragen und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit FCS freiem Medium gewaschen und mit 100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL oder nLDL 18 Stunden beladen.

3.2.5 Lysieren von Zellen für Western Blot

- HEPES/NP40 Lysispuffer:
50 mM HEPES (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl_2 ; 1 mM Ethylenglykoltetraessigsäure (ethyleneglycoltetraacetic acid, EGTA); 100 μM NaF; 10 μM Natriumvanadat; 10 % Glycerol; 1 %; Nonidet-P40

Herstellung für 50 ml HIF-1 α Lysispuffer:

Vorerst wird ein HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) Puffer hergestellt, der auf einen pH Wert von 7,5 eingestellt wird. Dafür werden in einem 50 ml Messkolben alle Chemikalien bis auf Glycerol und NP40 eingewogen. Anschließend wird der Messkolben halbvoll mit HEPES befüllt und Glycerol und NP40 dazupipettiert. Der Inhalt des Messkolbens wird auf dem Magnetrührer gut durchgeschmischt und der pH Wert nochmals überprüft. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank.

Bevor die Zellen lysiert werden, wird dem Lysispuffer ein Protease Inhibitor Cocktail (PIC) im Verhältnis 1:100 zugesetzt.

Die folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.

Nach 18 Stunden Zellinkubation mit oxLDL und nLDL werden 500 μ l Zellmedium für die TBARS Bestimmung abgenommen und dann das restliche Medium abgesaugt. Nachdem die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen wurden, wird 70 μ l Lysispuffer für 10 Minuten auf die Zellen pipettiert. Dann werden die Zellen mit einem Schaber von der Platte abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Der Zellschaber wird mit destilliertem Wasser gereinigt. Zusätzlich werden die Zellen 2 Sekunden lang am Ultraschallgerät (Inula) aufgeschlossen und verweilen 1 Stunde auf Eis, bis sie eingefroren werden.

3.3 Isolierung und Analyse der Lipoproteine

3.3.1 Lipoprotein Präparation durch sequentielle Ultrazentrifugation

Das benötigte LDL für die folgenden Versuche stammt aus Vollblut gesunder, nüchterner, weiblicher Probanden. Den Spenderinnen wird bei der Blutabnahme 150 ml Blut abgenommen, welches mit 2 ml einer 0,18 M EDTA-Lösung vermischt wird, um das Blut ungerinnbar zu machen. Das Plasma wird durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 3000 U/min und 4 °C gewonnen (Heraeus Megafuge R 1.0). Der Zentrifugationsschritt wird nochmals unter den gleichen Bedingungen mit dem Plasmaüberstand für 5 Minuten wiederholt. Die Auftrennung der Lipoproteine untereinander und auch von anderen im Blut enthaltenen Proteine wird durch die unterschiedlichen Dichteeinstellungen während der Ultrazentrifugation des Plasmas erreicht [SCHUMAKER et al., 1986; KAHN et al., 1984].

Lipoproteinfraktion	Dichte in g/ml
VLDL	1,019
LDL	1,07
HDL	1,22

Tabelle 3.1: unterschiedliche Dichte der Lipoproteinfraktionen

Die Dichte des Blutplasmas wird vor jeder Ultrazentrifugation durch die Zugabe von Kaliumbromid (KBr) auf die jeweilige Dichte des Lipoproteins eingestellt. Zuerst wird die Dichte von VLDL = 1,019 g/ml mit Kaliumbromid eingestellt. Nach der folgenden Formel wird die notwendige KBr Menge berechnet:

$$gKBr = \frac{V_{Probe} * (Dichte_{final} - Dichte_{initial})}{1 - (0,312 * Dichte_{final})}$$

Das Plasma wird mit einer Spritze in versiegelbare Zentrifugenröhrchen (Beckman Centrifuge Tubes, Fassungsvermögen 40 ml) überführt, anschließend verschweißt und in den vorgekühlten Winkelrotor (55.2 Ti) eingesetzt und mit Caps stabilisiert. Bei 51000 U/min erfolgt die Zentrifugation für 20 Stunden und 4 °C (Beckman, L-60 Ultracentrifuge). Nach der Zentrifugation wird mittels einer Schneidevorrichtung (Slicer) das Lipoprotein sehr geringer Dichte (very low-density lipoprotein, VLDL) vom übrigen Plasma getrennt. Es erfolgt eine Dichteeinstellung des restlichen Plasmas für LDL = 1,07 g/ml und wieder ein Zentrifugationsschritt.

3.3.2 Entsalzen der Lipoproteine mittels Dialyse

Die einzelnen Lipoproteinfraktionen werden einer Dialyse unterzogen, da der Salzgehalt durch die Zugabe von KBr bei der Ultrazentrifugation zu hoch für eine Zellinkubation wäre. Daher wird mittels eines Dialysepuffers die einzelnen Fraktionen auf einen physiologischen Salzgehalt eingestellt.

- 10x Dialysepuffer:
900 g NaCl und 100 g EDTA werden in 8 Litern destilliertem Wasser gelöst. Ein pH-Wert von 7,4 wird mit NaOH eingestellt. Danach wird mit destilliertem Wasser bis zur 10 Liter Markierung aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

3.3.2.1 Durchführung

Die Dialyseschläuche (Spectra/Por[®]4) werden 3 Stunden in fließendem Wasser eingelegt. Anschließend werden sie in 5 Liter einer NaHCO₃ Lösung 12 Minuten gekocht und danach 30 Minuten in 3 Liter 10 mM EDTA 30 Minuten eingelegt, wobei die

Lösung ständig gerührt wird. Zur Lagerung werden sie in 500 ml 10 mM EDTA bei 4 °C aufbewahrt. Die Lipoproteinlösung wird in die Schläuche pipettiert, diese dann gut verknotet und in 5 Liter Dialysepuffer eingelegt. Die Dialyse wird unter ständigem Rühren 24 Stunden bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt, wobei der Puffer zweimal gewechselt werden muss, um das Konzentrationsgefälle aufrecht zu erhalten. Die Lipoproteinfraktionen werden bei 4 °C unter dunklen Bedingungen in 50 ml Falcons gelagert.

3.3.3 Proteinbestimmung des LDL mit der Bradford Methode

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration des Lipoproteins LDL muss zunächst eine Standardreihe hergestellt werden, deren Zusammensetzung in der Tab. 3.2 einzusehen ist.

Standard Konz. [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Aqua dest. μl	BSA [250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] μl	Biorad-Reagenz 1:5 ml
0	200	/	3
5	180	20	3
10	160	40	3
20	120	80	3
40	40	160	3

Tabelle 3.2: *Pipettierschema: Standardgerade zur Bestimmung der LDL - Proteinkonzentration*

Die LDL-Proben werden in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 200 μl verdünnt. Die Proben erhalten außerdem noch 3 ml einer 1:5 verdünnten BIO-RAD Reagenzlösung. Die ermittelte Proteinkonzentration wird für die Reinheitsüberprüfung und die oxidative Modifizierung von LDL benötigt.

3.3.4 Reinheitsüberprüfung der Lipoproteine mittels Elektrophorese

Um die Reinheit der Lipoproteinfraktionen zu überprüfen, werden die Fraktionen auf einem Natriumdodecylsulfat-(sodium dodecylsulfate, SDS) Polyacrylamidgel aufgetragen.

Verwendete Lösungen:

- Elektrophoresepuffer:
100 ml 10x Tris/Glycin Puffer (siehe Kapitel 3.7.1), 900 ml Aqua dest.
- Sample Buffer:
100 μ l Glycerin, 90 μ l Tris-HCl + 8 % SDS, Spatelspitze Bromphenolblau
- Destain Solution:
200 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 700 ml Aqua dest.
- Coomassie (0,1 % Stammlösung):
0,4 g Coomassieblau werden in 80 ml Aqua dest. gelöst und mit 120 ml Methanol aufgefüllt. Die Lösung wird filtriert und zur Herstellung einer 0,1 % Arbeitslösung müssen noch 50 ml dieser Stammlösung mit 10 ml Essigsäure und 40 ml Aqua dest. vermischt werden.

3.3.4.1 Etherextraktion für SDS-PAGE

Eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) kann nur dann durchgeführt werden, wenn der Lipidanteil der Lipoproteine durch eine Etherextraktion entfernt wird. In ein Eppi werden 50 μ g Lipoprotein mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 100 μ l aufgefüllt. Diethylether wird im Verhältnis 1:2 zugesetzt und das Gemisch wird 20 Sekunden gevortext. Die Lipoproteine werden bei 10000 rpm 2 Minuten lang zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417 R). Die obere lipidhaltige Phase wird verworfen und der Unterstand in ein neues Eppi übertragen. Das etherextrahierte Protein wird auf das Gel aufgetragen.

3.3.4.2 Trennung der Lipoproteine mit SDS Polyacrylamidgel

Es werden zwei 1,5 mm Acrylamidgele gegossen, wobei die gegossenen Trenngele einen 8 %igen und einen 10 % Acrylamidgehalt haben, um mehrere Möglichkeiten für eine optimale Trennung der Hauptproteine der einzelnen Fraktionen zu erhalten. Die Sammelgele haben einen Acrylamidgehalt von 4 % (Tab. 3.3).

Gel (1,5 mm)	8 % Trenngel	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
Aqua bidest.	3,2 ml	2,7 ml	2,1 ml
Acrylamid 30 %	2,1 ml	2,7 ml	0,5 ml
3 M Tris-HCl pH 8,45; 0,3 %SDS	2,7 ml	2,7 ml	1,3 ml
APS 10 %	60 μ l	60 μ l	30 μ l
TEMED	6 μ l	6 μ l	3 μ l

Tabelle 3.3: Pipettierschema zur Herstellung von 1,5 mm dicken SDS-Polyacrylamid-Gelelen

Die entsprechende Menge Lipoprotein 10, 20, bzw. 30 μ l werden mit 8 μ l Sample Buffer und 2 μ l Mercaptoethanol vermischt und eventuell mit 0,9 %iger NaCl Lösung auf ein Probenvolumen von 40 μ l aufgefüllt. Nach 1 Stunde Laufzeit in der Elektrophorese bei 180 V und 4 °C wird das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel 30 Minuten lang mit Coomassie gefärbt. Außerdem werden die Gele einige Male mit Destain gewaschen. Nun können die Gele in der Imager Kammer (Chemilmager 4400, Alpha Innotech-Corporation) fotografiert werden (Abb. 3.1). Die Reinheit der LDL-Fraktion zeigt sich bei circa 560 kDa, was dem Apo-B100 entspricht. Im HDL ist Apo-A1 mit 25 kDa das Hauptprotein. Wird hier Albumin gefunden, muss dieses durch einen zusätzlichen Ultrazentrifugationsschritt entfernt werden.

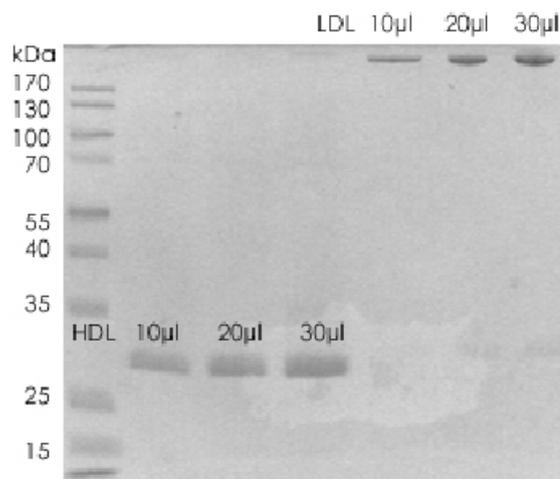


Abbildung 3.1: Mit Coomassie-gefärbtes SDS-Gel einer HDL- und LDL-Fraktion

3.4 Messung der mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (TBARS)

3.4.1 Prinzip der Messung

Bei der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren entstehen Lipidhydroperoxide, zu denen Aldehyden wie Hydroxynonenal und Malondialdehyd gezählt werden. Mengenmäßig wird vor allem Malondialdehyd (MDA), welches quantitativ das wichtigste Endprodukt der Oxidation darstellt, gebildet. Dieses kann mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure reagieren und dabei entsteht ein roter Polymethin-Farbstoff, der photometrisch bei 534 nm gemessen werden kann [ESTERBAUER et al., 1990].

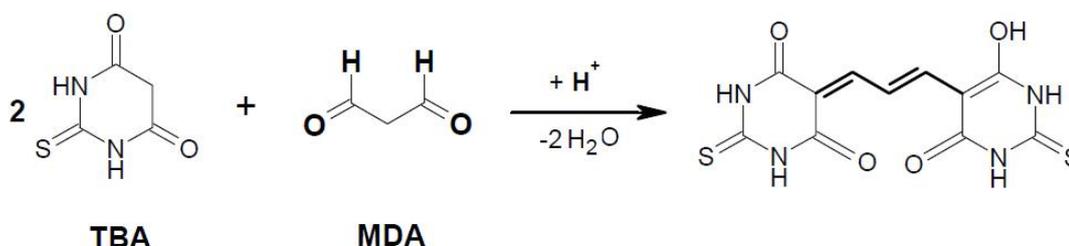


Abbildung 3.2: Reaktion von Thiobarbitursäure mit Malondialdehyd

3.4.2 Herstellung der Thiobarbitursäure-Lösung

Es werden 0,5 g TBA in einem kleinen Becherglas eingewogen und in 2,5 ml 1 M NaOH gelöst. Mit einem Magnetrührer wird der Inhalt so lange durchgemischt, bis eine senfartige Lösung entsteht. Langsam wird nach und nach destilliertes Wasser dazu pipettiert, bis ein Endvolumen von 50 ml erreicht ist (1 % in 0,05 M NaOH). Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Kühlschrank.

3.4.3 Durchführung der TBARS-Messung

500 μ l Zellüberstand der inkubierten Zellen werden in einem 2 ml Eppi mit folgenden Substanzen vermischt:

10 μ l Butylhydroxytoluol (BHT) (1 mM Stammlösung)

10 μ l EDTA (1 mM Stammlösung)

500 μl 1 %iger TBA-Lösung

500 μl Eisessig

Die Proben werden gevortext und das Eppi mit einer Nadel angestochen. Dann kommen sie für 45 Minuten in den 100 °C warmen Hitzeschrank. Danach werden sie auf Raumtemperatur abgekühlt und im Photometer (Perkin Elmer, UV/VIS Spectrometer Lamda2) bei einer Absorption von 534 nm gemessen. Über das Lambert-Beersche Gesetz und den Extinktionskoeffizienten von Malondialdehyd ($\epsilon = 156\,000 \text{ (mol/l)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) wird der Gehalt an MDA in den Proben berechnet.

3.5 Proteinbestimmung nach der Bradford Methode

3.5.1 Prinzip der Messung

Diese empfindliche photometrische Methode dient zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Die Methode beruht auf der Farbänderung des eingesetzten Farbreagens (BioRad) durch Bindung an basische und aromatische Aminosäurereste. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 verschiebt sich bei der Proteinbindung von 465 nm zu 595 nm [BRADFORD, 1976]. Mit Hilfe einer BSA-Standardkurve, die bei jeder Proteinbestimmung neu hergestellt wird (Tab. 3.4), lassen sich die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmen.

Standard Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	BSA [100 $\mu\text{g/ml}$] μl	Aqua dest. μl	Biorad-Reagenz μl
0	0	400	100
1	5	395	100
2	10	390	100
4	20	380	100
6	30	370	100
8	40	360	100
10	50	350	100
15	75	325	100
20	100	300	100

Tabelle 3.4: Pipettierschema: Standardgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration

3.5.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Proteinbestimmung für den Western Blot:

Dafür werden die Zellysate auf Eis aufgetaut und dann die Proben 10 Minuten lang bei 14 000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Mit dem Überstand wird die Proteinbestimmung durchgeführt. Dafür werden 2,5 µl Lysat eingesetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 400 µl verdünnt.

Proteinbestimmung für HPLC-Versuche:

Nach der Lipidextraktion werden 2 ml einer 0,1 M NaOH auf die Dishes pipettiert, damit eine Zellyse erreicht wird. Nach einer Stunde Schwenken am Belly Dancer werden 10 µl Probe entnommen und mit Wasser auf ein Volumen von 400 µl verdünnt.

Wie in der Tabelle 3.4 zu sehen ist, werden anschließend 100 µl BioRad Reagenz hinzugefügt und die Plastikröhrchen gut gevortext. Die Proben werden in Doppelbestimmung auf eine 96-well Platte mit einem Probenvolumen von 200 µl aufgetragen.

Die Extinktion wird am Plattenphotometer (Microplate Reader BIO Rad Model 550) bei 595nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden mit bekannter Konzentration an BSA (Abb. 3.3) kann die Proteinkonzentration der einzelnen Proteine ermittelt werden.

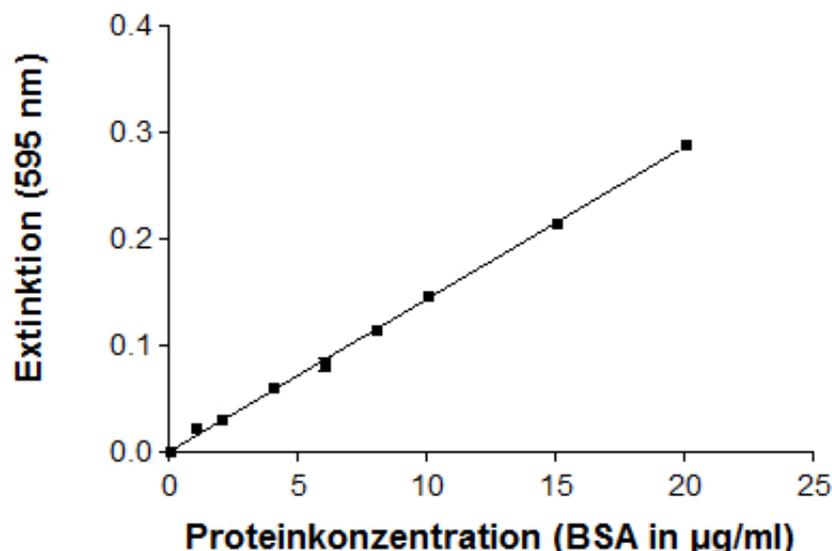


Abbildung 3.3: Repräsentative BSA-Standardgerade

3.6 Intrazelluläre Cholesterolmessung mit HPLC

3.6.1 Prinzip der Messung

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gehört zu der Gruppe der Säulenchromatographien, wobei sich die stationäre Phase in einer Säule befindet, durch die die mobile Phase fließt. Die mobile Phase wird dabei mit hohem Druck durch die Säule gepumpt, damit wird eine optimale, schnellere Trennung erreicht. Bei einem Probengemisch wandern die einzelnen Bestandteile unterschiedlich schnell, weil sie durch die Wechselwirkung mit der stationären Phase unterschiedlich stark aufgehalten werden. Werden die Stoffe aus der Säule eluiert, werden sie mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen.

