

Die immunmodulatorische Wirkung von Ethylpyruvat

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Marcus Hollenbach

geb. am 12.07.1983 in Bad Salzungen

angefertigt an der

Universität Leipzig / Institut für Biochemie

Betreuer: Prof. Dr. G. Birkenmeier

Institut für Biochemie, Universität Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 27.09.2011

Meinen Eltern, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglichten

Redaktionsschluss: 31.03.2009

Bibliographische Beschreibung

Hollenbach, Marcus

Titel der Arbeit:

Die immunmodulatorische Wirkung von Ethylpyruvat

Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Institut für Biochemie
122 Seiten, 52 Abbildungen, 198 Literaturzitate

Referat:

In einer Vielzahl von Arbeiten konnten anti-inflammatorische Eigenschaften von Ethylpyruvat (EP) aufgezeigt werden. An verschiedenen Modellen der Sepsis, des hämorrhagischen Schocks, von Verbrennungsschäden, des Apoplex oder der Ischämie und Reperfusion wurde bei der Behandlung mit EP ein protektiver Effekt sowie eine verminderte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nachgewiesen. Als biochemische Grundlage wurde die Interaktion von EP mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B identifiziert, die spezifischen Regulationsmechanismen konnten bisher allerdings nicht zufriedenstellend aufgeklärt werden. In dieser Arbeit wurde als eine neue mögliche Erklärung für die anti-inflammatorischen Eigenschaften des EP und weiterer α -oxo-Karbonsäureester die Inhibierung der Glyoxalase I (Glo-I) aufgezeigt. *In vitro*-Experimente zur Enzymaktivität belegten die Hemmung der Glo-I durch EP, während α -Hydroxy-Karbonsäureester wie L-Ethyllaktat (EL) keine inhibierenden Eigenschaften aufwiesen. Dennoch waren sowohl EP als auch EL und weitere Laktatester in der Lage, die LPS-induzierte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α von humanen immunkompetenten Zellen zu supprimieren und die Expression von Immunrezeptoren wie HLA-DR, CD14 und CD91 zu modulieren. Somit konnten erstmals anti-inflammatorische Eigenschaften von Laktatestern nachgewiesen sowie eine Verbindung zwischen den Glyoxalase-Enzymen und dem Immunsystem etabliert werden. Diese und weitere Ergebnisse zur Einflussnahme der Karbonsäureester auf die Zellvitalität präsentieren das Glyoxalasesystem als mögliches Ziel neuer Therapiekonzepte für die Immunsuppression und bestätigen dessen Bedeutung für die Entwicklung von Anti-Tumor-Agenzien.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
1.1	Das Glyoxalasesystem.....	1
1.1.1	Eigenschaften und Funktionsweise des Glyoxalasesystems	1
1.1.2	Die Charakterisierung der Glyoxalase I	2
1.1.3	Die Charakterisierung der Glyoxalase II.....	3
1.1.4	Methylglyoxal	4
1.1.5	Die zelluläre Regulation des Glyoxalasesystems	5
1.1.6	Inhibitoren von Glyoxalase-Enzymen.....	6
1.2	Pyruvat und dessen Ester Ethylpyruvat.....	7
1.2.1	Pyruvat und reaktive Sauerstoffspezies.....	7
1.2.2	Protektive Effekte bei der Behandlung mit Pyruvat.....	8
1.2.3	Probleme in der Anwendung von Pyruvat	9
1.2.4	Anti-inflammatorische Eigenschaften von Ethylpyruvat	10
1.2.5	Unterschiede zwischen Pyruvat und Ethylpyruvat.....	15
1.2.6	Die biochemische Grundlage für die anti-inflammatorischen Effekte von Ethylpyruvat	17
1.2.7	Der klinische Einsatz von Ethylpyruvat	18
1.2.8	Ziele der Arbeit	19
2.	Material und Methoden	21
2.1	Verwendete Chemikalien	21
2.2	Verwendete Puffer.....	22
2.3	Verwendete Geräte	23
2.4	Zellkultur	23
2.5	Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen aus humanem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation	24
2.6	Lyse der Zellen zur Herstellung von zytosolischen Extrakten.....	25

2.7	Bestimmung der Glyoxalaseaktivität	25
2.8	Proteinbestimmung nach Bradford.....	25
2.9	Durchflusszytometrische Analysen.....	26
2.9.1	Messprinzip	26
2.9.2	Durchflusszytometrische Bestimmung von pro-inflammatorischen Zytokinen ...	27
2.9.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von HLA-DR, CD14 und CD91	29
2.9.4	Durchflusszytometrische Bestimmung von Apoptose und Nekrose.....	31
2.10	Statistik.....	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Die Hemmung der Glyoxalase I durch Ethylpyruvat	34
3.2	Die Aktivität der Glyoxalase I in PBMCs und THP-1-Zellen	35
3.3	Der Einfluss von Ethylpyruvat, L-Ethyllaktat und weiteren Substanzen auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine.....	36
3.3.1	Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine	36
3.3.2	Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine.....	37
3.3.3	Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine.....	39
3.4	Der Einfluss von Ethylpyruvat, L- und D-Ethyllaktat und weiteren Substanzen auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker	40
3.4.1	Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker	41
3.4.1.1	Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von HLA-DR	41
3.4.1.2	Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von CD14.....	43
3.4.1.3	Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von CD91	44
3.4.2	Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker	46

3.4.2.1	Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von HLA-DR.....	46
3.4.2.2	Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von CD14	47
3.4.2.3	Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von CD91	49
3.4.3	Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker	50
3.4.3.1	Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von HLA-DR	50
3.4.3.2	Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von CD14.....	52
3.4.3.3	Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von CD91.....	53
3.4.4	Der Einfluss von Butyllaktat auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker	55
3.4.4.1	Der Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von HLA-DR	55
3.4.4.2	Der Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von CD14.....	56
3.4.4.3	Der Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von CD91	58
3.4.5	Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker	59
3.4.5.1	Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von HLA-DR	59
3.4.5.2	Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von CD14.....	61
3.4.5.3	Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von CD91	62
3.5	Der Einfluss von Ethylpyruvat und strukturell verwandter Verbindungen auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP-1-Zellen	64
3.5.1	Der Einfluss von Ethylpyruvat auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP- 1-Zellen	65
3.5.2	Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP- 1-Zellen	68
3.5.3	Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP- 1-Zellen	71
3.5.4	Der Einfluss von Pyruvat auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP-1- Zellen.....	72

3.5.5	Der Einfluss von Ethanol auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP-1-Zellen.....	73
4.	Diskussion	75
4.1	Die Hemmung der Glyoxalase I durch Ethylpyruvat	75
4.2	Der Einfluss von Ethylpyruvat und strukturell verwandter Verbindungen auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine	76
4.3	Der Einfluss von Ethylpyruvat und strukturell verwandter Verbindungen auf die Expression von HLA-DR, CD14 und CD91	78
4.4	Der Einfluss von Ethylpyruvat und strukturell verwandter Verbindungen auf die Zellvitalität	84
4.5	Die Hemmung der Glyoxalase I als mögliche biochemische Grundlage der Effekte von Ethylpyruvat	86
5.	Zusammenfassung	88
6.	Quellenangaben	89
7.	Eigene Publikationen.....	104
8.	Abbildungsverzeichnis	105
9.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	108
10.	Lebenslauf	111
11.	Danksagung	113
12.	Erklärung an Eides statt.....	114

1. Einleitung

1.1 Das Glyoxalasesystem

1.1.1 Eigenschaften und Funktionsweise des Glyoxalasesystems

Das Glyoxalasesystem wurde 1913 von Dakin und Dudley sowie in einer weiteren Arbeitsgruppe von Neuberg entdeckt. Dabei entwickelten sie zunächst die Theorie, dass ein einzelnes Enzym für die Metabolisierung von Methylglyoxal (MGO) zu Laktat und von Phenylglyoxal zu Mandelsäure verantwortlich ist (Dakin und Dudley 1913). Später wurde beobachtet, dass reduziertes Glutathion (GSH) eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität des Systems darstellt (Lohmann 1932, Hopkins und Morgan 1945).

In den folgenden Jahrzehnten konnte die genaue Struktur und Funktion des Glyoxalasesystems weiter aufgeklärt werden. Nach heutigem Stand der Forschung beschreibt das Glyoxalasesystem einen Komplex aus zwei Enzymen, der Glo-I und Glo-II. Dabei katalysiert die Glo-I die Kondensationsreaktion von MGO und GSH zu S-D-Lactoylglutathion. Die Aufgabe der Glo-II besteht in der Hydrolyse von S-D-Lactoylglutathion und H₂O zu D-Laktat. Hierbei wird GSH regeneriert (siehe Abbildung 1) (Racker 1951, Mannervik 1980, Murata et al. 1989).

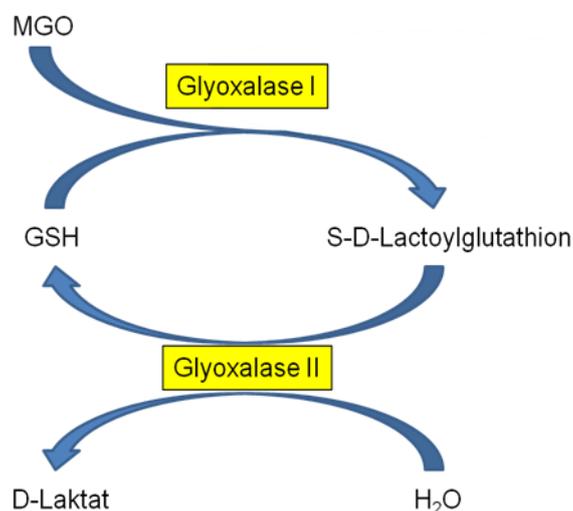


Abbildung 1: Das Glyoxalasesystem. Nach Thornalley (Thornalley 1990).

Glyoxalaseenzyme existieren ubiquitär in allen Lebewesen, sie werden im Zytosol und z.T. auch in den Mitochondrien gefunden (Hopkins und Morgan 1945, Jerzykowski et al. 1975, Darling und Blum 1988).

1.1.2 Die Charakterisierung der Glyoxalase I

Die Glo-I (EC 4.4.1.5) ist in Säugetieren ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 43-48 kDa. In pro- und eukaryonten Mikroorganismen wird das Enzym als Monomer von 20-36 kDa gefunden (Douglas et al. 1986). Jede Untereinheit des Dimers bzw. jedes Monomer besitzt in seinem aktiven Zentrum ein Zn^{2+} , während das Apoenzym katalytisch inaktiv ist (Sellin et al. 1983, Thornalley 1990). Substitutionsexperimente mit anderen Metallionen ergaben, dass ähnliche spezifische Aktivitäten im Vergleich zum Zn^{2+} -Ion durch Substitution mit Mg^{2+} -, Mn^{2+} -, Co^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen erreicht werden konnten (Han et al. 1977). Beide Monomere des humanen Dimers bestehen aus zwei strukturell identischen Domänen. Das aktive Zentrum ist zwischen beiden Monomeren lokalisiert, wobei die Zinkbindungsstelle durch zwei strukturell identische Proteinreste (Gln 33A, Glu 99A, His-126B und Glu-172B) von jeder Domäne und je zwei Wassermolekülen gehalten wird. So ergibt sich eine oktaedrische Anordnung (siehe Abbildung 2) (Cameron et al. 1997, Thornalley 2003).

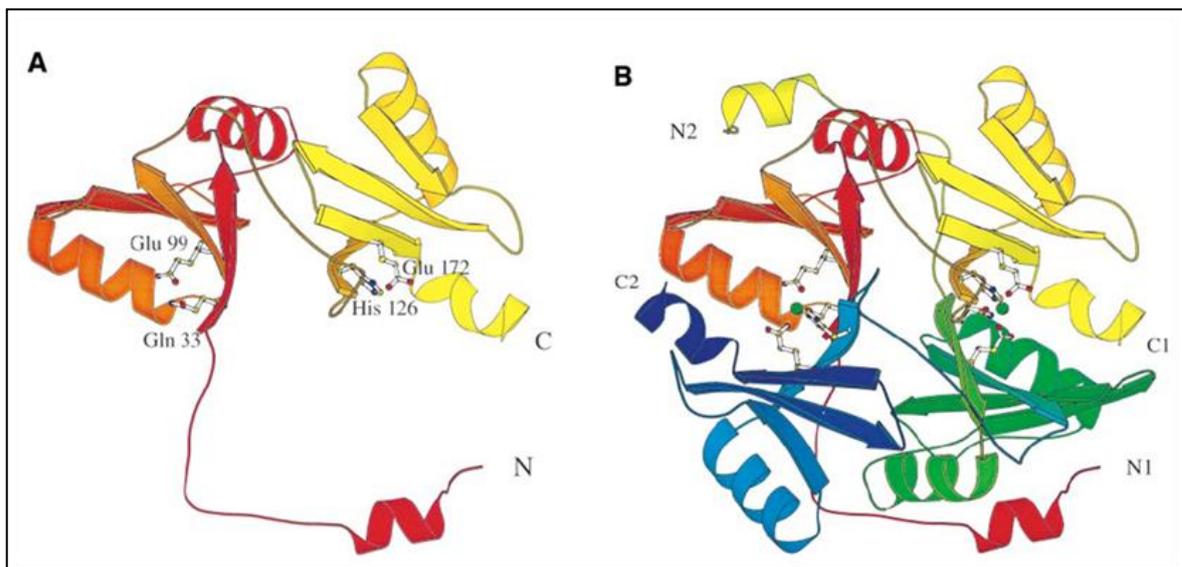


Abbildung 2: Struktur der Glyoxalase I. A) als Monomer und B) als Dimer (Cameron et al. 1997).

Der physiologischen Kofaktor für die Glo-I ist GSH, wobei oxidiertes Glutathion (GSSG), L-Cystein, L-Cysteinglycin oder γ -L-Glutamylcystein als Kofaktoren inaktiv sind (Wieland et al. 1956, Carnegie 1963). Die Glo-I besitzt weiterhin eine breite Substratspezifität für α -Oxoaldehyde wie MGO, Hydroxypyruvaldehyd, Hydroxypyruvataldehydphosphat, Glyoxal, Phenylglyoxal, 4,5-Dioxovalerate und viele

andere Alkyl- und Arylglyoxale (Weaver und Lardy 1961, Vander Jagt 1989, Mannervik 1980, Thornalley 1993).

Der Mechanismus der Glo-I-Reaktion beinhaltet die Bindung eines Hemithioacetals an das aktive Zentrum des Enzyms. Dieses Hemithioacetal entsteht nichtenzymatisch aus einem α -Oxoaldehyd wie z.B. MGO und GSH (Mannervik et al. 1981, Thornalley 1990). Dabei ereignet sich ein Protonentransfer vom C1 zum C2 des Hemithioacetals, wodurch es zur Entstehung eines Endiol-Intermediats kommt. Dieses wird in einer schnellen Ketonisation zum Thioesterprodukt S-D-Lactoylglutathion überführt (Hall 1978, Douglas 1987).

Das Translationsprodukt des humanen Glyoxalase I-Gens besteht aus 184 Aminosäuren, wobei das N-terminale Met einer posttranslationalen Prozessierung unterliegt und das N-terminale Ala geblockt ist (Cameron et al. 1997). Es existieren drei verschiedene Phänotypen der Glo-I: GLO 1-1, GLO 1-2 und GLO 2-2, welche die homo- und heterozygote Expression der Gene GLO^1 und GLO^2 repräsentieren (Kompf et al. 1975a, Kompf et al. 1975b). Der Genlocus der Glo-I befindet sich auf Chromosom 6 zwischen Zentromer und HLA-DR (Bender und Grzeschik 1976, Kompf und Bissbort 1976).

Weiterhin wurden geographische Unterschiede bei der Expression der Glo-I festgestellt. In Alaska konnten sehr hohe Allelfrequenzen der GLO^1 gefunden werden. Dagegen waren verminderte Frequenzen in Süd- und Osteuropa, Südamerika, Afrika, Indien und sehr niedrige Allelfrequenzen der GLO^1 im Fernen Osten und Ozeanien feststellbar (Thornalley 1991). Ebenso wurde eine Verbindung zwischen der Expression der Glo-I und insulinabhängigem Diabetes mellitus festgestellt. Ein erhöhte Allelfrequenz von GLO 1-1 und erniedrigte Frequenzen von GLO 1-2 und GLO 2-2 konnten bei dieser Erkrankung festgestellt werden (McCann et al. 1981).

1.1.3 Die Charakterisierung der Glyoxalase II

Die Glyoxalase II (Glo-II) (EC 3.1.2.6.) ist ein Monomer mit einer molekularen Masse zwischen 18 und 29 kDa (Principato et al. 1987). Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse einer Vielzahl von Derivaten des S-D-Hydroxyacylglutathions wie S-Lactoyl-, S-Glycolyl- oder S-Mandelylglutathion zu GSH und der entsprechenden Aldonsäure, im Fall von S-D-Lactoylglutathion D-Laktat (Uotila 1973, Guha et al. 1988).

Die Glo-II besteht strukturell aus zwei verschiedenen Domänen, wobei die erste Domäne der Struktur von Metallo- β -Laktamasen ähnelt und die zweite Domäne vorwiegend α -

helikale Eigenschaften besitzt. Im aktiven Zentrum ist eine binukleäre Zinkbindungsstelle lokalisiert, die Substratbindungsstelle befindet sich an der Domänengrenzfläche (Cameron et al. 1999).

Bei der katalytischen Reaktion der Glo-II wird ein Histidinrest im aktiven Zentrum durch S-D-Lactoylglutathion modifiziert, woraufhin Glutathion das aktive Zentrum verlässt und das Acyl-Enzym-Intermediat hydrolysiert wird. Dabei entsteht D-Laktat und das aktive Enzym steht für weitere Reaktionen wieder zur Verfügung (Ball und Vander Jagt 1981).

Der Genlocus der Glo-II befindet sich auf Chromosom 16 (Honey und Shows 1981), gewöhnlich wird nur ein Genotyp exprimiert (Board 1980).

Als Hemmstoffe der Glo-II sind S-Karbobenzoxyglutathione beschrieben, diese stellen kompetitive Inhibitoren dar (Al-Timari und Douglas 1986, Principato et al. 1989).

1.1.4 Methylglyoxal

MGO ist das bedeutendste physiologische Substrat der Glo-I (Thornalley 1990). Es ist eine reaktive Carbonylverbindung, die physiologisch in vielen Stoffwechselwegen wie bei der Triosephosphatisomerase (TIM) (EC 5.3.1.1), in der Glykolyse (Ohmori et al. 1989) aber auch bei der Bildung von Aceton im Ketonkörperstoffwechsel und bei der Bildung von Aminoaceton im Threoninkatabolismus entsteht (Ray und Ray 1983, Casazza et al. 1984, Phillips und Thornalley 1993). Dabei wird die Hauptmenge des MGO in der TIM erzeugt (Ohmori et al. 1989).

Obwohl MGO ein natürliches biologisches Produkt darstellt, besitzt es zytotoxische Eigenschaften, indem es an Proteine und Nukleinsäuren bindet (Vaca et al. 1994, Lo et al. 1994). Durch die Reaktion von MGO mit Proteinen, Nukleotiden und wahrscheinlich auch basischen Phospholipiden entstehen „advanced glycation endproducts“ (AGEs). Wichtige AGEs sind z.B. das Hydroimidazol, ein Derivat des Arginins und strukturelle Isomere wie das Argpyrimidin, ein Derivat des Ornithin (Thornalley 2003). Weiterhin induziert MGO Apoptose mit Beteiligung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Du et al. 2000, Akhand et al. 2001). Ferner ist MGO in der Lage, glykolytische Enzyme zu hemmen (Leoncini et al. 1980, Leoncini et al. 1989) sowie den Aufbau von Mikrotubuli zu unterbinden (Miglietta und Gabriel 1986). Außerdem wurde festgestellt, dass es in Ratten mit Hypertonie nach Injektion von MGO zur verstärkten Expression von NF- κ B, p53 und ICAM1 kommt (Wu und Juurlink 2002).

Ebenso wurden erhöhte Konzentrationen von MGO, S-D-Lactoylglutathion und D-Laktat in Blutproben von Diabetikern, verglichen mit gesunden Blutspendern, gefunden (McLellan et al. 1994). Damit nehmen die Enzyme Glo-I und -II bei der Neutralisierung des biologisch toxischen MGO eine wichtige Rolle im Organismus ein.

1.1.5 Die zelluläre Regulation des Glyoxalasesystems

Die unterschiedlichen Aktivitäten und Phänotypen des Glyoxalasesystems wurden bereits in der Embryogenese untersucht. Ein Ergebnis war die Feststellung, dass die Glo-I und -II zu den am frühesten in der Entwicklung exprimierten Enzymen gehören (Wieczorek und Dobosz 1979). Ebenso ist ein aktives Glyoxalasesystem während Embryogenese und Gewebereifung präsent und persistiert bis zum Zelltod. Damit stellt dieses System eine fundamentale Grundlage für die Aufrechterhaltung des Lebens dar (McLellan und Thornalley 1989).

Durch Studien an verschiedenen Geweben wurde postuliert, dass in unreifen, proliferierenden Geweben eine hohe Aktivität der Glo-I und eine niedrige Aktivität der Glo-II zu finden ist. Dagegen ergab sich in reifen, differenzierten Gewebetypen eine umgekehrte Verteilung. In beiden Modellen stellt dabei die Glo-II das limitierende Enzym dar (Principato et al. 1982, Principato et al. 1983).

Untersuchungen zur Aktivität des Glyoxalasesystems in Tumorzellen ergaben z.T. sehr konträre Aussagen. Die Aktivität der Glo-I kann in Tumorgewebe eine höhere, niedrigere oder gleich große Aktivität im Vergleich zum korrespondierenden Nicht-Tumorgewebe aufweisen. Dabei scheint die Glo-II in Tumorgewebe eine niedrigere Aktivität zu besitzen (Jerzykowski et al. 1975, Hooper et al. 1987). Aufgrund der Erkenntnis der verstärkten Aktivität der Glo-I in chemotherapieresistenten Tumoren wurde die Theorie entwickelt, dass Inhibitoren der Glo-I die zelluläre Konzentration von MGO in einen toxischen Bereich erhöhen und damit zur Bekämpfung der Tumorzellen beitragen können (Vince und Daluge 1971, Sakamoto et al. 2000).

1.1.6 Inhibitoren von Glyoxalase-Enzymen

Die stärksten und meist untersuchten Inhibitoren der Glo-I sind die S- ρ -Bromobenzylglutathion-Diester wie S- ρ -Bromobenzylglutathion oder S- ρ -Bromobenzylglutathioncyclopentylidiester. In HLA-60-Leukämiezellen führt die Zugabe dieser Hemmstoffe zum intrazellulären Anstieg von MGO, zur Hemmung der DNA-Synthese und zur Induktion der Apoptose. Daneben wurde eine Inhibierung des Tumorwachstums beobachtet (Lo und Thornalley 1992, Thornalley et al. 1996, Kang et al. 1996).

Ein weiterer Glyoxalaseinhibitor ist das Folsäureanalogon Methotrexat (MTX). Es konnte gezeigt werden, dass MTX *in vitro* die Glo-I hemmt und dass sich die Konzentrationen von D-Laktat in Patienten, denen MTX verabreicht wurde, signifikant verringerten (Bartyik et al. 2004).

Ferner sind auch verschiedene nichtsteroidale Antirheumatika wie Indomethacin in der Lage, als Hemmstoffe der Glo-I zu agieren. Durch die Zugabe von Indomethacin zu Tumorzellen konnte deren Überlebensrate erheblich gesenkt werden. Ähnliche, wenn auch deutlich geringer ausgeprägte Effekte traten bei der Behandlung der Zellen mit Acetylsalicylsäure oder Tolmetin auf (Sato et al. 2007).

Ein weiterer bedeutender Hemmstoff kommt aus der Klasse der Antidiabetika, der „Insulinsensitizer“ Troglitazone. Es konnte nachgewiesen werden, dass Troglitazone sowohl die Glo-I als auch die Glo-II hemmt. Dieser Effekt ist konzentrations- sowie zeitabhängig und geht mit einer erhöhten Bildung von AGEs einher (Wu et al. 2001).

In einer weiteren Arbeit wurden natürlich vorkommende Flavanoide wie Myricetin und Quercetin als Glyoxalaseinhibitoren identifiziert. Die Zugabe dieser Substanzen zu humanen Leukämiezellen zeigte ebenfalls eine signifikante Abnahme der Überlebensrate der Tumorzellen (Takasawa et al. 2008).

Diese Auflistung verschiedenster Stoffklassen als Inhibitoren der Glo-I und -II zeigt die Bedeutung dieses Enzymsystems im biologischen Organismus und das Interaktionspotential zwischen unterschiedlichen pathologischen Zuständen und den Glyoxalaseenzymen.

1.2 Pyruvat und dessen Ester Ethylpyruvat

1.2.1 Pyruvat und reaktive Sauerstoffspezies

Die Brenztraubensäure ist eine einfache 3-Keto-Karbonsäure. Unter physiologischen Bedingungen existiert die Brenztraubensäure in Zellen und im Extrazellulärraum hauptsächlich in Form des Anions. Pyruvat spielt als Endprodukt der Glykolyse und Substrat des Zitrat-Zyklus eine zentrale Rolle im intermediären Stoffwechsel. Darüber hinaus fungiert Pyruvat als endogenes Antioxidans (Fink 2004).

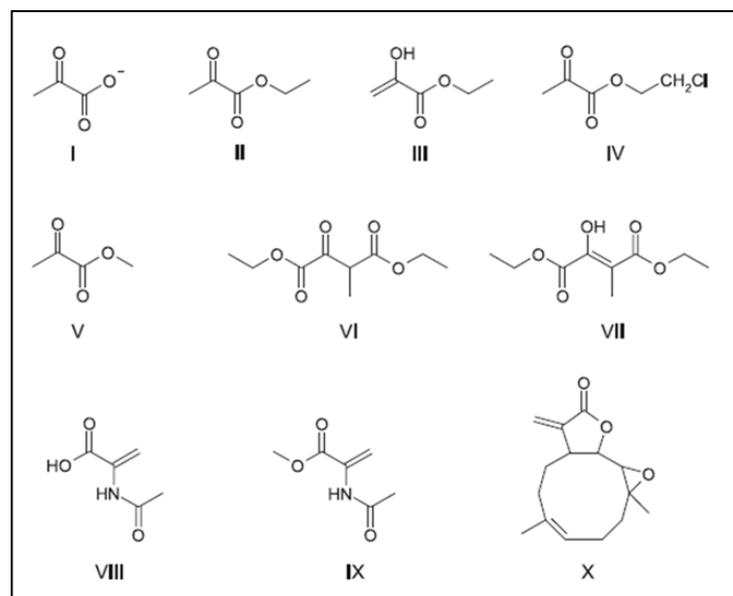


Abbildung 3: Chemische Strukturen von Pyruvat und verwandten Verbindungen. I) Pyruvat, II) EP in der Ketoform, III) EP in der Enolform, IV) 2-Chlor-Ethylpyruvat, V) Methyl-pyruvat, VI) Diethyloxalopropionat (DEOP) in der Keto- und VII) Enolform, VIII) 2-Acetamidoacrylat (2-AA), IX) Methyl-2-Acetamidoacrylat (Me-2-AA), und X) Parthenolid (Fink 2007a).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine zentrale Rolle als Mediatoren verschiedenster pathologischer Prozesse. Entscheidende Bedeutung erlangen ROS bei Verbrennungen (LaLonde et al. 1996), verschiedenen Formen der Ischämie- und Reperfusionsschäden (DeBoer et al. 1993, Horton und Walker 1993) sowie beim hämorrhagischen Schock (Deitch et al. 1988, Deitch et al. 1990). Weiterhin spielen redox-vermittelte Prozesse eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Sepsis und des septischen Schocks. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Radikalfängern positive Effekte in verschiedenen Modellen der Sepsis (Sprong et al. 1997, Zacharowski et

al. 2000), bei LPS-induziertem akuten Lungenversagen (Gonzalez et al. 1995) sowie LPS-induziertem Schock (Essani et al. 1997, Leach et al. 1998) erzielt.

Biologisch relevante ROS sind das Superoxidanion-Radikal ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) sowie das Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$). Obwohl $O_2^{\cdot-}$ nur gering reaktiv ist, kann es über die Superoxiddismutase in das wesentlich stärker reaktive H_2O_2 konvertiert werden. Sowohl das $O_2^{\cdot-}$ als auch H_2O_2 können in einer Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO) das hochreaktive $ONOO^{\cdot}$ bilden (Wink und Mitchell 1998). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass sowohl $O_2^{\cdot-}$ als auch H_2O_2 in mehreren Reaktionen, die über ionisiertes Eisen vermittelt werden, interagieren und eine weitere hochreaktive ROS entsteht, das OH^{\cdot} (Graf et al. 1984).

Protektive Effekte des Pyruvats gegen oxidativen Stress in Form von ROS konnten am Beispiel von humanen Fibroblasten und Adenokarzinomzellen unter Exposition mit Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden (O'Donnell-Tormey et al. 1987). Weitere Versuche an Thymus-Zelllinien konnten diese Eigenschaft des Pyruvats als Radikalfänger auch an proliferierenden Zellen bestätigen (Brand und Hermfisse 1997, Brand 1997). Dabei spaltet Pyruvat in einer stöchiometrischen Reaktion H_2O_2 nichtenzymatisch in Kohlendioxid und Wasser (Holleman 1904, Adickes und Andresen 1943). Weiterhin ist Pyruvat in der Lage, neben Wasserstoffperoxid auch die schädigende Wirkung anderer ROS wie des OH^{\cdot} zu neutralisieren (Dobsak et al. 1999).

1.2.2 Protektive Effekte bei der Behandlung mit Pyruvat

Die Erkenntnis, dass Pyruvat ein Radikalfänger von ROS ist, veranlasste die Wissenschaftler, diese Substanz in verschiedenen Krankheitsmodellen einzusetzen, die zumindest teilweise durch oxidativen Stress verursacht werden. In darauf folgenden *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit einer Natriumpyruvatlösung die Nierenfunktion in Rattenmodellen von ROS-vermittelten akuten Nierenversagen verbessern kann. Die Zugabe von Pyruvat verminderte sowohl die durch H_2O_2 -Infusion induzierte Proteinexkretion als auch die durch Glycerol-Injektion vermittelten strukturellen Nierenschäden (Salahudeen et al. 1991). Weiterhin wurde an isolierten Schweineherzen beobachtet, dass die Behandlung mit Pyruvat nach Ischämie und Reperfusion zur nahezu vollständigen Normalisierung der Inotropie, des Herzminutenvolumens und des Sauerstoffverbrauchs führte sowie die Adenylat-

Degradation verminderte (Bunger et al. 1989). In weiteren Versuchsreihen konnten ebenso neuroprotektive Effekte des Pyruvats gezeigt werden. Die Zugabe von Pyruvat bei Ratten mit einer Ischämie des Lobus frontalis zeigte eine signifikante Reduktion der Mortalität und Verbesserung der neuronalen Zellfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lee et al. 2001). Darüber hinaus wurde Pyruvat auch zur möglichen Behandlung des hämorrhagischen Schocks eingesetzt. Auch hier zeigte sich eine deutlich verbesserte Überlebensrate bei der Behandlung septischer Mäuse mit einer Natriumpyruvatlösung als bei der Zugabe von einer Natriumchloridlösung (Slovin et al. 2001). Eine verbesserte Überlebensrate war auch nach Induktion eines hämorrhagischen Schocks in Schweinen feststellbar, ebenso eine deutliche Verbesserung des cerebralen Stoffwechsels (Mongan et al. 1999, Mongan et al. 2001). Die Behandlung mit Pyruvat verringerte außerdem in einem Rattenmodell die Bildung von freien Radikalen im Dünndarm drastisch und trug zur Erhaltung der mikroskopischen Darmstruktur bei (Cicalese et al. 1996). Daneben führte die Gabe von Pyruvat zur Verbesserung einer durch Ischämie und Reperfusion verursachten hepatischen Schädigung (Sileri et al. 2001). Weiterhin wurde auch ein positiver Effekt nach Behandlung mit Pyruvat bei der Bildung der Katarakt durch Diabetes mellitus oder Galaktoseinfusion festgestellt (Zhao et al. 2000, Gupta et al. 2002). Die Schädigung der Linse durch oxidativen Stress konnte nach Zugabe von Pyruvat ebenfalls deutlich gesenkt werden (Varma et al. 1998, Varma et al. 2006).

1.2.3 Probleme in der Anwendung von Pyruvat

Trotz dieser überzeugenden Erkenntnisse bezüglich des Einsatzes von Pyruvat in ROS-vermittelten Krankheitsmodellen blieb seine klinische Anwendung als therapeutisches Agens aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften beschränkt (Fink 2007a).

Pyruvat weist in wässriger Lösung nur eine niedrige Stabilität auf, umgehend unterzieht es sich einer Aldol-ähnlichen Kondensationsreaktion zu 2-Hydroxy-2-Methyl-4-Ketoglutarat, auch bekannt als Parapyruvat. Dieses zusätzliche Reaktionsprodukt ist in der Lage, die Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-Coenzym-A, einer Hauptreaktion im Citratzyklus, zu hemmen (Montgomery und Webb 1956, Montgomery et al. 1956, Willems et al. 1978). Weiterhin erfolgt in wässriger Lösung eine spontane Hydratation des Pyruvats zu Pyruvathydrat. Dabei sind im Gegensatz zu Pyruvat weder Parapyruvat noch Pyruvathydrat in der Lage, als Radikalfänger zu agieren (Fink 2007a).

1.2.4 Anti-inflammatorische Eigenschaften von Ethylpyruvat

Um die durch die Instabilität von Pyruvat in wässriger Lösung auftretenden Probleme zu umgehen, aber gleichzeitig dessen anti-inflammatorische Eigenschaften zu nutzen, rückte in weiteren Versuchsreihen ein Ester des Pyruvats, EP, in den Fokus des Interesses.

Hierfür verwendete man in ersten Studien eine modifizierte Ringer-Lösung, bestehend aus 130 mM Natrium, 4 mM Kalium, 2,7 mM Calcium, 130 mM Chlorid und 28 mM EP. Diese Ringer-Ethylpyruvat-Lösung (REPS) wurde Ratten gegeben, in denen die Induktion einer 60-minütigen mesenterialen Ischämie und eine anschließende 60-minütige Reperfusion erfolgte. Sowohl die Behandlung mit EP als auch mit Pyruvat verringerte die Entwicklung einer Hyperpermeabilität der Mukosa während der Reperfusion. Ebenso konnte der strukturelle Schaden an der Mukosa minimiert werden. Interessanterweise war die Behandlung mit EP effektiver als die Behandlung mit äquimolaren Dosen Pyruvat (Sims et al. 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten weiterhin, dass EP als „Prodrug“ für Pyruvat dienen könnte und dass der Ester differenzierte pharmakologische Eigenschaften im Vergleich zu Pyruvat besitzt. Nachfolgende Publikationen bestätigten diese protektive Wirkung von EP und ermittelten einen konzentrationsabhängigen Effekt im Bereich zwischen 17 und 150 mg/kg Körpergewicht (KG). Die Behandlung mit mindestens 50 mg/kg KG EP verbesserte in Mäusen die durch Ischämie und Reperfusion erzeugte mikrovaskuläre Hypoperfusion sowie die Entstehung von Mukosaschäden des Darms (Uchiyama et al. 2003).

In weiteren Versuchsmodellen wurden mögliche anti-inflammatorische Effekte von EP untersucht. Yang et al. verglichen an einem Mausmodell des hämorrhagischen Schocks die Wirkung von REPS gegenüber Ringer-Laktat-Lösung (RLS). Die Behandlungsgruppe, die zur Reanimation REPS erhalten hatte, zeigte eine signifikant höhere Überlebensrate nach 24 Stunden, ebenso wurde eine verminderte bakterielle Translokation zu den mesenterialen Lymphknoten festgestellt. Weiterhin verringerte sich die schockinduzierte Mukosapermeabilität bereits nach vier Stunden, ebenso reduzierte sich die Konzentration der zirkulierenden Alanin-Aminotransferase deutlich. Außerdem konnte bei der Behandlung mit REPS anstelle der RLS eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und eine geringere Expression von TNF- α , COX-2 (EC 1.14.99.1), IL-6 sowie der NO-Synthase in Leber, Ileum und Colon festgestellt werden (Yang et al. 2002). Es ist bekannt, dass ROS die Aktivierung oder Modulierung von verschiedenen bedeutenden intrazellulären Signalwegen wie dem NF- κ B beeinflussen

können (Thannickal und Fanburg 2000). Die Aktivierung von NF- κ B ist bei der Expressionsregulation verschiedener am Inflammationsprozess beteiligter Gene von zentraler Bedeutung. Somit konnten Yang et al. erstmals durch die Hemmung von NF- κ B sowie verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine nachweisen, dass EP ein anti-inflammatorisches Agens darstellt.

Diese Ergebnisse konnten in weiteren Arbeiten verifiziert werden, ferner führte die Gabe von EP bei der myokardialen Ischämie in Ratten zur verbesserten Organfunktion sowie verminderter Infarktgröße, reduziertem oxidativen Stress und erhöhten ATP-Konzentrationen (Tawadrous et al. 2002, Woo et al. 2004, Taylor et al. 2005).

Da ROS auch in der Pathogenese des LPS-induziertem Schock eine wichtige Rolle spielen, erfolgte die Analyse der Wirkung von EP in Form von REPS an Ratten in einem Modell der arteriellen Hypotension, induziert durch Injektion von LPS aus *Escherichia coli*. Nach Abfall des arteriellen Mitteldrucks auf 60 mmHg führte die Infusion von REPS im Vergleich zur Gabe von RLS zur signifikanten Verbesserung der Überlebenszeit. Weiterhin resultierte die Behandlung mit EP in signifikant niedrigeren Plasmakonzentrationen von Nitrit/Nitrat (Marker der Stickoxidsynthese), IL-6 und höheren Konzentrationen von IL-10. Daraus ist zu erkennen, dass die Behandlung mit REPS die LPS-vermittelte Immunantwort in Richtung verstärkte Produktion anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10) und weg von der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6) lenkt (Venkataraman et al. 2002). Dagegen konnte in dieser Arbeit kein Unterschied zwischen REPS und RLS im Hinblick auf die Expression von TNF- α festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist die unmittelbare Freisetzung dieses Zytokins nach LPS-Infusion in einem monophasischem Peak, der nach einer Stunde eindeutig zu erkennen ist. Da die Zugabe von REPS und RLS aber frühestens nach 15 Minuten erfolgte, wurde die Initiierung der TNF- α -Freisetzung bereits gestartet (Venkataraman et al. 2002). Kritisch anzumerken bleibt das Design dieser Studie, es wurde zwar REPS und RLS verglichen, aber die Überlebenszeit und Freisetzung der Zytokine in einer unbehandelten Kontrollgruppe hätte eine bessere Aussage zum Einfluss von EP auf TNF- α zugelassen.

Zur weiteren Analyse dieser Ergebnisse wurde der Einfluss von EP auf LPS-induzierte, systemische Inflammationsprozesse untersucht. Diese werden durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 und high mobility group B-1 (HMGB1) vermittelt, die von Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und weiteren Immunzellen produziert werden. Dabei korreliert die Stärke und Dauer der systemischen Entzündungsreaktion mit der Entwicklung von Gewebeschäden, Hypotension, multiplen

Organversagen und Letalität. Ein Hauptproblem bei der Entwicklung therapeutischer Medikamente, die die Ausschüttung bzw. Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine hemmen, ist die frühe Freisetzung von z.B. TNF- α und IL-1 β im systemischen Entzündungsprozess, wodurch nur ein schmales therapeutisches Fenster zu Verfügung steht. Glücklicherweise konnte HMGB1, ein intrazelluläres DNA-Bindungsprotein, als Spätmediator der Sepsis bzw. systemischen Entzündungsreaktion identifiziert werden, welches 12 bis 18 Stunden nach Endotoxinstimulation freigesetzt wird (Tracey et al. 1986, Wang et al. 1999). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde der Einfluss von EP nach LPS-Stimulation *in vitro* und *in vivo* untersucht. In RAW 264.7 Maus-Makrophagen führte die Behandlung mit EP nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden zur Hemmung der TNF- α -Freisetzung sowie der TNF- α -mRNA. Weiterhin blockierte EP die DNA-Bindung von NF- κ B und reduzierte die Phosphorylierung der p38 mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK). Zusätzlich verminderte sich auch die Freisetzung von HMGB1 nach LPS-Stimulation aus den Maus-Makrophagen. Weiterhin wurden Mäuse 30 Minuten vor der Injektion von LPS mit EP vorbehandelt, auch hier konnte die Letalitätsrate signifikant gesenkt werden. Ebenso verringerte sich nach Zugabe von EP die Konzentration von zirkulierendem TNF- α sowie von HMGB1. Auch bei der Behandlung mit EP vier bis dreißig Stunden nach der LPS-Stimulation wurde eine Verbesserung der Überlebensrate sowie reduzierte Konzentrationen von HMGB1 festgestellt (Ulloa et al. 2002). Allerdings sind Modelle der akuten Endotoxämie an Nagern nicht ohne Weiteres auf den humanen Patienten zu übertragen. Mäuse und Ratten sind im Vergleich zu Menschen weitaus weniger sensitiv bezüglich der pro-inflammatorischen und letalen Wirkung des LPS (Fink und Heard 1990). Daher untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe die therapeutischen Effekte von EP an einem etablierten und vielfach evaluierten Modell der schweren Sepsis, der zökalen Ligation und Perforation (Wichmann et al. 1996). Auch hier erzielte man bei der Behandlung mit EP 24 Stunden nach CLP-induzierter Peritonitis eine deutlich höhere Überlebensrate als in der Kontrollgruppe (Ulloa et al. 2002).

Aufgrund der positiven Ergebnisse beim Einsatz von EP in verschiedenen Tiermodellen der Sepsis untersuchten Wissenschaftler mögliche nützliche Eigenschaften des EP bei einer der häufigsten Komplikationen der Sepsis, dem akuten Nierenversagen (Klenzak und Himmelfarb 2005). Dabei war es in der Vergangenheit oft schwierig, neue Therapien gegen Sepsis-induziertes akutes Nierenversagen aufgrund eines fehlenden etablierten Tiermodells zu entwickeln (Fink 2007a). Im Jahr 2003 wurde allerdings beobachtet, dass gealterte Mäuse mit CLP-induzierter Sepsis Zustände entwickeln, die klinisch und

pathologisch mit einem akuten Nierenversagen beim Menschen vergleichbar sind (Miyaji et al. 2003). Diese Arbeitsgruppe konnte auch nachweisen, dass EP multiple Organschäden in Niere (Anstieg von Serumkreatinin und tubuläre Schäden), Muskeln und Pankreas nach CLP-vermittelter Sepsis reduziert. Dieser protektive Effekt konnte selbst nachgewiesen werden, wenn die Behandlung mit EP erst 12 Stunden nach der chirurgischen Intervention erfolgte. Ferner führte die Therapie mit EP in der Niere zur verminderten Expression von TNF- α , Tissue factor und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), welche mitverantwortlich für die Entstehung des akuten Nierenversagens in der Sepsis sind (Miyaji et al. 2003).

Nachdem in verschiedenen Mausmodellen erfolgreich ein protektiver Effekt von EP in septischen Zuständen und deren Komplikationen nachgewiesen werden konnte, erfolgten erste Experimente an Schweinen. Im Gegensatz zu Nagetieren reagieren Schweine, ähnlich dem Menschen, sehr sensitiv in Hinblick auf den pro-inflammatorischen Effekt des LPS. Nach Infusion von LPS entwickeln diese ein hyperdynamisches hypotensives kardiovaskuläres Profil, das stark an septische Patienten erinnert. Daher wurde der Einfluss von EP auf die systemische, pulmonale und auf die Hämodynamik von Leber und Splanchnikus an anästhesierten, beatmeten Schweinen 12 Stunden nach kontinuierlicher LPS-Infusion untersucht. Bei den mit EP behandelten Tieren war der arterielle Mitteldruck konstant, weiterhin erhöhte die Zugabe von EP nach 24 Stunden das Verhältnis von arteriellem Sauerstoffpartialdruck zum Sauerstoffanteil der Inspirationsluft ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, Horovitz-Quotient) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dabei ist der Horovitz-Quotient ein Maß für den Grad der Lungenschädigung, höhere Werte beschreiben eine bessere Lungenfunktion. Außerdem verstärkte die Gabe von EP die Diurese in den letzten sechs Stunden des Studienprotokolls. Ebenso wurde das Auftreten der LPS-induzierten metabolischen Azidose sowie die Lipidperoxidation und Produktion von Stickstoffmonoxid reduziert. (Hauser et al. 2005). Ferner konnte eine protektive Wirkung von EP beim septischen Schock in Schafen festgestellt werden. In 14 Schafen wurde durch die intraperitoneale Injektion von Fäzes eine schwere Peritonitis mit septischem Schock erzeugt. Im Vergleich zur isolierten Infusion von RLS konnte die Kombination von EP und RLS die Entwicklung der Tachykardie, der arteriellen Hypotension und der Oligurie vermindern und die Überlebenszeit verlängern (Su et al. 2007). Ebenso verbesserte die Gabe von EP die Gewebe-Oxygenierung von Hunden mit septischem Schock (Kou und Guan 2008). Zusammenfassend konnte also auch an großen Tiermodellen nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit EP bei schwerer Sepsis die

Konsequenzen der systemischen Entzündungsreaktion verhindern oder zumindest verringern kann.

In weiteren Arbeiten wurde der Einfluss von EP auf das Gerinnungssystem untersucht. Es konnte an monozytären THP-1-Zellen gezeigt werden, dass die Behandlung mit EP in Konzentrationen bis 10 mM die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder dem Makrophagen-Inflammasom-Protein (MIP) I- α und MIP-I β sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nach LPS-Stimulation hemmt. Ebenso wurde beobachtet, dass EP die LPS-induzierte Expression des Thromboplastins, welches die Gerinnungskaskade aktiviert, verringert (van Zoelen et al. 2006). Diese Ergebnisse untermauern den möglichen Nutzen von EP in der künftigen Behandlung septischer Patienten. Ebenso konnte EP in Ratten mit schwerer Pankreatitis die Freisetzung von HMGB1, TNF- α , IL-1 β und IL-6 vermindern und sowohl die Organfunktion als auch die Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe verbessern (Cheng et al. 2007). Vergleichbare Resultate wurden auch bei einem Modell der nekrotisierenden Pankreatitis an Mäusen erzielt. Zusätzlich konnten die Konzentration von Alanin-Aminotransferase und die bakterielle Translokation zu den mesenterialen Lymphknoten vermindert werden (Yang et al. 2004a). Weiterhin verringerte EP in Mäusen alkoholinduzierte Leberschäden wie Fetteinlagerungen, Nekrosen, Lipidoxidation und reduzierte die Plasmakonzentrationen der Alanin-Aminotransferase signifikant. Vergleichbare protektive Effekte durch die Behandlung mit EP konnten auch bei der Induktion von Leberschäden durch die Ligatur des Gallenganges oder durch hepatische Ischämie erzielt werden (Yang et al. 2004b, Tsung et al. 2005). Ferner konnte die Behandlung mit EP positive Effekte bei der Induktion von Verbrennungsverletzungen an Ratten aufzeigen. Bei den mit EP behandelten Ratten wurden signifikant weniger akutes Lungenversagen, multiples Organversagen sowie bakterielle Translokation zu den Lymphknoten festgestellt (Wang et al. 2006, Karabeyoglu et al. 2007, Karabeyoglu et al. 2008). Ebenso wurde durch die Behandlung mit EP die Proliferation von T-Lymphozyten erhöht und die Apoptoserate gesenkt (Dong et al. 2005a, Dong et al. 2005b). Weiterhin wirkte die Gabe von EP protektiv bei Intoxikationen mit Paraquat, Alkohol und bei Bestrahlung (Fedeli et al. 2007, Epperly et al. 2007, Lee et al. 2008).

1.2.5 Unterschiede zwischen Pyruvat und Ethylpyruvat

Nach der bereits beschriebenen Instabilität von Pyruvat in Lösung wurde EP als eine weitaus stabilere Substanz evaluiert (Sims et al. 2001). Dennoch wurden in zahlreichen Arbeiten z.T. grundverschiedene pharmakologische Eigenschaften der Pyruvatester wie EP im Vergleich zu Pyruvat dargestellt. Erstmals wurde der Vergleich zwischen EP und Pyruvat in der bereits beschriebenen Arbeit am Modell der mesenterialen Ischämie und Reperfusion verdeutlicht. Die Wissenschaftler erkannten, dass bei der Behandlung mit EP die histologische Struktur des untersuchten Darmabschnitts bedeutend weniger Schaden aufweist als bei der Behandlung mit Pyruvat (Sims et al. 2001).

Die unterschiedlichen Effekte von Pyruvat und EP untersuchten Sappington et al. tiefgründiger. In dieser Arbeit wurden Caco-2 Zellen, transformierte Kolonkarzinom-Zellen mit Eigenschaften von humanen intestinalen Epithelzellen, mit „Cytomix“ (einer Mischung aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α) stimuliert, um die epitheliale Permeabilität zu steigern. Dieser Prozess, der mit einer Störung der intestinalen Barriere vergleichbar ist, wird durch die zytokinvermittelte Aktivierung der NO-Synthase und damit der Freisetzung von Stickstoffmonoxid realisiert (Chavez et al. 1999). Es zeigte sich, dass die Inkubation von „Cytomix“ und EP die Entstehung der Hyperpermeabilität und damit der Barrierestörung des Darms unterbinden kann. Im Gegensatz dazu konnte die Zugabe einer Natriumpyruvatlösung zum „Cytomix“ diesen Effekt nicht auslösen. Ferner verdeutlichte auch diese Arbeit, dass EP die Aktivierung von NF- κ B verringert sowie die Expression der induzierbaren NO-Synthase reduziert. Ebenso verhinderte EP die durch den „Cytomix“ ausgelöste Alternation der „tight-junction“-Proteine ZO-1 und Occludin (Sappington et al. 2003b).

In einer weiteren Publikation wurden die Effekte von Pyruvat und EP auf oxidativen Schaden an der Linse untersucht. Auch hier konnte EP stärker vor oxidativem Stress schützen als Pyruvat (Varma et al. 1998). Außerdem konnte EP die Bildung der Katarakt verhindern (Devamanoharan et al. 1999).

Weitere überzeugende Daten bezüglich der unterschiedlichen pharmakologischen Effekte von Pyruvat und EP wurden an einem Modell der transienten Vorderhirnischämie in Mäusen ermittelt. Die intraperitoneale Gabe von Pyruvat eine Stunde nach 12-minütiger Ischämie konnte dabei die neuronale Zellschädigung drastisch verringern. Zusätzlich reduzierte sich die Mortalität in der mit Pyruvat behandelten Kohorte deutlich. Dieser neuroprotektive Effekt war sogar noch 30 Tage nach dem Insult beobachtet worden (Lee et

al. 2001). Ähnliche Ergebnisse konnten auch an einem Rattenmodell des zerebralen Infarktes beobachtet werden. Hierzu wurde, ähnlich dem Schlaganfall beim Menschen, die Arteria cerebri media verschlossen. 30 Minuten nach dem arteriellen Verschluss erfolgte die Injektion verschiedener Dosen der Natriumpyruvatlösung (250, 500 und 1000 mg/kg KG). Nach 24 Stunden sind bei Pyruvat-Dosierungen bis 500 mg/kg KG eine mäßig reduzierte Mortalität und geringere neurologische Defizite festgestellt worden, aber keine Reduktion des Infarktvolumens. Dagegen resultierten Pyruvatkonzentrationen von 1000 mg/kg KG weder in einer Reduktion der Mortalität noch der neurologischen Defizite. Verglichen mit der Kontrollgruppe wurde dabei das Infarktvolumen sogar signifikant vergrößert (Gonzalez-Falcon et al. 2003).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die intraperitoneale Behandlung mit EP vor oder nach einem 60-minütigem Verschluss der Arteria cerebri media die Infarktgröße erheblich reduziert. Ebenso wurden die mit dem Schlaganfall assoziierten klinischen Manifestationen wie motorische und neurologische Defizite, verstärkte Aktivierung der Mikroglia und erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen minimiert. Diese Effekte konnten bei der Gabe von EP 30 Minuten vor bis zu 24 Stunden nach dem Gefäßverschluss beobachtet werden (Yu et al. 2005). In einer weiteren Arbeit am gleichen Rattenmodell wurde festgestellt, dass Pyruvat zwar auch das Infarktvolumen reduziert, allerdings nur 30 Minuten vor bis 30 Minuten nach Ischämie. Dagegen konnte bereits vier Stunden nach Reperfusion kein Effekt von Pyruvat auf das Infarktvolumen ermittelt werden. Weiterhin konnte EP im Gegensatz zu Pyruvat die LPS-induzierte NO-Produktion der Mikrogliazellen inhibieren (Kim et al. 2005). Zusammenfassend hat die Zugabe einer Natriumpyruvatlösung nur einen geringen Effekt auf die Reduktion des Infarktvolumens in einem sehr begrenzten zeitlichen Intervall. Dagegen zeigt auch eine verzögerte Gabe von EP eine signifikante Reduktion der Infarktgröße und der neurologischen Ausfälle. Die neuroprotektiven Effekte von EP konnten auch in weiteren Arbeiten verdeutlicht werden (Wang et al. 2005, Cho et al. 2006).

Darüber hinaus wurde auch in biochemischen Prozessen, die unabhängig von oxidativen Stress und Entzündungsreaktionen sind, versucht, die unterschiedlichen pharmakologischen Effekte von Pyruvat und den Pyruvatestern nachzuweisen. So ist beispielsweise Methylpyruvat in der Lage, in Inselzellen des Pankreas die Sekretion von Insulin anzuregen, Pyruvat dagegen nicht (Mertz et al. 1996, Zawalich und Zawalich 1997).

1.2.6 Die biochemische Grundlage für die anti-inflammatorischen Effekte von Ethylpyruvat

NF- κ B wurde ursprünglich als ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der in die Aktivierung von κ -Leichtkettengen in B-Lymphozyten involviert ist (Sen und Baltimore 1986). Ergänzend ist dieser Faktor an der Regulierung der Transkription von über 200 Genen beteiligt. Einige von diesen, wie z.B. TNF- α , IL-6, IL-8, COX-2 und der induzierbaren NO-Synthase sind in die Entzündungsreaktion involviert. Weiterhin beschreibt NF- κ B eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch Hetero- oder Homodimerisation aus Proteinen der Rel-Familie (p50, p65, c-Rel, p52 und RelB) gebildet werden. In ruhenden Zellen befinden sich die verschiedenen Formen des NF- κ B im Zytoplasma in ihrer inaktiven Form, da sie durch ein inhibitorisches Protein, I κ B, gebunden werden. Nach Stimulation der Zelle durch einen pro-inflammatorischen Mediator wie TNF- α oder auch LPS wird I κ B an zwei Serinresten phosphoryliert. Dadurch kommt es zur Ubiquitinylierung und zur Degradation in den Proteasomen. Infolgedessen kann NF- κ B in den Nucleus überführt werden und an die Promotorregionen verschiedener Gene binden (Siebenlist et al. 1994).

Verschiedene, z.T. bereits erwähnte Arbeiten zeigten, dass EP die Aktivierung von NF- κ B hemmt (Yang et al. 2002, Ulloa et al. 2002, Sappington et al. 2003b, Yang et al. 2003, Uchiyama et al. 2003, Yang et al. 2004a, Song et al. 2004, Kim et al. 2005, Wang et al. 2005). Möglicherweise ist die Grundlage dieser Hemmung die Eigenschaft des Pyruvats als Radikalfänger, denn EP ist wie Pyruvat ein Antioxidans (Varma et al. 1998, Tawadrous et al. 2002, Song et al. 2004) und oxidativer Stress ist eine Möglichkeit zur Aktivierung der Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen (Haddad 2002). Diese sehr einfache Erklärung wird aber durch verschiedene Beobachtungen in Frage gestellt. So wurde festgestellt, dass oxidativer Stress in Form von Wasserstoffperoxid NF- κ B in Caco-2-Zellen nicht aktivieren kann (Parikh et al. 2000), hingegen ist EP in der Lage, die Aktivierung von NF- κ B durch den bereits beschriebenen „Cytomix“ zu blockieren (Sappington et al. 2003b). Weiterhin konnten andere etablierte Radikalfänger wie Pyrollidin-Dithiocarbamat oder Dimethylsulfoxid die IL-1 β -induzierte Aktivierung von NF- κ B in Caco-2-Zellen nicht verhindern (Parikh et al. 2000), während EP in der gleichen Zelllinie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch den „Cytomix“ unterbinden konnte (Sappington et al. 2003b). Ferner war ein weiterer Radikalfänger, N-Acetylcystein (NAC), ebenfalls nicht in der Lage, die IL-1 β -vermittelte Aktivierung von NF- κ B in

ECV304-Endothelzellen zu inhibieren (Bowie et al. 1997) und NAC verhinderte in J774.1 Maus-Makrophagen die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung nicht (Chandel et al. 2000). Im Vergleich dazu blockierte EP die Aktivierung von NF- κ B, hervorgerufen durch „Cytomix“ in Caco-2-Zellen (Sappington et al. 2003b) und LPS in RAW 264.7-Zellen (Ulloa et al. 2002). Ferner wurden in einer Arbeit direkt EP und N-Acetylcystein auf ihre anti-inflammatorischen Eigenschaften verglichen, wobei EP die eindeutig effektivere Substanz darstellte (Song et al. 2004).

Eine weitere Versuchsreihe verfolgte den protektiven Effekt von EP auf Caco-2-Zellen nach „Cytomix“-Zugabe. Dabei verhinderte EP die bereits beschriebene „Cytomix“-induzierte Hyperpermeabilität, sogar wenn die Zellen mit EP mehrere Stunden vor Zugabe des „Zytokincocktails“ inkubiert und anschließend mehrmals gewaschen wurden (Sappington et al. 2003a).

Folglich sind genannte Ausführungen inkongruent mit der Theorie, dass die anti-inflammatorischen Effekte von EP nur auf dessen Fähigkeit als Radikalfänger und endogenes Antioxidans beruhen. Auch der Erklärungsversuch, EP als ein „Prodrug“ für Pyruvat zu betrachten, liefert keine ausreichende Begründung für die z.T. stark differenten pharmakologischen Eigenschaften der beiden Stoffe.

1.2.7 Der klinische Einsatz von Ethylpyruvat

Obwohl in einer Vielzahl präklinischer Versuchsreihen die protektiven anti-inflammatorischen Eigenschaften von EP aufgezeigt wurden, konnten in drei Publikationen keine positiven Eigenschaften dieser Substanz nachgewiesen werden. Am Modell des hämorrhagischen bzw. septischen Schocks konnte die Gabe von EP in Form von REPS keine protektiven Effekte im Vergleich zu der Gabe von Ringer-Acetat hinsichtlich der hämodynamisch relevanten Parameter wie Nierenarterien- oder Portalvenendruck sowie der Entwicklung einer Azidose festgestellt werden (Mulier et al. 2005, Andersson et al. 2006). Ebenso wirkte sich die Gabe von EP in einer Studie negativ auf die Überlebensrate von mit LPS behandelten Mäusen aus (Su et al. 2008). Dennoch wurde von der Critical Therapeutics Inc. der erste klinische Einsatz von EP initiiert. In der Phase I wurde EP in Form von CTI-01 von den Probanden gut toleriert und zeigte in einer vielfach stärkeren Dosis als bei den präklinischen Versuchen keine Nebenwirkungen. Folglich wurde eine doppelblinde, randomisierte, plazebokontrollierte Studie mit CTI-01

bei Patienten mit Anlage eines intraoperativen kardiopulmonalen Bypasses durchgeführt. Allerdings zeigten sich keine Vorteile bei der Behandlung mit EP hinsichtlich der Entwicklung von Komplikationen wie Organschäden im Vergleich zur Placebogruppe und die Studie wurde vorzeitig abgebrochen (Fink 2007a).

1.2.8 Ziele der Arbeit

Zahlreiche Studien der letzten Jahre beschrieben ausführlich die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Pyruvat. Aufgrund der geringen Stabilität dieser Verbindung in wässriger Lösung rückte dessen Ester EP in den Fokus des Interesses. In einer Vielzahl von Arbeiten konnten anti-inflammatorische Eigenschaften von EP aufgezeigt werden. An verschiedenen Modellen der Sepsis, des hämorrhagischen Schocks, von Verbrennungsschäden, des Apoplex oder der Ischämie und Reperfusion wurde bei der Behandlung mit EP ein protektiver Effekt sowie eine verminderte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nachgewiesen. Dabei war die Wirkung von EP mitunter wesentlich stärker ausgeprägt als bei der Behandlung mit Pyruvat.

Als biochemische Grundlage für die anti-inflammatorischen und protektiven Eigenschaften von EP wurde die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B identifiziert, die spezifischen Regulationsmechanismen für die verminderte Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors konnten bisher allerdings nicht zufriedenstellend aufgeklärt werden. In dieser Arbeit soll als eine neue mögliche Erklärung für die anti-inflammatorischen Eigenschaften von EP und weiterer α -oxo-Karbonsäureester die Inhibierung der Glo-I aufgezeigt werden. Die Glo-I ist ein wichtiges ubiquitäres Enzym, das zusammen mit der Glo-II die Konversion von α -oxo-Aldehyden wie MGO unter der Verwendung von GSH als Kofaktor katalysiert. Anhand von *in vitro*-Experimenten zur Enzymaktivität wird die Hemmung der Glo-I durch EP aufgezeigt, während α -Hydroxy-Karbonsäureester wie EL keine inhibitorischen Eigenschaften aufweisen. Des Weiteren erfolgen Untersuchungen zur Einflussnahme von EP, EL und weiterer Laktatester auf die LPS-induzierte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α von humanen immunkompetenten Zellen und auf die Expression von Immunrezeptoren wie HLA-DR, CD14 und CD91, wodurch eine Verbindung zwischen den Glyoxalase-Enzymen und dem Immunsystem aufgezeigt wird. Anhand dieser und weiterer Ergebnisse zur Einflussnahme der Karbonsäureester auf die Zellvitalität wird das Glyoxalasesystem als mögliches Ziel

neuer Therapiekonzepte für die Immunsuppression präsentiert und dessen Bedeutung für die Entwicklung von Anti-Tumor-Agenzien konsolidiert.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
Annexin V-FITC	Immunotools, Marseille, Frankreich
Anti-HLA-DR-APC	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-CD14-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-Maus IgG1-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-CD91-FITC	BioMac, Leipzig
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Butyllaktat	Sigma-Aldrich, Steinheim
CBA Human Inflammation Kit 551811	BD Biosciences, San Jose, USA
Comassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Seelze
(D-)-Ethyllaktat	Sigma-Aldrich, Steinheim
(L-)-Ethyllaktat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA
Ficoll Paque	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Glutathion, reduziert	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Ferak, Berlin-West
Lipopolysaccharid (LPS) von E. coli Serotype 0111:B4	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylglyoxal 40%ige Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Agros, New Jersey, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid (PMSF)	Boehringer, Mannheim
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin	Linz, Österreich
RPMI 1640	Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA
Triton X 100	Merck, Darmstadt

Wasser, pyrogenfrei
Wasserstoffperoxid

Delta Select, Dreieich
Merck, Darmstadt

Alle anderen verwendeten Substanzen waren von analytischer Reinheit.

2.2 Verwendete Puffer

PBS:

8.4	mM	Dinatriumhydrogenphosphat
1.5	mM	Kaliumdihydrogenphosphat
137	mM	Natriumchlorid
2.7	mM	Kaliumchlorid

gelöst in H₂O, pH = 7.4

Zellysepuffer:

10	mM	HEPES
2	mM	Magnesiumchlorid
15	mM	Kaliumchlorid
0.1	mM	EDTA
1	mM	PMSF
1	mM	DTT
0.03	%	Proteaseinhibitor
0.1	%	Triton
1	%	Glycerol

gelöst in H₂O, pH = 7.8

Erythrozytenlysepuffer:

155	mM	Ammoniumchlorid
0.12	mM	EDTA
10	mM	Natriumhydrogenkarbonat

gelöst in H₂O, pH = 7.4

Fixationspuffer: PBS + 2 % Paraformaldehyd

<u>Annexin V-Bindungspuffer:</u>	10	mM	HEPES
	140	mM	Natriumchlorid
	2.5	mM	Calciumchlorid
			gelöst in H ₂ O, pH = 7.4

Alle Puffer wurden vor der Verwendung durch Autoklavieren sterilisiert.

2.3 Verwendete Geräte

Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Röhrchen 5ml Rundbodenröhrchen	BD Falcon, San Jose, USA
Heparinmonovetten	Saarstedt, Nümbrecht
Mikroskop ID 03	Carl-Zeiss, Jena
Mikroskop DM IRBE	Leica, Solms
Photometer Specord 205	Analytik Jena, Jena
Sterilbox Antares	Steril, Mailand, Italien
Zentrifuge 3K12	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zentrifuge Rotina 46R	Hettich, Tuttlingen

2.4 Zellkultur

Für die verwendeten THP-1-Zellen (humane monozytäre Leukämie Zelllinie, European Collection of Cell Cultures ECCCL 88081201) wurde RPMI-1640-Kulturmedium mit 10 % FKS (fetales Kälberserum) verwendet. Die Inkubation bzw. Kultivierung der Zellen erfolgte in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid versetzten wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Das Kulturmedium wurde ca. alle drei Tage erneuert. Zum Passagieren der nichtadhärenten Zellen erfolgte die Überführung in ein 50 ml-Tube und anschließend wurden die THP-1-Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Die Abheberung des Überstandes erfolgte nach der Zentrifugation bei 200 x g fünf Minuten bei 20 °C und anschließend die Resuspension der

Zellen in frisches Kulturmedium. Nachfolgend wurden die resuspendierten Zellen in einem bestimmten Verhältnis gesplittet und in neuen Kulturflaschen in einem Volumen von 10 ml Medium ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer am Lichtmikroskop. Bei Anwesenheit von EP in den Versuchsansätzen wurden dem Medium immer 10 mM HEPES hinzugegeben, um den pH-Wert konstant zu halten.

2.5 Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen aus humanem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Blutentnahme erfolgte an mehreren freiwilligen Spendern in Heparinmonovetten. Die Monovetten wurden anschließend fünf Minuten bei 200 x g und 20 °C zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde verworfen und die verbliebenen zellulären Bestandteile im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Danach wurden in einem 50 ml- bzw. 15 ml-Tube (je nach Blutvolumen) 0.75 ml auf Raumtemperatur erwärmtes Ficoll Paque je ml Blutgemisch vorgelegt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Überschichtung des Ficoll mit dem verdünnten Blut, wobei das Tube in 45°-Schräglage gehalten wurde, um eine Aufwirbelung zu verhindern. Darauffolgend wurden die Proben 30 Minuten bei 200 x g und 20 °C zentrifugiert. Dabei wurde die Bremsfunktion der Zentrifuge ausgeschaltet, um ein zu ruckartiges Abstoppen und Aufwirbelung der nach der Dichte getrennten Schichten zu verhindern.

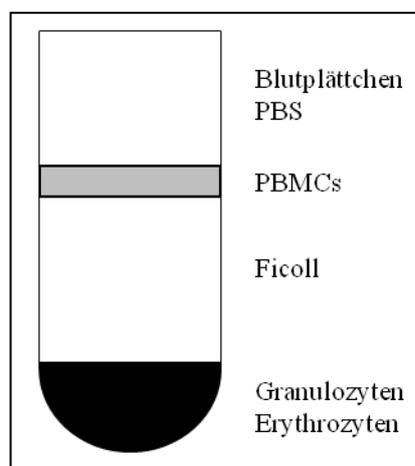


Abbildung 4: Trennung der Blutbestandteile nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.

Nach diesem Verfahren entsteht eine braunefärbte Zone, in der sich die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) befinden. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde dieser „Ring“ in ein neues Tube überführt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Danach standen die isolierten PBMCs für Versuchsansätze zur Verfügung.

2.6 Lyse der Zellen zur Herstellung von zytosolischen Extrakten

Die Zellen wurden mit Lysepuffer im Verhältnis 1:4 gemischt und anschließend 15 Minuten bei 4 °C auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten die mikroskopische Kontrolle der Lyse und die Zentrifugation der Proben 15 Minuten bei 13000 x g und 4 °C.

2.7 Bestimmung der Glyoxalaseaktivität

Die Aktivität der Glo-I wurde durch die Bestimmung der Bildung von S-D-Lactoylglutathion ermittelt. Die Bildung dieses Intermediates korreliert dabei mit der steigenden Absorption bei 240 nm. Die Messung erfolgte nach der Methode von Mannervik et al. (Mannervik et al. 1982).

Vor jeder Messung erfolgte die Eichung des Analytic Jena Specord 250-Photometers gegen den Leerwert. Um den Einfluss von EP und EL auf die Aktivität der Glo-I zu ermitteln, wurden verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen mit 2 mM GSH vier Minuten vorinkubiert. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 2 mM MGO und 70 mU Glo-I in einer 1 ml-Küvette.

Das Enzym Glo-I stammte aus Vorversuchen, in denen in unserer Arbeitsgruppe das Enzym aus humanen Erythrozyten nach der Methode von Allen et al. gewonnen wurde (Allen et al. 1993a, Allen et al. 1993b).

2.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glo-I erfolgte die Quantifizierung der Proteinkonzentration in den zytosolischen Extrakten mit der Methode nach Bradford von

1976. Diese basiert auf einer Reaktion der zu bestimmenden Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue. Die dabei entstehenden Komplexe weisen ein Absorptionsmaximum von 595 nm auf. Parallel zur Messung der Proben wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (RSA) erstellt, mit der die Proteinkonzentration der Extrakte bestimmt werden konnte.

Zur Ermittlung der Eichkurve wurden Standardmessungen mit 3, 6, 9, 12 und 15 µg RSA pro 100 µl Natriumphosphatpuffer durchgeführt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die jeweiligen zytosolischen Extrakte mit 50 mM Natriumphosphatpuffer verdünnt und von diesem Gemisch 100 µl in eine Küvette mit 2 ml Bradford-Lösung gegeben. Danach erfolgte die Inkubation der Proben fünf Minuten bei 20 °C und anschließend die photometrische Messung bei 595 nm gegen einen Leerwert von 100 µl H₂O und 2 ml Bradford-Lösung.

2.9 Durchflusszytometrische Analysen

2.9.1 Messprinzip

Zur Bestimmung der Zytokinfreisetzung und der Expression von ausgewählten Oberflächenmarkern sowie von Apoptose und Nekrose wurde die durchflusszytometrische oder FACS- (Fluorescent Activated Cell Sorting) Analyse verwendet. Mit Hilfe dieser Methode ist eine Charakterisierung von Einzelzellen oder Partikeln wie den „Beads“ in einer Suspension möglich. Durch die hydrodynamische Fokussierung wird der Flüssigkeitsstrom im Gerät so stark verengt, dass die Zellen sequenziell den Schnittpunkt zwischen dem Flüssigkeitsstrom und einem Argonlaser passieren müssen. Sobald eine Zelle auf den Laserstrahl trifft, kommt es zur Streuung des Lichtes. Dabei wird sowohl das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), welches der Zellgröße entspricht als auch das Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter, SSC), welches die Granularität beschreibt, von Detektoren erfasst. Mit Hilfe dieser Parameter lassen sich unterschiedliche Leukozytensubpopulationen analysieren (siehe Abbildung 6). Zusätzlich wird durch weitere Laser die Fluoreszenz von mit markierten Antikörpern beladenen Zellen bestimmt. Sofern eine Zelle eine Fluoreszenzmarkierung besitzt, kommt es zur Absorption von Lichtenergie in einem für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich. Die Elektronen werden somit kurzfristig auf ein höheres Energieniveau gehoben und geben beim Rückgang auf das Ausgangsniveau Energie in

Form von Licht höherer Wellenlänge ab. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Durch die Beladung von Zellen mit einem gegen z.B. ein Oberflächenantigen gerichteten Antikörper ist somit eine Aussage über die Expression dieser Strukturen möglich. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass das durch breite Emissionsspektren der Fluorochrome bedingte „Überstrahlen“ in den Bereich anderer Fluorochrome verhindert werden muss. Daher entschlossen wir uns bei der Bestimmung der Oberflächenmarker für den Einsatz von Fluoresceinisothiocyanat- (FITC), Phycoerythrin- (PE) und Allophycocyanin- (APC) konjugierten Antikörpern. Diese besitzen relativ gut abgrenzbare Emissionsspektren und erlauben eine einfache Kompensation der Fluoreszenzkanäle am Durchflusszytometer.

2.9.2 Durchflusszytometrische Bestimmung von pro-inflammatorischen Zytokinen

Zur Untersuchung der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen ist der Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammation Kit 551811 von Becton Dickinson eingesetzt worden. Das Prinzip dieser Analyse besteht darin, dass sechs „Bead“-Populationen mit verschiedener Fluoreszenzintensität mit spezifischen Antikörpern gegen IL-1 β , IL-6, IL-8, und TNF- α beschichtet wurden. Die „Capture-Beads“ werden zu den Proben gegeben und anschließend mit einem sekundären, mit PE-markiertem Antikörper inkubiert. Die entstehenden Komplexe können im FL3-Kanal des Durchflusszytometers unterschieden werden. Mit Hilfe des im CBA Kit enthaltenen Human Inflammation-Standards wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und so eine Eichkurve mit dem Durchflusszytometer erstellt. Anschließend ermittelt die spezielle BD CBA-Software die entsprechende Konzentration für jedes Zytokin.

Zur Ermittlung der Zytokinkonzentrationen wurde Heparin-Vollblut von mehreren freiwilligen Spendern gewonnen. Auf einer 24-Kavitäten-Platte wurden die benötigten Mengen an Kulturmedium RPMI-1640 vorgelegt. Danach erfolgte die Zugabe von 200 μ l Vollblut pro Kavität sowie die Zugabe von LPS und verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Substanzen zu den jeweiligen Kavitäten. Dabei betrug das Gesamtvolumen in allen Wells 1 ml. Das lyophilisierte LPS wurde als Stocklösung von 1 mg/ml hergestellt. Diese wurde vor Verwendung 30 Minuten auf dem Vortexer geschüttelt. Nach der Zugabe aller Substanzen in die Kulturplatte erfolgte die Inkubation im Brutschrank über sechs Stunden. Nach Abschluss der Inkubation wurde der Kulturüberstand in 1,5 ml

Eppendorfbecher pipettiert und zur weiteren Analyse verwendet. Von jeder „Capture-Bead“-Lösung wurden 10 µl je Probe gemischt und von diesem Gemisch 50 µl pro Probe in ein steriles FACS-Röhrchen zusammen mit 50 µl des jeweiligen Kulturüberstandes überführt. Nach Zugabe des sekundären Antikörpers in Form von 50 µl PE-Detektionslösung erfolgte die Inkubation drei Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Danach wurden die Proben mit 1 ml des im Kit enthaltenen Waschpuffer gewaschen und fünf Minuten bei 200 x g und 20 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl Waschpuffer resuspendiert. Zum Abschluss erfolgte die Messung der Proben im Durchflusszytometer, nachdem die Zytometer-Kalibrierung wie im Kit beschrieben durchgeführt wurde. Hierbei wurden 2000 „Beads“ je Probe gemessen, analysiert und mit Hilfe der Standarddeichkurve die Konzentration der Zytokine bestimmt. Die Messung und der Versuchsansatz wurden jeweils dreimal wiederholt und daraus die Standardabweichung ermittelt.

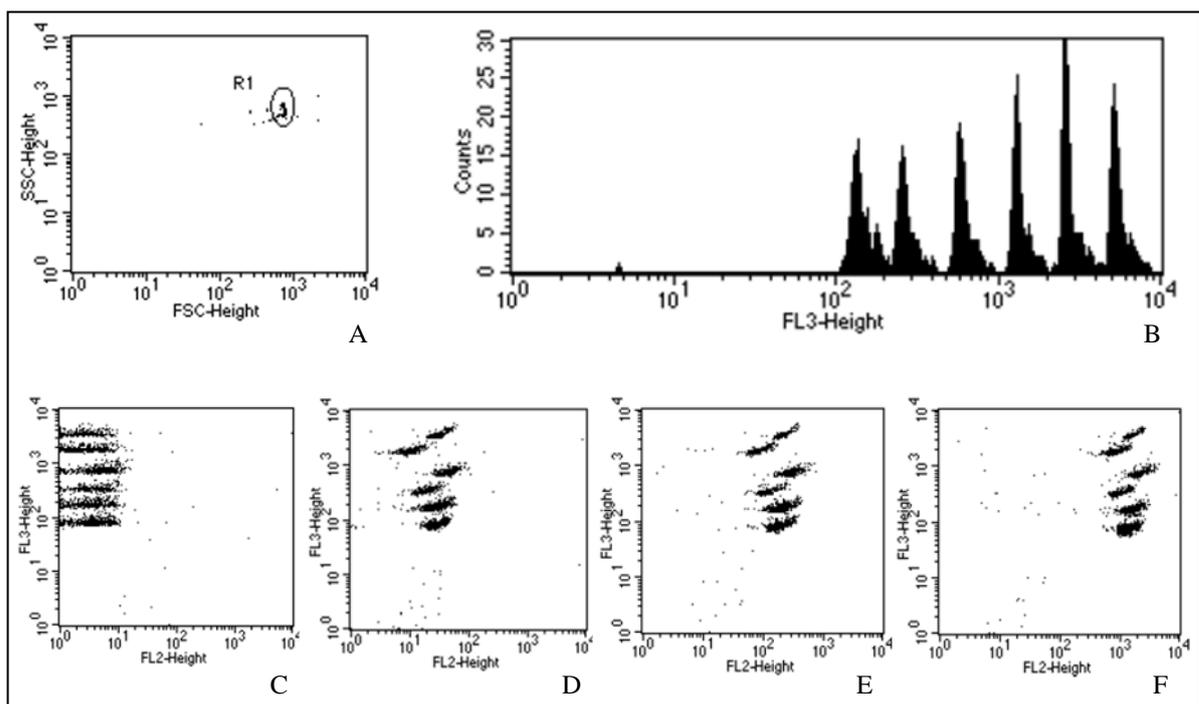


Abbildung 5: Beispiel der durchflusszytometrischen Messung der „Capture-Beads“. A) zeigt die Lage der „Bead“-Population im FSC/SSC-Plot und B) die Darstellung des FL3-Fluoreszenzkanals im Histogramm. C) zeigt die negative Kontrolle, D) die Standardkonzentration 80 pg/ml, E) 625 pg/ml und F) 5000 pg/ml.