Das verwendete HPLC-Gerät und der Detektor stammen von der Firma Waters (Waters 2695 Separations Module und 2487 Dual Absorbance Detector). In Abbildung 3.4 sind die HPLC-Bedingungen aufgelistet, unter denen die intrazelluläre Cholesterolmessung durchgeführt wurde.



Parameter	Bedingungen
HPLC-Säule	Nova-Pack C18, 4 μ m; 3,9x150 mm column
Fließmittel	Acetonitril : Isopropanol 80:20
Fließgeschwindigkeit	1 ml/min.
Säulentemperatur	30 °C
Sample Temperatur	20 °C
Einspritzvolumen	30 μ l
Wellenlänge	210 nm
Laufzeit	30 min.
Waschmittel	50 % Methanol

Abbildung 3.4: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von intrazellulärem Cholesterol

3.6.2 Verwendete Lösungen

- Hexan : Isopropanol 3:2 (v/v)
- Interner Standard Ergosterol (C28), Stammlösung: 1 mg/ml in Hexan-Isopropanol gelöst

- 0,1 M NaOH
- ethanolische KOH Lösung 94:6 (v/v)
- EtOH : Chloroform 80:20 (v/v)

3.6.3 Lipidextraktion

Nach 18 Stunden Inkubation mit oxLDL werden die THP-1 Makrophagen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Für die Lipidextraktion werden 3 ml frisch zubereitetes Hexan : Isopropanol (3:2) und 12 μ g Ergosterol ($C_{28}H_{44}O$) als interner Standard auf die Dishes pipettiert. Nach 30 Minuten Schwenken am Belly Dancer wird der Überstand in Röhrchen überführt. Die Dishes werden nochmals mit 3 ml Hexan : Isopropanol (3:2) gewaschen, und auch diese werden in die Röhrchen transferiert. Die Röhrchen mit den Lipidextrakten werden unter N_2 -Atmosphäre getrocknet. Ist das Hexan : Isopropanol (3:2) auf den Dishes verdampft kommen jeweils 2 ml 0,1 M NaOH auf die Zellkulturschalen, um eine Zellyse zu erreichen. Nach 1 Stunden Schwenken am Belly Dancer kann mit der Proteinbestimmung fortgefahren werden. Siehe Kapitel 3.5.2.

3.6.4 Verseifung

Nach der N_2 -Verdampfung kommen 5 ml einer ethanolischen KOH Lösung (94:6) in die Röhrchen. Damit sich die Fette lösen können, werden die Röhrchen 1 Stunde bei 70 °C erwärmt, wobei die Lösung immer wieder geschüttelt werden muss. Nach Umfüllen der Flüssigkeit in Erlenmeyerkolben, werden 5 ml H_2O und 10 ml Hexan : Isopropanol (3:2) hinzugefügt. Die Kolben werden 30 Sekunden lang gevortext, in Glaseprouvetten überführt und gewartet, bis sich zwei Phasen bilden. Die obere Phase, in welcher sich die Lipide befinden, wird in neue Röhrchen pipettiert, die untere Phase wird in den Erlenmeyerkolben zurückgeleert, und nochmals mit 10 ml Hexan : Isopropanol (3:2) ausgeschüttelt. Die obere Phase wird zu den ersten Überresten in die Röhrchen pipettiert und diese wieder unter N_2 -Atmosphäre eingedampft.

Zusätzlich werden Versuche gemacht, bei welchem vor dem Eindampfen mit Stickstoff die Probe aufgeteilt wird und dabei ein Teil der Probe verseift wird und der andere nicht. Der Teil, der nicht verseift wurde erhielt direkt 1 ml EtOH : Chloroform (80:20). Siehe weiter Kapitel 3.6.5.

3.6.5 Vorbereitung der Proben für die HPLC-Messung

Nach der N₂-Verdampfung wird die Probe in 1 ml einer EtOH : Chloroform (80:20) Mischung in Röhrchen resuspendiert, welche dann eine halbe Stunde bei 45 °C unter Schütteln in den Hitzeschrank gestellt werden. Für die HPLC-Messung werden Leerwerte mit je 1 ml frisch hergestellter EtOH : Chloroform (80:20) Mischung bereitgestellt und in Vials übertragen. Der Inhalt der Röhrchen wird mit einer Pasteurpipette in Eppis überführt und von dort mit einer Spritze und einem Filter der Porengröße 0,45 µm in Vials übertragen. Mit einer Kappe werden die Vials verschlossen und können so in das HPLC-Gerät gestellt werden.

3.6.6 Bedienung des HPLC-Gerätes

Für die intrazelluläre Cholesterolmessung werden die Lösungsmittel Acetonitril, 50 % Methanol und Isopropanol verwendet. Das Gerät wird bei einer Proben temperatur (sample temperature) von 20 °C und einer Säulentemperatur (column temperature) von 30 °C entlüftet. Danach wird eine neue Lösungsmittelzusammensetzung mit 20 % Isopropanol und 80 % Acetonitril eingestellt. Nach Entlüftung der Säulen wird der Flow auf 1 ml/min eingestellt. Nachdem der Druck auf < 700psi und Δ p auf circa 15 stabilisiert ist kann der Lauf der mobilen Phase gestartet werden. Mit der Messung der Proben kann dann begonnen werden, wenn die Baseline um nicht mehr als 2 mAU schwankt. Für die Messung wird mit einem Autosampler 30 µl Probe aus dem Vial entnommen und 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 210 nm gemessen.

3.6.7 Reinigung der HPLC-Säule nach einem Lauf

Nach der Analyse der Proben wird das Gerät 30 Minuten mit frischem destilliertem H₂O und anschließend ein paar Stunden mit 50 % Methanol gespült. Der Flow wird auf 1 ml/min und die Säulentemperatur auf 50 °C eingestellt, um Cholesterol- und Lipidreste gründlich von der Säule zu lösen. Die HPLC-Auswertung erfolgt mit der Software Empower (Firma Waters).

3.6.8 Messung der Reinsubstanzen

Interner Standard Ergosterol:

Dafür werden direkt 12 µl Ergosterol (Konz. 1 mg/ml) in Glaseprouvetten mit 6 ml

3.6. INTRAZELLULÄRE CHOLESTEROLMESSUNG MIT HPLC

Hexan : Isopropanol (3:2) pipettiert und diese unter N₂-Atmosphäre eingedampft. Die weiteren Arbeitsschritte werden unter Punkt 3.6.5. genau erläutert.

Cholesterol:

Zuerst wird eine Stammlösung eines Cholesterolpulvers (Apoka, HERBA) mit einer Konzentration von 3 mg/ml hergestellt. Das Pulver wird in Hexan : Isopropanol (3:2) gelöst und daraus dann 20 µl (1:50 Verdünnung), 10 µl (1:100) und 4 µl (1:250) entnommen, und direkt in 6 ml Hexan : Isopropanol (3:2) pipettiert. Die folgenden Arbeitsschritte sind mit dem von Ergosterols ident. Ein direkter Vergleich der chemischen Strukturen von Cholesterol und dem internen Standard Ergosterol ist in Abbildung 3.5 zu sehen.

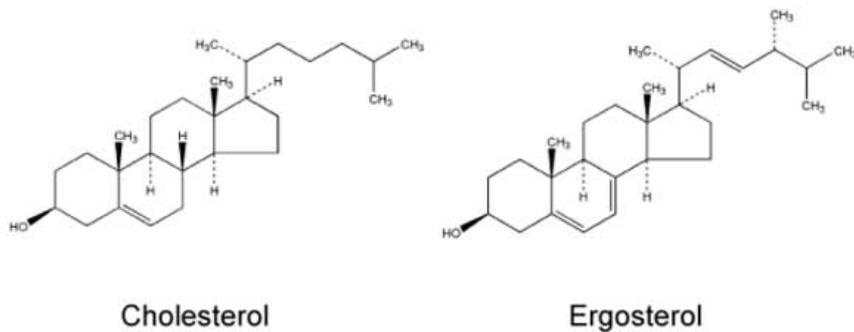


Abbildung 3.5: Chemische Struktur von Cholesterol und Ergosterol

3.6.9 Messung von intrazellulärem und extrazellulärem Cholesterol

Bei diesem Versuch wird PBS, mit dem die inkubierten Zellen gewaschen werden, in einem 15 ml Falcon gesammelt. Dabei wird PBS von jeweils 3 gleichen Versuchsansätzen (insgesamt 9 ml) zusammengemischt und 5 Minuten lang zentrifugiert (1750 rpm, 4 °C). Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 3 ml Hexan: Isopropanol (3:2) gelöst und wieder 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in neue Röhrchen transferiert, das Pellet wieder gelöst und wieder zentrifugiert. Am Ende befinden sich 6 ml eines Hexan : Isopropanol (3:2) Gemisches mit 12 µl Ergosterol in den Röhrchen.

Dieses wird unter N₂-Atmosphäre eingedampft. Der weitere Verlauf entspricht dem unter Punkt 3.6.4 beschriebenen Durchführung.

3.7 Western Blot

3.7.1 SDS-Gel Elektrophorese

Verwendete Lösungen:

- 10 % SDS Lösung:
10 g Sodium dodecylsulfate (SDS)
100 ml Aqua dest.
Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.
- Sample Buffer (SB):
50 % Glycerin
45 % 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
Pulverspitze Bromphenolblau
5 % Mercaptoethanol (BioRad)
Dieser wird jedesmal frisch hergestellt.
- 10x Tris/Glycin Puffer:
30 g Tris-Base
144 g Glycin (Merck)
100 ml einer 10 %igen SDS-Lösung werden in einem Gesamtvolumen von einem Liter destilliertem Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.
Der Puffer wird 1:10 verdünnt, um den für die Elektrophorese benötigten 1x Tris/Glycin Puffer zu erhalten.
- 3 M Tris-HCl, pH 8,45 / 0,3 % SDS:
182 g Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris Base, Merck) werden 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 aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.
- 30 % Acrylamid (Bis solution; 29:1)
- TEMED (Tetramethylethylendiamin, Fluka)

- 10 %APS:
500 mg Ammoniumpersulfat (APS, Pharmacia Biotech) werden in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und zu je 105 μl aliquotiert. Diese Menge reicht für 2 Gele. Die Lagerung erfolgt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7.1.1 Herstellen von Polyacrylamidgelen

Für die Proteintrennung werden 8 %ige Polyacrylamidgele mit der Stärke 0,75 mm gegossen.

Gel (0,75 mm)	8 % Trenngel	4 % Sammelgel
Aqua dest.	1,6 ml	1,1 ml
Acrylamid 30 %	1,1 ml	0,3 ml
3 M Tris-HCl pH 8,45 0,3 % SDS	1,3 ml	0,7 ml
10 % APS	30 μl	20 μl
TEMED	3 μl	2 μl

Tabelle 3.5: *Pipettierschema eines SDS-Polyacrylamidgels mit einer Dichte von 0,75 mm*

Die Glasplatten werden mit 70 %igem Ethanol gereinigt und mit einem Microfasertuch gründlich getrocknet. Die Platten werden aneinandergelegt und in die Halterung gedrückt. Die Einzelsubstanzen für das Trenngel werden in einem Falcon zusammengemischt, und erst kurz bevor man das Gel gießt, werden APS und TEMED hinzugefügt, da diese das Gel zur Polymerisation bringen. Die zusammengemischten Lösungen werden auf eine Höhe von $\frac{2}{3}$ der Glasplatten eingegossen. Mit Isopropanol wird das Trenngel überschichtet, damit eine luftblasenfreie Oberfläche entsteht und das Gel nicht austrocknet. Ist das Trenngel polymerisiert, wird das Isopropanol verworfen und die Oberfläche des Gels mit dest. Wasser gespült und anschließend mit einem Filterpapier getrocknet. Daraufhin werden die Zutaten für das Sammelgel zusammengemischt. Um das Sammelgel anzufärben, damit die Taschen später besser sichtbar sind, wird der Flüssigkeit eine Spatelspitze Bromphenolblau zugegeben. Das Sammelgel kann nun auf das Trenngel pipettiert werden. Ein 10er oder 15er Kamm wird vorsichtig in das Sammelgel geschoben, damit Taschen für den Probeninhalt entstehen. Nach circa 30 Minuten ist das Gel polymerisiert, und die Proben können aufgetragen werden.

3.7.1.2 Vorbereitung der Proben

Die Lysate werden auf Eis aufgetaut und mit PBS verdünnt, um eine einheitliche Proteinmenge der Proben zu erhalten. Die Proben werden mit Sample Buffer 1:4 versetzt und für 30 Minuten bei 40 °C im Wasserbad erhitzt.

3.7.1.3 Beladung der Gele und Trennung der Proteine

Die Glasplatten werden in die Gel-Elektrophorese-Apparatur (Mini PROTEAN[®] 3 Cell) eingebaut und in den Tank gestellt. Dieser wird mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt, sodass die Geltaschen vollständig bedeckt sind. Nach Entfernen der Kämmen im Abzug werden die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült, um restliche Gelbestandteile zu entfernen. In die erste Tasche kommen 2,5 µl eines Protein-Markers (PageRuler[®] Prestained Protein Ladder, Fermentas) mit Proteinen bekannter Größe. Die Taschen werden mit 22 µl (10er Kamm) bzw. 10 µl (15er Kamm) Protein befüllt und eventuell freibleibende Taschen werden mit Sample Buffer beladen. Nun wird die Elektrophorese bei 180 V 1 Stunde und 20 Minuten bei 4 °C durchgeführt. Die Stromstärke soll pro Gel bei maximal 60 mA liegen.

3.7.2 Western Transfer Blotting

Verwendete Lösungen:

- Transfer Buffer:
wird für den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran verwendet. 100 ml 10x Tris/Glycin Puffer und 200 ml Methanol werden auf 1000 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. Der Puffer kann mehrmals verwendet werden. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Durchführung:

Nach der Proteinauftrennung in der Elektrophorese werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und anschließend immunologisch detektiert. Dafür werden die beiden Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt und das Sammelgel mit einer Rasierklinge abgeschnitten. Um die Proteine auf die Membran zu blotten, werden eine Transferkassette mit Schwamm, Filterpapier, Nitrocellulose und das Gel gebraucht. Mit Ausnahme des Gels werden die genannten Bestandteile in Transfer Puffer getaucht und in der Reihenfolge, wie auf der Abbildung 3.6 zu sehen ist, übereinander geschichtet.

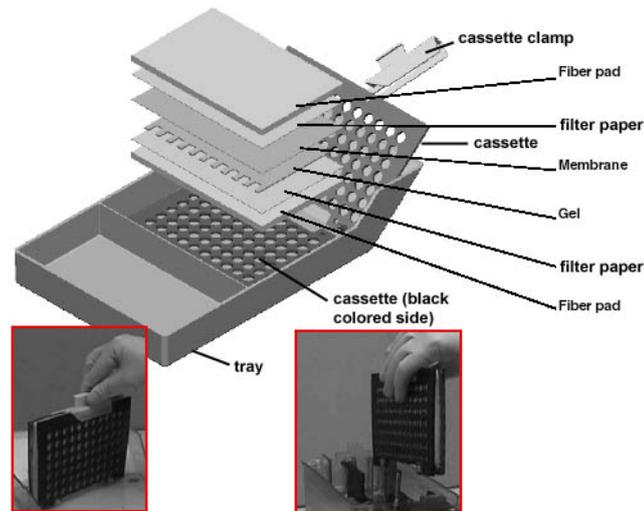


Abbildung 3.6: *Aufbau eines Western Blot-Sandwiches*
 (Quelle: <http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=Westernblotting>)

Um störende Luftblasen zwischen Gel und Nitrozellulose zu verhindern, werden diese gründlich mit einer Plastikeprouvette über dem Filterpapier ausgerollt. Die zusammengeklappte Transferkassette wird mit der schwarzen Platte zum schwarzen Teil der Kammer (Mini-Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell, Biorad) gestellt. Die Transferkammer wird mit ausreichend Transfer-Puffer befüllt, und zur Kühlung des Blotting Vorgangs kommt zusätzlich ein Eisblock in die Kammer. Der Transfer wird bei 0,4 Ampere 45 Minuten im Kühlschrank durchgeführt. Dabei sollen die Leistung stets über 35 W liegen, ansonsten muss ein neuer Transfer Puffer hergestellt werden.

3.7.3 Immunoblotting

Verwendete Lösungen:

- 10x TBS Puffer:
dient als Stammlösung für den Washing Buffer und den Blocking Buffer. 24,2 g TRIS und 84,8 g NaCl werden in 800 ml Aqua dest. aufgelöst. Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,4 eingestellt und der Puffer mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.
- Ponceau S:
dient der reversiblen Anfärbung von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran. 10 g Ponceau S, 300 g Trichloressigsäure, 300 g Sulfosalicylsäure werden mit dest. Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur. Die Lösung kann mehrmals verwendet werden.

- Washing Buffer:
wird zum Entfernen von überschüssiger Milch und Antikörpern verwendet.
100 ml 10x TBS
900 ml Aqua dest.
1 ml Tween20
Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur
- 5 %ige Milch:
2,5 g Milchpulver werden in 50 ml Washing Buffer aufgelöst. Die Lösung wird vor Verbrauch frisch hergestellt.
- Primärer Antikörper:
HIF-1 α : Mouse IgG1, BD-Transduction Laboratories, 1:300 in 3 % BSA (120 kDa)
SR-BI: Rabbit IgG, abcam, 1:3000 in 2,5 %iger Milch (82 kDa)
 β -Aktin: Mouse IgG2a, Sigma, 1:3000 in 3 % BSA (42 kDa)
Die Antikörper können mehrmals verwendet werden. Um die Haltbarkeit zu erhöhen, werden ein paar Körnchen Natrium-Acid (NaN_3) dazugegeben. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank.
- Sekundärer Antikörper:
HIF-1 α und β -Aktin (mouse IgG): Horse-Radish-Peroxidase-gekoppelte Goat Anti-mouse IgG-HRP Konjugat (BioRad).
1: 20 000 in 15 ml 5 %iger Milch für β -Aktin.
1: 10 000 in 20 ml 5 %iger Milch für HIF-1 α
SR-BI (rabbit): Goat Anti-rabbit IgG-HRP Konjugat (BioRad).
1: 20 000 in 15 ml 5 %iger Milch für SR-BI.

Nach dem Transfer wird die Nitrocellulosemembran vorsichtig aus der Kassette entnommen und einige Minuten in eine Ponceau S Lösung eingelegt, um die Proteine zu färben. Ponceau S wird mit dest. Wasser abgewaschen, und nun kann die Membran entsprechend der Proteingröße von HIF-1 α , SR-BI und β -Aktin geschnitten werden. Um die Proteine zu entfärben, wird der Blot 5 Minuten lang am Belly Dancer mit Washing Buffer gewaschen. Die freien unspezifischen Bindungstellen werden 1 Stunde lang mit Blocking Buffer am Belly Dancer bei Raumtemperatur geblockt. Danach werden die Blots dreimal 10 Minuten mit Washing Buffer gewaschen. Nun werden die Blots nach ihrer Größe aufgeteilt und

mit den oben beschriebenen primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Am folgenden Tag werden die Antikörper in ein 15 ml Falcon zurückgeleert und die Blots dreimal 10 Minuten mit Washing Buffer gewaschen. Anschließend werden die Blots bei Raumtemperatur 1 Stunde am Belly Dancer mit sekundärem Antikörpern, welche oben beschrieben sind, inkubiert. Danach werden die Nitrocellulosemembranen wieder dreimal mit Washing Buffer gewaschen.

3.7.4 Detektion

Verwendete Lösungen:

- Supersignal Chemiluminescent (Pierce)
- ChemiGlow (Alpha Innotech)

Durchführung:

Die Lösungen bestehen aus einer Enhancer- und einer Peroxid-Lösung, welche kurz vor Gebrauch in gleichen Teilen zusammengemischt werden. Die Blots werden mit dieser Lösung beträufelt und nach einer 5-minütigen Einwirkzeit werden die Blots in eine Klarsichtfolie gewickelt, damit sie nicht austrocknen. Anschließend werden sie in die Imager-Kammer (Chemilmager 4400, Alpha Innotech Corporation) gelegt. Durch die Chemilmager Software (Chemilmager v5.5, Alpha Innotech) wird eine Bildsequenz über die Dauer der Belichtung aufgezeichnet. Mit dem Programm AlphaEase FC (Chemilmager 4400) kann die Signalstärke der Banden ausgewertet werden, wobei die jeweiligen Banden auf die Ladekontrolle β -Aktin bezogen werden.

3.7.5 Statistische Auswertung

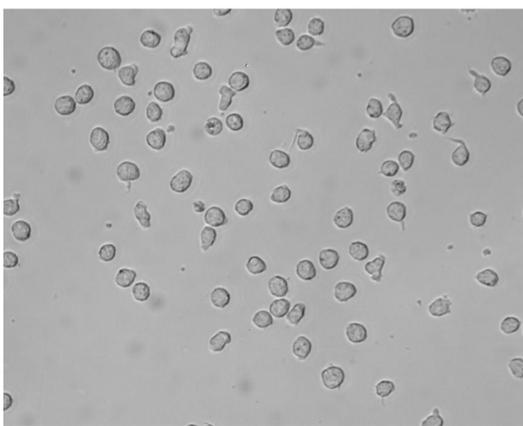
Das Programm GraphPad Prism (Version 3.02) wurde zur statistischen Auswertung herangezogen. Die statistische Signifikanz wurde mit der One-way ANOVA und Newman-Keuls berechnet (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

4 Ergebnisse

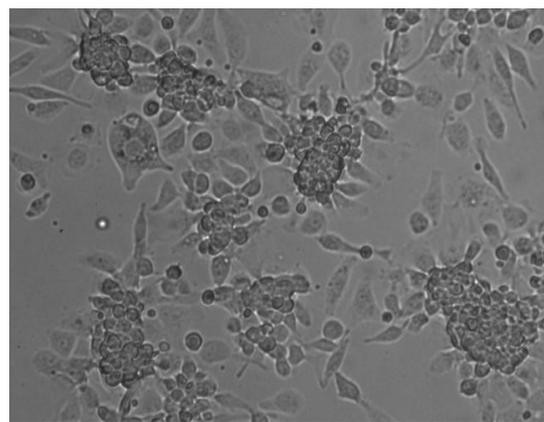
Die Auswertungen dieser Arbeit basieren auf den bereits im Material- und Methoden Teil beschriebenen HPLC- und Western Blot-Ergebnissen. Die HPLC dient der quantitativen Bestimmung von intrazellulärem Cholesterol. Mit Hilfe des Western Blots kann der Einfluss des Antioxidans N-acetyl-cystein (NAC) auf die Proteinexpression von SR-BI und HIF-1 α bestimmt werden. Für beide Untersuchungen verwendeten wir die humane Monozyten-Zelllinie THP-1, welche mit PMA zu Makrophagen ausdifferenziert wird.

4.1 THP-1 Zelldifferenzierung mit PMA

Werden THP-1 Monozyten (0,5 Mio./ml) in Suspension (Abb. 4.1a) mit 160 nM PMA inkubiert, bilden sich nach 3 Tagen adhärente Makrophagen aus, die an der Well-Oberfläche festsitzen und Ausläufer gebildet haben (Abb. 4.1b). Makrophagen spielen in der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Rolle und zeichnen sich durch die phagozytotische Aufnahme von Pathogenen aus. Weiters spielen sie in der Pathogenese der Atherosklerose, durch die unkontrollierte Aufnahme von Lipiden durch ihre spezifischen Scavenger-Oberflächenrezeptoren, eine zentrale Rolle.



(a) Monozytäre THP-1 Zellen in Suspension

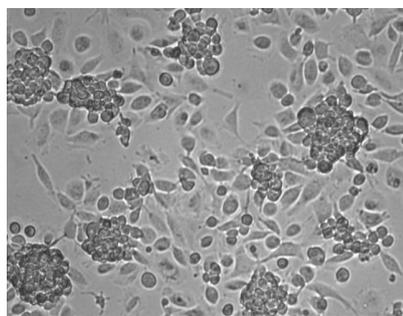


(b) durch PMA stimulierte Makrophagen

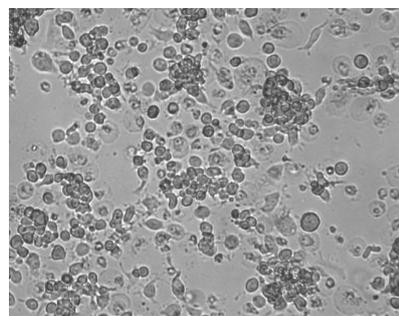
Abbildung 4.1: THP-1 Monozyten (a) und durch PMA Stimulierung zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen (b)

4.2 Zellmorphologische Veränderung durch modifiziertes LDL in THP-1 Makrophagen

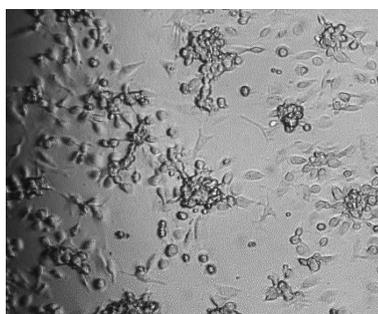
Sind die Zellen nach der Inkubation mit PMA zu Makrophagen ausdifferenziert, werden sie mit verschiedenen Substanzen weiterbehandelt. Es erfolgt eine Inkubation mit Cu^{2+} - als auch HOCl-modifiziertem LDL ($100 \mu\text{g/ml}$) und eine Inkubation mit nativem LDL ($100 \mu\text{g/ml}$) für eine Dauer von 18 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 Gehalt. Die Kontrolle wird mit BSA (2 mg/ml) behandelt (Abb. 4.2a). Die beobachteten zellmorphologischen Veränderungen können nach 18 Stunden Inkubation mit Hilfe des Mikroskopes festgestellt werden. Makrophagen nehmen dabei Cu^{2+} -oxLDL unkontrolliert in das Cytoplasma auf und verwandeln sich in lipidbeladene Schaumzellen, die sich morphologisch stark von den Kontrollzellen unterscheiden (Abb. 4.2b). Im Gegensatz dazu zeigen HOCl-oxLDL (Abb. 4.2c) und nLDL (Abb. 4.2d) behandelte Zellen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle.



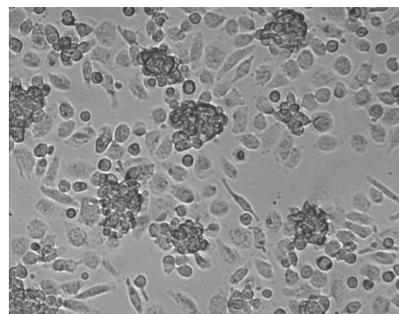
(a) Kontrolle (BSA 2 mg/ml)



(b) Cu^{2+} -oxLDL ($100 \mu\text{g/ml}$)



(c) HOCl-oxLDL ($100 \mu\text{g/ml}$)



(d) nLDL ($100 \mu\text{g/ml}$)

Abbildung 4.2: THP-1 Makrophagen (a) nach einer Inkubation mit Cu^{2+} -oxLDL (Schaumzellbildung) (b) und unbeeinflusste Zellmorphologie durch Inkubation mit HOCl-oxLDL und nLDL (c,d)

4.3 OxLDL-verursachte MDA Freisetzung in THP-1 Makrophagen

Werden im Organismus Fettsäuren durch ROS angegriffen, entsteht eine Kettenreaktion, in deren Verlauf hochreaktive Radikale entstehen, die die Zelle schädigen können. Bei diesem Prozess der Lipidperoxidation entstehen hauptsächlich Malondialdehyd und Hydroxynonenal, die selbst wiederum in der Lage sind, schädliche Reaktionen in der Zelle auszuführen. Diese Oxidationsprodukte können mit Hilfe der Thiobarbitursäure zu einem roten Polymethin-Farbstoff kondensieren und so mittels Photometer bei 534 nm detektiert werden [ESTERBAUER et al., 1990]. Um den Malondialdehyd-Gehalt der Proben zu messen, wird der Zellüberstand der inkubierten Zellen verwendet und wie in Kapitel 3.4 beschrieben mit Thiobarbitursäure versetzt.

Wie die nachstehende Grafik (Abb. 4.3) deutlich zeigt, kommt es bei der Inkubation von THP-1 Makrophagen mit Cu^{2+} -oxidiertem LDL ($100 \mu\text{g/ml}$) zu einem enormen Anstieg an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen. Die MDA-Bildung ist dabei um das 20-fache höher als bei der Kontrolle. Ein Unterschied in der MDA-Menge zwischen Kontrolle (2 mg/ml BSA) und der Inkubation mit nLDL ($100 \mu\text{g/ml}$) kann nicht festgestellt werden. Die Inkubation mit HOCl-modifiziertem LDL ($100 \mu\text{g/ml}$) zeigt keine Akkumulation von TBARS, da hierbei vor allem der Proteinanteil des LDL-Moleküls oxidiert wird [RADHIKA, 2007].

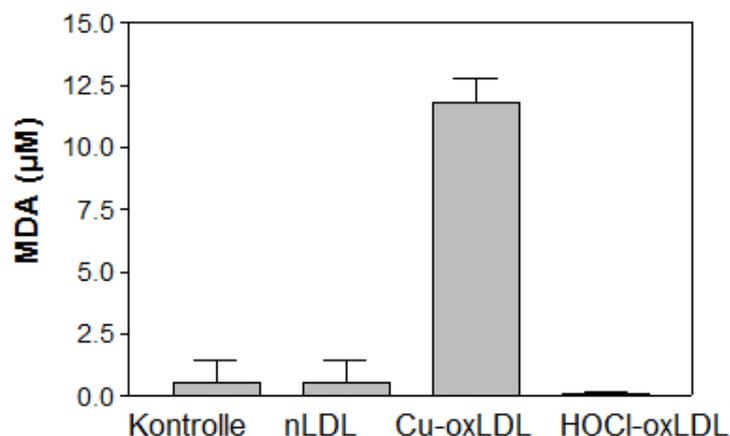


Abbildung 4.3: MDA-Freisetzung in differenzierten THP-1 Zellen nach einer 18 Stunden Inkubation mit nLDL, Cu^{2+} - und HOCl-oxLDL (jeweils $100 \mu\text{g/ml}$) bei 37°C im Vergleich zu einer Kontrolle (2 mg/ml BSA). $n = 4$, $\text{MW} \pm \text{SD}$

4.4 Einfluss von oxLDL auf die Proteinmenge von THP-1 Makrophagen

Die Proteinbestimmung erfolgt mit der Methode nach Bradford, die auf der Farbänderung des eingesetzten Farbreagens beruht. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm bei einer Proteinbindung zu 595 nm [BRADFORD, 1976].

Für die HPLC-Versuche werden Kulturschalen mit einer Wachstumsfläche von 22,1 cm² verwendet, auf welche 2 ml 0,1 M NaOH pipettiert wird, um eine Zellyse zu erreichen. Nach einer Stunde wird den Proben 10 µl entnommen und die Proteinkonzentration photometrisch mit der Bradford-Methode bestimmt.

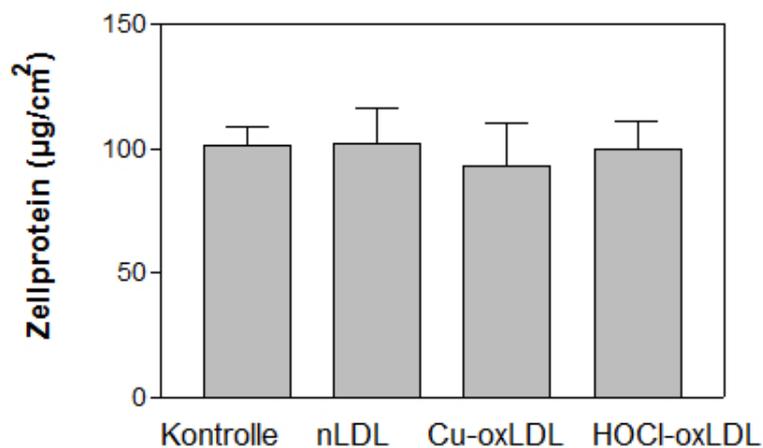


Abbildung 4.4: Proteinkonzentration in differenzierten THP-1 Zellen nach 18-stündiger Behandlung mit 100 µg/ml nLDL, Cu²⁺- und HOCl-oxLDL im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA). n = 4, MW ± SD

Die Grafik (Abb. 4.4) zeigt eine leicht erniedrigte, nicht signifikante Proteinkonzentration von THP-1 Makrophagen, die mit Cu²⁺-oxLDL (100 µg/ml) inkubiert wurden, wobei eine 9 %ige Senkung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden konnte. Die Kontrollzellen (2 mg/ml BSA), als auch nLDL und HOCl-oxLDL (jeweils 100 µg/ml) behandelte Makrophagen enthalten ca. 100 µg Zellprotein pro cm².

4.5 Bestimmung von intrazellulärem Cholesterol in THP-1 Zellen mittels HPLC

4.5.1 Interner Standard Ergosterol

Für die HPLC-Messung ist es wichtig, den zu analysierenden Proben eine bekannte Substanz mit bekannter Konzentration hinzuzufügen, welche außerdem eine ähnliche chemische Zusammensetzung hat (Abb. 3.6). Da dieses Kriterium auf Ergosterol völlig zutrifft, wird es für die HPLC-Versuche verwendet. 12 μ l Ergosterol (1 mg/ml) werden direkt nach dem Waschschrift auf die Kulturschale pipettiert und ab dem Zeitpunkt der Zugabe bis zur Messung durchläuft der interne Standard die gleichen experimentellen Bedingungen, wie auch die zu messende Substanz. Nach dem HPLC-Lauf wird Ergosterol gemeinsam mit den anderen Peaks ausgewertet und die Konzentration der zu messenden Substanzen wird in Relation zum internen Standard berechnet.

Es kann gezeigt werden, dass sowohl die Reinsubstanz Ergosterol als auch Ergosterol samt Zellmischung nach einer Retentionszeit (retention time, RT) von 5,3 Minuten eluiert wird. Dabei weist Ergosterol allein bei der Messung eine Peakfläche von circa 30 000 auf. Im Gegenteil dazu vermindert sich die Peakfläche in diesem Experiment um das 1,8-fache, wenn ein normaler Probendurchlauf mit Zellen durchgeführt wird (Abb. 4.5). Eine mögliche Erklärung dieses Unterschieds könnte sein, dass die Reinsubstanz Ergosterol nicht in die Kulturschale pipettiert wurde, sondern gleich direkt im Glasröhrchen mit Hexan : Isopropanol (3:2) vermischt wurde.