2.9.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von HLA-DR, CD14 und CD91

Zur Ermittlung der Expression verschiedener Oberflächenmarker wurde Heparin-Vollblut von mehreren freiwilligen Spendern nach Desinfektion aus den Kubitalvenen mit handelsüblichen Kanülen in Heparinmonovetten gewonnen. Auf einer Kulturplatte wurden die benötigten Mengen an Kulturmedium RPMI-1640 vorgelegt. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Vollblut pro Kavität sowie die Zugabe von LPS und verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Substanzen zu den jeweiligen Kavitäten. Dabei betrug das Gesamtvolumen in allen Kavitäten 1 ml. Das lyophilisierte LPS wurde als Stocklösung von 1 mg/ml hergestellt. Diese wurde vor Verwendung 30 Minuten auf dem Vortexer geschüttelt. Nach der Zugabe aller Substanzen in die Kulturplatte erfolgte die Inkubation im Brutschrank über sechs Stunden. Anschließend wurde die Kulturplatte für 20 Minuten auf Eis gelegt und darauffolgend der gesamte Inhalt der Kavitäten unter Aufwirbelung in vorgekühlte FACS-Röhrchen überführt. Danach wurden die Kavitäten mit PBS nachgespült und dieses ebenfalls zu den FACS-Röhrchen gegeben. Daran anknüpfend erfolgte die Zentrifugation der Proben über fünf Minuten bei 200 x g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und die Proben zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden alle Proben in gleichen Volumina von 300 µl resuspendiert und von dieser Lösung jeweils 100 µl in neue FACS-Röhrchen überführt. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 5 µl Anti-HLA-DR-APC, Anti-CD14-PE und Anti-CD91-FITC bzw. der jeweiligen Isotypenkontrolle von Maus-IgG1 und die Inkubation der Proben über 30 Minuten bei 4°C im Dunklen. Danach wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen und bei 200 x g und 4 °C fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 2 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert, 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Abschließend erfolgte die Resuspendierung der Pellets in 250 µl Fixationspuffer und die Messung der Proben im Durchflusszytometer. Die Messung und Auswertung der Proben erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur mit Hilfe der Software Cellquest Pro. Die Messung aller Proben erfolgte bei identischen Geräteeinstellungen. Dabei wurden nach Optimierung von Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzintensität mit Hilfe von Negativ-, Positiv- und Isotypenkontrolle jeweils 50000 Zellen pro Probe gemessen.

Zur Auswertung der Proben wurde zunächst ein FSC/SSC-Dotplot erstellt (siehe Abbildung 6 A)). Wie bereits beim Messprinzip beschrieben, konnten somit anhand von Größe (FSC) und Granularität (SSC) die Leukozyten charakterisiert werden. Population R1 entspricht aufgrund der relativ hohen Zellgröße und mittelgroßen Granularität den Monozyten bzw. Makrophagen. Population R2 besitzt eine geringere Zellgröße und Granularität und charakterisiert daher die Lymphozyten. Die Kombination aus starker Granularität und Zellgröße beschreibt Population R3 als Granulozyten. Die Cellquest Pro-Software erlaubt das Setzen von Gates und Quadranten und die statistische Auswertung der Zellen in diesen. Diese Methode ermöglicht eine differenzierte Auswertung der einzelnen Zellpopulationen. Die drei Populationen wurden markiert und von den Zellen im jeweiligen Gate die Fluoreszenzintensität bestimmt (siehe Abbildung 6 B) und 6 C)). Die Festlegung der Quadranten erfolgte dabei anhand der Isotypenkontrolle und wurde bei jeder Messprobe beibehalten. Mit Hilfe der Statistik wurde dann für die Zellen in den Quadranten die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zwischen den Proben verglichen. Dabei wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität („Geo Mean Fluorescence intensity“) verwendet, da die Einteilung der Achsen in logarithmischen Einheiten erfolgte.

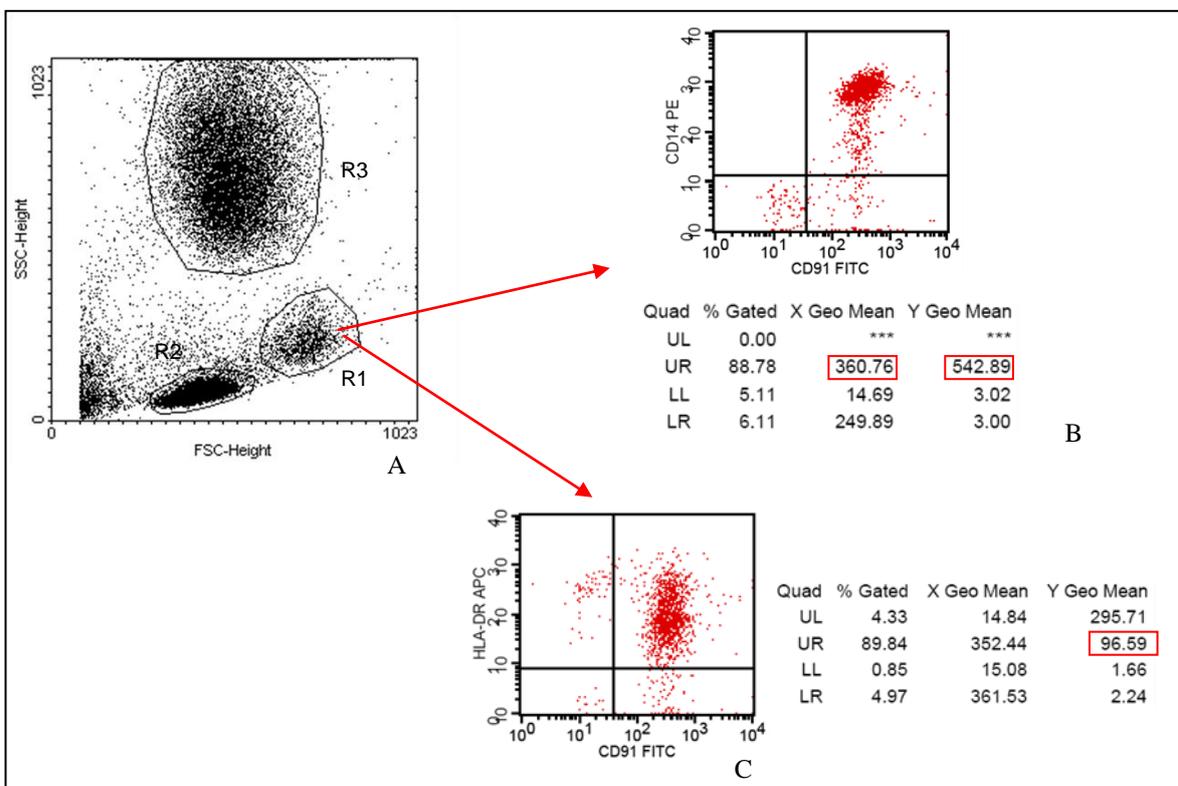


Abbildung 6: Beispiel der durchflusszytometrischen Bestimmung der Oberflächenmarker. A) zeigt den FSC/SSC-Scatterplot, B) und C) die Darstellung der jeweiligen Fluoreszenzen der in A) markierten Zellen. R1 beschreibt dabei die Monozyten, R2 die Lymphozyten und R3 die Granulozyten.

2.9.4 Durchflusszytometrische Bestimmung von Apoptose und Nekrose

Mit Hilfe der Zugabe von FITC-konjugierten Annexin V und Propidiumiodid (PI) zu einem Probenansatz kann der Prozentsatz vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt werden. Dabei werden die prinzipiellen Unterschiede in der Entstehung dieser beiden Formen des Zelltodes genutzt. Annexin V bindet an Phosphatidylserinketten, die sich bei vitalen Zellen nur auf der Innenseite der Zellmembran befinden. Da Annexin V die Zellmembran jedoch nicht permeieren kann, binden normale Zellen diese Substanz nicht. Während der Induktion der Apoptose erfolgt hingegen die Translokation der Phosphatidylserinketten von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite, wodurch die Anlagerung von Annexin V an die Zellmembran erfolgt. Durch die Verknüpfung von Annexin V mit einem FITC-Farbstoff zeigen die apoptotischen Zellen entsprechend ein positives Signal im FITC-Kanal. Im Vergleich dazu lagert sich PI an Fragmente der DNA an und fluoresziert im PE-Kanal. Die Membranen bei apoptotischen Zellen bleiben allerdings intakt und PI kann die Zellmembran ebenfalls nicht passieren. Daher erfolgt bei apoptotischen Zellen keine Bindung von PI. Beim Vorgang des nekrotischen Zelltodes wird die Zellmembran allerdings porös, wodurch PI diese permeieren und die DNA anfärben kann. Annexin V durchdringt in diesem Fall ebenso die Zellmembran und lagert sich nun an die Phosphatidylserinketten an der Innenseite der Membran an (Vermes et al. 1995, Span et al. 2002).

Daher stellen sich apoptotische Zellen bei der durchflusszytometrischen Analyse Annexin V-FITC-positiv und PI-negativ dar, während nekrotische Zellen ein positives Fluoreszenzsignal sowohl im FITC- als auch im PE-Kanal zeigen (siehe Abbildung 7). Nach dieser Erklärung dürfte es allerdings keine Annexin V-negativen und PI-positiven Zellen geben. Ein gewisser Prozentsatz dieser Zellen tritt aber bei jeder Messung auf, die Ursache hierfür ist nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Theorien postulieren, dass die Zellmembran möglicherweise erst für einen der beiden Farbstoffe durchlässig wird und später für den anderen, diese Zellen beschreiben aber auf jeden Fall auch den nekrotischen Anteil und wurden in diesen mit aufgeführt (Vermes et al. 1995).

Zur Ermittlung des apoptotischen bzw. nekrotischen Zellanteils wurden entweder THP-1-Zellen oder isolierte PBMCs, wie in 2.5. beschrieben, verwendet. Bei den PBMCs wurden im FSC/SSC Dotplot jeweils die Monozyten und Lymphozyten markiert und getrennt analysiert. THP-1 ist eine monozytäre Zelllinie, die sich von Tumorzellen der akuten myeloischen Leukämie ableitet. Unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer wurde die

Zellzahl der jeweiligen Suspension bestimmt und anschließend 200000 Zellen pro Kavität auf eine 24-Kavitäten-Platte ausgesät. Als Kulturmedium wurde für THP-1-Zellen RPMI-1640-Medium mit 1 % FKS verwendet. Für die Kultivierung der PBMCs wurde das bei der Ficoll-Isolation gewonnene Plasma im gleichen Verhältnis zum Medium hinzugegeben. Die Kulturplatten wurden 3, 12 oder 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde bei den PBMC-Versuchen die Kulturplatte auf Eis gelegt und der Inhalt der Kavitäten unter Aufwirbelung in FACS-Röhrchen überführt und die Kavitäten mit PBS nachgespült. Bei der Verwendung von THP-1-Zellen war dieses Vorgehen nicht notwendig, da es sich um eine nichtadhärente Zelllinie handelt. Danach erfolgte die Zentrifugation der Zellen bzw. PBMCs fünf Minuten bei 200 x g und 20 °C. Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abermals verworfen und die Zellpellets in 200 µl Annexin V-Bindungspuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 5 µl Annexin V-FITC und PI. Nach Schütteln auf dem Vortexer wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Abschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Annexin V-Bindungspuffer und die Messung am Durchflusszytometer. Mit Hilfe der Negativ- und Positivkontrollen wurden die Instrumenteneinstellungen der Laser und Kompensation der Fluoreszenzkanäle festgelegt. Diese Einstellungen wurden für alle Messungen eines Experimentes beibehalten. Es erfolgte die Messung von 50000 Zellen pro Probe. Sowohl die Messungen als auch der Versuchsansatz wurden dreimal wiederholt und aus diesen Werten die Standardabweichung bestimmt.

Zur Auswertung wurde zuerst ein FSC/SSC-Dotplot erstellt und die gewünschten Zellen markiert. Anschließend wurden mit Hilfe der beiden Fluoreszenzen anhand der unbehandelten Kontrollprobe die Quadranten festgelegt und auf jede Messprobe übertragen. Dabei kennzeichnet der untere linke Quadrant im Annexin V-FITC / PI - Dotplot die vitalen Zellen, da diese keinen der beide Farbstoffe binden. Der untere rechte Quadrant beschreibt die Annexin V-FITC-positiven und PI-negativen Zellen, die apoptotische Zellpopulation. Im oberen rechten Quadranten befinden sich sowohl Annexin V-FITC- als auch PI-positiven Zellen, diese beschreiben die nekrotische Zellpopulation. Der obere linke Quadrant kennzeichnet die PI-positiven und Annexin V-FITC-negativen Zellen, diese werden ebenfalls zur nekrotischen Zellpopulation gerechnet. Unter Einbeziehung der statistischen Auswertung konnte somit der prozentuale Zellanteil für vitale, apoptotische und nekrotische Zellen in jeder Probe bestimmt werden.

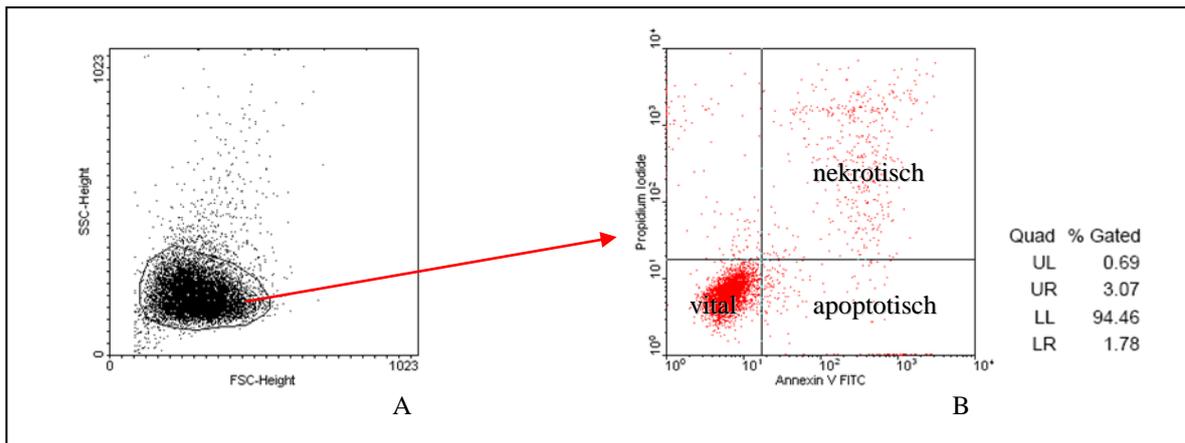


Abbildung 7: Beispiel der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptose von unbehandelten THP-1-Zellen. A) zeigt den FSC/SSC-Dotplot, B) die Fluoreszenzverteilung der in A) markierten Zellen. Für jeden Quadranten wurde der Prozenteil der darin liegenden Zellen bestimmt.

2.10 Statistik

Sämtliche statistische Auswertungen sowie die in dieser Arbeit verwendeten statistischen Abbildungen wurden mit der Software Graph Pad Prism 5 erstellt. Dabei wurden die aus jeder Messung ermittelten Einzelwerte zusammengefasst und die Standardabweichung bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Hemmung der Glyoxalase I durch Ethylpyruvat

Zur Analyse der Wirkung von EP auf die Glo-I wurde die isolierte humane Glo-I mit verschiedenen Konzentrationen von EP und EL behandelt. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung des Enzyms durch EP im Dosisbereich zwischen 2.5 mM und 20 mM verzeichnet werden. Bereits bei der Zugabe von 20 mM EP zur isolierten Glo-I konnte keine Enzymaktivität mehr festgestellt werden. Dagegen zeigte die Inkubation der Glo-I mit EL im Dosisbereich zwischen 2.5 mM und 20 mM nur minimale Veränderungen der Enzymaktivität. Allerdings wurde in zahlreichen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe festgestellt, dass die Behandlung von Zellkulturen sowohl mit EP als auch mit L- und D-Ethyllaktat (DEL) zur Inhibition der Glo-I im zytosolischen Extrakt führt. Diese Ausführungen sind aber nicht Gegenstand dieser Arbeit, sondern werden in entsprechender Literatur diskutiert.

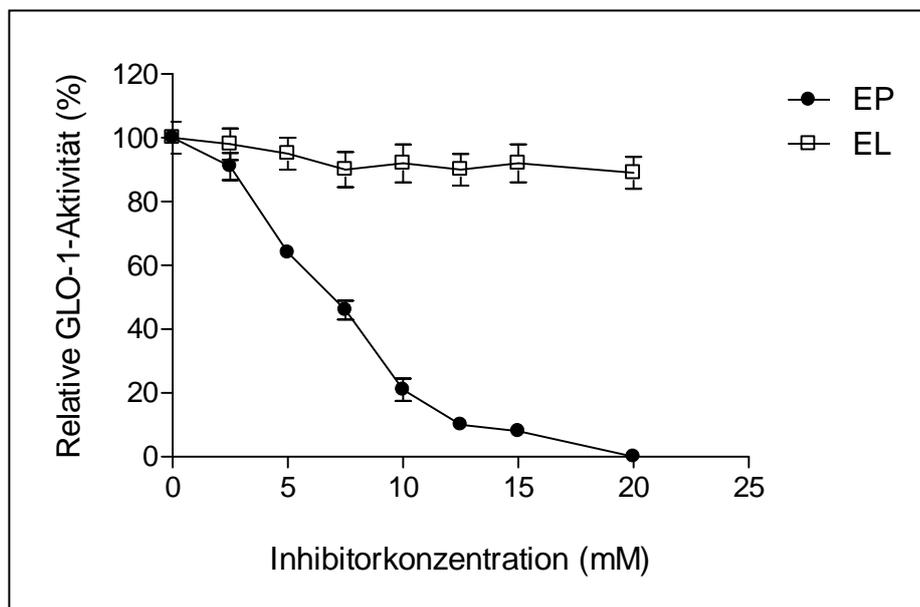


Abbildung 8: Die Hemmung der humanen GLO-1 durch Ethylpyruvat, nicht aber durch L-Ethyllaktat.

3.2 Die Aktivität der Glyoxalase I in PBMCs und THP-1-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass EP die isolierte humane Glo-I konzentrationsabhängig inhibiert, wurde die spezifische Aktivität dieses Enzyms in neoplastischen und nicht-neoplastischen Zellen untersucht. Hierfür wurden humane PBMCs und monozytäre Tumorzellen, THP-1-Zellen, verwendet. Für diese Analysen wurden der optische Test und die Proteinbestimmung nach Bradford verwendet. Durch diese Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die PBMCs mit 0.40 ± 0.01 U/mg im Gegensatz zu den THP-1-Zellen mit 2.08 ± 0.09 U/mg eine vielfach geringere spezifische Aktivität der Glo-I aufweisen. Der Einfluss von Glyoxalaseinhibitoren auf die Aktivität dieses Enzyms war ebenfalls Gegenstand der Forschungen unserer Arbeitsgruppe, allerdings werden diese Untersuchungen in anderen Arbeiten beschrieben.

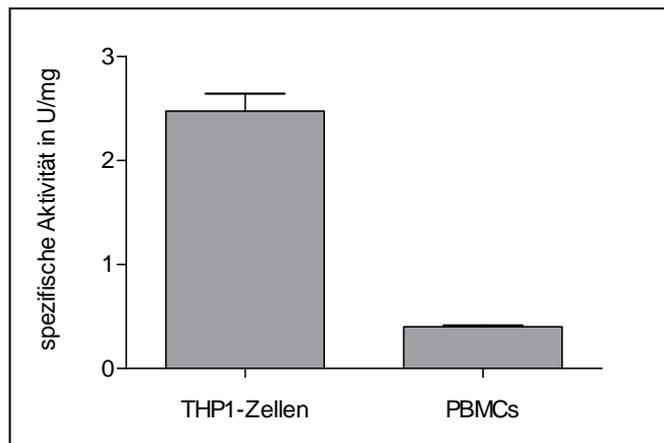


Abbildung 9: Die spezifische Aktivität der Glyoxalase I in THP-1-Zellen und PBMCs.

3.3 Der Einfluss von Ethylpyruvat, L-Ethyllaktat und weiteren Substanzen auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine

In den nachfolgend erläuterten Versuchsreihen wird der Einfluss von EP und anderen Glyoxalaseinhibitoren auf die Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α beschrieben. Zur Bestimmung des Effektes der verschiedenen Substanzen auf die Zytokinexpression wurden diese in An- und Abwesenheit von LPS mit Vollblutproben von drei verschiedenen Spendern inkubiert. Bei allen Spenderblutproben wurden tendenziell gleiche Ergebnisse bezüglich der Zytokinexpression festgestellt, nachfolgend werden die Ausführungen auf ausgewählte Beispiele beschränkt.

3.3.1 Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine

Bei der Behandlung der Blutproben mit 10 ng/ml LPS konnte eine deutliche Steigerung der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen festgestellt werden. Nach Zugabe von EP wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung dieser Zytokinproduktion verzeichnet. Die Konzentration von IL-1 β stieg nach LPS-Zugabe von 38.75 ± 9.66 pg/ml auf 5581 ± 160.40 pg/ml, nach Behandlung mit 5 mM EP verminderte sich diese bereits deutlich auf 4268 ± 126.60 pg/ml. Nach der Zugabe von 20 mM EP zum Versuchsansatz konnte ein Abfall der Konzentration von IL-1 β auf 45.10 ± 10.32 pg/ml verzeichnet werden. Eine ähnliche Tendenz konnte auch bei der Bestimmung von IL-6 festgestellt werden. Bei der Behandlung der Blutproben mit 10 ng/ml LPS stieg die Konzentration von IL-6 von 252.30 ± 90.68 pg/ml auf 53750 ± 1991 pg/ml, bei der Koinkubation von LPS und 5 mM EP verringerte sich diese auf 33490 ± 839.60 pg/ml und nach Zugabe von 20 mM EP auf 1197 ± 51.43 pg/ml.

Die Konzentration von IL-8 stieg nach Behandlung mit 10 ng/ml LPS von 33.00 ± 18.34 pg/ml auf 8435 ± 291.60 pg/ml. Nach Koinkubation mit LPS und 5 mM EP reduzierte sich die Interleukinkonzentration auf 7384 ± 159.60 pg/ml und nach Zugabe von 20 mM EP auf 2618 ± 110.80 pg/ml. Die Konzentration von TNF- α erhöhte sich nach Behandlung der Blutproben mit 10 ng/ml LPS von 45.50 ± 14.18 pg/ml auf 11840 ± 406.60 pg/ml. Nach Zugabe von 5 mM EP verringerte sich diese auf 4173 ± 121.90 pg/ml und nach

Behandlung mit 20 mM EP auf 368.50 ± 24.54 pg/ml. Die alleinige Zugabe von EP zu den Blutproben führte zu keiner Induktion der Zytokinfreisetzung.

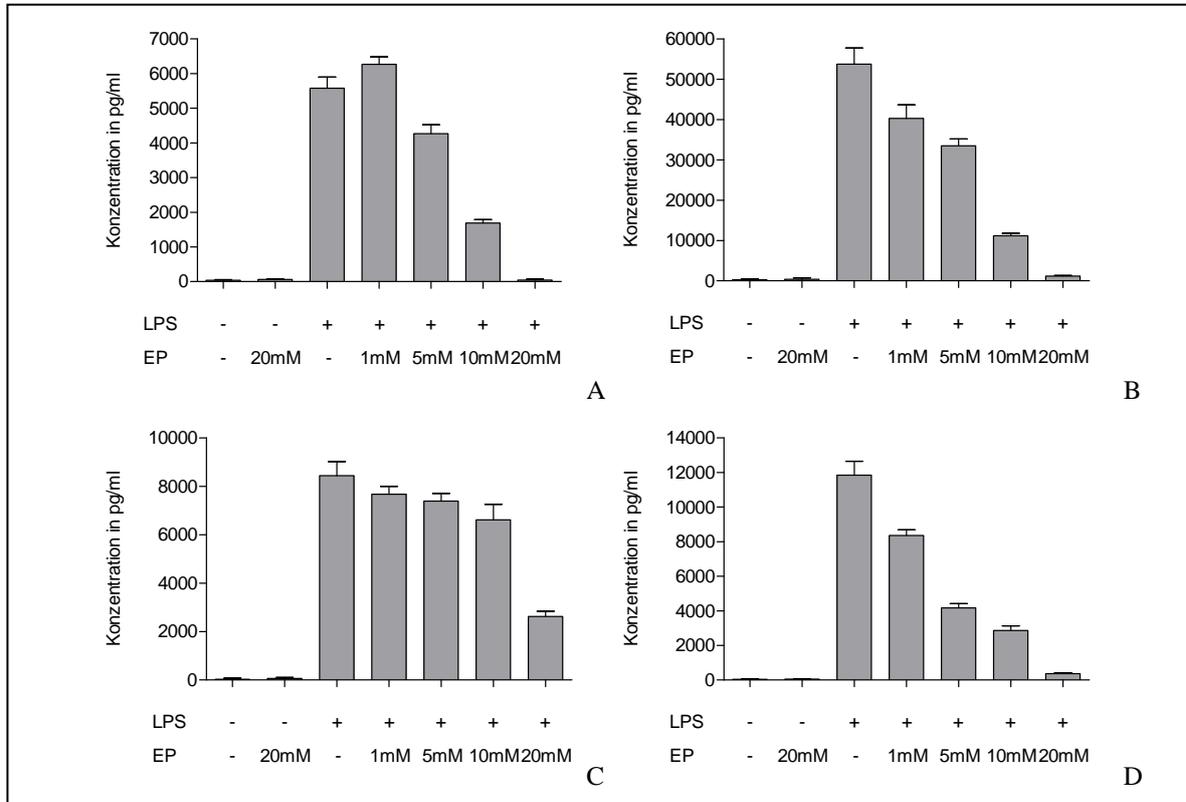


Abbildung 10: Einfluss von Ethylpyruvat auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Vollblut nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. A) IL-1 β , B) IL-6, C) IL-8, D) TNF- α .

3.3.2 Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine

Auch bei den Versuchen zur Untersuchung des Effektes von EL konnte bei der Behandlung der Blutproben mit 10 ng/ml LPS eine deutliche Steigerung der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen festgestellt werden. Nach Zugabe von EL wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung dieser Zytokinproduktion verzeichnet. Die Konzentration von IL-1 β stieg nach LPS-Zugabe von 550.8 ± 74.70 pg/ml auf 11270 ± 811.80 pg/ml, nach Behandlung mit 5 mM EL verminderte sich diese auf 9724 ± 210.40 pg/ml. Nach der Zugabe von 20 mM EL zum Versuchsansatz konnte ein Abfall der Konzentration von IL-1 β auf 1594 ± 130.10 pg/ml verzeichnet werden. Bei der

Behandlung der Blutproben mit 10 ng/ml LPS stieg die Konzentration von IL-6 von 252.30 ± 90.68 pg/ml auf 52330 ± 3692 pg/ml, bei der Koinkubation von LPS und 5 mM EL verringerte sich diese auf 41380 ± 566.30 pg/ml und nach Zugabe von 20 mM EL auf 7554 ± 209.70 pg/ml. Die Konzentration von IL-8 stieg nach Behandlung mit 10 ng/ml LPS von 45.75 ± 16.16 pg/ml auf 9841 ± 555.0 pg/ml. Nach Koinkubation mit LPS und 5 mM EL reduzierte sich die Interleukinkonzentration auf 6423 ± 175.31 pg/ml und nach Zugabe von 20 mM EL auf 506.32 ± 31.54 pg/ml. Die Konzentration von TNF- α erhöhte sich nach Behandlung der Blutproben mit 10 ng/ml LPS von 31.25 ± 3.14 pg/ml auf 9358 ± 486.10 pg/ml. Nach Zugabe von 5 mM EL verringerte sich diese auf 6372 ± 195.81 pg/ml und nach Behandlung mit 20 mM EL auf 457.82 ± 28.00 pg/ml. Die alleinige Zugabe von EL zu den Blutproben führte zu keiner Induktion der Zytokinfreisetzung.

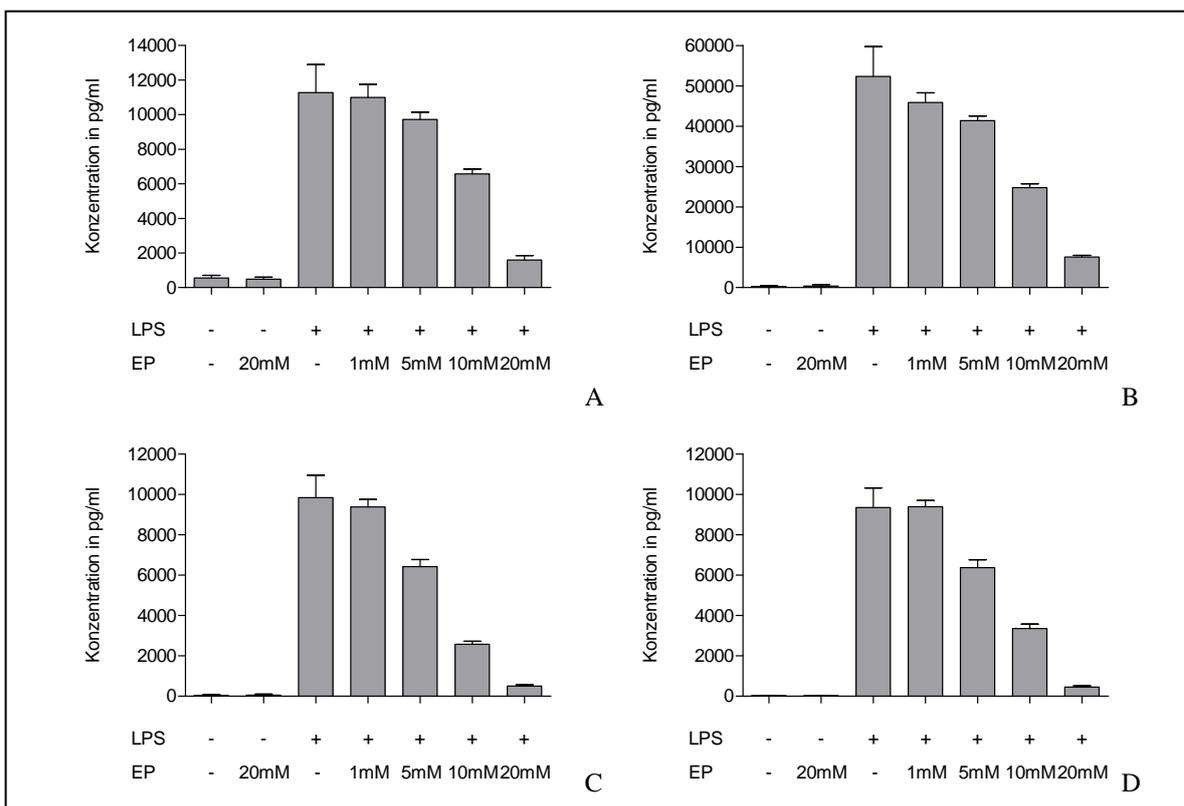


Abbildung 11: Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Vollblut nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. A) IL-1 β , B) IL-6, C) IL-8, D) TNF- α .

3.3.3 Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine

Bei der Untersuchung des Einflusses von MGO, eines Substrats der Glo-I, auf die Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α konnten ebenfalls konzentrationsabhängige Effekte nachgewiesen werden. Bei der Behandlung der Vollblutproben mit 10 ng/ml LPS stieg die Konzentration von IL-1 β von 2336 ± 88.91 pg/ml auf 9424 ± 75.44 pg/ml, nach Behandlung mit 2 mM MGO verminderte sich diese auf 4277 ± 70.73 pg/ml. Nach der Zugabe von 10 mM MGO zum Versuchsansatz konnte ein Abfall der Konzentration von IL-1 β auf 2516 ± 47.40 pg/ml verzeichnet werden. Bei der Behandlung der Blutproben mit 10 ng/ml LPS stieg die Konzentration von IL-6 von 570.51 ± 5.48 pg/ml auf 41290 ± 345.30 pg/ml, bei der Koinkubation von LPS und 2 mM MGO verringerte sich diese auf 27390 ± 78.23 pg/ml und nach Zugabe von 10 mM MGO auf 3693 ± 319.89 pg/ml. Die Konzentration von IL-8 stieg nach Behandlung mit 10 ng/ml LPS von 333.00 ± 3.46 pg/ml auf 5790 ± 35.51 pg/ml. Nach Koinkubation mit LPS und 2 mM MGO erhöhte sich die Interleukinkonzentration weiter auf 11810 ± 34.93 pg/ml und nach Zugabe von 10 mM MGO auf 13900 ± 344.31 pg/ml. Die Konzentration von TNF- α stieg nach Behandlung der Blutproben mit 10 ng/ml LPS von 342.02 ± 15.81 pg/ml auf 19020 ± 168.11 pg/ml. Nach Zugabe von 2 mM MGO verringerte sich diese auf 7233 ± 88.32 pg/ml und nach Behandlung mit 10 mM MGO auf 1155 ± 60.35 pg/ml. Die alleinige Zugabe von MGO zu den Blutproben führte zu keiner vermehrten Zytokinfreisetzung.

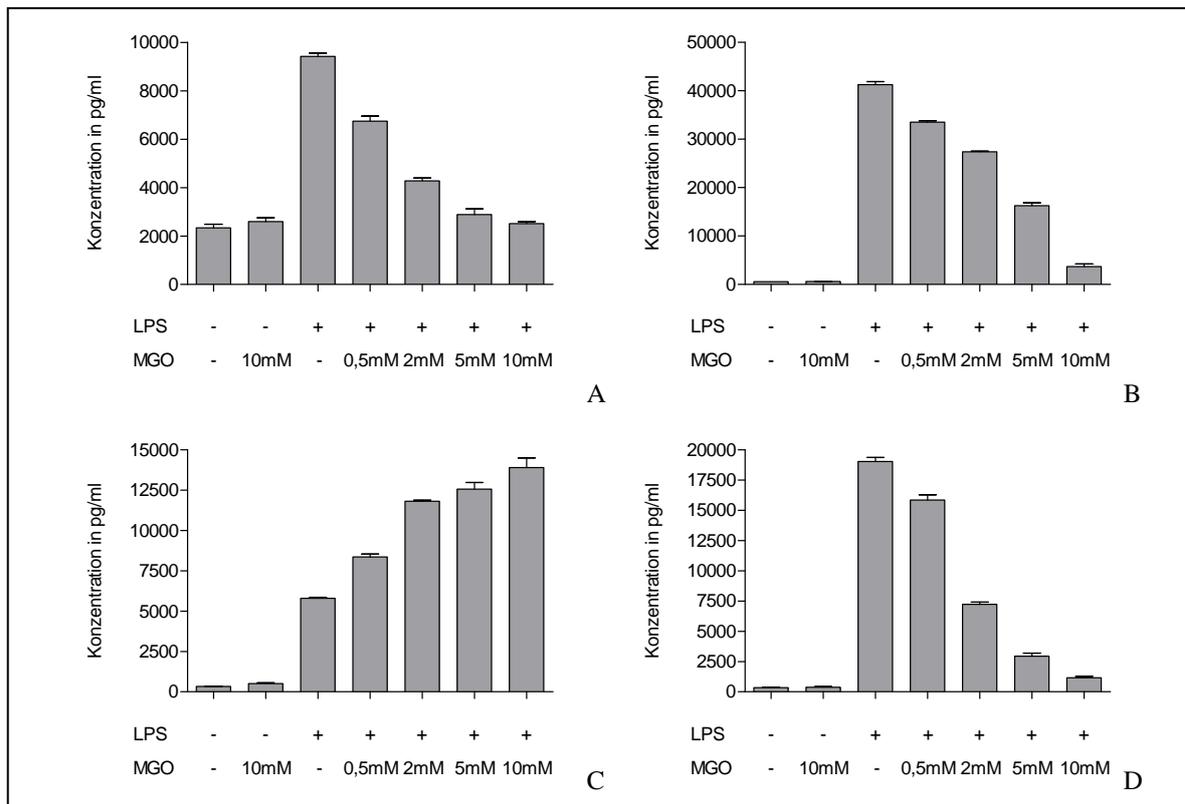


Abbildung 12: Einfluss von Methylglyoxal auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Vollblut nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. A) IL-1 β , B) IL-6, C) IL-8, D) TNF- α .

3.4 Der Einfluss von Ethylpyruvat, L- und D-Ethyllaktat und weiteren Substanzen auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker

Nachdem in verschiedenen Experimenten die konzentrationsabhängige Inhibierung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch EP und EL gezeigt wurde, erfolgte die Analyse des Einflusses dieser Substanzen auf für die Immunantwort bedeutsame Oberflächenmarker HLA-DR, CD14 und CD91.

Für diese Untersuchungen wurde heparinisieretes peripheres venöses Blut von drei gesunden Spendern verwendet. Nach Inkubation der Blutproben mit LPS bzw. den zu untersuchenden Substanzen erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Hierzu wurden die Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten im FSC/SSC-Plot identifiziert und markiert. Anhand dieser Auswahl erfolgte daraufhin die Analyse der Expression von HLA-DR, CD14 und CD91. Bei den Versuchen zeigten sich bei allen Blutspendern tendenziell

gleiche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses der einzelnen Substanzen auf die untersuchten Oberflächenmarker. Erwartungsgemäß konnten individuelle Unterschiede im Hinblick auf das Ansprechen der verschiedenen Proben der einzelnen Blutspender auf LPS verzeichnet werden. Im Folgenden werden die Ausführungen auf ausgewählte Beispiele beschränkt.

3.4.1 Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker

3.4.1.1 Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von HLA-DR

Nach Analyse der Messdaten konnte festgestellt werden, dass die alleinige Zugabe von 20 mM EP zum Vollblutassay keine Erhöhung oder Verminderung der HLA-DR-Expression auf Monozyten zur Folge hat. Die Inkubation des Vollblutes mit 10 ng/ml LPS hingegen führte zu einem drastischen Anstieg der MFI von 76.10 ± 1.26 auf 398.21 ± 4.28 und damit der Expression des Oberflächenantigens auf Monozyten. Weiterhin ergab sich bei einer Koinkubation der Blutproben mit LPS und EP eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch LPS-stimulierten HLA-DR-Expression. Bereits bei einer Behandlung mit 5 mM EP zeigte sich eine deutliche Abnahme der MFI auf 265.62 ± 4.41 und bei einer Behandlung mit 20 mM auf 42.30 ± 3.21 .