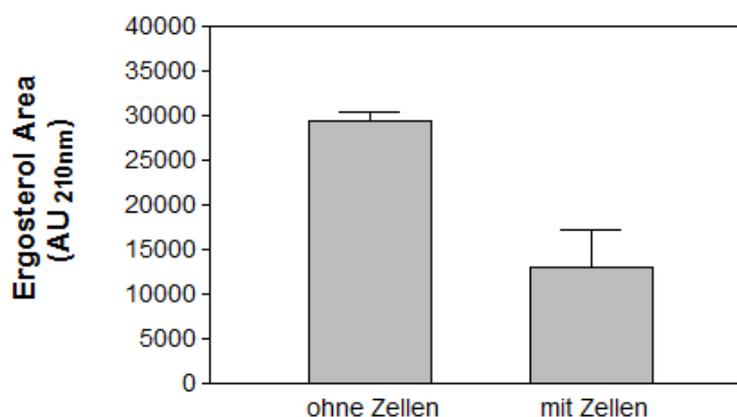


Abbildung 4.5: HPLC-Peakfläche von Ergosterol in An- oder Abwesenheit von Zellen. $n = 2, MW \pm SD$

4.5.2 Messung der Reinsubstanz Cholesterol

Bei diesem Versuch wird überprüft, ob die Peakfläche proportional mit der Erhöhung der Cholesterolkonzentration ansteigt. Dafür werden unterschiedliche Konzentrationen an Cholesterol (12; 30; 60 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt und mit der HPLC-Methode gemessen. Das reine Cholesterol wird nach einer RT von 7,2 Minuten eluiert. Bei einer Cholesterolkonzentration von 12 $\mu\text{g/ml}$ kann eine Peakfläche von 93 000 festgestellt werden. Diese verdoppelt sich bei einer eingesetzten Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$. Die nächsthöhere Konzentration zeigt einen Anstieg der Peakfläche um das 2,3 fache. Die Abb. 4.6 zeigt einen Zusammenhang zwischen eingesetzter Cholesterolmenge und detektierter Peakfläche.

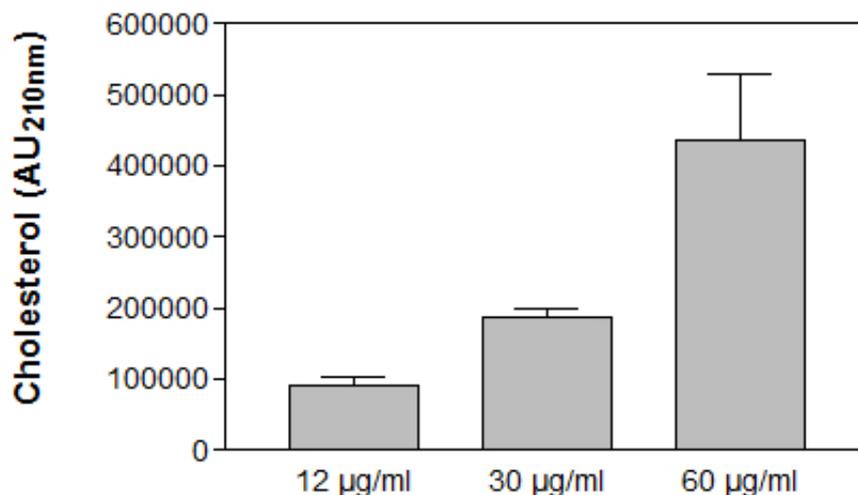


Abbildung 4.6: HPLC-Messung von verschiedenen Cholesterolkonzentrationen

4.5.3 Repräsentative Chromatogramme der mit LDL behandelten THP-1 Zellen

Die Peaks werden mit Hilfe von dem Programm Empower manuell ausgewertet. Der Ergosterol Peak erscheint nach einer RT von 5,3 Minuten und der Cholesterolpeak nach einer RT von 7,2 Minuten. Die RT gibt dabei die benötigte Zeit an, die eine Substanz vom Start der Analyse bis zu seiner Detektion für die Elution braucht. Die Fläche unter den Peaks ist dabei proportional der Konzentration des Stoffes. Dies ist anhand der untenstehenden Abbildungen (Abb. 4.7-4.10) deutlich zu erkennen.

4.5. BESTIMMUNG VON INTRAZELLULÄREM CHOLESTEROL IN THP-1 ZELLEN MITTELS HPLC

Der kleinste Cholesterolpeak ist der von den Kontrollzellen, die mit 2 mg/ml BSA inkubiert werden (Abb. 4.7). Dann folgen THP-1 Makrophagen, die mit Cu^{2+} -oxLDL (Abb. 4.9) und nLDL (Abb. 4.8) behandelte werden. Der größte totale Cholesterolpeak ist der von HOCl-oxLDL inkubierten Zellen (Abb. 4.10). Die Fläche der Peaks entsprechen den in der Abbildung 4.14 gezeigten intrazellulären Cholesterolwerten. Bei den zusätzliche Peaks, die zwischen Ergosterol und Cholesterol zu sehen sind, handelt es sich um von uns nicht identifizierte Substanzen. Cholesterol und Ergosterol werden mit dem 2487 Dual Absorbance Detektor (UV/VIS-Detektor) bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert.

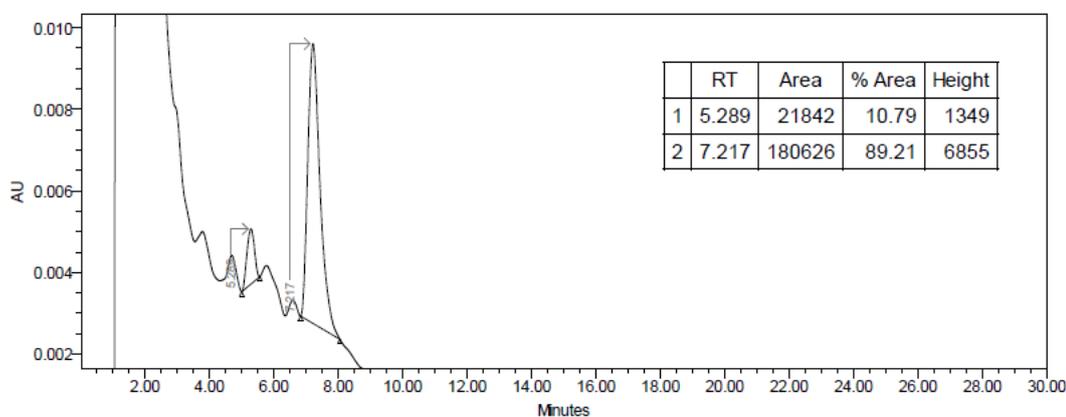


Abbildung 4.7: Chromatogramm von THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 2 mg/ml BSA (Kontrolle)

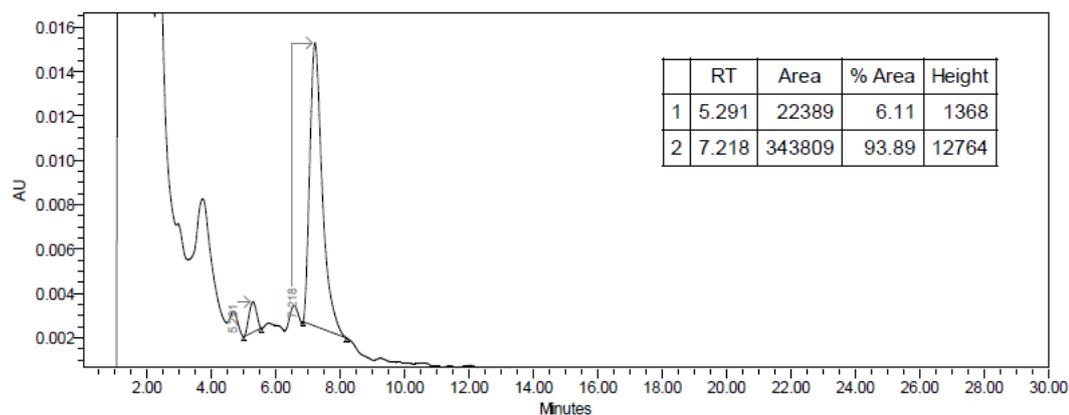


Abbildung 4.8: Chromatogramm von THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml (nLDL)

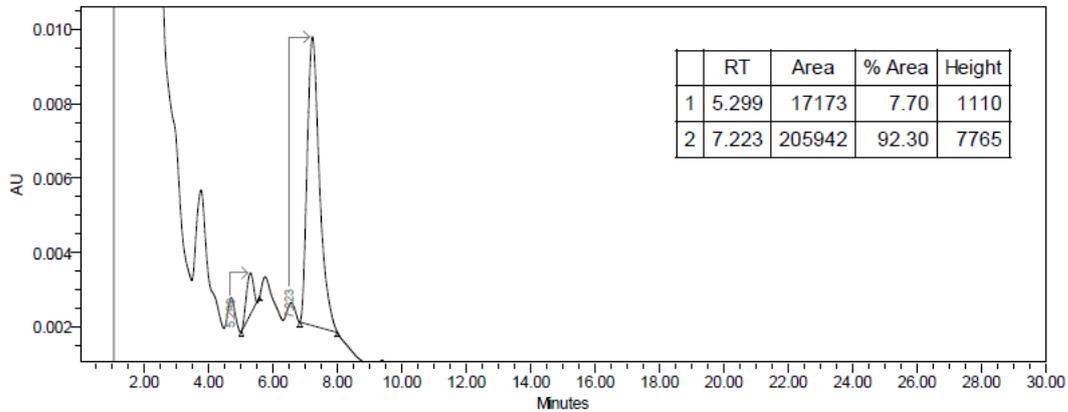


Abbildung 4.9: Chromatogramm von THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml (Cu^{2+} -oxLDL)

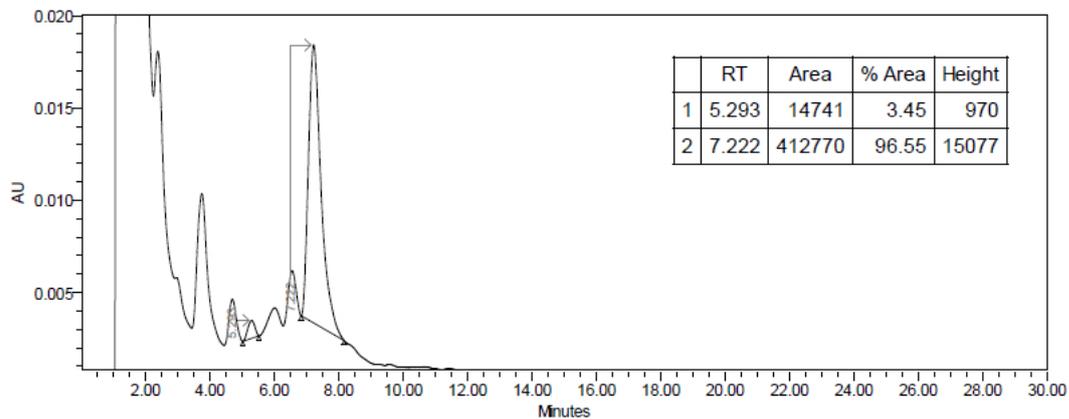


Abbildung 4.10: Chromatogramm von THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml (HOCl-oxLDL)

4.6 Bestimmung von freiem und totalem Cholesterol in THP-1 Zellen

Bei diesem Versuch wird die Probe eines Versuchsansatzes aufgeteilt, wobei ein Teil der Probe einer alkalischen Verseifung unterzogen wird und der andere Teil ohne Verseifungsschritt mittels HPLC gemessen wird. Dabei erhält man zwei unterschiedliche Cholesterolmengen, wobei eine den Anteil des freien (nicht veresterten) Cholesterols (Abb. 4.11) und der andere den Anteil des totalen (verseiften) Cholesterols (Abb. 4.12), widerspiegelt. Durch die Differenz dieser beiden Werte erhält man den Anteil an Cholesterylethern (Abb. 4.13).

4.6. BESTIMMUNG VON FREIEM UND TOTALEM CHOLESTEROL IN THP-1 ZELLEN

Die Verseifung der THP-1 Zellen durch Kalilauge führt zur hydrolytischen Spaltung der Cholesterylesterbindung zwischen Cholesterol und langkettiger Fettsäure. Das Endprodukt dieser Verseifung (Gesamtcholesterol) besteht zu circa 90 % aus freiem Cholesterol und einem geringen Anteil an Cholesterylestern. Werden die Proben jedoch nicht verseift, kann mittels HPLC-Messung der Anteil des freien Cholesterol dargestellt werden.

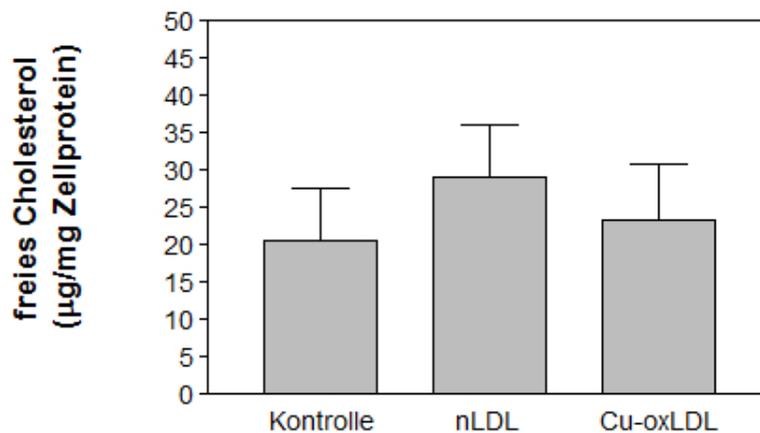


Abbildung 4.11: Die Menge des freien Cholesterols in THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml nLDL und Cu²⁺-oxLDL im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA). Dieser Versuchsansatz wurde keiner alkalischen Verseifung unterzogen. n = 3, MW ± SD

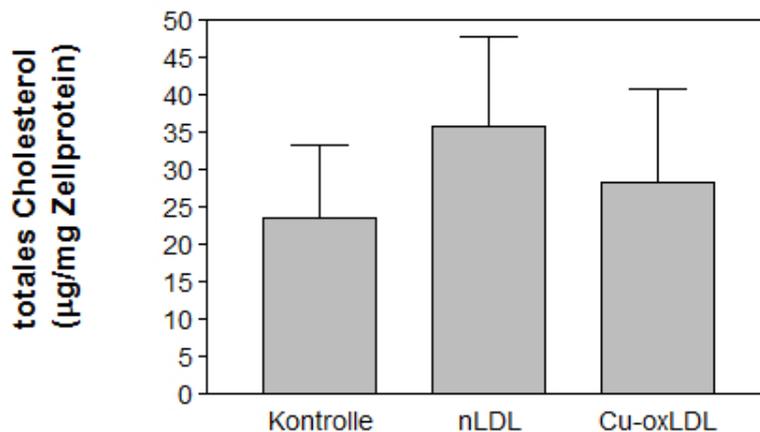


Abbildung 4.12: Die Menge des totalen Cholesterols in THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml nLDL und Cu²⁺-oxLDL im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA), nach alkalischer Verseifung. n = 3, MW ± SD

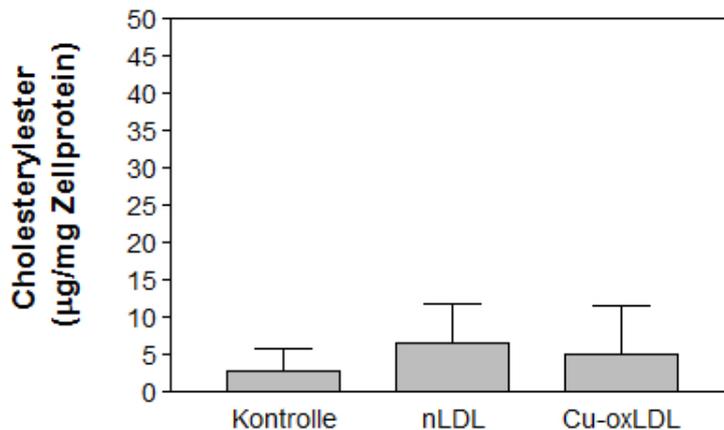


Abbildung 4.13: Die Menge der Cholesterylester in THP-1 Zelllysaten nach einer 18 Stunden Inkubation mit 100 µg/ml nLDL und Cu²⁺-oxLDL im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA). Der Anteil der Cholesterylester ergibt sich durch die Differenz des freien Cholesterols von totalem Cholesterol. $n = 3$, $MW \pm SD$

In den 3 einzelnen Grafiken (Abb. 4.11; 4.12; 4.13) ist gut zu erkennen, dass der Anteil des Gesamtcholesterols bei der Kontrolle (2 mg/ml BSA), den mit nLDL und Cu²⁺-oxLDL (jeweils 100 µg/ml) inkubierten Zellen immer höher ist, als der Anteil des freien Cholesterols. Die Differenz des freien Cholesterols von dem Gesamtcholesterol ergibt die Cholesterylester. Bei den Kontrollzellen bestehen 12 % des totalen Cholesterols aus Cholesterylestern. Bei der Inkubation von differenzierten THP-1 Zellen mit nLDL und Cu²⁺-oxLDL ergibt sich ein 18 %iger Cholesterylesteranteil.

4.7 Einfluss von oxLDL auf die intrazelluläre Cholesterolkonzentration

Wie in der nachstehenden Grafik (Abb. 4.14) erkennbar ist, weisen HOCl-oxLDL inkubierte Zellen den höchsten totalen Cholesterolwert auf. Dieser zeigt einen 58 %igen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$). Bei einer Inkubation mit 100 µg HOCl-oxLDL/ml kommt es vergleichen mit nLDL inkubierten Zellen zu einer signifikanten Zunahme des intrazellulären Cholesterolgehaltes ($p < 0,01$). Der zweithöchste Wert wurde von nLDL behandelten differenzierten THP-1 Zellen erreicht, wobei ein 36 %iger Anstieg im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen ist. Dies war auch sehr überraschend, denn laut Literatur wird nLDL nicht so schnell von den Rezeptoren der Makrophagen

4.8. MESSUNG VON INTRAZELLULÄREM CHOLESTEROL IN DER PBS-WASCHLÖSUNG

aufgenommen. Weiters konnte auch keine makroskopische Veränderung der Zellstruktur beobachtet werden. Cu^{2+} -oxLDL inkubierte Zellen hatten nur 19 % mehr totales Cholesterol als die Kontrolle.