Weiterhin wurde der Einfluss von EP auch auf Lymphozyten und Granulozyten hinsichtlich der HLA-DR-Expression untersucht. Hier zeigten sich bei Lymphozyten ähnliche wenn auch deutlich geringere Effekte. Außerdem exprimiert nur ein sehr kleiner Teil der Granulozyten das HLA-DR, wodurch ein Effektnachweis nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

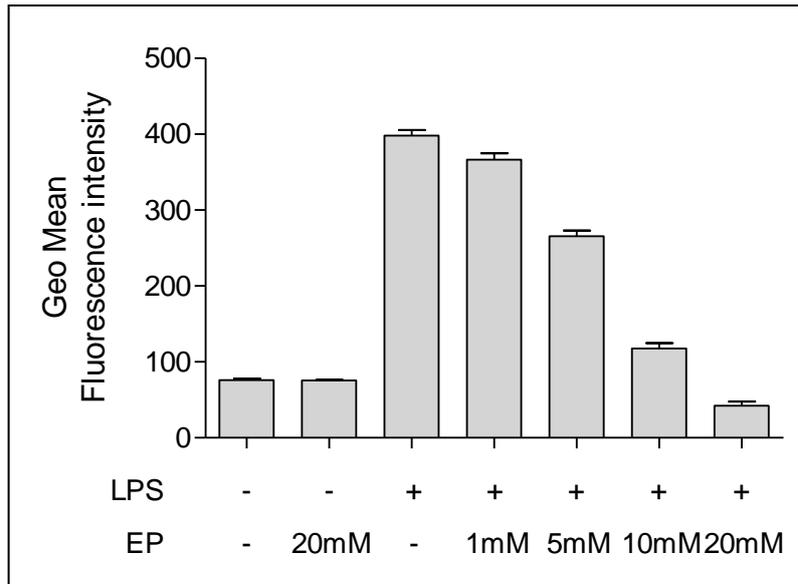


Abbildung 13: Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

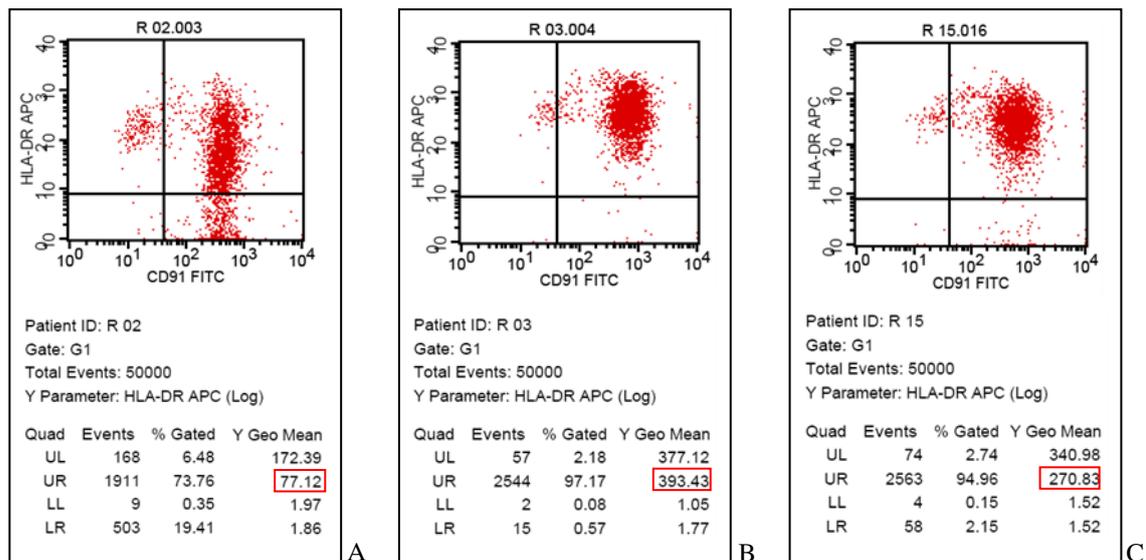


Abbildung 14: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit EP als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 5 mM EP und 10 ng/ml LPS.

3.4.1.2 Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von CD14

Analog zur Untersuchung von HLA-DR zeigten sich auch bei der Behandlung der Blutproben mit EP ohne Zugabe von LPS keine Unterschiede in der MFI bzw. Expression von CD14 auf Monozyten. Die Inkubation des Vollblutes mit 10 ng/ml LPS führte zu einer Erhöhung der MFI von 662.50 ± 15.22 auf 1068 ± 27.06 . Auch hier zeigte sich bei der Inkubation von LPS und EP gemeinsam eine konzentrationsabhängige Erniedrigung der LPS-induzierten Steigerung der MFI. Bei der Behandlung mit 5 mM EP und 10 ng/ml LPS verringerte sich die MFI auf 948.21 ± 7.01 und mit 20 mM EP auf 679.77 ± 15.63 . Auf Lymphozyten und Granulozyten konnten keine Effekte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

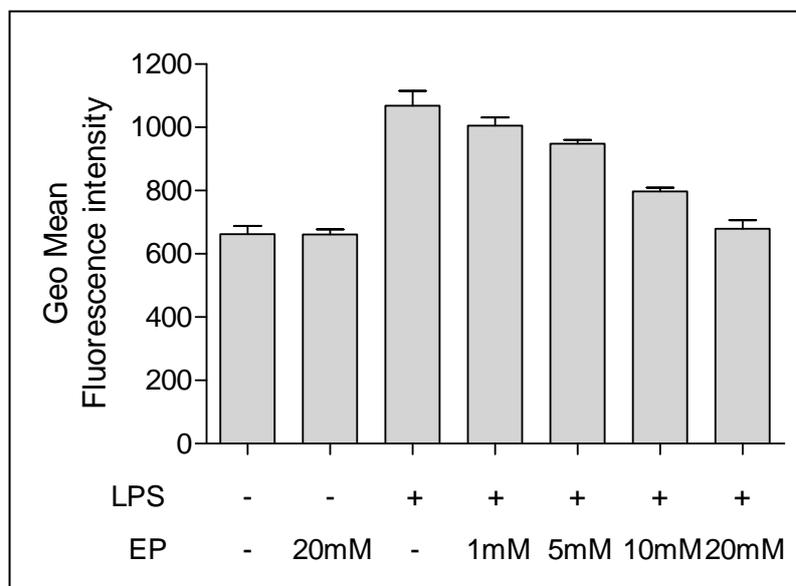


Abbildung 15: Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

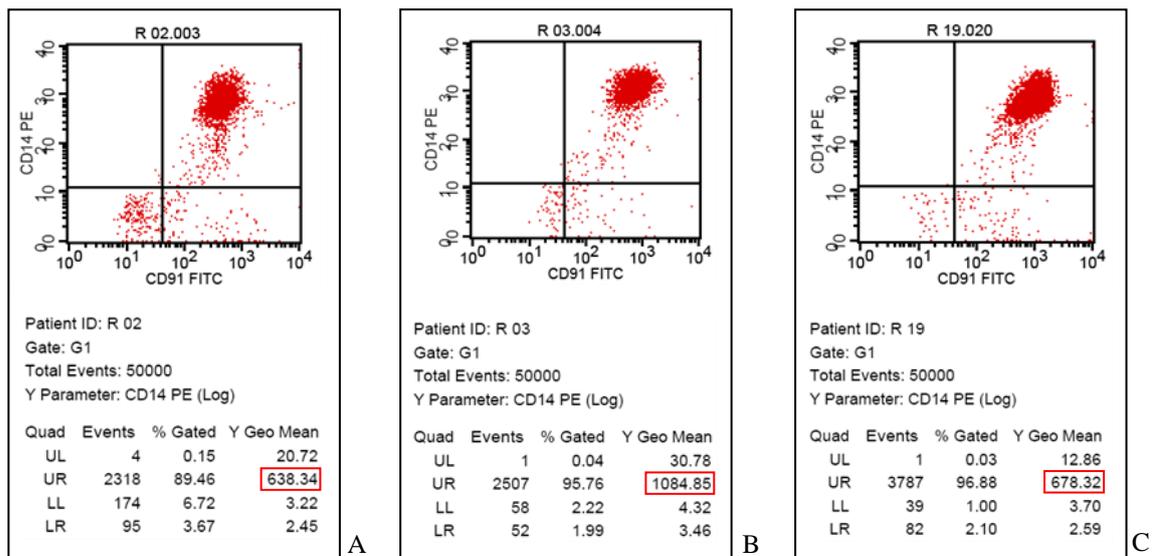


Abbildung 16: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit Ethylpyruvat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 20 mM EP und 10 ng/ml LPS.

3.4.1.3 Der Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von CD91

Die alleinige Zugabe von EP zeigte auch im Hinblick auf die Expressionsstärke von CD91 keine deutlichen Veränderungen auf Monozyten. Nach sechsständiger Inkubation stieg die MFI bei der Zugabe von 10 ng/ml LPS von 514.23 ± 9.73 auf 582.65 ± 10.01 . Auch bei der Expression von CD91 konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt von EP festgestellt werden, allerdings stieg die MFI des CD91 bei steigenden Behandlungskonzentrationen von EP weiter an. Bei der Koinkubation von 10 ng/ml LPS und 5 mM EP erhöhte sich die MFI weiter auf 614.34 ± 7.23 und bei der Behandlung mit 20 mM EP auf 768.36 ± 8.68 . Eine Beeinflussung der Lymphozyten oder Granulozyten hinsichtlich der Expression von CD14 konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

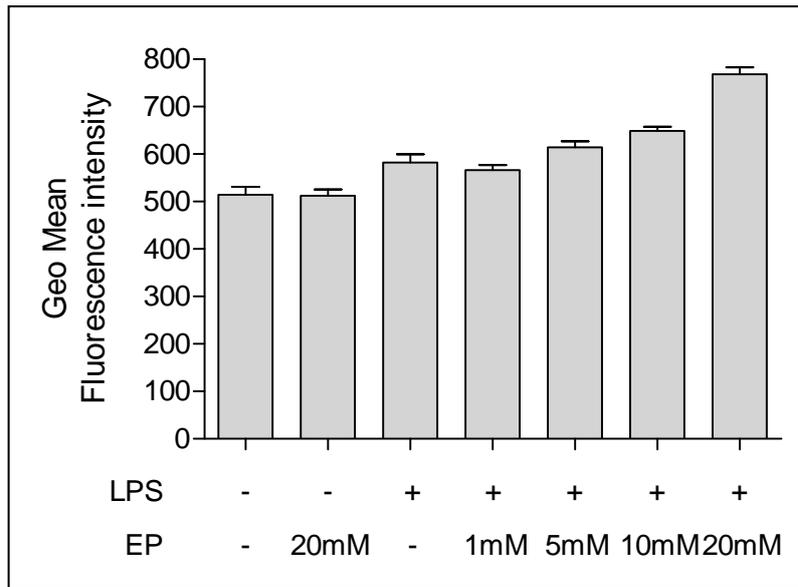


Abbildung 17: Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

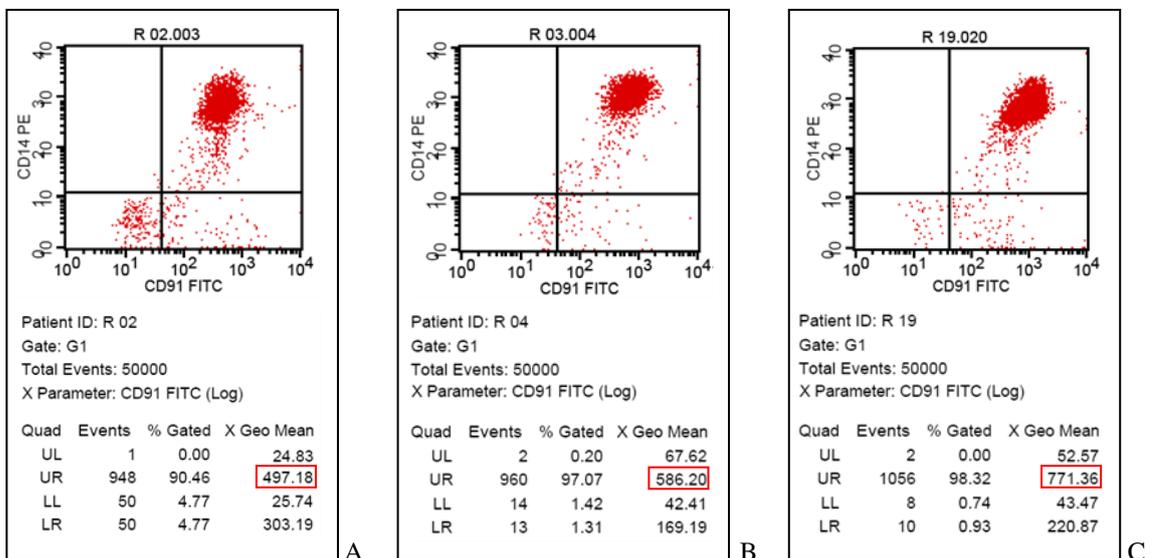


Abbildung 18: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit Ethylpyruvat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 20 mM EP und 10 ng/ml LPS.

3.4.2 Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker

3.4.2.1 Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von HLA-DR

Bei der Behandlung der Blutproben mit EL konnte ebenfalls eine Beeinflussung der Expression von HLA-DR festgestellt werden. Die Zugabe von 20 mM EL ohne LPS-Stimulation zeigte keine Steigerung oder Reduktion der MFI und damit der Expression des Oberflächenantigens auf Monozyten. Die Behandlung des Vollblutes mit 10 ng/ml LPS führte zu einem Anstieg der MFI von 106.30 ± 2.62 auf 714.22 ± 2.99 . Die Behandlung der Blutproben mit LPS und EL im Konzentrationsbereich zwischen 1 mM und 20 mM zeigte eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch LPS induzierten Expression von HLA-DR. Nach Zugabe von 5 mM EL reduzierte sich die MFI auf 568.52 ± 18.39 und bei der Behandlung mit 20 mM EL und LPS auf 272.31 ± 3.82 . Bei der Analyse der Lymphozyten und Granulozyten konnten keine bzw. nur geringe Effekte von EL auf die Expression von HLA-DR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

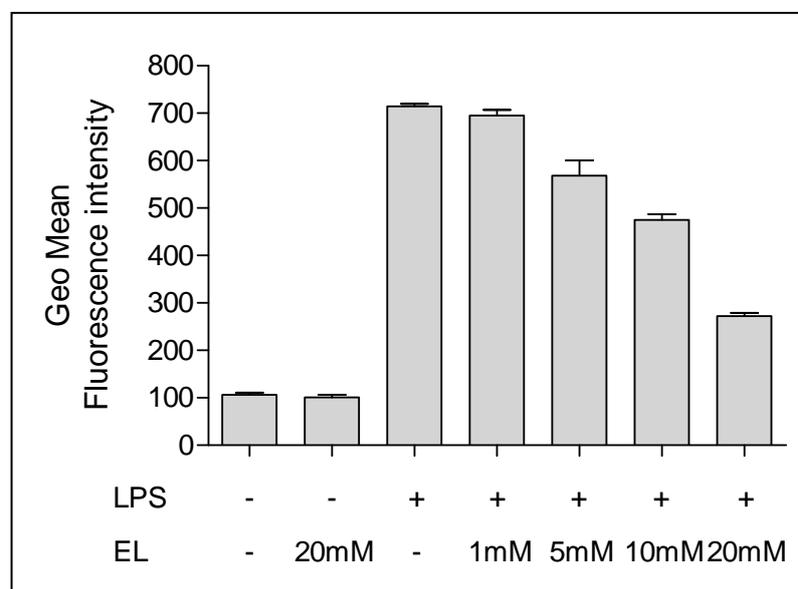


Abbildung 19: Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

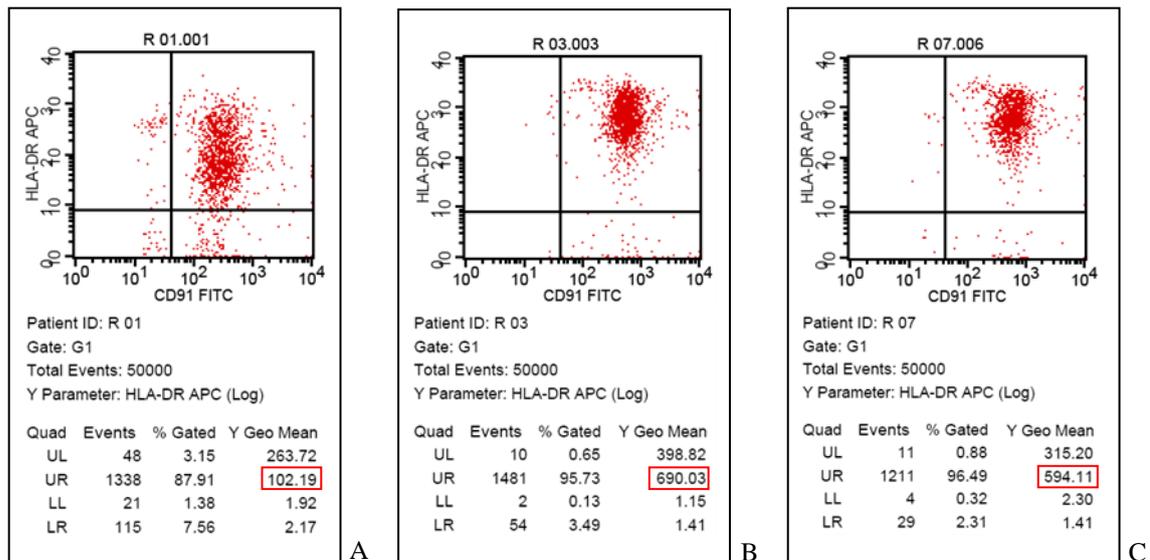


Abbildung 20: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit L-Ethyllaktat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 5 mM EL und 10 ng/ml LPS.

3.4.2.2 Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von CD14

Bei der alleinigen Zugabe von 20 mM EL ohne LPS-Stimulation konnte kein Effekt hinsichtlich der Expression von CD14 auf Monozyten festgestellt werden. Nach der Behandlung der Vollblutproben mit 10 ng/ml LPS in Abwesenheit von EL zeigte sich ein starker Anstieg der MFI von 371.61 ± 2.49 auf 1081 ± 17.23 . Bei der Koinkubation von LPS mit steigenden Konzentrationen von EL im Bereich zwischen 1 mM und 20 mM konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch LPS induzierten Expression des Oberflächenantigens registriert werden. Nach Behandlung mit 5 mM EL verringerte sich die MFI auf 876.85 ± 17.38 und bei 20 mM auf 607.21 ± 27.21 . Bei der Behandlung von Lymphozyten und Granulozyten konnte kein Effekt hinsichtlich der Expression von CD14 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

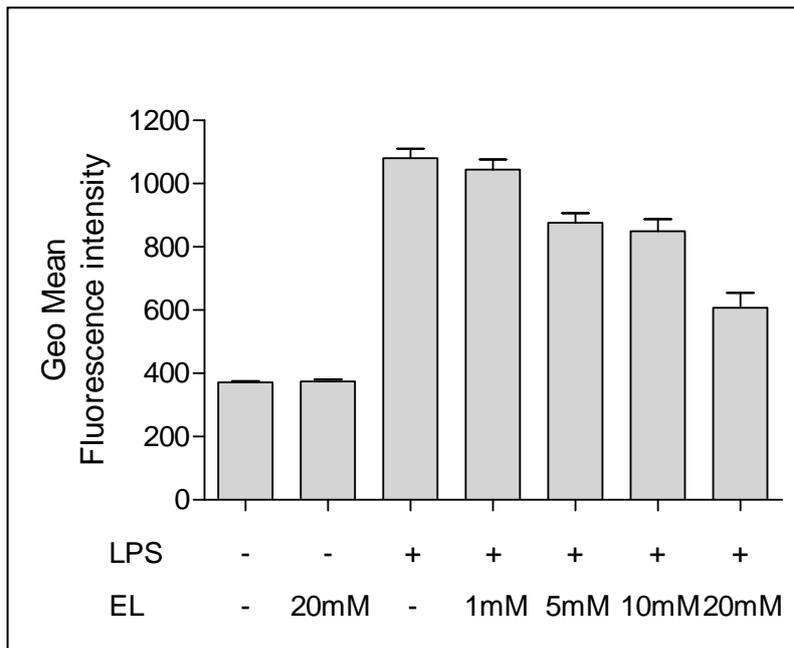


Abbildung 21: Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

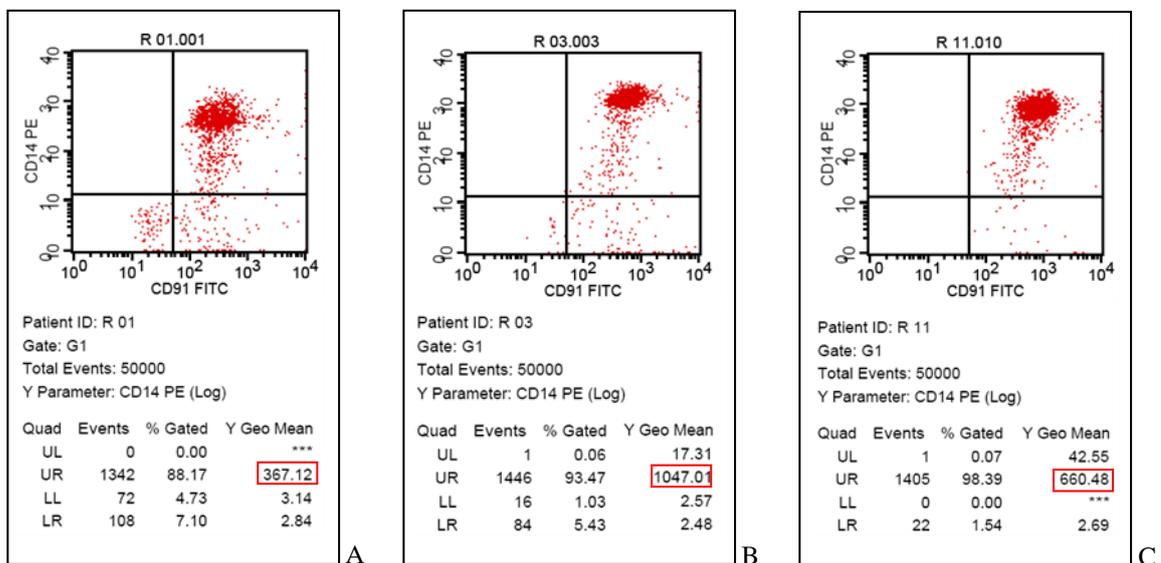


Abbildung 22: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit L-Ethyllaktat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 20 mM EL und 10 ng/ml LPS.

3.4.2.3 Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von CD91

Auch im Hinblick auf die Expression von CD91 auf Monozyten konnte nach der Behandlung mit 20 mM EL in Abwesenheit von LPS kein Effekt nachgewiesen werden. Nach Inkubation der Blutproben mit 10 ng/ml LPS erhöhte sich die MFI von 309.38 ± 7.13 auf 535.12 ± 25.05 . Bei der Zugabe von LPS und EL in steigenden Konzentrationen konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Expression von CD91 festgestellt werden. Die Koinkubation von 5 mM EL und 10 ng/ml LPS führte zu einer Erhöhung der MFI auf 560.91 ± 21.07 und die Behandlung mit 20 mM zu einem weiteren Anstieg auf 775.55 ± 11.04 . Bei der Analyse der Lymphozyten und Granulozyten konnte kein Effekt nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

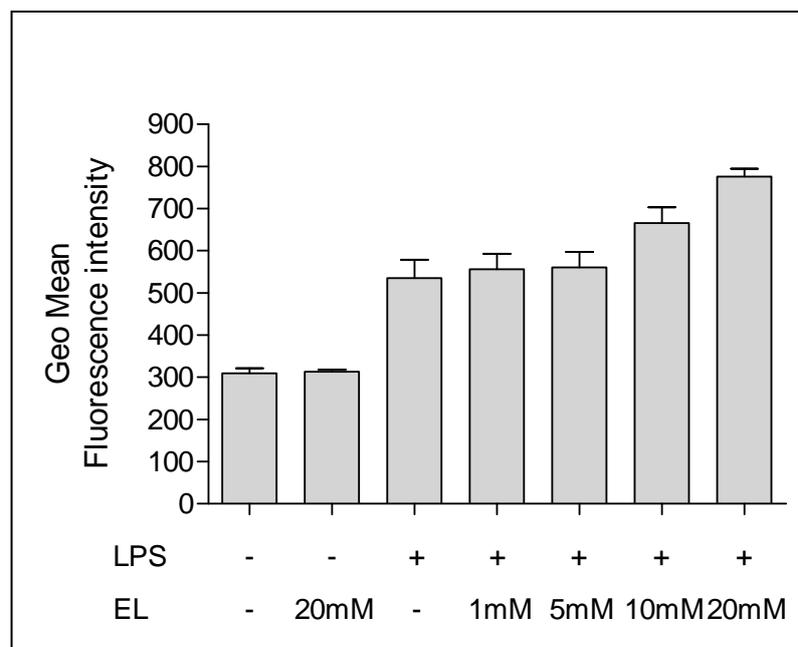


Abbildung 23: Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

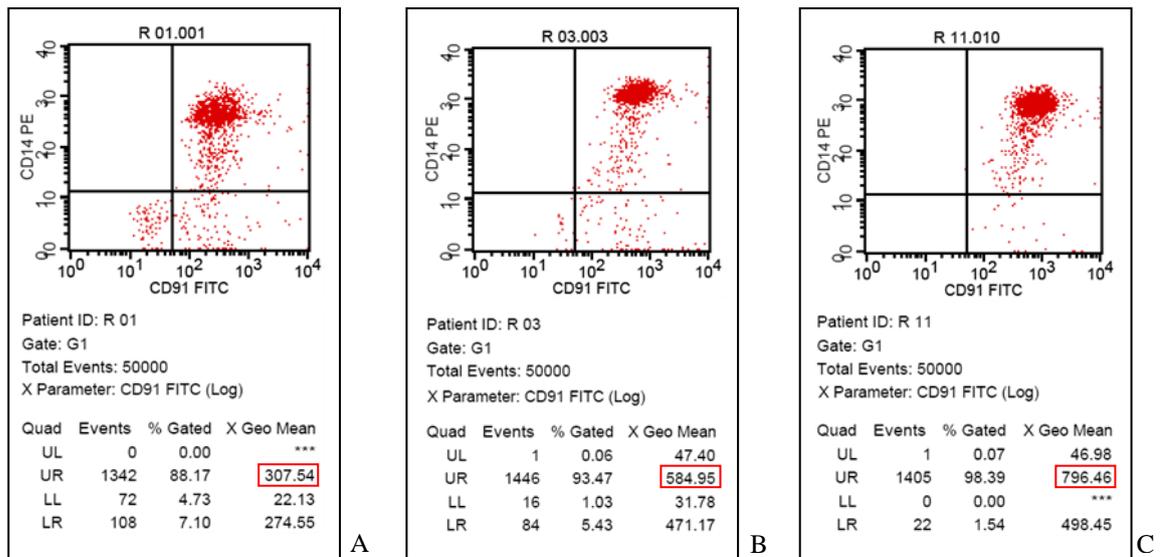


Abbildung 24: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit L-Ethyllaktat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 20 mM EL und 10 ng/ml LPS.

3.4.3 Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker

3.4.3.1 Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von HLA-DR

Auch bei dem Laktatester DEL konnte eine Beeinflussung der Expression von HLA-DR auf Monozyten festgestellt werden. Die isolierte Inkubation von 20 mM DEL im Vollblutassay zeigte keine Expressionsveränderungen des Oberflächenantigens. Die Zugabe von 10 ng/ml LPS bewirkte einen starken Anstieg der MFI von 74.20 ± 2.80 auf 689.51 ± 3.23 . Nach Koinkubation von 10 ng/ml LPS und steigenden Konzentrationen von DEL zwischen 1 mM und 20 mM konnte eine konzentrationsabhängige Erniedrigung der MFI und damit der Expression von HLA-DR festgestellt werden. Bei der Behandlung mit 5 mM verringerte sich die MFI auf 492.53 ± 9.23 und bei 20 mM DEL auf 307.51 ± 5.34 . Ein Einfluss von DEL auf die Expression von HLA-DR bei Lymphozyten und Granulozyten konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

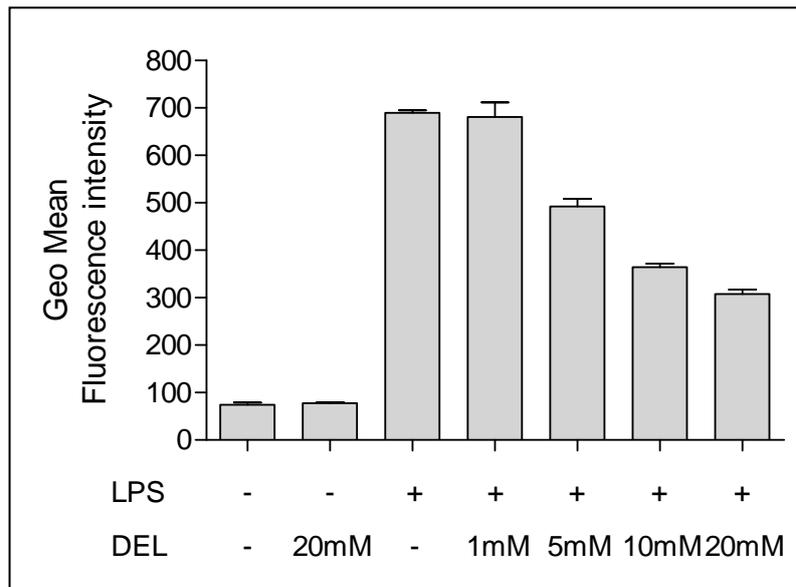


Abbildung 25: Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

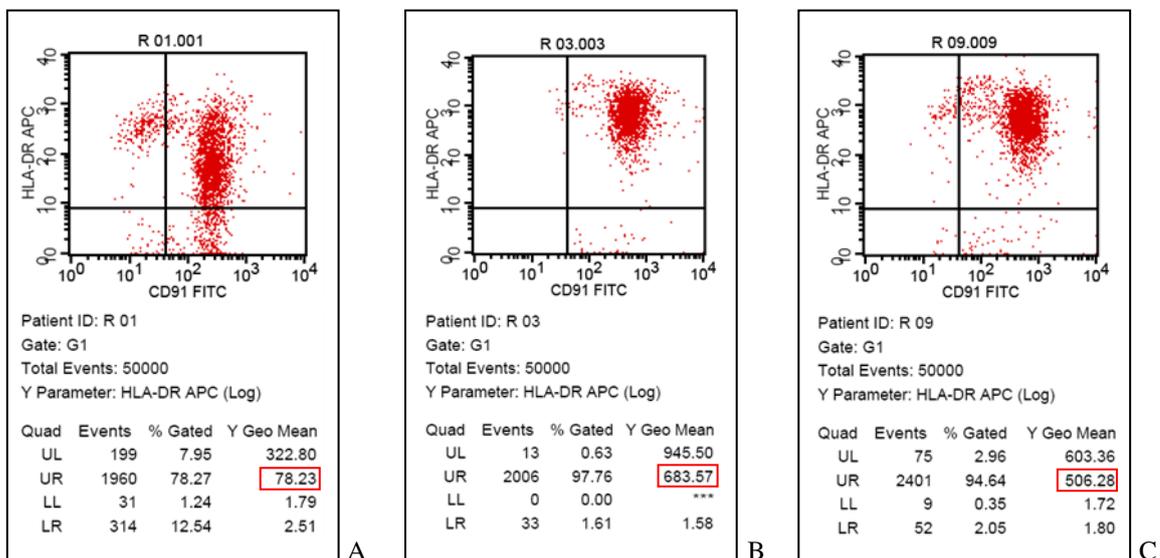


Abbildung 26: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit D-Ethyllaktat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 5 mM DEL und 10 ng/ml LPS.

3.4.3.2 Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von CD14

Die Inkubation der Spenderblutproben mit 20 mM DEL ohne Zugabe von LPS zeigte hinsichtlich der Expression von CD14 auf Monozyten keine Veränderung. Nach der Stimulation der Versuchsansätze mit 10 ng/ml LPS erhöhten sich die MFI und damit die korrelierende Expressionsstärke von CD14 von 468.59 ± 5.72 auf 1128 ± 51.09 . Weiterhin konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt bei der Zugabe von DEL und LPS zu den Blutproben festgestellt werden. Nach Stimulation mit LPS und Behandlung mit 5 mM DEL reduzierte sich die MFI auf 899.40 ± 4.40 und bei der Zugabe von 20 mM DEL auf 683.32 ± 21.44 . Ein Einfluss auf die Expression von CD14 auf Lymphozyten und Granulozyten konnte nicht verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).

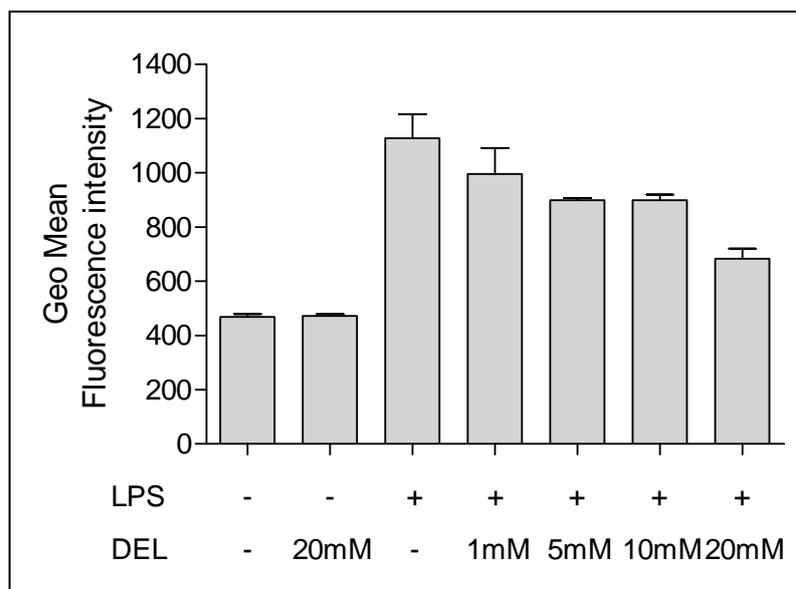


Abbildung 27: Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

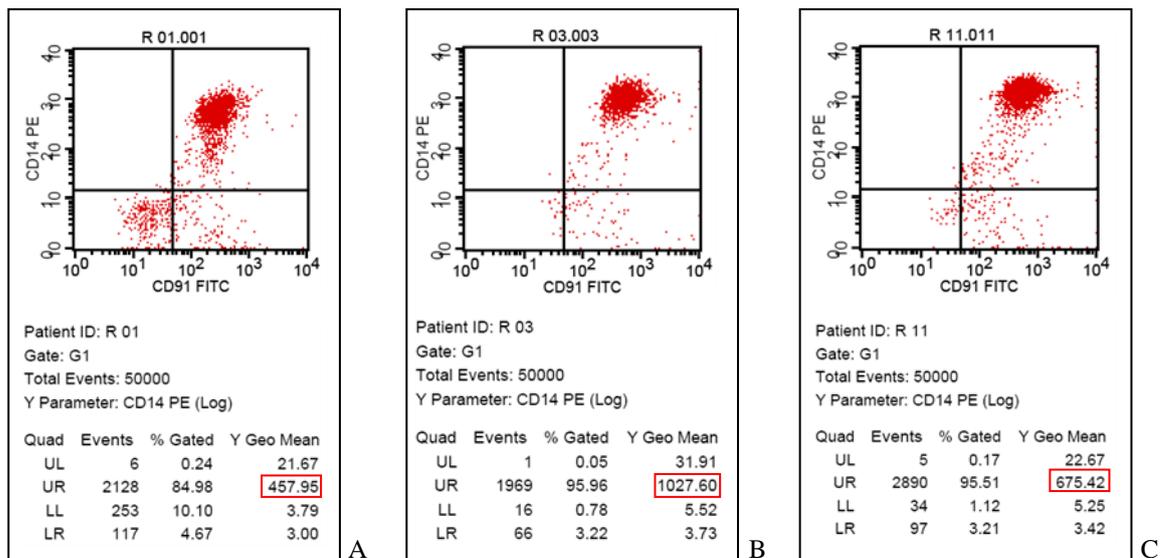


Abbildung 28: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit D-Ethyllaktat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 20 mM DEL und 10 ng/ml LPS.

3.4.3.3 Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von CD91

Die isolierte Zugabe von 20 mM DEL ohne Stimulation mit LPS zum Versuchsansatz erzielte keinen Effekt im Hinblick auf die Expression von CD91 auf Monozyten. Nach Zugabe von 10 ng/ml LPS zu den Proben konnte ein Anstieg der MFI von 247.71 ± 10.33 auf 531.26 ± 7.49 verzeichnet werden. Die Koinkubation von LPS und DEL in verschiedenen Konzentrationen ergab eine konzentrationsabhängige zusätzliche Erhöhung der MFI für CD91. Nach der Zugabe von 5 mM DEL und 10 ng/ml LPS erhöhte sich die MFI weiter auf 565.91 ± 7.06 und bei 20 mM DEL auf 713.57 ± 16.72 . Eine Veränderung der Expression von CD91 auf Lymphozyten bzw. auf Granulozyten durch die Zugabe von DEL konnte nicht ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

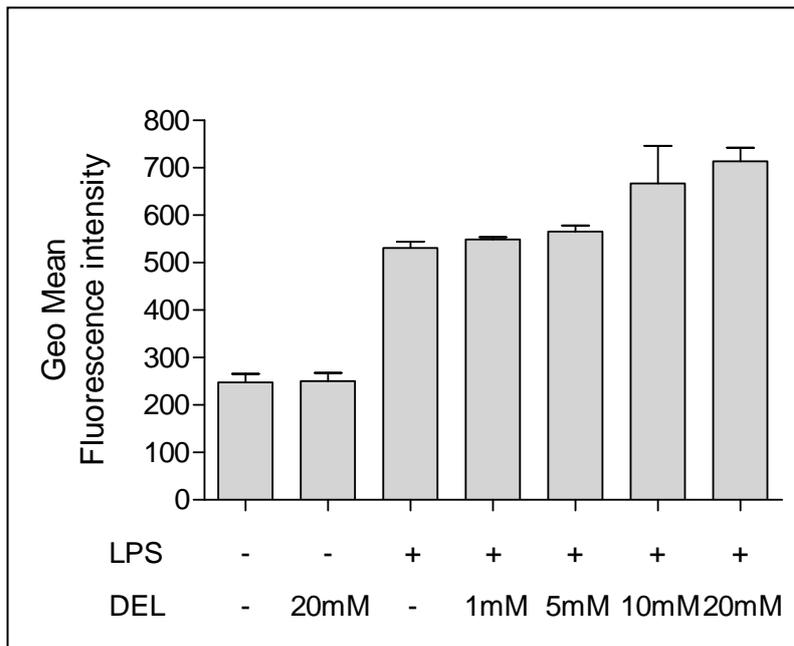


Abbildung 29: Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

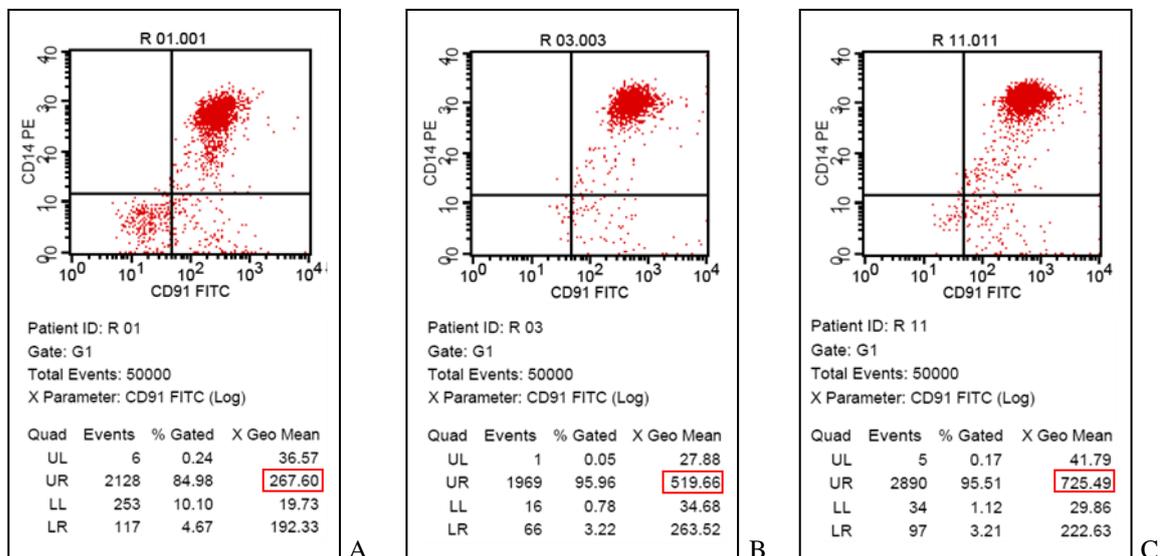


Abbildung 30: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit D-Ethyllaktat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 20 mM DEL und 10 ng/ml LPS.