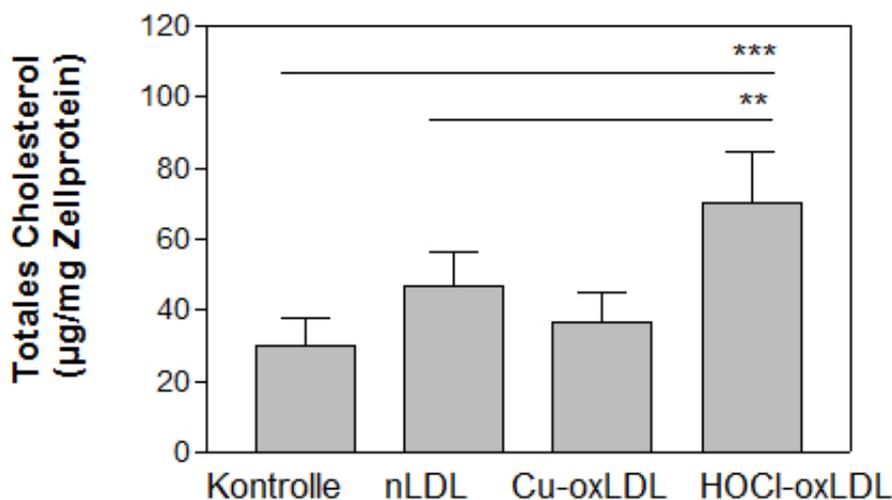


Abbildung 4.14: Auswirkungen einer Inkubation mit 100 µg/ml nLDL, Cu^{2+} - und HOCl-oxLDL auf den Gesamtcholesterolgehalt von THP-1 Makrophagen. *** $p < 0,001$ HOCl-oxLDL vs. Kontrolle; ** $p < 0,01$ HOCl-oxLDL vs. nLDL; $n = 4$, $MW \pm SD$

Wenn man sich die lipidgefüllten Schaumzellen, die durch die Aufnahme von Cu^{2+} -oxLDL entstehen, im Mikroskop anschaut, würde man annehmen, dass gerade diese Proben einen höheren intrazellulären Cholesterolgehalt aufweisen. Wie sich aber in diesem Experiment herausgestellt hat, ist dies nicht der Fall. Nach einer 18 Stunden Zellinkubation mit nLDL und HOCl-oxLDL konnte keine makroskopische Veränderung im Gegensatz zur Kontrolle gesehen werden. Bei der Messung durch die HPLC weisen aber genau diese Proben einen hohen Cholesterolgehalt auf.

4.8 Messung von intrazellulärem Cholesterol in der PBS-Waschlösung

Bei diesem Versuch wird festgestellt, ob beim Waschen der Zellen mit PBS viele Schaumzellen/Makrophagen weggespült werden. Denn die im Mikroskop sichtbaren Schaumzellen sitzen sehr lose an der Kulturschale und die Proteinbestimmung dieser

Zellen fällt auch geringer aus. Dies würde dann erklären, warum nLDL inkubierte Proben, die keine Schaumzellen ausbilden, mehr totales Cholesterol enthalten als die mit Cu^{2+} -oxLDL inkubierte THP-1 Makrophagen.

Daher wird die Waschlösung von jeweils 3 gleichen Versuchsansätzen gesammelt (z.B.: Kontrolle_g = gesamte PBS-Waschlösung die gesammelt wurde), um herauszufinden, wieviel intrazelluläres Cholesterol beim Waschen der Zellen verloren geht. Die Ergebnisse dieses Versuchs werden mit den totalen Cholesterolwerten (Mittelwert) der gleichen Proben verglichen.

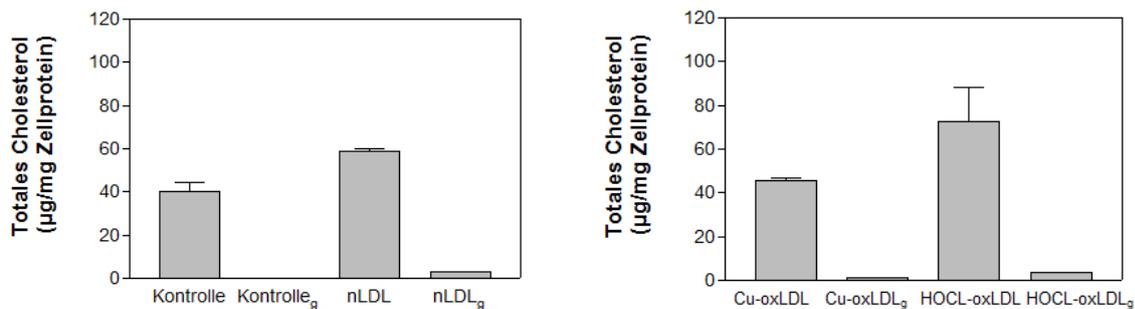


Abbildung 4.15: HPLC-Messung von intrazellulärem Cholesterol in der PBS-Waschlösung von nLDL, Cu^{2+} - und HOCl-oxLDL (100 µg/ml) inkubierten Zellen im Vergleich mit dem Gesamtcholesterol.

Bei der HPLC-Messung kann in der Waschlösung der Kontrolle_g kein Cholesterol gefunden werden, was vermuten lässt, dass hier keine Makrophagen von der Kulturschale abgelöst werden. Etwas mehr Cholesterol kann in den Waschüberständen von mit HOCl-oxLDL inkubierten THP-1 Makrophagen gefunden werden (3,56 µg/mg Zellprotein). Hier ist anzunehmen, dass beim Waschvorgang viele Zellen abgelöst wurden, und daher ein Cholesterolpeak zu verzeichnen ist. Die mit Cu^{2+} -oxLDL inkubierten THP-1 Makrophagen enthalten nur 1,2 µg Cholesterol/ mg Zellprotein in der Waschlösung. Daher kann die Annahme, dass Schaumzellen zu lose sitzen und dabei weggeschwemmt werden, bei diesem Versuch nicht bestätigt werden.

4.9 Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen an NAC auf die HIF-1 α und SR-BI Proteinexpression in mit oxLDL-inkubierten THP-1 Makrophagen

Für die folgenden Western Blot-Versuche werden THP-1 Monozyten in 6-well Platten ausgesetzt und mit 160 nM PMA zu Makrophagen ausdifferenziert. Nach 3 Tagen sind die Makrophagen ausgereift und können mit nLDL und Cu²⁺-oxLDL behandelt werden. Es erfolgt eine einstündige Präinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an N-acetyl-cystein (0; 0,1; 1; 10 mM). Die antioxidative Wirkung von NAC beruht auf der Tatsache, dass es durch die Thiol-Gruppe schädliche ROS direkt abfangen kann.

Nach der Präinkubation mit NAC werden die Zellen 18 Stunden mit 100 μ g/ml Cu²⁺-oxLDL bzw. nLDL bei 37 °C inkubiert. Als Vergleich wird eine Kontrolle, die mit BSA (2 mg/ml) inkubiert wird, herangezogen.

Die aufbereiteten Zellysate dienen der Detektion von den Proteinen SR-BI (82 kDa), HIF-1 α (120 kDa) und der Ladekontrolle β -Aktin (42 kDa). Die Banden werden in der Imager Kammer sichtbar gemacht und die Bandenstärke wird mit dem Programm AlphaEase FC ausgewertet.

BANDEN											PROTEIN	GRÖSSE	
											HIF-1 α	120 kDa	
											SR-BI	82 kDa	
											β -Aktin	42 kDa	
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Kontrolle (2mg/ml BSA)		
-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	nLDL (100 μ g/ml)		
-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	Cu ²⁺ -oxLDL (100 μ g/ml)		
-	0,1	1	10	-	0,1	1	10	-	0,1	1	10	mM NAC	

Abbildung 4.16: Repräsentative Western Blot-Banden zur Detektion der Proteine HIF-1 α , SR-BI und β -Aktin in THP-1 Makrophagen

4.9.1 Einfluss von NAC auf die oxLDL induzierte MDA-Freisetzung von THP-1 Makrophagen

Nach einer 18 Stunden Inkubation der differenzierten THP-1 Zellen wird der Zellüberstand für die Messung des MDA-Gehaltes herangezogen. Nach der Reaktion mit Thiobarbitursäure erfolgte die Messung am Photometer bei 534 nm.

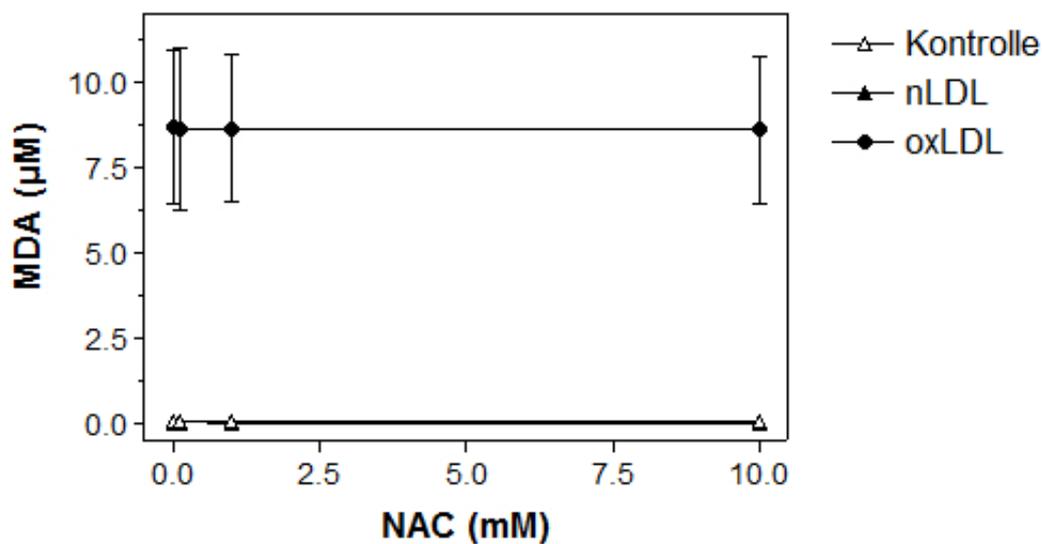


Abbildung 4.17: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen an NAC (0,1; 1; 10 mM) auf die oxLDL induzierte MDA-Entstehung in differenzierten THP-1 Zellen. $n = 3$, $MW \pm SD$

Eine Inkubation mit $100 \mu\text{g/ml Cu}^{2+}$ -oxLDL führt zu einer 8-fachen Erhöhung der MDA-Menge im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA) und nLDL (100 $\mu\text{g/ml}$) behandelten Zellen. Diese Akkumulation kann durch eine einstündige Präinkubation mit NAC nicht gesenkt bzw. verhindert werden. Das läßt darauf schließen, dass eine Vorinkubation mit NAC keinen schützenden Effekt auf die Lipidoxidation hat.

4.9.2 Einfluss verschiedener Konzentrationen an NAC auf die Proteinexpression von SR-BI und HIF-1 α in THP-1 Makrophagen

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse kann der Effekt unterschiedlicher NAC-Konzentrationen auf die Proteinexpression von SR-BI und HIF-1 α untersucht werden. β -Aktin wird dabei als Ladekontrolle verwendet, da dieses Protein in allen Zellen gleichmäßig vorhanden ist.

4.9.2.1 Expression von SR-BI Protein in THP-1 Makrophagen

Dieser Rezeptor wurde durch die Arbeitsgruppe Acton et al. als erster physiologisch relevanter HDL Rezeptor identifiziert [ACTON et al., 1996]. Anhand der repräsentativen Banden (Abb. 4.16) und der Abbildung 4.18 ist deutlich erkennbar, dass eine Inkubation mit Cu²⁺-oxLDL eine Senkung der SR-BI Expression in THP-1 Makrophagen bewirkt hat. Ein Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen an NAC auf die SR-BI Proteinexpression in THP-1 Makrophagen kann nicht gezeigt werden. Auch bei der Inkubation mit 2 mg/ml BSA (Kontrolle) und 100 μ g/ml nLDL ist kein Einfluss von NAC auf die SR-BI Proteinexpression festzustellen.

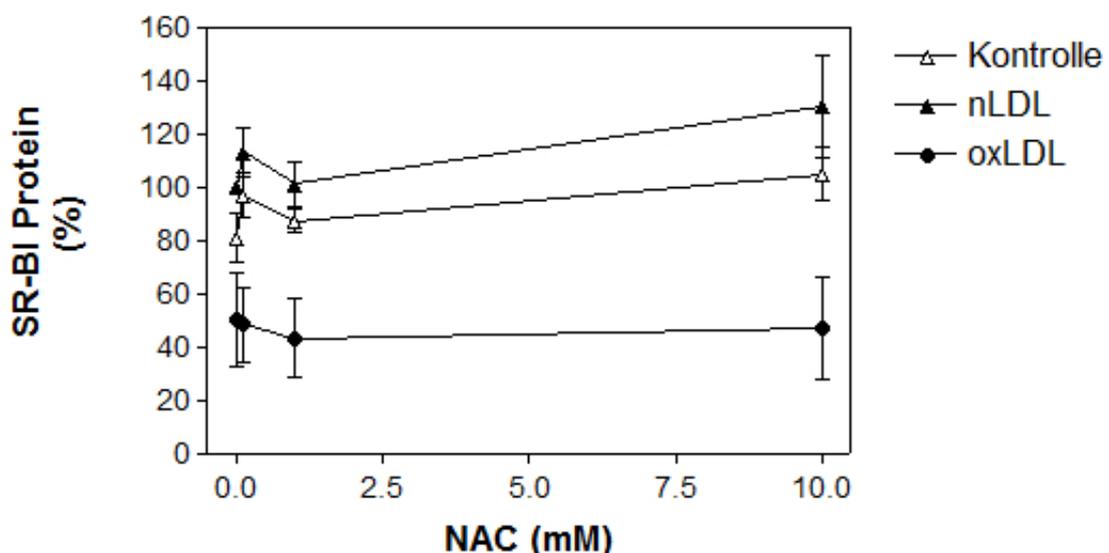


Abbildung 4.18: Einfluss verschiedener Konzentrationen von NAC auf die SR-BI Proteinexpression bei Cu²⁺-oxLDL (100 μ g/ml), BSA (2 mg/ml, Kontrolle) und mit nLDL (100 μ g/ml) behandelten THP-1 Zellen im Vergleich zur 100 % gesetzten nLDL Probe ohne NAC. n = 3, MW \pm SD

4.9.2.2 Expression von HIF-1 α Protein in THP-1 Makrophagen

HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher als einer der Hauptregulatoren der Sauerstoffhomöostase betrachtet wird. Dieser ist nur dann aktiv und kann im Zellkern die Transkription beeinflussen, wenn die α - und die β - Untereinheit dimerisieren. Unter Normoxie wird die α -Untereinheit rasch über das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut. Bei einer Hypoxie wird dieser Abbau verhindert und HIF-1 kann im Zellkern eine Vielzahl von Genen aktivieren, die zu einer Anpassung der Zelle an die mangelnde Sauerstoffversorgung führen [VINK et al., 2007].

Eine Inkubation mit 2 mg/ml BSA führt bei den THP-1 Makrophagen zu keiner Stabilisierung der HIF-1 α Proteinexpression. Eine Zugabe von 100 μ g Cu²⁺-oxLDL/ml zu den THP-1 Zellen kann die HIF-1 α Akkumulation jedoch deutlich anregen. Die Präinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an NAC ergibt jedoch keine signifikante Veränderung der HIF-1 α Menge. Ein geringer Rückgang der HIF-1 α Proteinexpression kann nur mit der 1 mM NAC Konzentration bei Cu²⁺-oxLDL inkubierten THP-1 Zellen erreicht werden.