3.4.4 Der Einfluss von Butyllaktat auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker

3.4.4.1 Der Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von HLA-DR

In den folgenden Ausführungen wird der Effekt eines weiteren Laktatesters, des Butyllaktats (BL), beschrieben. Die isolierte Inkubation der Versuchsansätze mit 20 mM BL führte zu keiner Veränderung der MFI und damit der Expression von HLA-DR auf Monozyten. Die Zugabe von 10 ng/ml LPS zeigte eine drastische Steigerung der MFI von 155.28 ± 4.54 auf 1082 ± 14.39 . Bei der Koinkubation von LPS und BL im Konzentrationsbereich zwischen 1 mM und 20 mM konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der LPS-induzierten Expressionssteigerung festgestellt werden. Nach Zugabe von 5 mM BL und 10 ng/ml LPS verringerte sich die MFI auf 967.93 ± 5.81 und bei 20 mM BL auf 244.84 ± 7.53 . Ein Einfluss von BL auf Lymphozyten und Granulozyten hinsichtlich der Expression von HLA-DR konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

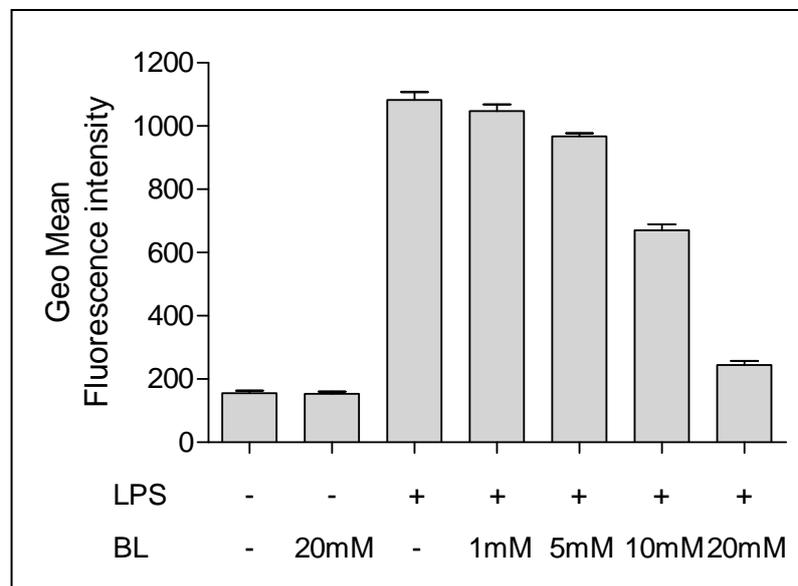


Abbildung 31: Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

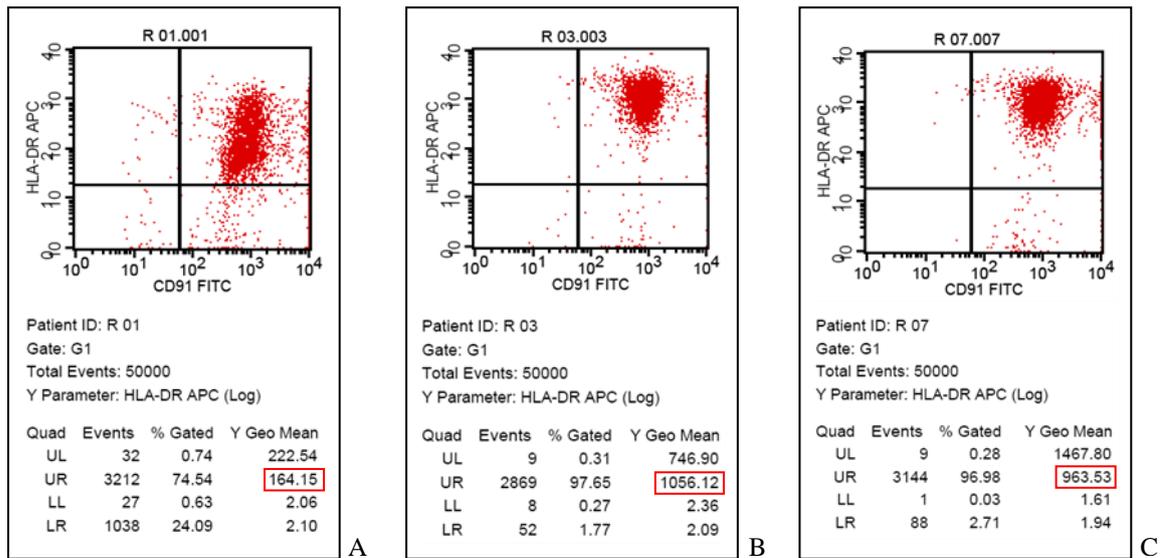


Abbildung 32: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit Butyllaktat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 5 mM BL und 10 ng/ml LPS.

3.4.4.2 Der Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von CD14

Die isolierte Behandlung der Versuchsansätze mit 20 mM BL ohne Stimulation mit LPS führte zu keiner Veränderung der MFI und damit der Expression von CD14 auf Monozyten. Nach der Stimulation mit 10 ng/ml LPS erhöhte sich die MFI von 397.08 ± 15.59 auf 720.02 ± 16.13 . Die Koinkubation von LPS und BL im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 20 mM zeigte eine konzentrationsabhängige Reduktion der MFI und damit der Expression von CD14. Bei der Behandlung mit 5 mM BL und 10 ng/ml LPS konnte eine Erniedrigung der MFI auf 695.51 ± 8.08 und bei 20 mM BL auf 529.84 ± 16.44 verzeichnet werden. Ein Einfluss von BL auf Lymphozyten und Granulozyten hinsichtlich der Expression von CD14 konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

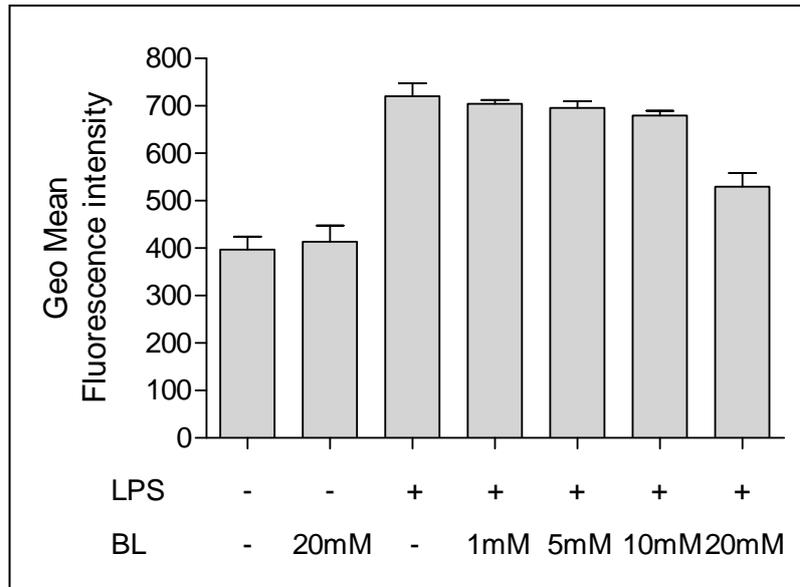


Abbildung 33: Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

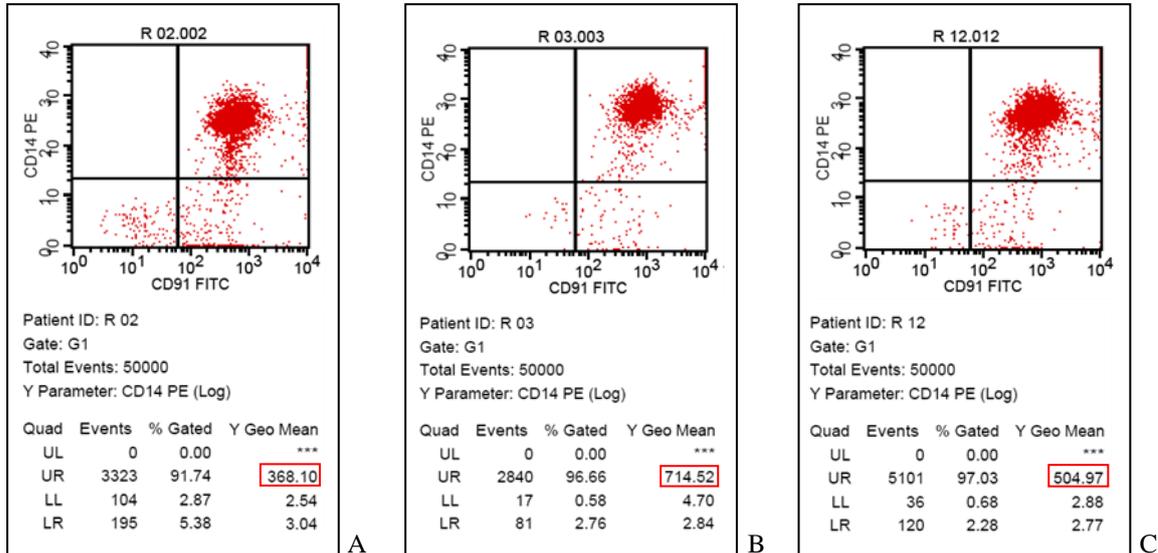


Abbildung 34: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit Butyllaktat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 20 mM BL und 10 ng/ml LPS.

3.4.4.3 Der Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von CD91

Die alleinige Behandlung der Versuchsansätze mit 20 mM BL ohne Stimulation mit LPS führte zu keiner Veränderung der MFI und damit der Expression von CD91 auf Monozyten. Nach der Stimulation mit 10 ng/ml LPS erhöhte sich die MFI von 661.72 ± 3.77 auf 947.75 ± 14.13 . Die Koinkubation von LPS und BL zeigte eine konzentrationsabhängige Erhöhung der MFI und damit der Expression von CD91. Bei der Behandlung mit 5 mM BL und 10 ng/ml LPS konnte ein Anstieg der MFI auf 1114 ± 9.80 und bei 20 mM BL auf 1382 ± 50.31 ermittelt werden. Eine Veränderung der Expression von CD91 durch BL auf Lymphozyten und Granulozyten konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

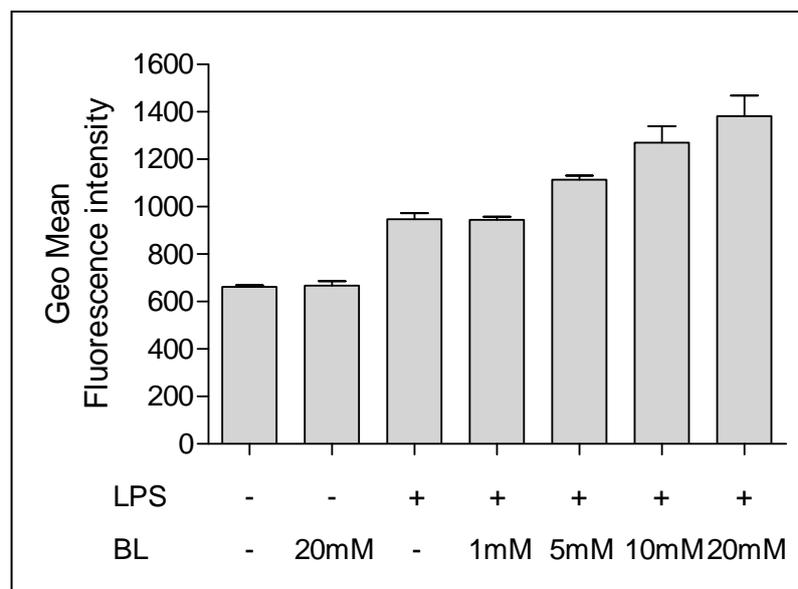


Abbildung 35: Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

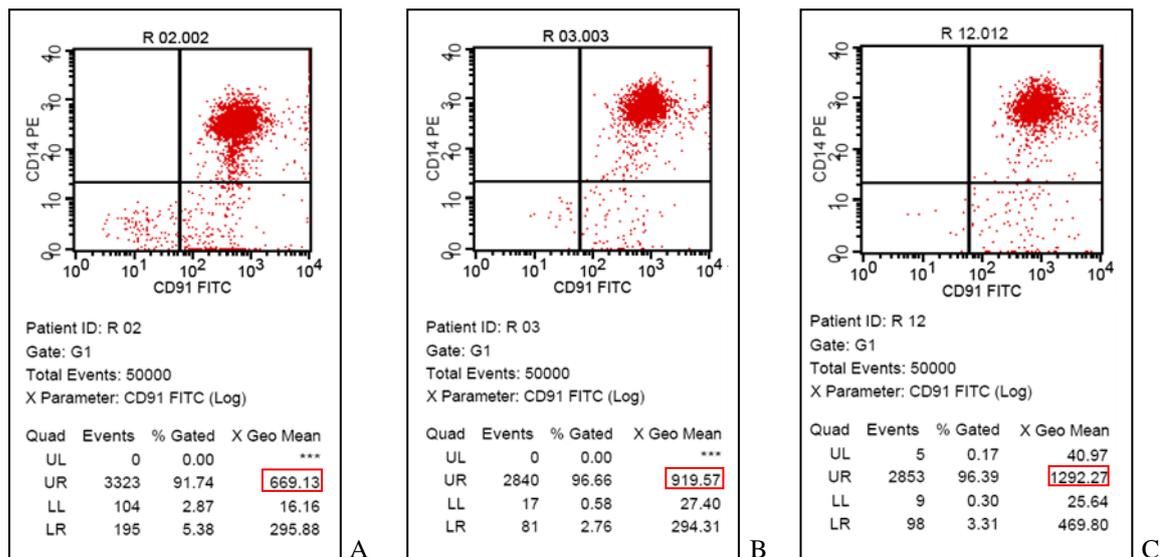


Abbildung 36: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit Butyllaktat als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 20 mM BL und 10 ng/ml LPS.

3.4.5 Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker

MGO stellt ein Substrat der Glyoxalase I dar und entsteht u.a. nichtenzymatisch im Glukosestoffwechsel. Da bei einer Hemmung der Glo-I durch EP die Konzentration von MGO ansteigt, wurde versucht, diesen Effekt durch die Behandlung von Vollblut mit verschiedenen Dosen MGO zu imitieren und damit weitere Erkenntnisse über die Wirkungsweise von EP zu erhalten.

3.4.5.1 Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von HLA-DR

Die isolierte Inkubation der Blutproben mit 10 mM MGO führte zu keiner Veränderung der MFI und damit der Expression von HLA-DR auf Monozyten. Die Zugabe von 10 ng/ml LPS zeigte eine Steigerung der MFI von 122.21 ± 8.55 auf 887.65 ± 12.91 . Bei der Koinkubation von LPS und MGO im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 mM und 10 mM konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der LPS-induzierten Expressionssteigerung festgestellt werden. Nach Zugabe von 1 mM MGO und 10 ng/ml

LPS verringerte sich die MFI auf 548.12 ± 23.47 und bei 20 mM MGO auf 123.34 ± 7.29 . Ein Einfluss von MGO auf Lymphozyten und Granulozyten hinsichtlich der Expression von HLA-DR konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

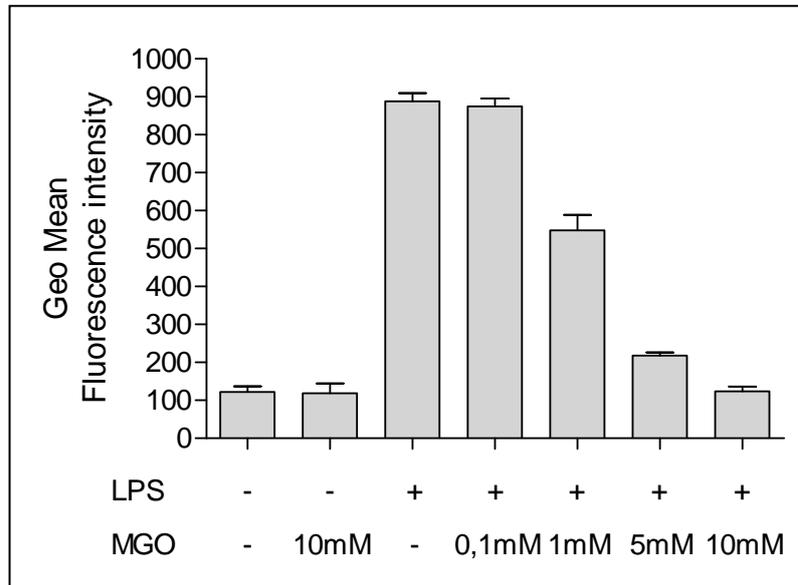


Abbildung 37: Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der mittleren MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

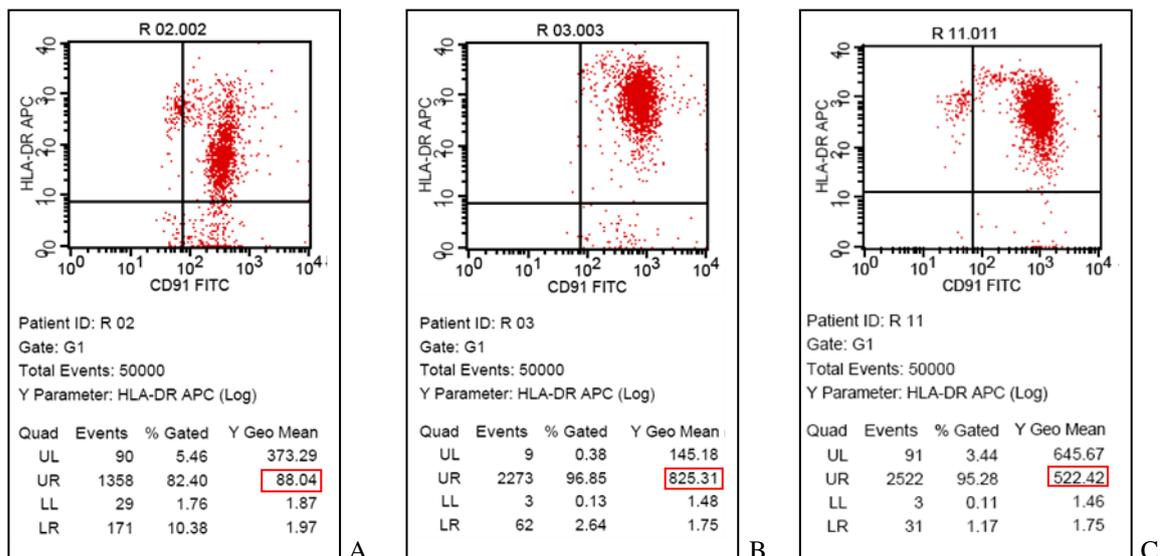


Abbildung 38: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit Methylglyoxal als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 1 mM MGO und 10 ng/ml LPS.

3.4.5.2 Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von CD14

Die isolierte Behandlung der Versuchsansätze mit 10 mM MGO ohne Stimulation mit LPS führte zu keiner Veränderung der MFI und damit der Expression von CD14 auf Monozyten. Nach der Stimulation mit 10 ng/ml LPS erhöhte sich die MFI von 477.91 ± 10.88 auf 676.72 ± 10.44 . Die Koinkubation von LPS und MGO zeigte eine konzentrationsabhängige Reduktion der MFI und damit der Expression von CD14. Bei der Behandlung mit 1 mM MGO und 10 ng/ml LPS konnte eine Erniedrigung der MFI auf 606.81 ± 7.04 und bei 10 mM MGO auf 268.42 ± 14.95 verzeichnet werden. Ein Einfluss von MGO auf Lymphozyten und Granulozyten hinsichtlich der Expression von CD14 konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

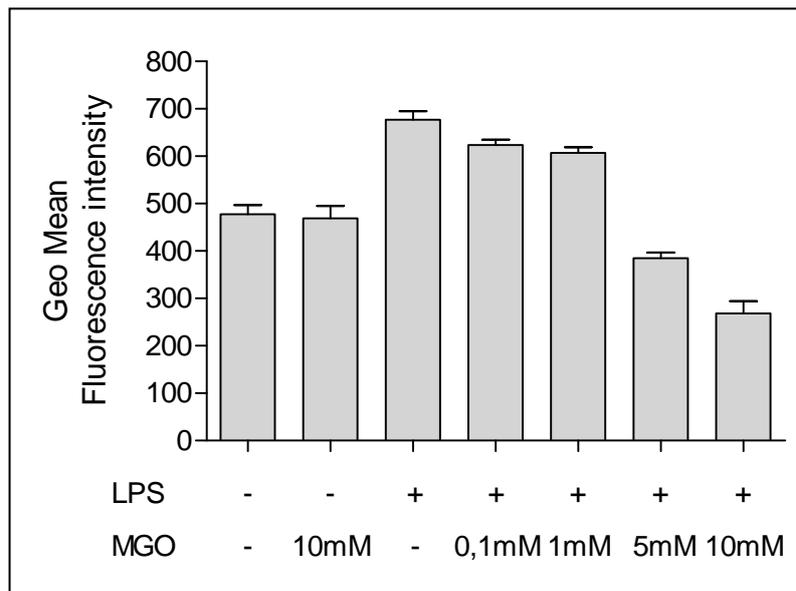


Abbildung 39: Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

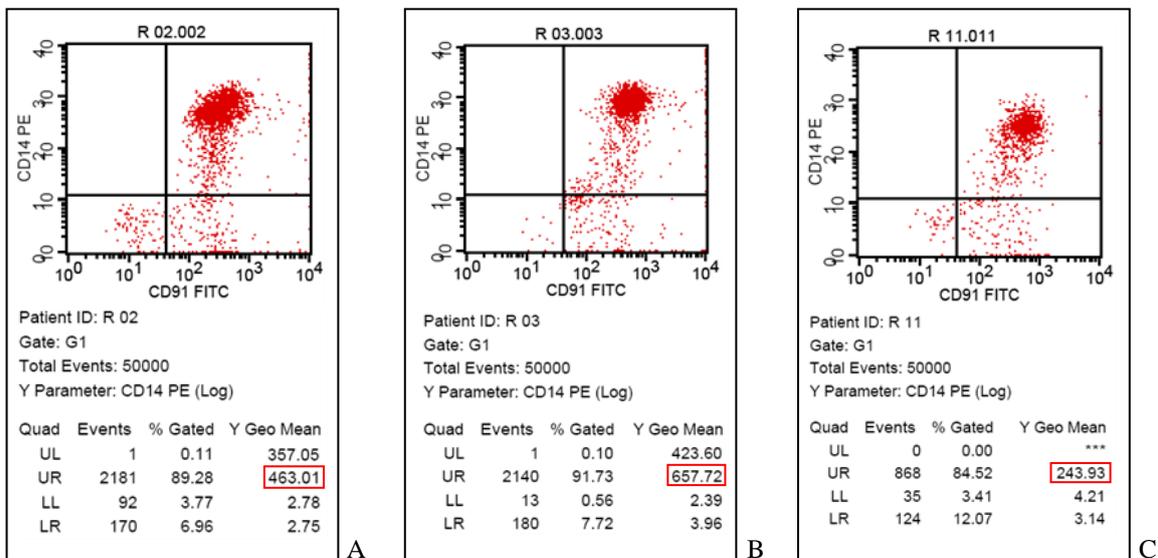


Abbildung 40: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit Methylglyoxal als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 10 mM MGO und 10 ng/ml LPS.

3.4.5.3 Der Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von CD91

Die isolierte Behandlung der Blutproben mit 10 mM MGO ohne Stimulation mit LPS führte zu keiner Veränderung der MFI und damit der Expression von CD91 auf Monozyten. Nach der Stimulation mit 10 ng/ml LPS erhöhte sich die MFI von 337.22 ± 5.58 auf 529.41 ± 3.76 . Die Koinkubation von LPS und MGO zeigte jedoch nur geringe Veränderungen im Hinblick auf die MFI und damit die Expression von CD91. Bei der Behandlung mit 1 mM MGO und 10 ng/ml LPS verringerte sich die MFI auf 481.53 ± 8.94 und bei der Zugabe von 10 mM MGO konnte eine MFI von 545.46 ± 26.66 ermittelt werden. Eine Erhöhung oder Verminderung der Expression von CD91 durch MGO auf Lymphozyten und Granulozyten konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

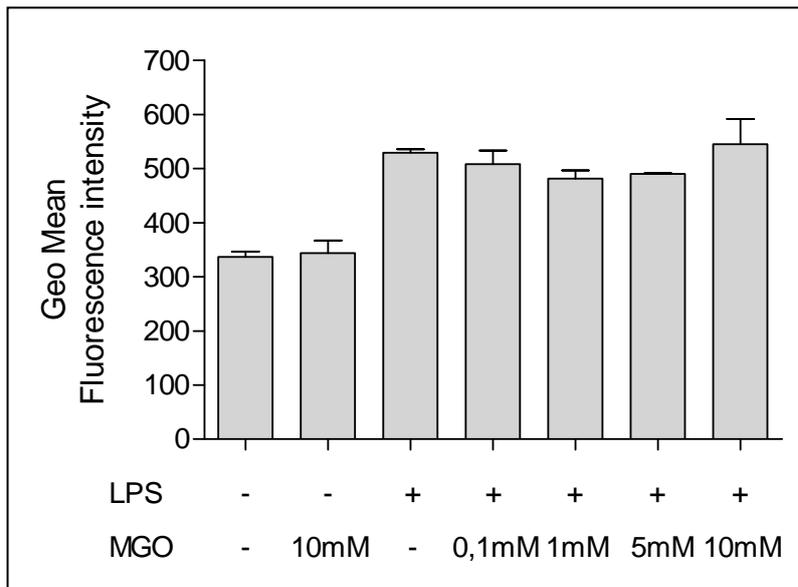


Abbildung 41: Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden. Zur Analyse der MFI wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität verwendet.

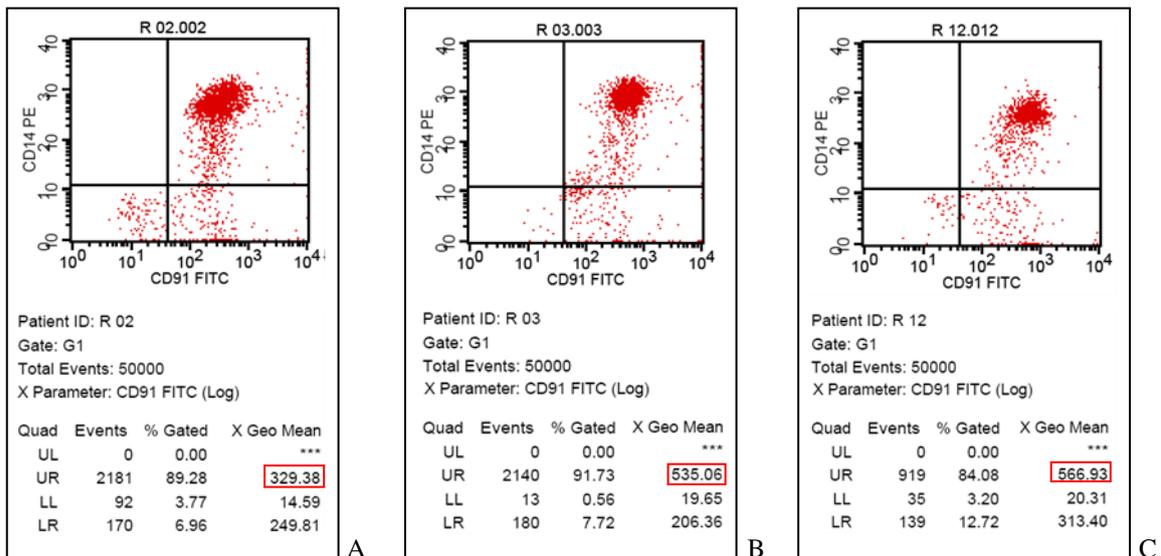


Abbildung 42: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit Methylglyoxal als Dot-Plot. A) unbehandelte Kontrollprobe, B) 10 ng/ml LPS, C) Koinkubation mit 10 mM MGO und 10 ng/ml LPS.

3.5 Der Einfluss von Ethylpyruvat und strukturell verwandter Verbindungen auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP-1-Zellen

In den bereits beschriebenen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass sowohl EP als auch die strukturell verwandten Substanzen EL, DEL und BL immunmodulatorische Effekte aufweisen. Sowohl die verstärkte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokinen als auch die Expression von HLA-DR und CD14 konnten nach Stimulation mit 10 ng/ml LPS deutlich gesenkt werden. Im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 20 mM wurden dosisabhängige Effekte nachgewiesen, teilweise konnte der Referenzwert der unbehandelten Kontrollproben erreicht werden. Zur weiteren Analyse des möglichen Zusammenhangs zwischen der Hemmung des Glyoxalase-Stoffwechsels und der anti-inflammatorischen Effekte wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt. In diesen Experimenten sollte nachgewiesen werden, dass die dargestellte Beeinflussung von Immunprozessen nicht auf eine Induktion des apoptotischen oder nekrotischen Zelluntergangs zurückzuführen ist.

Dazu wurden periphere mononukleäre Zellen aus humanem Vollblut, PBMCs, isoliert und mit den genannten Verbindungen für drei, zwölf und vierundzwanzig Stunden inkubiert. In der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die Monozyten und Lymphozyten separat markiert und analysiert. Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf Beobachtungen bei der Monozytenpopulation, da bei den Lymphozyten keine bzw. nur sehr geringe Einflüsse nachgewiesen werden konnten. Neben EP, EL und DEL erfolgte ebenso die Analyse des Einflusses der Grundsubstanz Pyruvat und von Ethanol auf Apoptose und Nekrose, um einen Einfluss der Hydrolyseprodukte der Ester auszuschließen. Weiterhin wurde eine mögliche Beeinflussung der Apoptose dieser Substanzen auch bei einer Zelllinie mit einer hohen Aktivität der Glyoxalase I, den monozytären THP-1-Zellen, untersucht. Nach der Behandlung erfolgte die Färbung der Zellen mit Annexin-V FITC und PI und mit Hilfe des Durchflusszytometers die Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität. Aus den gewonnenen Messwerten wurde jeweils ein Dot-Plot erstellt und darin die prozentuale Zellzahl für vitale, apoptotische und nekrotische Zellen bestimmt.

3.5.1 Der Einfluss von Ethylpyruvat auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP-1-Zellen

Die Untersuchung von EP auf seine apoptose- und nekroseinduzierenden Eigenschaften ergab deutliche Unterschiede zwischen PBMCs und THP-1-Zellen. Während sich nach dreistündiger Behandlung der Zellen mit 20 mM EP der Anteil vitaler PBMCs von 93.70 ± 1.42 % auf 84.73 ± 3.31 % verringerte, reduzierte sich der Prozentsatz vitaler THP-1-Zellen von 94.89 ± 0.41 % auf 58.14 ± 3.77 %. Der nekrotische Anteil der PBMCs erhöhte sich dabei von 2.63 ± 0.68 % auf 5.83 ± 3.18 %, dagegen stieg der Prozentsatz nekrotischer THP-1-Zellen von 2.99 ± 0.48 % auf 31.59 ± 2.81 %. Die Rate apoptotischer Zellen stieg bei den PBMCs von 3.67 ± 0.84 % auf 9.43 ± 1.03 % und bei den THP-1-Zellen von 2.13 ± 0.18 % auf 10.27 ± 1.28 %. Starke Unterschiede konnten auch nach 12 Stunden festgestellt werden. Während sich die Zahl der vitalen Zellen bei den PBMCs nur gering auf 74.04 ± 5.51 % reduzierte, verringerte sich der vitale Anteil bei den THP-1-Zellen drastisch auf 4.47 ± 2.35 %. Dabei stieg bei den PBMCs der nekrotische Anteil auf 22.69 ± 6.13 % und bei den THP-1-Zellen sogar auf 92.30 ± 3.85 %. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen betrug bei den PBMCs 3.27 ± 1.23 % und bei den THP-1-Zellen 3.23 ± 1.73 %. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden verringerte sich der Anteil vitaler Zellen bei den PBMCs auf 31.93 ± 1.59 % und bei den THP-1-Zellen auf 0.28 ± 0.09 %. Dagegen erhöhte sich der Prozentsatz nekrotischer Zellen bei den PBMCs auf 67.16 ± 1.30 % und bei den Tumorzellen auf 94.84 ± 2.16 %. Der Anteil apoptotischer Zellen bezifferte sich bei den PBMCs auf 0.91 ± 0.74 % und bei den THP-1-Zellen auf 4.32 ± 2.65 %.

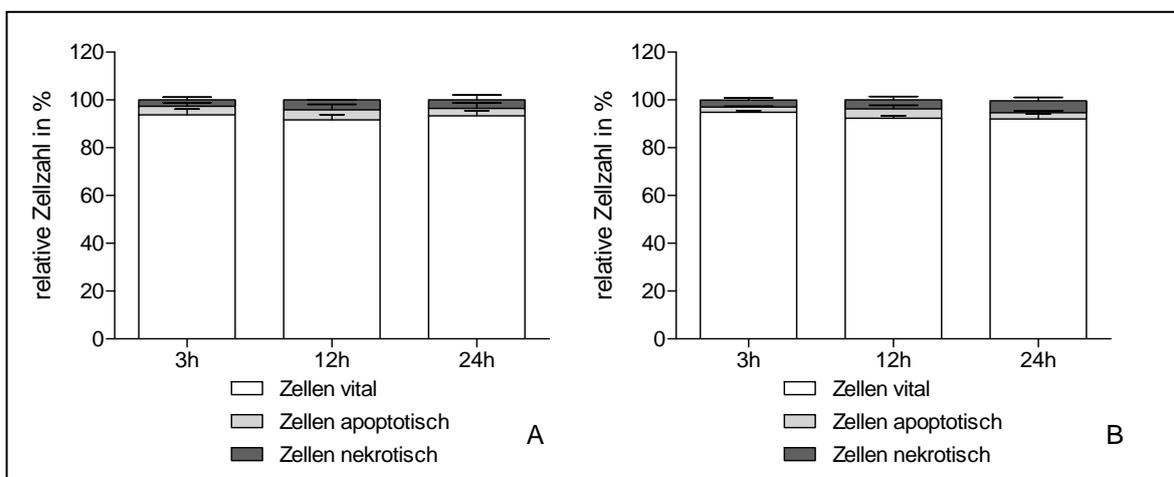


Abbildung 43: Detektion der Apoptose und Nekrose von unbehandelten Zellen. A) PBMCs, B) THP-1-Zellen nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden.

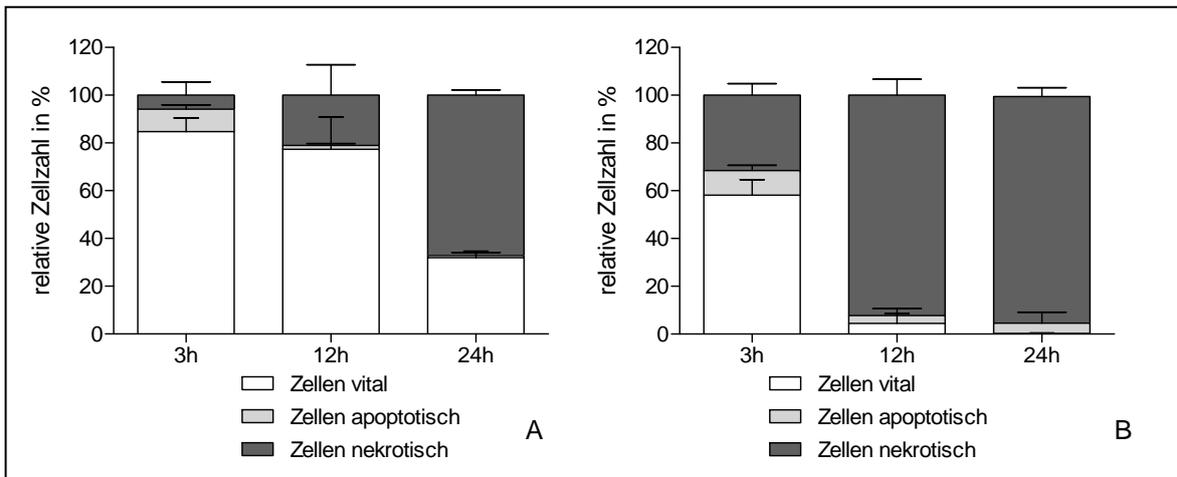


Abbildung 44: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM Ethylpyruvat. A) PBMCs und B) THP-1-Zellen nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden.

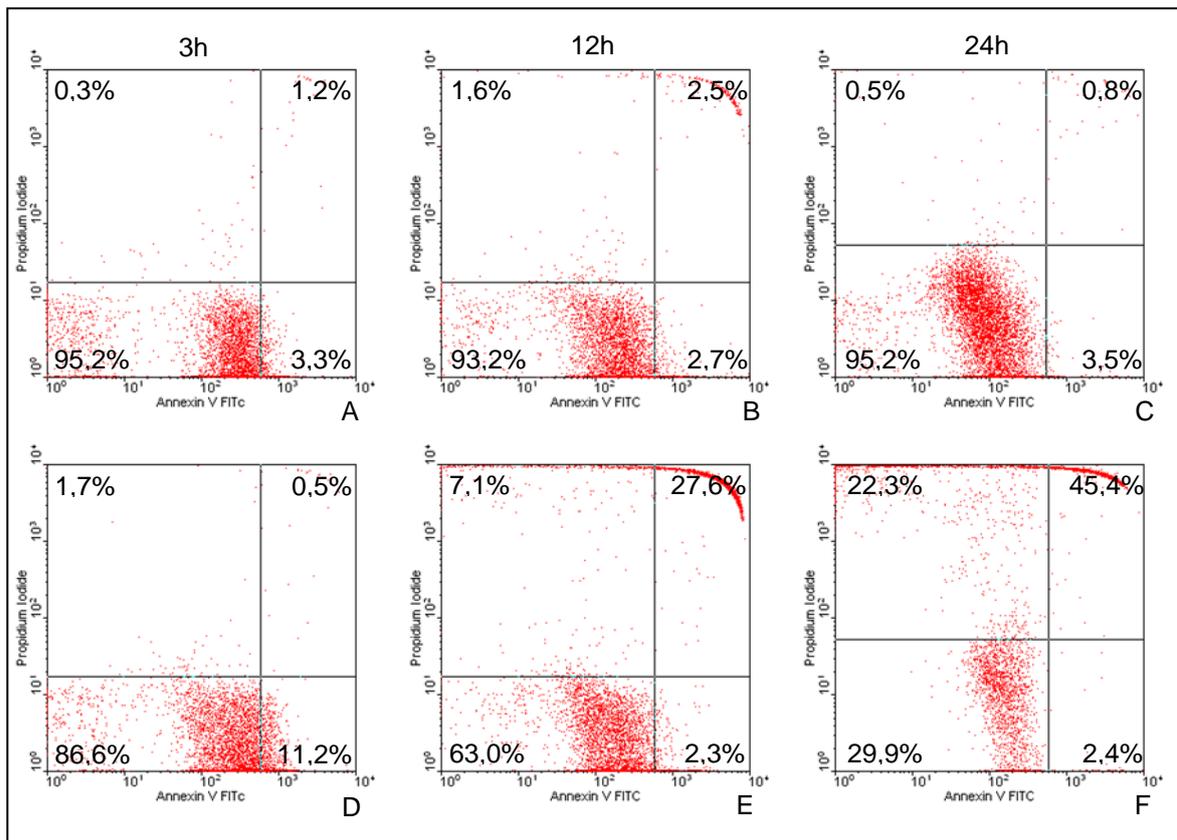


Abbildung 45: Grafische Darstellung der Detektion von Apoptose und Nekrose von PBMCs. A), B) und C) Dotplots für die unbehandelten Kontrollproben nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden. D), E) und F) mit 20 mM EP behandelte PBMCs nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden. Im unteren linken Quadranten befinden sich die vitalen Zellen, im unteren rechten Quadranten die apoptotischen Zellen und im oberen rechten die nekrotischen Zellen. Die Zellen im oberen linken Quadranten werden wie bereits beschrieben ebenfalls zu der nekrotischen Population gerechnet.