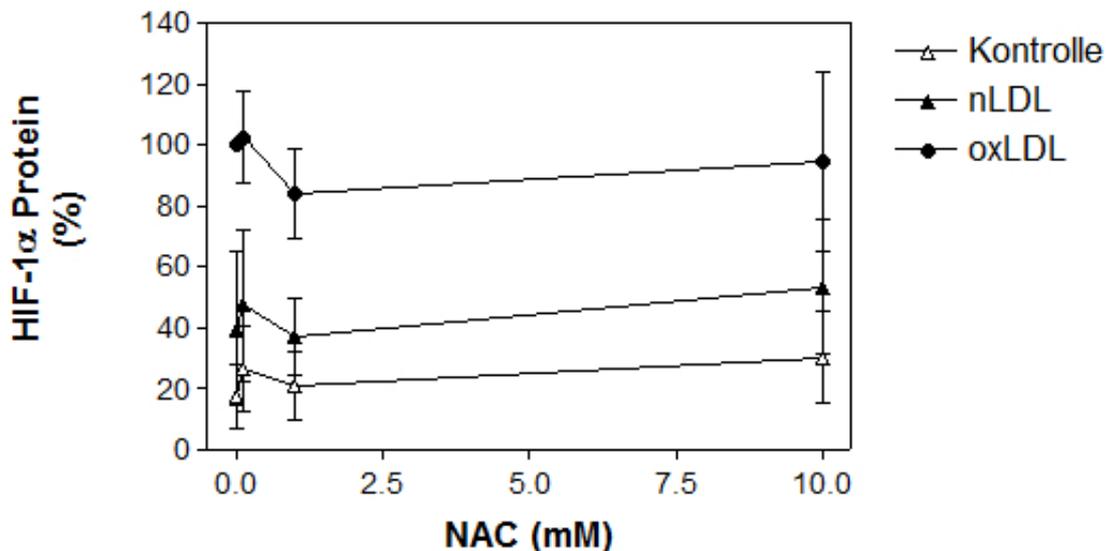


Abbildung 4.19: Einfluss verschiedener Konzentrationen von NAC auf die HIF-1 α Proteinexpression bei Cu²⁺-oxLDL (100 μ g/ml), BSA (2 mg/ml, Kontrolle) und mit nLDL (100 μ g/ml) behandelten THP-1 Makrophagen im Vergleich zur 100 % gesetzten Cu²⁺-oxLDL Probe ohne NAC. $n = 3$, $MW \pm SD$

5 Schlussbetrachtung

Die LDL-Oxidationstheorie ist seit der Beobachtung durch Goldstein et al. im Jahre 1979 allgemein gültig. Die LDL-Oxidation gilt als das Schlüsselereignis in der Entstehung der Atherosklerose. Grundlage für diese Hypothese war die Beobachtung, dass modifiziertes, jedoch nicht natives LDL ungehemmt von den Makrophagen aufgenommen wird [GOLDSTEIN et al., 1979]. Für die unkontrollierte Ingestion sind Scavenger-Rezeptoren (SR-A, CD36, SR-BI) auf der Zelloberfläche der Makrophagen verantwortlich. Die Anreicherung von oxidiertem LDL führt zu einer Cholesterol- und Lipideinlagerung in der Zelle, die die Bildung von Schaumzellen ermöglichen. Diese sind die Vorstufe der atherosklerotischen Plaques und sind deswegen Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten [GLASS und WITZTUM, 2001].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 durch die Zugabe von Phorbol ester (160 nM PMA) zu reifen Makrophagen ausdifferenziert. Nach einer Inkubationszeit von 72 h haben sich adhärente Zellen mit Ausläufern gebildet, die im Mikroskop eindeutig identifizierbar waren. Die Wirkung von nLDL, Cu²⁺- und HOCl-oxLDL (jeweils 100 µg/ml), auf eine zellmorphologische Veränderung wurde untersucht, als auch deren Auswirkung auf die HIF-1α und SR-BI Proteinexpression unter normoxischen Bedingungen. Mit Western Blot-Analysen wurde ermittelt, ob das Antioxidans NAC einen Einfluss auf die von uns untersuchten Proteine und dabei einen atheroprotektiven Effekt auf die Zelle hat. Des weiteren beschreibt diese Arbeit die Etablierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von intrazellulärem Cholesterol in THP-1 Makrophagen. Hier lag das besondere Augenmerk auf dem quantitativen intrazellulären Cholesterolvergleich von mit nLDL, Cu²⁺- und HOCl-oxLDL (jeweils 100 µg/ml) inkubierten Makrophagen.

Eine Erhöhung von LDL im Blut stellt einen wesentlichen Risikofaktor in der Entstehung der Atheroskleroseerkrankung dar. Dieser Zusammenhang kann deutlich an Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie beobachtet werden, bei denen es durch einen Mangel an LDL-Rezeptoren zu einer Akkumulation von LDL im Blut kommt und daher bereits Kinder ein erhöhtes Atheroskleroserisiko aufweisen [STEINBERG, 1987]. Menschliches LDL besteht mengenmäßig vor allem aus Cholesterol und Cholesterylesteren, welches zu

den extrahepatischen Geweben transportiert wird und damit die Zellen mit Cholesterol versorgt [ESTERBAUER et al., 1990].

Erfolgt im Blut eine Cholesterolakkumulation durch eine erhöhte Cholesterolaufnahme über die Nahrung oder einen LDL-Rezeptormangel, versucht der Organismus das LDL durch die Aufnahme in die Makrophagen zu beseitigen. Um von den speziellen Rezeptoren der Makrophagen erkannt und aufgenommen zu werden, muss das LDL-Molekül vorerst modifiziert werden. *In vivo* erfolgt die LDL-Oxidation dabei vorwiegend durch reaktive Sauerstoffspezies in der Gefäßwand. Verschiedene dort ansässige Enzyme, wie die Lipoxygenase und die Myeloperoxidase, können dabei ROS generieren und so den LDL-Partikel chemisch verändern [BERLINER und HEINECKE, 1996].

Das von uns benötigte LDL wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation aus dem Blut gesunder, weiblicher Probanden isoliert. In der vorliegenden Arbeit wird LDL auf 2 verschiedene Arten modifiziert und dann den Zellen zugeführt. Zum einen wird es mit 10 μ M Kupfersulfat in einem 37 °C warmen Wasserbad 4 Stunden lang oxidiert. Es ist das am häufigsten eingesetzte Oxidationsmittel, da das gebildete oxLDL sehr ähnliche biologische und physikalische Eigenschaften aufweist wie jenes *in vivo* [STEINBRECHER et al., 1987]. Die Anwesenheit von Kupferionen in der Gefäßwand ist jedoch weiterhin umstritten, obwohl Kupferionen in atherosklerotischen Humanarterien nachgewiesen wurden [STADLER et al., 2004].

Hypochlorit ist das zweite Oxidationsmittel, welches für die LDL-Oxidation *in vitro* eingesetzt wird. Dafür wird LDL 1 Stunde lang mit 1 mM Natriumhypochlorit im Wasserbad bei 37 °C oxidiert. Die Myeloperoxidase, ein körpereigenes Enzym, katalysiert die Entstehung von Hypochloritionen im Körper. Diesem wird eine große Bedeutung bei der *in vivo* Oxidation zugesprochen, da es bereits in großen Mengen in atherosklerotischen Läsionen gefunden wurde [HAZELL et al., 1996].

Bei der LDL-Oxidation mit Kupfersulfat wird vor allem der Lipidanteil des Partikels angegriffen, was einen enormen Anstieg an Lipidperoxidationsprodukten zur Folge hat. Im Gegensatz dazu bewirkt HOCl vor allem eine Veränderung des Apoproteins B100, wobei die Lipide des LDL-Partikels unverändert bleiben [RADHIKA et al., 2007]. Mit Hilfe der durchgeführten TBARS-Messung kann das gebildete Malondialdehyd photometrisch bei 534 nm gemessen werden. Dafür werden differenzierte THP-1 Zellen

18 Stunden lang mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Cu^{2+} - und HOCl-oxLDL inkubiert, und anschließend im Zellüberstand die Malondialdehydmenge photometrisch gemessen. Dabei ist im Vergleich zur Kontrolle (2 mg/ml BSA) bzw. zu nativem LDL die MDA-Bildung bei Cu^{2+} -oxLDL inkubierten Zellen um das 20-fache höher. Nach der 18-stündigen Inkubationszeit kann bei den Cu^{2+} -oxLDL behandelten Zellen auch eine Veränderung der Zellmorphologie festgestellt werden. Die THP-1 Makrophagen reichern das modifizierte LDL in ihrem Zellinneren an, und dabei entstehen Schaumzellen, die als runde prall gefüllte Zellen im Mikroskop sichtbar sind. Zellen, die mit HOCl-oxLDL behandelt werden, zeigen keine Ausbildung von Schaumzellen und bilden auch kein Malondialdehyd.

Der Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-BI), mit dem wir uns in dieser Arbeit befassen, wurde erstmals 1994 von Acton et al. als physiologisch relevanter HDL-Rezeptor identifiziert. Der Rezeptor kann eine Vielzahl von strukturell unterschiedlichen Liganden, wie modifizierte Lipoproteine, anionischen Phospholipide und apoptotischen Zellen aufnehmen [ACTON et al., 1996]. In vielen Studien wird ihm eine antiatherogene Wirkung zugesprochen, da eine Überexpression des Rezeptors zu einer Verminderung der atherosklerotischen Läsionen führt [KOZARSKY et al., 1997].

Western Blot-Analysen zeigen, dass eine Inkubation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Cu^{2+} -oxLDL in THP-1 Zellen zu einer 50 %igen Verminderung der SR-BI Proteinexpression im Vergleich zur 100 % gesetzten nLDL Probe ohne NAC führt. Schon die Arbeitsgruppe von Han et al. konnten in ihrer Studie eine dosis- und zeitabhängige Senkung der SR-BI Expression durch oxLDL in Makrophagen zeigen [HAN et al., 2001]. Eine andere Studie von Hirano et al. konnten jedoch durch die Inkubation mit oxLDL eine erhöhte SR-BI Proteinexpression in humanen Makrophagen feststellen. Sie konnten weiters verstärkt SR-BI in humanen atherosklerotischen Läsionen nachweisen [HIRANO et al., 1999].

Diese Ergebnisse stehen im genauen Widerspruch zu denen von Han et al., wobei die Gründe für diese Unterschiede noch nicht genau geklärt sind. Die zwei oben erwähnten Studien verwendeten Kupfersulfat mit einer Endkonzentration von 5 μM , um LDL zu oxidieren. In unserer Arbeitsgruppe wird eine 10 μM CuSO_4 -Lösung verwendet, um damit LDL 4 Stunden zu oxidieren. Die LDL-Inkubationszeit von Han et al. beträgt 12 Stunden und die von Hirano et al. ist die längste mit 24 Stunden.

Die Zellinkubationszeit mit dem modifizierten LDL beträgt 18 Stunden in unserem Versuch, die sich nur gering von der Gruppe Han et al. mit 16 Stunden unterscheidet. Hirano und Kollegen inkubierten die Makrophagen 24 Stunden lang mit dem oxidierten

LDL. Han et al. zeigten in ihrer Studie, dass die SR-BI Proteinexpression hinaufreguliert wird, wenn sich Makrophagen in einem frühen Differenzierungsstadium befinden. Im Gegensatz zu ausdifferenzierten Makrophagen, bei denen eine SR-BI Ausschüttung durch oxLDL behindert wird. Makrophagen im ausdifferenzierten Stadium stimmen eher mit der Morphologie in atherosklerotischen Geweben überein. Prinzipiell kann jedoch gesagt werden, dass die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen schwer zu vergleichen sind, da die experimentellen Bedingungen oft sehr unterschiedlich sind.

HIF-1 α spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1 besteht aus einer α - (120 kDa) und einer β - (91-94 kDa) Untereinheit und ist Regulator der Sauerstoffhomöostase. HIF-1 α wird unter Normoxie rasch über das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut. Dieser Abbau wird unter hypoxischen Zuständen in der Zelle verhindert, so dass eine Dimerisierung der beiden Untereinheiten im Zellkern stattfindet. Der gebildete HIF-1 Komplex bindet an Hypoxie-responsive Elemente der DNA und bewirkt die Transkription vieler Zielgene, die unter anderem an Angiogenese, Erythropoese, Zellwachstum und Energiestoffwechsel beteiligt sind [SALCEDA und CARO, 1997].

Shatrov und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass HIF-1 α auch unter Normoxie stabilisiert werden kann, wenn Makrophagen oxLDL ausgesetzt sind. Daher wird vermutet, dass aufgrund hypoxie-ähnlicher Zustände HIF-1 α Protein auch in atherosklerotischen Läsionen vorhanden ist [SHATROV et al., 2003]. Hypoxische Regionen konnten in einer aktuellen Studie von Sluimer et al. besonders im makrophagenreichen Plaquinieren demonstriert werden [SLUIMER et al., 2008]. Eine interessante Entdeckung konnten auch Jiang et al. durch die Unterdrückung des HIF-1 durch siRNA in oxLDL inkubierten Makrophagen machen, die in Folge dessen eine verminderte Schaumzellbildung beobachten konnten [JIANG et al., 2007].

In dieser Arbeit wurde mittels Western Blot belegt, dass durch eine Inkubation mit Cu²⁺-oxLDL eine HIF-1 α Akkumulation unter Normoxie stattfinden kann. Dafür wurden THP-1 Makrophagen 18 Stunden lang mit 100 μ g/ml Cu²⁺-oxLDL inkubiert und anhand der Western Blot-Ergebnisse konnte eine enorme Anreicherung von HIF-1 α in diesen Zellen gezeigt werden. Diese HIF-1 α Stabilisierung unter Normoxie konnte auch schon in anderen Studien durch reaktive Sauerstoffspezies bewirkt werden.

Weiters wollten wir den Einfluss verschiedener Konzentrationen des Antioxidans NAC auf die Proteinexpression von SR-BI und HIF-1 α in THP-1 Makrophagen mittels Western Blot-Analyse untersuchen. N-acetyl-cystein bietet eine ausgezeichnete Quelle an Sulfhydryl (SH)-Gruppen, mit denen es freie Radikale direkt unschädlich machen kann. Dadurch, dass es die acetylierte Form der Aminosäure Cystein ist, welches für die Bildung von Glutathion benötigt wird, hilft es außerdem dem Körper, den intrazellulären Antioxidationsgehalt zu erhöhen [AITIO, 2005]. In unserem Versuch werden THP-1 Makrophagen mit unterschiedlichen Konzentrationen an NAC (0,1; 1; 10 mM) 1 Stunde präinkubiert, um sich vor der darauffolgenden Cu²⁺-oxLDL Inkubation und der damit einhergehenden Radikalbildung besser schützen zu können. Der Einsatz von NAC konnte in einer Studie die endogenen ROS-Level unterdrücken und damit die endotheliale Funktion verbessern [ZAFARULLAH et al., 2003].

Nachdem die Zellen 1 Stunde mit NAC beladen werden, erhalten sie 100 $\mu\text{g/ml}$ Cu²⁺-oxLDL bzw. nLDL. Auch hier wird nach 18 Stunden der MDA-Gehalt im Zellüberstand gemessen. Die Inkubation mit Cu²⁺-oxLDL führt zu einer 8-fachen Erhöhung der MDA-Menge im Vergleich zur Kontrolle und nLDL beladenen Zellen. Die Präinkubation mit NAC kann eine Anreicherung an Lipidperoxiden und die Bildung von Schaumzellen nicht verhindern. In unserem Versuch kann daher kein schützender Effekt von NAC auf die Lipidoxidation festgestellt werden.

Desweiteren kann eine ansteigende Konzentration des Antioxidans bei den Cu²⁺-oxLDL inkubierten THP-1 Zellen keinen Einfluss auf die SR-BI Proteinexpression bewirken. Weiters untersuchen wir den Effekt von NAC auf die oxLDL-induzierte HIF-1 α Expression in THP-1 Makrophagen. Zellen, die mit Cu²⁺-oxLDL 18 Stunden beladen werden zeigen durch die Vorinkubation mit 1 mM NAC-Konzentration einen geringen Abfall der HIF-1 α Menge. Mit steigender Antioxidantienkonzentration wird der Effekt jedoch aufgehoben und HIF-1 α Protein wird wieder vermehrt akkumuliert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die 1-stündige Präinkubation mit NAC nicht ausreichend war, um die gewünschten antioxidativen und antiatherogenen Effekte in der Zelle zu erzielen.

In der Studie von Shatrov et al. wurden humane Mono-Mac-6 (MM6) Makrophagen mit 3 mM NAC für 2 Stunden beladen. Danach inkubierten sie die Makrophagen 8 Stunden lang mit oxLDL (200 $\mu\text{g/ml}$). Die durchgeführten Western Blots zeigten durch

die Präinkubation mit dem Antioxidans NAC eine verminderte HIF-1 α Akkumulation [SHATROV et al., 2003].

Tajima et al. zeigten in ihrer Studie, dass NAC unter hypoxischen Bedingungen die HIF-1 Aktivierung dosisabhängig reduzieren kann. Humane Epithelialzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1; 3; 10 mM) an NAC für 30 Minuten beladen und anschließend 30 Stunden unter Hypoxie kultiviert [TAJIMA et al., 2009].

Die Ergebnisse dieser 2 Studien stimmen nicht mit unseren Daten über NAC überein. Daher sind weitere Forschungsarbeiten mit diesem Antioxidans notwendig, um noch detailliertere Ergebnisse zu erhalten. Interessant wären auch die Ergebnisse einer gleichzeitigen Inkubation von NAC und oxLDL und dessen Auswirkung auf die Proteinexpression von SR-BI und HIF-1 α .

Unter dem Begriff Chromatographie versteht man eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden, fließenden (mobilen) Phase. Ein chromatographisches System besteht also aus zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie zählt zu der Gruppe der Säulenchromatographien, bei der die mobile Phase (in unserem Fall ein Acetonitril-Isopropanol-Gemisch), unter hohem Druck die mit Füllmaterial dicht gepackte Trennsäule durchströmt. Das in unserer Arbeit verwendete HPLC-Gerät und der verwendete UV/VIS-Detektor stammen von der Firma Waters (2695 Separations Module und Dual Absorbance Detector).

Mit der durchgeführten HPLC-Messung haben wir den intrazellulären Cholesterolgehalt von THP-1 Makrophagen, welche mit nLDL, Cu²⁺-oxLDL und HOCl-oxLDL (jeweils 100 μ g/ml) inkubiert wurden, miteinander verglichen. Die Proben werden nach einer 18 Stunden Inkubation mit dem modifizierten LDL einer Lipidextraktion mit Hexan : Isopropanol (3:2) unterzogen und die erhaltenen Lipidextrakte werden unter N₂-Atmosphäre eingedampft. Weiters werden die Proben mit einer ethanolschen KOH-Lösung erhitzt und eine Verseifung durchgeführt. Die Proben müssen noch einmal unter N₂-Atmosphäre getrocknet werden, und die darauffolgende Zugabe von Ethanol : Chloroform (80:20) löst die Lipide vollständig auf. Für die Messung unseres Probengemisches werden 30 μ l aus dem Vial entnommen und 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 210 nm gemessen. Das verwendete Fließmittel besteht zu 20 % aus Isopropanol und zu 80 % aus Acetonitril.

Den zu analysierenden Proben wird ein interner Standard mit bekannter Konzentration hinzugefügt, der eine ähnliche chemische Zusammensetzung wie die zu messende Probe hat. Da dieses Kriterium auf Ergosterol (1 mg/ml) zutrifft, wird dieses für die HPLC-Versuche verwendet. Nach der Messung wird der Ergosterol-Peak gemeinsam mit den anderen Peaks ausgewertet und die Konzentration der zu messenden Substanz kann in Relation zum internen Standard berechnet werden.