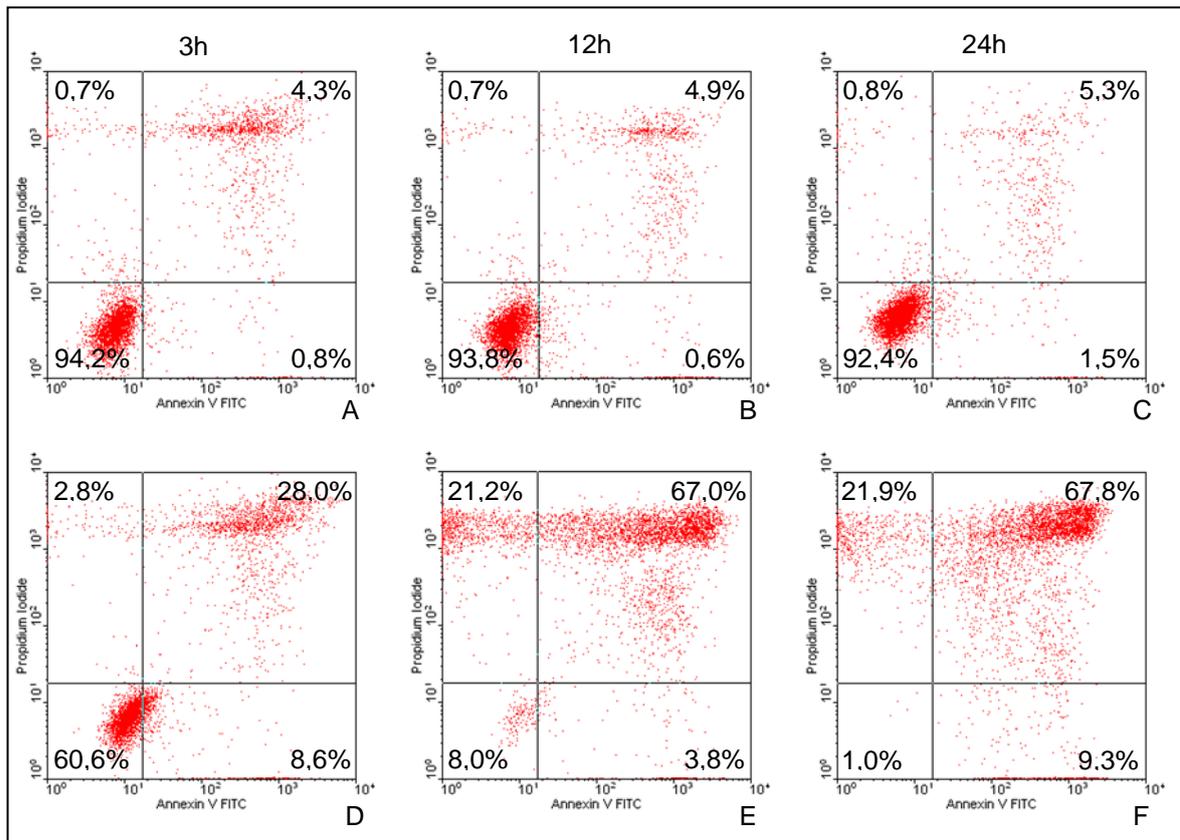


Abbildung 46: Grafische Darstellung der Detektion von Apoptose und Nekrose von THP-1-Zellen. A), B) und C) Dotplots für die unbehandelten Kontrollproben nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden. D), E) und F) mit 20 mM EP behandelte THP-1-Zellen nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden. Im unteren linken Quadranten befinden sich die vitalen Zellen, im unteren rechten Quadranten die apoptotischen Zellen und im oberen rechten die nekrotischen Zellen. Die Zellen im oberen linken Quadranten werden wie bereits beschrieben ebenfalls zu der nekrotischen Population zugeordnet.

Weiterhin wurde untersucht, ob ein konzentrationsabhängiger Einfluss von EP auf die Induktion von Apoptose bzw. Nekrose vorliegt. Dazu erfolgte die Inkubation der PBMCs und der THP-1-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen EP im Dosisbereich zwischen 1 mM und 20 mM. Es wurde eine Behandlungsdauer von 12 Stunden gewählt, da bei dieser Zeitspanne sowohl bei PBMCs als auch bei THP-1-Zellen deutliche Effekte bei der Behandlung mit 20 mM EP zu sehen sind.

Sowohl bei den PBMCs als auch bei den THP-1-Zellen konnte ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Zellvitalität festgestellt werden. Nach Behandlung mit 10 mM EP verminderte sich der Prozentsatz vitaler Zellen bei den PBMCs von $92.10 \pm 0.78 \%$ auf $81.83 \pm 1.71 \%$ und nach Zugabe von 20 mM auf $74.20 \pm 2.76 \%$. Dagegen stieg der Anteil nekrotischer Zellen bei der Zugabe von 10 mM EP von $5.17 \pm 0.83 \%$ auf $10.80 \pm 1.08 \%$ und nach Behandlung der Zellen mit 20 mM EP auf $22.10 \pm$

1.97 %. Die Rate apoptotischer PBMCs erhöhte sich nach Zugabe von 10 mM EP von 2.73 ± 0.22 % auf 7.37 ± 0.63 %, nach der Behandlung mit 20 mM betrug diese 3.60 ± 1.70 %. Die Zahl vitaler THP-1-Zellen verringerte sich ebenfalls konzentrationsabhängig, jedoch wesentlich stärker als die der PBMCs. Nach Zugabe von 10 mM EP verringerte sich nach 12 Stunden der Anteil vitaler Zellen von 93.70 ± 0.44 % auf 51.13 ± 6.62 % und nach Behandlung mit 20 mM auf 6.03 ± 0.95 %. Dabei stieg der Anteil nekrotischer Zellen bei der Zugabe von 10 mM EP von 1.67 ± 1.11 % auf 31.83 ± 9.23 % und nach Behandlung der Zellen mit 20 mM EP auf 89.73 ± 1.42 %. Die Rate apoptotischer THP-1-Zellen erhöhte sich nach Zugabe von 10 mM EP von 4.63 ± 0.90 % auf 17.03 ± 2.77 %, nach der Behandlung mit 20 mM betrug diese 4.23 ± 0.97 %.

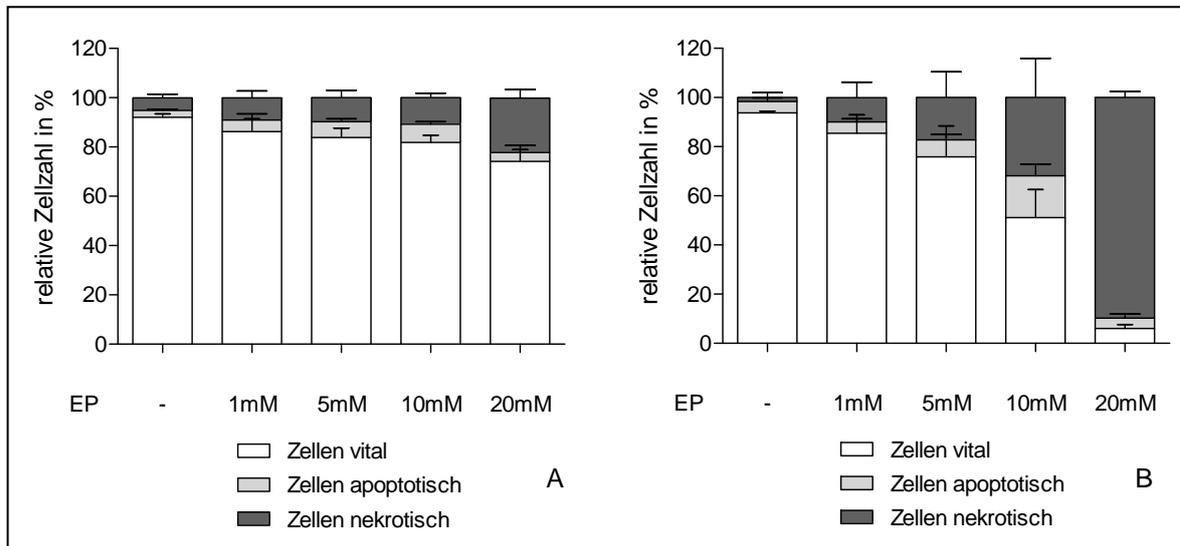


Abbildung 47: Detektion der Apoptose und Nekrose nach konzentrationsabhängiger Behandlung mit Ethylpyruvat. Die Zellen wurden mit 1 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM EP für 12 Stunden inkubiert. A) PBMCs und B) die THP-1-Zellen.

3.5.2 Der Einfluss von L-Ethyllaktat auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP-1-Zellen

Nach einer Inkubationsdauer von drei Stunden mit 20 mM EL reduzierte sich der Anteil vitaler PBMCs von 93.70 ± 1.42 % auf 92.81 ± 2.14 %, bei den THP-1-Zellen verringerte sich der vitale Prozentsatz von 94.89 ± 0.41 % auf 76.20 ± 3.36 %. Der nekrotische Anteil der PBMCs erhöhte sich dabei von 2.63 ± 0.68 % auf 3.69 ± 1.21 %, dagegen stieg der

Prozentsatz nekrotischer THP-1-Zellen von $2.99 \pm 0.48 \%$ auf $7.17 \pm 0.53 \%$. Die Rate apoptotischer Zellen betrug bei den PBMCs nach einer Inkubationszeit von drei Stunden $3.50 \pm 1.18 \%$ und bei den THP-1-Zellen $16.63 \pm 3.84 \%$. Während sich nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden die Zahl der vitalen Zellen bei den PBMCs auf $77.43 \pm 7.13 \%$ reduzierte, verringerte sich der vitale Anteil bei den THP-1-Zellen auf $55.43 \pm 8.14 \%$. Dabei stieg bei den PBMCs der nekrotische Anteil auf $17.96 \pm 6.89 \%$ und bei den THP-1-Zellen auf $30.65 \pm 6.46 \%$. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen betrug bei den PBMCs nach zwölfstündiger Behandlung $4.61 \pm 0.74 \%$ und bei den THP-1-Zellen $13.92 \pm 1.70 \%$. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit 20 mM EL verringerte sich der Anteil vitaler Zellen bei den PBMCs bzw. Monozyten auf $64.36 \pm 6.05 \%$ und bei den THP-1-Zellen auf $24.90 \pm 9.20 \%$. Dagegen bezifferte sich der nekrotische Prozentsatz bei den PBMCs auf $14.71 \pm 5.13 \%$ und bei den Tumorzellen auf $69.99 \pm 10.59 \%$. Der Anteil apoptotischer Zellen betrug bei den PBMCs $20.93 \pm 9.53 \%$ und bei den THP-1-Zellen $5.11 \pm 1.45 \%$.

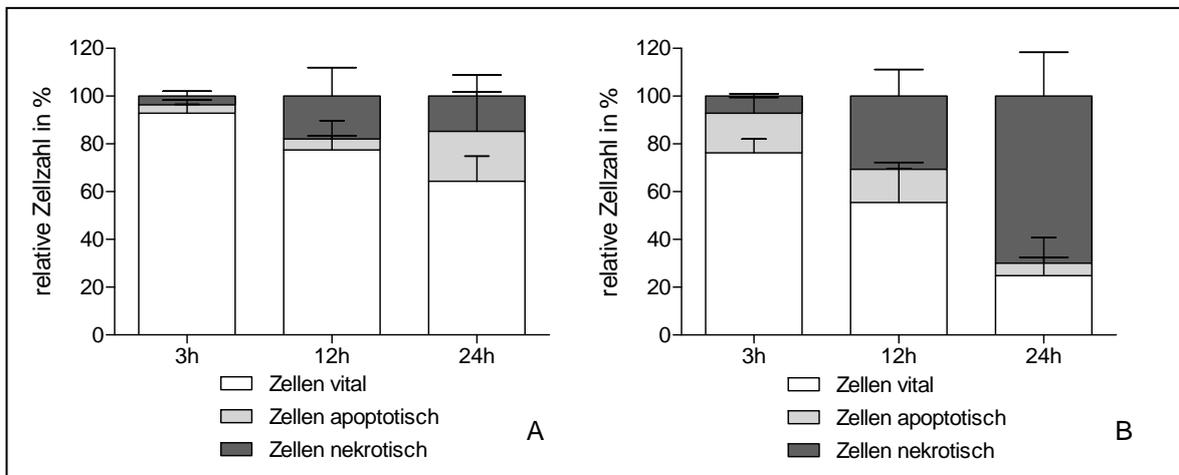


Abbildung 48: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM L-Ethyllaktat. A) PBMCs und B) THP-1-Zellen nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden.

Entsprechend der Versuchsreihe mit EP wurden sowohl die PBMCs als auch die THP-1-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von EL behandelt und danach der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt. Als Inkubationsdauer wurde ebenfalls ein Intervall von 12 Stunden festgelegt, da sich nach dieser Behandlungszeit bereits deutliche Unterschiede zwischen den Tumorzellen und den PBMCs zeigten. Sowohl bei den PBMCs

als auch bei den THP-1-Zellen konnte eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Zellvitalität nach Zugabe von EL festgestellt werden. Nach Behandlung mit 10 mM EL verminderte sich der Prozentsatz vitaler PBMCs von 92.23 ± 1.30 % auf 91.53 ± 1.51 % und nach Zugabe von 20 mM auf 79.93 ± 2.57 %. Dagegen veränderte sich der Anteil nekrotischer Zellen bei der Zugabe von 10 mM EL von 4.90 ± 0.86 % auf 4.17 ± 0.72 % und nach Behandlung der Zellen mit 20 mM EL auf 13.00 ± 1.65 %. Die Rate apoptotischer PBMCs erhöhte sich nach Zugabe von 10 mM EL von 2.87 ± 0.57 % auf 4.30 ± 0.82 %, nach der Behandlung mit 20 mM betrug diese 7.07 ± 0.93 %. Der Anteil vitaler THP-1-Zellen verringerte sich nach Zugabe von 10 mM EL nach 12 Stunden von 93.70 ± 0.44 % auf 82.53 ± 5.10 % und nach Behandlung mit 20 mM auf 64.57 ± 5.00 %. Dabei stieg der Anteil nekrotischer Zellen bei der Zugabe von 10 mM EL von 1.67 ± 1.11 % auf 12.63 ± 4.45 % und nach Behandlung der Zellen mit 20 mM auf 25.40 ± 3.87 %. Der Prozentsatz apoptotischer THP-1-Zellen erhöhte sich nach Zugabe von 10 mM EL von 4.63 ± 0.90 % auf 4.83 ± 0.67 %, nach der Behandlung mit 20 mM betrug diese 10.03 ± 1.33 %.

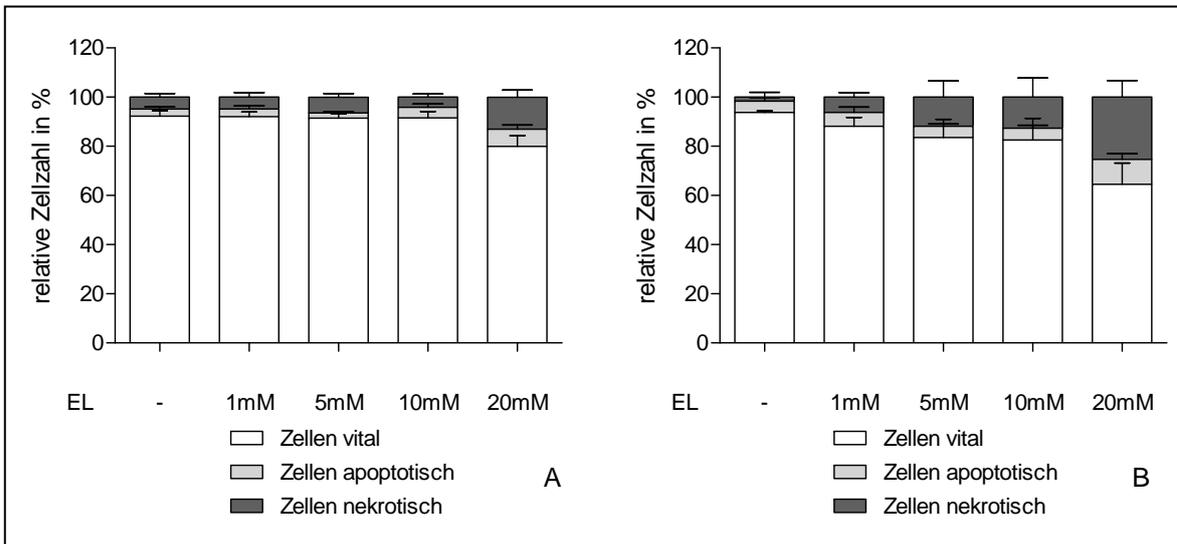


Abbildung 49: Detektion der Apoptose und Nekrose nach konzentrationsabhängiger Behandlung mit L-Ethyllaktat. Die Zellen wurden mit 1 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM EL für 12 Stunden inkubiert. A) PBMCs und B) THP-1-Zellen.

3.5.3 Der Einfluss von D-Ethyllaktat auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP-1-Zellen

Nach einer Inkubationsdauer von drei Stunden mit 20 mM DEL änderte sich der Anteil vitaler PBMCs nur geringfügig auf 95.00 ± 0.82 %, bei den THP-1-Zellen verringerte sich dagegen der vitale Prozentsatz von 94.89 ± 0.41 % auf 77.70 ± 1.70 %. Der nekrotische Anteil der PBMCs betrug dabei 1.96 ± 0.63 %, dagegen stieg der Prozentsatz nekrotischer THP-1-Zellen von 2.99 ± 0.48 % auf 12.40 ± 2.27 %. Die Rate apoptotischer Zellen bezifferte sich bei den PBMCs nach einer Inkubationszeit von drei Stunden auf 2.71 ± 0.35 % und erhöhte sich bei den THP-1-Zellen von 2.13 ± 0.18 % auf 9.90 ± 1.00 %. Während sich nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden die Zahl der vitalen Zellen bei den PBMCs unwesentlich auf 93.30 ± 0.53 % veränderte, reduzierte sich der vitale Anteil bei den THP-1-Zellen auf 59.53 ± 1.61 %. Dabei änderte sich bei den PBMCs der nekrotische Zellanteil auf 2.80 ± 0.10 % und bei den THP-1-Zellen auf 32.63 ± 2.31 %. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen betrug bei den PBMCs nach zwölfstündiger Behandlung 3.90 ± 0.44 % und bei den THP-1-Zellen 7.83 ± 0.99 %. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit 20 mM DEL verringerte sich der Anteil vitaler Zellen bei den PBMCs bzw. Monozyten auf 75.20 ± 2.59 % und bei den THP-1-Zellen auf 46.57 ± 3.24 %. Dagegen bezifferte sich der nekrotische Prozentsatz bei den PBMCs auf 12.43 ± 1.03 % und bei den Tumorzellen auf 41.30 ± 4.36 %. Der Anteil apoptotischer Zellen betrug bei den PBMCs 12.37 ± 2.31 % und bei den THP-1-Zellen 12.13 ± 1.13 %.

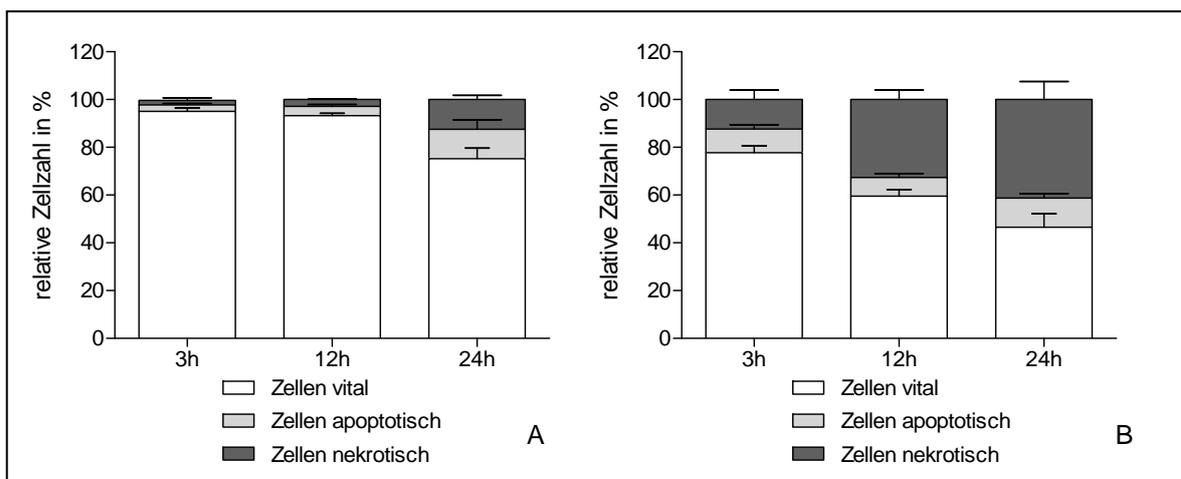


Abbildung 50: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM D-Ethyllaktat. A) PBMCs und B) THP-1-Zellen nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden.

3.5.4 Der Einfluss von Pyruvat auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP-1-Zellen

Nachdem der Einfluss der strukturell verwandten Verbindungen EP, EL und DEL auf die Induktion von Apoptose bzw. Nekrose untersucht worden waren, erfolgte eine Versuchsreihe mit der Grundsubstanz Pyruvat. Nach einer Inkubationsdauer von drei Stunden mit 20 mM Pyruvat reduzierte sich der Anteil vitaler PBMCs von 93.70 ± 1.42 % auf 84.67 ± 3.71 %, bei den THP-1-Zellen verringerte sich der vitale Prozentsatz von 94.89 ± 0.41 % auf 91.96 ± 1.66 %. Der nekrotische Anteil der PBMCs änderte sich dabei geringfügig auf 1.85 ± 0.51 %, dagegen stieg der Prozentsatz nekrotischer THP-1-Zellen von 2.99 ± 0.48 % auf 4.91 ± 1.10 %. Die Rate apoptotischer Zellen stieg bei den PBMCs nach einer Inkubationszeit von drei Stunden von 3.67 ± 0.84 % auf 13.49 ± 4.09 % und erhöhte sich bei den THP-1-Zellen von 2.13 ± 0.18 % auf 3.13 ± 0.57 %. Während sich nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden die Zahl der vitalen Zellen bei den PBMCs auf 86.00 ± 0.66 % verringerte, reduzierte sich der vitale Anteil bei den THP-1-Zellen auf 80.08 ± 2.47 %. Dabei erhöhte sich bei den PBMCs der nekrotische Anteil auf 6.66 ± 1.90 % und bei den THP-1-Zellen auf 12.35 ± 3.65 %. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen betrug bei den PBMCs nach zwölfstündiger Behandlung 7.34 ± 1.65 % und bei den THP-1-Zellen 7.57 ± 1.20 %. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit 20 mM Pyruvat verringerte sich der Anteil vitaler Zellen bei den PBMCs auf 80.25 ± 5.59 % und bei den THP-1-Zellen auf 66.63 ± 1.90 %. Dagegen bezifferte sich der Prozentsatz nekrotischer Zellen bei den PBMCs auf 4.33 ± 0.99 % und bei den Tumorzellen auf 22.26 ± 1.59 %. Der Anteil apoptotischer Zellen stieg bei den PBMCs auf 15.42 ± 5.60 % und bei den THP-1-Zellen auf 11.11 ± 1.29 %.

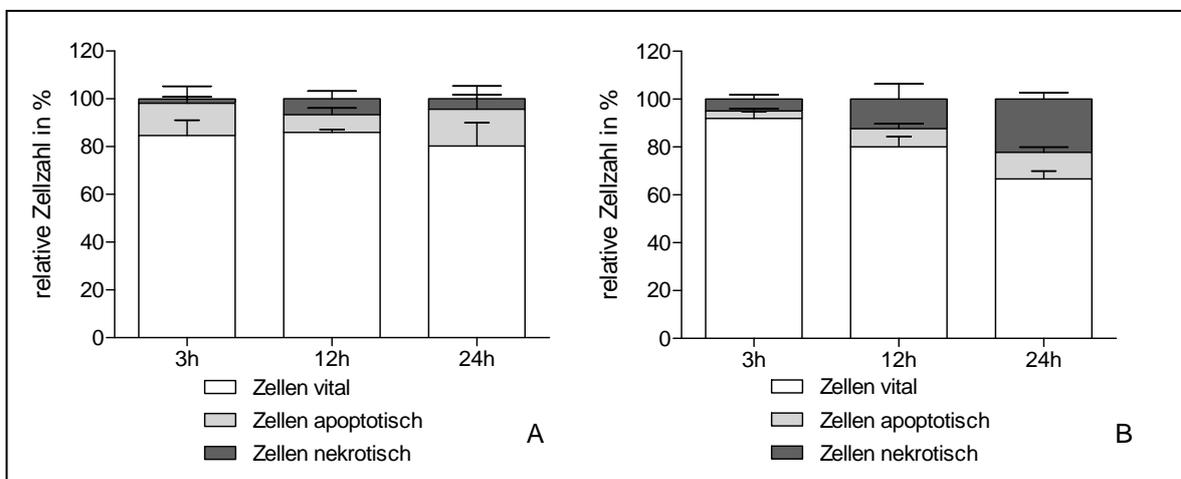


Abbildung 51: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM Pyruvat. A) PBMCs und B) THP-1-Zellen nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden.

3.5.5 Der Einfluss von Ethanol auf Apoptose und Nekrose von PBMCs und THP-1-Zellen

Obwohl der Ester EP eine vielfach höhere Stabilität in wässriger Lösung als Pyruvat besitzt, erfolgte dennoch zum Ausschluss einer interferierenden Wirkung der Hydrolyseprodukte die Analyse des Einflusses von Ethanol auf Apoptose und Nekrose. Hierfür wurden PBMCs und THP-1-Zellen für 3, 12 und 24 Stunden mit 20 mM Ethanol inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von drei Stunden mit 20 mM Ethanol war der Anteil vitaler PBMCs nahezu unverändert, bei den THP-1-Zellen verringerte sich der vitale Prozentsatz von 94.89 ± 0.41 % auf 85.40 ± 2.08 %. Der nekrotische Anteil der THP-1-Zellen stieg dabei von 2.99 ± 0.48 % auf 7.47 ± 0.63 %. Die Rate apoptischer THP-1-Zellen erhöhte sich dabei von 2.13 ± 0.18 % auf 5.47 ± 0.52 %. Während sich nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden die Zahl der vitalen Zellen bei den PBMCs nur geringfügig von 91.66 ± 1.27 auf 88.87 ± 1.25 % verringerte, reduzierte sich der vitale Anteil bei den THP-1-Zellen auf 76.73 ± 1.83 %. Dabei erhöhte sich bei den PBMCs der nekrotische Anteil minimal auf 6.43 ± 0.15 % und bei den THP-1-Zellen auf 16.70 ± 2.21 %. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen betrug bei den PBMCs nach zwölfstündiger Behandlung 4.70 ± 1.12 % und bei den THP-1-Zellen 6.57 ± 0.90 %. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit 20 mM Ethanol verringerte sich der Anteil vitaler Zellen bei den PBMCs minimal auf 90.53 ± 1.23 % und bei den THP-1-Zellen auf 73.33 ± 1.66 %. Dagegen bezifferte sich der Prozentsatz nekrotischer Zellen bei den PBMCs auf 5.00 ± 0.75 % und bei den THP-1-Zellen auf 20.93 ± 2.03 %. Der Anteil apoptotischer Zellen stieg bei den PBMCs auf 4.47 ± 1.23 % und bei den THP-1-Zellen auf 5.73 ± 0.56 %.

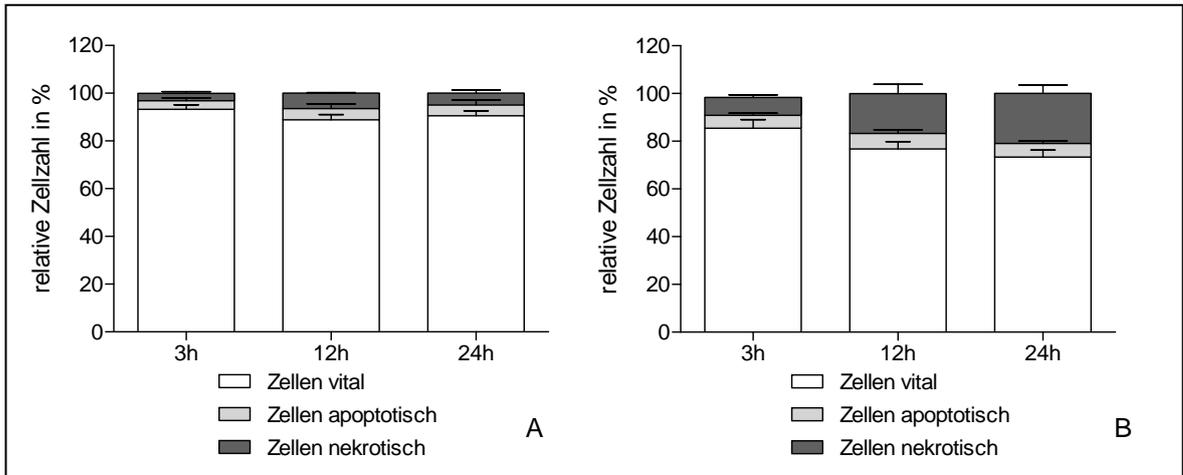


Abbildung 52: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM Ethanol. A) PBMCs und B) THP-1-Zellen nach einer Inkubationszeit von 3, 12 und 24 Stunden.

4. Diskussion

4.1 Die Hemmung der Glyoxalase I durch Ethylpyruvat

In einer Vielzahl von Publikationen konnten verschiedene anti-inflammatorische Eigenschaften von Pyruvat aufgezeigt werden. Protektive Effekte dieser Substanz wurden an verschiedenen Modellen des akuten Nierenversagens, der Myokardischämie, des septischen Schocks sowie des Apoplex nachgewiesen (Salahudeen et al. 1991, Cicalese et al. 1996, Slovin et al. 2001). Allerdings weist Pyruvat in wässriger Lösung eine geringe Stabilität auf, umgehend erfolgt eine Aldol-ähnliche Kondensationsreaktion zu 2-Hydroxy-2-Methyl-4-Ketoglutarat, auch bekannt als Parapyruvat. Weiterhin erfolgt in wässriger Lösung eine spontane Hydratation des Pyruvats zu Pyruvathydrat. Dabei sind weder Parapyruvat noch Pyruvathydrat in der Lage, als Antioxidants zu agieren (Montgomery und Webb 1956, Montgomery et al. 1956, Willems et al. 1978).

Um die Probleme der Stabilität in wässriger Lösung zu umgehen, aber dennoch die positiven Eigenschaften des Pyruvats zu nutzen, rückte dessen Ester EP in den Fokus des Interesses. In zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen konnte auch bei EP ein protektiver Effekt in verschiedenen Modellen der Sepsis, des hämorrhagischen Schocks, bei Verbrennungsschäden, des Apoplex oder der Ischämie und Reperfusion aufgezeigt werden. Dabei war der Einfluss von EP mitunter deutlich stärker ausgeprägt als der des Pyruvats (Sappington et al. 2003b, Kim et al. 2005, Hauser et al. 2005, Dong et al. 2005a). Dennoch konnte die exakte biochemische Grundlage für die vielfältigen positiven Eigenschaften von EP noch nicht abschließend geklärt werden. In dieser Arbeit wurde versucht, die Hemmung der Glo-I durch EP als mögliche neue Erklärung für die vielfältigen Eigenschaften des EP aufzuzeigen.

Die Glo-I stellt ein Enzym zur Entgiftung von Alphaoxoaldehyden wie MGO dar (Racker 1951, Carrington und Douglas 1985). Um unsere Theorie zu bestätigen, dass EP einen Inhibitor der Glo-I repräsentiert, wurde zunächst die Aktivität der Glo-I in PBMCs und den monozytären THP-1-Zellen bestimmt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die THP-1-Zellen eine wesentlich höhere Aktivität der Glo-I besitzen als die PBMCs (siehe Abbildung 9). Diese Ergebnisse spiegeln die Erkenntnis von Ayoub et al. sowie von Thornalley wider, dass die Glo-I in Tumorzellen eine höhere Aktivität als in den korrespondierenden nichtmalignen Geweben aufweisen kann. Allerdings wurde anhand von weiteren Untersuchungen nachgewiesen, dass die Aktivität der Glo-I von Tumorzellen im Vergleich zu nichtmalignen Geweben auch identisch oder vermindert sein kann

(Jerzykowski et al. 1975, Hooper et al. 1987, Thornalley 1990, Ayoub et al. 1993, Thornalley 1993).

In weiteren Versuchsreihen wurde der Nachweis erbracht, dass EP die enzymatische Reaktion der humanen Glo-I inhibiert (siehe Abbildung 8). Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist die exakte biochemische Basis dieser Eigenschaft des EP noch nicht abschließend geklärt und wird Gegenstand zukünftiger wissenschaftlicher Arbeiten sein. Dennoch reflektiert der kalkulierte IC_{50} -Wert von 7.01 ± 1.9 mM bei einer Substratkonzentration von 2 mM die effektive Konzentration von EP auf zellulärer Ebene, wie auch schon aus weiteren Publikationen bekannt (Song et al. 2004). Überraschenderweise fungiert die reduzierte Form, EL, nicht als ein Inhibitor der isolierten humanen Glo-I *in vitro* (siehe Abbildung 8). Diese Erkenntnis lässt den Schluss zu, dass die inhibitorische Wirkung einer Substanz auf die Glo-I an das Vorhandensein von „Dikarbonyl“-Strukturen ($O=C-C=O$), die von Estern der α -Oxo-Karbonsäuren gebildet werden, gebunden ist. Weiterhin konnte die Hemmung der Glo-I durch EP nicht durch die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an GSH aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Hierdurch wird ersichtlich, dass EP seine Wirkungen nicht durch eine Reduktion der GSH-Konzentration entfaltet, sondern einen direkten Enzymhemmer darstellt.

Um weitere Einblicke in die Wirkung von EP auf zellulärer Ebene zu erhalten, wurde der Einfluss von EP und weiteren α -Keto-Karbonsäureester auf immunkompetente Zellen untersucht.

4.2 Der Einfluss von Ethylpyruvat und strukturell verwandter Verbindungen auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine

Zur Überprüfung unserer Theorien, dass die beschriebenen anti-inflammatorischen Effekte von EP zumindest teilweise durch die Inhibierung der Glo-I vermittelt werden, wurde humanes Vollblut mit dem Endotoxin LPS stimuliert und mit EP und verschiedenen Laktat-Estern koinkubiert. Die Zugabe von 10 ng/ml LPS zum Vollblut induzierte die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α , aber nicht von IL-10. Die Koinkubation des Vollblut-Ansatzes mit LPS und steigenden Konzentrationen von EP verminderte die Zytokinfreisetzung konzentrationsabhängig (siehe Abbildung 10), Ausnahme bildete ein leichter Konzentrationsanstieg von IL-1 β bei einer Behandlungskonzentration von 1 mM EP. Kontrollexperimente zeigten keinen

Anstieg der Zytokinproduktion bei der isolierten Zugabe von EP zum Vollblut ohne LPS-Stimulation. Die Ergebnisse in dieser Arbeit sind daher konform mit den bisher belegten Daten zur Wirkung von EP im Hinblick auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nach LPS-Stimulation (Ulloa et al. 2002, Venkataraman et al. 2002).

Überraschenderweise zeigte die Versuchsreihe mit EL zwar keine Hemmung der Glo-I *in vitro*, dennoch war bei der Koinkubation des humanen Vollblutes mit LPS und steigenden Konzentrationen von EL eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zytokinproduktion (siehe Abbildung 11), vergleichbar mit dem Effekt von EP, zu verzeichnen. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals eine anti-inflammatorische Wirkung von Laktat-Estern im Hinblick auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α beschrieben werden. Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit EL im Hinblick auf fehlende Inhibierung der Glyoxalase I und Reduktion der Zytokinfreisetzung sind allerdings nur bei oberflächlicher Betrachtung inkongruent mit den Schlussfolgerungen der EP-Experimente. Eine mögliche Erklärung ist die Erkenntnis, dass EL ein „Prodrug“ darstellt, welches intrazellulär durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu EP konvertiert wird (Lluis und Bozal 1976). Eigene Messergebnisse bestätigten diese Darlegungen (Daten nicht gezeigt). Die logische Fortführung dieser Zusammenhänge führt zu dem Schluss, dass der Effekt von EL in verschiedenen Zellen von der Expressionsstärke der LDH bzw. dem Vorhandensein verschiedener Isoformen dieser abhängen könnte. Wie bereits beschrieben belegen die Ergebnisse dieser Arbeit eine vergleichbare Reduktion der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine von EP und EL (siehe Abbildungen 10 und 11). Erstaunlicherweise reduzierte EL in einer anderen Arbeit die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α in kultivierten RAW 264.7-Zellen lediglich auf ca. 60%, EP hingegen auf ca. 20% des Ausgangswertes (Sappington et al. 2005). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sicherlich die unterschiedliche Reaktion der RAW 264.7-Zellen und ein anderes Expressionsmuster der LDH-Isoformen im Vergleich zum humanen Vollblut sein.

Die Inhibierung der Glo-I würde zu einem deutlichen Anstieg der intra- und extrazellulären MGO-Konzentration führen, da die ungeladenen Oxo-Aldehyde ungehindert vom Zellinneren in den interstitiellen Raum und umgekehrt diffundieren (Miller et al. 2006). Sollte die intrazelluläre Konzentrationserhöhung von MGO für die anti-inflammatorischen Effekte verantwortlich sein, müsste die Zugabe von MGO zu einem Vollblutansatz vergleichbare Effekte wie bei der Behandlung mit EP und EL zeigen. Unter diesen Voraussetzungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Koinkubation von humanem Vollblut mit LPS und exogen zugeführtem MGO im Konzentrationsbereich von

0,5 mM bis 10 mM die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen konzentrationsabhängig komparabel mit der Behandlung mit EP und EL reduzierte (siehe Abbildung 12). Eine Ausnahme bildet die Freisetzung von IL-8, die durch die Zugabe von MGO noch verstärkt wurde. Diese Erkenntnisse verdeutlichen die beschriebene Eigenschaft des MGO als intrazellulärer Mediator der Glyoxalase-Inhibitoren (Thornalley et al. 1996). Eine Vielzahl verschiedener zellulärer Effekte wurde für MGO beschrieben, die noch nicht endgültig verstanden sind. In einigen Arbeiten werden toxische Wirkungen des MGO über eine Verminderung der GSH- und ATP-Speicher beschrieben. Weiterhin ist MGO für die Modulation des mitochondrialen Membranpotentials, die Produktion von ROS und die Induktion der Apoptose verantwortlich (Shangari und O'Brien 2004, de Arriba et al. 2007). In anderen Arbeiten konnten dagegen keine toxischen Effekte festgestellt werden (Speer et al. 2003, Ghosh et al. 2006). Dagegen ist MGO dazu in der Lage, die Funktion verschiedenster Proteine zu modifizieren, z.B. durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Zuin et al. 2005), kovalente Modifikation von Proteinen wie Hsp27 (Sakamoto et al. 2002) oder die Modifikation von Enzymen wie Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Lee et al. 2005). Ob diese Protein- und Enzymmodulationen irreversibel oder transient sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Im Hinblick auf die Regulation des zellulären Metabolismus und Wachstums führen transiente MGO-induzierte Modifikationen zur temporären Aktivierung oder Inaktivierung von Zielproteinen, hingegen kann eine irreversible Modifikation der gleichen oder anderer Zielmoleküle zum Zelltod führen (Ramasamy et al. 2006).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse zum Einfluss von EP, EL und MGO auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine einen Zusammenhang zwischen der Inhibition der Glo-I und den Effekten von EP und EL wahrscheinlich erscheinen.

4.3 Der Einfluss von Ethylpyruvat und strukturell verwandter Verbindungen auf die Expression von HLA-DR, CD14 und CD91

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss von EP und strukturell verwandten Verbindungen auf die Expression der für die Immunantwort bedeutsamen Oberflächenrezeptoren HLA-DR, CD14 und CD91 untersucht. Auf humanen antigenpräsentierenden Zellen werden drei verschiedene Isoformen, HLA-DR, -DQ und -DP, des major histocompatibility complex (MHC) Klasse II exprimiert. Die MHC-Region,

die u.a. für die Expression dieser HLA-Glykoproteine verantwortlich ist, befindet sich auf Chromosom 6p21 in der Nähe des Genlokus der Glo-I. Die von dieser Region kodierten Gene werden in drei Klassen eingeteilt. Klasse I beinhaltet die Gene für die HLA-Antigene A und B, Klasse II für die Heterodimere HLA-DR, -DQ und -DP und Klasse III kodiert u.a. für die Komplementfaktoren und TNF- α . Die primäre Funktion von HLA-DR ist die Präsentation von Antigenen, welche zur Aktivierung von T-Zellen und zur Produktion von Antikörpern führen kann. HLA-DR wird hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, Monozyten, B-Zellen und dendritischen Zellen gefunden. Ein Anstieg der HLA-DR-Expression wird nach Stimulation mit z.B. LPS beobachtet, daher ist HLA-DR auch ein Indikator für die Stimulation bzw. Aktivierung des Immunsystems (Hansen et al. 1978, Charron 1982).

CD14 ist ein 55 kDa großes Glykoprotein, welches auf der Zelloberfläche von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Kielian und Blecha 1995). CD14 existiert in 2 Formen, dem löslichen (sCD14) und dem membrangebundenen (mCD14) Molekül, welches über einen Phosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden ist. Lösliches CD14 wird im Plasma gefunden und überträgt LPS-vermittelte Signale in Zellen ohne mCD14 wie Endothel- und Epithelzellen (Simmons et al. 1989). Die bedeutendste Funktion des CD14 besteht allerdings in seiner Rolle als Rezeptor für LPS in Verbindung mit dem LPS-Bindungs-Protein (LBP). Lipopolysaccharide sind die Hauptbestandteile der Zellmembran gramnegativer Bakterien wie *Staphylokokkus aureus*. Diese Moleküle werden von körpereigenen Abwehrzellen erkannt und bewirken eine überschießende Immunreaktion, welche zum septischen Schock mit einer hohen Mortalitätsrate führen kann. LBP ist ein Akute-Phase-Protein, das in der Leber produziert wird und im Blutkreislauf einen Komplex mit dem Lipid A des LPS bildet. Anschließend dockt LBP zusammen mit LPS am CD14 an und bildet somit einen ternären Komplex. Dieser ermöglicht die Übertragung von LPS auf den eigentlichen LPS-Rezeptor-Komplex, bestehend aus Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und MD-2 (Schumann et al. 1990, Hailman et al. 1994). Schließlich wird über verschiedene Signalkaskaden, die u.a. die mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) und die mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-Kinase (MKK) beinhalten, das inhibitorische I κ B des NF- κ B phosphoryliert und der Transkriptionsfaktor aktiviert. Folglich kommt es zur Freisetzung von TNF- α , COX-2 u.a. Mediatoren (Palsson-McDermott und O'Neill 2004).

CD91 wurde ursprünglich als Rezeptor für Alpha-2-Makroglobulin, einem Proteaseinhibitor mit zahlreichen Funktionen, entdeckt. Weiterhin wurde festgestellt, dass

verschiedene „Hitzeschockproteine“ (HSP) wie gp96, hsp90 oder hsp70 sowie „low-density-lipoproteins“ (LDL) an diesen Rezeptor binden. Antigenpräsentierende Zellen können exogene Antigene, die durch HSP chaperonisiert wurden, mit Hilfe der Rezeptors CD91 aufnehmen und über MHC I präsentieren. Diese Antigenpräsentation führt schließlich zur Aktivierung von antigenspezifischen zytotoxischen CD8-T-Zellen. Damit spielt CD91 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems durch chaperonisierte Antigene (Binder et al. 2000, Basu et al. 2001, van der Geer 2002).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 10 ng/ml LPS die Expression von HLA-DR auf humanen Monozyten auf ein Vielfaches des Ausgangswertes erhöht. Ebenso wurde durch die Zugabe von LPS die Expression von CD14 und CD91 gesteigert. Die simultane Behandlung der Blutproben mit LPS und verschiedenen Dosen EP, EL und DEL oder BL führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der gesteigerten Expression von HLA-DR und CD14, wobei die Behandlung mit EP die Expression am deutlichsten reduzierte. Dabei konnte teilweise der Expressionswert der unbehandelten Kontrollprobe erreicht werden (siehe Abbildungen 13, 15, 19, 21, 25, 27, 31, 33). Dagegen führte die Behandlung der Blutproben mit LPS und o.g. Verbindungen zu einer zusätzlichen Expressionssteigerung von CD91 (siehe Abbildungen 17, 23, 29, 35). Dementsprechend kann eine sensibilisierende Wirkung von LPS auf die Monozyten für die Stimulation von CD91 durch EP und die Laktatester abgeleitet werden. Vergleichbare Ergebnisse erbrachte auch die Behandlung mit exogen zugeführtem MGO zum Vollblutansatz, wobei geringe Abweichungen im Hinblick auf die CD91-Expression beobachtet wurden (siehe Abbildungen 37, 39, 41). Erwartungsgemäß zeigten sich individuelle Unterschiede im Hinblick auf das Ansprechen der verschiedenen Proben der einzelnen Blutspender auf LPS. Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit die inhibierenden Eigenschaften von EP, EL, DEL, BL und MGO bezüglich der stimulierenden Wirkung von LPS. Monozyten und Makrophagen reagieren auf die Anwesenheit von LPS mit der Produktion von ROS, der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und der Expressionssteigerung von Oberflächenmolekülen. Eine Vielzahl dieser zellulären Mechanismen wird über die Aktivierung des NF- κ B vermittelt. Dieser Faktor ist an der Regulierung der Transkription von über 200 Genen wie z.B. TNF- α , IL-6, IL-8, COX-2 und der NO-Synthase beteiligt. In ruhenden Zellen befinden sich die verschiedenen Formen des NF- κ B im Zytoplasma in ihrer inaktiven Form, da sie durch ein inhibitorischen Protein, I κ B, gebunden werden. Nach Stimulation

der Zelle durch einen pro-inflammatorischen Mediator wie TNF- α oder auch LPS wird I κ B an zwei Serin-Resten phosphoryliert, ubiquitinyliert und anschließend in den Proteasomen abgebaut. Infolgedessen kann NF- κ B in den Nucleus überführt werden und an die Promotorregionen verschiedener Gene binden (Siebenlist et al. 1994). In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass EP die Aktivierung von NF- κ B inhibiert (Yang et al. 2002, Ulloa et al. 2002, Sappington et al. 2003b, Yang et al. 2003, Yang et al. 2004a, Uchiyama et al. 2003, Song et al. 2004, Wang et al. 2005, Kim et al. 2005). Ein Teil der Autoren diskutiert als mögliche Grundlage dieser Wirkung die Eigenschaft von EP als Radikalfänger, da ROS die Aktivierung von NF- κ B vermitteln können (Varma et al. 1998, Tawadrous et al. 2002, Haddad 2002, Song et al. 2004). Allerdings ist oxidativer Stress in Form von Wasserstoffperoxid nicht in der Lage, NF- κ B in Caco-2-Zellen zu aktivieren. Weiterhin konnten andere etablierte Radikalfänger wie Pyrollidin-Dithiocarbamat, Dimethylsulfoxid oder N-Acetylcystein die IL-1 β -vermittelte Aktivierung von NF- κ B in Caco-2- bzw. ECV304-Zellen nicht verhindern (Parikh et al. 2000). Im Vergleich dazu blockierte EP die Aktivierung von NF- κ B, hervorgerufen durch „Cytomix“ (bestehend aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α) in Caco-2-Zellen und durch LPS in RAW 264.7-Zellen (Ulloa et al. 2002, Sappington et al. 2003b). Ferner wurden in einer Arbeit direkt EP und N-Acetylcystein auf ihre anti-inflammatorischen Eigenschaften verglichen, wobei EP die eindeutig effektivere Substanz darstellte (Song et al. 2004). Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Funktion von EP als Radikalfänger keine ausreichende Erklärung für die Hemmung von NF- κ B und die protektiven Effekte dieser Substanz liefert. Ebenso wurde ermittelt, dass durch EP die intrazelluläre GSH-Konzentration vermindert wird (Song et al. 2004). In dieser Arbeit wurden RAW 264.7-Zellen mit LPS stimuliert und mit EP behandelt. Weiterhin wurde die intrazelluläre Konzentration von GSH durch die Gabe von GSH-Ethylester erhöht und die Zellen anschließend mit EP behandelt. Tatsächlich konnte dadurch die EP-induzierte Hemmung von NF- κ B egalisiert werden. Die LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B war in Zellen, die mit EP und GSH-Ethylester behandelt wurden, größer als bei der isolierten Zugabe von EP.

Zur weiteren Analyse des Wirkmechanismus von EP wurde eine Serie strukturell zu dieser Substanz verwandter Verbindungen im Hinblick auf deren anti-inflammatorische Effekte untersucht. Sowohl 2-AA als auch DEOP (siehe Abbildung 3) konnten in RAW 264.7-Zellen die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α und NO sowie die „Cytomix“-induzierte Hyperpermeabilität in Caco-2-Zellen reduzieren. Nach Injektion dieser Verbindungen wurde eine verringerte Leberzellschädigung und Mukosahyperpermeabilität des Darms in

Mäusen nachgewiesen. Weiterhin erfolgte durch die Behandlung mit 2-AA und DEOP eine verminderte „Cytomix“-vermittelte NF- κ B-DNA-Bindung in Caco-2-Zellen (Sappington et al. 2005). Eine mögliche Erklärung für die verminderte Aktivierung von NF- κ B stellt die reduzierte Phosphorylierung der I κ B-Untereinheit durch die I κ B-Kinase und Degradation von I κ B in den Proteasomen dar (Senftleben und Karin 2002). Allerdings waren weder EP, 2-AA oder DEOP in der Lage, die Degradation von I κ B in „Cytomix“-stimulierten Caco-2-Zellen zu verhindern. Daher muss die Aktivierung von NF- κ B durch bestimmte Zellmediatoren oder durch andere Angriffspunkte in der NF- κ B-Signalkaskade erfolgen. Bei der strukturellen Analyse der drei Stoffe konnte ermittelt werden, dass sowohl EP als auch DEOP in einer Keto- und Enolform existieren (siehe Abbildung 3). Die Analyse ergab, dass bei der Enolform des EP und des DEOP jeweils eine „Dikarbonylgruppe“ (O=C-C=O) und bei 2-AA und bei Me-2-AA, dem Methylester von 2-AA, jeweils zwei Carbonylgruppen (C=O) vorhanden sind. Dieser Fakt bekräftigt die Hypothese, dass die aus der Inhibierung der Glo-I postulierten anti-inflammatorischen Eigenschaften von EP zumindest teilweise auf dessen strukturelle Besonderheiten zurückzuführen sind. Bemerkenswert ist dabei auch die Tatsache, dass der Ester des 2-AA, Me-2-AA, eine 100-fach stärkere Inhibierung der LPS-induzierten NO- und TNF- α Sekretion im Vergleich zu 2-AA bewirkt. Diese Ergebnisse sind kongruent mit der z.T. vielfach stärkeren Wirkung von EP im Vergleich zum strukturell verwandten Pyruvat (Varma et al. 1998, Sims et al. 2001, Sappington et al. 2005). Diese Ausführungen bestätigen unter Anbetracht der persistierenden anti-inflammatorischen Wirkung von EP auch nach Auswaschen der Verbindung und weiterer Inkubation des Versuchsansatzes die Hypothese, dass EP bestimmte Proteine oder Mediatoren kovalent modifizieren könnte und dadurch zu einer persistierenden Beeinflussung der zellulären Antwort auf pro-inflammatorische Zytokine oder LPS führt (Sappington et al. 2003a, Fink 2007a). Die explizite Ursache der verminderten Expression von NF- κ B durch EP konnte allerdings in der vorliegenden Literatur noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Hypothese, dass MGO bestimmte Zielproteine spezifisch verändert, möglicherweise durch Reaktion mit Cystein- oder Argininresten. Mögliche Kandidaten für diese Proteine könnten die Mitglieder der NF- κ B-Familie sein, da diese entsprechende Aminosäurereste in ihrer DNA-Bindungsregion besitzen (Galter et al. 1994). Neue Publikationen belegen, dass EP den Cysteinrest Cys³⁸ in der p65-Untereinheit des NF- κ B kovalent modifizieren und dadurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors inhibieren könnte (Han et al. 2005, Fink 2007b). Wahrscheinlicher

ist allerdings eine Modifikation bedingt durch MGO, da MGO eine weitaus stärkere Reaktivität als EP aufweist. Diese Argumentation wird durch die Erkenntnisse von Laga et al. bekräftigt, die eine Modifikation des Cysteinrestes Cys³⁸ in der p65-Untereinheit des NF- κ B durch MGO nachweisen (Laga et al. 2007). Ebenso untermauern weitere Publikationen die Hypothese einer selektiven Modifikation von Proteinen durch MGO über die Blockierung von spezifischen Aminosäuren (Gao und Wang 2006, Jia et al. 2006). Aus dieser Argumentationskette könnte somit auch der suppressive Effekt von EP, den Laktatestern und von MGO auf die LPS-induzierte Expressionssteigerung von HLA-DR und CD14 erklärt werden, da beide Rezeptoren über NF- κ B in Verbindung mit Toll-like-Rezeptoren reguliert werden. Offensichtlich wird die Expression von CD91 im Vergleich zu CD14 und HLA-DR verschieden reguliert, der genaue Mechanismus dieser Regulation bedarf weiterer intensiver Forschung.

Allerdings eröffnet die Hemmung der Glo-I und die damit verbundene Reduktion der Zytokinausschüttung und der Rezeptorexpression ein neues Konzept der Immunsuppression. Die Beobachtung, dass nur antigenaktivierte Zellen, die auf die Antigenpräsentation mit einer Erhöhung der Glykolyse-Rate reagieren, beeinflusst werden, eröffnet die Möglichkeit der selektiven Beeinflussung von Immunzellen, die in die Antigenerkennung und -Präsentation involviert sind. Ebenso fügt sich die Stimulation der Expression von CD91 durch die Hemmung der Glo-I nahtlos in diese Betrachtungsweise ein. Dieser Rezeptor fungiert einerseits als ein bedeutender Bestandteil der Antigenpräsentation, andererseits reinigt er über rezeptorvermittelte Endozytose Körperflüssigkeiten von Antigenen in Form von Peptiden, die an α -2-Makroglobulin oder intrazelluläre Chaperone gebunden sind (Cianciolo et al. 2001, Binder und Srivastava 2004). Die verstärkte Antigenaufnahme über CD91 einerseits und die verminderte Präsentation durch die Reduktion von HLA-DR andererseits führen somit zu einem Verlust der Antigenmoleküle und zu einer verminderten Aktivierung des Immunsystems. Die Charakterisierung von Indomethacin als ein anti-inflammatorisches und Anti-Tumor-Agens (Sato et al. 2007) wird die zellulären Funktionen der Glo-I im Metabolismus auch weiterhin in den Mittelpunkt zukünftiger Forschungstätigkeit stellen.

4.4 Der Einfluss von Ethylpyruvat und strukturell verwandter Verbindungen auf die Zellvitalität

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss von EP und strukturell verwandter Substanzen auf die Zellvitalität von PBMCs und THP-1-Zellen untersucht. In den bisher beschriebenen Arbeiten wurde dieser Aspekt nicht bzw. nur unzureichend diskutiert. In den Versuchsreihen wurde bei den monozytären THP-1-Zellen eine vielfach höhere Aktivität der Glo-I als bei PBMCs festgestellt (siehe Abbildung 9). In diesem Zusammenhang zeigt EP im Hinblick auf die Zellvitalität einen wesentlich geringeren Einfluss auf die PBMCs als auf die THP-1-Zellen. Während bei den PBMCs die Zellvitalität nach der Behandlung mit 20 mM EP für drei Stunden noch ca. 85 % betrug, verringerte sich diese bei den THP-1-Zellen wesentlich stärker auf ca. 60 %. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden zeigte sich dieser Unterschied noch ausgeprägter. Bezifferte sich der Anteil vitaler Zellen bei den PBMCs auf ca. 80 %, reduzierte sich dieser bei den THP-1-Zellen auf ca. 5 %. Ähnliche Tendenzen konnten auch nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden beobachtet werden (siehe Abbildung 44). Die Experimente mit verschiedenen Konzentrationen von EP sowie mit EL und DEL bestätigen diese Erkenntnisse (siehe Abbildungen 48-50). Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die beschriebenen Effekte von EP durch verschiedene intrazelluläre Vorgänge verursacht werden müssen und nicht nur auf die Induktion von Apoptose und Nekrose zurückzuführen sind. Bei der Behandlung mit einer Konzentration von 20 mM EP konnte die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine annähernd auf den unstimulierten Kontrollwert gesenkt werden, ebenso verringerte sich die Expression von HLA-DR und CD14 auf Monozyten deutlich. Dagegen wurde die Zellvitalität der PBMCs nur geringfügig beeinflusst. Auffällig ist dabei, dass die Behandlung mit 20 mM EP vorwiegend zur Induktion von Nekrose in den Tumorzellen und zu geringeren Anteilen auch in den PBMCs führt. Dagegen wurde festgestellt, dass die Gabe von EP in Glukose-depletierten A549-Lungenkarzinomzellen die Induktion der Nekrose verhindert und die Apoptose einleitet (Lim et al. 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass EP bei Splenozyten aus Ratten mit Verbrennungsschäden die Induktion der Apoptose reduziert (Dong et al. 2005a). Ebenso konnte EP in einer Reihe weiterer Arbeiten die Induktion der Apoptose verhindern (Tsung et al. 2005, Wang et al. 2005). Diese Ergebnisse sprechen aber nicht gegen die o.g. Ausführungen, da sich diese Publikationen mit der Analyse des Effektes von

EP auf die Reduktion der induzierten Apoptose bzw. Nekrose befassen und nicht mit der isolierten Betrachtung unstimulierter Zellen.

Ebenso konnte für EP ein konzentrationsabhängiger Effekt bezüglich der Beeinflussung der Zellvitalität nachgewiesen werden. Während sich bei den PBMCs die Zellvitalität mit steigenden Konzentrationen nur geringfügig verminderte, reduzierte sich diese bei den THP-1-Zellen bereits bei der Zugabe von 10 mM EP auf ca. 50 % und bei 20 mM auf ca. 95 %. Auch hier konnte also ein stärkerer konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Tumorzellen nachgewiesen werden. Diese Darlegungen führen neben der Bestätigung der mediatorvermittelten Wirkung von EP zu einer neuen Einsatzmöglichkeit für diese Substanz. Aus dieser Konstellation ergibt sich ein breites zeitliches Therapieintervall für eine mögliche zytostatische Anwendung. Eine zwölfstündige Behandlung mit 20 mM EP würde somit in einer Tumorphilpopulation zur nahezu vollständigen Nekrose führen, während körpereigene Zellen beinahe unbeeinflusst blieben. Die Experimente bezüglich der Zellvitalität mit Pyruvat und Ethanol in äquimolaren Dosen (siehe Abbildungen 51 und 52) belegen weiterhin eine direkte oder mediatorvermittelte toxische Wirkung auf die THP-1-Zellen durch EP und die Laktatester, die nicht durch die Spaltprodukte der Hydrolyse bewirkt wird.

Eine Erhöhung der MGO-Konzentration führt zur Induktion des Zelltodes in Tumorzellen und zur Reduktion des Tumorwachstums (Conroy 1978, Milanese et al. 2000), ebenso bewirkt der erhöhte Umsatz der Glykolyse in Tumorzellen eine vermehrte Produktion von MGO. Dieser Unterschied in der Aktivität der Glykolyse und der damit verbundenen MGO-Produktion könnte die unterschiedliche Wirkung von EP hinsichtlich der Zellvitalität auf maligne und nichtmaligne Zellen erklären und ein neues Anwendungsspektrum aufzeigen. Andererseits könnten die Tumorzellen im Organismus die eindringenden Immunzellen durch die Produktion von Glyoxalase-Inhibitoren blockieren und somit Makrophagen und T-Zellen in der Umgebung der Tumorzellen kupieren. Diese Inhibitoren könnten MGO selbst oder andere „Dicarbonyl-Strukturen“ sein, die durch die Zellmembran diffundieren und damit zur Tumorresistenz gegenüber dem Immunsystem beitragen (Gottfried et al. 2006). Auch in dieser Beziehung könnte die Höhe der Konzentration von MGO die teilweise divergenten Effekte auslösen. Die Reduktion der Vitalität von THP-1-Zellen durch EP konnte in dieser Arbeit erstmals dargelegt werden und bietet ein innovatives Therapiekonzept, dessen genauer Mechanismus weiterer intensiver Forschungsarbeit bedarf.

4.5 Die Hemmung der Glyoxalase I als mögliche biochemische Grundlage der Effekte von Ethylpyruvat

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass verschiedene Funktionen der Leukozyten über die Inhibierung der Glo-I moduliert werden. Um diesen Effekt zu erklären, wurde angenommen, dass die Initiierung der Glykolyse einen frühen Schritt in der Aktivierung von Zellen durch LPS, Antigenen oder Mitogenen darstellt. Frühere Publikationen führten zu dem Schluss, dass die Aktivierung der Makrophagen durch LPS für die enorme Stimulation der Glukoseaufnahme, Glykolyse und der Expressionssteigerung von GLUT1 verantwortlich ist (Fukuzumi et al. 1996). Ruhende Makrophagen benötigen nur eine geringe Menge Glukose, um ihre normalen „Housekeeping“-Funktionen aufrechtzuerhalten. Nach der Aktivierung durch ein Antigen oder Mitogen reagieren die T-Zellen allerdings mit einer Induktion des Zellwachstums und der Proliferation. Dieser energieintensive Schritt der Aktivierung wird begleitet von einem Anstieg der Glukoseverwertung, welcher eine Stunde nach der Aktivierung messbar ist. Interessanterweise ist der Anstieg der Glykolyse vielfach größer als der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, gemessen anhand der erhöhten Laktat-Produktion (Krauss et al. 2001). Diese so genannte aerobe Glykolyse spiegelt einige Eigenschaften von malignen Zellen wider (Warburg 1956). Die gesteigerte Glykolyse führt zur verstärkten Akkumulation von MGO, welches hochreaktiv ist. In ruhenden Zellen wird die Expression der Enzyme Glo-I und -II entsprechend der Produktion von MGO nivelliert, um eine Überproduktion von MGO zu vermeiden. Andererseits ist anzunehmen, dass in metabolisch aktiven Zellen die Produktion von MGO zumindest kurzzeitig die Abbaukapazitäten dieser beiden Enzyme übersteigt. Dementsprechend wird in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass gebildetes MGO als ein „glykolytischer second messenger“ agiert, um zelluläre Prozesse wie die Produktion von Zytokinen oder die Expression von Oberflächenrezeptoren zu regulieren. Eine Inhibierung der Glo-I durch EP würde folglich Eingriff in diese komplexen Regulationsmechanismen nehmen und wäre somit ein nachvollziehbares Erklärungsmodell für die anti-inflammatorischen Eigenschaften von EP und weiterer Karbonsäureester. Weiterhin bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Einflusses von EP auf die Zellvitalität von THP-1-Zellen als Stellvertreter metabolisch hochaktiver Zellen und PBMCs als Stellvertreter ruhende Zellen die Ansicht, dass ausreichend hohe Konzentrationen von MGO das Absterben metabolisch aktiver Zellen bewirken, während ruhende Zellen nahezu unberührt bleiben. Diese

Ausführungen bekräftigen die Annahme, dass MGO kurzzeitig intrazelluläre Signale über die Modulation der Expression regulatorischer Proteine oder über die Induktion des Zelltodes konzentrationsabhängig regulieren könnte. Demzufolge könnte mit abfallenden Konzentrationen von MGO die intrazelluläre Signalkaskade infolge der Stimulation metabolischer Enzyme wiederhergestellt werden. Neuere Publikationen bestätigen die dargelegte Hypothese. Ein weiteres Enzym des Glukosemetabolismus, die Aldosereduktase, konnte mit der LPS-vermittelten Zytokinfreisetzung in Verbindung gebracht werden. Dieses Enzym ist für die Entgiftung einer Reihe von endogenen Aldehyden wie MGO und 4-Hydroxynonenal sowie deren GSH-Konjugaten in Anwesenheit von NADP⁺ verantwortlich (Vander Jagt et al. 2001). Es wurde aufgezeigt, dass das intrazelluläre Redoxpotential von GSH/GSSG darüber entscheidet, ob MGO die Aldosereduktase oder den Glykolyse-Zyklus durchläuft. Die Inhibierung oder eine genetische Ablation der Aldosereduktase unterbindet die LPS-induzierte Aktivierung von NF-κB und die darüber vermittelte Zytokinproduktion (Ramana et al. 2006).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass EP in der Lage ist, die Glo-I zu hemmen. Folglich führt die Inhibierung der Glo-I in metabolisch aktiven Zellen zu einem temporären Anstieg der MGO-Konzentration, welcher sich in der Beeinflussung zahlreicher Immunreaktionen niederschlägt. Dementsprechend könnte die Glo-I ein neues Behandlungsziel der immunsuppressiven Therapie darstellen, das möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der Gewebe- und Organtransplantation spielen wird.

5. Zusammenfassung

Zahlreiche Studien der letzten Jahre beschrieben ausführlich die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Pyruvat. Aufgrund der geringen Stabilität dieser Verbindung in wässriger Lösung rückte dessen Ester EP in den Fokus des Interesses. In einer Vielzahl von Arbeiten konnten anti-inflammatorische Eigenschaften von EP aufgezeigt werden. An verschiedenen Modellen der Sepsis, des hämorrhagischen Schocks, von Verbrennungsschäden, des Apoplex oder der Ischämie und Reperfusion wurde bei der Behandlung mit EP ein protektiver Effekt sowie eine verminderte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nachgewiesen. Als biochemische Grundlage für die anti-inflammatorischen und protektiven Eigenschaften von EP wurde die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NF κ B identifiziert, die spezifischen Regulationsmechanismen für die verminderte Aktivierung NF κ B konnten bisher allerdings nicht zufriedenstellend aufgeklärt werden. In dieser Arbeit wurde als eine neue mögliche Erklärung für die anti-inflammatorischen Eigenschaften von EP und weiterer α -oxo-Karbonsäureester die Inhibierung der Glo-I aufgezeigt. Die Glo-I ist ein wichtiges ubiquitäres Enzym, das zusammen mit der Glyoxalase II die Konversion von α -oxo-Aldehyden wie MGO unter der Verwendung von GSH als Kofaktor katalysiert. *In vitro*-Experimente zur Enzymaktivität belegten die Hemmung der Glo-I durch EP, während α -Hydroxy-Karbonsäureester wie EL keine inhibitorischen Eigenschaften aufwiesen. Dennoch waren sowohl EP als auch EL und weitere Laktatester in der Lage, die LPS-induzierte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α in humanen immunkompetenten Zellen zu supprimieren und die Expression von Immunrezeptoren wie HLA-DR, CD14 und CD91 zu modulieren. Somit konnten erstmals anti-inflammatorische Eigenschaften von Laktatestern nachgewiesen sowie eine Verbindung zwischen den Glyoxalase-Enzymen und dem Immunsystem etabliert werden. Diese und weitere Ergebnisse zur Einflussnahme der Karbonsäureester auf die Zellvitalität präsentieren das Glyoxalasesystem als mögliches Ziel neuer Therapiekonzepte für die Immunsuppression und bestätigen dessen Bedeutung für die Entwicklung von Anti-Tumor-Agenzien.

6. Quellenangaben

- Adickes, F. und Andresen, G. (1943): Zur Kenntnis der Reihe der normalen aliphatischen β -Oxysäuren und der α -Ketosäuren. *Ann Chem* 50, 41-57.
- Akhand, A. A., Hossain, K., Mitsui, H., Kato, M., Miyata, T., Inagi, R., Du, J., Takeda, K., Kawamoto, Y., Suzuki, H., Kurokawa, K., und Nakashima, I. (2001): Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for map family kinases and caspase activation in human endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* 31, 20-30.
- Al-Timari, A. und Douglas, K. T. (1986): Inhibition by glutathione derivatives of bovine liver glyoxalase II (hydroxyacylglutathione hydrolase) as a probe of the N- and S-sites for substrate binding. *Biochim.Biophys.Acta* 870, 219-225.
- Allen, R. E., Lo, T. W., und Thornalley, P. J. (1993a): A simplified method for the purification of human red blood cell glyoxalase. I. Characteristics, immunoblotting, and inhibitor studies. *J.Protein Chem* 12, 111-119.
- Allen, R. E., Lo, T. W., und Thornalley, P. J. (1993b): Purification and characterisation of glyoxalase II from human red blood cells. *Eur.J.Biochem.* 213, 1261-1267.
- Andersson, A., Fenhammar, J., Frithiof, R., Sollevi, A., und Hjelmqvist, H. (2006): Haemodynamic and metabolic effects of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate in the acute phase of porcine endotoxaemic shock. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 50, 1198-1206.
- Ayoub, F., Zaman, M., Thornalley, P., und Masters, J. (1993): Glyoxalase activities in human tumour cell lines in vitro. *Anticancer Res.* 13, 151-155.
- Ball, J. C. und Vander Jagt, D. L. (1981): S-2-hydroxyacylglutathione hydrolase (glyoxalase II): active-site mapping of a nonserine thiolesterase. *Biochemistry* 20, 899-905.
- Bartyik, K., Turi, S., Orosz, F., und Karg, E. (2004): Methotrexate inhibits the glyoxalase system in vivo in children with acute lymphoid leukaemia. *Eur.J.Cancer* 40, 2287-2292.
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., und Srivastava, P. K. (2001): CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* 14, 303-313.
- Bender, K. und Grzeschik, K. H. (1976): Assignment of the genes for human glyoxalase I to chromosome 6 and for human esterase D to chromosome 13. *Cytogenet.Cell Genet.* 16, 93-96.
- Binder, R. J., Han, D. K., und Srivastava, P. K. (2000): CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat.Immunol.* 1, 151-155.
- Binder, R. J. und Srivastava, P. K. (2004): Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 6128-6133.

- Board, P. G. (1980): Genetic polymorphism of human erythrocyte glyoxalase II. *Am.J.Hum.Genet.* 32, 690-694.
- Bowie, A. G., Moynagh, P. N., and O'Neill, L. A. (1997): Lipid peroxidation is involved in the activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H₂O₂ in NF-kappaB activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J.Biol.Chem* 272, 25941-25950.
- Brand, K. (1997): Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J.Bioenerg.Biomembr.* 29, 355-364.
- Brand, K. A. und Hermfisse, U. (1997): Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* 11, 388-395.
- Bunger, R., Mallet, R. T., und Hartman, D. A. (1989): Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postschismic isolated working heart. Near-complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur.J.Biochem.* 180, 221-233.
- Cameron, A. D., Olin, B., Ridderstrom, M., Mannervik, B., und Jones, T. A. (1997): Crystal structure of human glyoxalase I--evidence for gene duplication and 3D domain swapping. *EMBO J.* 16, 3386-3395.
- Cameron, A. D., Ridderstrom, M., Olin, B., und Mannervik, B. (1999): Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure.* 7, 1067-1078.
- Carnegie, P. R. (1963): Isolation of a homologue of glutathione and other acidic peptides from seedlings of phaseolus aureus. *Biochem.J.* 89, 459-471.
- Carrington, S. J. und Douglas, K. T. (1985): Glyoxalase I is activated by nitration of its tyrosine residues. *IRCS Med.Sci* 13, 883-884.
- Casazza, J. P., Felver, M. E., und Veech, R. L. (1984): The metabolism of acetone in rat. *J.Biol.Chem.* 259, 231-236.
- Chandel, N. S., Trzyna, W. C., McClintock, D. S., und Schumacker, P. T. (2000): Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J.Immunol.* 165, 1013-1021.
- Charron, D. J. (1982): HLA-DR antigens: cellular expression and molecular structure. *Ann Immunol.(Paris)* 133D, 155-169.
- Chavez, A. M., Menconi, M. J., Hodin, R. A., und Fink, M. P. (1999): Cytokine-induced intestinal epithelial hyperpermeability: role of nitric oxide. *Crit Care Med.* 27, 2246-2251.
- Cheng, B. Q., Liu, C. T., Li, W. J., Fan, W., Zhong, N., Zhang, Y., Jia, X. Q., und Zhang, S. Z. (2007): Ethyl pyruvate improves survival and ameliorates distant organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *Pancreas* 35, 256-261.

- Cho, I. H., Kim, S. W., Kim, J. B., Kim, T. K., Lee, K. W., Han, P. L., and Lee, J. K. (2006): Ethyl pyruvate attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *J.Neurosci.Res.* 84, 1505-1511.
- Cianciolo, G. J., Enghild, J. J., and Pizzo, S. V. (2001): Covalent complexes of antigen and alpha(2)-macroglobulin: evidence for dramatically-increased immunogenicity. *Vaccine* 20, 554-562.
- Cicalese, L., Lee, K., Schraut, W., Watkins, S., Borle, A., and Stanko, R. (1996): Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine. *Am.J.Surg.* 171, 97-100.
- Conroy, P. J. (1978): Carcinostatic activity of methylglyoxal and related substances in tumour-bearing mice. *Ciba Found.Symp.* 271-300.
- Dakin, H. D. und Dudley, H. W. (1913): An enzyme concerned with the formation of hydroxy acids from ketonic aldehydes. *J.Biol.Chem.* 14, 155-157.
- Darling, T. N. und Blum, J. J. (1988): D-lactate production by *Leishmania braziliensis* through the glyoxalase pathway. *Mol.Biochem.Parasitol.* 28, 121-127.
- de Arriba, S. G., Stuchbury, G., Yarin, J., Burnell, J., Loske, C., and Munch, G. (2007): Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells--protection by carbonyl scavengers. *Neurobiol.Aging* 28, 1044-1050.
- DeBoer, L. W., Bekx, P. A., Han, L., and Steinke, L. (1993): Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. *Am.J.Physiol* 265, H1571-H1576.
- Deitch, E. A., Bridges, W., Baker, J., Ma, J. W., Ma, L., Grisham, M. B., Granger, D. N., Specian, R. D., and Berg, R. (1988): Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation is reduced by xanthine oxidase inhibition or inactivation. *Surgery* 104, 191-198.
- Deitch, E. A., Bridges, W., Berg, R., Specian, R. D., and Granger, D. N. (1990): Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation: the role of neutrophils and hydroxyl radicals. *J.Trauma* 30, 942-951.
- Devamanoharan, P. S., Henein, M., Ali, A. H., and Varma, S. D. (1999): Attenuation of sugar cataract by ethyl pyruvate. *Mol.Cell Biochem.* 200, 103-109.
- Dobsak, P., Courderot-Masuyer, C., Zeller, M., Vergely, C., Laubriet, A., Assem, M., Eicher, J. C., Teyssier, J. R., Wolf, J. E., and Rochette, L. (1999): Antioxidative properties of pyruvate and protection of the ischemic rat heart during cardioplegia. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 34, 651-659.
- Dong, N., Yao, Y. M., Dong, Y. Q., Liu, H., Wei, P., Yu, Y., and Sheng, Z. Y. (2005a): Effects of ethyl pyruvate on splenocyte proliferation and apoptosis in burn rats with delayed resuscitation. *Zhongguo Wei Zhong.Bing.Ji.Jiu.Yi.Xue.* 17, 393-396.
- Dong, Y. Q., Yao, Y. M., Wei, P., Liu, H., Dong, N., Yu, Y., and Sheng, Z. Y. (2005b): Effects of ethyl pyruvate on cell-mediated immune function in rats with delayed resuscitation after burn injury. *Zhongguo Wei Zhong.Bing.Ji.Jiu.Yi.Xue.* 17, 12-15.