In dieser Arbeit wird die Retentionszeit und die Peakfläche von der Reinsubstanz Ergosterol und dem Ergosterol samt Zellgemisch durch eine HPLC-Messung miteinander verglichen. Beide Proben wurden nach einer Retentionszeit von 5,3 Minuten eluiert, unterscheiden sich jedoch in der Größe des Peaks. Wird Ergosterol gemeinsam mit dem Zellgemisch gemessen ist die gemessene Peakfläche um das 1,8 fache kleiner als die Peakfläche von 30 000 bei der Reinsubstanz Ergosterol. Eine mögliche Erklärung für diesen großen Unterschied könnte in der verschiedenen Aufarbeitung der beiden Proben liegen. Das Ergosterol/Zellgemisch samt Hexan : Isopropanol (3:2) befand sich während des Durchmischens in der Zellkulturschale, wohingegen das Ergosterol alleine mit Hexan : Isopropanol (3:2) direkt in Glasröhrchen pipettiert wurde.

Zusätzlich wird überprüft, ob die Peakfläche von der Reinsubstanz Cholesterol proportional mit der Erhöhung der Cholesterolkonzentration ansteigt. Dafür werden unterschiedliche Konzentrationen (12; 30; 60 $\mu\text{g/ml}$) von Cholesterol verwendet und anschließend mittels HPLC gemessen. Nach einer Retentionszeit von 7,3 Minuten wird Cholesterol eluiert und ein proportionaler Zusammenhang zwischen eingesetzter Cholesterolmenge und detektierter Peakfläche festgestellt.

Im Laufe der Versuche ist aufgefallen, dass die Cu^{2+} -oxLDL Proben bei jeder Proteinbestimmung im Vergleich zu Kontrolle, nLDL und HOCl-oxLDL Proben eine geringere Proteinmenge aufweisen. Diese enthalten jeweils ca. 100 μg Zellprotein pro cm^2 , wobei die gesamte Fläche der Kulturschale 22,1 cm^2 beträgt. Im Gegensatz dazu kann eine um 9 % geringere Proteinkonzentration bei den Cu^{2+} -oxLDL inkubierten Zellen festgestellt werden. Diese Beobachtung konnte auch schon in vorherigen Versuchen in dieser Arbeitsgruppe (Diplomarbeit von Magdalena Moser) gezeigt werden. Dabei konnte eine 35 %ige Abnahme der Proteinmenge in Cu^{2+} -oxLDL inkubierten Zellen, im Vergleich zur nLDL Probe festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist die Abnahme der Zellviabilität in Cu^{2+} -oxLDL inkubierten THP-1

Zellen, die sich auch in einer Abnahme der Proteinmenge manifestiert [MOSER, 2006].

Des Weiteren interessiert uns der Anteil des totalen Cholesterols in mit BSA (2 mg/ml, Kontrolle), nLDL, Cu²⁺- und HOCl-oxLDL (100 µg/ml) inkubierten THP-1 Makrophagen nach der Verseifung und im Vergleich dazu das freie Cholesterol in der Zelle, das ohne Verseifungsschritt gemessen wird. Dafür wird die Probe eines Versuchsansatzes aufgeteilt, wobei ein Teil verseift wird und der andere nicht. So gelingt ein direkter Vergleich von Gesamtcholesterol- und freiem Cholesterolanteil dieser Proben. Die experimentell durchgeführte alkalische Verseifung im Labor durch Kalilauge führt zur hydrolytischen Spaltung der Cholesterylesterbindung zwischen Cholesterol und langkettiger Fettsäure. Nach dem Verseifungsschritt erhält man den Gesamtcholesterolgehalt der Zelle, der zu circa 90 % aus freiem Cholesterol und zu circa 10 - 20 % aus Cholesterylestern besteht.

Werden die THP-1 Zellen mit 2 mg/ml BSA (Kontrolle) für 18 Stunden inkubiert, haben diese einen freien Cholesterolgehalt von 20 µg/mg Zellprotein. Die Cu²⁺-oxLDL inkubierten Zellen weisen 24 µg freies Cholesterol/mg Zellprotein auf, also nur gering mehr als die Kontrolle. Erwartungsgemäß, wenn man die Schaumzellen im Mikroskop betrachtet, nimmt man an, dass gerade diese um einiges mehr Cholesterol enthalten als die Kontrolle. Überraschend war jedoch das Ergebnis der nLDL Proben nach der HPLC-Messung, die einen freien Cholesterolgehalt von 30 µg/mg Zellprotein aufweisen. Diese liegen demnach mit ihrem Cholesterolgehalt über den Cu²⁺-oxLDL Proben. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es neben der Scavenger-vermittelten Lipidaufnahme in die Makrophagen auch noch andere Möglichkeiten gibt, wie auch natives LDL aufgenommen werden kann, ohne dass dabei die Zellstruktur verändert wird. Aus der Differenz des freien Cholesterols von dem Gesamtcholesterol erhält man die Cholesterylesteranteile dieser Proben. Dabei hat die Kontrolle circa 12 % und die nLDL und Cu²⁺-oxLDL Proben circa einen 18 %igen Cholesterylesternanteil.

In 4 unabhängigen Versuchen werden THP-1 Makrophagen mit 2 mg/ml BSA (Kontrolle), und jeweils 100 µg/ml nLDL, Cu²⁺-oxLDL oder HOCl-oxLDL 18 Stunden inkubiert. Mit Hilfe der HPLC-Messung sollte herausgefunden werden, wieviel totales Cholesterol diese Zellen intrazellulär angereichert haben. Auch hier war das Ergebnis überraschend, da die Proben, die mit HOCl-oxLDL inkubiert werden, den höchsten totalen Cholesterolwert aufweisen (70 µg/mg Zellprotein). Bei diesen Proben, sowie bei

den nLDL Proben (45 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein), kann im Mikroskop keine zellmorphologische Veränderung festgestellt werden. Auch in diesen Versuchen stellt sich heraus, dass Cu^{2+} -oxLDL inkubierte THP-1 Makrophagen nur gering mehr totales Cholesterol im Vergleich zur Kontrolle aufweisen.

Zusätzlich kann man nach 18 Stunden bei den Cu^{2+} -oxLDL inkubierten Zellen im Mikroskop lose sitzende Schaumzellen beobachten. Darum stellt sich die Frage, ob diese beim Waschen mit PBS weggespült werden und so der Cholesterolgehalt von Cu^{2+} -oxLDL inkubierten Zellen bei der HPLC-Messung vermindert ist. Dafür wird die Waschlösung von jeweils 3 gleichen Versuchsansätzen gesammelt, davon das intrazelluläre Cholesterol von eventuell aufschwimmenden Zellen gemessen, und dieser Wert mit dem totalen Cholesterolgehalt (Mittelwert) der 3 identen Ansätze verglichen. Der höchste Cholesterolpeak kann aus dem Überstand von mit HOCl-oxLDL inkubierten THP-1 Makrophagen gefunden werden. Hier konnten jedoch im Mikroskop keine lose sitzenden Makrophagen beobachtet werden. Die Annahme, dass Schaumzellen leicht von der Kulturschale abzulösen sind, kann in diesem Versuch nicht gezeigt werden.

Die Arbeitsgruppe Cader et al. inkubierten THP-1 Makrophagen 48 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen an nLDL, Cu^{2+} - und HOCl-oxLDL (0-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Mit Hilfe von HPLC-Messungen konnten sie zeigen, dass Makrophagen, inkubiert mit HOCl-oxLDL, Cholesterol in einem größeren Ausmaß akkumulieren als Cu^{2+} -oxLDL Proben. Die von ihnen ermittelten totalen Cholesterolwerte für Cu^{2+} - und HOCl-oxLDL (30 bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein) sind mit unseren gemessenen Daten vergleichbar. Weiters führte eine HOCl-oxLDL Zellinkubation zu einem 12 mal höheren Cholesterylesteranstieg, im Vergleich zu nLDL und Cu^{2+} -oxLDL Proben. Daher vermuten Cader et al., dass Verbindungen im Cu^{2+} -oxLDL (Lipidperoxidationsprodukte) in der Lage sind, Enzyme in der Zelle zu hemmen, die für eine Veresterung verantwortlich sind [CADER et al., 1997]. Das könnte eine Erklärung sein, dass Cu^{2+} -oxLDL behandelte Zellen weniger Cholesterylester und damit insgesamt viel weniger Gesamtcholesterol im Vergleich zu HOCl-oxLDL Proben haben. Bisher haben wir nur den Cholesterylestergehalt in Zellen, die mit Cu^{2+} -oxLDL inkubiert wurden gemessen und können noch keine Informationen über das Verhältnis von freiem zu totalem Cholesterol in HOCl-oxLDL Proben geben.

In einer Studie von Contreras et al. wurden humane Makrophagen 72 Stunden mit acetyliertem LDL bzw. nativem LDL (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Anschließend wurde die

Menge an freiem Cholesterol und dem Anteil der Cholesterylester mittels HPLC ermittelt. AcLDL ist dem Cu^{2+} -oxLDL sehr ähnlich, da es auch zu einer Lipideinlagerung in die Makrophagen kommt und sich Schaumzellen ausbilden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass natives LDL nur gering weniger freies intrazelluläres Cholesterol ($25 \mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein) enthält als acLDL Proben mit $27 \mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein. Auch hier stellt sich die Frage, warum nLDL so viel Cholesterol im Zellinneren anreichern konnte, obwohl mehrere Studien eindeutig zeigen konnten, dass natives LDL nicht so schnell von den Rezeptoren der Makrophagen aufgenommen wird. In dieser Studie konnte eine massive Cholesterylester Einlagerung in acLDL inkubierten Makrophagen festgestellt werden ($41 \mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein). Im Gegensatz dazu wurden in nLDL inkubierten Makrophagen nur $8 \mu\text{g}/\text{mg}$ Cholesterylester im Zellinneren gemessen [CONTRERAS et al., 1992]. Dies entspricht auch der in unserer Arbeit ermittelten Cholesterylmenge in nLDL behandelten Zellen.

In einer anderen Studie, die sich auch mit der HPLC-Messung von Cholesterol beschäftigt hat, wurden humane Makrophagen 48 Stunden lang mit acLDL ($80 \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert, woraufhin Cholesterol in diesen Zellen akkumuliert wurde. Die ermittelte Cholesterolmenge dieser Arbeitsgruppe unterscheidet sich jedoch grundlegend von der Studie von Contreras et al. und den erhaltenen Daten unserer Gruppe. Die gemessenen Werte liegen für das totale Cholesterol bei $542 \mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein, wovon sie einen Anteil von 40 % freiem Cholesterol und 60 % Cholesterylester haben. In unserer Arbeit konnten wir derart hohe Cholesterylester Anteile nicht messen [CULLEN et al., 1997].

Eine klare Interpretation unserer HPLC-Ergebnisse ist also sehr schwierig, weil es wenig wissenschaftliche Literatur zum direkten Vergleich betreffend der eingesetzten LDL-Konzentration und Inkubationsdauer gibt. Die Western Blot-Ergebnisse zeigen, durch die einstündige Beladung mit NAC und anschließender Inkubation mit Cu^{2+} -oxLDL in THP-1 Makrophagen keinen Effekt bezüglich SR-BI und HIF-1 α Proteinexpression.

6 Zusammenfassung

Atherosklerose zählt durch seine Folgeerkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen und zeichnet sich als eine progressive, multifaktorielle Erkrankung der großen Arterien aus. Dabei wird die Oxidation von LDL (oxLDL), als ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose beschrieben. Eine unkontrollierte Aufnahme von oxLDL in die Makrophagen über Scavenger-Rezeptoren führt zur Ausbildung von lipidgefüllten Schaumzellen. Diese werden als Vorstufe atherosklerotischer Plaques angesehen.

Diese Arbeit beschreibt den Einfluss von oxLDL auf die Schaumzellbildung in THP-1 Zellen und vergleicht die intrazelluläre Cholesterolkonzentration von mit nLDL, Cu^{2+} -oxLDL und HOCl-oxLDL inkubierten Makrophagen mittels HPLC-Methode. Zusätzlich wird der Effekt von oxLDL auf die Proteinexpression von HIF-1 α und SR-BI untersucht, wobei auch die Wirkung des Antioxidans NAC in THP-1 Makrophagen beschrieben wird.

Mit Hilfe der sequentiellen Ultrazentrifugation wird LDL aus dem Blut gesunder weiblicher Probanden isoliert. Die Oxidation von isoliertem LDL erfolgt durch eine 4-stündige CuSO_4 - ($10 \mu\text{M}$) Inkubation bzw. eine 1-stündige NaOCl Behandlung. Die verwendete monozytäre THP-1 Zelllinie wurde mittels Phorbol ester zu Makrophagen ausdifferenziert und diese 18 Stunden mit modifiziertem LDL inkubiert. Im Zellüberstand wurde die Menge an Malondialdehyd, welches als Maß für die Lipidoxidation gilt, ermittelt.

Die Cu^{2+} -oxLDL inkubierten THP-1 Makrophagen bilden Schaumzellen aus und führen zu einem enormen Anstieg an MDA. Bei HOCl-oxLDL konnte keiner dieser Effekte nachgewiesen werden. Eine schlechtere Viabilität der Cu^{2+} -oxLDL inkubierten Zellen konnte auch durch einen geringeren Proteinanteil festgestellt werden. Die HPLC-Ergebnisse konnten eindeutig zeigen, dass HOCl-oxLDL den höchsten totalen Cholesterolgehalt aufweist. Der zweithöchste Wert wurde von Zellen, die mit nLDL inkubiert wurden, erreicht, obwohl diese keine sichtbaren Schaumzellen ausgebildet haben und keine erhöhten MDA Werte aufweisen. Die Cu^{2+} -oxLDL inkubierten Zellen zeigten als einzige eine zellmorphologische Veränderung, weisen jedoch nur einen

geringen Mehranteil an totalem Cholesterol im Gegensatz zur Kontrolle auf.

Die Western Blot-Ergebnisse zeigen eine Herunterregulierung von SR-BI und eine gesteigerte HIF-1 α Proteinexpression in Cu²⁺-oxLDL inkubierten THP-1 Makrophagen. Es konnte kein Effekt auf diese Proteine durch die Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an NAC zu diesen Zellen festgestellt werden. Ebenso wenig konnte der Zusatz von NAC die MDA Menge in THP-1 inkubierten Zellen verringern.

Die ermittelten Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von oxLDL und HIF-1 α in der Pathogenese der Atherosklerose. Eine Beladung mit dem Antioxidans NAC und nachfolgender Inkubation mit Cu²⁺-oxLDL in THP-1 Makrophagen zeigte in den Western Blot Ergebnissen jedoch keinen Effekt bezüglich der SR-BI und HIF-1 α Proteinexpression. Weiters sprechen die gezeigten HPLC-Ergebnisse und deren Vergleich mit anderen Studien dafür, dass eine klare einheitliche Interpretation aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, sehr schwierig ist und daher noch weitere Untersuchungen nötig sind.

7 Summary

Atherosclerosis and its secondary complications are the most common causes of death in westernized countries. It is characterized as a progressive and multifactorial disease of the large arteries. The oxidative modification of LDL (oxLDL) is described to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. The uncontrolled uptake of oxLDL in macrophages through scavenger receptors leads to foam cell formation, which is considered as a precursor of atherosclerotic plaques.

This work describes the influence of oxLDL on foam cell formation in THP-1 macrophages. Furthermore we compare the intracellular cholesterol concentrations of nLDL-, Cu²⁺-oxLDL- and HOCl-oxLDL- incubated macrophages by HPLC. Additionally the effect of oxLDL on the protein expression of HIF-1 α and SR-BI is analysed and also the effect of the antioxidant NAC in THP-1 macrophages is described.

LDL was isolated by sequential ultracentrifugation from the plasma of healthy female volunteers. LDL was oxidised by the incubation with CuSO₄ (10 μ M) for four hours and NaOCl for one hour. The used monocytic cell line THP-1 was differentiated towards macrophages with phorbol esters and were incubated for 18 hours with modified LDL. The amount of MDA was utilised as a measurement for lipid oxidation in the cell supernatant.

Incubation with Cu²⁺-oxLDL leads to foam cell formation in THP-1 macrophages and an increase of MDA. There is no effect by the treatment with HOCl-oxLDL seen. A poorer viability of Cu²⁺-oxLDL-incubated cells is also detected by a lower amount of protein. The HPLC results clearly demonstrate that HOCl-oxLDL has the highest total cholesterol content. The second highest value is found, when cells were incubated with nLDL, even though these cells are not converted into foam cells and do not show elevated MDA levels. The Cu²⁺-oxLDL-incubated cells are the only ones that showed a cell morphological change, despite the fact that they have only a small increase in the amount of total cholesterol with respect to the control.

The Western blot results show an upregulation of SR-BI and an increased HIF-1 α

protein expression in Cu^{2+} -oxLDL-incubated THP-1 macrophages. These proteins show no effect on increasing concentrations of NAC. Furthermore, NAC reduced the amount of MDA in THP-1 cells.

The results underline the importance of oxLDL and HIF-1 α in the pathogenesis of atherosclerosis. The loading of THP-1 macrophages with NAC and subsequent incubation with Cu^{2+} -oxLDL showed no effect on the SR-BI and HIF-1 α protein expression in the Western blot results. The comparison of our HPLC results with other studies shows that a clear interpretation is very difficult, because of the different experimental conditions. Therefore further investigations are required.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg, Leiter des Instituts für medizinische Chemie der Medizinischen Universität Wien, für die schnelle und interessante Bereitstellung dieses Diplomarbeitsthemas bedanken.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Hilde Laggner und Mag. Sabine Schreier für die fortwährende Unterstützung während meiner Zeit im Labor, wo sie mich durch ihr fachliches Wissen und ihre Ratschläge immer gut beraten haben. Danke für eure Geduld und die tolle Betreuung!

Weiters möchte ich mich bei all jenen Mitarbeitern dieses Instituts bedanken, die durch ihre fachliche Kompetenz zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mir mit hilfreichen Anregungen zur Seite standen.

Ganz besonders möchte ich meinen lieben Eltern und Geschwistern (Jacqueline, Dominik, Therese, Philipp, Christopher) danken, die mich während meiner ganzen Studienzzeit unterstützt haben, immer ein offenes Ohr für mich hatten und mein Leben einfach perfekt machen! Vielen Dank auch an meine Großeltern die mir während des Studiums finanziell geholfen haben und auch sonst großes Interesse für meine Arbeiten zeigten.

Ein besonderes Dankeschön an meinen großartigen Freund Stefan, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mich auch in schwierigen Zeiten geduldig ertragen hat.

9 Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Caroline Tufaro, geb. Tuppy
Geburtsdatum: 24. November 1984
Anschrift: Weinberggasse 28/11, 1190 Wien
Telefon: 0664/73614902
E-mail: caroline.t@gmx.at



Schul- und Berufsausbildung:

1991-1995 Volksschule, 1190 Wien
1995-2003 Realgymnasium Krottenbach, 1190 Wien
2003-2004 Studium der Medizin, Universität Wien
Seit Oktober 2004 Studium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien
(Schwerpunkt: Psychologie der Ernährung/Ernährungsberatung)
Seit Oktober 2008 Diplomarbeit am Institut für Medizinische Chemie
(Atheroskleroseforschung)

Studienbegleitende Tätigkeiten:

Februar 2007 Praktikum im Rahmen des Projekts NutritionDay in European Hospitals, Arbeitsgemeinschaft Klinische Ernährung, 1090 Wien
Juli 2007 Praktikum in der Cystischen Fibrose Ambulanz, AKH, 1090 Wien
August 2007 Praktikum bei der Diätologin Edith Kubierna, Praxis für ganzheitliche Ernährungstherapie
WS 2008/2009 Praktikum bei Mag. Sandrina Burisch, Ernährungsberatung und Polarity, 1190 Wien

Aug-Sept 2008 Praktikum am Institut für Medizinische Chemie, 1090 Wien
Mai 2009 Tutorium bei den biochemischen Arbeitstechnik Übungen für
Ernährungswissenschaften

Besondere Fähigkeiten und Kenntnisse:

Fremdsprachen: Englisch in Wort und Schrift
Französisch und Italienisch Grundkenntnisse

Computerkenntnisse: MS Office, Internet, GraphPad,

Besitz des B-Führerschein

Wien, den 28. Juli 2009

Literaturverzeichnis

- [1] ACTON S., RIGOTTI A., LANDSCHULZ K.T., XU S., HOBBS H.H., KRIEGER M. Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science*, 271:518–520, 1996.
- [2] AITIO M.L. N-acetylcysteine - passe-partout or much ado about nothing? *Br J Clin Pharmacol*, 61:5–15, 2005.
- [3] ASSMANN G., GOTTO A.M. HDL Cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation*, 109(suppl III):III8–III14, 2004.
- [4] AUWERX J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experimentia*, 47(1):22–31, 1991.
- [5] BERLINER J.A., HEINECKE J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, 20(5):707–727, 1996.
- [6] BERLINER J.A., NAVAB M., FOGELMAN A.M., FRANK J.S., DEMER L.L., EDWARDS P.A., WATSON A.D., LUSIS A.J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, 91:2488–2496, 1995.
- [7] BJORNHEDEN T., LEVIN M., EVALDSSON M., WIKLUND O. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19:870–860, 1999.
- [8] BOBRY SHEV Y V. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*, 37(3):208–222, 2006.
- [9] BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254, 1976.
- [10] BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*, 52:223–61, 1983.

- [11] CADER A.A., STEINBERG F.M., MAZZONE T., CHAIT A. Mechanisms of enhanced macrophage apoE secretion by oxidized LDL. *Journal of Lipid Research*, 38:981–991, 1997.
- [12] CARROLL V.A., ASHCROFT M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med*, 7(6):1–16, Apr 2005.
- [13] CHARO I.F., TAUBMAN M.B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*, 95(9):858–866, Oct 2004.
- [14] CHISOLM G.M., HAZEN S.L., FOX P.L., CATHCART M.K. The Oxidation of Lipoproteins by Monocytes-Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(37):25959–25962, 1999.
- [15] CHISOLM G.M., STEINBERG D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med*, 28(12):1815–1826, Jun 2000.
- [16] CONNELLY M.A., WILLIAMS D.L. SR-BI and HDL cholesteryl ester metabolism. *Endocr Res*, 30:697–703, 2004.
- [17] CONTRERAS J.A., CASTRO M., BOCOC C., HERRERA E., LASUNCION M.A. Combination of an enzymatic method and HPLC for the quantitation of cholesterol in cultured cells. *Journal of Lipid Research*, 33:931–936, 1992.
- [18] CULLEN P., FOBKER M., TEGELKAMP K., MEYER K., KANNENBERG F., CIGNARELLA A., BENNINGHOVEN A., ASSMANN G. An improved method for quantification of cholesterol and cholesteryl esters in human monocyte-derived macrophages by high performance liquid chromatography with identification of unassigned cholesteryl ester species by means of secondary ion mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 38:401–409, 1997.
- [19] DAVIGNON J., GANZ P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109(23 Suppl 1):III27–III32, Jun 2004.
- [20] DE FLORA S., BENNICELLI C., CAMOIRANO A. In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis*, 6:1735–1745, 1985.
- [21] DEVILLIERS W.J.S., SMART E.J. Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J. Leukoc. Biol.*, 66:740–746, 1999.

- [22] ESTERBAUER H., CHEESEMAN K.H. Determination of aldehyde lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.*, 186:407–421, 1990.
- [23] ESTERBAUER H., GEBICKI J., PUHL H., JÜRGENS G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 13(4):341–390, Oct 1992.
- [24] ESTERBAUER H., RAMOS P. Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 127:31–64, 1996.
- [25] ESTERBAUER H., ROTHENEDER M.D., WAEG G., STRIEGL G., JÜRGENS G. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol*, 3(2):77–92, 1990.
- [26] ESTERBAUER H., STRIEGL G., PUHL H., ROTHENEDER M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*, 6(1):67–75, 1989.
- [27] FARUQI R.M., POPTIC E.J., FARUQI T.R., DELA M.C., DICORLETO P.E. Distinct mechanisms for N-acetylcysteine inhibition of cytokine-induced E-selectin and VCAM-1 expression. *Ann. J. Physiol.*, 273:H817–H828, 1997.
- [28] GALIS Z.S., ASANUMA K., GODIN D., MENG X. N-Acetyl-Cysteine Decreases the Matrix-Degrading Capacity of Macrophage-Derived Foam Cells. *Circulation*, 97:2445–2453, 1998.
- [29] GAVISH D., BRESLOW J.L. Lipoprotein(a) reduction by N-acetylcysteine. *Lancet*, 337:203–204, 1991.
- [30] GLASS C.K., WITZTUM J.L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 104(4):503–516, Feb 2001.
- [31] GOLDSTEIN J.L., HO Y.K., BASU S.K., BROWN M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(1):333–337, 1979.
- [32] GUSTAFSSON M., FLOOD C., JIRHOLT P., BOREN J. Retention of atherogenic lipoproteins in atherogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 61:4–9, 2004.

- [33] HAN J., NICHOLSON A.C., ZHOU X., FENG J., GOTTO A.M., HAJJAR D.P. Oxidized Low Density Lipoprotein Decreases Macrophage Expression of Scavenger Receptor B-I. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(19):16567–16572, 2001.
- [34] HANSSON G.K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *The New England Journal of Medicine*, 352:1685–1695, 2005.
- [35] HAZELL L.J., ARNOLD L., FLOWERS D., WAEG G., MALLE E., STOCKER R. Presence of Hypochlorite-modified Proteins in Human Atherosclerotic Lesions. *J. Clin. Invest.*, 97:1535–1544, 1996.
- [36] HAZELL L.J., STOCKER R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem. J.*, 290:165–172, 1993.
- [37] HENRIKSEN T., MAHONEY E.M., STEINBERG D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(10):6499–6503, 1981.
- [38] HEYDECK D., UPSTON J.M., VIITA H., YLÄ-HERTTUALA S., STOCKER R. Oxidation of ldl by rabbit and human 15-lipoxygenase: prevalence of nonenzymatic reactions. *J. Lipid Res.*, 42(7):1082–1008, 2001.
- [39] HIRAMATSU K., ROSEN H., HEINECKE J.W., WOLFBAUER G., CHAIT A. Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis*, 7(1):55–60, 1987.
- [40] HIRANO K., YAMASHITA S., NAKAGAWA Y., OHYA T., MATSUURA F., TSUKAMOTO K., OKAMOTO Y., MATSUYAMA A., MATSUMOTO K., MIYAGAWA J., MATSUZAWA Y. Expression of Human Scavenger Receptor Class B Type I in Cultured Human Monocyte-Derived Macrophages and Atherosclerotic Lesions. *Circ Res*, 85:108–116, 1999.
- [41] HU F.B., MANSON J.E., WILLETT W.C. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review . *J Am Coll Nutr.*, 20(1):5–19, 2001.
- [42] JIALAL I. Evolving lipoprotein risk factors: lipoprotein(a) and oxidized low-density lipoprotein. *Clinical Chemistry*, 44(8):1827–1832, 1998.

- [43] JIANG G., LI T., QIU Y., RUI Y., CHEN W., LOU Y. RNA interference for HIF-1 α inhibits foam cells formation in vitro. *Eur J Pharmacol*, 562(3):183–190, May 2007.
- [44] KAHN T.S., ADAMSON G.L., GLINES L.A., LINDGREN F.T., LASKARIS M.A., SHORE V.G. Analytic ultracentrifuge calibration and determination of lipoprotein-specific refractive increments. *Lipids*, 19(7):558–561, 1984.
- [45] KELLY G.S. Clinical Applications of N-acetylcysteine. *Alt Med Rev*, 3(2):114–127, 1998.
- [46] KOZARSKY K.F., DONAHEE M.H., RIGOTTI A., IQBAL S.N., EDELMAN E.R., KRIEGER M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, 387:414–417, 1997.
- [47] KRIEGER M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic system. *J. Clin. Invest.*, 108:793–797, 2001.
- [48] LEE J., BAE S., JEONG J., KIM S., KIM K. Hypoxia-inducible factor (HIF-1): its protein stability and biological functions. *Experimental and Molecular Medicine*, 38(1):1–12, 2004.
- [49] LEPPANEN O., BJORNHEDEN T., EVALDSSON M., BOREN J., WIKLUND O., LEVIN M. ATP depletion in macrophages in the core of advanced rabbit atherosclerotic plaques in vivo. *Atherosclerosis*, 188:323–330, 2006.
- [50] LÖFFLER G., PETRIDES P.E., HEINRICH P.C. Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Medizin Verlag Heidelberg*, 8.Auflage:568–579, 2007.
- [51] LI A.C., GLASS C.K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*, 8(11):1235–1242, Nov 2002.
- [52] LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 42:868–874, 2002.
- [53] LIBBY P., THEROUX P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation*, 111:3481–3488, 2005.
- [54] LUC G., FRUCHART J.C. Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*, 53:206–208, 1991.
- [55] LUSIS A.J. Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801):233–241, Sep 2000.

- [56] MALLE E., MARSCHÉ G., ARNHOLD J., DAVIES M.J. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761:392–415, 2006.
- [57] MCMILLAN GC. Historical review of research on atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*, 369:1–6, 1995.
- [58] MESTAS J., LEY K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 18(6):228–232, Aug 2008.
- [59] MOREL D.W., DiCORLETO P.E., CHISOLM G.M. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*, 4(4):357–364, 1984.
- [60] MOSER M. Untersuchungen zur Bedeutung von Vitamin C und HDL in der Frühphase der Atherosklerose. *Diplomarbeit*, 2007.
- [61] NAKATA K., KAWASE M., OGINO S. Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and an attempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine derivatives. *Mech Ageing Dev*, 90:195–207, 1996.
- [62] PACKARD R.R.S., LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*, 54(1):24–38, Jan 2008.
- [63] PODREZ E.A., ABU-SOUD H.M., HAZEN S.L. Myeloperoxidase-Generated Oxidants and Atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 28:1717–1725, 2000.
- [64] QUEHENBERGER O. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. *J Lipid Res*, 46(8):1582–1590, Aug 2005.
- [65] RADHIKA A., JACOB S.S., SUDHAKARAN P.R. Influence of oxidatively modified LDL on monocyte-macrophage differentiation. *Mol Cell Biochem*, 305(1-2):133–143, Nov 2007.
- [66] RANKIN S.M., PARTHASARATHY S., STEINBERG D. Evidence of a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages. *J. Lipid Res*, 32:449–456, 1991.

- [67] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362:801–9, 1993.
- [68] ROSS R. Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis*, 131:3–4, 1997.
- [69] ROSS, R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(2):115–126, 1999.
- [70] ROSS R., GLOMSET J., HARKER L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*, 86(3):675–684, Mar 1977.
- [71] SALCEDO S., CARO J. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasom system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, 272:22642–22647, 1997.
- [72] SAWAMURA T., KUME N., AOYAMA T., MORIWAKI H., HOSHIKAWA H., AIBA Y., TANAKA T., MIWA S., KATSURA Y., KITA T., MASAKI T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 386:73–77, 1997.
- [73] SCHUMAKER V.N., PUPPIONE D.L. Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol.*, 128:155–170, 1986.
- [74] SEMENZA G.L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes & Development*, 14:1983–1991, 2000.
- [75] SEMENZA G.L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Molecular Medicine*, 7(8):345–350, 2001.
- [76] SEMENZA G.L. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology*, 64:993–998, 2002.
- [77] SHASHKIN P., DRAGULEV B., LEY K.,. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des*, 11(23):3061–3072, 2005.
- [78] SHATROV V.A., SUMBAYEV V.V., ZHOU J., BRÜNE B. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood*, 101(12):4847–4849, 2003.

- [79] SLUIMER J.C., GASC J., VAN WANROIJ J.L., KISTERS N., GROENEWEG M., GELPKE S., et al. Hypoxia, Hypoxia-Inducible Transcription Factor, and Macrophages in Human Atherosclerotic Plaques Are Correlated with Intraplaque Angiogenesis. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(13):1258–1265, 2008.
- [80] STADLER N., LINDNER R.A., DAVIES M.J. Direct Detection and Quantification of Transition Metal Ions in Human Atherosclerotic Plaques: Evidence for the Presence of Elevated Levels of Iron. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24:949–954, 2004.
- [81] STEINBERG D. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation*, 76:508–514, 1987.
- [82] STEINBERG D. Low Density Lipoprotein Oxidation and its Pathobiological Significance. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:20963–20966, 1997.
- [83] STEINBERG D., PARTHASARATHY S., CAREW T.E., KHOO J.C., WITZTUM J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 320:915–924, 1989.
- [84] STEINBRECHER U. P., WITZTUM J. L., PARTHASARATHY S., STEINBERG D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. *Arteriosclerosis*, 7:135–143, 1987.
- [85] TAJIMA M., KURASHIMA Y., SUGIYAMA K., OGURA T., SAKAGAMI H. The redox state of glutathione regulates the hypoxic induction of HIF-1. *European Journal of Pharmacology*, 606:45–49, 2009.
- [86] THOMAS C.E., JACKSON R.L. Lipid Hydroperoxide Involvement in Copper-Dependent and Independent Oxidation of Low Density Lipoproteins. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256(3):1182–1188, 1990.
- [87] TOSSIOS P., MEHLHORN U. Freie Radikale und Antioxidantien in der Herzchirurgie. *Blickpunkt der Mann*, 2(3):36–39, 2004.
- [88] TRIGATTI B., COVERY S., RIZVI A. Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. *Biochemical Society Transaction*, 32:116–120, 2004.

- [89] TRIGATTI B.L., KRIEGER M., RIGOTTI A. Influence of the HDL Receptor SR-BI on Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:1732–1738, 2003.
- [90] TSUCHIYA S., YAMABE M., YAMAGUCHI Y., KOBAYASHI Y., KONNO T., TADA K. Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1). *Int. J. Cancer*, 26:171–176, 1980.
- [91] VINK A., SCHONEVELD A.H., LAMERS D., HOUBEN A.J.S., VAN DER GROEP P., VAN DIEST P.J., PASTERKAMP G. HIF-1 alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages. *Atherosclerosis*, 195(2):e69–e75, Dec 2007.
- [92] WATANABE T., PAKALA R., KARAGIRI T., BENEDICT C.R. Synergistic effect of urotensin II with mildly oxidized LDL on DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 104:16–18, 2001.
- [93] WILLIAMS KJ., TABAS I. The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15:551–61, 1995.
- [94] WITZTUM J. L., STEINBERG D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med*, 11(3-4):93–102, 2001.
- [95] WITZTUM J.L., STEINBERG D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 88:1785–1792, 1991.
- [96] WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). Fact sheet N° 317 Cardiovascular Diseases (2007). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>, (Zugriff am 14.02.2009).
- [97] YLÄ-HERTTUALA S. Macrophages and Oxidized Low Density Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Ann Med*, 23:561–567, 1991.
- [98] YLÄ-HERTTUALA S. Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr.Opin.Lipidol.*, 9:337–344, 1998.
- [99] YLÄ-HERTTUALA S. Oxidized LDL and Atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 874:134–137, 1999.

- [100] ZAFARULLAH M., LI W.Q., SYLVESTER J., AHMAD M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60:6–20, 2003.
- [101] ZHU H., TAKAHASHI Y., XU W., et al. Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-mediated Membrane Translocation of 12/15-Lipoxygenase Is Required for Oxidation of Low Density Lipoprotein by Macrophages. *J. Biol. Chem.*, 278(15):13350–13355, 2003.