- Douglas, K. T. (1987): Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* 59, 103-167.
- Douglas, K. T., Seddon, A. P., and Nakagawa, Y. (1986): Yeast glyoxalase I. Circular dichroic spectra and pH effects. *Int.J.Biochem.* 18, 549-555.
- Du, J., Suzuki, H., Nagase, F., Akhand, A. A., Yokoyama, T., Miyata, T., Kurokawa, K., and Nakashima, I. (2000): Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T cells by activating c-Jun N-terminal kinase. *J.Cell Biochem.* 77, 333-344.
- Epperly, M., Jin, S., Nie, S., Cao, S., Zhang, X., Franicola, D., Wang, H., Fink, M. P., and Greenberger, J. S. (2007): Ethyl pyruvate, a potentially effective mitigator of damage after total-body irradiation. *Radiat.Res.* 168, 552-559.
- Essani, N. A., Fisher, M. A., and Jaeschke, H. (1997): Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF-alpha formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock* 7, 90-96.
- Fedeli, D., Falcioni, G., Olek, R. A., Massi, M., Cifani, C., Polidori, C., and Gabbianelli, R. (2007): Protective effect of ethyl pyruvate on msP rat leukocytes damaged by alcohol intake. *J.Appl.Toxicol.* 27, 561-570.
- Fink, M. P. (2004): Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis and shock. *Minerva Anesthesiol.* 70, 365-371.
- Fink, M. P. (2007a): Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *J.Intern.Med.* 261, 349-362.
- Fink, M. P. (2007b): Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis. *Novartis.Found.Symp.* 280, 147-156.
- Fink, M. P. und Heard, S. O. (1990): Laboratory models of sepsis and septic shock. *J.Surg.Res.* 49, 186-196.
- Fukuzumi, M., Shinomiya, H., Shimizu, Y., Ohishi, K., and Utsumi, S. (1996): Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1. *Infect.Immun.* 64, 108-112.
- Galter, D., Mihm, S., and Droge, W. (1994): Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *Eur.J.Biochem.* 221, 639-648.
- Gao, Y. und Wang, Y. (2006): Site-selective modifications of arginine residues in human hemoglobin induced by methylglyoxal. *Biochemistry* 45, 15654-15660.
- Ghosh, M., Talukdar, D., Ghosh, S., Bhattacharyya, N., Ray, M., and Ray, S. (2006): In vivo assessment of toxicity and pharmacokinetics of methylglyoxal. Augmentation of the curative effect of methylglyoxal on cancer-bearing mice by ascorbic acid and creatine. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 212, 45-58.
- Gonzalez, P. K., Zhuang, J., Doctrow, S. R., Malfroy, B., Benson, P. F., Menconi, M. J., and Fink, M. P. (1995): EUK-8, a synthetic superoxide dismutase and catalase

- mimetic, ameliorates acute lung injury in endotoxemic swine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 275, 798-806.
- Gonzalez-Falcon, A., Candelario-Jalil, E., Garcia-Cabrera, M., and Leon, O. S. (2003): Effects of pyruvate administration on infarct volume and neurological deficits following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 990, 1-7.
- Gottfried, E., Kunz-Schughart, L. A., Ebner, S., Mueller-Klieser, W., Hoves, S., Andreesen, R., Mackensen, A., and Kreutz, M. (2006): Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 107, 2013-2021.
- Graf, E., Mahoney, J. R., Bryant, R. G., and Eaton, J. W. (1984): Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J.Biol.Chem* 259, 3620-3624.
- Guha, M. K., Vander Jagt, D. L., and Creighton, D. J. (1988): Diffusion-dependent rates for the hydrolysis reaction catalyzed by glyoxalase II from rat erythrocytes. *Biochemistry* 27, 8818-8822.
- Gupta, S. K., Mohanty, I., Trivedi, D., Tandon, R., Srivastava, S., and Joshi, S. (2002): Pyruvate inhibits galactosemic changes in cultured cat lens epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 34, 23-28.
- Haddad, J. J. (2002): Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor-kappaB. *Crit Care* 6, 481-490.
- Hailman, E., Lichenstein, H. S., Wurfel, M. M., Miller, D. S., Johnson, D. A., Kelley, M., Busse, L. A., Zukowski, M. M., and Wright, S. D. (1994): Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J.Exp.Med.* 179, 269-277.
- Hall, S. S. D. A. M. a. J. F. (1978): Glyoxalase I enzyme studies. General base catalyzed enediol proton transfer rearrangement of methyl- and phenylglyoxalglutathionylhemithiol acetal to S-lactoyl-S-mandeloyl-glutathione followed by hydrolysis. A model for the glyoxalase enzyme system. *J.Am.Chem.Soc.* 100, 5934-5939.
- Han, L. P., Schimandle, C. M., Davison, L. M., and Vander Jagt, D. L. (1977): Comparative kinetics of Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, and Ni²⁺-activated glyoxalase I. Evaluation of the role of the metal ion. *Biochemistry* 16, 5478-5484.
- Han, Y., Englert, J. A., Yang, R., Delude, R. L., and Fink, M. P. (2005): Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent signaling by directly targeting p65. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 312, 1097-1105.
- Hansen, G. S., Rubin, B., Sorensen, S. F., and Svejgaard, A. (1978): Importance of HLA-D antigens for the cooperation between human monocytes and T lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 8, 520-525.
- Hauser, B., Kick, J., Asfar, P., Ehrmann, U., Albicini, M., Vogt, J., Wachter, U., Bruckner, U. B., Fink, M. P., Radermacher, P., and Bracht, H. (2005): Ethyl pyruvate

improves systemic and hepatosplanchnic hemodynamics and prevents lipid peroxidation in a porcine model of resuscitated hyperdynamic endotoxemia. *Crit Care Med.* 33, 2034-2042.

- Holleman, M. (1904): Notice sur l'action de l'eau oxygénée sur les acétoniques et sur le dicétones. *Recl Trav Chim Pays-bas Bepl* 23, 169-171.
- Honey, N. K. und Shows, T. B. (1981): Assignment of the glyoxalase II gene (HAGH) to human chromosome 16. *Hum.Genet.* 58, 358-361.
- Hooper, N. I., Tisdale, M. J., und Thornalley, P. J. (1987): Glyoxalase activity during differentiation of human leukaemia cells in vitro. *Leuk.Res.* 11, 1141-1148.
- Hopkins, F. G. und Morgan, E. J. (1945): On the distribution of glyoxalase and glutathione. *Biochem.J.* 39, 320-324.
- Horton, J. W. und Walker, P. B. (1993): Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J.Appl.Physiol* 74, 1515-1520.
- Jerzykowski, T., Winter, R., Matuszewski, W., und Szczurek, Z. (1975): Glyoxalase II activity in tumours. *Experientia* 31, 32-33.
- Jia, X., Olson, D. J., Ross, A. R., und Wu, L. (2006): Structural and functional changes in human insulin induced by methylglyoxal. *FASEB J.* 20, 1555-1557.
- Kang, Y., Edwards, L. G., und Thornalley, P. J. (1996): Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leuk.Res.* 20, 397-405.
- Karabeyoglu, M., Kocer, B., Ozel, U., Atasay, F. O., Ustun, H., Dolapci, M., Karabeyoglu, I., und Cengiz, O. (2007): The protective effect of ethyl pyruvate on lung injury after burn in rats. *Saudi.Med.J.* 28, 1489-1492.
- Karabeyoglu, M., Unal, B., Bozkurt, B., Dolapci, I., Bilgihan, A., Karabeyoglu, I., und Cengiz, O. (2008): The effect of ethyl pyruvate on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury. *J.Surg.Res.* 144, 59-63.
- Kielian, T. L. und Blecha, F. (1995): CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. *Immunopharmacology* 29, 187-205.
- Kim, J. B., Yu, Y. M., Kim, S. W., und Lee, J. K. (2005): Anti-inflammatory mechanism is involved in ethyl pyruvate-mediated efficacious neuroprotection in the postischemic brain. *Brain Res.* 1060, 188-192.
- Klenzak, J. und Himmelfarb, J. (2005): Sepsis and the kidney. *Crit Care Clin.* 21, 211-222.
- Kompf, J. und Bissbort, S. (1976): Confirmation of linkage between the loci for HL-A and glyoxalase I. *Hum.Genet.* 32, 197-198.
- Kompf, J., Bissbort, S., Gussmann, S., und Ritter, H. (1975a): Polymorphism of red cell glyoxalase I (EI: 4.4.1.5); a new genetic marker in man. Investigation of 169 mother-child combinations. *Humangenetik.* 27, 141-143.

- Kompf, J., Bissbort, S., und Ritter, H. (1975b): Red cell glyoxalase i (E.C.: 4.4.1.5): formal genetics and linkage relations. *Humangenetik*. 28, 249-251.
- Kou, Q. Y. und Guan, X. D. (2008): Effect of ethyl pyruvate on indices of tissue oxygenation and perfusion in dogs with septic shock. *Zhongguo Wei Zhong.Bing.Ji.Jiu.Yi.Xue*. 20, 34-36.
- Krauss, S., Brand, M. D., und Buttgerit, F. (2001): Signaling takes a breath--new quantitative perspectives on bioenergetics and signal transduction. *Immunity*. 15, 497-502.
- Laga, M., Cottyn, A., Van, H. F., Vanden, B. W., Haegeman, G., Van, O. P., Vandekerckhove, J., und Vancompernelle, K. (2007): Methylglyoxal suppresses TNF-alpha-induced NF-kappaB activation by inhibiting NF-kappaB DNA-binding. *Biochem.Pharmacol*. 74, 579-589.
- LaLonde, C., Nayak, U., Hennigan, J., und Demling, R. (1996): Antioxidants prevent the cellular deficit produced in response to burn injury. *J.Burn Care Rehabil*. 17, 379-383.
- Leach, M., Frank, S., Olbrich, A., Pfeilschifter, J., und Thiemermann, C. (1998): Decline in the expression of copper/zinc superoxide dismutase in the kidney of rats with endotoxic shock: effects of the superoxide anion radical scavenger, tempol, on organ injury. *Br.J.Pharmacol*. 125, 817-825.
- Lee, H. J., Howell, S. K., Sanford, R. J., und Beisswenger, P. J. (2005): Methylglyoxal can modify GAPDH activity and structure. *Ann N.Y.Acad.Sci*. 1043, 135-145.
- Lee, J., Kwon, W., Jo, Y., Suh, G., und Youn, Y. (2008): Protective effects of ethyl pyruvate treatment on paraquat-intoxicated rats. *Hum.Exp.Toxicol*. 27, 49-54.
- Lee, J. Y., Kim, Y. H., und Koh, J. Y. (2001): Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J.Neurosci*. 21, RC171.
- Leoncini, G., Maresca, M., und Bonsignore, A. (1980): The effect of methylglyoxal on the glycolytic enzymes. *FEBS Lett*. 117, 17-18.
- Leoncini, G., Maresca, M., und Buzzi, E. (1989): Inhibition of the glycolytic pathway by methylglyoxal in human platelets. *Cell Biochem.Funct*. 7, 65-70.
- Lim, S. C., Choi, J. E., Kim, C. H., Duong, H. Q., Jeong, G. A., Kang, H. S., und Han, S. I. (2007): Ethyl pyruvate induces necrosis-to-apoptosis switch and inhibits high mobility group box protein 1 release in A549 lung adenocarcinoma cells. *Int.J.Mol.Med*. 20, 187-192.
- Lluis, C. und Bozal, J. (1976): LDH and structural analogues of pyruvate (author's transl). *Rev.Esp.Fisiol*. 32, 9-13.
- Lo, T. W. und Thornalley, P. J. (1992): Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by diethyl esters of glyoxalase inhibitors in vitro. *Biochem.Pharmacol*. 44, 2357-2363.

- Lo, T. W., Westwood, M. E., McLellan, A. C., Selwood, T., and Thornalley, P. J. (1994): Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllsine, and bovine serum albumin. *J.Biol.Chem.* 269, 32299-32305.
- Lohmann, K. (1932): A study of the enzymatic transformation of synthetic methylglyoxal to lactic acid. *Biochem.Z.* 254, 332-354.
- Mannervik, B. (1980): Glyoxalase I. In: *Enzymatic Basis of Detoxification*. Academic Press, New York. 2, 263-293.
- Mannervik, B., Aronsson, A. C., Marmstal, E., and Tibbelin, G. (1981): Glyoxalase I (rat liver). *Methods Enzymol.* 77, 297-301.
- Mannervik, B., Aronsson, A. C., and Tibbelin, G. (1982): Glyoxalase I from human erythrocytes. *Methods Enzymol.* 90 Pt E, 535-541.
- McCann, V. J., Davis, R. E., Welborn, T. A., Constable, I. J., and Beale, D. G. (1981): Glyoxalase phenotypes in patients with diabetes mellitus. *Aust.N.Z.J.Med.* 11, 380-382.
- McLellan, A. C. and Thornalley, P. J. (1989): Glyoxalase activity in human red blood cells fractionated by age. *Mech.Ageing Dev.* 48, 63-71.
- McLellan, A. C., Thornalley, P. J., Benn, J., and Sonksen, P. H. (1994): Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin.Sci (Lond)* 87, 21-29.
- Mertz, R. J., Worley, J. F., Spencer, B., Johnson, J. H., and Dukes, I. D. (1996): Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells by specific products of glucose metabolism. Evidence for privileged signaling by glycolysis. *J.Biol.Chem* 271, 4838-4845.
- Miglietta, A. und Gabriel, L. (1986): Methylglyoxal-tubulin interaction: studies on the aldehyde effects on hepatoma, liver and purified microtubular protein. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 51, 245-260.
- Milanesa, D. M., Choudhury, M. S., Mallouh, C., Tazaki, H., and Konno, S. (2000): Methylglyoxal-induced apoptosis in human prostate carcinoma: potential modality for prostate cancer treatment. *Eur.Urol.* 37, 728-734.
- Miller, A. G., Smith, D. G., Bhat, M., and Nagaraj, R. H. (2006): Glyoxalase I is critical for human retinal capillary pericyte survival under hyperglycemic conditions. *J.Biol.Chem* 281, 11864-11871.
- Miyaji, T., Hu, X., Yuen, P. S., Muramatsu, Y., Iyer, S., Hewitt, S. M., and Star, R. A. (2003): Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. *Kidney Int.* 64, 1620-1631.
- Mongan, P. D., Capacchione, J., Fontana, J. L., West, S., and Bunker, R. (2001): Pyruvate improves cerebral metabolism during hemorrhagic shock. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 281, H854-H864.

- Mongan, P. D., Fontana, J. L., Chen, R., and Bunger, R. (1999): Intravenous pyruvate prolongs survival during hemorrhagic shock in swine. *Am.J.Physiol* 277, H2253-H2263.
- Montgomery, C. M., Fairhurst, A. S., and Webb, J. L. (1956): Metabolic studies on heart mitochondria. III. The action of parapyruvate on alpha-ketoglutaric oxidase. *J.Biol.Chem* 221, 369-376.
- Montgomery, C. M. und Webb, J. L. (1956): Metabolic studies on heart mitochondria. II. The inhibitory action of parapyruvate on the tricarboxylic acid cycle. *J.Biol.Chem* 221, 359-368.
- Mulier, K. E., Beilman, G. J., Conroy, M. J., Taylor, J. H., Skarda, D. E., and Hammer, B. E. (2005): Ringer's ethyl pyruvate in hemorrhagic shock and resuscitation does not improve early hemodynamics or tissue energetics. *Shock* 23, 248-252.
- Murata, K., Inoue, Y., Rhee, H., and Kimura, A. (1989): 2-Oxoaldehyde metabolism in microorganisms. *Can.J.Microbiol.* 35, 423-431.
- O'Donnell-Tormey, J., Nathan, C. F., Lanks, K., DeBoer, C. J., and de la, H. J. (1987): Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J.Exp.Med.* 165, 500-514.
- Ohmori, S., Mori, M., Shiraha, K., and Kawase, M. (1989): Biosynthesis and degradation of methylglyoxal in animals. *Prog.Clin.Biol.Res.* 290, 397-412.
- Palsson-McDermott, E. M. und O'Neill, L. A. (2004): Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113, 153-162.
- Parikh, A. A., Moon, M. R., Pritts, T. A., Fischer, J. E., Szabo, C., Hasselgren, P. O., and Salzman, A. L. (2000): IL-1beta induction of NF-kappaB activation in human intestinal epithelial cells is independent of oxyradical signaling. *Shock* 13, 8-13.
- Phillips, S. A. und Thornalley, P. J. (1993): The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur.J.Biochem.* 212, 101-105.
- Principato, G. B., Bodo, M., Biagioni, M. G., Rosi, G., and Liotti, F. S. (1982): Glyoxalases and glutathione reductase activity changes in chicken liver during embryo development and after hatching. *Acta Embryol.Morphol.Exp.* 3, 173-179.
- Principato, G. B., Locci, P., Rosi, G., Talesa, V., and Giovannini, E. (1983): Activity changes of glyoxalases I-II and glutathione reductase in regenerating rat liver. *Biochem.Int.* 6, 249-255.
- Principato, G. B., Rosi, G., Talesa, V., Giovannini, E., and Uotila, L. (1987): Purification and characterization of two forms of glyoxalase II from the liver and brain of Wistar rats. *Biochim.Biophys.Acta* 911, 349-355.
- Principato, G. B., Talesa, V., Norton, S. J., Giovannini, E., and Rosi, G. (1989): Effects of some S-blocked glutathione derivatives on the prevalent glyoxalase II (a form) of rat liver. *Enzyme* 41, 175-180.

- Racker, E. (1951): The mechanism of action of glyoxalase. *J.Biol.Chem.* 190, 685-696.
- Ramana, K. V., Fadl, A. A., Tammali, R., Reddy, A. B., Chopra, A. K., and Srivastava, S. K. (2006): Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide-induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. *J.Biol.Chem* 281, 33019-33029.
- Ramasamy, R., Yan, S. F., and Schmidt, A. M. (2006): Methylglyoxal comes of AGE. *Cell* 124, 258-260.
- Ray, S. und Ray, M. (1983): Formation of methylglyoxal from aminoacetone by amine oxidase from goat plasma. *J.Biol.Chem* 258, 3461-3462.
- Sakamoto, H., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Hashimoto, Y., Naito, M., and Tsuruo, T. (2000): Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood* 95, 3214-3218.
- Sakamoto, H., Mashima, T., Yamamoto, K., and Tsuruo, T. (2002): Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *J.Biol.Chem* 277, 45770-45775.
- Salahudeen, A. K., Clark, E. C., and Nath, K. A. (1991): Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J.Clin.Invest* 88, 1886-1893.
- Sappington, P. L., Cruz, R. J., Jr., Harada, T., Yang, R., Han, Y., Englert, J. A., Ajami, A. A., Killeen, M. E., Delude, R. L., and Fink, M. P. (2005): The ethyl pyruvate analogues, diethyl oxaloproprionate, 2-acetamidoacrylate, and methyl-2-acetamidoacrylate, exhibit anti-inflammatory properties in vivo and/or in vitro. *Biochem.Pharmacol.* 70, 1579-1592.
- Sappington, P. L., Fink, M. E., Yang, R., Delude, R. L., and Fink, M. P. (2003a): Ethyl pyruvate provides durable protection against inflammation-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *Shock* 20, 521-528.
- Sappington, P. L., Han, X., Yang, R., Delude, R. L., and Fink, M. P. (2003b): Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated caco-2 enterocytic monolayers. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 304, 464-476.
- Sato, S., Kwon, Y., Kamisuki, S., Srivastava, N., Mao, Q., Kawazoe, Y., and Uesugi, M. (2007): Polyproline-rod approach to isolating protein targets of bioactive small molecules: isolation of a new target of indomethacin. *J.Am.Chem.Soc.* 129, 873-880.
- Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249, 1429-1431.
- Sellin, S., Eriksson, L. E., Aronsson, A. C., and Mannervik, B. (1983): Octahedral metal coordination in the active site of glyoxalase I as evidenced by the properties of Co(II)-glyoxalase I. *J.Biol.Chem.* 258, 2091-2093.

- Sen, R. und Baltimore, D. (1986): Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- Senftleben, U. und Karin, M. (2002): The IKK/NF-kappa B pathway. *Crit Care Med.* 30, S18-S26.
- Shangari, N. und O'Brien, P. J. (2004): The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochem.Pharmacol.* 68, 1433-1442.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., und Brown, K. (1994): Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu.Rev.Cell Biol.* 10, 405-455.
- Sileri, P., Schena, S., Morini, S., Rastellini, C., Pham, S., Benedetti, E., und Cicalese, L. (2001): Pyruvate inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 72, 27-30.
- Simmons, D. L., Tan, S., Tenen, D. G., Nicholson-Weller, A., und Seed, B. (1989): Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73, 284-289.
- Sims, C. A., Wattanasirichaigoon, S., Menconi, M. J., Ajami, A. M., und Fink, M. P. (2001): Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit Care Med.* 29, 1513-1518.
- Slovin, P. N., Huang, C. J., Cade, J. R., Wood, C. E., Nasiroglu, O., Privette, M., Orbach, P., und Skimming, J. W. (2001): Sodium pyruvate is better than sodium chloride as a resuscitation solution in a rodent model of profound hemorrhagic shock. *Resuscitation* 50, 109-115.
- Song, M., Kellum, J. A., Kaldas, H., und Fink, M. P. (2004): Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 308, 307-316.
- Span, L. F., Pennings, A. H., Vierwinden, G., Boezeman, J. B., Raymakers, R. A., und de, W. T. (2002): The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytometry* 47, 24-31.
- Speer, O., Morkunaite-Haimi, S., Liobikas, J., Franck, M., Hensbo, L., Linder, M. D., Kinnunen, P. K., Wallimann, T., und Eriksson, O. (2003): Rapid suppression of mitochondrial permeability transition by methylglyoxal. Role of reversible arginine modification. *J.Biol.Chem* 278, 34757-34763.
- Sprong, R. C., Aarsman, C. J., van Oirschot, J. F., und van Asbeck, B. S. (1997): Dimethylthiourea protects rats against gram-negative sepsis and decreases tumor necrosis factor and nuclear factor kappaB activity. *J.Lab Clin.Med.* 129, 470-481.
- Su, F., Wang, Z., Cai, Y., Rummelink, M., und Vincent, J. L. (2007): Beneficial effects of ethyl pyruvate in septic shock from peritonitis. *Arch.Surg.* 142, 166-171.

- Su, J., Li, X., Cui, X., Li, Y., Fitz, Y., Hsu, L., Mani, H., Quezado, M., and Eichacker, P. Q. (2008): Ethyl pyruvate decreased early nuclear factor-kappaB levels but worsened survival in lipopolysaccharide-challenged mice. *Crit Care Med.*
- Takasawa, R., Takahashi, S., Saeki, K., Sunaga, S., Yoshimori, A., and Tanuma, S. I. (2008): Structure-activity relationship of human GLO I inhibitory natural flavonoids and their growth inhibitory effects. *Bioorg.Med.Chem.*
- Tawadrous, Z. S., Delude, R. L., and Fink, M. P. (2002): Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. *Shock* 17, 473-477.
- Taylor, M. D., Grand, T. J., Cohen, J. E., Hsu, V., Liao, G. P., Zentko, S., Berry, M. F., Gardner, T. J., and Woo, Y. J. (2005): Ethyl pyruvate enhances ATP levels, reduces oxidative stress and preserves cardiac function in a rat model of off-pump coronary bypass. *Heart Lung Circ.* 14, 25-31.
- Thannickal, V. J. und Fanburg, B. L. (2000): Reactive oxygen species in cell signaling. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 279, L1005-L1028.
- Thornalley, P. J. (1990): The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem.J.* 269, 1-11.
- Thornalley, P. J. (1991): Population genetics of human glyoxalases. *Heredity* 67 (Pt 2), 139-142.
- Thornalley, P. J. (1993): The glyoxalase system in health and disease. *Mol.Aspects Med.* 14, 287-371.
- Thornalley, P. J. (2003): Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem.Soc.Trans.* 31, 1343-1348.
- Thornalley, P. J., Edwards, L. G., Kang, Y., Wyatt, C., Davies, N., Ladan, M. J., and Double, J. (1996): Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochem.Pharmacol.* 51, 1365-1372.
- Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahey, T. J., III, Zentella, A., Albert, J. D., und . (1986): Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234, 470-474.
- Tsung, A., Kaizu, T., Nakao, A., Shao, L., Bucher, B., Fink, M. P., Murase, N., and Geller, D. A. (2005): Ethyl pyruvate ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by decreasing hepatic necrosis and apoptosis. *Transplantation* 79, 196-204.
- Uchiyama, T., Delude, R. L., and Fink, M. P. (2003): Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. *Intensive Care Med.* 29, 2050-2058.
- Ulloa, L., Ochani, M., Yang, H., Tanovic, M., Halperin, D., Yang, R., Czura, C. J., Fink, M. P., and Tracey, K. J. (2002): Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with

- established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 12351-12356.
- Uotila, L. (1973): Purification and characterization of S-2-hydroxyacylglutathione hydrolase (glyoxalase II) from human liver. *Biochemistry* 12, 3944-3951.
- Vaca, C. E., Fang, J. L., Conradi, M., and Hou, S. M. (1994): Development of a ³²P-postlabelling method for the analysis of 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA adducts of methylglyoxal. *Carcinogenesis* 15, 1887-1894.
- van der Geer, P. (2002): Phosphorylation of LRP1: regulation of transport and signal transduction. *Trends Cardiovasc.Med.* 12, 160-165.
- van Zoelen, M. A., Bakhtiari, K., Dessing, M. C., van't, V. C., Spek, C. A., Tanck, M., Meijers, J. C., and van der, P. T. (2006): Ethyl pyruvate exerts combined anti-inflammatory and anticoagulant effects on human monocytic cells. *Thromb.Haemost.* 96, 789-793.
- Vander Jagt, D. L. (1989): The glyoxalase system. In: *Glutathione "Chemical, Biochemical and Medical Aspects"*. Wiley-Interscience, New York , 597-641.
- Vander Jagt, D. L., Hassebrook, R. K., Hunsaker, L. A., Brown, W. M., and Royer, R. E. (2001): Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. *Chem Biol.Interact.* 130-132, 549-562.
- Varma, S. D., Devamanoharan, P. S., and Ali, A. H. (1998): Prevention of intracellular oxidative stress to lens by pyruvate and its ester. *Free Radic.Res.* 28, 131-135.
- Varma, S. D., Hegde, K. R., and Kovtun, S. (2006): Oxidative damage to lens in culture: reversibility by pyruvate and ethyl pyruvate. *Ophthalmologica* 220, 52-57.
- Venkataraman, R., Kellum, J. A., Song, M., and Fink, M. P. (2002): Resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution prolongs survival and modulates plasma cytokine and nitrite/nitrate concentrations in a rat model of lipopolysaccharide-induced shock. *Shock* 18, 507-512.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 184, 39-51.
- Vince, R. und Daluge, S. (1971): Glyoxalase inhibitors. A possible approach to anticancer agents. *J.Med.Chem.* 14, 35-37.
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P. E., Abumrad, N. N., Sama, A., and Tracey, K. J. (1999): HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285, 248-251.
- Wang, L. Z., Sun, W. C., and Zhu, X. Z. (2005): Ethyl pyruvate protects PC12 cells from dopamine-induced apoptosis. *Eur.J.Pharmacol.* 508, 57-68.

- Wang, W. J., Yao, Y. M., Xian, L. M., Dong, N., and Yu, Y. (2006): Effect of treatment with ethyl pyruvate on multiple organ dysfunction and mortality following delayed resuscitation after burn injury in rat. *Zhongguo Wei Zhong.Bing.Ji.Jiu.Yi.Xue.* 18, 132-135.
- Warburg, O. (1956): On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Weaver, R. H. und Lardy, H. A. (1961): Synthesis and some biochemical properties of phosphohydroxypyruvic aldehyde and of 3-phosphoglyceryl glutathione thiol ester. *J.Biol.Chem* 236, 313-317.
- Wichmann, M. W., Haisken, J. M., Ayala, A., and Chaudry, I. H. (1996): Melatonin administration following hemorrhagic shock decreases mortality from subsequent septic challenge. *J.Surg.Res.* 65, 109-114.
- Wieczorek, E. und Dobosz, T. (1979): Phenotypes of blood group enzymes (AK, ADA, 6PGD, PGM-1, EsD and GLO) during man's fetal life. *Ginekol.Pol.* 50, 23-29.
- Wieland, T., Pfeleiderer, G., und Lau, H. H. (1956): Knowledge on glyoxalases. *Biochem.Z.* 327, 393-406.
- Willems, J. L., de Kort, A. F., Vree, T. B., Trijbels, J. M., Veerkamp, J. H., und Monnens, L. A. (1978): Non-enzymic conversion of pyruvate in aqueous solution to 2,4-dihydroxy-2-methylglutaric acid. *FEBS Lett.* 86, 42-44.
- Wink, D. A. und Mitchell, J. B. (1998): Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic.Biol.Med.* 25, 434-456.
- Woo, Y. J., Taylor, M. D., Cohen, J. E., Jayasankar, V., Bish, L. T., Burdick, J., Pirolli, T. J., Berry, M. F., Hsu, V., und Grand, T. (2004): Ethyl pyruvate preserves cardiac function and attenuates oxidative injury after prolonged myocardial ischemia. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 127, 1262-1269.
- Wu, L., Eftekharpour, E., Davies, G. F., Roesler, W. J., und Juurlink, B. H. (2001): Troglitazone selectively inhibits glyoxalase I gene expression. *Diabetologia* 44, 2004-2012.
- Wu, L. und Juurlink, B. H. (2002): Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 39, 809-814.
- Yang, R., Gallo, D. J., Baust, J. J., Uchiyama, T., Watkins, S. K., Delude, R. L., und Fink, M. P. (2002): Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 283, G212-G221.
- Yang, R., Han, X., Delude, R. L., und Fink, M. P. (2003): Ethyl pyruvate ameliorates acute alcohol-induced liver injury and inflammation in mice. *J.Lab Clin.Med.* 142, 322-331.
- Yang, R., Uchiyama, T., Alber, S. M., Han, X., Watkins, S. K., Delude, R. L., und Fink, M. P. (2004a): Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med.* 32, 1453-1459.

- Yang, R., Uchiyama, T., Watkins, S. K., Han, X., und Fink, M. P. (2004b): Ethyl pyruvate reduces liver injury in a murine model of extrahepatic cholestasis. *Shock* 22, 369-375.
- Yu, Y. M., Kim, J. B., Lee, K. W., Kim, S. Y., Han, P. L., und Lee, J. K. (2005): Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window. *Stroke* 36, 2238-2243.
- Zacharowski, K., Olbrich, A., Cuzzocrea, S., Foster, S. J., und Thiernemann, C. (2000): Membrane-permeable radical scavenger, tempol, reduces multiple organ injury in a rodent model of gram-positive shock. *Crit Care Med.* 28, 1953-1961.
- Zawalich, W. S. und Zawalich, K. C. (1997): Influence of pyruvic acid methyl ester on rat pancreatic islets. Effects on insulin secretion, phosphoinositide hydrolysis, and sensitization of the beta cell. *J.Biol.Chem* 272, 3527-3531.
- Zhao, W., Devamanoharan, P. S., Henein, M., Ali, A. H., und Varma, S. D. (2000): Diabetes-induced biochemical changes in rat lens: attenuation of cataractogenesis by pyruvate. *Diabetes Obes.Metab* 2, 165-174.
- Zuin, A., Vivancos, A. P., Sanso, M., Takatsume, Y., Ayte, J., Inoue, Y., und Hidalgo, E. (2005): The glycolytic metabolite methylglyoxal activates Pap1 and Sty1 stress responses in *Schizosaccharomyces pombe*. *J.Biol.Chem* 280, 36708-36713.

7. Eigene Publikationen

- Hollenbach, M., Hintersdorf, A., Huse, K., Sack, U., Bigl, M., Groth, M., Santel, T., Buchold, M., Lindner, I., Otto, A., Sicker, D., Schellenberger, W., Almendinger, J., Pustowoit, B., Birkemeyer, C., Platzer, M., Oerlecke, I., Hemdan, N. und Birkenmeier, G. (2008): Ethyl pyruvate and ethyl lactate down-regulate the production of pro-inflammatory cytokines and modulate expression of immune receptors. *Biochem Pharmacol.* 76, 631-644.
- Santel, T., Pflug, G., Hemdan, N. Y., Schäfer, A., Hollenbach, M., Buchold, M., Hintersdorf, A., Lindner, I., Otto, A., Bigl, M., Oerlecke, I., Hutschenreuter, A., Sack, U., Huse, K., Groth, M., Birkemeyer, C., Schellenberger, W., Gebhardt, R., Platzer, M., Weiss, T., Vijayalakshmi, M. A., Krüger, M. und Birkenmeier, G. (2008): Curcumin inhibits glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. *PloS One.* e3508.

8. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Das Glyoxalasesystem.	1
Abbildung 2: Struktur der Glyoxalase I.	2
Abbildung 3: Chemische Strukturen von Pyruvat und verwandten Verbindungen.	7
Abbildung 4: Trennung der Blutbestandteile nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.	24
Abbildung 5: Beispiel der durchflusszytometrischen Messung der „Capture-Beads“.	28
Abbildung 6: Beispiel der durchflusszytometrischen Bestimmung der Oberflächenmarker.....	30
Abbildung 7: Beispiel der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptose von unbehandelten THP-1-Zellen.....	33
Abbildung 8: Die Hemmung der humanen GLO-1 durch Ethylpyruvat, nicht aber durch L-Ethyllaktat.	34
Abbildung 9: Die spezifische Aktivität der Glyoxalase I in THP-1-Zellen und PBMCs.	35
Abbildung 10: Einfluss von Ethylpyruvat auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Vollblut nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	37
Abbildung 11: Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Vollblut nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	38
Abbildung 12: Einfluss von Methylglyoxal auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Vollblut nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	40
Abbildung 13: Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	42
Abbildung 14: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit EP als Dot-Plot.	42
Abbildung 15: Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	43
Abbildung 16: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit Ethylpyruvat als Dot-Plot.	44
Abbildung 17: Einfluss von Ethylpyruvat auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	45
Abbildung 18: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit Ethylpyruvat als Dot-Plot.	45

Abbildung 19: Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	46
Abbildung 20: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit L-Ethyllaktat als Dot-Plot.....	47
Abbildung 21: Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	48
Abbildung 22: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit L-Ethyllaktat als Dot-Plot.....	48
Abbildung 23: Einfluss von L-Ethyllaktat auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	49
Abbildung 24: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit L-Ethyllaktat als Dot-Plot.....	50
Abbildung 25: Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.	51
Abbildung 26: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit D-Ethyllaktat als Dot-Plot.	51
Abbildung 27: Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	52
Abbildung 28: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit D-Ethyllaktat als Dot-Plot.....	53
Abbildung 29: Einfluss von D-Ethyllaktat auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	54
Abbildung 30: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit D-Ethyllaktat als Dot-Plot.....	54
Abbildung 31: Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	55
Abbildung 32: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit Butyllaktat als Dot-Plot.	56
Abbildung 33: Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.	57
Abbildung 34: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit Butyllaktat als Dot-Plot.....	57
Abbildung 35: Einfluss von Butyllaktat auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.	58

Abbildung 36: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit Butyllaktat als Dot-Plot.....	59
Abbildung 37: Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von HLA-DR auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.	60
Abbildung 38: Grafische Auswertung der Messdaten von HLA-DR bei der Behandlung mit Methylglyoxal als Dot-Plot.	60
Abbildung 39: Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von CD14 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	61
Abbildung 40: Grafische Auswertung der Messdaten von CD14 bei der Behandlung mit Methylglyoxal als Dot-Plot.....	62
Abbildung 41: Einfluss von Methylglyoxal auf die Expression von CD91 auf Monozyten nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden.....	63
Abbildung 42: Grafische Auswertung der Messdaten von CD91 bei der Behandlung mit Methylglyoxal als Dot-Plot.....	63
Abbildung 43: Detektion der Apoptose und Nekrose von unbehandelten Zellen.....	65
Abbildung 44: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM Ethylpyruvat.....	66
Abbildung 45: Grafische Darstellung der Detektion von Apoptose und Nekrose von PBMCs.....	66
Abbildung 46: Grafische Darstellung der Detektion von Apoptose und Nekrose von THP-1-Zellen.	67
Abbildung 47: Detektion der Apoptose und Nekrose nach konzentrationsabhängiger Behandlung mit Ethylpyruvat.	68
Abbildung 48: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM L-Ethyllaktat.	69
Abbildung 49: Detektion der Apoptose und Nekrose nach konzentrationsabhängiger Behandlung mit L-Ethyllaktat.....	70
Abbildung 50: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM D-Ethyllaktat.	71
Abbildung 51: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM Pyruvat.	72
Abbildung 52: Detektion der Apoptose und Nekrose nach Behandlung mit 20 mM Ethanol.	74

9. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

2-AA: 2-Acetamidoacrylat

AGEs: advanced glycation endproducts

Ala: Alanin

APC: Allophycocyanin

ATP: Adenosin-tri-phosphat

BL: Butyllaktat

CBA: Cytometric Bead Array

CD: cluster of differentiation

Co²⁺: Cobalt

COX-2: Cyclooxygenase-2

Da: Dalton

DEOP: Diethyloxalopropionat

DNA: Desoxyribunukleinsäure

EL: L-Ethyllaktat

EP: Ethylpyruvat

FACS: Fluorescent Activated Cell Sorting

FITC: Fluoresceinisothiocyanat

FKS: Fetales Kälberserum

FSC: Forward Scatter

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Gln: Glutamin

Glo-I: Glyoxalase I

Glo-II: Glyoxalase II

Glu: Glutamat

GSH: reduziertes Glutathion

GSSG: oxidiertes Glutathion

H₂O₂: Wasserstoffperoxid

His: Histidin

Hitzeschockprotein

HLA: Human Leukocyte Antigen

HMGB1: High mobility group box protein 1

ICAM1: Intercellular adhesion molecule 1

IFN: Interferon
IL: Interleukin
KG: Körpergewicht
LBP: LPS-Bindungs-Protein
LDH: Laktatdehydrogenase
LDL: low-density-lipoprotein
LPS: Lipopolysaccharid
MAPK: mitogenaktivierte Proteinkinase
Me-2-AA: Methyl-2-Acetamidoacrylat
Met: Methionin
MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität
Mg²⁺: Magnesium
MGO: Methylglyoxal
MHC: major histocompatibility complex
MIP: Makrophagen-Inflamations-Protein
MKK: mitogenaktivierte Proteinkinasekinase
Mn²⁺: Mangan
mRNA: messenger Ribonukleinsäure
MTX: Methotrexat
NAC: N-Acetylcystein
NF-κB: Nukleärer Faktor κB 4
Ni²⁺: Nickel
NO: Stickstoffmonoxid
O₂^{•-}: Superoxidanion-Radikal
OH[•]: Hydroxyl-Radikal
ONOO⁻: Peroxynitrit
PAI: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PaO₂/FiO₂: Horovitz-Quotient 13
PBMCs: periphere mononukleäre Zellen
PBS: phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE: Phycoerythrin
PI: Propidiumiodid
REPS: Ringer-Ethylpyruvat-Lösung
RLS: Ringer-Laktat-Lösung

ROS: Reactive Oxygen Species / reaktive Sauerstoffspezies

RSA: Rinderserumalbumin

SSC: Sideward Scatter

TIM: Triosephosphatisomerasereaktion

TLR: toll-like-Rezeptor

TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor α

Zn²⁺: Zink

10. Lebenslauf

Name: Hollenbach, Marcus
Adresse: Wurzner Straße 161, 1. OG links, 04318 Leipzig
Geburtsdatum: 12.07.1983
Geburtsort: Bad Salzungen
Nationalität: deutsch
Eltern: Bernd Hollenbach, Lehrer
Damaris Hollenbach, Lehrerin

Schulische Ausbildung und Studium:

`90 bis `94: Grundschule Wiesenthal
`94 bis `02: Dr.-Sulzberger-Gymnasium Bad Salzungen
Abschluss durch Abitur mit Durchschnitt 1,4
August `02 bis Mai `03: Zivildienst am Klinikum Bad Salzungen
seit Oktober `03: Medizinstudium an der Universität Leipzig
August `05: erfolgreicher Abschluss des ersten Abschnitts der ärztlichen
Prüfung mit der Note „gut“

Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit Februar `06: Anfertigung einer Dissertation zur Erlangung des
akademischen Grades „doctor medicinae“ am Institut für
Biochemie der Universität Leipzig zum Thema:
„Die immunmodulatorische Wirkung von Ethylpyruvat“

Praktische Tätigkeiten:

2000: zweiwöchiges Praktikum auf traumatologischer Station
im Klinikum Bad Salzungen
August `02 bis Mai `03: Zivildienst auf am Klinikum Bad Salzungen
Juli / August `06: 30-tägige Famulatur auf gastroenterologischer Station
in der Universitätsklinik Leipzig
August / September `06: 30-tägige Famulatur im chirurgischen Notfallzentrum in
Leipzig
Juli / August `07: 30-tägige Famulatur im Herzzentrum Leipzig

Februar / März `08: 30-tägige Famulatur in gastroenterologischer
Gemeinschaftspraxis in Leipzig

August bis November `09: PJ-Tertial Anästhesie an der Universität Leipzig

Dezember `08 bis März `09: PJ-Tertial Innere Medizin an der Universität Leipzig

April bis Juli `09: PJ-Tertial Chirurgie im Kantonspital Bruderholz / Schweiz

11. Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. med. Gerd Birkenmeier für die freundliche Überlassung des Themas, für die hervorragende fachliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen, die Durchsicht meiner Arbeit und die angenehme Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön gilt auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Birkenmeier im Institut für Biochemie für die Unterstützung beim Erlernen der verschiedenen Arbeitsmethoden und die außergewöhnlich nette Arbeitsatmosphäre. Ganz besonderer Dank gilt dabei Dr. Andreas Otto, Angelika Schäfer und Elke Usbeck für die vielen wertvollen Ratschläge und die jederzeit bereitwillige Auskunft auf meine Fragen. Ebenso bedanke ich mich bei Fr. Knaack aus dem Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin für ihre fachkundige Hilfe bei der Einstellung und Messung mit dem Durchflusszytometer.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und meiner Freundin Anja Hintersdorf für die Unterstützung in schwierigen Zeiten, die Geduld und das Zuhören.

12. Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift