

**„Die Bedeutung von Hypoxie und Endotoxintoleranz
für die Funktion von Monozyten und Makrophagen
sowie für die Wechselwirkung von Monozyten und
Endothel“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Sandra Winning

geb. Hoffmann

geboren in Wesel

Institut für Physiologie
der
Universität Duisburg-Essen

2009

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2007 bis Oktober 2009 im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Fandrey am Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 20.07.2010

Gutachter: Prof. Dr. J. Fandrey
Prof. Dr. M. Epple
Prof. Dr. B. Walzog
Vorsitzender: Prof. Dr. G. Haberhauer

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung</i>	6
1.1	Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF-1, -2, -3)	7
1.1.1	Aufbau und physiologische Funktion	7
1.1.2	Sauerstoffabhängige Aktivierung von HIF- α -Untereinheiten	9
1.1.3	Sauerstoffunabhängige Aktivierung von HIF-1/2 α	11
1.2	Effekte der HIF-Aktivierung	12
1.2.1	HIF-1 α	12
1.2.2	HIF-2 α	13
1.3	Funktion von Monozyten/Makrophagen und Endothel unter Hypoxie und Entzündung	14
1.3.1	Monozyten und Sauerstoffmangel	14
1.3.2	Extravasation: Zusammenspiel von Monozyten und Endothel	14
1.3.3	Makrophagenfunktion in inflammatorischen Geweben	18
1.3.4	Inflammatorisches Preconditioning/ Etablierung von Endotoxintoleranz	19
2.	<i>Ziel der Arbeit</i>	20
3.	<i>Material und Methoden</i>	22
3.1	Verwendete Geräte und Substanzen	22
3.1.1	Geräte	22
3.1.2	Substanzen	25
3.1.2.1	Chemikalien	25
3.1.2.2	Antikörper	26
3.1.2.3	RT-Reagenzien, PCR-Primer und -Zusätze	27
3.1.2.4	siRNA	28
3.1.2.5	Zellkulturmedien	28
3.1.2.6	Puffer	28
3.2	Versuchstiere	32
3.2.1	Tierhaltung und -zucht	32
3.2.2	Transgene Mäusestämme	32
3.2.3	Genotypisierung	33
3.3	Zelllinien und Zellkultur	35
3.4	Versuchsbedingungen und Aufarbeitung der Zellysate	39
3.4.1	Allgemeine Versuchsbedingungen	39
3.4.2	Etablierung der Endotoxintoleranz	39
3.4.3	Cokulturversuche	40
3.4.4	Proteinisolierung und -analyse	42
3.4.4.1	Gesamtzellysat	42
3.4.4.2	Kernextrakte	42
3.4.4.3	Proteinbestimmung nach Lowry	43
3.4.4.4	Antikörper und Western Blot Analysen	43
3.4.4.5	Immunfluoreszenz	45
3.4.4.6	NF- κ B-Assay	48

3.4.5	RNA-Isolierung / cDNA-Synthese	49
3.4.5.1	PCR und real-time PCR	50
3.4.5.2	Transfektion mit siRNA	52
3.4.6	Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Assay	54
3.4.7	Phagozytose-Assay	55
3.4.8	MatriGel Invasionsassay	56
3.4.9	Statistik	57
4.	<i>Ergebnisse</i>	58
4.1	Inflammatorische Präkonditionierung bzw. Etablierung von Endotoxintoleranz	58
4.1.1	Die Etablierung von Endotoxintoleranz führt zu einer signifikanten Verminderung der HIF-1 α -Protein- sowie -mRNA-Expression	58
4.1.2	Die Etablierung von Endotoxintoleranz ist auch <i>in vivo</i> möglich und führt hier ebenfalls zu verminderter HIF-1 α -Expression	62
4.1.3	Die Etablierung der Endotoxintoleranz kann durch den Knock-down des p52-Vorläuferproteins p100 verhindert werden	64
4.1.4	Veränderte Bedingungen zur Etablierung von Endotoxintoleranz	66
4.1.5	Auswirkungen von Endotoxintoleranz auf das Verhalten von THP-1-Zellen	71
4.2	Auswirkungen akuter, schwerer Hypoxie auf die Interaktion zwischen Monozyten und Endothel	75
4.2.1	THP-1-Zellen exprimieren interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1	75
4.2.2	Schwere, akute Hypoxie induziert ICAM-1 in humanen Monozyten	82
4.2.3	Schwere, akute Hypoxie führt zur Anheftung von Monozyten an Endothelzellen	84
4.2.4	Die Hypoxie-induzierte Adhäsion ans Endothel ist abhängig von der monozytären ICAM-1 Expression	88
4.2.5	Veränderungen in der HIF-Expression in Monozyten und Endothelzellen während der Cokultorexperimente	93
4.2.6	Rolle von HIF-1 α bei der Regulation des Adhäsionsproteins ICAM-1	98
4.2.7	Auswirkungen von Hypoxie und LPS-Inkubation auf die Expression von endothelialelem ICAM-1 in HUVEC-Zellen	108
4.3	Auswirkungen der LPS-Vorbehandlung auf die Interaktion zwischen Monozyten und Endothel	113
5.	<i>Diskussion</i>	116
5.1	Beeinflussung der HIF-1α-Expression durch die Etablierung von Endotoxintoleranz	116
5.2	Auswirkungen akuter Hypoxie auf die Monozyten-Endothel-Interaktion	123
5.3	Auswirkungen der LPS-Vorbehandlung auf die Monozyten-Endothel-Interaktion	133
6.	<i>Zusammenfassung</i>	135
7.	<i>Literatur</i>	137

8.	<i>Anhang</i>	152
8.1	Abkürzungsverzeichnis	152
8.2	Einwilligungserklärung zur Nabelschnurspende	156
8.3	Publikationsliste	158
8.4	Lebenslauf	160
8.5	Erklärung	161
8.6	Danksagung	162

1. Einleitung

Eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff stellt eine Grundvoraussetzung für das Überleben und die Funktion aller Zellen dar. Der Energiestoffwechsel der Einzelzelle hängt dabei über die oxidative Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette unmittelbar vom Sauerstoffpartialdruck im Gewebe ab. Man spricht von Hypoxie, sobald die Sauerstoffspannung in der Umgebung einer Zelle unter den für sie gewohnten Normalwert absinkt. In diesem Fall ist die Zelle auf Regulationsmechanismen angewiesen, die es ihr ermöglichen, sich an diese neuen Gegebenheiten anzupassen. Dies bedeutet konkret, dass die Resynthese von ATP (Adenosintriphosphat), dem zellulären Energielieferanten, aufrechterhalten werden muss.

Medizinische Ursachen für einen Sauerstoffmangel im Gewebe können vielfältig sein: Bei der Ischämie ist die lokale Durchblutung gestört, Patienten mit Anämie weisen erniedrigte Blut-Hämoglobinspiegel auf, wodurch der Sauerstofftransport eingeschränkt ist. Darüber hinaus entstehen sowohl in soliden Tumoren als auch in Herden bakterieller Entzündung oft große hypoxische Areale. Häufig übertrifft die Proliferation der Tumorzellen die Ausbildung der Tumolvaskularisierung oder die neu gebildeten Gefäße sind nicht ausreichend funktionsfähig, was zu einem Absinken der Sauerstoffspannung im Tumor führt. In Wundgeweben entstehen hypoxische Areale außer durch mangelhafte Perfusion vor allem durch die massive Invasion von Zellen der Immunabwehr (Neutrophile, Monozyten, später auch rekrutierte Fibroblasten und Endothelzellen), da diese metabolisch hochaktiv sind und einen Großteil des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs konsumieren (Murdoch et al., 2005).

Zentrale Schaltstelle zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase sind in all diesen Fällen die Hypoxie-induzierbaren Faktoren 1-3 (HIF-1-3). Diese Transkriptionsfaktoren verändern die Genexpression der Zelle dahingehend, dass zum einen eine maximale Sauerstoffzufuhr von außen ermöglicht wird, zum

anderen soviel Energie wie möglich über die anaerobe Glykolyse gewonnen werden kann. Die wichtigsten Mechanismen zur Verbesserung des Sauerstofftransports zur Zelle sind hierbei eine Steigerung der Angiogenese (Gefäßneubildung) sowie eine vermehrte Synthese von Erythrozyten (Erythropoiese), weswegen man unter den HIF-Zielgenen neben einer Reihe von glykolytischen Enzymen (z.B. Phosphoglyceratkinase-1, PGK-1) angiogenetische Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) und Adrenomedullin (ADM) sowie Erythropoietin findet.

1.1 Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF-1, -2, -3)

1.1.1 Aufbau und physiologische Funktion

Als zentrale Antwort auf Hypoxie im Gewebe aktivieren Hypoxie-induzierbare Faktoren die Expression einer Reihe von Genen, die Angiogenese, Erythropoiese und Glykolyse kontrollieren und somit eine Verbesserung des Sauerstofftransports zur Zielzelle und deren Versorgung mit ATP garantieren. Bei Säugetieren konnte bei drei Genen gezeigt werden, dass sie für HIF- α -Untereinheiten kodieren, wovon HIF-1 α und HIF-2 α deutlich besser charakterisiert sind als ihr Ortholog HIF-3 α .

Die sauerstoffsensitive HIF-1 α -Untereinheit weist eine molekulare Masse von 120 kDa auf und unterliegt bei normoxischen Bedingungen der kontinuierlichen Neubildung und Degradation. Unter Hypoxie erfolgt die Stabilisierung des Proteins; der Translokation in den Nukleus folgt die Dimerisierung mit einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit (91-94 kDa). Diese ist auch bekannt als ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator).

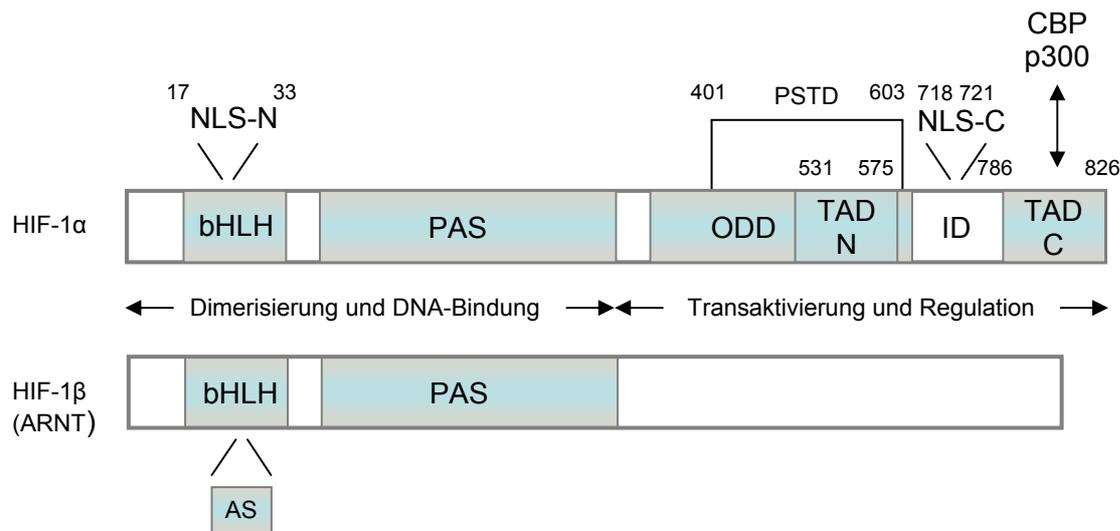


Abb. 1.1: Struktur des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1.

HIF-1 α besteht aus 826 Aminosäuren, HIF-1 β wird entweder als 774- oder als 789-AS-Polypeptid exprimiert. Die unterschiedlichen Varianten sind dabei die Folge eines alternativen Spleißvorgangs eines Exons, das 15 AS enthält. Die basischen Helix-Schleife-Helix-(bHLH) sowie die PAS-Domänen dienen der Heterodimerisierung und Bindung an die DNA.

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheiten weisen am N-terminalen Ende zum einen basische Helix-Schleife-Helix-Domänen (bHLH), zum anderen PER-ARNT-SIM (PAS)-homologe Domänen auf. Die bHLH ist das Merkmal einer großen Protein-Superfamilie eukaryontischer Transkriptionsfaktoren. Die HLH-Domäne dient zur Regulation der Heterodimerisierung, wohingegen die basische Domäne den DNA-Kontakt vermittelt (Semenza, 2000).

Die PAS-Domänen weisen Homologien zu den Proteinen period (PER) und single-minded (SIM) in *Drosophila* sowie zu dem arylhydrocarbon receptor (AhR) bzw. arylhydrocarbon nuclear translocator (ARNT) in Säugern auf (Wang et al., 1995). HIF-1 α sowie HIF-2 α binden an sogenannte Hypoxie-responsive Elemente (HREs) auf ihren jeweiligen Zielgenen und induzieren somit die Genexpression. Während HIF-1 α ubiquitär exprimiert wird, findet man HIF-2 α gewebespezifisch nur im vaskulären Endothel, Leberparenchym, Lungenpneumocyten (Typ II) und Nierenepithelzellen. HIF-3 α findet sich im Thymus, cerebellaren Purkinje-Zellen und dem Cornea-Epithel, fungiert jedoch als negativer Regulator der HIF-1/2 α -vermittelten Transkription (Bertout et al., 2008).

1.1.2 Sauerstoffabhängige Aktivierung von HIF- α -Untereinheiten

Die sauerstoffabhängige Regulation der Hypoxie-induzierbaren Faktoren basiert auf posttranslationalen Modifikationen zur Beeinflussung der Proteinstabilität. Unter normoxischen Bedingungen erfolgt eine Hydroxylierung der HIF- α -Untereinheit, die sie der Ubiquitylierung und proteasomaler Degradation zuführt. Verantwortlich für diesen initialen Schritt zeichnet eine Gruppe von Enzymen, die Prolylhydroxylase-Aktivität besitzen, die so genannten PHDs (Prolylhydroxylase-Domäne-enthaltende Proteine) 1, 2 und 3. Ihnen kommt in der sauerstoffabhängigen Aktivierung von HIF- α -Untereinheiten die Rolle des Sauerstoffsensors zu (Epstein et al., 2001): Sie hydroxylieren bei ausreichend zur Verfügung stehendem Sauerstoff die Prolylreste 402 und 564 in den so genannten ODDs (sauerstoffabhängige Degradationsdomänen) des HIF- α -Proteins. Die ODDs werden in einen N-terminalen sowie einen C-terminalen Bereich gegliedert; Pro-402 liegt in der N-ODD und wird nur von PHD 1 und 2 erkannt, Pro-564 befindet sich in der C-ODD und wird von allen PHDs hydroxyliert. Dabei bindet Sauerstoff zunächst koordinativ an einem Fe(II)-Atom im aktiven Zentrum der Enzyme. Durch diese Koordination verliert die O=O-Bindung einen Teil ihres Doppelbindungscharakters, wird gespalten und ein Sauerstoffatom in die neu entstehende Hydroxy-Gruppe eingebaut. Das zweite wird an das Cosubstrat 2-Oxoglutarat angelagert, das daraufhin unter CO₂-Abspaltung zum Succinat reagiert. Das hydroxylierte HIF- α -Protein wird vom von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL) erkannt und dem E3-Ubiquitinligase-Komplex zugeführt. Dieser markiert das Protein durch Ubiquitylierung für die proteasomale Degradation.

Unter Hypoxie werden die PHDs in ihrer Aktivität gehemmt; die Initiation des HIF- α -Abbaus unterbleibt und die Untereinheiten können zunächst im Zytosol akkumulieren, um später mittels einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) in den Kern zu translozieren und dort ein Heterodimer mit der β -Untereinheit zu

bilden. Erst dann wird die transkriptionelle Aktivität entfaltet (Wenger et al., 2002).

Hierzu werden jedoch noch einige Cofaktoren benötigt, die mit dem HIF-Heterodimer über so genannte Transaktivierungsdomänen (TAD) interagieren. Diese liegen sowohl N- als auch C-terminal (N- und C-TAD) vor. Die wohl bedeutendste Rolle unter den transkriptionellen Coaktivatoren nimmt p300/CBP ein, das über seine Cystein- und Histidin-reiche Domäne (CH1) mit der C-TAD in Wechselwirkung tritt (Masson et al., 2003). Dadurch entsteht ein Gerüst für die Anlagerung weiterer Transkriptionsfaktoren, außerdem erleichtert p300/CBP die Transkription durch Acetylierung und Umlagerung von Histonproteinen (Gu et al., 2001).

Der HIF-1-inhibierende Faktor (FIH-1) stellt einen weiteren Sauerstoffsensor im Zytosol dar. Er sorgt für die Hydroxylierung des Asparaginrests 802 innerhalb der C-TAD und verhindert somit unter Normoxie die Bindung des p300/CBP.

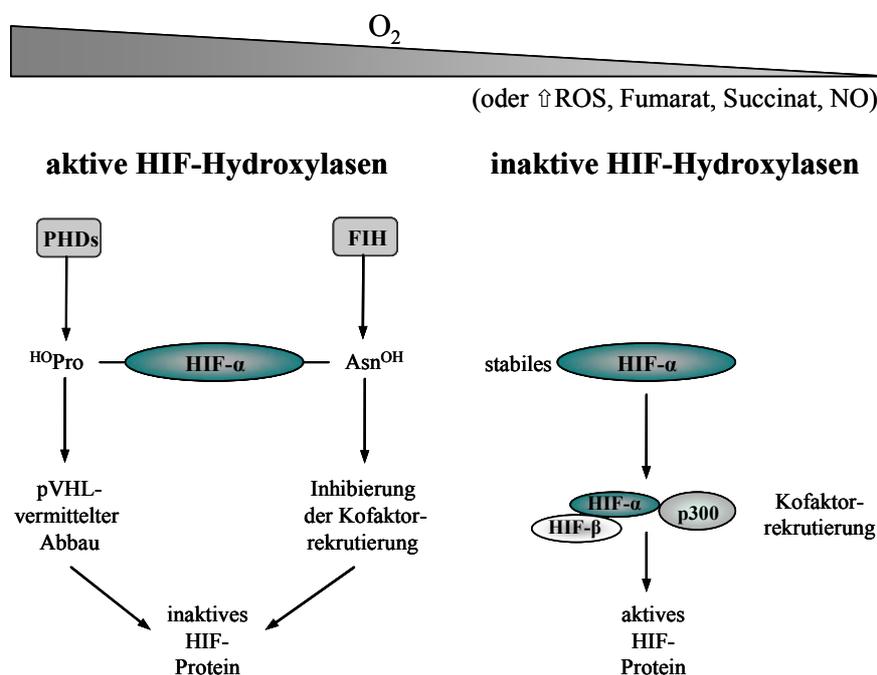


Abb. 1.2: Regulation der HIF- α -Aktivität.

Unter normoxischen Bedingungen werden die HIF- α -Untereinheiten unter Beteiligung von Prolylhydroxylasen (PHDs), von Hippel-Lindau-Protein (pVHL) und E3-Ligase für den Abbau innerhalb des Proteasoms markiert. Der HIF-inhibierende Faktor (FIH) hydroxyliert Asn 803 und verhindert damit die spätere Bindung des Coaktivators p300. Es resultiert eine geringere transkriptionelle Aktivität. Unter hypoxischen Bedingungen erfolgt eine Hemmung der PHDs sowie des FIH, woraus eine Stabilisierung des HIF- α resultiert. Dieses reichert sich an und transloziert in den Kern, wo es mit seinem Dimerisierungspartner HIF- β einen Komplex eingeht. Das Heterodimer ist transkriptionell aktiv.

1.1.3 Sauerstoffunabhängige Aktivierung von HIF-1/2 α

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass zahlreiche Substanzen in der Lage sind, HIF-1 sauerstoffunabhängig zu aktivieren. Eine bedeutende Rolle spielen hierbei neben reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die inflammatorischen Cytokine IL-1 β und TNF- α . Auch körperfremde Stoffe, wie zum Beispiel bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Membranbestandteile gram-negativer Bakterien, können eine Induktion der zellulären HIF-Antwort bewirken. Konträr zur sauerstoffabhängigen Aktivierung resultiert die Inkubation mit LPS in einer Expressionssteigerung der HIF-1 α mRNA-Menge. LPS aktiviert die Transkription von HIF-1 α hierbei über einen NF- κ B-abhängigen Signalweg, in den die p44/42 MAPK (mitogen activated protein kinase) eingebunden ist (Frede et al., 2006).

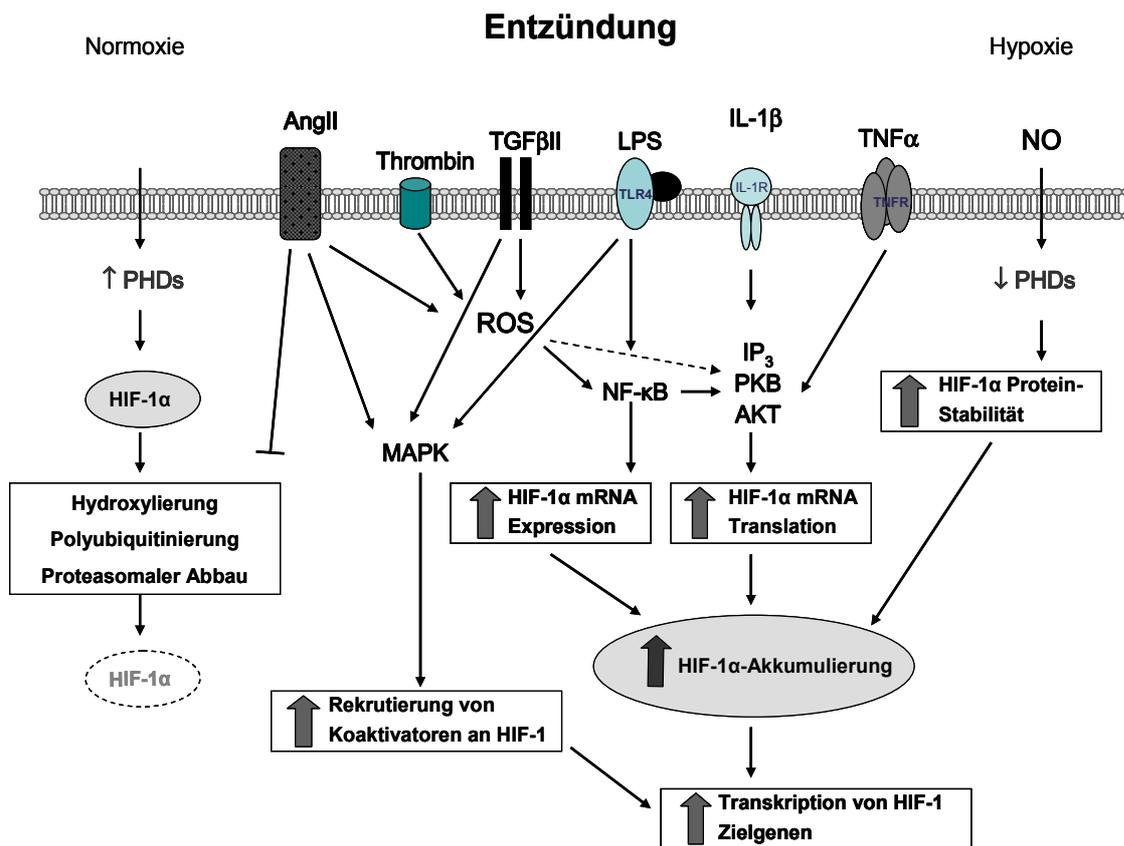


Abb. 1.3: Regulation von HIF-1 α bei Entzündung im Vergleich zu den intrazellulären Signaltransduktionen bei Normoxie und Hypoxie.

Unter Normoxie sind die PHDs aktiv; HIF-1 α wird hydroxyliert und abgebaut. Hypoxie und NO-Einwirkung hemmen die PHDs, die in HIF-1 α -Proteininstabilität ist erhöht. Die Einwirkung von inflammatorischen Zytokinen und LPS aktiviert NF- κ B und führt zu einer gesteigerten HIF-1 α -mRNA-Expression. Zusätzlich wird durch Aktivierung von IP $_3$, PKB und AKT eine vermehrte Translation der HIF-1 α -mRNA erreicht. Diese Faktoren sowie die zusätzliche Rekrutierung von HIF-1 α -Coaktivatoren durch MAP-Kinasen münden in einer gesteigerten Transkription von HIF-Zielgenen.

LPS sind ebenfalls in der Lage, HIF-2 α sauerstoffunabhängig über eine vermehrte HIF-2 α -mRNA-Expression zu aktivieren. Die Rolle von HIF-2 α in entzündlichen Prozessen ist jedoch bisher noch völlig unklar.

Darüber hinaus ist eine sauerstoffunabhängige HIF-1/2 α -Aktivierung über eine Hemmung der PHDs möglich; dabei sind neben NO (konkurriert mit O₂ um das aktive Zentrum) vor allem zweiwertige Kationen wie Kobalt(II) oder Mangan(II) von Bedeutung.

1.2 Effekte der HIF-Aktivierung

Die beiden wichtigsten HIF- α -Untereinheiten HIF-1/2 α sind sowohl an der Regulation orthologspezifischer als auch gemeinsamer Zielgene beteiligt.

Die Spezifität in der Induktion der jeweiligen Zielgene scheint hierbei durch die N-TAD gesteuert zu werden, wohingegen die C-TAD die Expression gemeinsamer Zielgene fördert (Bracken et al., 2006; Hu et al., 2007).

1.2.1 HIF-1 α

Bis heute sind mehr als 70 Zielgene des HIF-1 α bekannt, die von entscheidender Bedeutung für die Physiologie und Pathophysiologie der Ischämie und Tumorbologie sind. Damit wurde HIF-1 als Hauptregulator der Sauerstoffhomöostase identifiziert. Beispiele für solche Zielgene sind neben Erythropoietin auch der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) oder das Adrenomedullin (ADM).

Darüber hinaus induziert HIF-1 α beinahe alle Enzyme der Glykolyse und sichert somit die fortlaufende Produktion von ATP selbst unter hypoxischen Bedingungen. Die außerordentliche Bedeutung von HIF-1 α in der Regulation der Vaskularisierung führt dazu, dass ein genereller Knock-out des Proteins in Mäusen letal ist. Möglich war es jedoch, Tiere mit zell- bzw. gewebespezifischem HIF-1 α Knock-out zu generieren. Mit Hilfe eines myeloidzellspezifischen HIF-1 α Knock-outs konnte beispielsweise die

herausragende Rolle von HIF-1 α bei Entzündungsprozessen untersucht werden (Cramer et al., 2003).

1.2.2 HIF-2 α

HIF-2 α kommt in der Embryonalentwicklung eine große Rolle zu; es induziert hier Gene wie z. B. Oct-4 (Octamer binding transcription factor-4) und TGF (transforming growth factor)- α ; dieses Protein wird außer von embryonalen auch von vielen Tumorzellarten produziert und ist im Urin vieler Tumorpatienten nachweisbar. Ein weiteres bedeutendes HIF-2 α -Zielgen ist Cyclin D1, das in die Regulation des Zellzyklus eingebunden ist.

Darüber hinaus zählen VEGF, ADM und der Glukosetransporter (GLUT)-1 ebenfalls zu HIF-2 α -Zielgenen. Welches Ortholog diese Gene reguliert, ist in der Regel zellspezifisch. Dabei ist noch nicht eindeutig geklärt, ob HIF-1 α und HIF-2 α dieselben HBS (HIF-binding sites) innerhalb des jeweiligen Hypoxie-responsiblen Elements besetzen oder ob eine Bindung an unterschiedlichen HBS erfolgt.

1.3 Funktion von Monozyten/Makrophagen und Endothel unter Hypoxie und Entzündung

Makrophagen sind eine essenzielle Komponente des angeborenen Immunsystems und entstehen im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen. Diese Stammzellen entwickeln sich schließlich zu Promonozyten und werden in die Blutbahn entlassen, wo sie zu Monozyten differenzieren. Von dort aus migrieren sie in fast alle Gewebe, wo sie sich zu „sesshaften“ Gewebsmakrophagen entwickeln und ihre Umgebung vor Infektionen und anderen Schäden schützen.

1.3.1 Monozyten und Sauerstoffmangel

Monozyten sind in der Blutbahn sehr verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und müssen in der Lage sein, angemessen auf Änderungen der Sauerstoffspannung zu reagieren. Findet sich in den Arterien beispielsweise noch ein sehr hoher Sauerstoffdruck mit etwa 90 mmHg, so lassen sich in den Kapillaren oft nur noch sehr geringe Sauerstoffspannungen messen; Werte zwischen 20 und 30 mmHg sind hier durchaus üblich. Ein Sauerstoffdruck von 20 mmHg entspricht einem fraktionellen Sauerstoffanteil von etwa 3% O₂, was daher als Standardsauerstofffraktion für alle hypoxischen Versuche diene.

Ausgewanderte Monozyten, die zu sesshaften Gewebsmakrophagen differenziert sind, sind allerdings oft noch weit geringeren Sauerstoffspannungen ausgesetzt: Der partielle Sauerstoffdruck in gesundem Gewebe liegt bei 1-2 mmHg, in tumorösem sowie entzündetem Gewebe lassen sich auch anoxische Areale feststellen.

1.3.2 Extravasation: Zusammenspiel von Monozyten und Endothel

Die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen ist seit Mitte der 1990er Jahre sehr genau untersucht. Seitdem ist bekannt, dass Adhäsionsmoleküle auf den

Leukozyten wie auch auf den Endothelzellen am Prozess der Extravasation beteiligt sind. Hauptschauplatz dieses Phänomens ist die postkapilläre Venole. Hier werden die Leukozyten zunächst verlangsamt, bis niedrigaffine Wechselwirkungen zwischen Glykoproteinen auf Leukozyten und Endothelzellen zu einem „Rollen“ der Leukozyten auf dem Endothel führen. Vermittelt wird dieser Prozess von Selektinen, Lectin-ähnlichen Molekülen, die sich sowohl auf Leukozyten (L-Selektin) als auch auf dem Endothel befinden (E- und P-Selektin). Die zunehmenden Wechselwirkungen zwischen rollenden Leukozyten und Endothel führen zunächst zu einer Verlangsamung der Rollbewegung, später zu einem Arrest der rekrutierten Immunzellen. Die Haftung der Leukozyten ist Integrin-vermittelt. Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die aus α - und β -Untereinheiten bestehen. Sie werden auf der Zelloberfläche von Leukozyten exprimiert und können die Leukozyten-Endothel-Interaktion bereits wenige Minuten nach einem inflammatorischen Stimulus modulieren. Die Spezifität der verschiedenen Integrine richtet sich nach ihrer Struktur: mit der Adhäsion von Leukozyten ans Endothel werden β_1 -, β_2 - und β_7 -Integrine in Verbindung gebracht. Besonders betrachtet werden in der vorliegenden Arbeit die β_2 -Integrine, die über jeweils eine gemeinsame β -Kette (CD 18) verfügen, die an eine von vier verschiedenen α -Ketten gebunden ist (CD 11a, CD 11b, CD 11c, oder CD 11d) (Panés et al., 1999). Das Heterodimer CD 11a/CD 18 ist auf den meisten Leukozyten exprimiert und interagiert mit ICAM (intercellular adhesion molecule)-1 und -2 auf den Endothelzellen. Dieses Integrin wird nicht nennenswert in der Zelle bevorratet, eine gesteigerte Interaktion mit ICAM-1 wird auf eine Konformationsänderung nach Aktivierung der Leukozyten zurückgeführt (Panés et Granger, 1998). Monozyten verfügen über das Heterodimer CD 11b/ CD 18, das in Granula gespeichert und nach Aktivierung der Monozyten innerhalb kürzester Zeit an die Zelloberfläche transportiert werden kann. Eine Aktivierung mit TNF- α oder Zytokinen kann dabei eine Expressionssteigerung um das 10-30fache des

Ausgangswerts bewirken (Panés et Granger, 1998). Auch CD 11c/ CD 18 wird auf Monozyten exprimiert, der Interaktionspartner auf den Endothelzellen ist allerdings bisher unbekannt. Darüber hinaus sind Interaktionen des β_1 -Integrins VLA (very late antigen)-4 mit endotheliale VCAM (vascular cell adhesion molecule)-1 sowie des β_7 -Integrins $\alpha_4\beta_7$ mit MADCAM (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule)-1 bekannt (Ley et al., 2007).

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1/2, VCAM-1, PECAM-1 und MADCAM-1 auf den Endothelzellen gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. ICAM-1 ist auch unter Kontrollbedingungen auf Endothelzellen zu finden, kann jedoch nach Zytokin- oder Endotoxin-Stimulus in seiner Expression deutlich verstärkt werden. Im Plasma kann während einer Entzündung eine lösliche Form des Adhäsionsmoleküls (sICAM-1) nachgewiesen werden, die ein Fragment des endothelialen ICAM-1 darstellt (Komatsu et al., 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass dieses löslich Fragment an leukozytäre CD 11/ CD 18-Komplexe binden kann, die funktionalen Konsequenzen daraus sind jedoch noch unklar.

ICAM-2 wird konstitutiv exprimiert und bindet an CD 11a/ CD 18-Komplexe, jedoch mit niedrigerer Affinität als ICAM-1.

VCAM-1 bindet sowohl β_1 -als auch β_7 -Integrine und moduliert, weil es nach Zytokin-Stimulus deutlich stärker induziert wird als ICAM-1 (Grund ist eine deutlich niedrigere Expression unter Kontrollbedingungen), die Zellmigration.

MADCAM-1 interagiert mit L-Selektin und dem β_7 -Integrin $\alpha_4\beta_7$; es wird konstitutiv exprimiert. PECAM-1 wird konstitutiv auf Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen exprimiert. Es moduliert die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an das Endothel sowie die Migration der Leukozyten durch die Endothelzellen und die perivaskuläre Basalmembran (Muller et al., 1993; Wakelin et al., 1996).

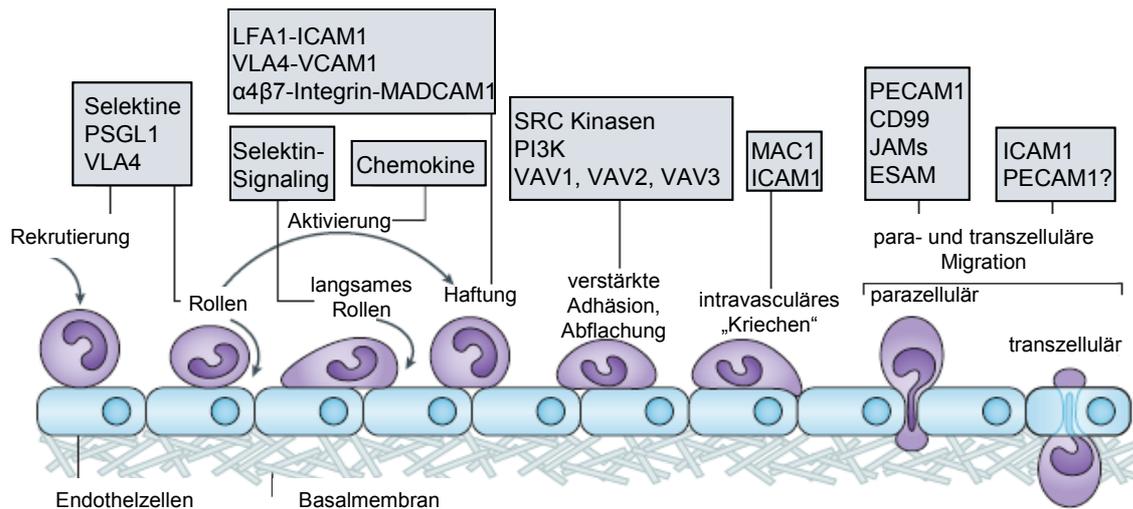


Abb. 1.5: Ablauf der Aktivierung von Leukozyten durch das Endothel mit anschließender Extravasation.

Nach ihrer Rekrutierung durch das aktivierte Endothel beginnen die Leukozyten zunächst Selektin-vermittelt auf den Endothelzellen zu Rollen. Dadurch werden sie selbst aktiviert, was zur Expression von Adhäsionsmolekülen (vor allem Integrine) führt. Deren Wechselwirkungen mit Dimerisierungspartnern auf den Endothelzellen (CAMs, cellular adhesion molecules) führen zu einer Verlangsamung und schließlich zur festen Adhäsion der Monozyten auf dem Endothel. Die Leukozyten bewegen sich so lange auf dem Endothel vorwärts, bis eine geeignete Stelle zur Extravasation erreicht ist und verlassen das Gefäß dann para- bzw. transzellulär (modifiziert nach Ley et al., 2007).

Zytokin-Stimuli führen im Fall des PECAM-1 nicht zu einer absoluten Expressionssteigerung auf der Oberfläche der Endothelzellen, sondern induzieren vielmehr eine Verschiebung an die Grenzflächen zwischen benachbarten Endothelzellen, wo es an endothelialen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt ist, die die leukozytäre Transmigration und die microvasculäre Permeabilität beeinflussen (Romer et al., 1995).

Die Transmigration selbst wird induziert durch die Bindung von leukozytärem MAC (macrophage antigen)-1 an ICAM-1. Als direkte Folge findet man in Endothelzellen erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel, eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase und der RHO (RAS homologue) GTPase, was zu einer Aktivierung der Myosinkontraktilität führt. Die Endothelzellen kontrahieren also, die Zellzwischenräume werden vergrößert und die Extravasation begünstigt.

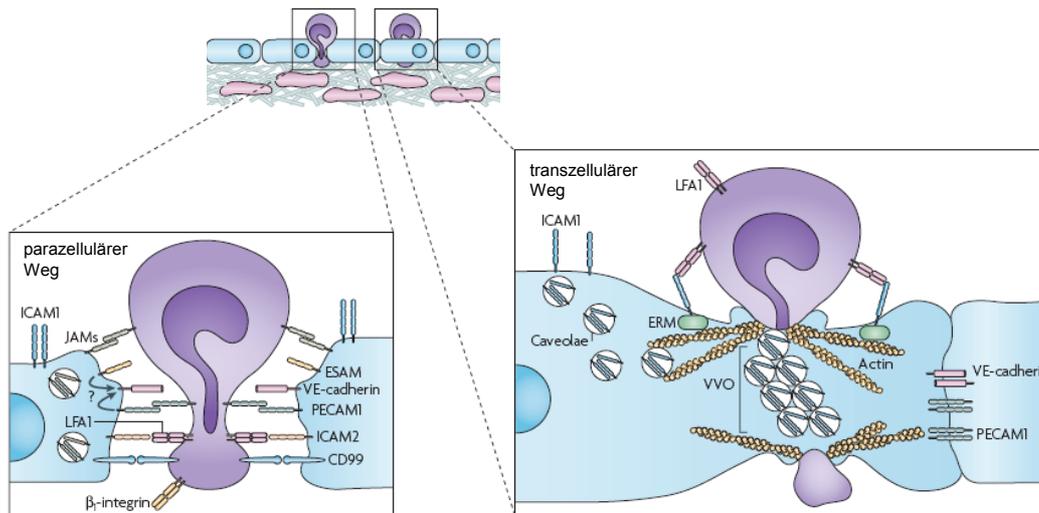


Abb. 1.6: Extravasation von Leukozyten.

Leukozyten verlassen Blutgefäße in der Regel durch Zwischenräume zwischen zwei Endothelzellen (parazellulär), die Extravasation kann aber auch durch eine Endothelzelle hindurch (transzellulär) erfolgen. Die Abbildung zeigt die am jeweiligen Prozess beteiligten Proteine, von denen beim parazellulären Weg PECAM-1 eine herausragende Rolle spielt (modifiziert nach Ley et al., 2007).

1.3.3 Makrophagenfunktion in inflammatorischen Geweben

An Orten bakterieller Infektion sind die rekrutierten Makrophagen oft hypoxischen Arealen ausgesetzt. Ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch durch die Proliferation von Bakterien sowie eine Akkumulation von Phagozyten führen zusammen mit eventuell auftretender Ödembildung und Kompression von Kapillaren im betroffenen Gebiet zu einer Mangelversorgung mit Sauerstoff. Zur Aufrechterhaltung der Makrophagenfunktion ist eine Expressionssteigerung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α ist unter diesen Bedingungen unumgänglich: Immunzellen aus Mäusen mit konditionellem HIF-1 α Knock-down in Zellen der myeloiden Reihe weisen unter hypoxischen Bedingungen drastisch reduzierte intrazelluläre ATP-Spiegel auf. Als Konsequenz daraus weisen die myeloiden Zellen eine erheblich verminderte Zellaggregation, Motilität und Invasion auf. Darüber hinaus sind diese Zellen in ihrer Fähigkeit Bakterien intrazellulär abzutöten signifikant eingeschränkt (Cramer et al., 2003; Peyssonnaud et al., 2005).

1.3.4 Inflammatorisches Preconditioning/ Etablierung von Endotoxintoleranz

Unter inflammatorischem Preconditioning oder auch Etablierung von Endotoxintoleranz versteht man eine verminderte Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen auf einen zweiten inflammatorischen Stimulus, nachdem die Zellen bereits für längere Zeit einem niedrig dosierten inflammatorischen Stimulus ausgesetzt waren. Beispielsweise führt eine längere Inkubation von Monozyten/Makrophagen mit sehr geringen LPS-Dosen zu einer verminderten Freisetzung von TNF- α und IL-1 β als Antwort auf einen zweiten, deutlich stärkeren LPS-Stimulus. LPS vermitteln hierbei ihre Signalwirkung in der Zelle über den nukleären Faktor (NF)- κ B, der seinerseits die Transkription von HIF-1 α induzieren kann (Frede et al., 2006). In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass Endotoxintoleranz in Monozyten/Makrophagen auch das HIF-System betrifft: endotoxintolerante Zellen weisen deutlich verminderte HIF-1 α -Protein- und -mRNA-Mengen auf. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Induktion des NF- κ B-Familienmitglieds p52 unter Präkonditionierungsbedingungen, das Bestandteil des alternativen NF- κ B-Signalwegs ist (Yoza et al., 2004; Frede et al., 2009).

2. Ziel der Arbeit

Die zellulären Funktionen von Monozyten und Makrophagen sowie Endothelzellen werden durch Hypoxie und Inflammation verglichen mit physiologischen Bedingungen in hohem Maße verändert. Dies betrifft auf Ebene der leukozytären Zellen sowohl die veränderte Chemokin- und Cytokinsekretion in Tumor-assoziierten Makrophagen als auch die dauerhaft erniedrigte Abwehrfunktion der Monozyten und Makrophagen bei Patienten mit SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome). Diese Patienten weisen nach Trauma, Verbrennungen oder Sepsis eine deutlich veränderte Immunantwort auf, zu der beispielsweise gehört, dass ihre Monozyten eine verminderte Kapazität zur Sekretion von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-10 und IL-12 besitzen (Cavaillon J.-M. et al., 2004). Die Hyporeaktivität der hämatopoietischen Zellen ist eine der möglichen Ursachen dafür, dass SIRS-Patienten einer höheren Wahrscheinlichkeit ausgesetzt sind, an nosokomialen Infektionen zu erkranken als Patienten, deren Blutzellen eine normale Reaktivität aufweisen.

Deshalb sollen in dieser Arbeit die Auswirkungen, die sowohl eine hypoxische als auch eine inflammatorische Umgebung auf die Funktion von Monozyten haben können, untersucht werden. Zentraler Bestandteil des ersten Teils der vorgelegten Arbeit ist hierbei die Charakterisierung Endotoxin-toleranter Monozyten und Makrophagen bezüglich ihrer Zellantwort auf hypoxische wie inflammatorische Bedingungen. Darüber hinaus werden die Auswirkungen von Hypoxie sowie Endotoxintoleranz auf die Interaktion zwischen Monozyten und Endothel untersucht werden. Hierbei liegt der Schwerpunkt der Untersuchungen auf Veränderungen der Gen- bzw. Proteinexpression von Adhäsionsmolekülen auf beiden Zellarten.

Zur Untersuchung der angegebenen Fragestellungen auf Seiten der Monozyten bzw. Makrophagen sind THP-1-Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien als stabile Zelllinie und murine Peritonealmakrophagen als Primärkultur

herangezogen worden. Um das Verhalten der Endothelzellen zu dokumentieren, wurde die Rattenendothelzelllinie EC52 als stabiles Modell gewählt. Des Weiteren fanden Untersuchungen an primären humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) statt.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte und Substanzen

3.1.1 Geräte

- Sterile Werkbank:

Hera safe, Heraeus Instruments

- Brutschrank:

Hera cell, Heraeus Instruments

- Hypoxie-Brutschrank:

BB 6220 CUO₂, Heraeus Instruments

Invivo₂ 400, Hypoxia Workstation

- Erhitzen:

60°C: HLC TM 130-6, Oehmen

95°C: HLC HTM 130, Oehmen

- Tischzentrifugen:

Centrifuge 5415 D, Eppendorf

Biofuge pico, Heraeus Instruments

- Kühlzentrifugen:

Centrifuge 5415 R, Eppendorf

Biofuge fresco, Heraeus Instruments

Labofuge 400 R function line, Heraeus Instruments

- ELISA-Reader:

Spectra Count, Packard

· Photometer:

SmartSpec 3000, Bio-Rad

Küvette: Quarz Spectrophotometer Cell Micro,

16.50-Q-10/8,5mm, Bio-Rad

· Netzgeräte:

Power Pac 200, Bio-Rad

Power Pac 300, Bio-Rad

Power Pac 3000, Bio-Rad

· Western-Blot:

Mini Protean 3, Bio-Rad

Nitrocellulose-transfer-membrane, 0.2 µm Porengröße,

Schleicher & Schuell

Gel-blotting-Papiere, GB003, Schleicher & Schuell

· RT-PCR:

Tpersonal, Biometra

Tprofessional, Biometra

· PCR:

Mastercycler personal, Eppendorf

Tpersonal, Biometra

Tprofessional, Biometra

DNA Thermal cycler, Perkin Elmer

Geneamp PCR system 9600, Perkin Elmer

· Real-time-quantitative-PCR:

iCycler iQ 5, Multicolor Real-Time PCR Detection System,
Bio-Rad

· Geldokumentation:

Photo-Print IP-115.SD, LTF Labortechnik

· Mikroskop:

Zeiss

· Fluoreszenzmikroskop:

Zeiss Axiovert 100

· Laser Scanning Mikroskop:

LSM 510

Zeiss Axiovert 100

· Elektroporation:

Gene Pulser I System, Bio-Rad

3.1.2 Substanzen

3.1.2.1 Chemikalien

- Acrylamid 30% (Bio-Rad)
- APS (Bio-Rad)
- Bortezomib (Velcade®, Millenium Pharmaceuticals, Inc.)
- Bromphenolblau (Sigma)
- BSA (SERVA)
- Collagenase A (Roche)
- p-Cumarinsäure (Sigma)
- DEPC (Sigma)
- Dexamethason (Roche)
- DMF (Sigma)
- DMOG (Sigma)
- DMSO (Merck)
- Echinomycin (Alexis)
- ECL Advance Western Blotting Detection System (GE Amersham)
- Essigsäure, 100% (Fluka)
- Ethanol (Sigma)
- Ethidiumbromid (Sigma)
- GTC (Roth)
- Glycerin (Merck)
- Glycin (Fluka)
- Isopropanol (Sigma)
- LPS (Sigma)
- Liquemin (Sigma)
- β -Mercaptoethanol (Merck)
- Methanol (Sigma)
- MG 132 (Sigma)
- MTT (Sigma)

- NaCl (Fluka)
- NP 40 (AppliChem)
- Paraformaldehyd (Fluka)
- Phenol (AppliChem)
- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (AppliChem)
- Ponceau S (Sigma)
- PMA (Sigma)
- Salzsäure, 32% (Fluka)
- SDS (Roth)
- SYBRGreen (Eurogentec)
- TEMED (Sigma)
- TRIS (Fluka)
- TRIS-EDTA Buffer Solution pH 8.0 (Fluka)
- Tween 20 (Roth)
- Wasserstoffperoxid (Merck)

3.1.2.2 Antikörper

a) Western Blot

Erstantikörper

Humane Proben:

- HIF-1 α BD Transduction (Novus Biologicals)
- HIF-2 α (Novus Biologicals)
- p65 (Santa Cruz)
- ICAM-1 (CD54; Novus Biologicals)
- α -Tubulin (Santa Cruz)

Murine Proben:

- HIF-1 α (Novus Biologicals)
- α -Tubulin (Santa Cruz)

Zweitantikörper:

- anti-mouse (Sigma)
- anti-rabbit (Sigma)

b) Immunfluoreszenz

Erstantikörper

- human anti-ICAM-1 (R&D systems)
- human anti-Endothelin-1 (R&D systems)
- rat anti-Endothelin-1 (dianova)

Zweitantikörper

- AlexaFluor 568 goat anti-mouse (invitrogen)
- AlexaFluor 568 goat anti-rat (invitrogen)
- AlexaFluor 546 goat anti-mouse (invitrogen)

Farbstoffe

- Calcein AM (invitrogen)
- Hoechst 33342 (invitrogen)

3.1.2.3 RT-Reagenzien, PCR-Primer und –Zusätze

- Reverse Transkriptase (Promega)
- RT-5×Puffer (Promega)
- Oligo dT (Invitrogen)
- alle Primer (Invitrogen)
- NTPs (Qiagen)
- Taq Polymerase (Invitrogen; Promega)
- 10×PCR-Puffer (Invitrogen)
- 5×PCR-Puffer (Promega)

- MgCl_2 (Invitrogen)
- 100 kb DNA Ladder (Invitrogen)
- qPCR MasterMix Plus for SYBRGreen I (Eurogentec)

3.1.2.4 siRNA

- ON-TARGETplus siRNA (Dharmacon)
 - human NF- κ B2 (p100)
 - human non-target
- Accell siRNA (Dharmacon)
 - human non-target-GFP
 - human ICAM-1
 - human HIF-1 α
 - rat ICAM-1

3.1.2.5 Zellkulturmedien

- RPMI 1640 (Invitrogen)
- DMEM (Invitrogen)
- ECGM (Promocell)
- M199 (PAN Biotech)

3.1.2.6 Puffer

- 10x PBS (phosphate buffered saline)
 - 2.1g KH_2PO_4
 - 9g NaCl
 - 7.26g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ } ad 1L mit aqua dest.

- PBS-BSA (Immunfluoreszenz)
 - 1.5g BSA in 50 mL 1x PBS

- 1 M TRIS-HCl-Puffer, pH 8.0

- Lysepuffer (Gesamtlysat; Western Blot)
 - 0.5% NP40
 - 150mM NaCl
 - 10mM TRIS pH 7.9
 - Protease-Inhibitor (1:100)

- Lysepuffer A (Kernextrakte; Western Blot)
 - 10mM Hepes pH 7.9
 - 1.5mM MgCl₂
 - 10mM KCl
 - 0.5mM PMSF
 - 0.5mM DTT
 - 0.4 % NP-40
 - Protease-Inhibitor (1:10)

- Lysepuffer B (Kernextrakte; Western Blot)
 - 20mM Hepes pH 7.9
 - 420mM NaCl
 - 1.5mM MgCl₂
 - 0.2mM EDTA
 - 0.5mM PMSF
 - 0.5mM DTT
 - Protease-Inhibitor (1:10)

· 4x SDS (Western Blot)

400 μ L aqua dest.
1.6mL 0.5 M TRIS pH 6.8
3.2mL 10% SDS
0.8mL β -Mercaptoethanol
0.4mL 0.05% Bromphenolblau
1.6mL 10% Glycerin

· 1.5M TRIS-Puffer, pH 8.8 (Western Blot)

91g TRIS, pH mit 32% HCl; ad 500mL mit aqua dest.

· 0.5M TRIS-Puffer, pH 6.8 (Western Blot)

30.3g TRIS, pH mit 32% HCl; ad 500mL mit aqua dest.

· Laufpuffer (Western Blot)

30g TRIS
144g Glycin
10g SDS

} ad 1L mit aqua dest.

· Blotpuffer (Western Blot)

15g TRIS
72g Glycin
1L Methanol

} ad 5L mit aqua dest.

· 10 x TBS (TRIS-buffered saline; Western Blot)

121g TRIS
400g NaCl, pH 7.6 mit 32% HCl

} ad 5L mit aqua dest.

· TBS-T (TRIS-buffered saline with Tween; Western Blot)

500mL 1x TBS
250 μ L Tween

· Lysepuffer (MTT-Test)

100mL DMF

100mL Aqua dest.

40g SDS

2.5mL Essigsäure (80%)

2.5mL 1M HCl

· Pb-Sucrose

7mM Natriumpyruvat

272mM Sucrose

1mM MgCl₂

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Tierhaltung und –zucht

Alle Mäuse wurden im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen gehalten. Sie fanden dort kontrollierte Umweltbedingungen vor:

Bis zu fünf Tiere lebten zusammen in Makrolon[®]-Filterkäfigen Typ III bei einer Umgebungstemperatur von 20°C und einem konstanten 12h-Tag-Nacht-Rhythmus. Sie erhielten pelletiertes Alleinfuttermittel und Trinkwasser *ad libitum*.

Um die Reproduktivität innerhalb jedes Stammes aufrecht zu erhalten wurden gezielt möglichst weit entfernte Tiere verpaart.

Die Anzeige zur Organentnahme bei den betroffenen Versuchstieren wurde unter der folgenden Ordnungsnummer G-794/04 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen bewilligt.

3.2.2 Transgene Mäusestämme

Der verwendete Knock-out-Stamm mit der dazugehörigen Kontrolle wurde unserem Institut bereits für ein anderes Projekt freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Randall Johnson (University of California, San Diego) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei den Knock-out-Mäusen um Tiere vom Stamm C57Bl/6, die in den Zellen der myeloischen Reihe einen konditionellen Cre/*lox*-Knock-out aufweisen. Das Exon 2 des *hif-1α*-Gens ist hierbei auf beiden Allelen von *loxP*-sites flankiert (*HIF-1α^{flox/flox}*). Exprimieren die Zellen Cre, führt das über den Verlust des Exons hinaus zur Leserasterverschiebung. Dies hat zur Folge, dass aus der resultierenden mRNA kein funktionelles HIF-1α-Protein mehr gebildet werden kann. Zur Generierung dieses myeloidzell-spezifischen Knock-outs wurden Tiere mit dem *cre*-Knock-in unter der Kontrolle des

Lysozyms M (LysM) in die Kontrolllinie eingekreuzt. Die resultierenden LysM cre HIF-1 $\alpha^{lox/lox}$ -Mäuse (nachfolgend LysM-Tiere genannt) exprimieren Cre daher in Granulozyten und Makrophagen.

Als Kontrollen dienten HIF-1 $\alpha^{lox/lox}$ -Mäuse (nachfolgend DF (double-floxed)-Tiere genannt), die nicht transgen für *cre* sind.

3.2.3 Genotypisierung

Im Alter von etwa einem Monat wurden die Mäuse abgesetzt und erhielten wenig später ihre Ohrmarkierung mit Hilfe eines Ohrstanzers. Das hierbei gewonnene Gewebematerial wurde in 300 μ L NaOH (50 mM) aufgenommen und für mindestens eine Stunde auf 100°C erhitzt. Im Anschluss daran wurden 30 μ L eines einmolaren Tris-HCl-Puffers (pH 8.0) zugegeben und die Proben für fünf Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Die nun frei vorliegende genomische DNA (gDNA) konnte mittels PCR amplifiziert werden: Für die Durchführung der PCR wurden 5 μ L gDNA pro Reaktion eingesetzt. Hinzugefügt wurden 4 μ L NTPs, 5 μ L 10xPCR-Puffer, 1.5 μ L MgCl₂ (50 mM) sowie 0.15 μ L Taq-Polymerase pro Ansatz. Die Menge der benötigten Primer variierte und ist deshalb unten angegeben. Jeder Ansatz wurde mit VE-Wasser auf 50 μ L Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden dann für 3 Minuten bei 96°C denaturiert und schließlich in der gewünschten Zyklusanzahl für 1 Minute auf 96°C, für 1 ½ Minuten auf die entsprechende Annealing-Temperatur der Primer und für eine Minute auf 72°C erhitzt. Die amplifizierte DNA konnte nun mittels Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel mit 0.2% Ethidiumbromid dargestellt werden.

Tabelle 3.1.: Primer und PCR-Bedingungen für die Genotypisierung

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Primer- menge	PCR	Produktgröße
<i>hif-1α</i>	5' HIF-DF	<i>gga gct atc tet cta gac c</i>	1 μL	57°C, 34 cycl.	WT: ~200 bp DF: ~250 bp
	3' HIF-DF	<i>gca gtt aag agc act agt tg</i>	1 μL		
<i>lysm</i>	5' Mlys1	<i>ctt ggg ctg cca gaa ttt ctc</i>	1.5 μL	58 °C, 35 cycl.	WT: ~350 bp LysMCre: ~520bp
	3' Mlys2	<i>tta cag tcg gcc agg ctg ac</i>	0.75 μL		
	3' MlysCre	<i>ttc gct ggc cca aat gtt gct g</i>	1.5 μL		

Zur Genotypisierung der LysM-Tiere wurden drei Primer gewählt. Hierbei handelte es sich um einen 5'- sowie zwei verschiedene 3'-Primer. Der 3' Mlys2-Primer kann nur an WT-gDNA binden, der 3' MlysCre nur an der gDNA jener Mäuse, die positiv für Cre sind. Auf diese Weise war eine Unterscheidung zwischen Homo- und Heterozygoten möglich.

3.3 Zelllinien und Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in Luft gezüchtet.

Die THP-1-Zellen mussten für einige Versuche ausdifferenziert werden:

Dazu wurden sie in 6-Lochkulturplatten ausgesät (je 2mL pro Vertiefung, Zelldichte 1·10⁶/mL) und für vier Tage mit 10 nM PMA inkubiert. Nach zwei Tagen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, das neue Medium war ebenfalls mit 10 nM PMA versetzt.

Die murinen Peritonealmakrophagen wurden aus circa drei Monate alten Mäusen wie folgt isoliert:

Die Mäuse wurden mittels CO₂-Begasung getötet und das Abdomen mit Ethanol desinfiziert. Das Fell wurde mit einem kurzen Schnitt geöffnet und anschließend so weit aufgerissen, dass der Bauchraum der Maus komplett frei lag. Das Peritoneum ließ sich dann etwa auf Höhe des Brustbeins mit einer Pinzette anheben und mit einer Spritze konnten 5 mL Zellkulturmedium (s.u.) mit Liquemin 5U/mL injiziert werden. Nach kurzer Einwirkzeit wurde das Einstichloch vorsichtig vergrößert und das Medium mittels einer Multipette wieder entnommen. Die so gewonnenen Peritonealmakrophagen wurden auf die benötigte Zellkonzentration eingestellt:

Tabelle 3.2.: Zellkonzentrationen verschiedener Versuche

Versuch	Zellkonzentration [in x·10 ⁶]
<i>Proteine</i>	2
<i>RNA</i>	3
<i>Invasionsassay</i>	1

Mit diesem Schritt war auch ein Mediumwechsel verbunden, um das Liquemin aus dem Medium zu entfernen.

Bei HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cord cells) handelt es sich um primäre humane Nabelschnurendothelzellen. Zu ihrer Isolation wurden in Kooperation mit der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Universitätsklinikum Essen Nabelschnüre verwendet, die maximal vier Tage bei 4°C in sterilem PBS gelagert wurden.

Die Verwendung der Nabelschnüre wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Essen unter der Voraussetzung genehmigt, dass die Patientinnen über den Verbleib des Materials aufgeklärt wurden und ihr Einverständnis dazu gegeben hatten (Einverständniserklärung siehe Anhang). Die Vorgangsnummer hierzu lautet 07-3445.

Die Nabelschnüre mussten zunächst mit sterilem PBS (37°C) gespült werden. Dazu wurde an einer Seite mittels eines Kabelbinders eine Knopfkanüle in der Nabelschnurvene fixiert, durch die das PBS gespritzt werden konnte, bis die austretende Flüssigkeit klar war. Im Anschluss daran wurde am anderen Ende der Nabelschnur ebenfalls eine Knopfkanüle mit Hilfe eines Kabelbinders angebracht. An beiden Knopfkanülen konnten nun Dreiwegehähne montiert werden. Die Nabelschnur wurde dann mit Collagenase A (0.1 mg/L) durchgespült (ca. 20 mL), ein Dreiwegehahn wurde geschlossen und die Nabelschnur prall mit Collagenase-Lösung gefüllt. Nachdem auch der andere Hahn abgeschlossen worden war, konnte die Nabelschnur für dreißig Minuten bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert werden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Zellsuspension in einem 50 mL Falcon-Gefäß aufgefangen und zum Abstoppen der Reaktion mit mindestens 40 mL Medium M199 (mit 10% FBS, Pen/Strep, s.u.) nachgespült. Das Medium wurde ebenfalls aufgefangen und die Suspension bei 1200 U/min für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, die Zellen in 5 mL ECGM-Medium resuspendiert

und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Zellen aus mehreren Nabelschnüren wurden möglichst gepoolt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und danach in M199-Medium kultiviert. Die Versuche wurden mit möglichst niedrigen Passagen durchgeführt.

Die Vorversuche zu den Cokultorexperimenten sowie die mRNA-Analysen erfolgten mit einer stabilen Rattenendothelzelllinie, den EC52-Zellen, die unserem Institut freundlicherweise von Frau Prof. Dr. U. Rauen (Institut für Physiologische Chemie, Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt wurden. Diese wurden unter Dexamethason kultiviert um das gleichzeitige Wachstum eventuell als Verunreinigung enthaltener Leukozyten zu unterdrücken. Für die Cokultorexperimente musste dieses Medium durch dexamethasonfreies Medium ersetzt werden.

Nachfolgend wird die Zusammensetzung der Zellkulturmedien aufgelistet:

1. THP-1-Zellen:

RPMI 1640

10% fetal bovine serum (575H)

2mM L-Glutamin

1mM Natriumpyruvat

100U/mL Penicillin

100µg/mL Streptomycin

2. murine Peritonealmakrophagen:

RPMI 1640

2% fetal bovine serum (Gold)

2mM L-Glutamin

100U/mL Penicillin

100µg/mL Streptomycin

3. Isolationsmedium HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cord cells):

ECGM

4. Kulturmedium HUVEC-Zellen:

M199

10% fetal bovine serum (FBS)

2mM L-Glutamin

100U/mL Penicillin

100µg/mL Streptomycin

5. EC52-Zellen:

RPMI 1640

20% fetal bovine serum (FBS)

4mM L-Glutamin

100U/mL Penicillin

100µg/mL Streptomycin

7,2µg/mL Dexamethason

6. U2OS-Zellen:

DMEM

10% fetal bovine serum (FBS)

100U/mL Penicillin

100µg/mL Streptomycin

3.4 Versuchsbedingungen und Aufarbeitung der Zellysate

3.4.1 Allgemeine Versuchsbedingungen

Die hypoxische Inkubation erfolgte, wenn nicht anders gekennzeichnet, konstant in einem 37°C warmen, wasserdampfgesättigten Gasgemisch aus 5% CO₂, 3% O₂ und 92% N₂. Einige spezielle Versuche erforderten jedoch auch einen 5 bzw. 1%igen O₂-Anteil. Sämtliche Cokulturversuche fanden in der Hypoxic Workstation statt, der fraktionelle Sauerstoffanteil betrug hier nur 0.1%. Die Differenzen der unterschiedlichen Sauerstoffanteile wurden stets mit einer entsprechenden Anpassung der jeweiligen N₂-Fraktion ausgeglichen. Die normoxische Inkubation erfolgte in einem wasserdampfgesättigten Gasgemisch aus Luft und 5% CO₂, ebenfalls bei 37 °C.

3.4.2 Etablierung der Endotoxintoleranz

Die Versuche zur Endotoxintoleranz wurden an differenzierten THP-1-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Monozyten in 6-Lochkulturplatten ausgesät und für vier Tage mit 10 nM PMA inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel; neues Medium mit 10 nM PMA wurde zugesetzt. Durch diesen Vorgang erhält man einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp; die Zellen adhären am Boden der Kulturplatten und entwickeln Pseudopodien. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 48 Stunden mit einer sehr geringen LPS-Dosis (0.05 ng/mL) inkubiert. Die Versuchsdauer im Anschluss betrug sechs Stunden; hierbei erfolgte eine Inkubation mit und ohne hochkonzentriertes LPS (1 µg/mL) unter normoxischen wie hypoxischen Bedingungen.

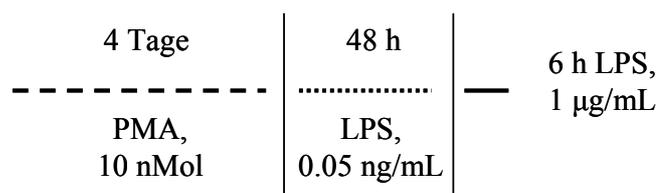


Abb. 3.1.: Schema des Endotoxintoleranzprotokolls.

Nach viertägiger Differenzierung mit PMA erfolgte die zweitägige Inkubation mit sehr niedriger LPS-Dosis. Anschließend fand der Akutversuch ohne bzw. mit einem hohen LPS-Stimulus statt.

3.4.3 Cokulturversuche

Für die Untersuchung der monozytären Adhäsion ans Endothel wurden THP-1-Zellen zusammen mit HUVEC- bzw. EC52-Zellen inkubiert. Dazu wurden einen Tag vor dem Versuch die Endothelzellen so ausplattiert, dass sie am folgenden Tag einen konfluenten Zellrasen bildeten. Dies erfolgte für Untersuchungen auf Protein- bzw. mRNA-Ebene in 10 cm-Kulturschalen, für Immunfluoreszenz-versuche auf 24-Lochkulturplatten. Auf die großen Schalen wurden am Versuchstag je 10 mL THP-1-Zellen (Dichte: $5 \cdot 10^5$ /mL) gegeben, die Inkubation auf den 24-Lochkulturplatten erfolgte mit 500 μ L Zellsuspension derselben Zelldichte.

Für manche Cokulturversuche wurden die THP-1-Zellen mit spezifischen Hemmstoffen vorinkubiert. Um p65, ein Mitglied der NF- κ B-Familie zu hemmen, wurde Bortezomib verwendet.

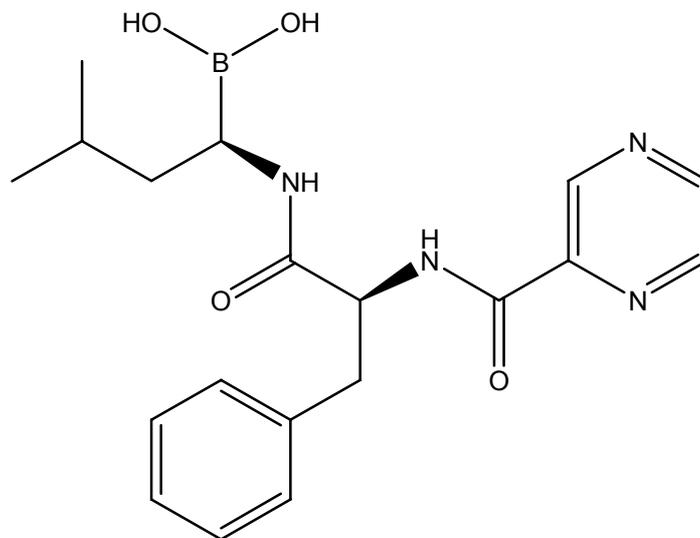


Abb. 3.2.: Bortezomib (C₁₉H₂₅BN₄O₄)

(1R)-3-Methyl-1-[(2R)-3-phenyl-2-[(2-pyrazinyl-carbonyl)-amino]propanoyl]amino]butylborsäure

Die Inkubation erfolgte zeitgleich zur Färbung der Zellen mittels Calcein AM direkt vor Versuchsbeginn. Dazu wurden die Zellen für fünfzehn Minuten mit 100 ng/mL Bortezomib versetzt und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Eine Hemmung der DNA-Bindungsaktivität des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 konnte mittels Echinomycin erreicht werden. Hierzu wurden die Monozyten vor

dem Versuch für sechzehn Stunden mit einer Konzentration von 10 nM Echinomycin inkubiert.

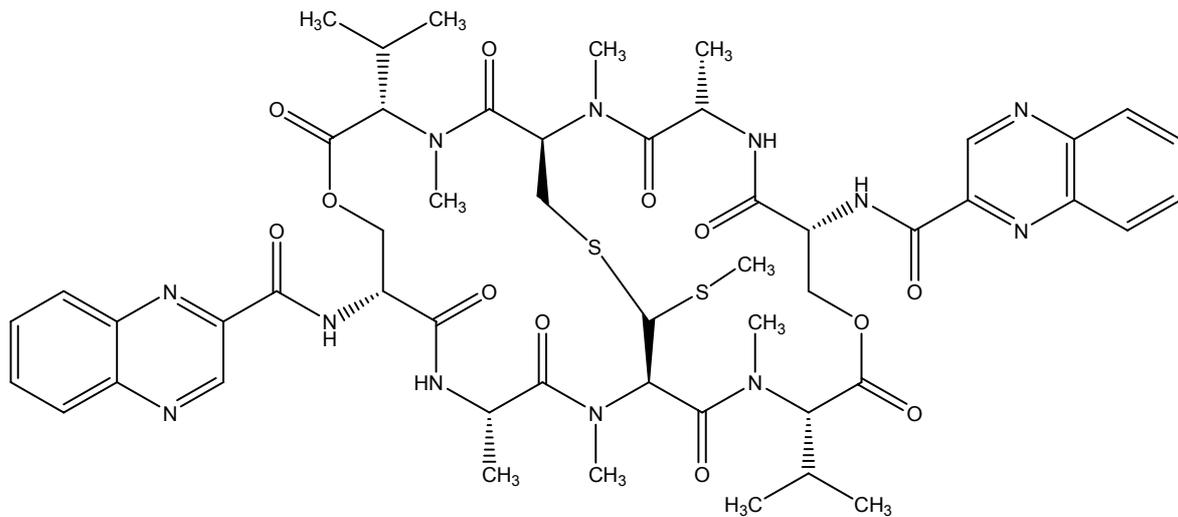


Abb. 3.3.: Echinomycin (C₅₁H₆₄N₁₂O₁₂S₂)

N-[3,11,13,16,24,26-hexamethyl-27-methylsulfanyl-2,5,9,12,15,18,22,25-octaoxo-4,17-di(propan-2-yl)-8-(chinoxalin-2-carboxylamino)-6,19-dioxa-28-thia-3,10,13,16,23,26-hexazabicyclo[12.12.3]nonacosan-21-yl]chinoxalin-2-carboxamid

Cokulturversuche mit EC52- und THP-1-Zellen wurden anschließend mittels Western Blot, PCR und Immunfluoreszenz charakterisiert, die Cokultur aus HUVEC- und THP-1-Zellen wurde ausschließlich mittels Immunfluoreszenz untersucht.

3.4.4 Proteinisolierung und -analyse

3.4.4.1 Gesamtzelllysat

Bei Versuchen mit adhärenen Zellen wurden die 6-Lochkulturplatten nach erfolgter Inkubation auf Eis gestellt, das Medium abgenommen und die Zellen mit eisgekühltem PBS gewaschen. Mit Hilfe von 65 μ L Lysepuffer und Schabern wurden die Zellen vom Plattenboden gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Bei nicht adhärenen Zellen wurde die Zellsuspension nach der Inkubation komplett in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und eine Minute bei 13200 U/min zentrifugiert. Nachdem das Medium verworfen worden war, wurde das Zellpellet mit 65 μ L Lysepuffer überschichtet.

Die Peritonealmakrophagen stellen eine Mischkultur aus differenzierten und undifferenzierten Zellen dar. Sie wurden nach dem Versuch mit Hilfe von Schabern komplett in Suspension gebracht und als Suspensionskultur weiterbehandelt. Nach jeweils 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate fünf Minuten bei 3.600 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren.

3.4.4.2 Kernextrakte

Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium auf Eis abgesaugt und die Zellen mit gekühltem PBS gewaschen. Mit Hilfe von 150 μ L Lysepuffer A und Schabern wurden die Zellen vom Plattenboden gelöst und die Lysate in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 3600 rpm und 4°C, der Überstand wurde verworfen und die Präzipitate in je 65 μ L Lysepuffer B resuspendiert. Im Anschluss daran wurden die Proben eine halbe Stunde mittels Rührer homogenisiert. Nach abschließender 15 minütiger Zentrifugation bei 3600 rpm

und 4°C wurde der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren.

3.4.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Bei dieser Methode bilden Cu^{2+} -Ionen, die im Folin-Ciocalteau-Reagenz enthalten sind, einen Farbkomplex mit Stickstoffatomen der Amidbindungen von Proteinen. Dabei kann eine Reduktion des zweiwertigen Kupfers zu Cu(I) erfolgen. Dieses einwertige Kupfer reduziert zusammen mit einigen aromatischen Aminosäure-Resten wie Tyrosin und Tryptophan, die dafür keine vorherige Komplexbildung eingehen müssen, ebenfalls enthaltene Heteropolyphosphomolybdate und -wolframate. Hierbei tritt ein Farbumschlag des Folin-Reagenzes nach tiefblau auf. Dieser kann zur quantitativen Proteinbestimmung genutzt werden.

Die hergestellten Standards (25; 10; 5; 2.5; 1; 0.5; 0.25 und 0,1 mg/mL BSA) sowie die Proben wurden 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und je 20 µL in Doppelbestimmung auf eine Platte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Pro Ansatz wurden 10 µL Reagenz A und 80 µL Reagenz B (von Biorad Laboratories) hinzugefügt, 10 Minuten inkubiert und schließlich die Extinktion bei 700 nm mit Hilfe des ELISA-Readers gemessen.

3.4.4.4 Antikörper und Western Blot Analysen

Für alle Western Blot Analysen wurden 10%ige Trenngele verwendet. Die Proben wurden stets auf 5%ige Sammelgele aufgetragen. Dazu wurden für die Gesamtzelllysate zwischen 40-75 µg Probe in Probenpuffer aufgenommen und nach fünfminütiger Denaturierung bei 95 °C auf das Gel gebracht. Bei den Kernextrakten wurden 30 µg Probe aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V und der Transfer auf die Membranen (Blotten) bei 110 V (jeweils 90 Minuten). Danach wurden die Membranen zur Kontrolle eines gleichmäßigen

Proteintransfers kurz mit Ponceau-Lösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen mit TBS-T gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindung für etwa eine Stunde mit 10%iger Magermilch, gelöst in TBS-T, inkubiert. Nach der Blockierung wurde mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit primären monoklonalen Antikörpern erfolgte in der Regel über Nacht, die Inkubation mit sekundären Antikörpern mindestens eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 1). Dazwischen wurde drei mal drei Minuten, nach dem zweiten Antikörper fünf mal drei Minuten mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde für HIF-1 α , HIF-2 α , ICAM-1 und p65 das ECL-System, für α -Tubulin das Luminol-System verwendet.

Luminol-System:

10 mL TRIS (100mM), pH 8.5

50 μ L Luminol (250 mM)

25 μ L p-Cumarinsäure (90 mM)

3-7 μ L H₂O₂ (30%)

Tabelle 3.3.: Western Blot Antikörper (anti-human)

1. AK	Blockierung	Konzentration des 1. AK	Art des 2.AK, Verdünnung	Exposition in min
<i>HIF-1α</i>	5 % MM In TBS-T	1:500	anti-mouse; 1:100000	10-15
<i>HIF-2α</i>	5 % MM In TBS-T	1:1000	anti-rabbit; 1:100000	5
<i>ICAM-1</i>	5 % MM In TBS-T	1:500	anti-mouse; 1:100000	2-10
<i>p65</i>	5 % MM In TBS-T	1:1000	anti-mouse; 1:100000	6
<i>α-Tubulin</i>	5 % MM In TBS-T	1:1000	anti-mouse; 1:10000	3
<i>Pol II</i>	5 % MM In TBS-T	1:1000	anti-mouse; 1:10000	3

Tabelle 3.4.: Western Blot Antikörper (anti-mouse)

1. AK	Blockierung	Konzentration des 1. AK	Art des 2.AK, Verdünnung	Exposition in min
<i>HIF-1α</i>	<i>5 % MM In TBS-T</i>	<i>1:500</i>	<i>anti-rabbit; 1:100000</i>	<i>10-15</i>
<i>α-Tubulin</i>	<i>5 % MM In TBS-T</i>	<i>1:1000</i>	<i>anti-mouse; 1:10000</i>	<i>3</i>

Tabelle 3.5.: Western Blot Antikörper (anti-rat)

1. AK	Blockierung	Konzentration des 1. AK	Art des 2.AK, Verdünnung	Exposition in min
<i>HIF-1α</i>	<i>5 % MM In TBS-T</i>	<i>1:500</i>	<i>anti-rabbit; 1:100000</i>	<i>10-15</i>
<i>HIF-2α</i>	<i>5 % MM In TBS-T</i>	<i>1:1000</i>	<i>anti-rabbit; 1:10000</i>	<i>5-10</i>
<i>α-Tubulin</i>	<i>5 % MM In TBS-T</i>	<i>1:1000</i>	<i>anti-mouse; 1:10000</i>	<i>3</i>

3.4.4.5 Immunfluoreszenz

Die Inkubation der Zellen, die mittels Immunfluoreszenz untersucht werden sollten, erfolgte stets in 24-Loch-Platten.

Bei differenzierten THP-1-Zellen sowie EC52-Zellen erfolgte zunächst die Beschichtung steriler Glasplättchen mit 0.1% Poly-D-Lysin (30 min, 37 °C), um eine optimale Adhärenz der Zellen zu erreichen. Im Anschluss wurden die Plättchen dreimal mit PBS gewaschen, um Rückstände zu entfernen. Dann wurden entweder undifferenzierte THP-1-Zellen (250 μ L, mit 10 nM PMA versetzt), EC52-Zellen (350 μ L trypsinierte Zellen) oder HUVEC-Zellen (400 μ L trypsinierte Zellen) auf die Plättchen gegeben und in 1 mL Gesamtmedium kultiviert. Nachdem eine Adhärenz der Zellen erreicht war, erfolgte der Versuch

mit den jeweils angegebenen Bedingungen in 250 μL , bei Cokulturversuchen in 500 μL Medium. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Zellen für zehn Minuten bei -20°C mit einem Gemisch aus Aceton/Methanol (1:1; 250 μL) fixiert. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Zellen bei Raumtemperatur zehn Minuten getrocknet. Danach wurde für weitere zehn Minuten mit 3%igem BSA bei Raumtemperatur blockiert. Die Antikörperinkubation erfolgte für alle Zellen in 200 μL 3% BSA/PBS und unter Ausschluss von Licht. Die verwendeten Antikörperkonzentrationen sowie die zugehörigen Zweitantikörper können der nachstehenden Tabelle entnommen werden:

Tabelle 3.6.: Fluoreszenzfarbstoffe/Antikörper für die Immunfluoreszenz

1. AK	Konzentration des 1. AK	Art des 2.AK, Konzentration	Absorptions-maximum	Emissions-maximum
<i>ICAM-1</i>	10 μMol	<i>Alexa 568;</i> <i>anti mouse</i> <i>1:400</i> <i>bzw.</i> <i>Alexa 546</i> <i>anti mouse</i> <i>1:400</i>	<i>Alexa 568:</i> <i>576 nm</i> <i>Alexa 546:</i> <i>562 nm</i>	<i>Alexa 568:</i> <i>603 nm</i> <i>Alexa 546:</i> <i>573 nm</i>
<i>hu</i> <i>Endothelin-1</i>	10 μMol	<i>Alexa 568;</i> <i>anti rat</i> <i>1:400</i>	576 nm	603 nm
<i>rat anti-</i> <i>Endothel</i>	10 μMol	<i>Alexa 568</i> <i>anti mouse</i> <i>1:400</i>	576 nm	603 nm
<i>Calcein AM</i>	4 μMol	-	493 nm	514 nm

Die Inkubationsdauer des ersten Antikörpers betrug in der Regel zwei Stunden, die des zweiten Antikörpers mindestens eine Stunde. Zwischen dem Wechsel der Antikörper fand ein Waschvorgang (zweimal 250 μL PBS, je fünf Minuten)

statt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben wiederum zunächst mit PBS (zweimal fünf Minuten) gewaschen. Zur Fixierung der Glasplättchen auf dem Objektträger wurden jeweils 2 μL Moviol auf den Objektträger gegeben, die Glasplättchen mit den Zellen nach unten darauf gegeben und über Nacht bei 4°C unter Ausschluss von Licht getrocknet. Die Inkubation der Monozyten mit Calcein AM (Endkonzentration 4 μM) erfolgte für jeweils dreißig Minuten. Im Anschluss daran wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, bevor sie in den Cokulturversuch mit HUVEC- bzw. EC52-Zellen gegeben wurden. Die Endothelzellen wurden mit Hilfe des regulären Immunfluoreszenz-Protokolls markiert.

Die Auswertung am Mikroskop erfolgte spätestens am folgenden Tag.

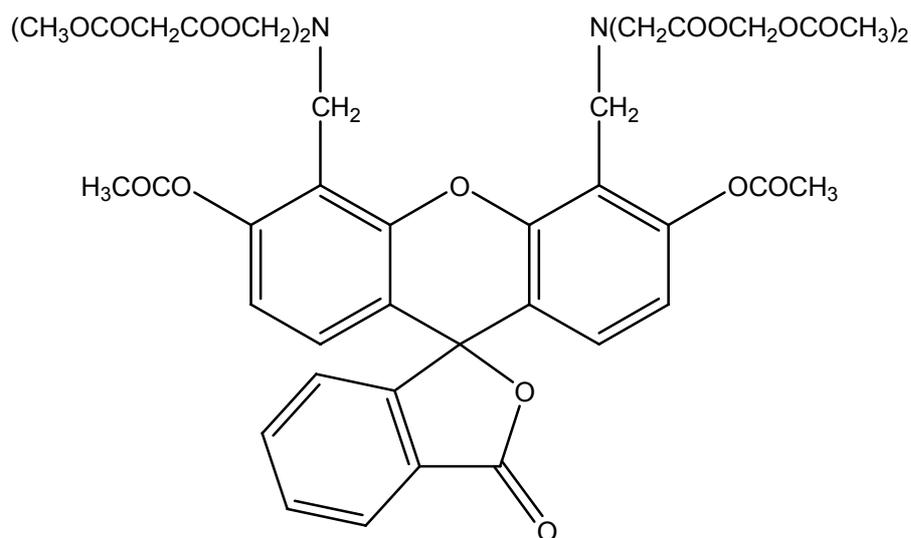


Abb. 3.4.: Calcein AM (C₄₆H₄₆N₂O₂₃)

N/A/Glycin, N,N'-[[3',6'-bis(acetyloxy)-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-4',5'-diyl]bis(methylen)bis[N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]-bis[(acetyloxy)methyl]ester

3.4.4.6 NF- κ B-Assay

Bei diesem Assay der Firma Active Motif handelt es sich um einen ELISA-basierten DNA-Bindungsassay. Der initiiierende Schritt besteht aus der Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktors an eine bestimmte Oligonukleotidsequenz, Durchführung und Detektion basieren auf der ELISA-Methode. Auf die bereits mit der entsprechenden Oligonukleotidsequenz (5'-GGGACTTCC-3') beschichtete 96-Lochkulturplatte wurden zunächst 30 μ L Complete Binding Buffer gegeben, anschließend wurde die Platte neben jeweils 2-5 μ g Protein aus zuvor erstellten Kernextrakten in Lysepuffer mit einem Leerwert (nur Lysepuffer) und einer Positiv-Kontrolle (Raji Nuclear Extract, 4,5 μ g) beschickt. Die Platte wurde nun eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (100 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurden die Vertiefungen drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und dann mit jeweils 100 μ L des Antikörperkonjugates (200 μ M) versehen. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde wiederholt gewaschen und dann der Zweitantikörper (100 μ L einer 200 μ M Lösung) zugegeben. Es erfolgte wiederum eine einstündige Inkubation. Danach wurden die Vertiefungen vier Mal gewaschen und mit 100 μ L Detektionslösung versehen. Die Reaktion wurde nach ca. 8 Minuten, während derer sie in der Dunkelkammer aufbewahrt wurde, durch Zugabe von Stopplösung (1M H₂SO₄) beendet. Die Extinktion der Proben wurde mit Hilfe des ELISA-Readers umgehend bei 450 und 590 nm gemessen.

Tabelle 3.6.: im NF- κ B assay verwendete Antikörper

1. Antikörper	2. Antikörper
<i>p 65</i>	<i>Anti-rabbit HRP-conjugated IgG</i>
<i>c-Rel</i>	

3.4.5 RNA-Isolierung / cDNA-Synthese

Die RNA wurde mit Hilfe der sauren Phenol-Chloroform-Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) extrahiert. Dazu wurden die Zellen nach der Inkubation mit 700 μL GTC (4 M) lysiert und über Nacht bei -20°C eingefroren. Die aufgetauten Proben wurden mit 70 μL Natriumacetat (2 M) angesäuert sowie mit 560 μL Phenol und 290 μL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (49:25:1) versetzt. Die Proben wurden mittels Vortexer homogenisiert und mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 13200 rpm und 4°C . Die untere organische Phase enthielt nun die zellulären Proteine, die obere wässrige Phase die Nukleinsäuren. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die so vom Protein gereinigte RNA wurde durch Zugabe von 600 μL Isopropanol gefällt und über Nacht nochmals bei -20°C eingefroren. Die Proben wurden am nächsten Tag 30 Minuten bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das entstandene Präzipitat an der Luft getrocknet, in 300 μL 4M GTC resuspendiert und mit 500 μL Isopropanol versetzt. Nach wiederholter Lagerung bei -20°C über Nacht und Zentrifugation (30 min, 13200 rpm, 4°C) wurde wiederum der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und die RNA mit 75%igem Ethanol (500 μL) gewaschen. Das Präzipitat wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 10-20 μL DEPC-haltigem Wasser aufgenommen. Der RNA-Gehalt der Lösung wurde mit einem Photometer gemessen (Absorption bei 260 nm), der Quotient bei 260/280 nm zur Überprüfung der Reinheit der RNA-Präparation gebildet und die RNA bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Für die cDNA-Synthese wurde 1 μg RNA je Probe eingesetzt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge DEPC-Wasser und 2.5 μL Oligo-dT wurde das Gemisch 10 Minuten auf 68°C erhitzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde jedem Ansatz ein Mix aus 5 μL 5x RT-Puffer, 5 μL NTPs, 2.5 μL DEPC-

Wasser und 0.5 μL Reverser Transkriptase zugesetzt. Das Gesamtvolumen der Proben für die cDNA-Synthese betrug 25 μL ; diese wurden im Anschluss 90 min auf 45°C, 30 min auf 52°C und 15 min auf 95°C erhitzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei 4°C.

3.4.5.1 PCR und real-time PCR

Eingesetzt wurden 1 μL cDNA pro Reaktion. Hinzugefügt wurden 4 μL NTPs, 5 μL PCR-Puffer, 1.5 μL MgCl_2 (50 mM), je 1 μL der beiden gewünschten Primer, 38 μL Wasser und 0.15 μL Taq-Polymerase pro Ansatz. Die Ansätze wurden dann für 3 Minuten auf 96°C, und schließlich in der gewünschten Zyklenzahl für 1 Minute auf 96°C, für 1 ½ Minuten auf die entsprechende Annealing-Temperatur der Primer und für 1 Minute auf 72°C erhitzt. Die amplifizierte Menge an DNA konnte nun mittels Gelelektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel mit 0.2 % Ethidiumbromid dargestellt werden.

In den nachfolgenden Tabellen sind die zum jeweiligen Zielgen gehörigen Primersequenzen aufgelistet:

Tabelle 3.7.: humane Primer

Zielgen	Primer-Art	Sequenz (5' → 3')	PCR
HIF-1α	<i>fwd.</i>	<i>CTC CAT TAC CCA CCG CTG AA</i>	60 °C 33 cyc
	<i>rev.</i>	<i>TCA CTG GGA CTA TTA GGC TCA GGT</i>	
HIF-2α	<i>fwd.</i>	<i>AGG ACT ACA GCC TGT CGT CAG C</i>	60 °C 33 cyc
	<i>rev.</i>	<i>CCT TGC AGG AGC CTG GAG</i>	
ADM	<i>fwd.</i>	<i>GGA TGC CGC CCG CAT CCG AG</i>	60 °C 35 cyc
	<i>rev.</i>	<i>GAC ACC AGA GTC CGA CCC GG</i>	
CD 18	<i>fwd.</i>	<i>CTG GTA GCA AAG CCC CCA CG</i>	60 °C 30 cyc
	<i>rev.</i>	<i>TGG GTT TCA GCG AGG CTT GTG</i>	
CD 11b	<i>fwd.</i>	<i>GGC AGC ATG TGC CTG TAG TA</i>	60 °C 33 cyc
	<i>rev.</i>	<i>GCT GGA GTG CAG TGG TGT AA</i>	

Zielgen	Primer-Art	Sequenz (5' → 3')	PCR
<i>IL-1</i>	<i>fwd.</i>	<i>AAG ATG CTG GTT CCC TGC C</i>	60 °C 33 cyc
	<i>rev.</i>	<i>GCG TGC AGT TCA GTG ATC GTA C</i>	
<i>ICAM-1</i>	<i>fwd.</i>	<i>TCA CCCACACTGTGCCCCATCTACGA</i>	60 °C 30 cyc
	<i>rev.</i>	<i>CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG</i>	
<i>PGK-1</i>	<i>fwd.</i>	<i>AGA GCC CAC AGT TCC ATG GT</i>	60 °C 30 cyc
	<i>rev.</i>	<i>GCA AAG TAG TTC AGC TCC TTC TTC</i>	
<i>GLUT-1</i>	<i>fwd.</i>	<i>GAG GAG CTC TTC CAC CCT CT</i>	60 °C 30 cyc
	<i>rev.</i>	<i>TCC TCC TGG ACT TCA CTG CT</i>	
<i>β-Actin</i>	<i>fwd.</i>	<i>TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A</i>	60 °C 30 cyc
	<i>rev.</i>	<i>CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G</i>	

Tabelle 3.8.: murine Primer

Zielgen	Primer-Art	Sequenz (5' → 3')	PCR
<i>HIF-1α</i>	<i>fwd.</i>	<i>GAA ATG GCC CAG TGA GAA AA</i>	60 °C 33 cyc
	<i>rev.</i>	<i>CTT CCA CGT TGC TGA CTT GA</i>	
<i>ADM</i>	<i>fwd.</i>	<i>CGC AGT TCC GAA AGA AGT GG</i>	60 °C 35 cyc
	<i>rev.</i>	<i>CCA GTT GTC TTC TGC TCG TCC</i>	
<i>β-Actin</i>	<i>fwd.</i>	<i>CCCCTCTGAACCCTAAGGCC</i>	60 °C 30 cyc
	<i>rev.</i>	<i>GGACAACACAGCCTGGATGG</i>	

Tabelle 3.8.: Ratten-Primer

Zielgen	Primer-Art	Sequenz (5' → 3')	PCR
<i>HIF-1α</i>	<i>fwd.</i>	<i>ACA GGA TTC CAG CAG ACC CA</i>	60 °C 33 cyc
	<i>rev.</i>	<i>TGG GTA GAA GGT GGA GAT GCA</i>	
<i>HIF-2α</i>	<i>fwd.</i>	<i>GGT GAC CCA AGA CGG TGA TA</i>	60 °C 33 cyc
	<i>rev.</i>	<i>GGT CGC AAG GAT GAG TGA AG</i>	
<i>ADM</i>	<i>fwd.</i>	<i>AAT GAA GCT GGT TTC CAT CG</i>	60 °C 35 cyc
	<i>rev.</i>	<i>AGT TCC CTC TTC CCA CGA CT</i>	
<i>ICAM-1</i>	<i>fwd.</i>	<i>GGA GGC CCT AAA ACT CAA GG</i>	60 °C 30 cyc
	<i>rev.</i>	<i>GAG GTG GGT GAG GGG TAA AT</i>	
<i>β-Actin</i>	<i>fwd.</i>	<i>CCCCTCTGAACCCTAAGGCC</i>	60 °C 30 cyc
	<i>rev.</i>	<i>GGACAACACAGCCTGGATGG</i>	

Für die Quantifizierung der cDNA wurde das qPCR Mastermix for SYBRGreen I-System (Eurogentec) verwendet. Sämtliche Primer für die qualitative PCR wurden so gewählt, dass sie auch in der quantitativen Bestimmung Anwendung finden konnten. Zu einem zuvor hergestellten Mastermix aus je 50 μL 2-fachem Reaktionspuffer, 44 μL H_2O und 2 μL der jeweils benötigten Primer wurden pro Probe 2 μL cDNA hinzu gegeben. Für alle Proben wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Dazu wurde eine 96-Lochplatte zunächst mit einem Leerwert (2 μL Aqua dest. statt Probe) und den jeweiligen Standards (von 1000 – 0.001 $\text{fg}/\mu\text{g}$, Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:10) und dann mit den zu untersuchenden Proben beladen. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 25 μL . Die real-time PCR-Bedingungen im ICycler waren bei fast allen Quantifizierungen gleich: 50°C für 2 Minuten, 95°C für 10 Minuten, 40 Zyklen mit je 95°C für 15 Sekunden und 60°C für eine Minute. Zur Dissoziation folgte eine anschließende langsame Erhitzung auf 95°C innerhalb von 20 Minuten. Die einzige Ausnahme bildeten Actin und ribosomales Protein, die lediglich mit 35 Zyklen amplifiziert wurden.

3.4.5.2 Transfektion mit siRNA

Für die Transfektion mit siRNA gegen p100 wurden THP-1-Zellen auf 6-Lochkulturplatten ausdifferenziert.

Vor der Transfektion wurden zunächst die benötigte Menge an siRNA und das Transfektionsreagenz Oligofectamine für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Beginn der Präkonditionierungsphase wurden die Zellen dann zunächst für vier Stunden mit Transfektionsreagenz und siRNA (200 μL) überschichtet und bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert (Endkonzentrationen der NF- κB 2 (p100) sowie non-target siRNA: 20 μM ; Dharmacon: -ONTARGETplus-).

Nach der Transfektion wurde das Volumen in jedem Zellansatz mit serumfreiem Medium auf jeweils 2mL aufgefüllt. Es folgte die Inkubation bei 37°C und 5%

CO₂ mit und ohne 0.05 ng/mL LPS. Nach Beendigung des Toleranzprotokolls wurden die Zellen im jeweiligen Versuch inkubiert.

Die Transfektion mit si*Accell*-RNA (Dharmacon) erfolgte ohne Transfektionsreagenz über einen Zeitraum von 72 Stunden. Dazu wurden die adhärennten Zellen (EC52) mit einer Konfluenz von etwa 50% ausgesät und Suspensionskulturen (undifferenzierte THP-1) mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^5$ /mL angesetzt. Für die anschließende Untersuchung der Zellen mittels Immunfluoreszenz wurden 24-Lochkulturplatten verwendet. Hierbei erfolgte die Inkubation der Zellen in 400 μ L si*Accell*-Medium. Für anschließende mRNA-Versuche wurden 10 cm-Kulturschalen verwendet, auf denen die Zellen mit 3 mL Medium versetzt wurden. In diesem Fall musste verdunstetes Medium täglich ersetzt werden um das Überleben der Zellen zu gewährleisten. Die Endkonzentration der siRNA betrug in beiden Fällen 1 μ M.

Die Transfektion mit siRNA gegen HIF-1 α (Dharmacon: -siGenome-) für die mRNA-Analyse erfolgte mittels Elektroporation der THP-1-Zellen. Einen Tag vor der geplanten Elektroporation wurden die Zellen 1:2 gesplittet, damit sie sich zur Zeit der Transfektion in der Wachstumsphase befanden. Am Tag der Transfektion wurde die Zellsuspension in ein 50 mL-Falcon-Gefäß überführt und vier Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 10 mL Pb-Sucrose resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer erfolgte eine erneute Zentrifugation (4 min, 1500 rpm). Die Zellen wurden jeweils in soviel Pb-Sucrose resuspendiert, dass eine Zelldichte von $1,5 \times 10^7$ pro mL erreicht wurde. Für die Elektroporation wurden jeweils 100 μ L der Zellsuspension zusammen mit 10 μ L siRNA (Endkonzentrationen: HIF-1 α : 50 μ M, non-target siRNA: 20 μ M) in eine Küvette pipettiert und mit Hilfe des Elektroporators transfiziert.

Elektroporationsprotokoll:

Eigenschaft des Elektroporationspulses	Zahlenwert
<i>Volt</i>	100
<i>Länge</i>	2 ms
<i>Anzahl</i>	10
<i>Intervall</i>	100 ms

Nach der Transfektion wurde die Zellsuspension in jeweils 2mL Medium pro Ansatz aufgenommen und auf 6-Lochkulturplatten verteilt. Es folgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Sechzehn Stunden nach der Elektroporation wurden die Zellen dann für 8h bei 37°C, 3% O₂ und 5% CO₂ inkubiert.

Tabelle 3.9.: Nukleotidsequenzen der verwendeten siRNA

siRNA	Sequenz (5' → 3')
<i>human siON-TARGETplus-NF-κB2 (p100)</i>	<i>CGA ACA GCC UUG CAU CUA G</i>
<i>rat siAccell-ICAM-1</i>	<i>CCC UAA AAC UCA AGG UAC A</i>
<i>human siAccell-ICAM-1</i>	<i>GCA AUG UGC AAG AAG AUA G</i>
<i>human siAccell-HIF-1α</i>	<i>GUA UUA UUC AGC ACG ACU U</i>
<i>human siGenome -HIF-1α</i>	<i>GGA CAC AGA UUU AGA CUU GUU</i>
<i>human siGenome-PHD-1</i>	<i>ACA GAA AGG UGU CCA AGU</i>
<i>human siGenome-PHD-2</i>	<i>CAA GGU AAG UGG AGG UAU AUU</i>

3.4.6 Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Assay

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit Hilfe des MTT-Assays. Hierbei wurden die Zellen zunächst auf 96-Lochkulturplatten mit einem Ansatz von n=10 entsprechend der im Experiment verlangten Bedingungen inkubiert. Im Anschluss an das eigentliche Experiment erfolgte dann eine zweistündige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und Normoxie bzw. Hypoxie mit je 25 µL MTT

(5 g/L, gelöst in PBS) pro Ansatz, das von allen noch vitalen Zellen aufgenommen werden konnte. Im Anschluss wurden 100 µL MTT-Lysepuffer zugegeben, der einerseits eine Lyse der Zellen und andererseits einen Farbumschlag des aufgenommenen MTTs ins Blaue bewirkte. Die Extinktion in den Einzelvertiefungen der 96-Lochkulturplatte konnte dann mittels Plattenspektrometer bei einer Wellenlänge von 590 nm ausgewertet werden. Die gemessene Extinktion war dabei umgekehrt proportional der Vitalitätsrate der Zellen.

3.4.7 Phagozytose-Assay

Das Phagozytoseverhalten naiver wie endotoxintoleranter Zellen wurde mittels eines NBT (Nitroblau-Tetrazolium-Test)-basierten Phagozytose-Assays charakterisiert. Dazu wurden zunächst THP-1-Zellen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ /mL in 24-Lochkulturplatten ausdifferenziert (200 µL/Vertiefung) und dem Endotoxintoleranzprotokoll unterzogen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen stimuliert sowie 100 µL NBT zugesetzt, um das Phagozytoseverhalten quantitativ auswerten zu können.

Ansatz	Bemerkungen
<i>C</i>	<i>Kontrolle mit Zugabe von NBT</i>
<i>E. Coli</i>	<i>100 µl/Vertiefung</i>
<i>PMA 10 µM</i>	<i>20 µl/ Vertiefung</i>
<i>E. Coli + PMA</i>	<i>100 µl/ Vertiefung E. Coli + 20 µl/ Vertiefung PMA</i>
<i>LPS 1 µg/mL</i>	<i>0.5 µl/ Vertiefung</i>

Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, während derer die Monozyten den gelben Farbstoff NBT zu blauem Formazan umsetzten, erfolgte eine Lyse der Zellen mit 125 µL KOH (2M) und 150 µL DMSO. Die densitometrische Auswertung erfolgte bei 650 nm.

3.4.8 MatriGel Invasionsassay

Für den MatriGel Invasionsassay wurden spezielle 6- bzw. 24-Lochkulturplatten der Firma Becton Dickinson verwendet. Hierzu waren passende Einsätze erhältlich, die über eine semipermeable Membran an der Unterseite verfügten (Porengröße 8 μm mit $1 \cdot 10^5$ Poren/ cm^2). Zunächst musste hierauf eine möglichst gleichmäßige, dünne Schicht MatriGel aufgetragen werden. Dazu wurde das MatriGel mit serumfreiem, gekühltem Medium um den Faktor 1:3 verdünnt. Auf die 6-Lochkulturplatten wurden dann jeweils 300 μL , auf die 24-Lochkulturplatten 50 μL der MatriGel-Lösung aufgetragen. Alle diese Arbeiten wurden steril und auf Eis ausgeführt um ein vorzeitiges Polymerisieren des MatriGels zu vermeiden. Es wurden ebenfalls vorgekühlte Pipetten und -spitzen verwendet. Im Anschluss daran polymerisierte das MatriGel für mindestens drei Stunden, in der Regel jedoch über Nacht bei Raumtemperatur, der Versuch wurde am nächsten Tag durchgeführt. Auf die 6- bzw. 24-Lochkulturplatten wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn Tumorzellen ausgesät (je 150 μL bzw. 35 μL trypsinisierte U2OS-Zellsuspension mit 10^6 Zellen/mL). Für unsere Fragestellung wurden U2OS-Zellen gewählt, eine schnell proliferierende Osteosarkom-Zelllinie. Sie sollten die Monozyten zur Einwanderung in das MatriGel anregen. Während des eigentlichen Versuches wurden dann je 500 μL naive bzw. über 24 Stunden mit 0.05 ng/mL präkonditionierte THP-1-Zellsuspension in die mit MatriGel beschichteten Einsätze für die 6-Lochkulturplatten gegeben. Für die jeweiligen Einsätze der 24-Lochkulturplatten wurden 150 μL THP-1-Zellsuspension verwendet. Die Einsätze wurden wie in Abbildung 3.3. gezeigt über die Tumorzellen gestellt. Das zugegebene Medium gewährleistete den Kontakt zwischen beiden Arealen. Die THP-1-Zellen wurden mit LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) bzw. PBS versetzt für 90 Minuten bei 37°C , 5% CO_2 unter Normoxie inkubiert.

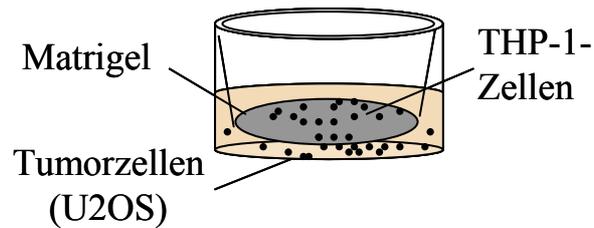


Abb. 3.5.: Schema des MatriGel Invasionsassays.

Auf die Lochkulturplatten wurden Tumorzellen aufgebracht, die die THP-1-Zellen zur Invasion in die extrazelluläre Matrix veranlassen sollten. Der mit MatriGel (grau dargestellt) beschichtete Einsatz enthielt die Monozyten. Der Kontakt zwischen beiden Arealen wurde durch das Auffüllen mit Medium hergestellt.

Im Anschluss wurden die Einsätze je dreimal mit PBS gewaschen um nicht eingewanderte Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden mittels 400 μ L 4%iger PFA-Lösung für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit Hoechst-Farbstoff (Hoechst 33342, 1 μ M) gefärbt. Die Auswertung am Mikroskop erfolgte am nächsten Tag, bis dahin wurden die Einsätze mit PBS überschichtet bei 4°C gelagert um ein Austrocknen der Matrix zu verhindern.

3.4.9 Statistik

Die Statistik wurde mit Hilfe des InStat 3.0 der Fa. Graphpad Software ® berechnet. Es wurde jeweils ein Tukey-Cramer-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden ab $p < 0.05$ als signifikant angesehen.

* = $p < 0.05$

** = $p < 0.01$

*** = $p < 0.001$

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil wird in insgesamt drei Teile gegliedert dargestellt; nachdem zunächst die Auswirkungen einer etablierten Endotoxintoleranz auf das monozytäre/makrozytäre Verhalten erläutert werden, erfolgt im Anschluss daran die Präsentation der Ergebnisse zum Adhäsionsverhalten von THP-1- Zellen an das Endothel. Als letztes werden beide Themenbereiche miteinander verknüpft indem die Ergebnisse zu den Auswirkungen einer LPS-Vorbehandlung auf das Adhäsionsverhalten humaner Monozyten vorgestellt werden.

4.1 Inflammatorische Präkonditionierung bzw. Etablierung von Endotoxintoleranz

Bereits in der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass eine längerfristige vorhergehende Inkubation von Makrophagen mit geringen Dosen bakterieller Lipopolysaccharide (LPS) zu einer verminderten Antwort des HIF-Systems auf einen neuerlichen LPS-Stimulus sowie auf Hypoxie führt. Man kann in diesem Zusammenhang also von einem funktionellen HIF-1 α Knock-down sprechen (Frede et al., 2009).

4.1.1 Die Etablierung von Endotoxintoleranz führt zu einer signifikanten Verminderung der HIF-1 α -Protein- sowie -mRNA-Expression

Die in der Diplomarbeit erzielten Ergebnisse wurden zunächst durch die Verwendung verschiedener LPS-Konzentrationen sowie die Durchführung der Versuche bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen ergänzt. Eine 48stündige Vorinkubation mit 0.05 ng/mL LPS führt in THP-1-Zellen, die zu einem makrophagenartigen Phänotyp differenziert wurden, zu einer verminderten Fähigkeit, unter Hypoxie HIF-1 α Protein zu akkumulieren. Darüber hinaus ist die LPS-Induzierbarkeit (1 μ g/mL LPS für nochmals sechs

Stunden) des Proteins nach Toleranzentwicklung sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen erheblich vermindert. Im Folgenden wird dieses Protokoll als Toleranzprotokoll bezeichnet; alle Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, nach diesem Schema durchgeführt.

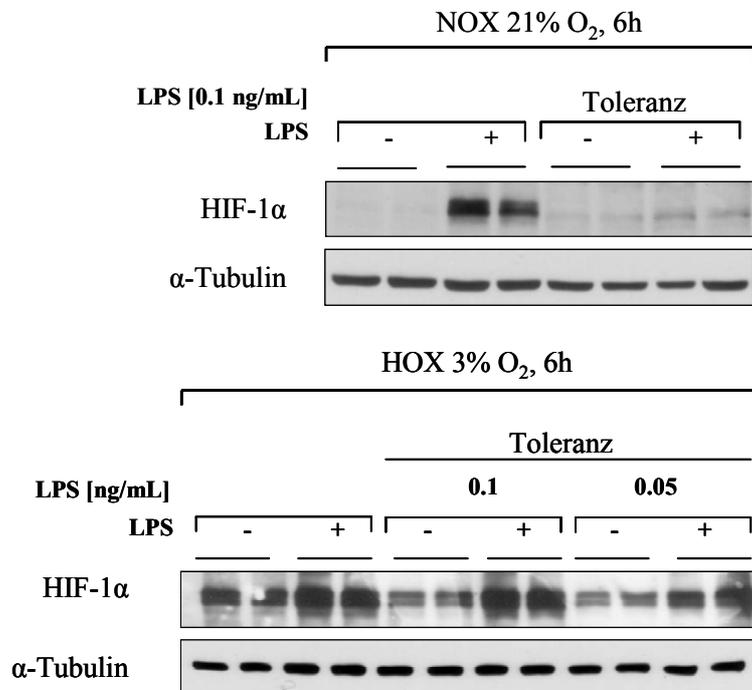


Abb. 4.1.1.: Die HIF-1 α -Proteinakkumulation ist nach Etablierung von Endotoxintoleranz deutlich vermindert.

Humane differenzierte THP-1-Zellen wurden zunächst für 48h mit und ohne 0.1 bzw. 0.05 ng/mL LPS inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Akutstimulation mit 1 μ g/mL LPS unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen. Die Etablierung von Endotoxintoleranz führt nicht nur zu einer deutlich verminderten HIF-1 α -Antwort auf eine neuerliche LPS-Stimulation, sondern erniedrigt darüber hinaus bereits die hypoxischen Kontrollmengen des HIF-1 α -Proteins. Aufgetragen wurden 50 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

Der in Abbildung 4.1. dargestellte Versuch wurde bei einer Sauerstoffkonzentration von 21% bzw. 3% durchgeführt. Um zu zeigen, dass die Etablierung von Endotoxintoleranz in THP-1-Zellen unabhängig von der im Versuch verwendeten Sauerstoffkonzentration zu denselben Ergebnissen führt, wurde im Anschluss der gleiche Versuch auch unter 5% Sauerstoff sowie bei 1%iger Sauerstoffkonzentration durchgeführt.

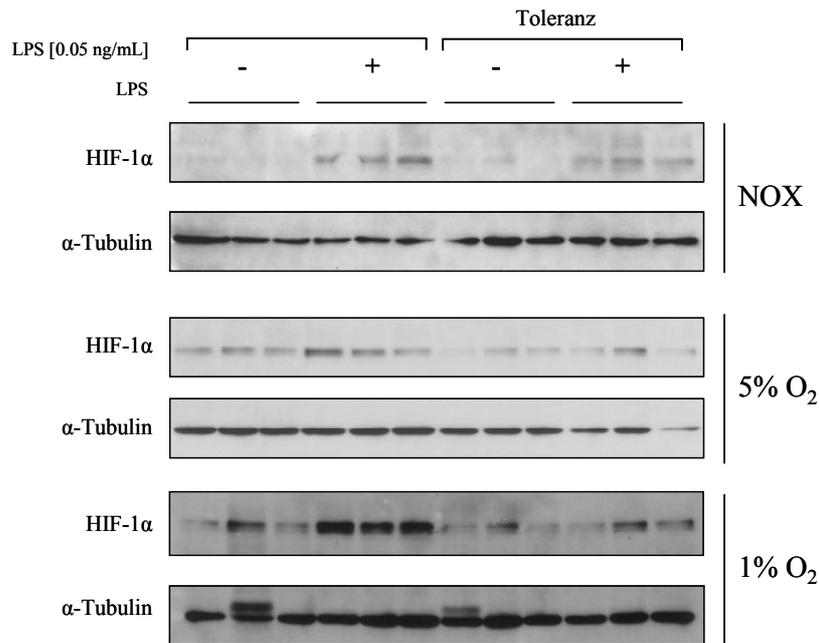


Abb. 4.1.2.: Die verminderte HIF-1 α -Proteinakkumulation nach Etablierung von Endotoxintoleranz ist unabhängig von der im Versuch verwendeten Sauerstoffkonzentration. Humane differenzierte THP-1-Zellen wurden dem Toleranzprotokoll unterzogen. Die Durchführung des Akutversuchs bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen nach der Toleranzentwicklung führt zu ähnlichen Ergebnissen: Man findet eine verminderte Akkumulation des HIF-1 α -Proteins unter hypoxischen Kontrollbedingungen und eine verminderte LPS-Induzierbarkeit unter Normoxie und entsprechender Hypoxie. Aufgetragen wurden 50 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch auf mRNA-Ebene erzielen:

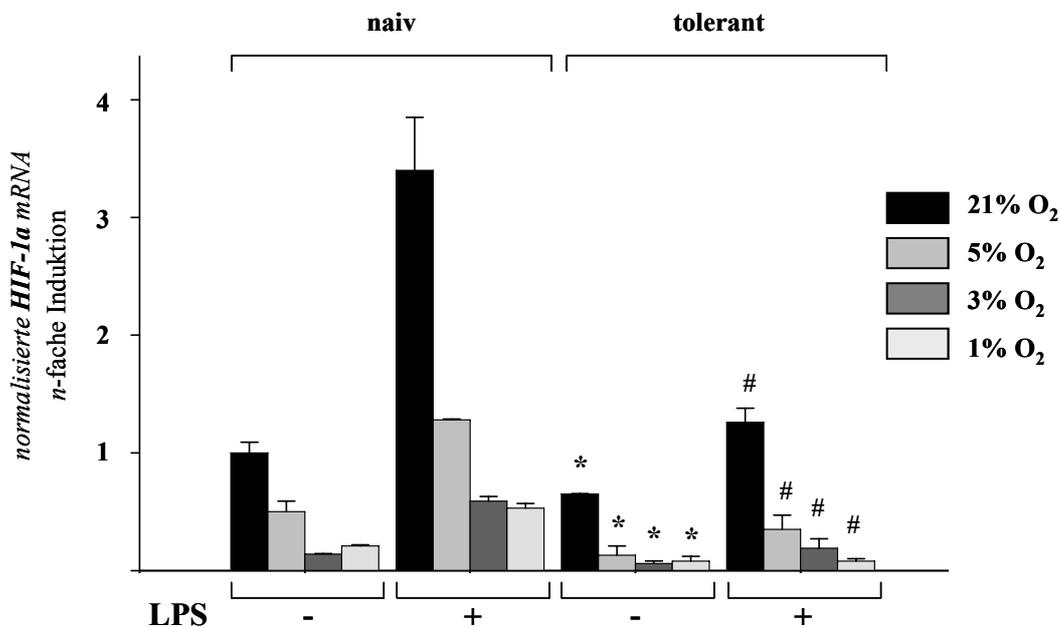


Abb. 4.1.3.: Etablierung von Endotoxintoleranz führt unabhängig von der im Versuch verwendeten Sauerstoffkonzentration zu verminderten HIF-1 α -mRNA Mengen sowie zu einer reduzierten LPS-Induzierbarkeit.

Humane differenzierte THP-1-Zellen wurden dem Toleranzprotokoll unterzogen. Endotoxintolerante THP-1-Zellen weisen eine gegenüber der jeweiligen naiven Kontrolle signifikant verminderte basale HIF-1 α -mRNA Expression auf. Darüber hinaus ist keine signifikante Induktion der mRNA mittels LPS-Stimulus mehr erreichbar (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle unbehandelter (naiver) THP-1-Zellen weisen die endotoxintoleranten Makrophagen signifikant verminderte HIF-1 α -mRNA Mengen auf. Darüber hinaus lässt sich die mRNA in den betreffenden Zellen mittels eines zweiten LPS-Stimulus nicht mehr signifikant induzieren.

Bereits in der Diplomarbeit konnte die verminderte Expression des HIF-Zielgens ADM (Adrenomedullin) gezeigt werden; als weiteres, allerdings HIF-1 α -spezifisches Zielgen wurde nun noch die Expression der Phosphoglyceratkinase (PGK)-1 in endotoxintoleranten Makrophagen untersucht.

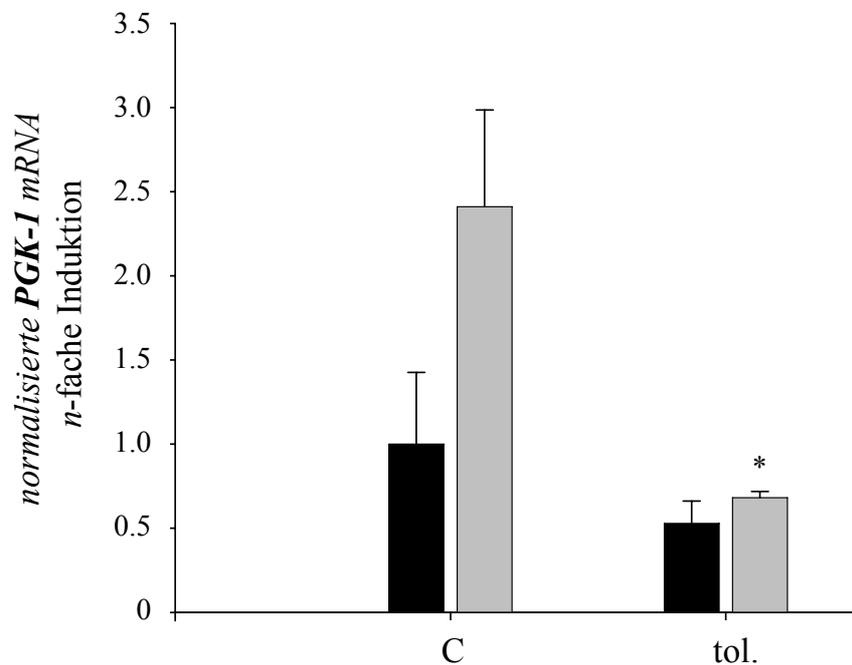


Abb. 4.1.4.: Die Expression des HIF-1 α -Zielgens PGK-1 in endotoxintoleranten Zellen ist vermindert.

Humane differenzierte THP-1-Zellen wurden dem Toleranzprotokoll unterzogen. Endotoxintolerante THP-1-Zellen weisen gegenüber der naiven Kontrolle unter hypoxischen Kontrollbedingungen (3% O₂) verminderte PGK-1-mRNA Mengen auf, die nicht mehr LPS-stimulierbar sind (Mittelwerte \pm SD; n=3).

4.1.2 Die Etablierung von Endotoxintoleranz ist auch *in vivo* möglich und führt hier ebenfalls zu verminderter HIF-1 α -Expression

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit sich die *in vitro* erzielten Ergebnisse auf ein Mausmodell übertragen ließen. Dazu wurden C57/Bl6-Tiere in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Schade (Institut für Experimentelle Unfallchirurgie) einmalig mit 240 μ g LPS behandelt (Injektion in den Peritonealraum) und vier Tage später mittels CO₂ getötet. Die Kontrolltiere erhielten zum selben Zeitpunkt eine Injektion einer Kochsalzlösung gleichen Volumens. Unmittelbar nach Eintritt des Todes wurden Peritonealmakrophagen aus allen Tieren isoliert und *in vitro* unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂, 6h) inkubiert. Hierbei zeigten die Peritonealmakrophagen aus endotoxin-toleranten Tieren deutlich verminderte HIF-1 α -Proteinmengen.

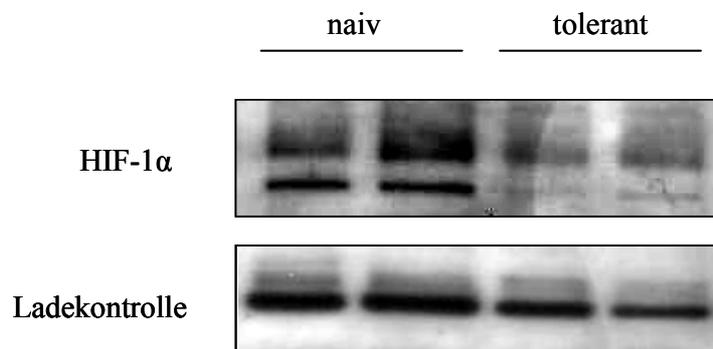


Abb. 4.1.5.: Die HIF-1 α -Proteinexpression in endotoxintoleranten murinen Peritonealmakrophagen ist vermindert.

C57/Bl6-Mäuse wurden vier Tage vor der Tötung mit und ohne 240 μ g LPS i.p. behandelt. Die isolierten Peritonealmakrophagen aus LPS-behandelten Mäusen weisen eine gegenüber den Kontrolltieren erheblich verminderte Möglichkeit zur hypoxischen HIF-1 α -Akkumulation auf. Aufgetragen wurden 40 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch für die HIF-1 α -mRNA erzielen, bereits unter normoxischen Bedingungen weisen endotoxintolerante Peritonealmakrophagen eine verminderte Expression der HIF-1 α -mRNA auf.

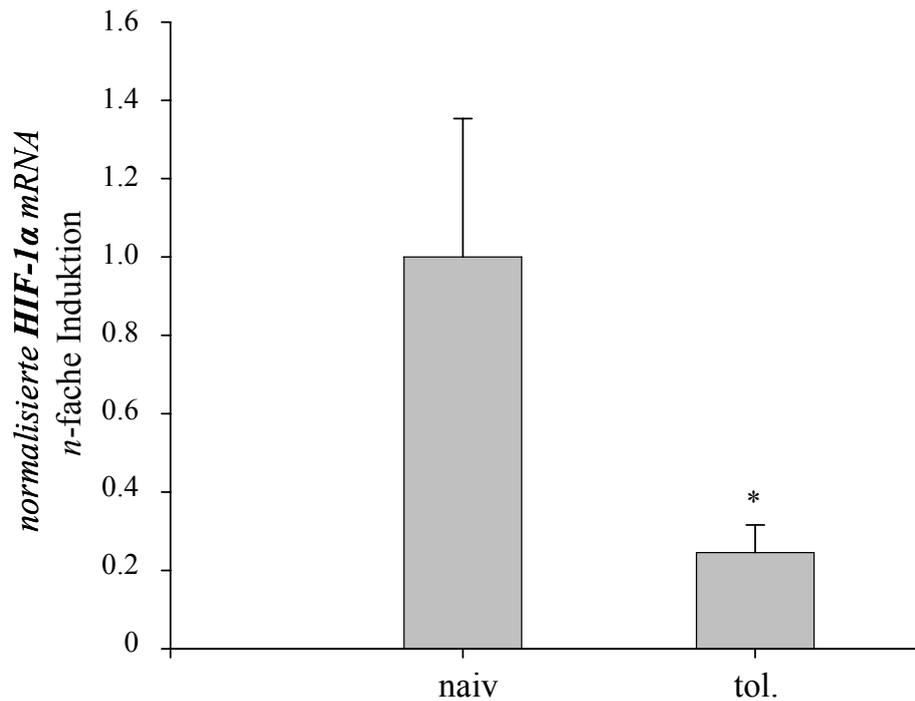


Abb. 4.1.6.: Endotoxintolerante murine Peritonealmakrophagen weisen signifikant verminderte HIF-1 α -mRNA-Mengen auf.

C57/Bl6-Mäuse wurden vier Tage vor der Tötung mit und ohne 240 μ g LPS i.p. behandelt. Die isolierten Peritonealmakrophagen aus LPS-behandelten Tieren weisen unter normoxischen Bedingungen signifikant verminderte Mengen an HIF-1 α -mRNA auf (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Darüber hinaus ist die Expression der HIF-Zielgene ADM bzw. Glukose-transporter (Glut)-1 in den toleranten Zellen signifikant erniedrigt.

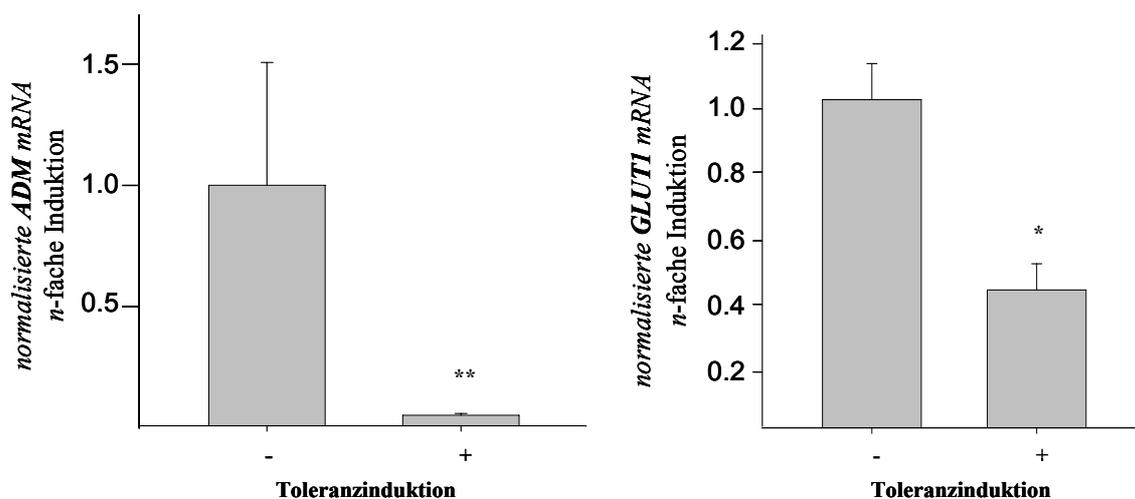


Abb. 4.1.7.: Endotoxintolerante murine Peritonealmakrophagen weisen signifikant verminderte mRNA-Mengen HIF-1 α -induzierter Zielgene auf.

C57/Bl6-Mäuse wurden vier Tage vor der Tötung mit und ohne 240 μ g LPS i.p. behandelt. Unter hypoxischen Bedingungen finden sich in endotoxintoleranten Peritonealmakrophagen signifikant verminderte mRNA -Mengen der HIF-Zielgene ADM und Glut-1 (Mittelwerte \pm SD; n=3).

4.1.3 Die Etablierung der Endotoxintoleranz kann durch den Knock-down des p52-Vorläuferproteins p100 verhindert werden

Bereits in der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindungsaktivität des Proteins p52 in endotoxintoleranten THP-1-Zellen signifikant erhöht war. p52 ist ein Mitglied der NF- κ B-Familie und als solches Bestandteil der sogenannten alternativen NF- κ B-Aktivierung. Diesem Weg war schon früher einige Bedeutung bei der Etablierung von Endotoxintoleranz beigemessen worden (Yoza et al., 2004). Aus diesem Grund lag es nahe, die Bedeutung von p52 auf die Entwicklung einer Endotoxintoleranz in THP-1-Zellen zu untersuchen. Dies geschah im vorliegenden Fall durch den Knock-down des p52-Vorläuferproteins p100 während der Vorinkubation mit geringen LPS-Dosierungen, also während der Phase, in der die Zellen Toleranz entwickeln sollten.

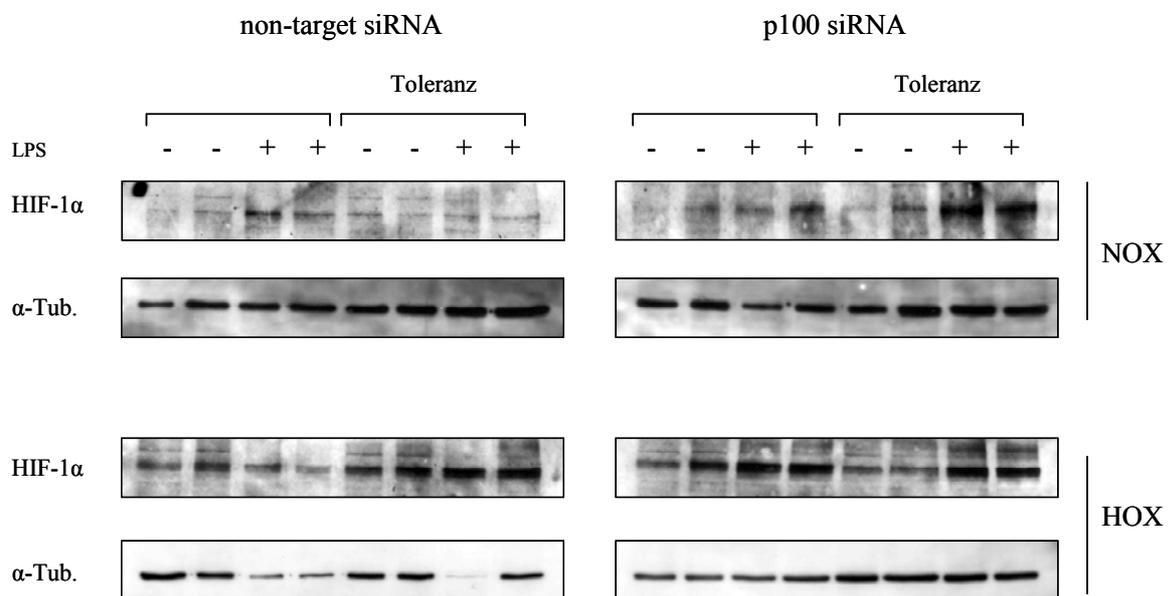


Abb. 4.1.8.: Knock-down von p100 während der Präkonditionierungsphase verhindert die Etablierung von Endotoxintoleranz.

Humane THP-1-Zellen wurden vor dem Beginn des Toleranzprotokolls mit siRNA gegen p100 transfiziert. Als Folge ist die Etablierung einer Endotoxintoleranz in diesen Zellen verhindert. si-p100-transfizierte Zellen weisen keine verminderte hypoxische HIF-1-Akkumulation nach Toleranzinduktion mehr auf. Darüber hinaus findet man eine erneute Induzierbarkeit des HIF-Systems der Zellen bezüglich einer zweiten LPS-Stimulation. Aufgetragen wurden 30 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

Die Transfektion der Zellen sowie deren weitere Inkubation mit siRNA während der Präkonditionierungsphase von 48h beanspruchte diese stark, was sich in der Unregelmäßigkeit der Ladekontrolle α -Tubulin widerspiegelt. Besonders die anschließende hypoxische Inkubation scheint dazu geführt zu haben, dass viele Zellen apoptotisch geworden sind. Daher wurde zur densitometrischen Auswertung nur die normoxische Proteinexpression herangezogen.

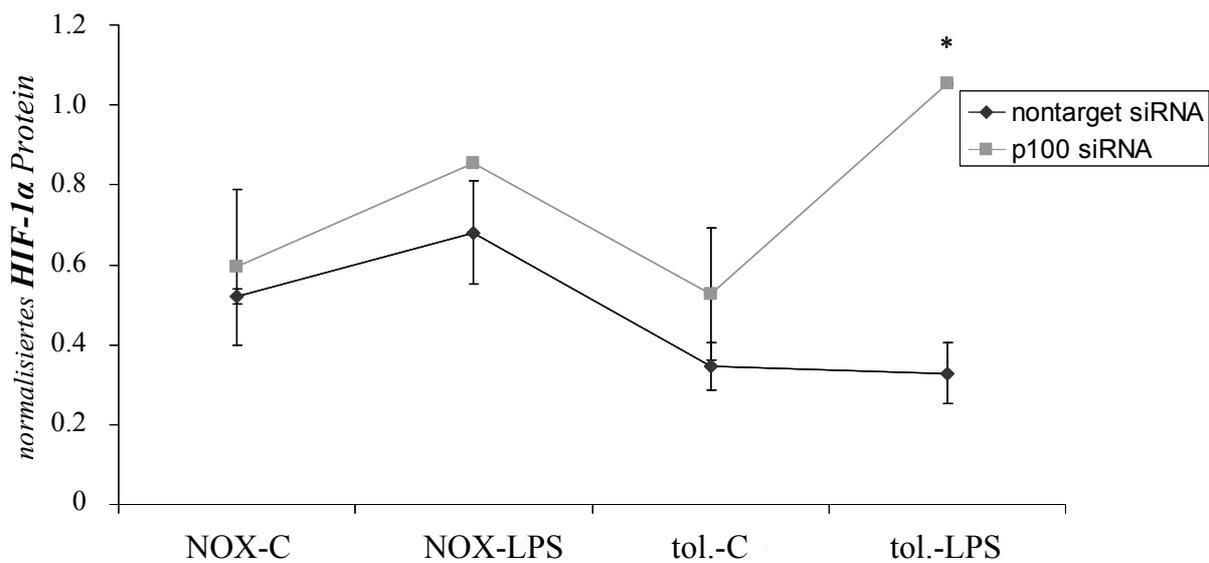


Abb. 4.1.9.: Transfektion von THP-1-Zellen mit siRNA gegen p100 während der Präkonditionierungsphase verhindert die Etablierung von Endotoxintoleranz.

Die densitometrische Auswertung des unter Abb. 4.8. gezeigten Western Blots ergibt eine signifikant wiederhergestellte LPS-Stimulation in THP-1-Zellen, die während der Präkonditionierungsphase mit si-p100-RNA transfiziert worden sind. Auch die Verminderung des HIF-1 α -Proteins in der endotoxintoleranten Kontrolle ist in den si-p100-transfizierten Zellen aufgehoben (Mittelwerte \pm SD; n=2).

Die densitometrische Auswertung von Abbildung 4.8. zeigt deutlich, dass sich mit der Transfektion von siRNA gegen p100 die Etablierung der Endotoxintoleranz wirksam verhindern lässt. Die Zellen zeigen einerseits keine verminderte HIF-1 α -Proteinexpression unter Kontrollbedingungen mehr, andererseits findet sich eine signifikant wiederhergestellte Fähigkeit der HIF-1 α -Proteinakkumulation nach LPS-Stimulation. Gleiches zeigt sich auch in der mRNA-Analyse des betreffenden Versuchs.

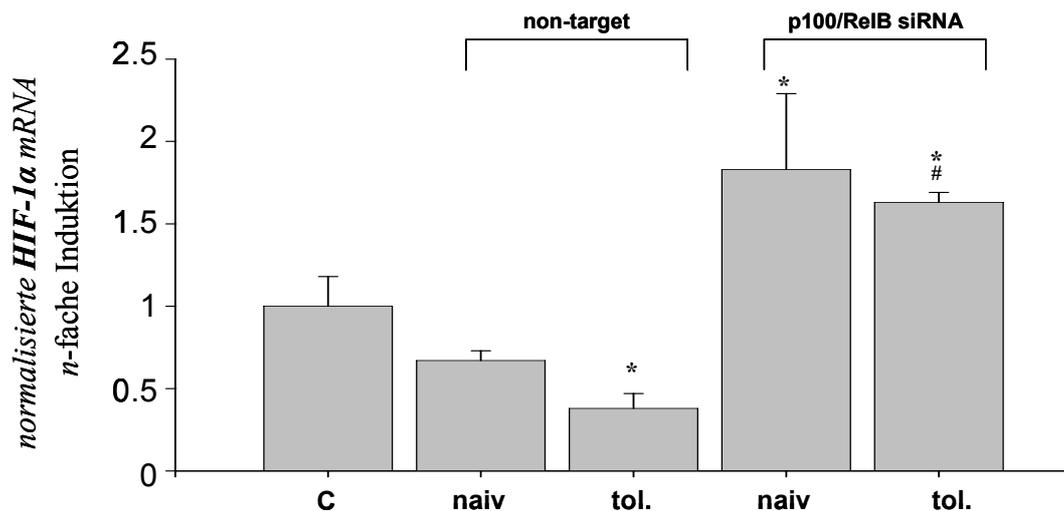


Abb. 4.1.10.: Transfektion von THP-1-Zellen mit siRNA gegen p100 vermindert die signifikante Reduktion der HIF-1 α -mRNA durch die Hemmung der Etablierung von Endotoxintoleranz.

Humane THP-1-Zellen wurden vor dem Beginn des Toleranzprotokolls mit siRNA gegen p100 transfiziert. Als Folge ist die Etablierung einer Endotoxintoleranz in diesen Zellen verhindert. Zellen, die mit non-target siRNA transfiziert wurden, entwickeln bei 48-stündiger Inkubation mit LPS eine Endotoxintoleranz und weisen als Folge daraus eine signifikant verminderte Menge an HIF-1 α -mRNA auf. In den Zellen, die mit siRNA gegen p100 transfiziert wurden, finden sich basal bereits signifikant erhöhte HIF-1 α -mRNA-Spiegel, die sich durch das Toleranzprotokoll nicht vermindern lassen (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Die Transfektion mit non-target siRNA führt zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Reduktion der HIF-1 α -mRNA gegenüber der Mock-Kontrolle (C). Mit non-target siRNA transfizierte THP-1-Zellen zeigen eine signifikante Verminderung bezüglich ihrer HIF-1 α -mRNA Expression nach etablierter Endotoxintoleranz. In den Zellen, die mit siRNA gegen p100 transfiziert wurden, ist nicht nur das Fehlen der verminderten HIF-1 α -mRNA Expression auffällig, sondern vor allem die gegenüber der Mock-Kontrolle auf fast das Doppelte gesteigerte Expression der mRNA von HIF-1 α .

4.1.4 Veränderte Bedingungen zur Etablierung von Endotoxintoleranz

Des Weiteren sollte nun untersucht werden, inwieweit veränderte Bedingungen während der Vorinkubation mit LPS wohl dazu führen könnten, die Etablierung der Endotoxintoleranz und damit die Reduktion von HIF-1 α -Protein und -mRNA zu beeinflussen. Als erstes wurde hier Auswirkung von DMOG (Dimethyloxallylglycin) als PHD-Hemmstoff während der Präkonditionierungs-

phase zugegeben und die Auswirkungen auf die HIF-1 α -Proteinakkumulation untersucht.

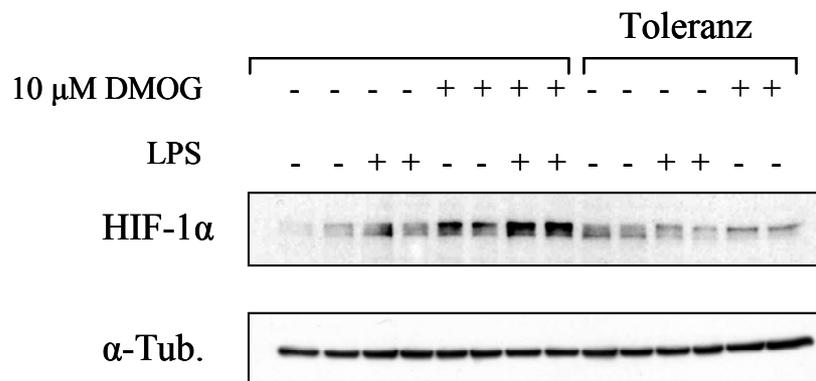


Abb. 4.1.11.: Die Zugabe von DMOG während der Präkonditionierungsphase hat keine Auswirkungen auf die Toleranzentwicklung in THP-1-Zellen.

Humane differenzierte THP-1-Zellen wurden während der Toleranzentwicklung mit 10 μ M DMOG inkubiert. Das HIF-1 α -Protein wird in naiven THP-1-Zellen durch DMOG stabilisiert (normoxische Inkubation), auch die Induktion des HIF-Proteins durch LPS auf kann nochmals gesteigert werden. Die Inkubation mit DMOG führt jedoch nicht dazu, dass die Toleranzentwicklung ausbleibt. Aufgetragen wurden 50 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

Eine 48stündige Zugabe von 10 μ M DMOG stabilisiert das HIF-1 α -Protein in naiven THP-1-Zellen und führt darüber hinaus zu einer Potenzierung der LPS-Stimulation in diesen Zellen. Die Anwesenheit des PHD-Hemmstoffs während der Präkonditionierungsphase kann die Ausbildung der Endotoxintoleranz jedoch nicht verhindern.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, inwieweit eine LPS-Vorinkubation unter bereits von Beginn an hypoxischen Bedingungen die Toleranzentwicklung und deren Auswirkungen auf HIF-1 α verändern könnte. Hierzu musste allerdings die Inkubationszeit während der Präkonditionierungsphase auf 24h herabgesetzt werden, um eine Apoptose der Zellen zu verhindern.

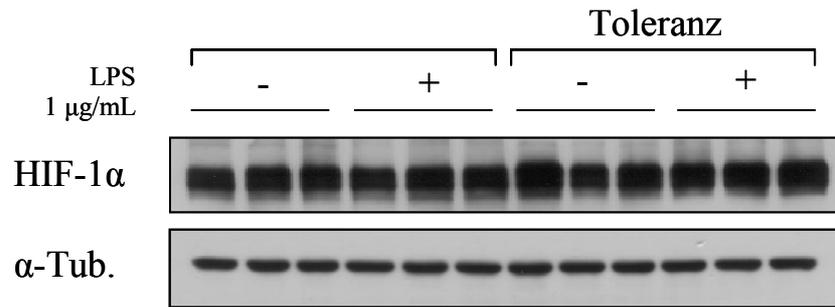


Abb. 4.1.12.: Präkonditionierung unter Hypoxie bedingt keine verminderte HIF-1 α -Proteinakkumulation.

Humane differenzierte THP-1-Zellen wurden zur Toleranzentwicklung für 24h mit 0.05 ng/mL LPS unter Hypoxie (3% O₂, 24h) inkubiert. Dies kann im anschließenden Experiment unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂, 6h) nicht dazu führen, dass eine Akkumulation des HIF-1 α -Proteins verhindert wird. Aufgetragen wurden 75 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

Nach 24stündiger Vorinkubation bei 3% O₂ mit 0.05 ng/mL LPS und anschließendem Akutversuch (6h ohne bzw. mit 1 μ g/mL LPS bei ebenfalls 3% O₂) lassen sich mittels Western Blot konstant hohe HIF-1 α -Proteinmengen detektieren. Es ist weder eine eindeutige Stimulation durch große LPS-Mengen zu erkennen noch eine Verminderung des HIF-1 α -Proteins durch vorhergehende Präkonditionierung. Betrachtet man die mRNA-Veränderungen für HIF-1 α unter diesen Versuchsbedingungen, stellt man fest, dass die hypoxische Vorinkubation nicht zu gegenüber der naiven Kontrolle verminderten HIF-1 α -mRNA-Mengen führt. Die LPS-Induktion im Akutversuch bleibt erhalten, scheint jedoch etwas vermindert zu sein. Dieser Effekt ist allerdings keineswegs signifikant. Betrachtet man die Veränderungen der mRNA des HIF-Zielgens ADM (Abb. 4.14.), so lässt sich im anschließenden normoxischen Versuch ein ähnliches Bild erhalten wie beim ursprünglichen Toleranzprotokoll. Man findet eine leicht verminderte ADM-mRNA Induktion in vorbehandelten Zellen sowie eine abgeschwächte Induzierbarkeit als Folge eines starken LPS-Stimulus, dies kehrt sich unter hypoxischen Bedingungen allerdings ins Gegenteil; hier ist die ADM-Expression in präkonditionierten THP-1-Zellen gegenüber den entsprechend behandelten naiven Zellen gesteigert.

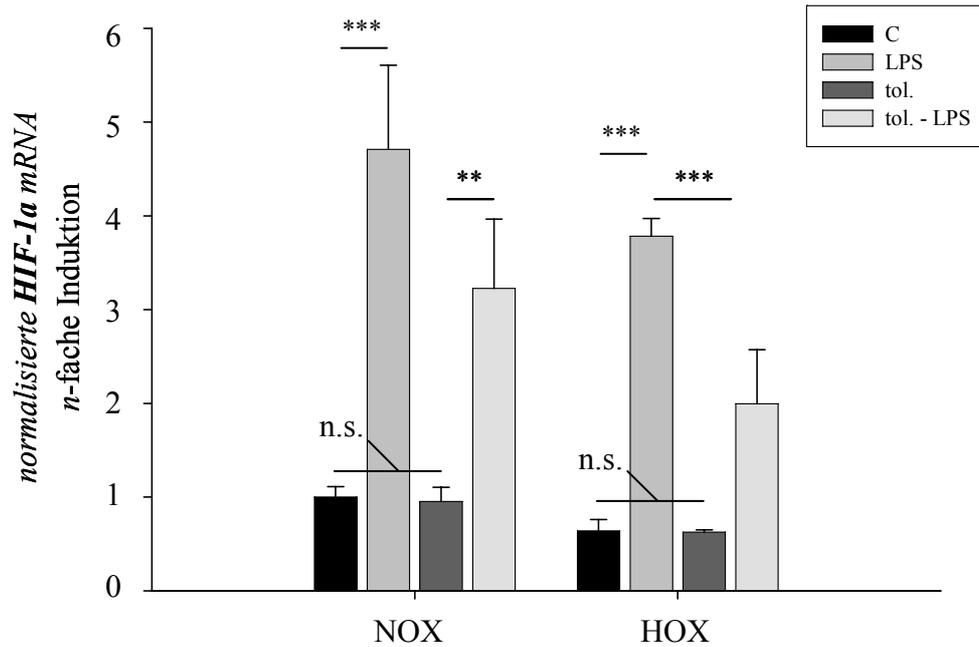


Abb. 4.1.13.: Präkonditionierung unter Hypoxie führt nicht zu verminderten HIF-1 α -mRNA-Mengen.

Humane differenzierte THP-1-Zellen wurden zur Toleranzentwicklung für 24h mit 0.05 ng/mL LPS unter Hypoxie (3% O₂, 24h) inkubiert. Mit LPS präkonditionierte wie naive THP-1-Zellen weisen unter Kontrollbedingungen vergleichbare HIF-1 α -mRNA-Mengen auf. Die LPS-Induktion im Akutversuch bleibt erhalten, wenngleich sie etwas vermindert erscheint. (Mittelwerte \pm SD; n=3).

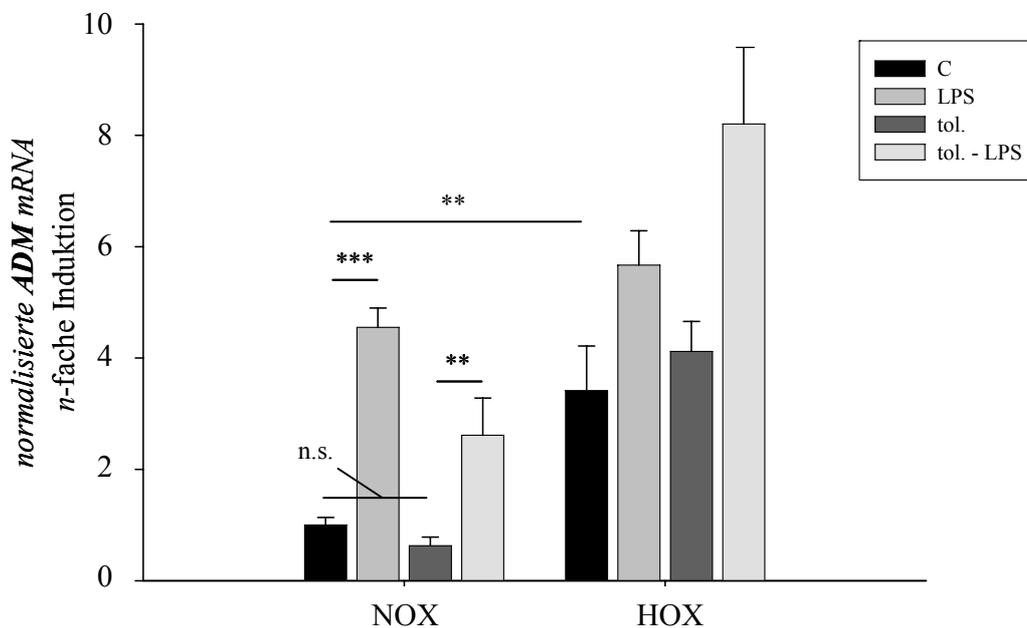


Abb. 4.1.14.: Präkonditionierung unter Hypoxie führt zu uneindeutigen Veränderungen bezüglich der mRNA des HIF-1 α -Zielgens ADM.

Humane differenzierte THP-1-Zellen wurden zur Toleranzentwicklung für 24h mit 0.05 ng/mL LPS unter Hypoxie (3% O₂, 24h) inkubiert. Die ADM mRNA im normoxischen Akutversuch zeigt ein ähnliches Verhalten wie im ursprünglichen Toleranzprotokoll, es ist allerdings weniger stark ausgeprägt: man findet verminderte ADM-Kontrolllevel sowie eine reduzierte LPS-Induktion. Unter hypoxischer Akutinkubation setzt jedoch der gegenteilige Effekt ein, sowohl die Kontrollexpression als auch die nach LPS-Stimulation ist in den präkonditionierten Zellen gesteigert (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Um zweifelsfrei festzustellen, ob die Etablierung von Endotoxintoleranz unter diesen Versuchsbedingungen nicht statt findet oder nur keine Auswirkungen mehr auf das HIF-System erkennbar sind, wurde die mRNA-Expression des inflammatorischen Zytokins IL-1 β untersucht.

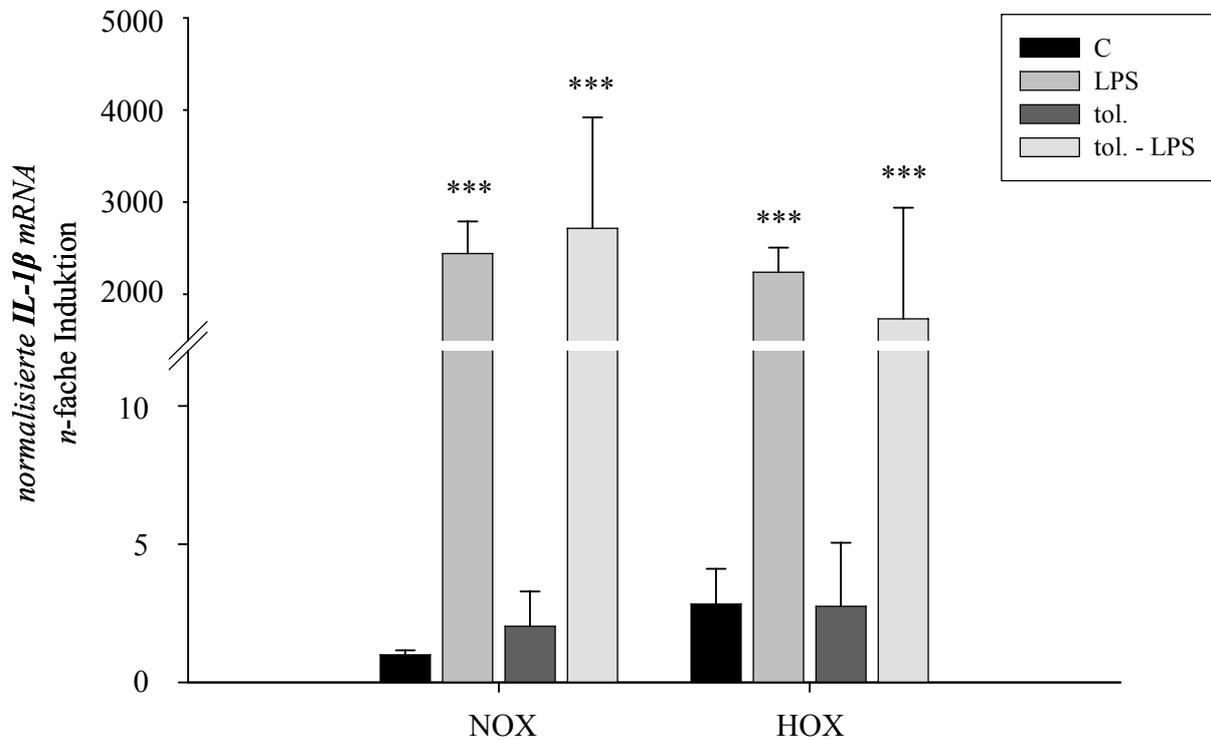


Abb. 4.1.15.: Präkonditionierung unter Hypoxie führt nicht zu einer Verminderung der IL-1 β mRNA-Expression.

Humane differenzierte THP-1-Zellen wurden zur Toleranzentwicklung für 24h mit 0.05 ng/mL LPS unter Hypoxie (3% O₂, 24h) inkubiert. Die IL-1 β mRNA zeigt im Akutversuch keinerlei Reduktion nach LPS-Vorbehandlung (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass eine Vorinkubation mit geringen LPS-Dosierungen unter hypoxischen Bedingungen nicht zu einer Etablierung von Endotoxintoleranz führen kann.

4.1.5 Auswirkungen von Endotoxintoleranz auf das Verhalten von THP-1-Zellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die Etablierung von Endotoxintoleranz THP-1-Zellen, die als Monozyten einen wichtigen Bestandteil der humanen Immunabwehr darstellen, in ihrem Verhalten verändert. Als erste wichtige Größe wurde hierzu die Vitalität unter Hypoxie mittels eines MTT-Tests bestimmt. Analog zu der verminderten HIF-1 α -Expression findet sich in präkonditionierten Zellen eine signifikant verminderte Vitalität unter hypoxischen Bedingungen.

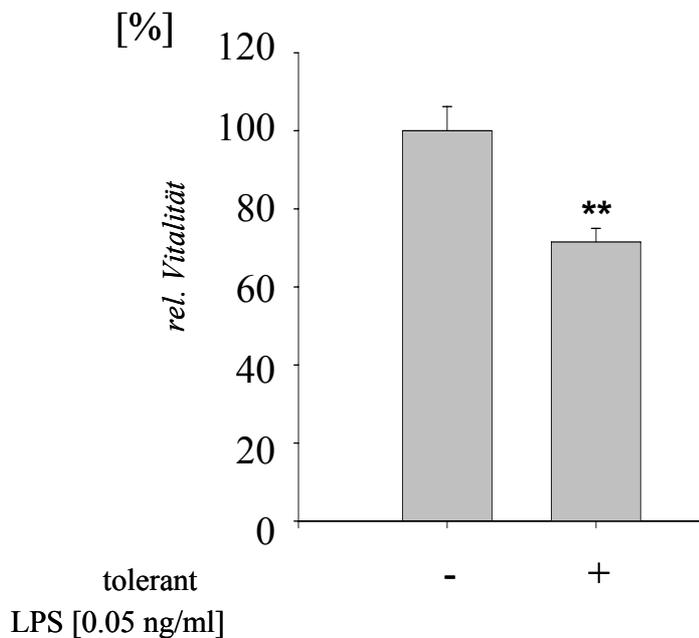


Abb. 4.1.16.: Endotoxintolerante THP-1-Zellen weisen eine verminderte Vitalität unter hypoxischen Bedingungen auf.

Inkubiert man naive und endotoxintolerante humane THP-1-Zellen für 24h unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂), so weisen die endotoxintoleranten Zellen eine um ca. 30% verminderte Vitalität auf (Mittelwerte \pm SD; n=10).

Als weitere wichtige Größe für das Verhalten von Monozyten und Makrophagen wurde das Phagozytoseverhalten der Zellen herangezogen. Dieses ist in endotoxintoleranten THP-1-Zellen gegenüber naiven Zellen nicht verändert und kann in beiden Fällen durch Inkubation mit PMA, LPS oder E.Coli in vergleichbarem Maße induziert werden.

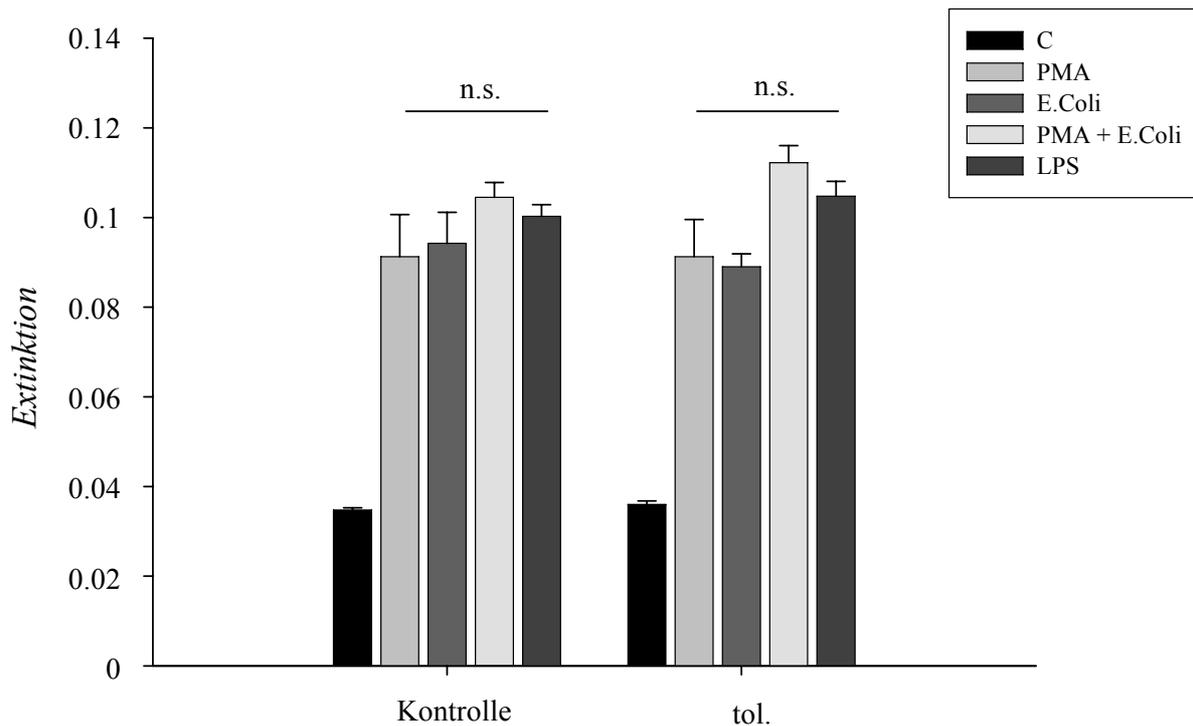


Abb. 4.1.17.: Endotoxintolerante Zellen weisen gegenüber naiven THP-1-Zellen kein verändertes Phagozytoseverhalten auf.

Inkubiert man naive und endotoxintolerante humane THP-1-Zellen für 2h mit unterschiedlichen Stimuli, lassen sich keine Unterschiede im Phagozytoseverhalten der Zellen feststellen. Beide Kontrollen befinden sich auf ähnlichem Niveau, die jeweiligen Induktionen durch PMA, E. Coli und LPS sind ebenfalls vergleichbar (Mittelwerte \pm SD; n=5).

Das dritte untersuchte Verhaltensmerkmal endotoxintoleranter Monozyten/Makrophagen betrifft deren Extravasation in extrazelluläre Matrix. Hierzu wurden undifferenzierte THP-1-Zellen für 24h mit 0.05 ng/mL LPS inkubiert und anschließend ihr Verhalten in einem anderthalbstündigen MatriGel-Invasionsassay untersucht. Hierbei ließen sich deutliche Unterschiede im Einwanderungsverhalten naiver und LPS-vorbehandelter Monozyten feststellen: Während die naiven Zellen bereits unter Kontrollbedingungen zu einem guten Teil in die extrazelluläre Matrix einwandern, beträgt die Anzahl eingewanderter vorbehandelter THP-1-Zellen nur etwa 80% des Kontrollwerts. Darüber hinaus ist die Einwanderung naiver THP-1-Zellen mittels LPS noch deutlich stimulierbar, diese Induktion fehlt bei den toleranten Zellen jedoch völlig.

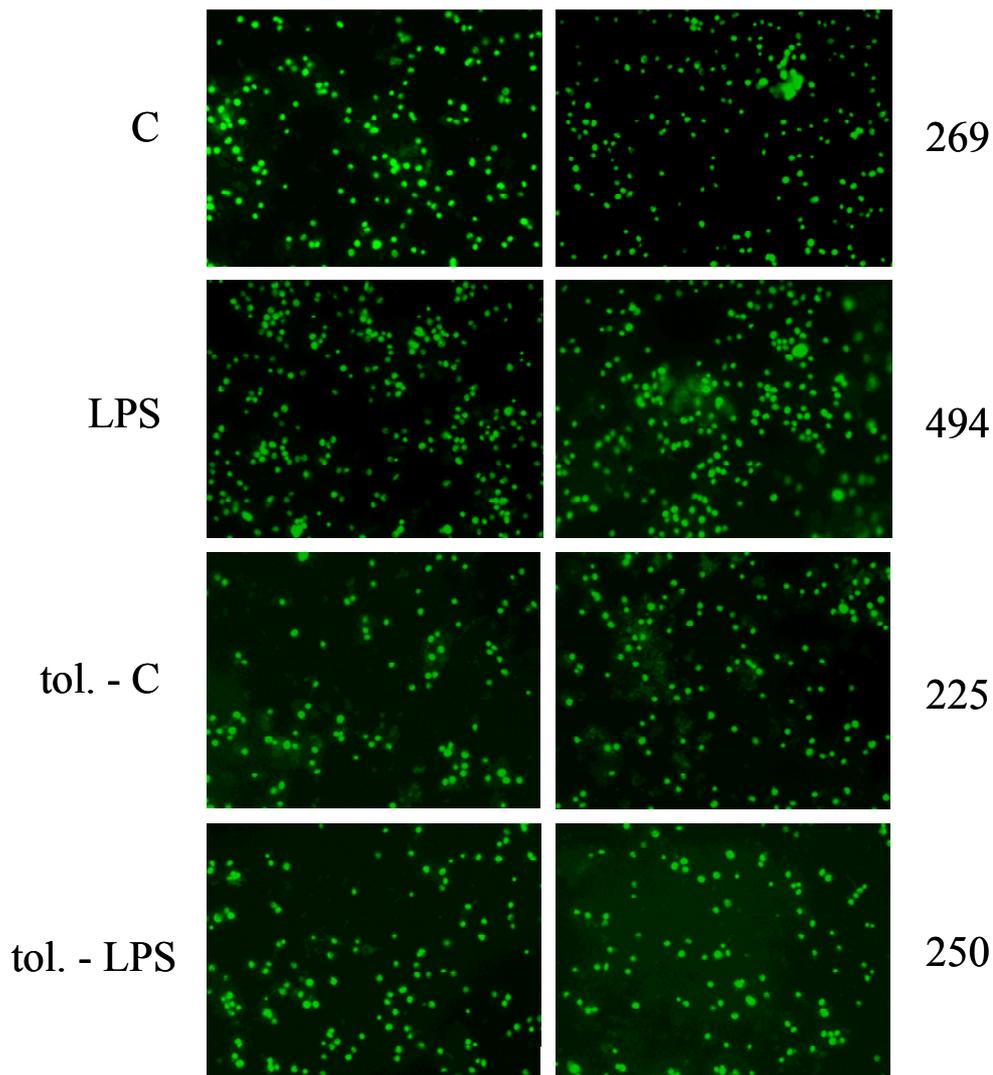


Abb. 4.1.18.: Die Einwanderung LPS-vorbehandelter Monozyten in extrazelluläre Matrix ist gegenüber naiven THP-1-Zellen deutlich vermindert.

Undifferenzierte THP-1-Zellen wurden für 24h mit und ohne 0.05 ng/mL LPS inkubiert und anschließend zum Teil mit 1 µg/mL LPS stimuliert. Naive THP-1-Zellen zeigen bereits unter Kontrollbedingungen eine gegenüber den vorbehandelten Zellen gesteigerte Tendenz in extrazelluläre Matrix einzuwandern. Diese Tendenz lässt sich mittels LPS etwa verdoppeln, bei den LPS-präkonditionierten Zellen fehlt diese Induktion völlig. Gezeigt sind jeweils zwei repräsentative Bilder aus acht Aufnahmen pro Ansatz, die Zahlen am Rand beschreiben die in beiden Bildern gleicher Kondition gezählten Zellen pro Gesichtsfeld.

Zur Verdeutlichung des Unterschieds im Einwanderungsverhalten unter LPS-Stimulation werden in der folgenden Abbildung nochmals zwei Bilder in der Vergrößerung gezeigt:

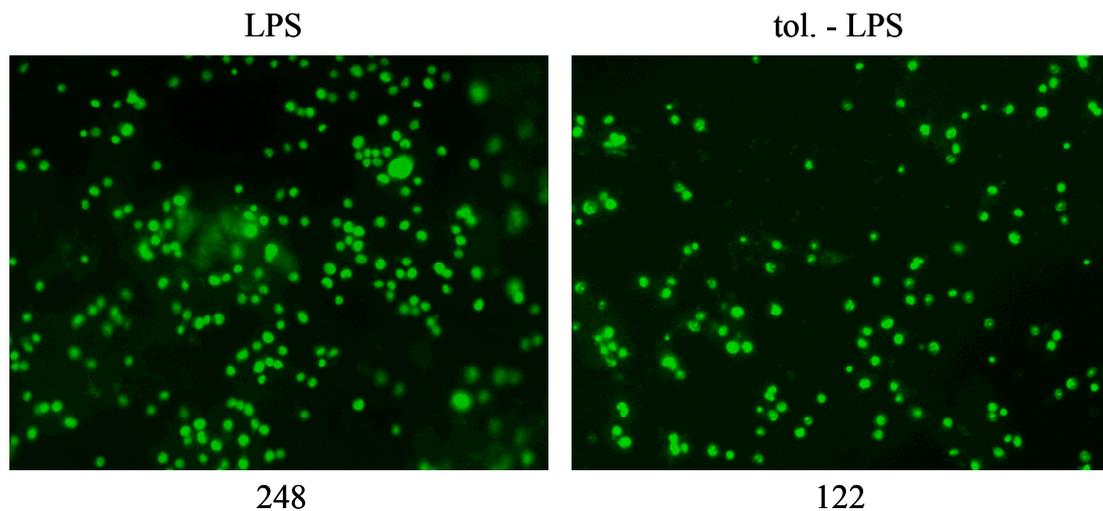


Abb. 4.1.19.: Unterschiedliches Einwanderungsverhalten naiver und LPS-vorbehandelter undifferenzierter THP-1-Zellen in extrazelluläre Matrix in der Vergrößerung.

Undifferenzierte THP-1-Zellen wurden für 24h mit und ohne 0.05 ng/mL LPS inkubiert und anschließend mit 1 µg/mL LPS stimuliert. Eine Steigerung der Einwanderung extrazelluläre Matrix durch LPS kann bei präkonditionierten THP-1-Zellen nicht festgestellt werden. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild aus insgesamt acht Aufnahmen pro Ansatz, die Zahlen unter den Bildern beschreiben die in der jeweiligen Abbildung gezählten Zellen pro Gesichtsfeld.

Darüber hinaus wurden die Zellen pro Gesichtsfeld in insgesamt vier Bildern pro Kondition ausgezählt und mit Standardabweichungen in ein Diagramm eingefügt.

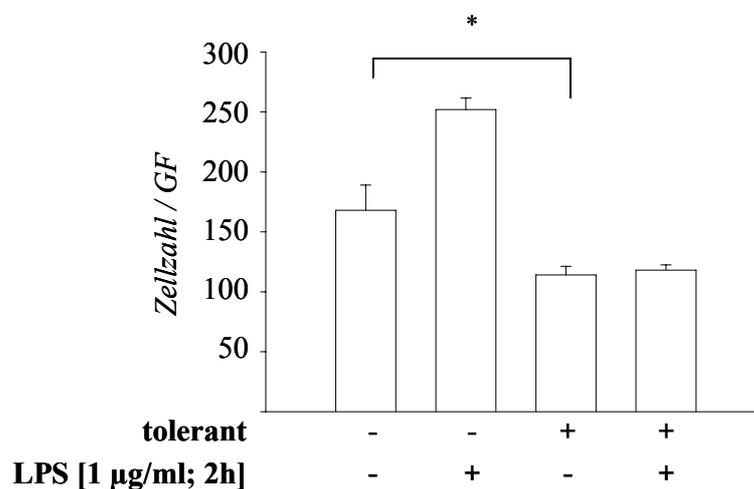


Abb. 4.1.20.: Vermindertes Einwanderungsverhalten LPS-präkonditionierter THP-1-Zellen in extrazelluläre Matrix.

Undifferenzierte THP-1-Zellen wurden für 24h mit und ohne 0.05 ng/mL LPS inkubiert und anschließend zum Teil mit 1 µg/mL LPS stimuliert. Die Tendenz zur Einwanderung in extrazelluläre Matrix ist in LPS-vorbehandelten THP-1-Zellen signifikant vermindert. Die Stimulierbarkeit der Einwanderung mittels LPS fehlt in diesen Zellen ganz. (Mittelwerte ± SD; n=4).

Die statistische Auswertung ergab für LPS-vorbehandelte THP-1-Zellen eine signifikant verminderte Tendenz in extrazelluläre Matrix einzuwandern.

4.2 Auswirkungen akuter, schwerer Hypoxie auf die Interaktion zwischen Monozyten und Endothel

4.2.1 THP-1-Zellen exprimieren interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1

Als Vorversuche zur Untersuchung der Auswirkungen von Hypoxie auf die Interaktion zwischen Monozyten und Endothel wurde zunächst die Expression von Adhäsionsproteinen auf den Monozyten analysiert. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf das Interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM)-1 gelegt. Dieses lässt sich in undifferenzierten THP-1-Zellen nach LPS-Stimulation unabhängig von der umgebenden Sauerstoffkonzentration erstmalig nach 3 Stunden nachweisen.

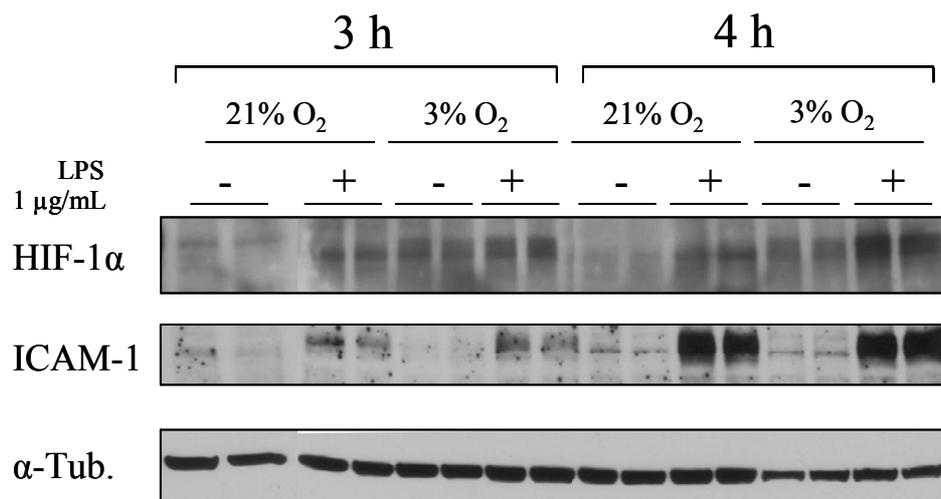


Abb. 4.2.1.: Undifferenzierte THP-1-Zellen exprimieren LPS-abhängig ICAM-1.

Undifferenzierte THP-1-Zellen wurden für 3 und 4 Stunden mit und ohne 1 µg/mL LPS unter 21% bzw. 3% O₂ inkubiert. Nach dreistündiger Inkubation mit LPS lässt sich erstmalig ICAM-1-Protein auf THP-1-Zellen nachweisen. Die LPS-Induktion ist unabhängig von der umgebenden Sauerstoffkonzentration und ist nach 4 Stunden noch ausgeprägter feststellbar. Aufgetragen wurden 75 µg Protein (Gesamtzelllysat).

Da deutlich erkennbar ist, dass die LPS-vermittelte ICAM-1-Expression nach vier Stunden stärker induziert ist als nach drei Stunden, wurden weitere Experimente zur Expressionsdauer des Adhäsionsproteins durchgeführt. Diese ergaben, dass THP-1-Zellen nach einmaligem LPS-Stimulus selbst 48 Stunden später noch über eine immens gesteigerte ICAM-1-Proteinexpression verfügen können:

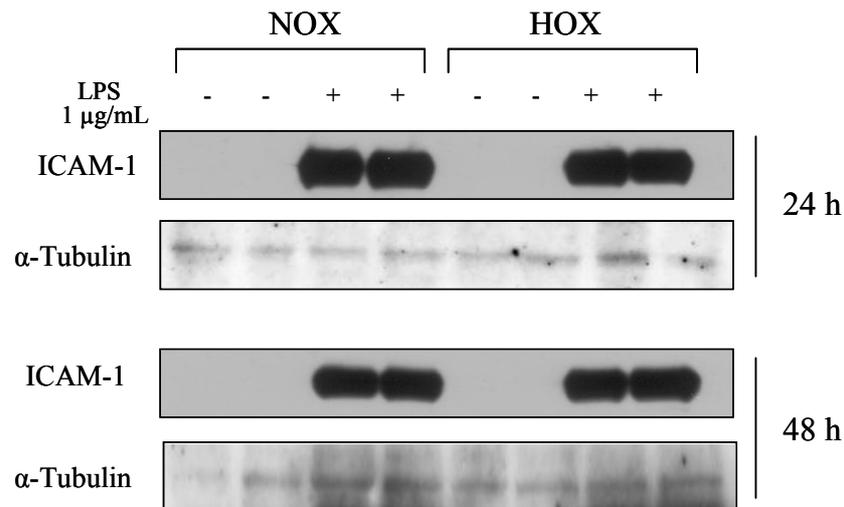


Abb. 4.2.2.: LPS-vermittelte ICAM-1-Induktion in undifferenzierten THP-1-Zellen nach 24 und 48h.

Undifferenzierte THP-1-Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit und ohne 1 µg/mL LPS unter 21% bzw. 3% O₂ inkubiert. Nach 24stündiger Inkubation mit LPS lässt sich die maximale Akkumulation des ICAM-1 Proteins in THP-1-Zellen feststellen. Die LPS-Induktion ist unabhängig von der umgebenden Sauerstoffkonzentration und auch nach 48 Stunden noch deutlich ausgeprägt. Aufgetragen wurden 50 µg Protein (Gesamtzelllysate).

Darüber hinaus konnte die LPS-vermittelte Expressionssteigerung von ICAM-1 in THP-1-Zellen auch mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Hierzu wurden differenzierte Zellen verwendet, da diese beim Differenzierungsvorgang an die für die Durchführung des Immunfluoreszenzprotokolls benötigten Glasplättchen adhären.

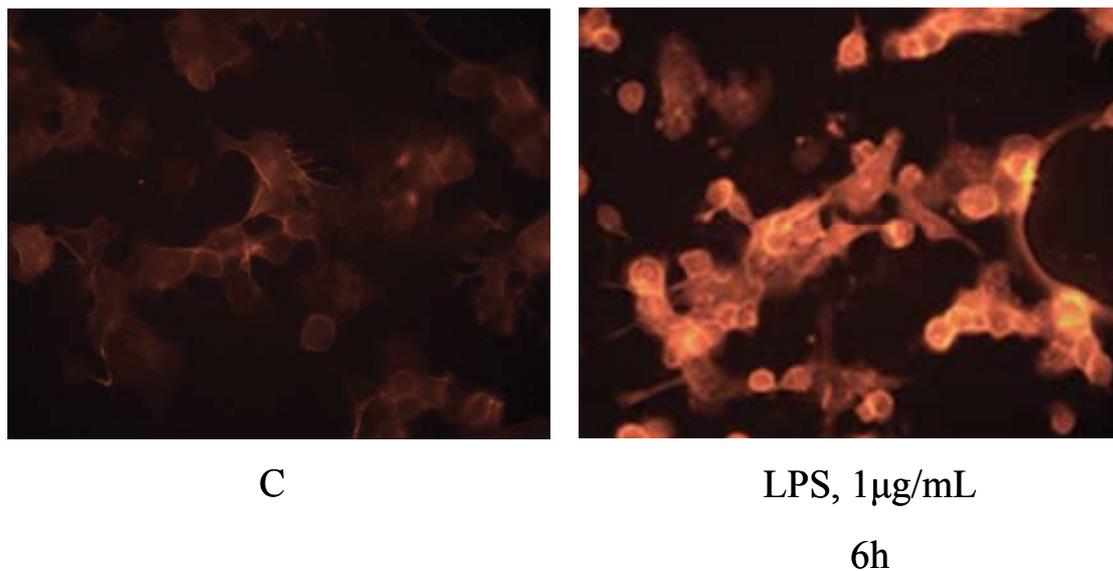


Abb. 4.2.3.: LPS-vermittelte ICAM-1-Induktion in differenzierten THP-1-Zellen nach 6h.

Differenzierte THP-1-Zellen wurden für 6h mit und ohne 1 µg/mL LPS inkubiert. Während mittels eines Erstantikörpers gegen humanes ICAM-1 und Alexa Fluor 546 als fluoreszierendem Zweitantikörper in den Kontrollzellen fast keine Fluoreszenz detektierbar ist, weisen die LPS-stimulierten THP-1-Zellen eine deutlich gesteigerte ICAM-1-Expression auf (40x Vergrößerung; gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt aus n=3.).

Während die unbehandelte Kontrolle kaum ICAM-1-bedingte Fluoreszenz aufweist, findet man eine deutlich ausgeprägtere Färbung vor allem der Zelloberfläche der LPS-behandelten Zellen, was auf eine lokalisierte Induktion des ICAM-1 Proteins schließen lässt. Analysiert man in undifferenzierten THP-1-Zellen die mRNA bezüglich Veränderungen in der ICAM-1-Expression nach LPS-Stimulation, findet man hier eine mehr als zweihundertfache Expressionssteigerung der ICAM-1 mRNA nach sechsständiger Inkubation mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS.

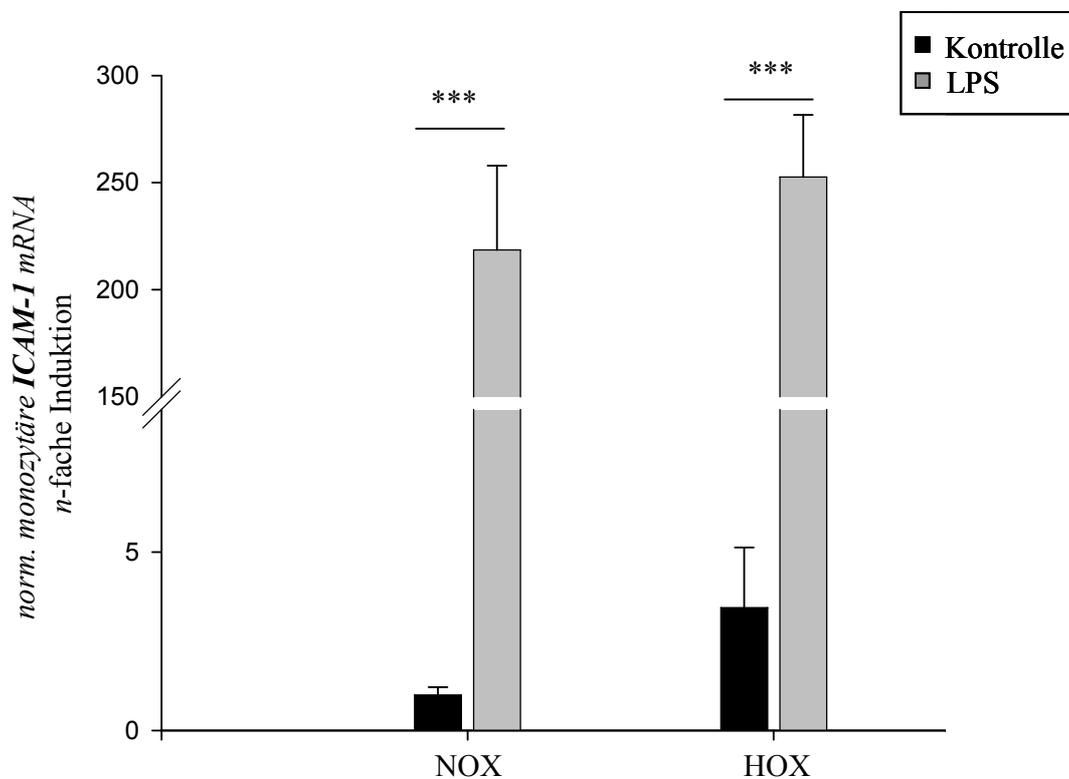


Abb. 4.2.4.: ICAM-1 mRNA-Induktion nach sechsständiger Stimulation mit LPS.

Undifferenzierte THP-1-Zellen wurden für 6h mit und ohne 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS inkubiert. Stimulation mit LPS führt in diesen Zellen zu einer etwa 200fachen Steigerung der ICAM-1 mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Auffällig ist in diesem Zusammenhang auch die hypoxische Induktion der ICAM-1 mRNA bei sechsständiger Inkubation bei einer Sauerstoffkonzentration von 3%. Der Effekt ist an dieser Stelle allerdings nicht signifikant. Da die LPS-induzierte Expressionssteigerung bezüglich der mRNA von HIF-1 α bislang nur an differenzierten THP-1-Zellen untersucht worden ist, wurde zum Vergleich auch die mRNA Expression in undifferenzierten Zellen untersucht.

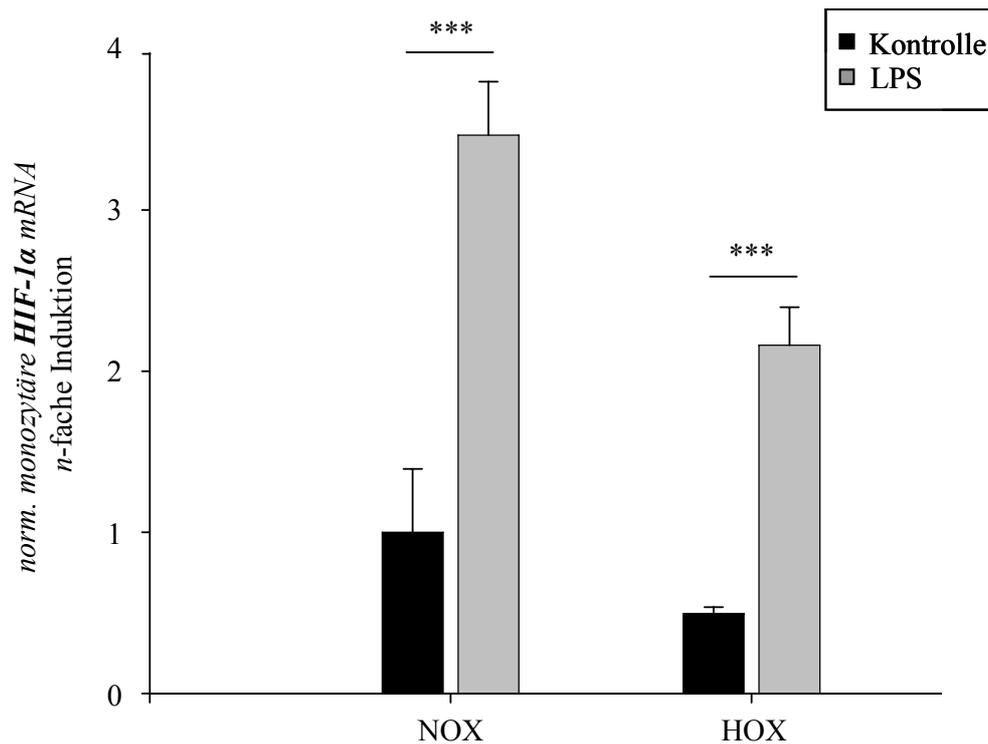


Abb. 4.2.5.: Induktion der HIF-1 α mRNA in undifferenzierten THP-1-Zellen durch LPS-Inkubation.

Undifferenzierte THP-1-Zellen wurden für 6h mit und ohne 1 μ g/mL LPS inkubiert. Stimulation mit LPS führt in diesen Zellen zu einer etwa 3,5 fachen Steigerung der HIF-1 α mRNA Expression. Wie für HIF-1 α mRNA üblich, liegen die hypoxischen Werte (3% O₂) etwas unter den normoxischen Werten (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Eine sechsstündige Stimulierung mit LPS führt in undifferenzierten THP-1-Zellen zu einer etwa 3,5 fachen Induktion der HIF-1 α mRNA Expression. Dies entspricht fast genau der Induktion, die man mittels LPS-Inkubation unter gleichen Versuchsbedingungen auch in differenzierten Zellen erhält (vergl. Abb. 4.1.3., naive Zellen). Die Werte, die unter hypoxischer Inkubation (3% O₂) ermittelt werden konnten, liegen etwas unter denen ihrer normoxischen Analoga. Dies ist ein für die mRNA von HIF-1 α typischer Befund und tritt sowohl in differenzierten THP-1-Zellen wie auch in anderen Zelltypen auf. Ein Beispiel hierfür findet sich wiederum in Abb. 4.1.3.

Um zu ermitteln, ob die ICAM-1 mRNA-Expression in THP-1-Zellen ebenfalls unabhängig vom Differenzierungsstatus ist, wurden diesbezüglich nun auch die differenzierten Zellen untersucht. Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse für beide Differenzierungsstadien in einem Diagramm dargestellt.

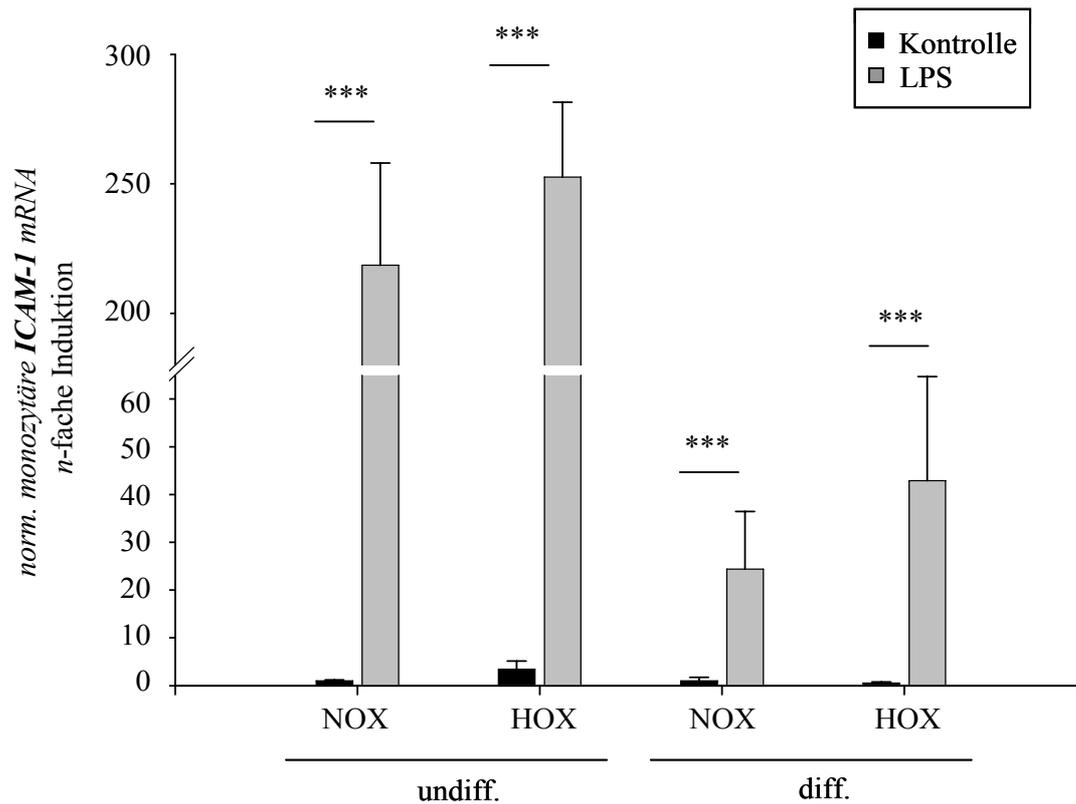


Abb. 4.2.6.: Veränderungen in der ICAM-1 mRNA-Expression nach Stimulation durch LPS bzw. Hypoxie.

Die basale ICAM-1 mRNA-Expression ist in undifferenzierten und differenzierten THP-1-Zellen vergleichbar niedrig. LPS (1 µg/mL, 6h) bewirkt bei undifferenzierten Zellen eine Expressionssteigerung um den Faktor 200, in differenzierten THP-1-Zellen liegt diese deutlich niedriger und beträgt nur etwas mehr als 10% der in undifferenzierten Zellen erreichten Induktion. In differenzierten Zellen sind normoxische und hypoxische Kontrollwerte vergleichbar, während sich in undifferenzierten THP-1-Zellen eine leichte ICAM-1 mRNA-Induktion unter Hypoxie (3% O₂) findet (Mittelwerte ± SD; n=3).

Betrachtet man die Basalexpression der ICAM-1 mRNA in differenzierten wie undifferenzierten THP-1-Zellen, so lassen sich keine Unterschiede feststellen. Charakterisiert man jedoch die Auswirkungen eines starken LPS-Stimulus auf ebendiese mRNA Expression, fällt sofort auf, dass die LPS-vermittelte Induktion der ICAM-1 mRNA in differenzierten Zellen deutlich geringer ausgeprägt ist als in undifferenzierten Zellen. Im makrophagenartigen Phänotyp findet sich nach sechsstündiger Inkubation mit LPS (1 µg/mL) eine etwa 25-30fache Induktion der ICAM-1 mRNA. Dies beträgt nur etwas mehr als 10% der in den Monozyten erreichten Steigerung bezüglich der mRNA dieses Adhäsionsmoleküls. Auch lassen sich in den Makrophagen keine Unterschiede zwischen der normoxischen und hypoxischen Kontrolle erkennen.

Um die Expression eines weiteren wichtigen Adhäsionsmoleküls zu charakterisieren, wurden die LPS-induzierten Veränderungen der mRNA des β_2 -Integrins CD18 untersucht.

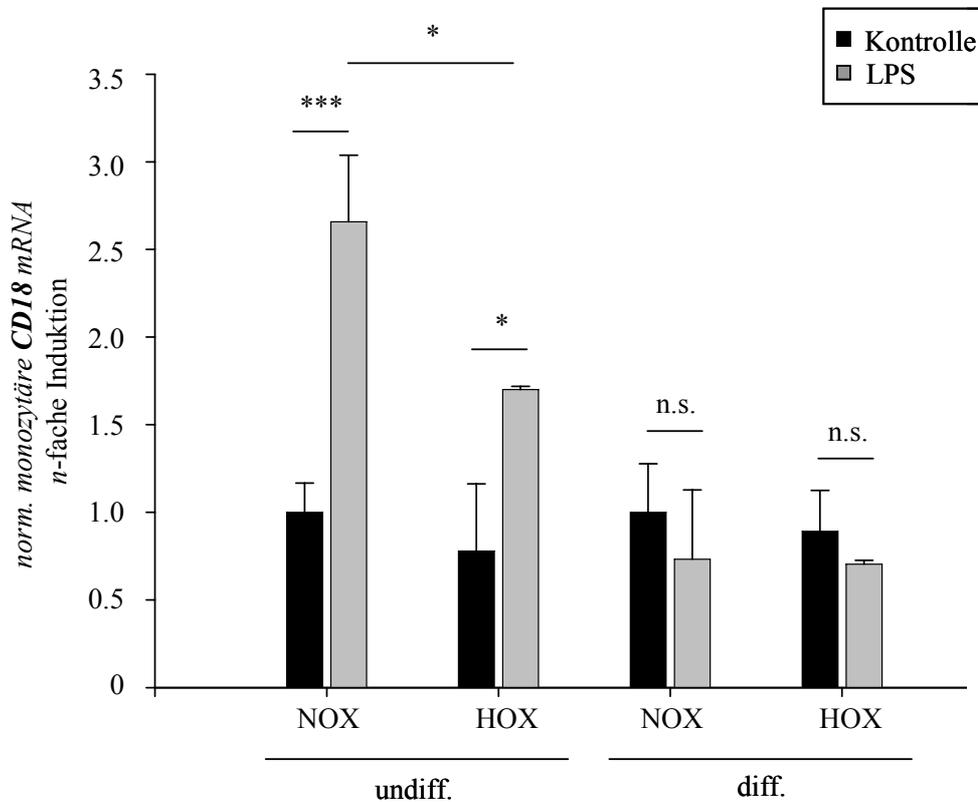


Abb. 4.2.7.: Veränderungen der CD18 mRNA-Expression nach Stimulation mittels LPS und Hypoxie in undifferenzierten und differenzierten THP-1-Zellen.

In undifferenzierten THP-1-Zellen resultiert eine sechsstündige Inkubation mit LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in einer etwa 2.5fachen Steigerung der CD18 mRNA gegenüber der normoxischen Kontrolle. Diese Induktion nimmt unter hypoxischer Inkubation deutlich ab. Differenzierte THP-1 weisen gegenüber ihren undifferenzierten Vorläufern vergleichbare Basalwerte auf, zeigen jedoch keinerlei LPS-vermittelte Induzierbarkeit bezüglich der CD18 mRNA mehr (Mittelwerte \pm SD; n=3).

In undifferenzierten THP-1-Zellen lässt sich unter Normoxie mittels LPS-Stimulation (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6h) eine signifikante Induktion der CD18 mRNA Expression erzielen. Diese findet sich in abgeschwächter Form auch unter hypoxischen Bedingungen, sie ist jedoch gegenüber der LPS-Induktion unter normoxischen Werten signifikant vermindert. Differenzierte THP-1-Zellen weisen ähnliche Basalwerte auf wie ihre undifferenzierten Vorläufer, hier fehlt jedoch die Expressionsteigerung der CD18 mRNA nach Behandlung mit LPS völlig. In einem weiteren Vorversuch wurde die Expression der ICAM-1 mRNA bei kurzen Inkubationszeiten mit LPS bzw. unter Hypoxie untersucht.

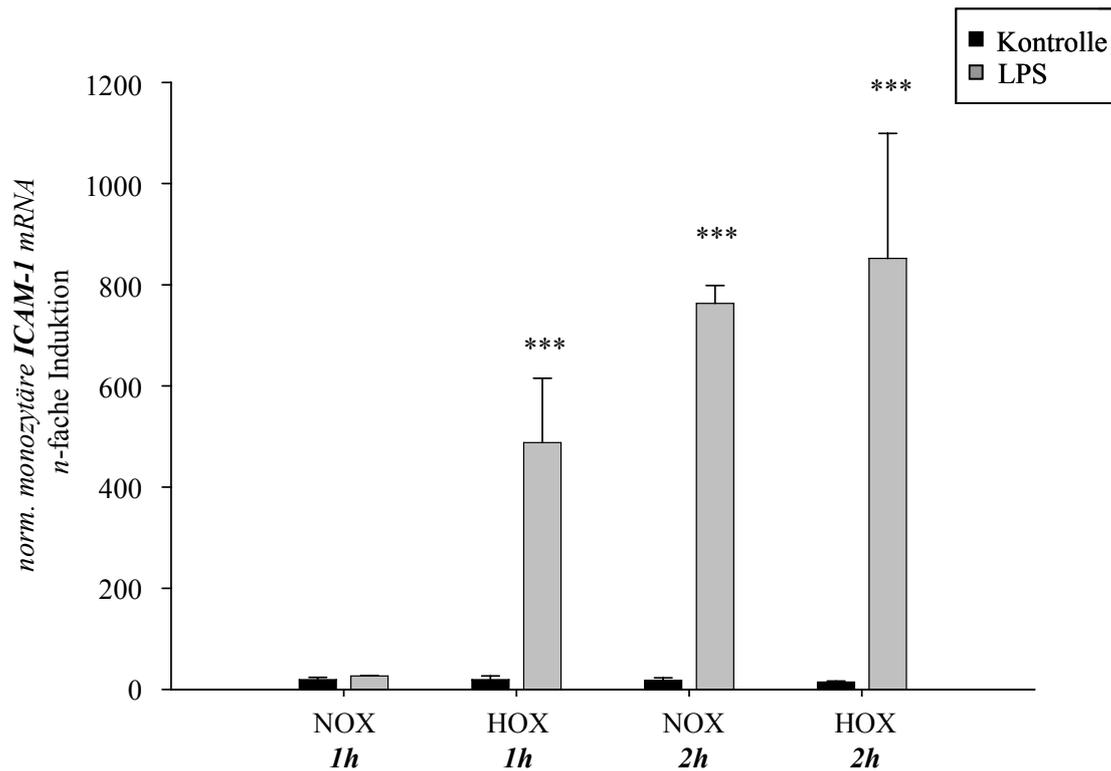


Abb. 4.2.8.: Induktion der ICAM-1 mRNA in THP-1-Zellen bei kurzen Inkubationsdauern mit LPS bzw. unter Hypoxie.

Undifferenzierte THP-1-Zellen wurden für eine bzw. zwei Stunden unter Normoxie bzw. Hypoxie (3% O₂) mit und ohne Zugabe von LPS (1 µg/mL) inkubiert. Nach einer Stunde lässt sich unter Normoxie noch keine LPS-Stimulation nachweisen. Unter Hypoxie findet sich, obwohl die Kontrolle nicht induziert wird, jedoch eine signifikante Stimulation der ICAM-1 mRNA Expression. Nach zwei Stunden lässt sich sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Induktion feststellen. (Mittelwerte ± SD, n=3).

Nach einstündiger Inkubation der THP-1-Zellen mit LPS (1 µg/mL) lässt sich keine Induktion der ICAM-1 mRNA-Expression feststellen. Inkubiert man die Zellen jedoch genauso lange unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂), resultiert die Behandlung mit der gleichen LPS-Dosis in einer signifikanten, fast 500fachen Expressionssteigerung gegenüber der normoxischen Kontrolle. Nach zwei Stunden Inkubationsdauer erhält man diese Induktion (sogar noch etwas stärker ausgeprägt) sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Um die Bedeutung von Hypoxie für die ICAM-1-Expression bei kurzen Inkubationsdauern näher zu untersuchen, wurden die folgenden Versuche alle bei schwerer Hypoxie durchgeführt; das heißt im vorliegenden Fall, dass die Zellen bei einer Sauerstoffkonzentration von nur 0.1% O₂ inkubiert wurden.

4.2.2 Schwere, akute Hypoxie induziert ICAM-1 in humanen Monozyten

In einem ersten Schritt wurden humane Monozyten (THP-1-Zellen) für 30 Minuten unter schweren hypoxischen Bedingungen (0.1 % O₂) inkubiert.

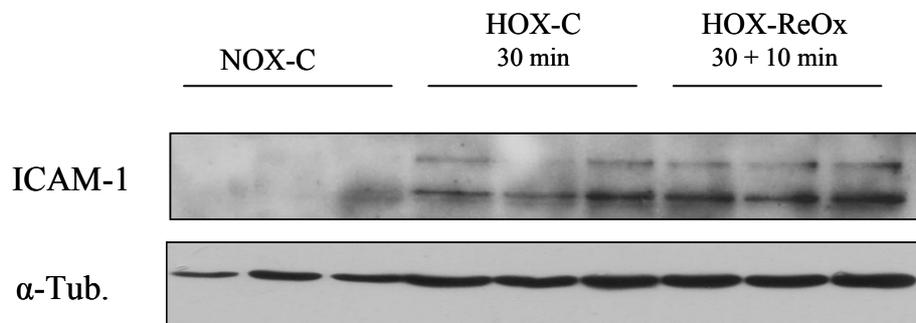


Abb. 4.2.9.: THP-1-Zellen akkumulieren ICAM-1 Protein unter akuter, schwerer Hypoxie.

Humane THP-1-Zellen wurden für dreißig Minuten unter normoxischen bzw. hypoxischen (0.1% O₂) Bedingungen mit und ohne Reoxygenierungsphase inkubiert. Bereits nach dieser kurzen hypoxischen Inkubation akkumuliert ICAM-1-Protein in den Monozyten, das unter Reoxygenierung nicht der Degradation unterliegt. Aufgetragen wurden 50 µg Protein (Gesamtzelllysat).

Bereits nach dreißig Minuten lässt sich in den Monozyten eine vermehrte Akkumulation des ICAM-1-Proteins detektieren. Dieses unterliegt in der anschließenden kurzen Phase der Reoxygenierung nicht der Degradation. Untersucht man das Verhalten der ICAM-1 mRNA bei gleichen Versuchsbedingungen, so lässt sich nach dreißig Minuten hypoxischer Inkubation auch eine signifikante Induktion in der ICAM-1 mRNA-Expression feststellen. Eine zehnmündige Reoxygenierungsphase führt hier allerdings - anders als beim ICAM-1-Protein - zu einer Reduktion der vorhergegangenen mRNA-Steigerung um etwa 30 %. Dieser Rückgang bewirkt die Aufhebung der Signifikanz gegenüber der normoxischen Kontrolle.

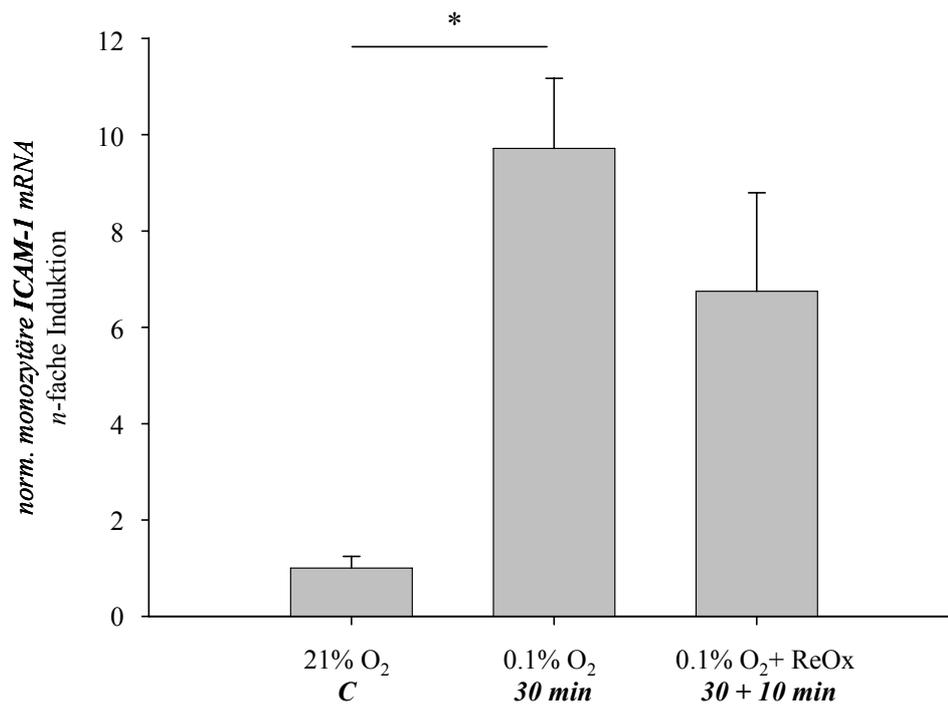


Abb. 4.2.10.: Akute, schwere Hypoxie führt zu einer Steigerung der ICAM-1 mRNA in humanen Monozyten.

Inkubiert man THP-1-Zellen für dreißig Minuten bei 0.1% O₂, resultiert dies in einer signifikanten Steigerung der ICAM-1 mRNA-Expression um etwa das Zehnfache des norm-oxischen Kontrollwerts. Eine anschließende kurze Phase der Reoxygenierung reduziert diesen Effekt wieder (Mittelwerte ± SD, n=3).

4.2.3 Schwere, akute Hypoxie führt zur Anheftung von Monozyten an Endothelzellen

Nachdem festgestellt werden konnte, dass humane Monozyten unter gravierenden hypoxischen Bedingungen sehr kurzfristig in der Lage sind, die Expression des Adhäsionsproteins ICAM-1 zu steigern, wurde im nächsten Schritt untersucht, inwieweit dies das Adhäsionsverhalten von Monozyten an Endothelzellen beeinflussen könnte. Hierzu wurden Monozyten zusammen mit einer Rattenendothelzelllinie (EC52) oder primären humanen Endothelzellen (HUVEC) unter normoxischen wie hypoxischen Bedingungen inkubiert. Unter normoxischer Cokultur lassen sich mittels zelltypspezifischer Immunfluoreszenz (die Monozyten wurden mit Calcein AM bereits vor dem eigentlichen Versuch grün, die Endothelzellen im Anschluss daran mit einem klassischen Immunfluoreszenzprotokoll rot gefärbt) kaum adhärenente Monozyten detektieren. Ganz anders unter hypoxischen Bedingungen: hier nimmt die Anzahl adhärenente THP-1-Zellen sprunghaft und signifikant auf knapp das 50fache zu. Der untere Teil von Abbildung 4.2.11. zeigt exemplarisch das Adhäsionsverhalten von THP-1-Zellen an humane Nabelschnurendothelzellen; für die Cokultur mit der Rattenendothelzelllinie wurden sehr ähnliche Ergebnisse erzielt. Auch hier lag die Adhäsion der Monozyten nach zweistündiger Cokultur unter Hypoxie bei etwa dem 50fachen des normoxischen Wertes (siehe dazu auch Abb. 4.2.13.).

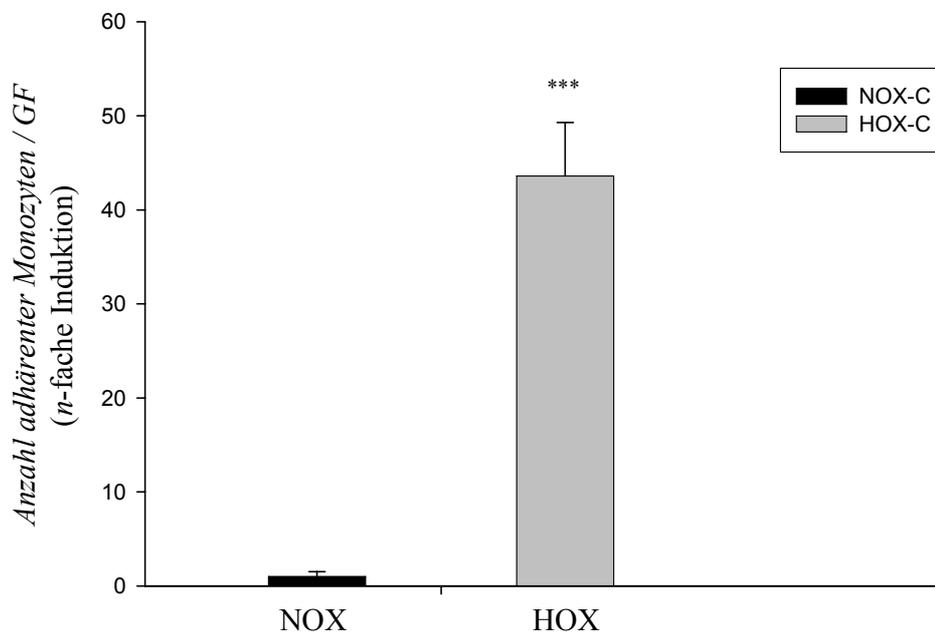
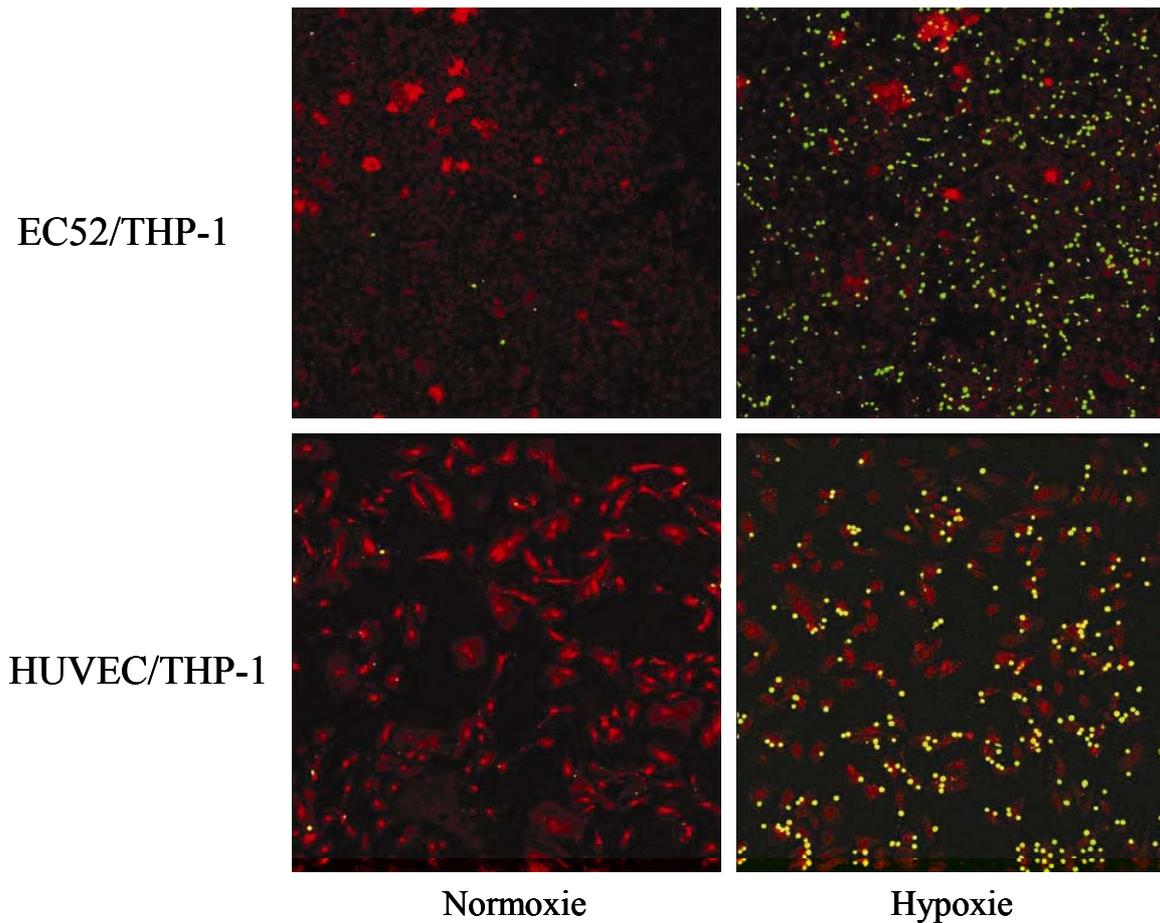


Abb. 4.2.11.: Inkubation von Monozyten und Endothelzellen unter akuter, schwerer Hypoxie führt zu einer vermehrten Adhäsion von Monozyten an das Endothel.

Humane Monozyten (THP-1-Zellen, grün dargestellt) wurden zusammen mit einer Rattenendothelzelllinie (EC52, rot; oben) oder humanen primären Endothelzellen (HUVEC, rot; unten) für 2h unter normoxischen wie hypoxischen (0.1% O₂) Bedingungen inkubiert. Die hypoxische Stimulation führt zu einer signifikant gesteigerten Anheftung der Immunzellen an das Endothel (EC52/THP-1 in 10facher Vergrößerung, HUVEC/THP-1 in 20facher Vergrößerung; Mittelwerte ± SD, n=4).

Im Folgenden wurde die LPS-induzierte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen untersucht. Dieser Stimulus wird in Adhäsionsassays schon lange verwendet und sollte als Vergleich zur erreichten Adhäsion dienen. Eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS ist dabei innerhalb eines Adhäsionsassays als sehr starker Stimulus einzuordnen.

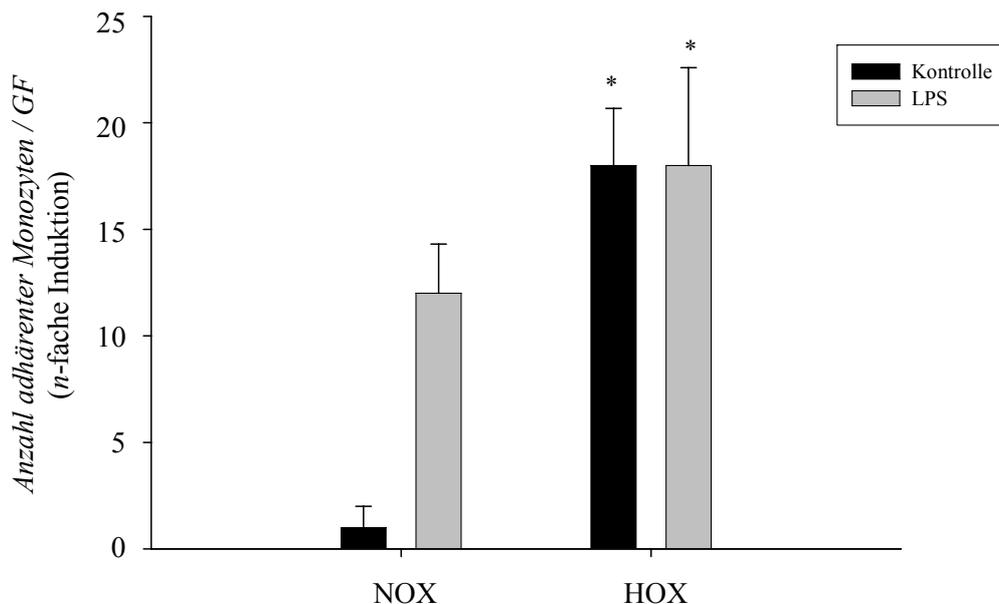


Abb. 4.2.12.: Vergleich der Adhäsionsstimulation durch LPS bzw. Hypoxie.

Die einstündige Stimulation der Monozyten mit LPS führt bereits unter normoxischen Bedingungen zu einer deutlich gesteigerten, jedoch knapp nicht signifikanten Adhäsion an das Endothel. Eine einstündige Inkubation bei 0.1% O_2 führt demgegenüber zu einer signifikant gesteigerten Anzahl adhärenter Monozyten, LPS und Hypoxie in Kombination erreichen keine zusätzliche Induktion (Mittelwerte \pm SD; $n=4$).

Eine einstündige Inkubation unter stark hypoxischen Bedingungen (0.1% O_2) stellt im hier verwendeten Modell einen stärkeren Stimulus zur Adhäsion dar als eine Inkubation von Monozyten und Endothelzellen mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS. Die hypoxische Inkubation mit LPS führt gegenüber der hypoxischen Kontrolle nicht zu nochmals vermehrter Adhäsion.

Im Anschluss daran wurde für die hypoxische Stimulation eine Zeitreihe zur Adhäsion der Monozyten an EC52-Zellen erstellt. Hierbei zeigte sich wiederum, dass bereits nach einer hypoxischen Inkubation von einer Stunde eine signifikant höhere Adhäsion als in der normoxischen Kontrolle vorliegt. Nach zweistündiger Inkubation unter Hypoxie wird das Maximum der monozytären

Adhäsion erreicht, nach sechs Stunden ist das Ausmaß der Adhäsion bereits wieder deutlich unter den nach einer Stunde erreichten Wert gesunken.

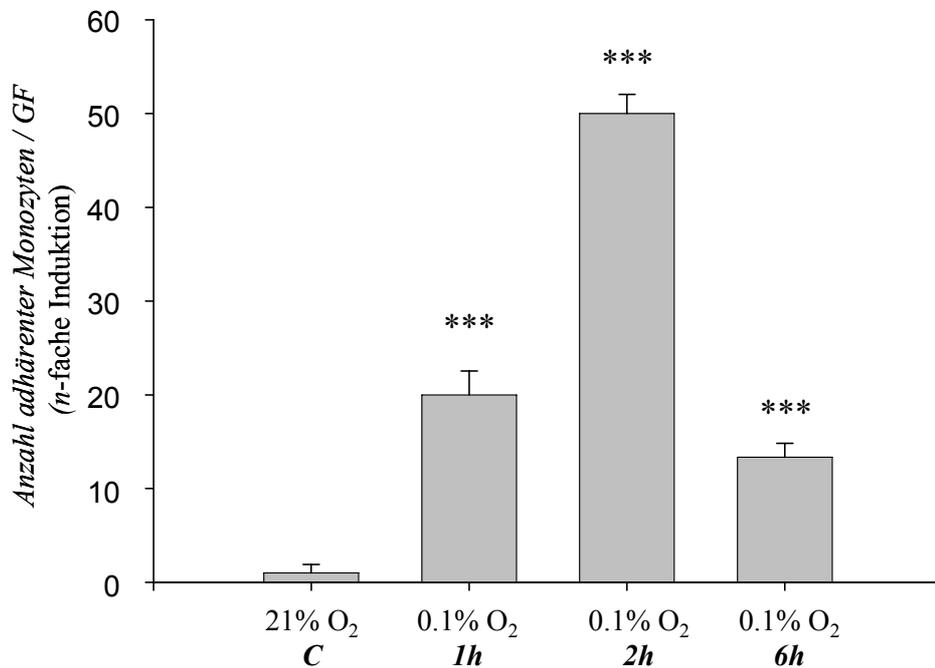


Abb. 4.2.13.: Zeitreihe zur Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens humaner THP-1-Zellen an Endothelzellen (EC52) unter Hypoxie.

Bereits nach einstündiger Inkubation unter Hypoxie (0.1% O₂) ist die monozytäre Adhäsion ans Endothel signifikant gesteigert. Nach zwei Stunden ist sie maximal, nach sechs Stunden adhären bereits wieder weniger Zellen als nach einer Stunde (Mittelwerte ± SD; n=4).

4.2.4 Die Hypoxie-induzierte Adhäsion ans Endothel ist abhängig von der monozytären ICAM-1 Expression

Es ist bekannt, dass β_2 -Integrine eine wichtige Rolle für die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen spielen, wenn die Immunzellen vorher für längere Zeit hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren (Kong et al., 2004). Aus diesem Grund wurde die Expression des β_2 -Integrins CD18 im vorliegenden Modell untersucht.

THP-1-Zellen exprimieren CD18 mRNA, bei sechsständiger Inkubation unter 3% Sauerstoff konnte jedoch keine Regulation der mRNA festgestellt werden (siehe auch Abb. 4.2.7.). Dennoch musste die Expression der CD18 mRNA unter akuter, schwerer Hypoxie charakterisiert werden um eine Beteiligung dieses Adhäsionsmoleküls an der gesteigerten Adhäsion unter diesen Bedingungen eindeutig ausschließen zu können.

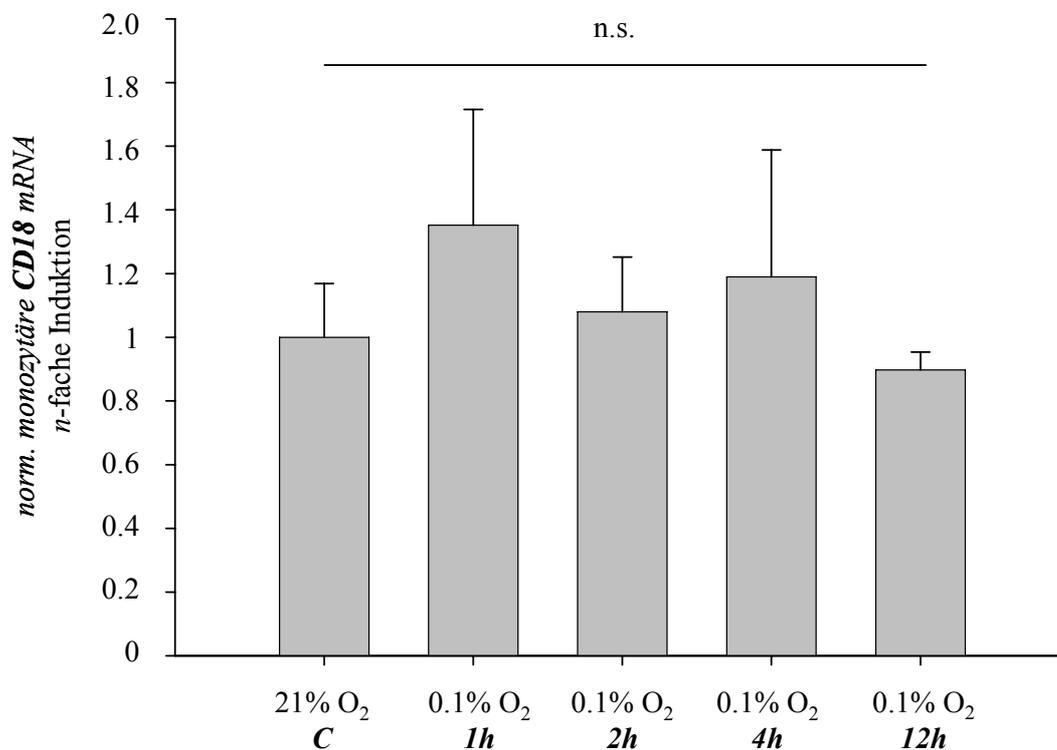


Abb. 4.2.14.: CD18 mRNA Expression in humanen THP-1-Zellen unter Cokultur.

Humane THP-1-Zellen wurden unter Normoxie und Hypoxie (0.1% O₂, verschiedene Versuchsdauern) mit der Rattenendothelzelllinie EC52 kokultiviert. Die Expression der humanen CD18 mRNA wird hierbei zu keinem Zeitpunkt signifikant gegenüber der normoxischen Kontrolle monokultivierter Monozyten verändert (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Zu keinem Zeitpunkt der Cokultur unter schwerer Hypoxie konnte eine signifikante Veränderung in der Expression der CD18 mRNA festgestellt werden. Alle Werte wurden auf die normoxische Kontrolle der THP-1-Zellen bezogen. Analysiert man jedoch im gleichen Zeitverlauf die mRNA-Veränderungen des monozytären ICAM-1, ergibt sich ein völlig anderes Bild:

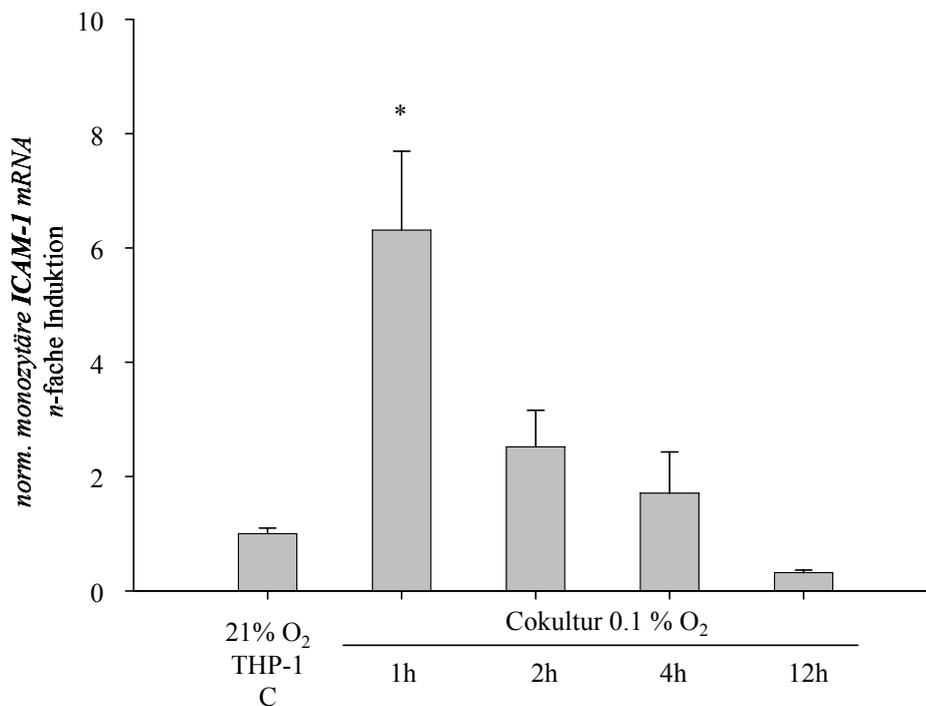


Abb. 4.2.15.: Veränderungen der monozytären ICAM-1 mRNA unter hypoxischer Cokultur.

Humane THP-1-Zellen wurden unter Normoxie und Hypoxie (0.1% O₂, verschiedene Versuchsdauern) mit der Rattenendothelzelllinie EC52 kokultiviert. Bereits nach einer Stunde hypoxischer Cokultur ist die ICAM-1 mRNA in humanen THP-1-Zellen signifikant gegenüber der normoxischen Kontrolle ohne Endothelzellen gesteigert. Bis vier Stunden nach Beginn der Inkubation bleiben die mRNA Mengen gesteigert, danach sinken sie jedoch sogar unter den Kontrollwert der Monokultur (Mittelwerte ± SD; n=3).

Bereits nach einstündiger hypoxischer Cokultur mit EC52-Zellen ist die monozytäre ICAM-1 mRNA signifikant induziert. Dieser Anstieg ist nur von kurzer Dauer, bereits nach etwa vier Stunden ist keine Induktion mehr erkennbar. Bei fortdauernder Cokultur schlägt der Effekt sogar ins Gegenteil um, man findet nach 12h gegenüber der normoxischen Kontrolle monokultivierter THP-1-Zellen eine deutliche Reduktion. Um die Rolle von endotheliale ICAM-1 an der Adhäsionssteigerung unter hypoxischer Cokultur im Vergleich zum monozytären Protein charakterisieren zu können, wurden im Anschluss die Veränderungen der Expression von endotheliale ICAM-1 unter Cokultur untersucht.

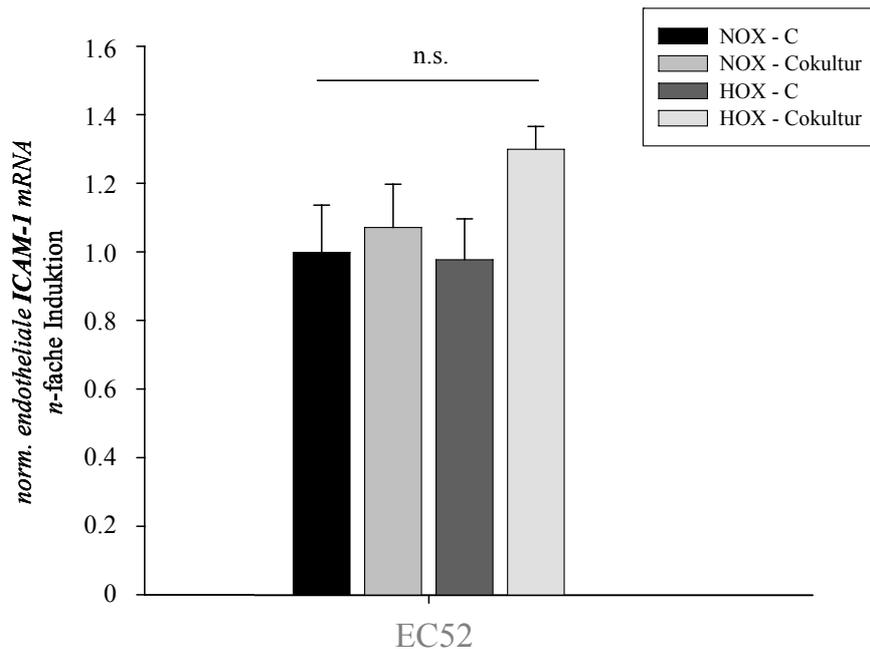


Abb. 4.2.16.: Endotheliale ICAM-1-Expression unter Hypoxie und Cokultur mit Monozyten.

Die ICAM-1 mRNA-Expression in der Rattenendothelzelllinie EC52 wird durch Hypoxie (0.1% O₂, 1h) und Cokultur nicht beeinflusst (Mittelwerte ± SD; n=3).

Weder die Cokultivierung mit Monozyten noch die Inkubation mit und ohne Immunzellen unter Hypoxie (0.1% O₂, 1h) induzierte eine Veränderung in der ICAM-1 mRNA-Expression der Rattenendothelzelllinie EC52. Nachdem also Veränderungen der ICAM-1-Spiegel auf endothelialer Seite ausgeschlossen werden konnten, musste noch zweifelsfrei festgestellt werden, ob die Veränderungen in der monozytären ICAM-1 Protein- wie mRNA-Expression tatsächlich die vermehrte Adhäsion ans Endothel bedingen, und wenn ja, an welches Rezeptormolekül das monozytäre ICAM-1 in diesem Fall binden könnte. Zu diesem Zweck wurden im weiteren Verlauf der Arbeiten Knock-down-Versuche sowohl für monozytäres als auch für endotheliales ICAM-1 durchgeführt. Transfiziert man humane THP-1-Zellen mit siRNA gegen ICAM-1 und inkubiert diese unter Hypoxie (0.1% O₂, 2h), so sind im Anschluss mittels Immunfluoreszenz so gut wie keine adhärenenten Monozyten mehr detektierbar. Gleiches gilt für den Knock-down des endothelialen ICAM-1: Inkubiert man unbehandelte THP-1-Zellen mit EC52-Zellen, in denen mittels siRNA die Expression dieses Adhäsionsproteins unterdrückt worden ist, so lassen sich ebenfalls nur sehr wenig adhärenente Monozyten detektieren. Abbildung 4.2.17.

zeigt die numerische Auswertung adhärenter Zellen in mindestens vier unabhängigen Bildausschnitten pro Versuchsbedingung.

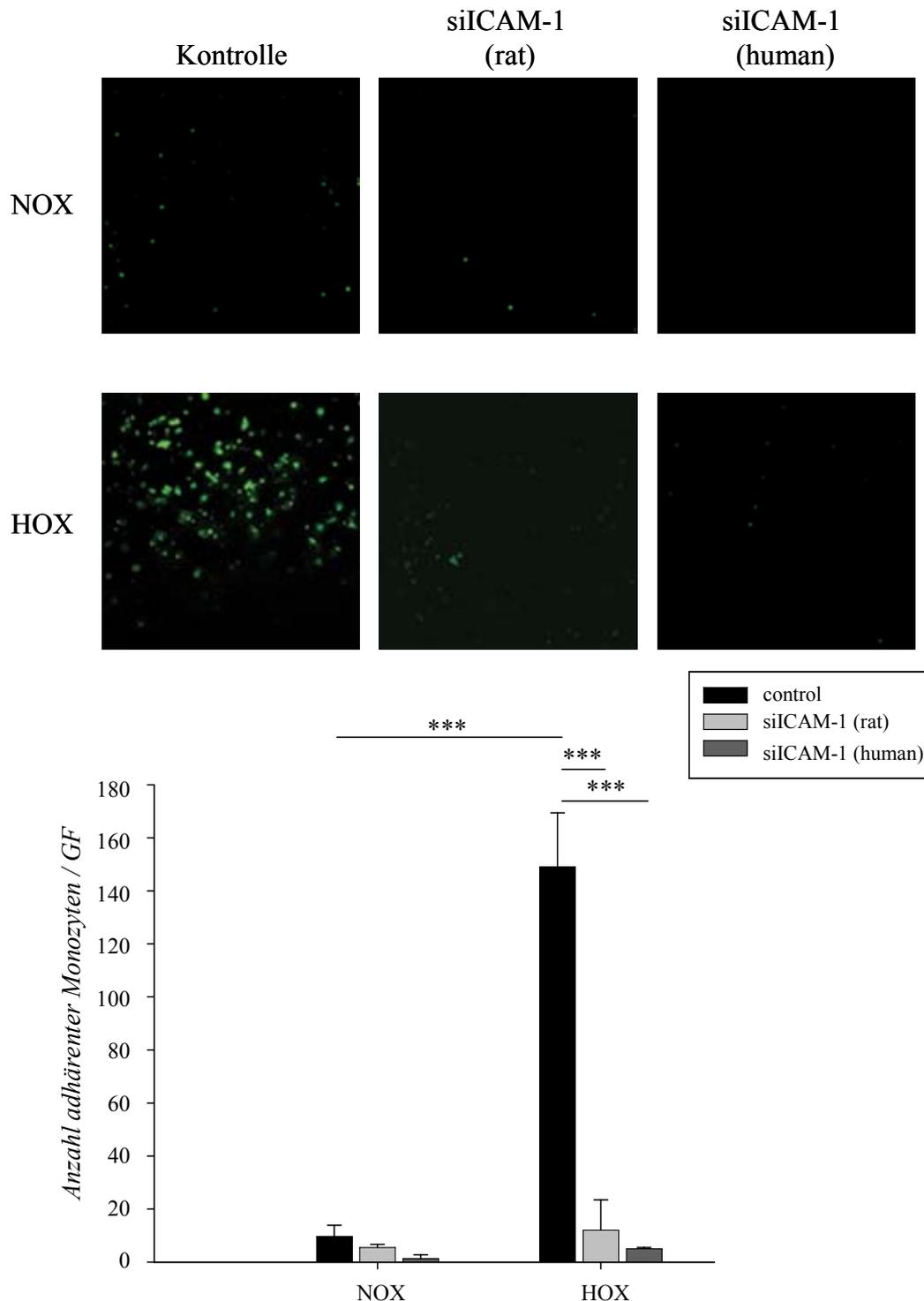


Abb. 4.2.17.: Adhäsionsverhalten unbehandelter Monozyten an ICAM-1-defiziente Ratten-Endothelzellen bzw. ICAM-1-defizienter Monozyten an unbehandelte Ratten-Endothelzellen.

Unbehandelte und mit siRNA gegen humanes ICAM-1 behandelte THP-1-Zellen wurden mit unbehandelten bzw. ebenfalls siRNA (anti-ratICAM-1) transfizierten Rattenendothelzellen unter Normoxie und Hypoxie (0.1% O₂, 2h) kokultiviert. Sowohl der Knock-down von monozytärem als auch der von endotheliale ICAM-1 verhindert die Hypoxie-induzierte Adhäsion von THP-1-Zellen (grün) an EC52-Zellen (nicht gefärbt) völlig (10fache Vergrößerung, gezeigt ist je ein repräsentatives Bild zu Mittelwerten ± SD; n=5).

Da sowohl der Knock-down des monozytären als auch der des endothelialen ICAM-1 eine Adhäsion der Monozyten unter akuter Hypoxie zu verhindern vermag, könnte eine Interaktion dieser beiden Adhäsionsmoleküle für die Hypoxie-induzierte Adhäsionssteigerung von essenzieller Bedeutung sein.

Die Effizienz des jeweiligen Knock-downs wurde in beiden Fällen mittels mRNA Analyse klassifiziert.

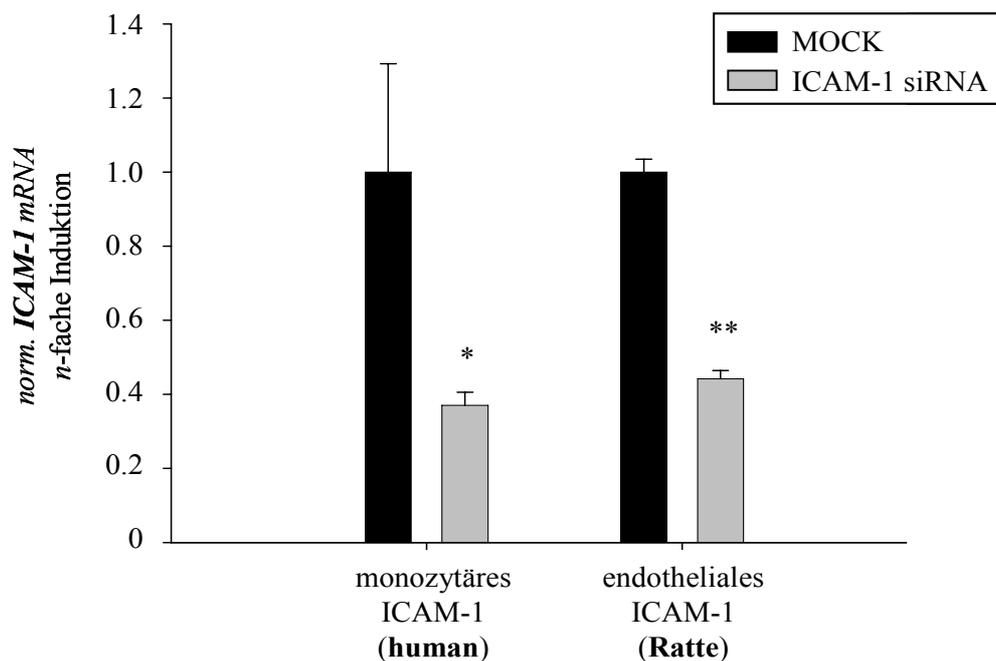


Abb. 4.2.18.: Klassifizierung der Knock-down-Effizienz von ICAM-1 in Ratten-Endothelzellen und humanen Monozyten.

Humane THP-1-Zellen und Rattenendothelzellen (EC52) wurden mit siRNA gegen ICAM-1 transfiziert. Sowohl in der Rattenendothelzelllinie EC52 wie auch in humanen THP-1-Zellen konnte die ICAM-1-Expression signifikant vermindert werden. Die Effizienz des Knock-downs betrug in beiden Fällen etwa 60% (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Sowohl in den Rattenzellen als auch in humanen THP-1-Zellen betrug die Knock-down-Effizienz etwa 60% und konnte jeweils als signifikant bezeichnet werden.

4.2.5 Veränderungen in der HIF-Expression in Monozyten und Endothelzellen während der Cokulturrexperimente

Um die Rolle der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α bzw. HIF-2 α während der Cokulturrexperimente und ihre eventuelle Bedeutung für die gesteigerte ICAM-1-Expression unter Hypoxie näher zu beleuchten, wurde zunächst die Expression dieser Proteine in der Rattenendothelzelllinie EC52 untersucht.

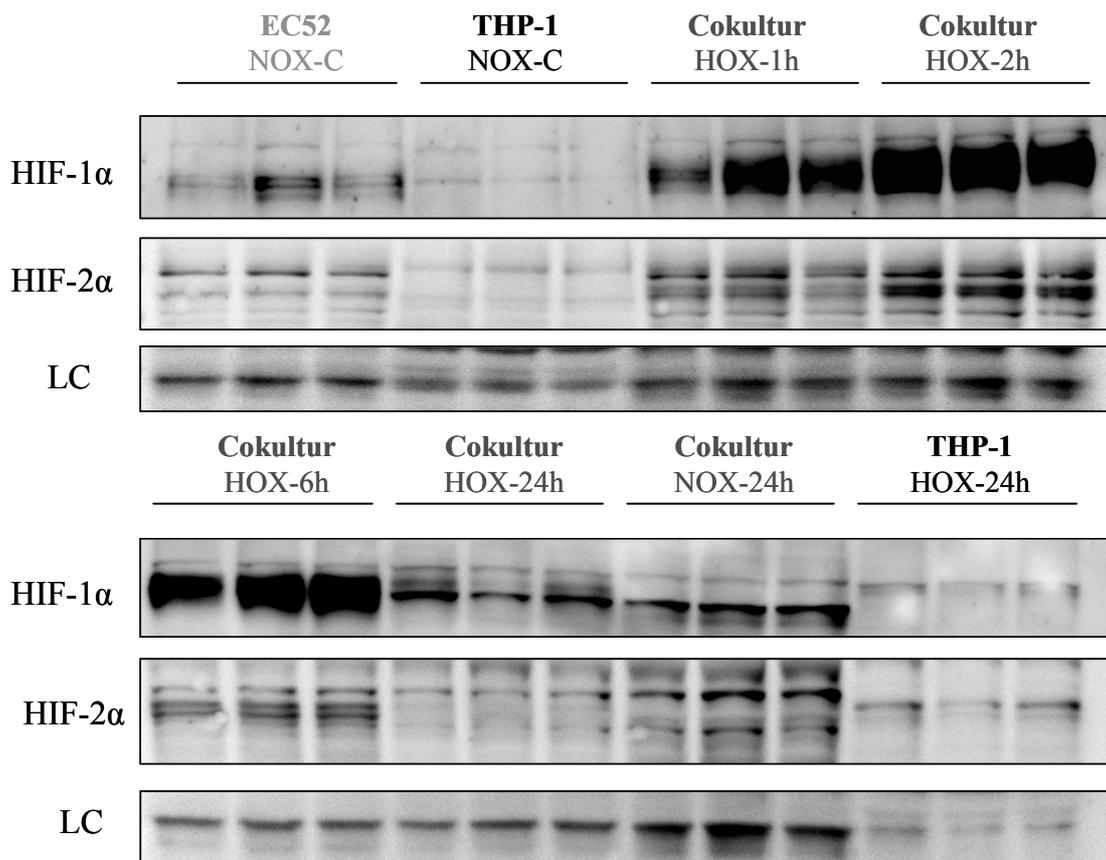


Abb. 4.2.19.: HIF-Proteinexpression in Rattenendothelzellen unter Cokulturbedingungen.

Humane THP-1-Zellen wurden mit der Rattenendothelzelllinie EC52 kokultiviert (Normoxie und Hypoxie mit 0.1% O₂, verschiedene Zeitpunkte). Die Expression des HIF-1 α und HIF-2 α -Proteins in den Rattenendothelzellen EC52 verläuft ähnlich: In beiden Fällen liegt die maximale Akkumulation des Proteins nach zwei Stunden vor. HIF-1 α scheint stärker induziert zu werden als das Homolog und wird länger stabilisiert; hier lassen sich auch nach 12 und 24 h Cokultur noch Banden detektieren. Aufgetragen wurden 75 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

Hierbei lässt sich zunächst feststellen, dass die Expression von HIF-1 α und HIF-2 α relativ ähnlich verläuft. Beide HIF- α -Untereinheiten akkumulieren bereits nach einstündiger Cokultur unter hypoxischen Bedingungen. Das Maximum der Proteinakkumulation liegt jeweils bei der zweistündigen Inkubation. Festzuhalten bleibt jedoch, dass deutlich mehr HIF-1 α als HIF-2 α akkumuliert,

was für Endothelzellen ein eher untypischer Befund ist, da HIF-2 α hier in der Regel die größere Bedeutung zukommt. Die Menge an HIF-1 α -Protein nimmt zudem auch deutlich langsamer ab als dies bei HIF-2 α der Fall ist. Während nach 24stündiger Cokultur bei HIF-2 α keine Bande mehr detektierbar ist, exprimieren die Rattenendothelzellen noch geringe Mengen HIF-1 α , die selbst unter normoxischer Cokultur über denselben Zeitraum noch erkennbar sind. Im Anschluss daran wurde überprüft, ob die Cokultur mit Monozyten in den Rattenendothelzellen auch Veränderungen in der HIF-mRNA-Expression hervorruft.

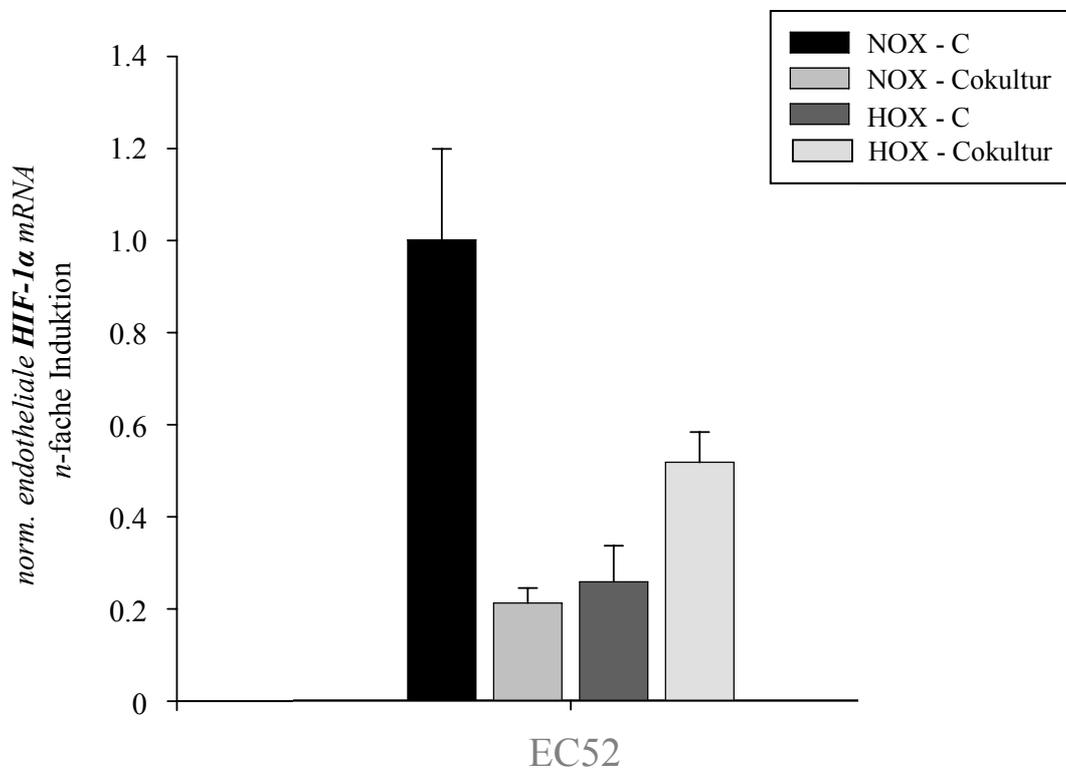


Abb. 4.2.20.: Veränderungen in der HIF-1 α mRNA-Expression von Endothelzellen unter Cokultur mit Monozyten.

Rattenendothelzellen (EC52) wurden mit und ohne humane THP-1-Zellen kultiviert. Die stärkste Expression der HIF-1 α mRNA findet man in den normoxischen Kontrollzellen. Hypoxie (0.1% O₂, 1h) verringert die HIF-1 α -Expression ebenso wie Cokultur unter Normoxie. Dieser Rückgang ist unter hypoxischer Cokultur nicht so stark ausgeprägt (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Betrachtet man zunächst die Veränderungen in der mRNA-Expression von HIF-1 α , so findet man neben der häufig beobachteten Repression der mRNA unter Hypoxie auch einen Rückgang unter normoxischer Cokultur. Unter hypoxischer Cokultur sind die HIF-1 α mRNA-Mengen gegenüber der normoxischen

Kontrolle ebenfalls vermindert, allerdings nicht in demselben Maße wie unter Hypoxie bzw. Cokultur allein. Im Gegensatz dazu findet man bei der Analyse von HIF-2 α eine geringe mRNA-Induktion nach hypoxischer Inkubation. Cokultur mit Monozyten führt sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einer gegenüber der jeweiligen Kontrolle verminderten HIF-2 α mRNA-Expression.

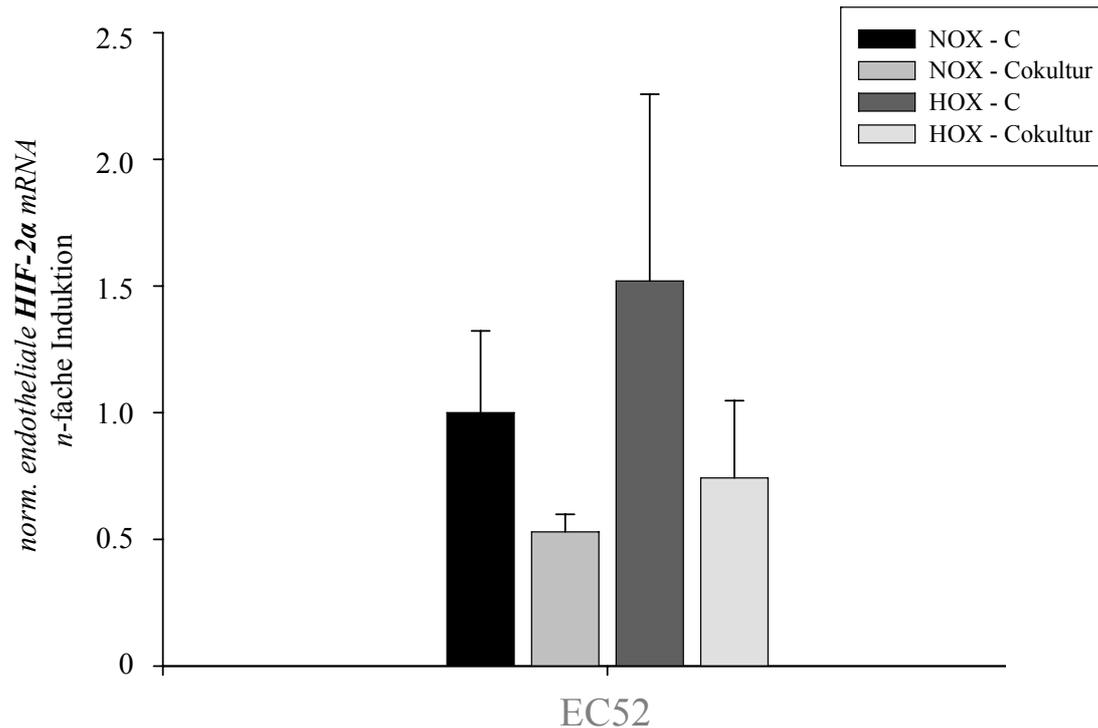


Abb. 4.2.21.: Veränderungen in der HIF-2 α mRNA-Expression von Endothelzellen unter Cokultur mit Monozyten.

Rattenendothelzellen (EC52) wurden mit und ohne humane THP-1-Zellen kultiviert. Cokultur mit Monozyten führt unabhängig von der umgebenden Sauerstoffkonzentration dazu, dass Ratten-Endothelzellen eine verminderte Expression der HIF-2 α mRNA aufweisen. Hypoxie induziert die Expression von HIF-2 α in geringem Umfang (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Im Anschluss daran wurde die HIF mRNA-Expression in humanen THP-1-Zellen untersucht. Während die hypoxische Inkubation hier einen geringfügigen Rückgang der HIF-1 α mRNA bedingt, scheint die Cokultivierung mit Endothelzellen eher zu einer leichten Expressionssteigerung der HIF-1 α mRNA in Monozyten zu führen.

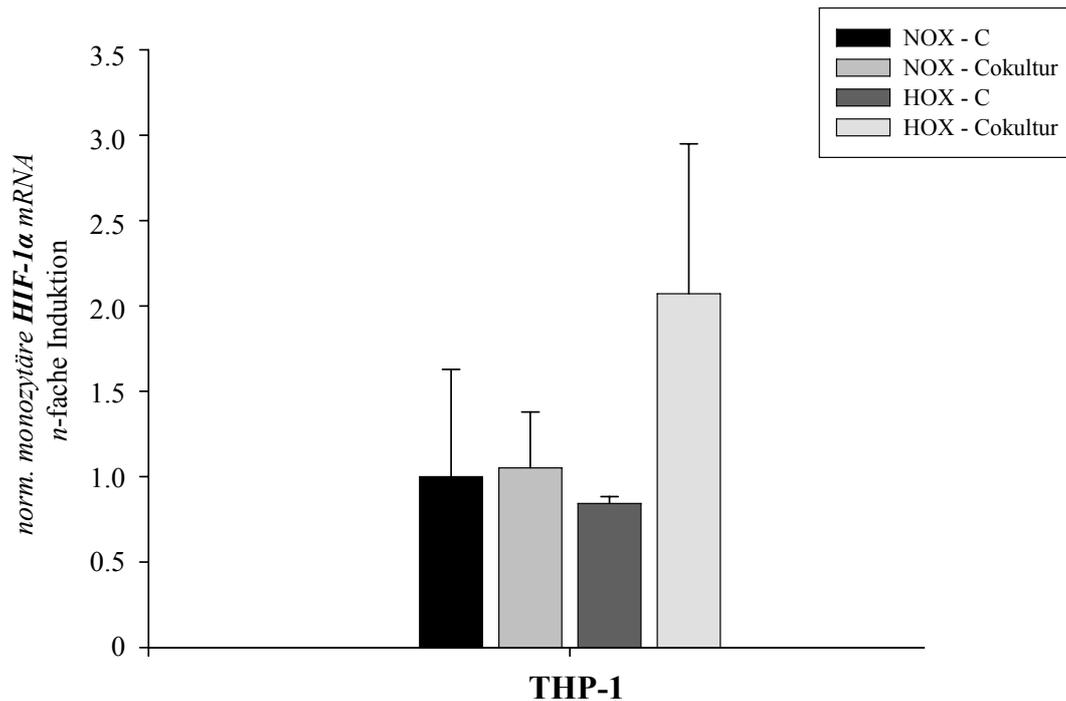


Abb. 4.2.22.: Veränderungen in der HIF-1α mRNA-Expression von Monozyten unter Cokultur mit Endothelzellen.

Humane THP-1-Zellen wurden mit und ohne Rattenendothelzellen (EC52) kultiviert. Unter normoxischen Bedingungen verändert Cokultur die Expression der HIF-1α mRNA nicht. Inkubation unter Hypoxie führt zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Rückgang der mRNA unter Monokultur, Cokultur unter Hypoxie scheint zu einer Steigerung der HIF-1α mRNA zu führen (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Da die HIF-1α-Proteinexpression in Monozyten unter Cokultur mittels Western Blot aufgrund zu geringer Anteile der Monozyten am Gesamtprotein nicht detektiert werden konnte, wurde zunächst untersucht, ob THP-1-Zellen in der Monokultur HIF-1α bzw. HIF-2α akkumulieren.

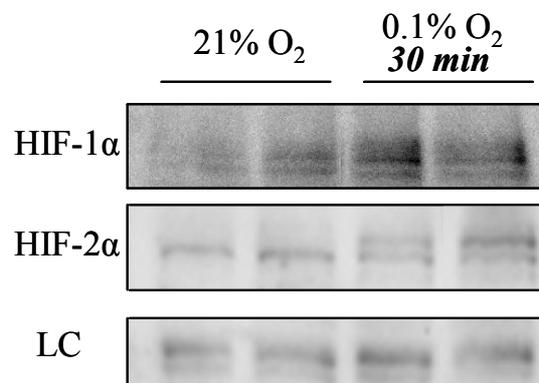


Abb. 4.2.23.: HIF-1α und HIF-2α-Proteinakkumulation in humanen THP-1-Zellen.

Humane THP-1-Zellen wurden für 30 Minuten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (0.1% O₂) inkubiert. Hypoxie führt zu einer Akkumulation beider Proteine im Zellkern. Aufgetragen wurden 20 µg Protein (Kernextrakt).

Darüber hinaus wurden die mRNA-Veränderungen des HIF-Zielgens ADM unter Cokulturbedingungen quantifiziert. Auf diese Weise war ein indirekter Rückschluss auf das Verhalten des HIF-1 α -Proteins unter hypoxischer Cokultur möglich.

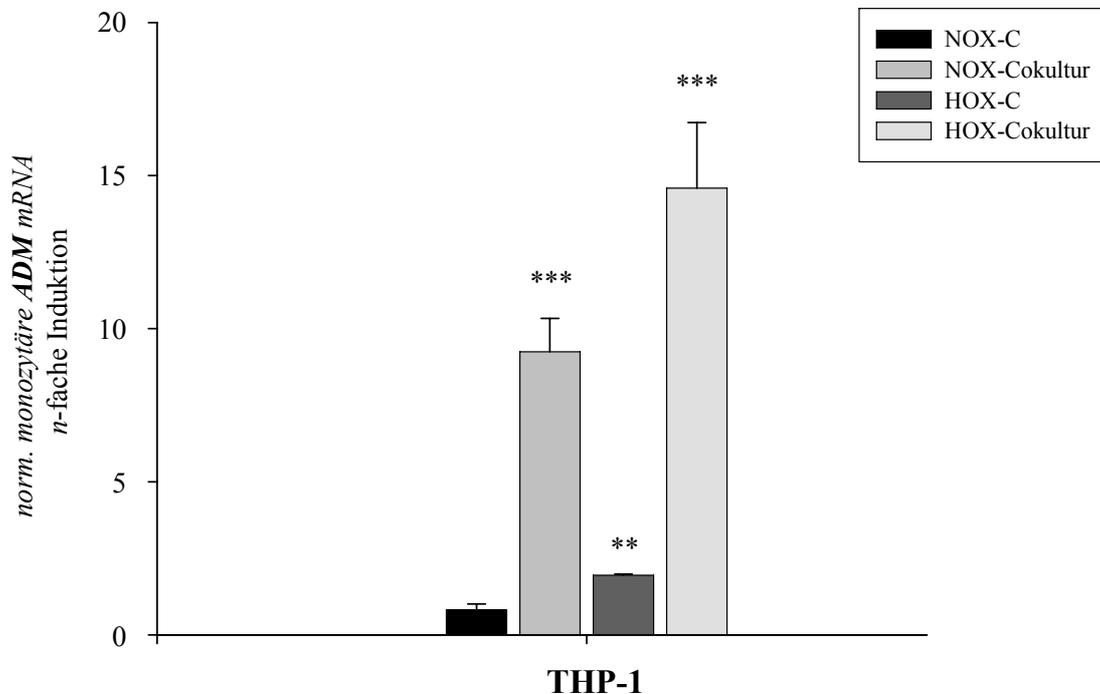


Abb. 4.2.24.: Veränderungen in der ADM mRNA-Expression von Monozyten unter Cokultur mit Endothelzellen.

Humane THP-1-Zellen wurden mit und ohne Rattenendothelzellen (EC52) kultiviert. Cokultur mit Endothelzellen führt bereits unter normoxischen Bedingungen zu einer signifikanten Induktion der ADM mRNA. Hypoxie (0.1% O₂, 1h) induziert das HIF-Zielgen ebenfalls, die stärkste Induktion findet sich unter hypoxischer Cokultur (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Bereits unter normoxischer Cokultur mit Endothelzellen findet sich eine signifikante Induktion der ADM mRNA-Expression über den durch Hypoxie allein verursachten Anstieg hinaus. Cokultur unter Hypoxie (0.1% O₂, 1h) führt zu nochmals gesteigerten ADM mRNA-Werten. Diese Befunde lassen auf eine Akkumulation des monozytären HIF-1 α Proteins unter Cokulturbedingungen schließen.

4.2.6 Rolle von HIF-1 α bei der Regulation des Adhäsionsproteins ICAM-1

Nachdem parallel zu den erhöhten monozytären Mengen an ICAM-1-Protein und mRNA auch eine gesteigerte Akkumulation der HIF- α -Untereinheiten gezeigt werden konnte, sollte im Anschluss die Rolle der Transkriptionsfaktoren HIF-1 bzw. HIF-2 für die ICAM-1-Expression untersucht werden. Dazu wurden humane THP-1-Zellen zunächst mit dem HIF-Inhibitor Echinomycin inkubiert. Zunächst wurden die Auswirkungen einer 16stündigen Inkubation mit 10 nM Echinomycin auf das HIF-Protein mittels Western Blot untersucht.

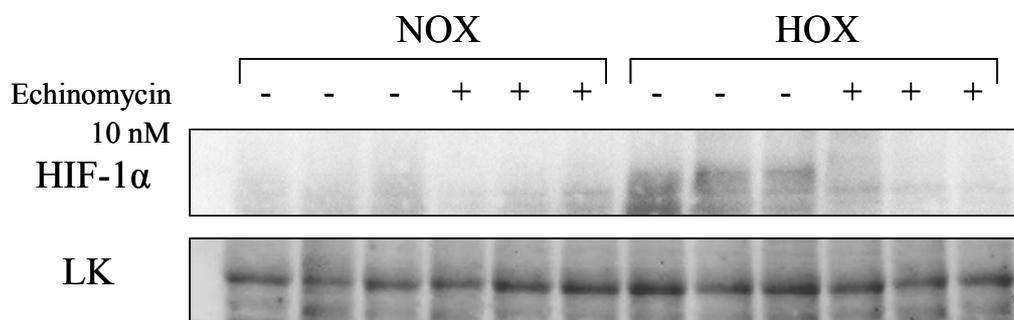


Abb. 4.2.25.: Auswirkungen von Echinomycin auf die HIF-1 α -Proteinakkumulation in THP-1-Zellen.

Humane THP-1-Zellen wurden für 16h mit dem HIF-Hemmstoff Echinomycin inkubiert und anschließend für zwei Stunden normoxischen bzw. hypoxischen (0.1% O₂) Bedingungen ausgesetzt. Echinomycin verhindert die hypoxische Akkumulation des Proteins. Aufgetragen wurden 40 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

Während die unbehandelten Zellen nach zweistündiger Inkubation bei 0.1% O₂ merklich HIF-1 α akkumulieren, wird dieser Prozess durch Vorinkubation mit Echinomycin verhindert. Auch die normoxischen Basalwerte des Proteins sind nach Echinomycin-Inkubation vermindert. Echinomycin ist dafür bekannt, die HIF-1 α -DNA-Bindung zu verhindern, sollte die Proteinmengen des Transkriptionsfaktors jedoch unbeeinflusst lassen. Der Rückgang des HIF-1 α -Proteins könnte an dieser Stelle ein Indiz für eine beeinträchtigte Vitalität der Zellen sein, da sie nach 16stündiger Vorinkubation auch morphologische Veränderungen aufwiesen. Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der Vorinkubation mit Echinomycin auf das Adhäsionsverhalten der Monozyten betrachtet. Dazu wurden die Monozyten vor dem eigentlichen Cokulturversuch ebenfalls für 16 Stunden mit 10 nM Echinomycin vorinkubiert. Dies resultierte

in einer leicht gesteigerten Adhäsion der Monozyten unter normoxischen Bedingungen, führte jedoch unter Hypoxie zu einer signifikanten Hemmung. Allerdings wiesen auch hier die THP-1-Zellen eine deutlich veränderte Morphologie auf, was die Vitalität der Zellen in Frage stellt.

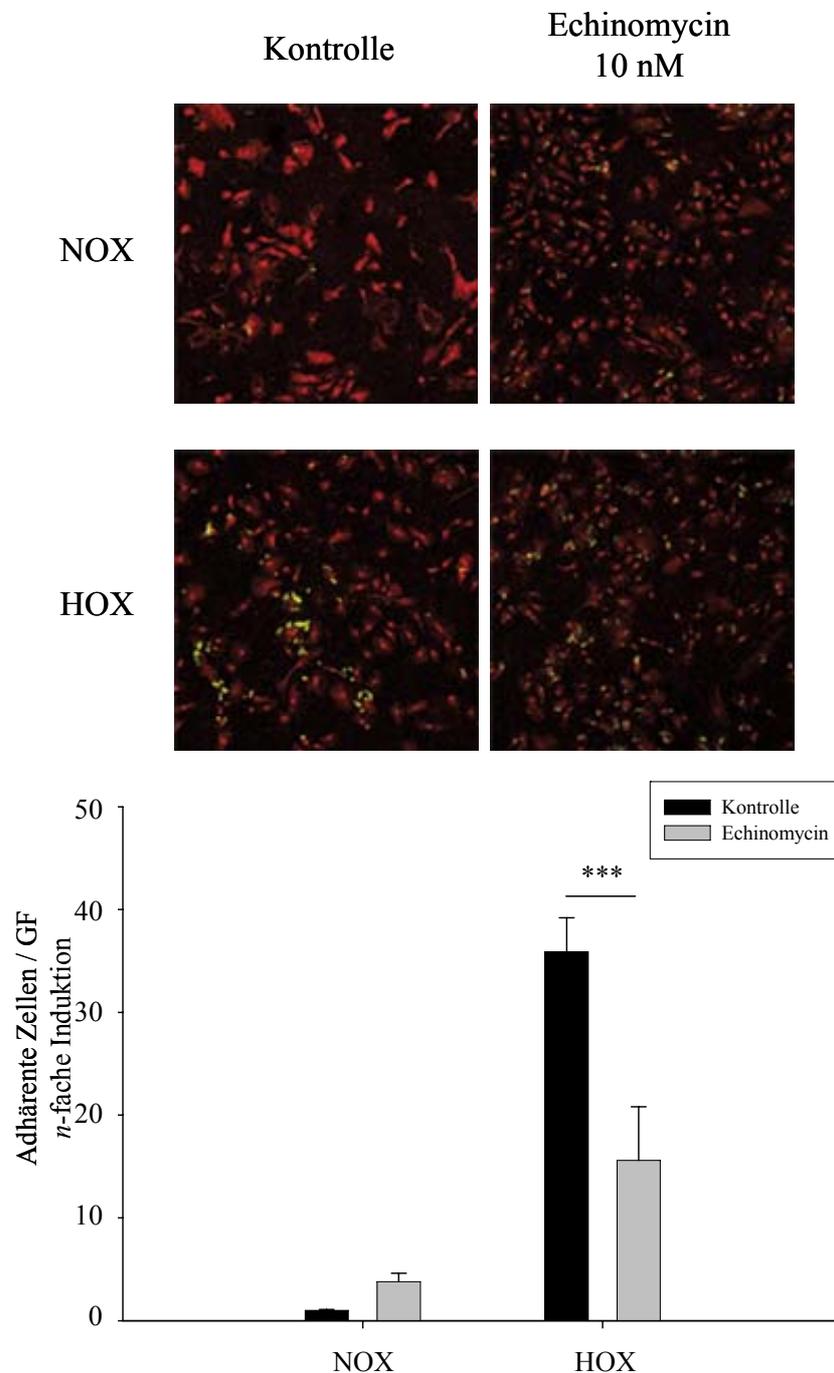


Abb. 4.2.26.: Auswirkungen der Vorinkubation von Monozyten mit Echinomycin auf das Adhäsionsverhalten der Zellen.

Humane THP-1-Zellen (grün) wurden vor dem Cokulturversuch (2h, 21% bzw. 0.1% O₂) mit HUVEC-Zellen (rot) für 16h mit 10 nM Echinomycin vorinkubiert. Echinomycin beeinflusst das Adhäsionsverhalten der Monozyten unter Normoxie kaum, die hypoxische Induktion wird jedoch signifikant vermindert (10fache Vergrößerung, gezeigt ist je ein repräsentatives Bild zu Mittelwerten ± SD; n=4).

Nach den uneindeutigen Ergebnissen, die mittels Echinomycin-Inkubation erzielt werden konnten, wurden die α -Untereinheiten der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in humanen THP-1-Zellen mit siRNA gegen HIF-1 α bzw. HIF-2 α unterdrückt. Die Effizienz des Knock-downs wurde mittels mRNA-Analyse sichergestellt:

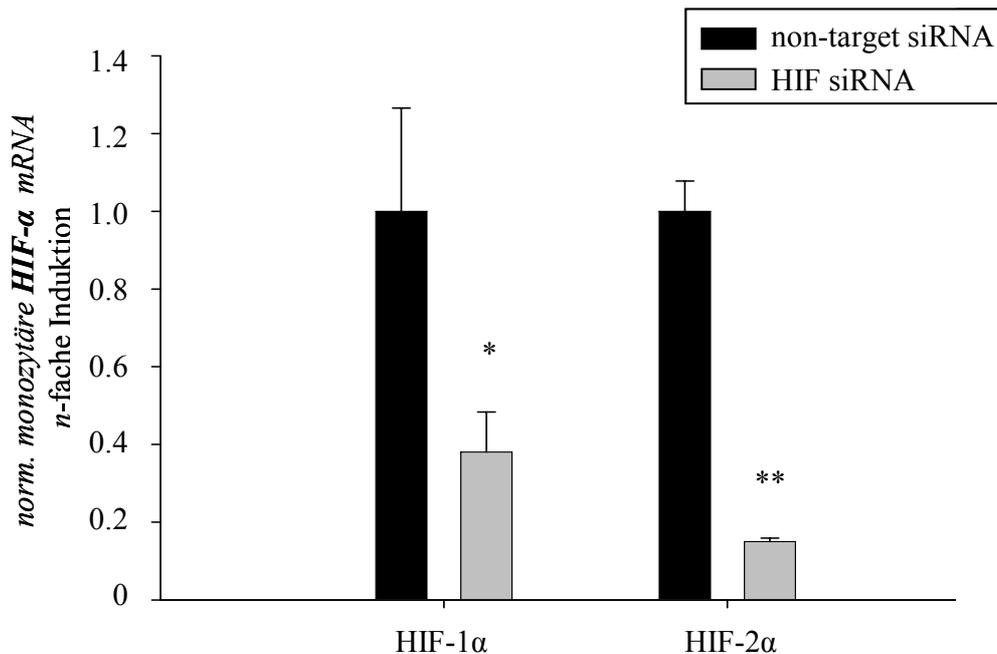


Abb. 4.2.27.: Reduktion der HIF-1/2 α mRNA nach Transfektion mit siRNA gegen HIF-1 α in humanen THP-1-Zellen.

Humane THP-1-Zellen wurden mittels Elektroporation mit non-target siRNA bzw. mit siRNA gegen HIF-1/2 α transfiziert. Im Anschluss daran ist die Expression beider HIF- α mRNAs signifikant vermindert (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Der Knock-down von HIF-1 α konnte als zu 60%, der von HIF-2 α als zu 80% effizient ermittelt werden. Im Anschluss daran wurden nun zum einen die Veränderungen in der mRNA-Expression von ICAM-1 in den Knock-down-Zellen gegenüber der Kontrolle betrachtet, zum anderen die Auswirkungen des HIF-1 α - bzw. HIF-2 α -Knock-downs auf das Adhäsionsverhalten der Zellen studiert.

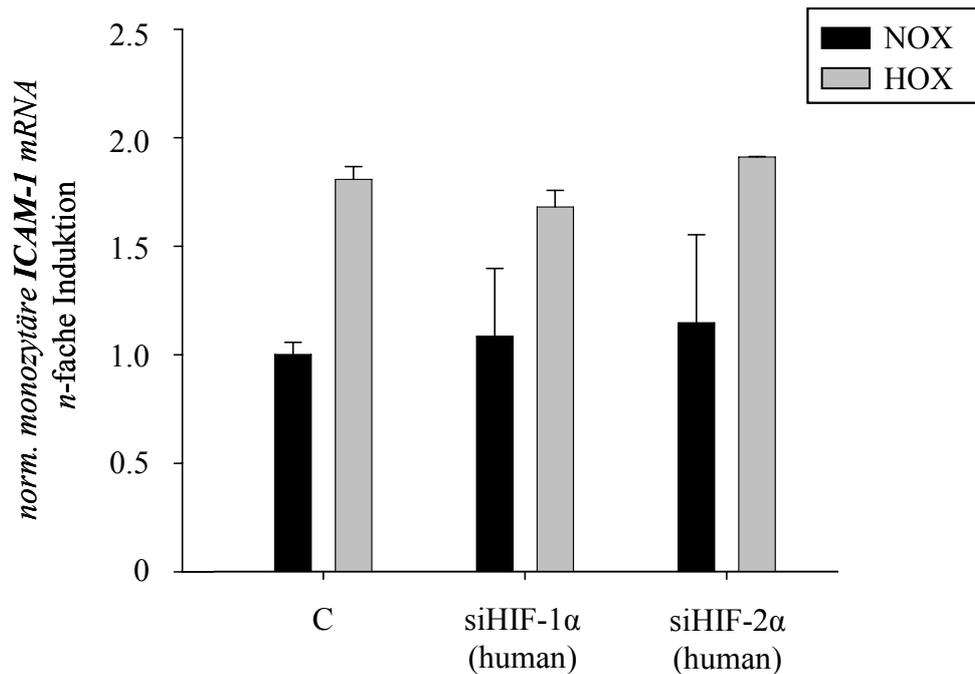


Abb. 4.2.28.: Auswirkungen des Knock-downs von HIF-1 α bzw. HIF-2 α in humanen THP-1-Zellen auf die mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1.

Humane THP-1-Zellen wurden mittels Elektroporation mit non-target siRNA bzw. siRNA gegen HIF-1 α transfiziert. Im Anschluss daran erfolgte eine zweistündige Inkubation unter normoxischen bzw. hypoxischen (0.1% O₂) Bedingungen. Die ICAM-1-Expression in den HIF-1 α -Knock-down-Zellen unterscheidet sich nicht von der in den Zellen, die mit non-target siRNA behandelt wurden (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Die Analyse der ICAM-1 mRNA-Expression in THP-1-Zellen, die mit siRNA gegen HIF-1 α bzw. HIF-2 α behandelt worden sind, ergab keine Veränderungen in der mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls gegenüber den Kontrollzellen. Die hypoxische Induktion der ICAM-1-mRNA blieb weiterhin vorhanden. Abbildung 4.2.32. zeigt das Adhäsionsverhalten von THP-1-Zellen, die mit siRNA gegen HIF-1 α transfiziert wurden sowie die Auszählung der adhärenen Zellen in jeweils fünf repräsentativen Bildausschnitten pro Versuchsansatz.

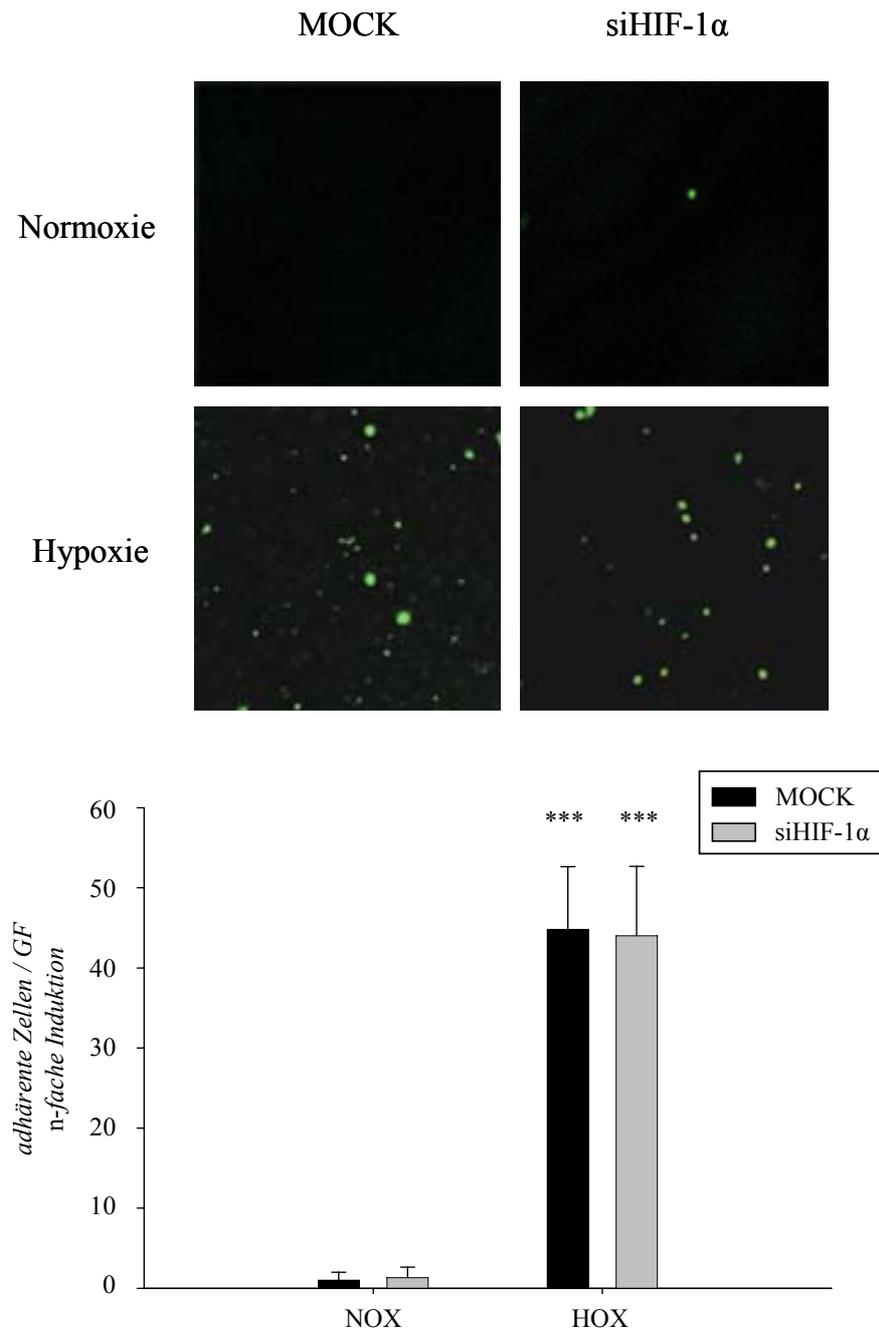


Abb. 4.2.29.: Auswertung des Adhäsionsverhaltens humaner THP-1-Zellen an HUVEC-Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen HIF-1α.

Unbehandelte und mit siRNA gegen humanes HIF-1α behandelte THP-1-Zellen wurden mit unbehandelten Rattenendothelzellen unter Normoxie und Hypoxie (0.1% O₂, 2h) kokultiviert. HIF-1α-defiziente THP-1-Zellen adhären unter Hypoxie in gleichem Maße und ebenso signifikant an Endothelzellen wie die Kontrollzellen (20fache Vergrößerung, gezeigt ist je ein repräsentatives Bild zu Mittelwerten ± SD; n=5).

Nachdem Hypoxie-induzierbare Faktoren die ICAM-1-Expression offensichtlich unbeeinflusst lassen, wurde untersucht, welche anderen Transkriptionsfaktoren zur Regulation dieses Adhäsionsmoleküls beitragen könnten. Dazu wurden THP-1-Zellen zunächst unter normoxischen Bedingungen mit dem PHD-

Hemmstoff Dimethyloxallylglycin (DMOG) inkubiert und die Auswirkungen auf die ICAM-1 mRNA-Expression sowie die Protein-akkumulation untersucht.

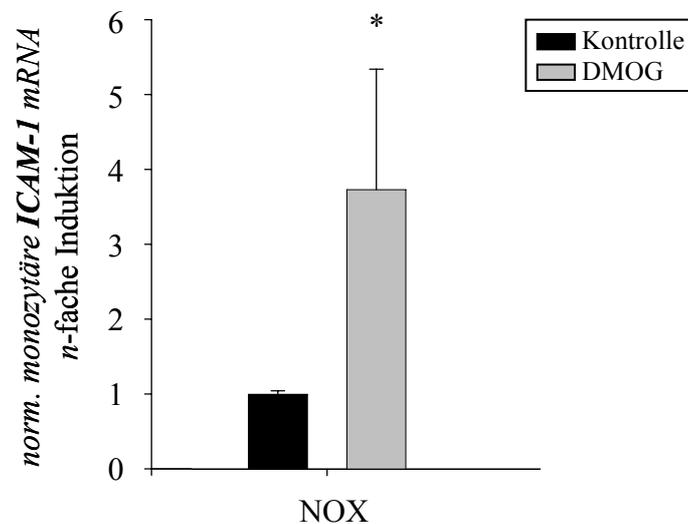


Abb. 4.2.30.: Normoxische Inkubation mit DMOG induziert die ICAM-1 mRNA.

Humane THP-1-Zellen wurden für eine Stunde unter normoxischen Bedingungen mit und ohne 1 mM DMOG inkubiert. DMOG-Inkubation resultiert in einer Induktion der ICAM-1 mRNA (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Eine einstündige normoxische Inkubation mit 1mM DMOG resultiert in einer deutlichen Induktion der ICAM-1 mRNA. Auch die Neusynthese des Proteins ist zu diesem Zeitpunkt bereits nachweisbar:

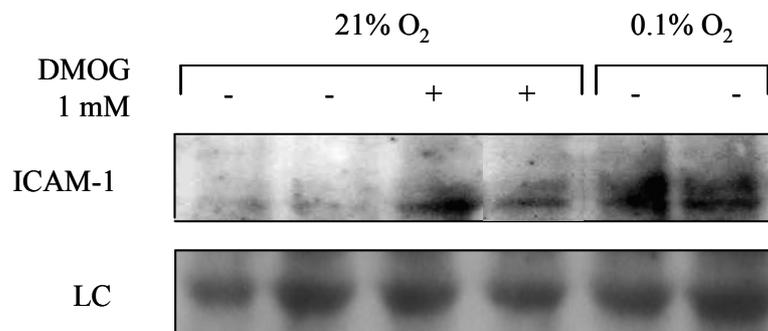


Abb. 4.2.31.: THP-1-Zellen akkumulieren ICAM-1 Protein unter normoxischer Inkubation mit DMOG.

Humane THP-1-Zellen wurden für eine Stunde unter normoxischen Bedingungen mit und ohne 1 mM DMOG bzw. unter Hypoxie inkubiert. DMOG-Inkubation unter Normoxie sowie hypoxische Stimulation sorgen für eine Akkumulation des ICAM-1-Proteins. Aufgetragen wurden 50 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

DMOG-Inkubation führt zu einer Akkumulation des ICAM-1-Proteins, die allerdings noch etwas schwächer ausfällt als die hypoxisch induzierte Induktion der Proteinexpression. Ein Knock-down der Prolylhydroxylasen PHD-1 bzw.

PHD-2 kann ebenfalls eine Induktion der ICAM-1 mRNA unter normoxischen Bedingungen erzielen:

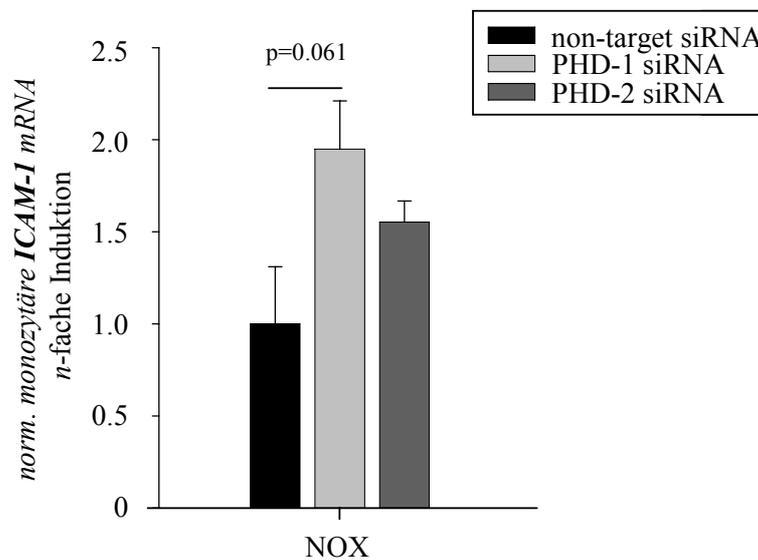


Abb. 4.2.32.: Knock-down von PHD-1 bzw. PHD-2 induziert die ICAM-1 mRNA.

Humane THP-1-Zellen wurden mittels Elektroporation mit non-target siRNA bzw. siRNA gegen PHD-1 oder PHD-2 transfiziert und unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Eine Hemmung der PHD-1 induziert die ICAM-1 mRNA in stärkerem Maße als der PHD-2 Knock-down, in beiden Fällen ist jedoch bereits unter Normoxie eine Induktion der ICAM-1 mRNA erkennbar (Mittelwerte \pm SD; n=2).

Die Effizienz des PHD-Knock-downs wurde in beiden Fällen mittels mRNA-Analyse kontrolliert und konnte als signifikant bezeichnet werden.

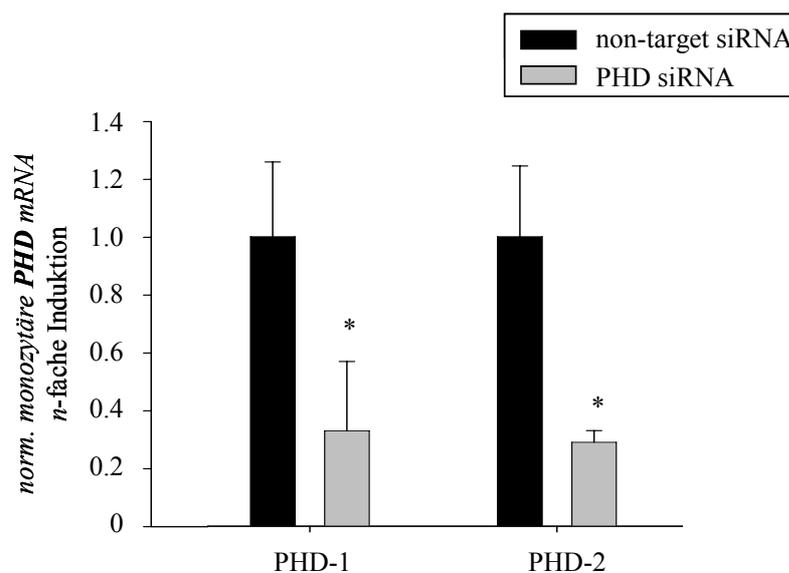


Abb. 4.2.33.: Knock-down-Kontrolle von PHD-1 bzw. PHD-2.

Humane THP-1-Zellen wurden mittels Elektroporation mit non-target siRNA bzw. siRNA gegen PHD-1 oder PHD-2 transfiziert. In beiden Fällen konnte der spezifische Knock-down als signifikant bezeichnet werden (Mittelwerte \pm SD; n=3).

In den letzten Jahren wurde eine direkte Beteiligung der Prolylhydroxylasen an der hypoxischen Aktivierung von NF- κ B postuliert (Cummins et al., 2006; Chan et al., 2009; Oliver et al., 2009). Aus diesem Grund wurde in THP-1-Zellen die nukleäre Lokalisation von p65, einem Mitglied des klassischen NF- κ B-Signalwegs, nach DMOG-Inkubation untersucht.

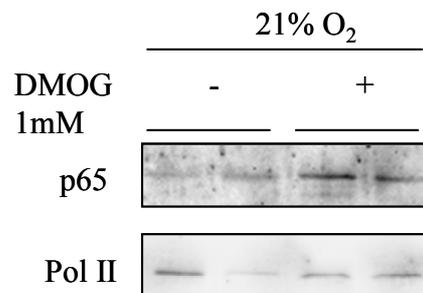


Abb. 4.2.34.: Normoxische Inkubation mit DMOG resultiert in einer vermehrten nuklearen Lokalisation von p65.

Humane THP-1-Zellen wurden für eine Stunde unter normoxischen Bedingungen mit und ohne 1 mM DMOG inkubiert. Dies hat eine vermehrte Nachweisbarkeit von p65 im Nukleus der Zelle zur Folge. Aufgetragen wurden 30 μ g Protein (Kernextrakt).

Wie in Abb. 4.2.38. erkennbar ist, ließ sich mittels DMOG-Stimulation eine vermehrte nukleare Lokalisation des NF- κ B-Mitglieds p65 induzieren. Daraufhin wurden in einem anderen Versuchsansatz THP-1-Zellen mit 10 nM Bortezomib (15 min) inkubiert, bevor sie in den Versuch gegeben wurden. Bortezomib ist ein Proteasomeninhibitor, der in der Anfangsphase nach der Inkubation für eine Akkumulation des HIF-Proteins sorgt. Gleichzeitig hemmt er mit unterschiedlicher Spezifität die Mitglieder der NF- κ B-Familie, vor allem die Untereinheit p65. Es ist bekannt, dass p65 an den ICAM-1-Promotor binden kann (van Wissink et al., 1997), daher sollte dieser Versuch dazu dienen zu ermitteln, ob die Regulation des monozytären ICAM-1 im vorliegenden Fall ebenfalls p65 unterliegt. Die Vorinkubation mit Bortezomib beeinflusst die ohnehin kaum vorhandene Adhäsion unter Normoxie nicht und ist darüber hinaus in der Lage, die Adhäsion der Monozyten unter Hypoxie komplett zu verhindern.

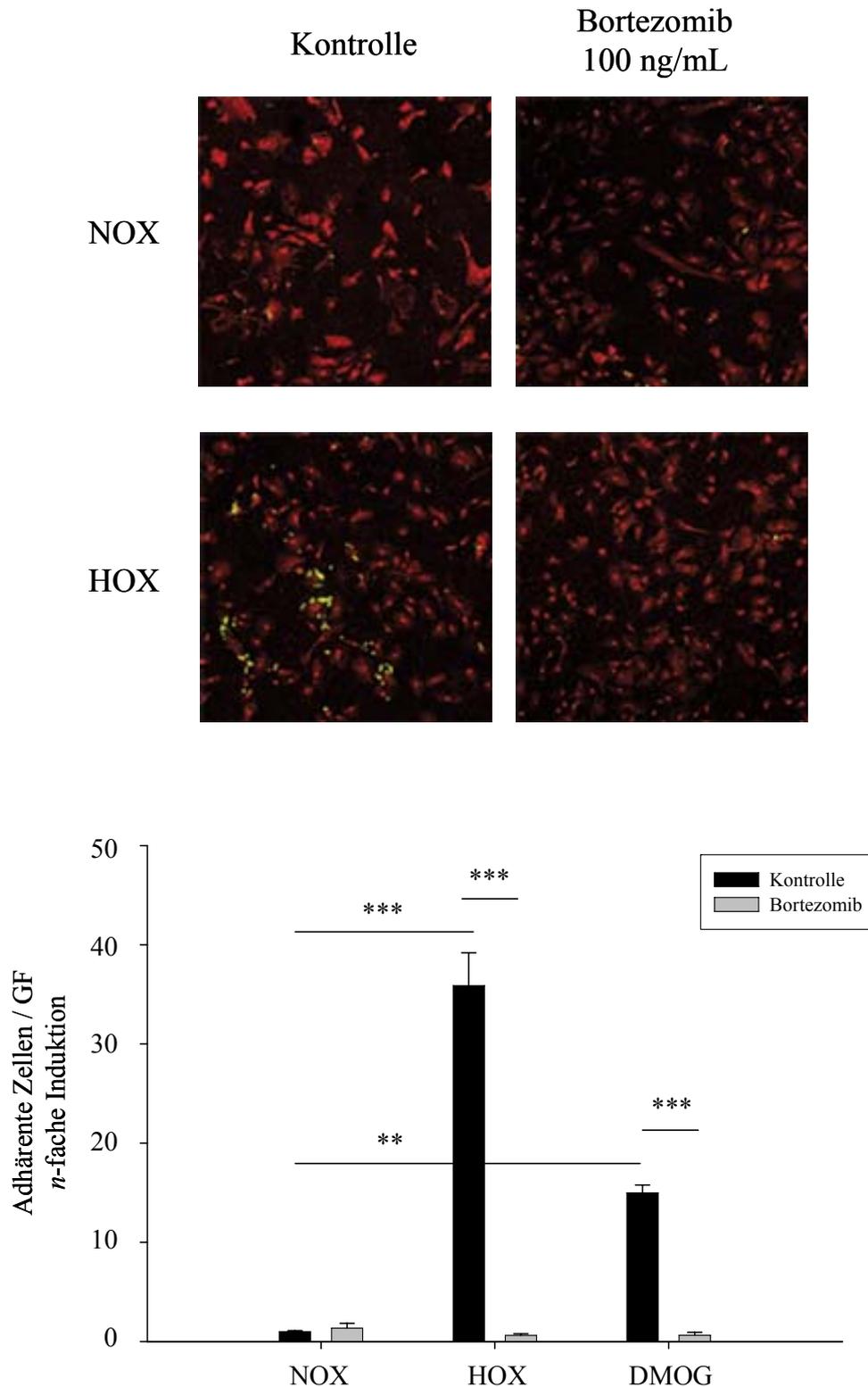


Abb. 4.2.35.: Auswirkungen der Vorinkubation von Monozyten mit Bortezomib auf das das Adhäsionsverhalten humaner THP-1-Zellen.

Humane THP-1-Zellen (grün) wurden vor dem Cokulturversuch (2h, 21% bzw. 0.1% O₂) mit HUVEC-Zellen (rot) für 15 min mit 10 nM Bortezomib vorinkubiert. Dies verhindert die hypoxische Induktion wirksam (10fache Vergrößerung, gezeigt ist je ein repräsentatives Bild aus n=4). Die numerische Auswertung der adhärenen Monozyten ergab eine signifikant verminderte Adhäsion nach Bortezomib-Inkubation, die sowohl den hypoxischen Stimulus als auch die DMOG-Inkubation dominiert (Mittelwerte ± SD; n=4).

Zur Verdeutlichung der Wirkung von Bortezomib auf HIF-1 α bzw. p65 wurde eine Western Blot Analyse der Proteinexpression beider Transkriptionsfaktoren nach Bortezomib-Inkubation durchgeführt:

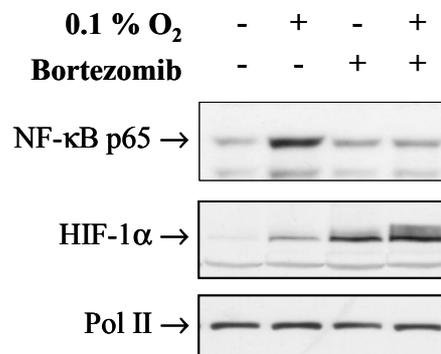


Abb. 4.2.36.: Veränderungen der Proteinexpression von p65 bzw. HIF-1 α in humanen THP-1-Zellen nach Bortezomib-Inkubation.

Humane THP-1-Zellen wurden für zwei Stunden mit und ohne 10 nM Bortezomib unter 21% bzw. 0.1% O₂ inkubiert. Hypoxie führt zu einer Akkumulation beider Transkriptionsfaktoren, Bortezomib verhindert die hypoxische Akkumulation von p65 und induziert die des HIF-1 α -Proteins. Aufgetragen wurden 30 μ g Protein (Kernextrakte).

Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit eine Inkubation mit Bortezomib die ICAM-1 mRNA-Expression beeinflussen kann.

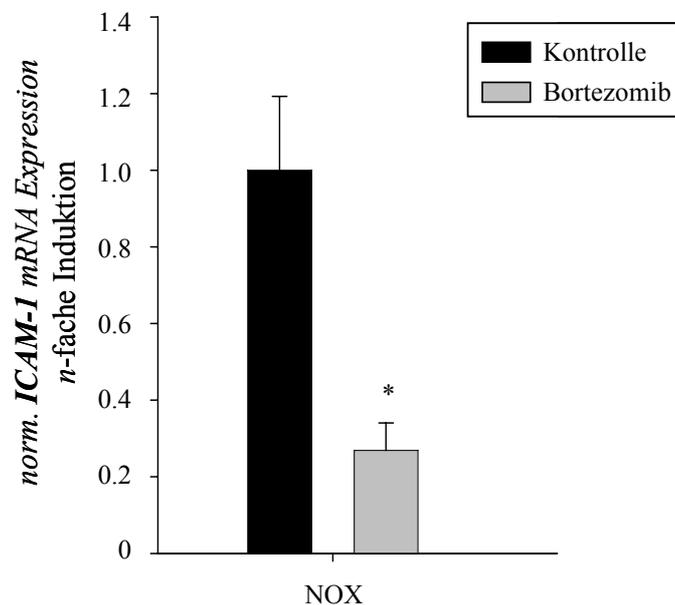


Abb. 4.2.37.: Veränderungen ICAM-1 mRNA-Expression in humanen THP-1-Zellen nach Bortezomib-Inkubation.

Humane THP-1-Zellen wurden für zwei Stunden mit und ohne 10 nM Bortezomib unter 21% O₂ inkubiert. Bortezomib vermindert die Expression der ICAM-1 mRNA signifikant (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Eine zweistündige Inkubation undifferenzierter THP-1-Zellen mit 10 nM Bortezomib reduziert hierbei signifikant die Expression der ICAM-1 mRNA.

4.2.7 Auswirkungen von Hypoxie und LPS-Inkubation auf die Expression von endotheliale ICAM-1 in HUVEC-Zellen

Nachdem die Expression des monozytären ICAM- unter Hypoxie bzw. LPS eingehend betrachtet wurde, sollten die LPS- bzw. Hypoxie-induzierten Veränderungen in der endothelialen ICAM-1-Expression ebenfalls kurz beleuchtet werden. Dazu wurden frisch isolierte HUVEC-Zellen (human umbilical vein cord endothelial cells) verwendet. Zunächst wurden die Zellen für vier Stunden unter normoxischen Bedingungen mit 1 µg/mL LPS stimuliert.

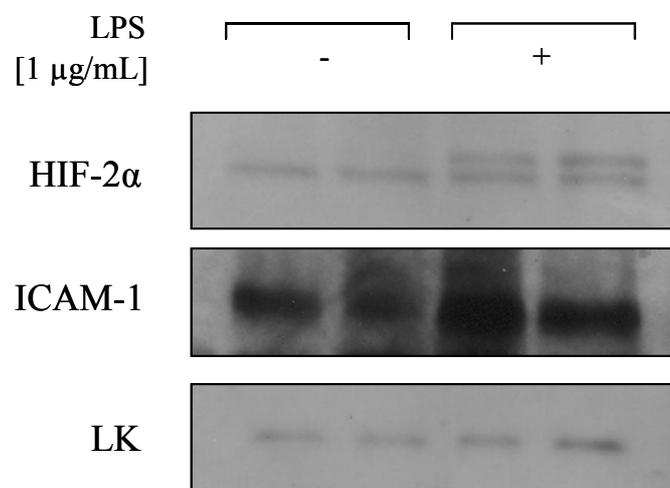


Abb. 4.2.38.: Veränderungen in der HIF-2α bzw. ICAM-1-Proteinexpression nach LPS-Stimulation in HUVEC-Zellen.

HUVEC-Zellen wurden für vier Stunden unter normoxischen Bedingungen mit 1 µg/mL LPS inkubiert. Es resultieren eine Induktion des HIF-2α Proteins sowie zu eine vermehrte Akkumulation von ICAM-1. Aufgetragen wurden 50 µg Protein (Gesamtzelllysat).

Eine vierstündige Inkubation mit LPS führt in HUVEC-Zellen zur Ausbildung einer Doppelbande beim Transkriptionsfaktor HIF-2α sowie zu einer Akkumulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1. Im Anschluss daran wurden die Auswirkungen einer einstündigen Inkubation mit DMOG auf die Expression der HIF-Proteine und des ICAM-1 untersucht. Hierbei fand sich eine eindeutige Induktion der HIF-1/2α-Untereinheiten mit DMOG; nach einer Stunde konnte unter 0.1% Sauerstoff noch keine hypoxische Induktion der Proteine festgestellt werden. Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 ist in HUVEC-Zellen, anders als in THP-1-Zellen, nach einstündiger Inkubation mit DMOG nicht eindeutig verändert.

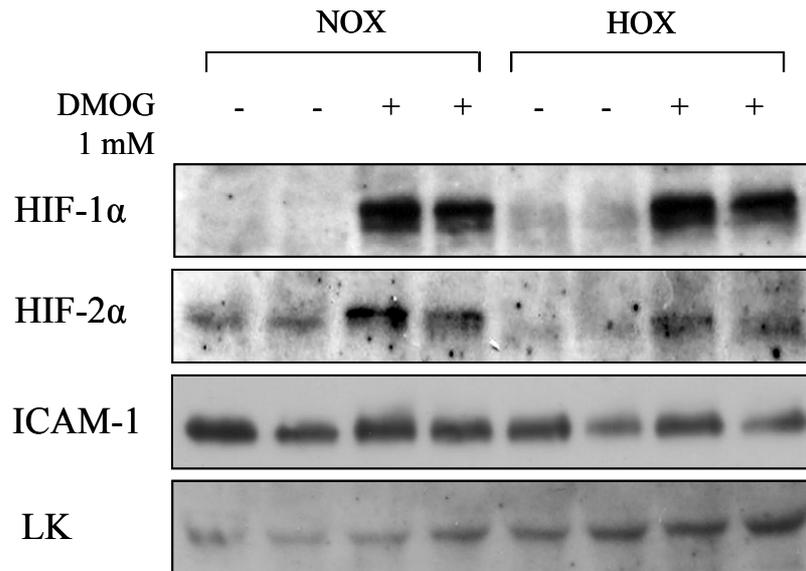


Abb. 4.2.39.: HIF-1/2 α - sowie ICAM-1-Proteinexpression in HUVEC-Zellen nach Behandlung mit 1mM DMOG und schwerer Hypoxie.

HUVEC-Zellen wurden für eine Stunde bei 21% bzw. 0.1% O₂ mit und ohne 1mM DMOG inkubiert. Es resultiert eine Akkumulation der HIF-Untereinheiten nach DMOG-Inkubation; die hypoxische Induktion ist nur bei HIF-1 α erkennbar. DMOG und schwere Hypoxie rufen in HUVEC-Zellen keine eindeutigen Veränderungen der ICAM-1-Expression hervor. Aufgetragen wurden 50 μ g Protein (Gesamtzelllysat).

Im Anschluss daran wurden die ICAM-1-Expression und deren Verteilung innerhalb der Zelle mittels Immunfluoreszenz untersucht. Hierzu wurden die Endothelzellen zunächst für unterschiedliche Zeitabschnitte mit LPS inkubiert. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde eine ähnliche Zeitreihe durchgeführt um die Auswirkungen schwerer Hypoxie auf intrazelluläre Expressionsveränderungen des Adhäsionsmoleküls zu untersuchen.

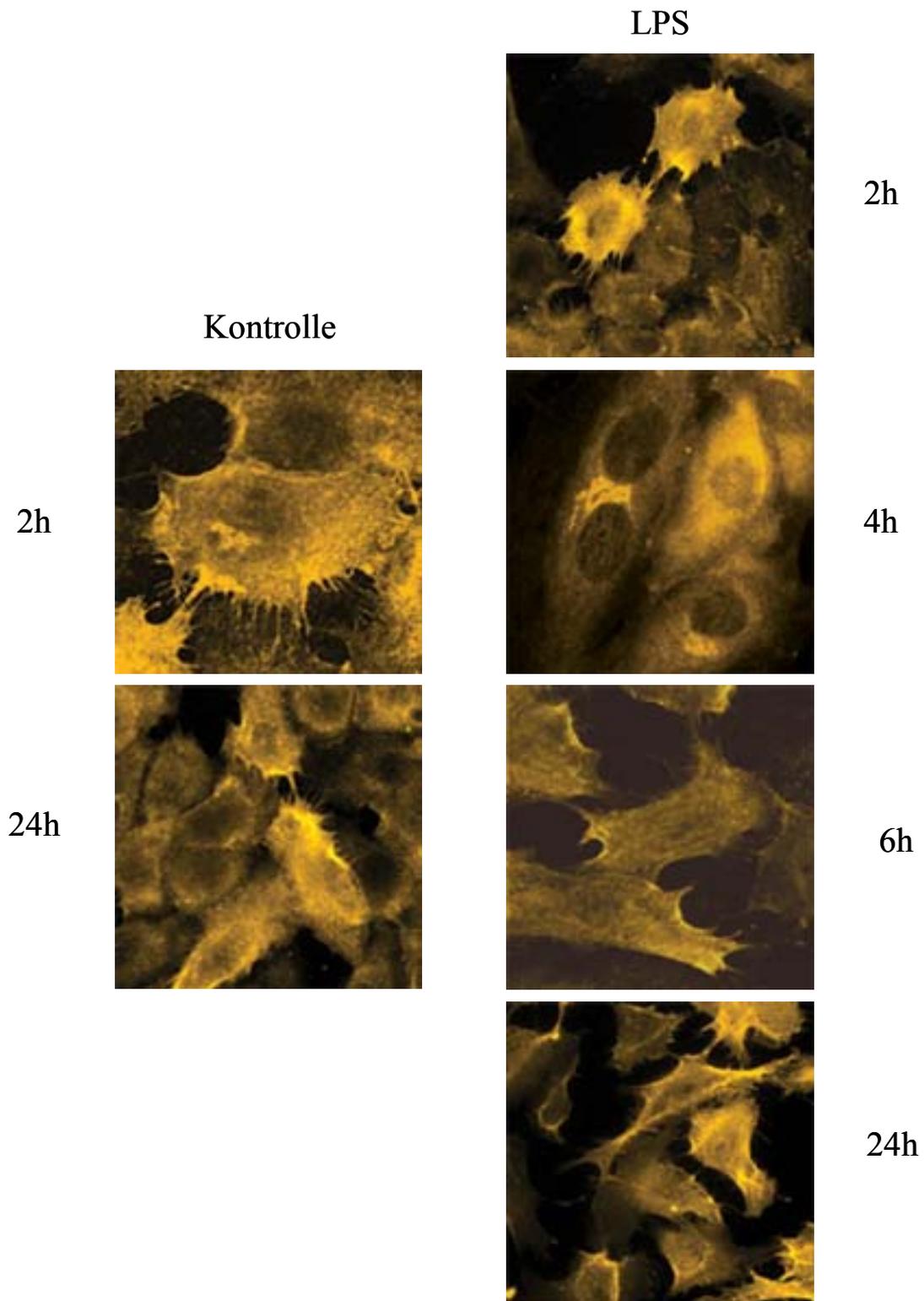


Abb. 4.2.40.: Zeitreihe zur LPS-Inkubation von HUVEC-Zellen und deren Auswirkungen auf die Expression des ICAM-1 Proteins innerhalb der Zelle.

HUVEC-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitabschnitte mit jeweils 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Nach vier Stunden ist eine eindeutige Expressionssteigerung im Bereich des endoplasmatischen Retikulums erkennbar. Nach sechsständiger Inkubation mit LPS findet sich die stärkste ICAM-1-Expression an den Rändern der Zelle. Nach 24h ist dies ebenfalls noch der Fall, die Zell-Zellkontakte sind allerdings bereits sichtlich gelöst und die Zellvitalität scheint herabgesetzt (63fache Vergrößerung, Färbung mit Alexa 546, gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild aus $n=6$).

Die Inkubation von HUVEC-Zellen mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS führt nach vier Stunden zu einer eindeutigen Expressionssteigerung des ICAM-1-Proteins, die zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich lokal begrenzt auf das endoplasmatische Retikulum der Zelle vorliegt. Dies lässt sich einer Neusynthese des ICAM-1-Proteins zuordnen. Nach sechs Stunden befinden sich die größten Anteile des Adhäsionsproteins bereits an ihrem Bestimmungsort an der Zelloberfläche. Dies ist nach 24stündiger LPS-Inkubation immer noch der Fall, allerdings findet sich hier eine zunehmende Auflösung der Zell-Zell-Kontakte. Die starke Vernetzung der Zellen untereinander, wie sie in den Kontrollen zu sehen ist, ist beinahe vollständig aufgehoben. Darüber hinaus finden sich viele Zellen, die unter dem Mikroskop einen regelrecht „perforierten“ Eindruck machen, das heißt offensichtlich an Zellvitalität verlieren. Die Gesamtintensität der Fluoreszenz ist jedoch noch nicht merklich vermindert. Inkubiert man dagegen HUVEC-Zellen unter schwerer Hypoxie findet sich keine ausgeprägte Neusynthese des ICAM-1-Proteins, im Gegenteil, die Intensität der Fluoreszenz nimmt sehr schnell ab. Auffällig ist hierbei, dass die Zeitspanne, bis die Zellen die Zell-Zell-Kontakte verlieren und apoptotisch werden, in diesem Fall deutlich kürzer ist. Bereits nach sechsständiger Inkubation bei 0.1% O_2 tritt wiederum eine „Perforation“ der Zellen ein, die Gesamtintensität der ICAM-1-Fluoreszenz ist merklich gesunken. Das verbleibende ICAM-1-Protein ist allerdings auch hier in der Nähe der Zelloberfläche lokalisiert.

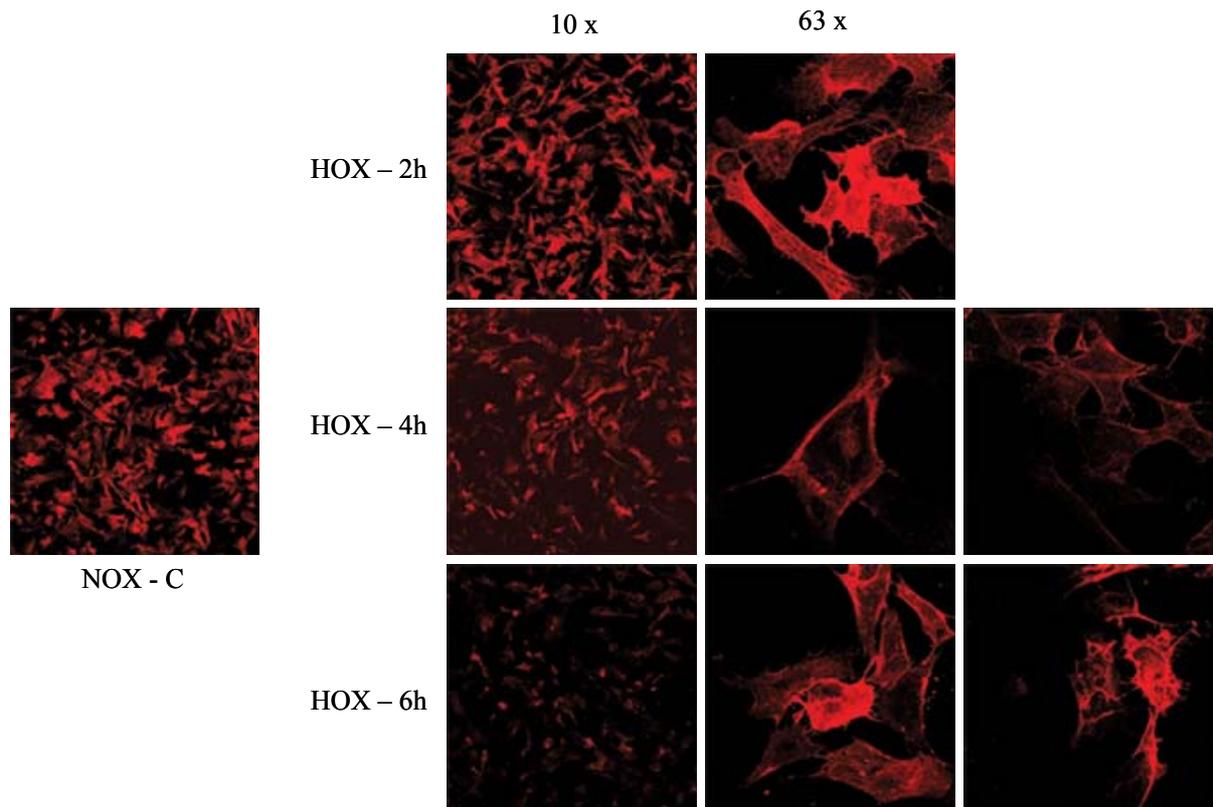


Abb. 4.2.41.: Veränderungen in der ICAM-1-Expression innerhalb der Zelle in HUVEC-Zellen bei Inkubation unter schwerer Hypoxie.

Humane Nabelschnurendothelzellen wurden für unterschiedliche Zeitabschnitte unter 0.1% O₂ inkubiert. Die Fluoreszenzintensität lässt bereits nach 4h merklich nach, sechsstündige Inkubation unter schwerer Hypoxie beeinträchtigt die Zellvitalität in hohem Maße. Die höchste Intensität der Fluoreszenz findet sich bis zuletzt an den Außenbereichen der Zelle (10fache bzw. 63fache Vergrößerung, Färbung mit Alexa 568, gezeigt wird jeweils ein repräsentatives Bild aus n=6).

4.3 Auswirkungen der LPS-Vorbehandlung auf die Interaktion zwischen Monozyten und Endothel

Abschließend wurde noch untersucht, inwieweit eine 24stündige Vorinkubation mit 0.05 ng/mL LPS in undifferenzierten THP-1-Zellen das Adhäsionsverhalten an Endothelzellen beeinflusst. Dazu wurde zunächst die ICAM-1-Expression in THP-1-Zellen analysiert, die mit und ohne geringe LPS-Dosierungen vorbehandelt worden waren.

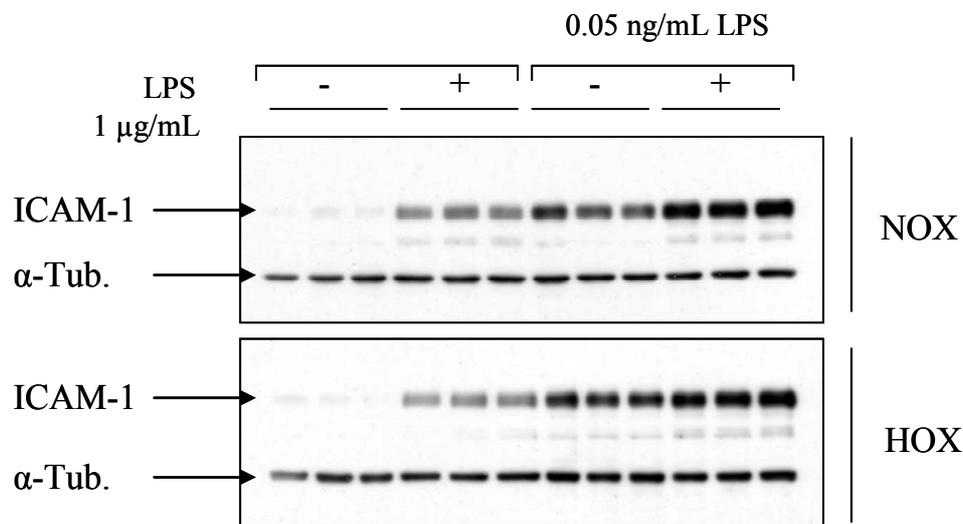


Abb. 4.3.1.: ICAM-1-Proteinexpression in humanen THP-1-Zellen mit und ohne LPS-Vorbehandlung.

Humane THP-1-Zellen wurden zunächst für 24h mit und ohne 0.05 ng/mL LPS inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine sechsstündige Inkubation mit und ohne 1 µg/mL LPS unter normoxischen bzw. hypoxischen (3% O₂) Bedingungen. Die Vorinkubation mit geringen LPS-Dosen resultiert in einer starken Akkumulation des ICAM-1-Proteins, die sogar größer ist als nach der Akutinkubation mit großen Mengen LPS. Die stärkste Akkumulation findet sich nach Vorinkubation und erneutem LPS-Stimulus. Gemäßigte Hypoxie hat keinen Einfluss auf die ICAM-1-Proteinakkumulation. Aufgetragen wurden 75 µg Protein (Gesamtzelllysat).

Eine Inkubation mit geringen LPS-Mengen führt bereits zu einer verstärkten Akkumulation von ICAM-1. Diese ist in humanen THP-1-Zellen sogar deutlicher ausgeprägt als nach einer akuten Stimulation mit einer sehr hohen LPS-Dosierung. Die stärkste Akkumulation des ICAM-1-Proteins erhält man nach 24stündiger Inkubation mit 0.05 ng/mL LPS und anschließender Akutstimulation mit hoher LPS-Dosierung. Hierbei macht es keinerlei Unterschied in der ICAM-1-Expression, ob die Akutstimulation unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen stattfindet. Analog zu diesem

Proteinversuch wurden auch die mRNA-Veränderungen des Adhäsionsmoleküls untersucht.

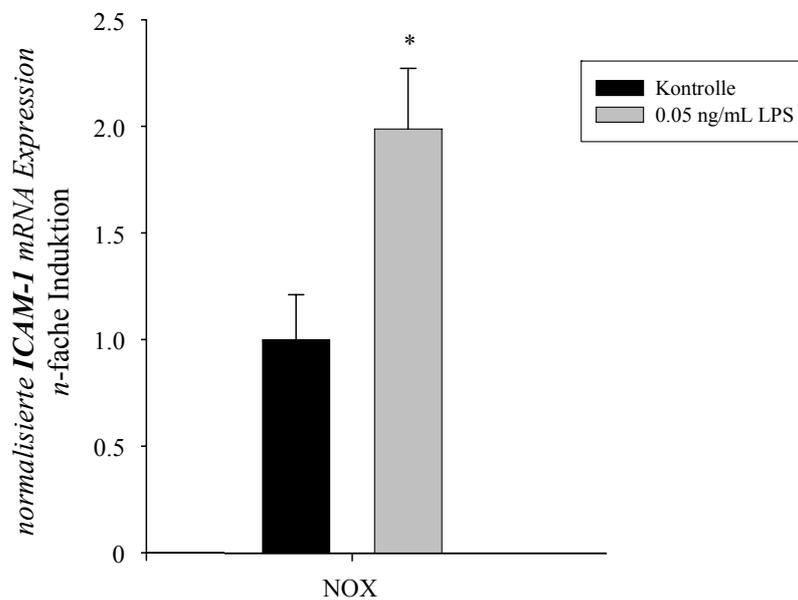


Abb. 4.3.2.: Veränderungen der ICAM-1-mRNA in humanen THP-1-Zellen nach Vorinkubation mit geringen LPS-Dosierungen.

Humane THP-1-Zellen wurden für 24h mit 0.05 ng/mL LPS inkubiert. Die Vorinkubation mit geringen LPS-Dosen führt zu einer signifikanten Induktion der mRNA (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Eine Vorinkubation von humanen THP-1-Zellen mit 0.05 ng/mL LPS führt zu erhöhter Basalexpression der ICAM-1 mRNA.

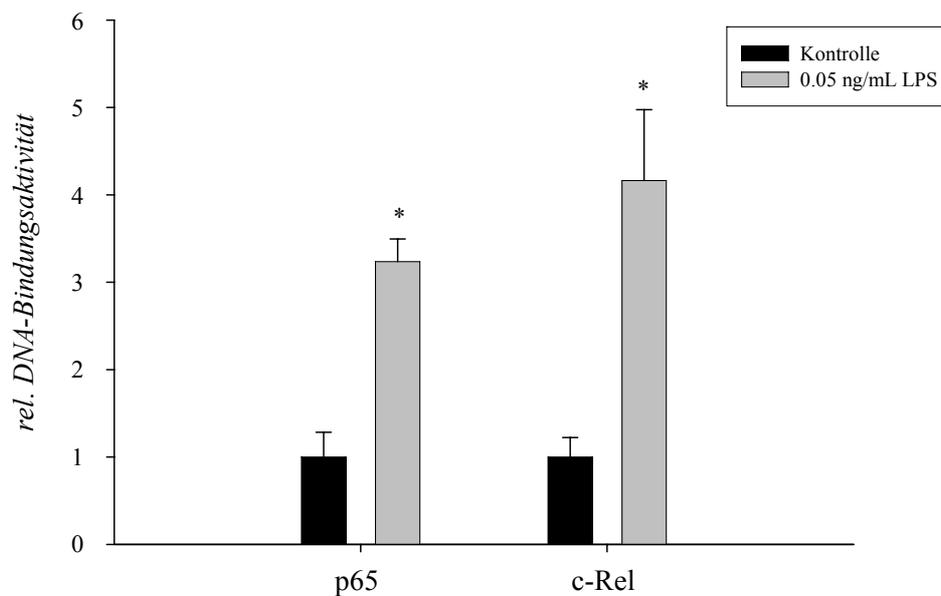


Abb. 4.3.3.: DNA-Bindungsassay für p65 und c-Rel nach Vorinkubation mit geringen LPS-Dosierungen.

THP-1-Zellen wurden für 24h mit und ohne 0.05 ng/mL LPS vorinkubiert. Die isolierten Kernextrakte wurden mittels NF- κ B-Bindungsassay der Firma ActiveMotif untersucht. Man erhält für beide Proteine eine signifikant gesteigerte DNA-Bindungsaktivität nach LPS-Vorbehandlung (Mittelwerte \pm SD; n=4).

Im Anschluss an diese Versuche wurde ein NF- κ B-Bindungsassay für die NF- κ B- Mitglieder p65 und c-Rel durchgeführt, von denen man annimmt, dass sie an der Induktion der ICAM-1 mRNA beteiligt sind. Auf diese Weise ließ sich für beide Mitglieder der NF- κ B-Familie eine signifikant gesteigerte DNA-Bindungskapazität nach LPS-Vorbehandlung feststellen. Zum Abschluss wurden nun noch die Auswirkungen einer Vorbehandlung von THP-1-Zellen mit geringen LPS-Dosierungen auf das Adhäsionsverhalten der Zellen untersucht. LPS-vorbehandelte Zellen weisen eine deutlich vermehrte Adhäsion an Endothelzellen auf.

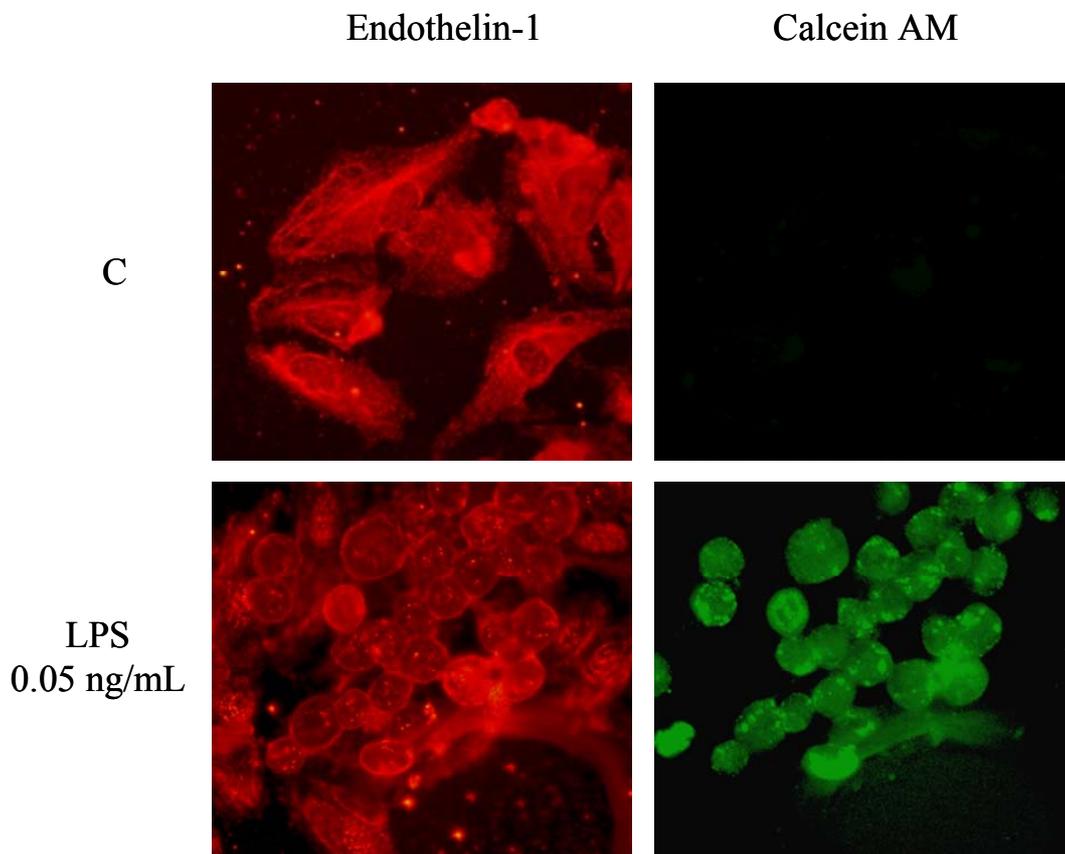


Abb. 4.3.4.: Adhäsionsverhalten un behandelter und LPS-vorbehandelter THP-1-Zellen.

Humane THP-1-Zellen (grün) wurden für 24h mit und ohne 0.05 ng/mL LPS inkubiert und anschließend 2h unter normoxischen Bedingungen mit HUVEC-Zellen (rot) kokultiviert. Unbehandelte Monozyten adhäreren unter Normoxie nicht, die Vorbehandlung mit LPS führt jedoch zu deutlich gesteigerter Adhäsion ans Endothel (40fache Vergrößerung, Färbung mit CalceinAM und Alexa 568, gezeigt ist je ein repräsentatives Bild aus n=6).

5. Diskussion

Die Ergebnisse werden analog ihrer Darstellung im vorherigen Abschnitt in drei Teilen diskutiert, beginnend mit den Daten zur Etablierung der Endotoxintoleranz in humanen wie murinen Monozyten/Makrophagen. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse, die zur gesteigerten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen unter akuter Hypoxie erhalten werden konnten, kritisch betrachtet und in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet. Abschließend erfolgt die Diskussion der Daten zur gesteigerten monozytären Adhäsion nach Vorbehandlung mit sehr geringen LPS-Dosierungen.

5.1 Beeinflussung der HIF-1 α -Expression durch die Etablierung von Endotoxintoleranz

Die Etablierung von Endotoxintoleranz mittels Vorinkubation mit bakteriellen LPS resultiert *per definitionem* in der verminderten Freisetzung inflammatorischer Zytokine auf einen nachfolgenden LPS-Stimulus (Majetschak et al., 1997). Bereits in der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass diese verminderte Cytokinausschüttung in differenzierten THP-1-Zellen vorliegt, die für 48 Stunden mit 0.1 ng/mL LPS inkubiert wurden. Darüber hinaus konnte in endotoxintoleranten Zellen eine Reduktion der HIF-1 α mRNA- und Proteinexpression nachgewiesen werden.

Ausgehend von den zuvor erzielten Ergebnissen wurde zu Beginn der Experimente die LPS-Konzentration während der Präkonditionierungsphase auf 0.05 ng/mL gesenkt. Dies führte zu einer Optimierung der Ergebnisse bezüglich der verminderten HIF-Antwort. Unter hypoxischen Kontrollbedingungen weisen derart vorbehandelte Zellen unabhängig vom Schweregrad der Hypoxie eine gegenüber naiven THP-1-Zellen deutlich verminderte HIF-1 α Proteinakkumulation auf. Darüber hinaus findet sich eine verminderte Induzierbarkeit des HIF-1 α -Proteins nach erneuter LPS-Stimulation. Ähnliche Ergebnisse ließen

sich für die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen auch auf mRNA-Ebene erzielen, was im Einklang zu den Ergebnissen mit Frede et al. (2006) steht, die eine LPS-induzierte Regulation der HIF-1 α mRNA unter Beteiligung von NF- κ B publizierten. Während bei der Induktion der HIF-1 α mRNA unter Akutbehandlung mit LPS bekanntermaßen die Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalwegs von Bedeutung ist (Frede et al., 2006; BelAiba et al. 2007, Bonello et al., 2007), schreibt man bei der Etablierung von Endotoxintoleranz den Mitgliedern des alternativen NF- κ B-Zweigs die entscheidende Bedeutung zu (Yoza et al., 2006, West et al., 2002). Hierbei führt die Bindung an den Rezeptor (z.B. Leukotrienrezeptor) zu einer Aktivierung von NIK (NF- κ B-induzierende Kinase), die den inhibierenden Kinase-Komplex (IKK)- α an Serinketten phosphoryliert. Dies führt zur Freisetzung des Heterodimers p100/RelB. Die p100-Untereinheit wird sofort ubiquitinyliert und im Anschluss partiell zu einem kleineren Protein (dem NF- κ B-Mitglied p52) abgebaut. Das entstehende Dimer aus p52 und RelB wird in den Zellkern transloziert und entwickelt transkriptionelle Aktivität (Senfleben et al., 2002; Vallabhapurapu et Karin, 2009). Im Verlauf der Etablierung einer Endotoxintoleranz erfolgt die Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs, was dazu führt, dass in endotoxintoleranten Zellen erhöhte p52-Spiegel vorliegen (Wedel et al., 1999; Yoza et al., 2006). In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass in LPS-vorbehandelten THP-1-Zellen eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität für p52 vorliegt. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Transfektion mit siRNA gegen p100 vor Beginn der Vorinkubation mit geringen LPS-Dosierungen die Etablierung der Endotoxintoleranz wirksam verhindern kann. Als Folge fanden sich in diesen Zellen eine wiederhergestellte HIF-1 α Proteinmenge und sogar gesteigerte mRNA-Basalwerte. Über das humane Zellkulturmodell hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Etablierung der Endotoxintoleranz auch im murinen Modell und *in vivo* möglich ist. Die Peritonealmakrophagen, die aus Mäusen isoliert wurden, die nach dem

Toleranzprotokoll behandelt worden waren, wiesen gegenüber denen, die aus Kontrolltieren gewonnen werden konnten, deutlich verminderte HIF-1 α Proteinmengen auf. Darüber hinaus war auch die Menge der HIF-1 α mRNA gegenüber der Kontrolle signifikant reduziert. Als Konsequenz aus der verminderten Fähigkeit zur HIF-Proteinakkumulation fand sich in Peritonealmakrophagen aus endotoxintoleranten Mäusen eine signifikant reduzierte Expression der HIF-Zielgene ADM und Glut-1. Die Etablierung von Endotoxintoleranz führt also sowohl *in vitro* in humanen THP-1-Zellen als auch *in vivo* in murinen Peritonealmakrophagen zu einer Reduktion der Basalwerte der HIF-1 α mRNA. Als Folge daraus wird signifikant weniger Protein translatiert, was für den Stoffwechsel der Zelle weitreichende Folgen hat. Zieht man dies alles in Betracht, kann die Etablierung von Endotoxintoleranz in Monozyten und Makrophagen also als ein funktioneller HIF-1 α Knock-down betrachtet werden.

In vivo ist der Ablauf zur Etablierung der Endotoxintoleranz nach dem vorliegenden Versuchsschema eher unwahrscheinlich. Monozyten differenzieren erst zu Makrophagen, nachdem sie ins Gewebe ausgewandert sind. Dieses ist in Relation zum Gefäßnetz als hypoxisch zu bezeichnen. Sollten sie also im Verlauf ihrer Migration zum Wundherd zunächst auf geringe LPS-Dosen treffen, würde dies *in vivo* immer unter hypoxischen Bedingungen geschehen, die eine Akkumulation des HIF-1 α Proteins hervorrufen würden. Zur Annäherung an die *in vivo* Situation wurden Versuche durchgeführt, in denen das HIF-1 α Protein während der Toleranzentwicklung stabilisiert wurde. Dies geschah zum einen mittels Inkubation der Zellen mit DMOG, einem Hemmstoff der Prolylhydroxylasen, die den Abbau von HIF unter normoxischen Bedingungen induzieren, zum anderen mittels LPS-Vorbehandlung unter hypoxischen Bedingungen. Hierbei wurde deutlich, dass eine Zugabe von DMOG während der gesamten Vorinkubation sowie im Akutversuch die Etablierung der Endotoxintoleranz und deren Auswirkungen auf das HIF-

System nicht beeinflussen konnte. DMOG-behandelte naive THP-1-Zellen akkumulierten deutlich mehr Protein als unbehandelte Monozyten. Zellen, die jedoch unter DMOG-Zugabe dem Endotoxintoleranzprotokoll unterzogen wurden, wiesen eine gegenüber der Kontrolle verminderte Akkumulation der HIF-1 α Untereinheit auf. Nach 24stündiger Vorinkubation mit 0.05 ng/ml LPS bei 3% O₂ und anschließendem Akutversuch unter Hypoxie konnte keine Verminderung der HIF-Akkumulation gegenüber den naiven Zellen festgestellt werden. Unter allen Versuchsbedingungen fand sich sowohl in naiven als auch in vorbehandelten THP-1-Zellen eine maximale Akkumulation des HIF-1 α -Proteins, LPS führte zu keiner weiteren Steigerung mehr. Betrachtet man in diesem Versuch die Veränderungen der HIF-1 α -mRNA, so war bezüglich der Kontrolle keine Verminderung in LPS-vorbehandelten Zellen erkennbar, unabhängig davon, ob der Akutversuch unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen durchgeführt wurde. Die LPS-Induktion der HIF-1 α mRNA schien in den vorbehandelten Zellen leicht vermindert, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Auch an der mRNA-Expression des HIF-Zielgens ADM ließ sich erkennen, dass die LPS-Vorbehandlung unter Hypoxie nicht zu dem zuvor erreichten funktionalen HIF-1 α Knock-down führen konnte. Im anschließenden normoxischen Versuch zeigte die ADM mRNA-Expression zwar wieder Ähnlichkeiten zum Standardprotokoll, im wesentlichen Folgeversuch unter Hypoxie ergab sich jedoch eine generell gesteigerte ADM-Expression. Die Induktion der mRNA durch LPS blieb in den vorbehandelten Zellen nicht nur erhalten, sondern war gegenüber den naiven Zellen sogar noch gesteigert. Betrachtete man im Anschluss daran noch die mRNA-Veränderungen des inflammatorischen Zytokins IL-1 β , ließ sich hier die Ursache für das veränderte Expressionsverhalten von HIF-1 α und ADM mRNA finden: Die Zellen wiesen nach 24stündiger Inkubation mit 0.05 ng/mL LPS unter 3% O₂ keine Merkmale einer Endotoxintoleranz auf. Nicht eindeutig geklärt werden konnte in diesem Zusammenhang, ob dies an der gegenüber dem Ursprungsprotokoll verkürzten

Zeitdauer liegen könnte oder an der hypoxischen Umgebung. Sowohl Hypoxie als auch das zuvor verwendete DMOG beeinflussen nicht nur das HIF-Protein, sondern auch die Stabilität der einzelnen Mitglieder der NF- κ B-Familie. Die hypoxische Inkubation soll hierbei hauptsächlich den klassischen NF- κ B-Signalweg betreffen (Oliver et al., 2009). Dieser beginnt mit der Aktivierung eines geeigneten Rezeptors (im Falle des LPS ist dies TLR4, möglich sind jedoch auch andere TLRs sowie eine Bindung von inflammatorischen Zytokinen an z.B. den IL-1R oder den TNF-R) und führt zunächst zur Aktivierung des IKK (Inhibitor of κ B-Kinase)-Komplexes. Dieser phosphoryliert I κ B, welcher das Heterodimer aus p65 und p50 im Cytosol festhält. Als Folge der Phosphorylierung wird I κ B ubiquitinyliert, das NF- κ B-Dimer ist nun in der Lage in den Nukleus zu translozieren und transkriptionell aktiv zu werden. Für die Induktion von NF- κ B unter Hypoxie werden verschiedene Angriffspunkte innerhalb des Signalwegs für wahrscheinlich gehalten: seit bereits mehr als einem Jahrzehnt ist bekannt, dass schwere Hypoxie zur Phosphorylierung von Tyrosinresten am I κ B α führt (Koong et al., 1994). Der vermehrte Abbau des I κ B führt dann zu einer NF- κ B-Aktivierung und vermehrter Zielgenexpression. Darüber hinaus sind auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die hypoxisch-induzierbaren Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sowie PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) in der Lage, eine verstärkte NF- κ B-Aktivierung auszulösen (Chandel et al., 2000; Zampetaki et al., 2004). Eine direkte Verbindung der hypoxischen NF- κ B-Induktion zu einem Sauerstoffsensoren in der Zelle konnten jedoch erst Cummins et al. im Jahre 2006 herstellen. Ihren Erkenntnissen zufolge wird der IKK-Komplex, genauer IKK- β , von den unter normoxischen Bedingungen aktiven Prolylhydroxylasen PHD-1 und PHD-2 hydroxyliert. Dies führt zu einer Hemmung des Enzyms, was wiederum einen Abbau von I κ B verhindert und die nukleäre Translokation von p65/p50 reduziert. Unter Hypoxie ist die Aktivität der PHDs herabgesetzt, was zu einer verminderten Hydroxylierung von IKK- β führt. Die Kinase wird dadurch

enthemmt und markiert I κ B für die proteasomale Degradation. Es resultiert eine vermehrte NF- κ B-Aktivierung. Diesen Effekt erzielten Cummins et al. ebenfalls durch eine kurzzeitige Inkubation mit 1 mM DMOG. Verglichen mit diesen Daten sollten Hypoxie und DMOG also sowohl die Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalwegs wie auch die Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins betreffend die gleiche Wirkung entfalten. Die Tatsache, dass dies im vorliegenden Versuch nicht der Fall ist, könnte zum einen in der niedrigeren Dosierung des DMOG begründet sein. Diese könnte unter Umständen nicht in der Lage gewesen sein, eine ausreichende Hemmung der PHDs zu erreichen. Allerdings resultierte eine deutliche detektierbare HIF-1 α -Akkumulation in den DMOG-behandelten Zellen. Eine höhere Konzentration hätte die Zellen darüber hinaus auf die lange Versuchsdauer gesehen zu sehr geschädigt um noch verwertbare Ergebnisse erzielen zu können. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass Hypoxie während der Präkonditionierungsphase die Akkumulation von p52/RelB-Einheiten und/oder deren DNA-Bindung verhindert. Dies stünde allerdings im Widerspruch zu den kürzlich veröffentlichten Ergebnissen von Oliver et al. (2009), die unter Hypoxie zwar eine Aktivitätssteigerung der klassischen NF- κ B-Mitglieder nachweisen konnten, jedoch keine Regulation der Proteine des alternativen Signalwegs. Denkbar scheint eine klassische NF- κ B-Aktivierung, die über die Induktion des alternativen Zweigs hinausgeht, oder eine aufgrund der kürzeren Vorinkubation noch nicht eingetretene Aktivierung des alternativen Signalwegs.

Die Etablierung von Endotoxintoleranz verändert den Stoffwechsel einer Zelle maßgeblich. Eine verminderte Expression von HIF-1 α in Monozyten, deren Bestimmung es ist, in hypoxisches Gewebe einzuwandern, wirkt sich negativ auf deren Überlebensrate aus. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit in endotoxintoleranten THP-1-Zellen eine um etwa 30% verminderte Vitalität gegenüber naiven Zellen festgestellt werden. Dies könnte eine mögliche Ursache dafür darstellen, dass die Tendenz in extrazelluläre Matrix einzuwandern in

diesen Zellen ebenfalls vermindert ist. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Cramer et al. (2003), als sie das Verhalten HIF-1 α -defizienter Leukozyten aus sogenannten LysM-Mäusen untersuchten, in denen die Zellen der myeloischen Reihe kein funktionelles HIF-1 α aufweisen. Diesen Zellen fehlt die Möglichkeit, auf einen inflammatorischen Stimulus eine angemessene Immunantwort zu generieren. So weisen sie eine verminderte Infiltration in inflammatorisches Gewebe auf, die durch eine verminderte Adhäsion, Migration, Chemotaxis und Invasion in extrazelluläre Matrix bedingt ist (Cramer et al., 2003; Frede et al., 2009). Darüber hinaus konnten bezüglich des Phagozytoseverhaltens endotoxintoleranter Zellen jedoch keine Veränderungen gegenüber der naiven Kontrolle festgestellt werden. Dies steht ebenfalls im Einklang mit Ergebnissen von Cramer et al. (2003) und Peyssonnaud et al. (2005), die in HIF-1 α -defizienten Makrophagen ein unverändertes Phagozytoseverhalten, jedoch eine verminderte Fähigkeit zur Abtötung von Bakterien nachweisen konnten. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass die endotoxintoleranten Makrophagen auch bezüglich ihrer Vitalität unter Hypoxie, der Invasion in extrazelluläre Matrix und ihres Phagozytoseverhaltens keine Unterschiede zu Makrophagen aus HIF-1 α Knock-out-Tieren aufweisen. Dies unterstützt die Annahme, dass die Etablierung von Endotoxintoleranz in der Lage ist, in Makrophagen einen funktionellen HIF-1 α Knock-down hervorzurufen.

5.2 Auswirkungen akuter Hypoxie auf die Monozyten-Endothel-Interaktion

Der Vorgang der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen ist seit etwa 20 Jahren bis ins Detail erforscht, und die zugrunde liegende Adhäsionskaskade wird stetig besser verstanden und um weitere Moleküle ergänzt. Seit langem bekannt ist auch das so genannte Interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM)-1 (Rothlein et al., 1986). Es wird hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert, findet sich jedoch auch auf den meisten Leukozyten und auf Fibroblasten (Panès et al., 1999; Smith 2008). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass auch THP-1-Zellen ICAM-1 exprimieren und dass dieses sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mittels LPS sehr stark und über einen langen Zeitraum hinweg induziert werden konnte. Die Basalexpression des Adhäsionsmoleküls war hierbei unabhängig vom Differenzierungsstatus der Zellen, nicht aber die LPS-Induzierbarkeit. Diese lag in den undifferenzierten Zellen etwa zehnmal höher als im makrophagen-ähnlichen Phänotyp. Die Rolle von ICAM-1 auf Leukozyten ist in der Vergangenheit streng auf die Aktivierung von T-Zellen limitiert gewesen. In diesem Kontext vermittelt ICAM-1 den Kontakt von der Antigen-präsentierenden Zelle mit der T-Zelle, indem es an LFA (Lymphocyte Function-related Antigen)-1 auf der T-Zelle bindet (Springer, 1990). Diese Funktion können differenzierte wie undifferenzierte THP-1-Zellen ausüben, sie erklärt jedoch nicht die deutlich stärkere LPS-Induzierbarkeit des Monozyten-artigen Phänotyps. Endotheliales ICAM-1 dagegen ist ein fester Bestandteil der Leukozyten-Adhäsionskaskade, die die Bindung der Immunzellen ans Endothel beschreibt (Butcher, 1991). Demzufolge lässt sich dieser Vorgang in drei Teile gliedern: Die Leukozyten werden zunächst in ihrer Strömung durch das Blutgefäß (in der Regel die postkapilläre Venole) verlangsamt und beginnen, vermittelt durch Selektin-abhängige affine Wechselwirkungen, auf dem Endothel entlang zu rollen. Im Anschluss daran erfolgt die Integrin-vermittelte feste Adhäsion ans Endothel, indem Wechselwirkungen zwischen leukozytären

Integrinen wie z.B. CD11b/CD18 (auch Mac-1, Monocyte adhesion complex-1, genannt) mit Immunglobulinen, z.B. ICAM-1, auf dem Endothel ausgebildet werden. Als letzter Schritt erfolgt die Diapedese; der Leukozyt wandert zwischen oder durch Endothelzellen hindurch und verlässt das Blutgefäß in Richtung Gewebe. Eine Rolle des monozytären ICAM-1 für die Adhäsionskaskade der Leukozyten ans Endothel ist bislang noch völlig unbekannt.

Neben der Expression des monozytären ICAM-1 wurde immer auch die des Integrins CD18 analysiert. Betrachtete man hier die LPS-Induzierbarkeit in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus, so wiesen die Monozyten eine etwa zweieinhalbfache Induktion der CD18 mRNA nach LPS-Stimulation auf, in makrophagenartig differenzierten THP-1-Zellen fand sich allerdings keine Induzierbarkeit mehr. Dies könnte darin begründet liegen, dass differenzierte Zellen *in vivo* erst nach der Extravasation zu finden sind und dass CD18, da es nicht an der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen beteiligt ist, dann für die Zellfunktion nur noch eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Darüber hinaus war auffällig, dass die CD18 mRNA in undifferenzierten THP-1-Zellen nach sechsständiger Inkubation bei 3% O₂ vermindert schien und dass die erzielbare LPS-Induktion ebenfalls hinter dem normoxischen Vergleichswert zurückblieb. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die Kong et al. (2004) erzielen konnten. Sie beschrieben eine hypoxische Induktion der CD18 mRNA und der Proteinexpression an der Zelloberfläche in U937 und frisch isolierten humanen Monozyten bei eben diesen Versuchsbedingungen. Was jedoch in weiteren Versuchen unsere Aufmerksamkeit auf sich zog, war die Tatsache, dass eine normoxische Inkubation undifferenzierter THP-1-Zellen mit 1 µg/mL LPS noch nicht zu einer Induktion der ICAM-1 mRNA führen konnte, während derselbe Versuch unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂) in einer fast 500fachen Steigerung der mRNA-Expression gegenüber der normoxischen Kontrolle resultierte. Dies führte dazu, die Expression von ICAM-1 unter schwerer, akuter

Hypoxie zu charakterisieren. Tatsächlich konnte bereits nach einer halbstündigen Inkubation bei 0.1% O₂ eine Induktion des ICAM-1 Proteins nachgewiesen werden. In einer anschließenden Reoxygenierungsphase unterlag das Protein nicht der Degradation, wurde also nicht sauerstoffabhängig wieder abgebaut. Betrachtete man im selben Versuch die mRNA-Veränderungen für ICAM-1, so ergab sich durch die hypoxische Inkubation auch eine signifikante Steigerung der mRNA. Reoxygenierung führte zu einer sichtbaren Verminderung der vorhergehenden Induktion und war gegenüber der normoxischen Kontrolle bereits nicht mehr signifikant verschieden. Dies legte eine direkte Beteiligung der umgebenden Sauerstoffkonzentration an der gesteigerten mRNA-Expression nahe. In weiteren Experimenten wurde nun untersucht, ob diese hypoxische Steigerung der ICAM-1-Expression die Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen beeinflussen kann. Dazu wurden die Monozyten unter normoxischen und hypoxischen (0.1% O₂) Bedingungen mit humanen primären Endothelzellen (HUVEC) sowie einer Rattenendothelzelllinie (EC52) inkubiert. Die Inkubation unter Hypoxie führte zu einer signifikant gesteigerten monozytären Adhäsion, die ihr Maximum nach zwei Stunden erreichte und dann gegenüber der normoxischen Kontrolle um den Faktor 50 erhöht war. Die hypoxische Adhäsion wurde mit der bereits gut untersuchten LPS-Stimulation verglichen und konnte hierbei als noch ausgeprägter charakterisiert werden. Die mRNA des Adhäsionsproteins CD18 veränderte sich auch bei dieser schweren Form von Hypoxie zu keinem Zeitpunkt der Cokulturversuche, wodurch eine Beteiligung dieses Moleküls an der Hypoxie-induzierten Adhäsion sehr unwahrscheinlich schien. Betrachtete man jedoch die mRNA-Veränderungen des ICAM-1, ging dem Maximum der Adhäsion zeitlich ein Maximum der mRNA-Expression dieses Adhäsionsmoleküls voraus. Die endotheliale ICAM-1-Expression hingegen blieb während der Cokulturexperimente unverändert, dies könnte auf einen Leukozyten-spezifischen Effekt hin deuten. Da die Rolle des monozytären

ICAM-1 in der Leukozyten-Adhäsionskaskade noch völlig unklar ist, gibt es auch keine Erkenntnisse über einen möglichen Bindungspartner auf den Endothelzellen. Springer schlug jedoch bereits 1990 eine Aggregation von ICAM-1-Homodimeren bei der Interaktion von dendritischen Zellen mit B-Lymphozyten vor (Springer, 1990). Aus diesem Grund führten wir Knock-down-Experimente sowohl für monozytäres als auch für endotheliales ICAM-1 durch. In beiden Fällen konnte hiermit die hypoxisch induzierte Adhäsionssteigerung verhindert werden. Dies legt zum einen eine wichtige Beteiligung von monozytärem ICAM-1 an der Hypoxie-induzierten Adhäsion nahe, zum anderen macht es endotheliales ICAM-1 zu einem sehr wahrscheinlichen Bindungspartner für das monozytäre Analogon. Im Folgenden wurden die Veränderungen in der HIF-1/2 α -Proteinexpression der Monozyten und Endothelzellen unter Cokulturbedingungen untersucht um die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für die massive Steigerung der Adhäsion unter Hypoxie zu untersuchen. Die Expression des HIF-1/2 α Proteins war in den Endothelzellen bereits nach einstündiger hypoxischer Cokultur merklich gesteigert und erreichte in beiden Fällen nach zwei Stunden, also zur Zeit der stärksten Adhäsion, ihr Maximum. Auffällig war die stärkere Akkumulation von HIF-1 α gegenüber dem homologen HIF-2 α , obwohl Endothelzellen in der Regel über deutlich mehr HIF-2 α verfügen. Dies könnte dafür sprechen, dass die Monozyten während der hypoxischen Cokultur inflammatorische Zytokine ausschütten, die sowohl die Expression des HIF-1 α -Proteins als auch dessen DNA-Bindungsaktivität zusätzlich induzieren könnten (Hellwig-Burgel et al., 1999; Frede et al., 2006, 2007). Dafür spräche auch die noch deutlich erkennbare HIF-1 α -Bande bei 24stündiger Cokultur unter Normoxie. Bezüglich der mRNA von HIF-1 α führte allerdings normoxische, kurzfristige Cokultur zu einem deutlichen Expressionsrückgang, was eine vermehrte Zytokinausschüttung zumindest zu diesem frühen Zeitpunkt unwahrscheinlich macht. Unter Hypoxie hingegen bewirkte die Cokultur einen Anstieg der HIF-1 α

mRNA gegenüber der hypoxischen Kontrolle, allerdings blieb die Expression immer noch unter dem normoxischen Kontrollwert. Eine Induktion des endothelialen HIF-1 α durch die Anwesenheit von Monozyten unter kurzfristiger Hypoxie sowie im normoxischen Langzeitversuch scheint also durchaus wahrscheinlich. Völlig anders stellte sich die HIF-2 α mRNA dar, die im Kurzzeit-Experiment unter normoxischen wie hypoxischen Bedingungen durch die Cokultur mit Monozyten eine deutliche Reduktion erfuhr. Dieses Ergebnis passt zur relativ geringen Proteinexpression des Transkriptionsfaktors. Denkbar wäre es also, dass die Cokultur mit Monozyten in der Rattenendothelzelllinie EC52 eine Expressions- und Aktivitätsverschiebung zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren auslöst: Während in der Monokultur von Endothelzellen vor allem HIF-2 α eine besondere Bedeutung in der Anpassung an hypoxische Umgebungsverhältnisse zukommt, könnte die Cokultur mit Immunzellen dazu führen, dass HIF-2 α nur noch eine untergeordnete Rolle einnimmt. Im Gegensatz dazu würde die Expression von HIF-1 α , also dem Transkriptionsfaktor, der einen entscheidenden Einfluss auf die inflammatorische Zellantwort ausübt, verstärkt.

Die HIF-1 α mRNA in humanen Monozyten blieb durch die Cokultur unverändert, die Expression des HIF-Zielgens ADM wurde allerdings allein durch die Cokultur unter normoxischen Bedingungen schon über die hypoxische Stimulation hinaus induziert. Cokultur unter Hypoxie steigerte diese Induktion nochmals deutlich. Auch dieser Befund spricht für eine zusätzliche Stimulation, die durch die Cokultur mit den Endothelzellen entsteht und über die hypoxische Induktion hinaus wirksam ist. In humanen Monozyten, die ohne Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, war bereits nach einer halben Stunde eine Akkumulation der nukleären HIF- α -Untereinheiten nachvollziehbar. Im Anschluss daran blieb noch zu klären, inwieweit die Veränderungen des HIF-1/2 α -Proteins die Expression des monozytären ICAM-1 unter Hypoxie beeinflussen könnten. Eine Inkubation der THP-1-Zellen mit dem Hemmstoff

Echinomycin führte zu einer verminderten Adhäsion ans Endothel, die Monozyten schienen in diesem Versuch jedoch in ihrer Vitalität eingeschränkt zu sein. Nach der Echinomycin-Inkubation wiesen die Zellen eine bereits mit bloßem Auge erkennbar veränderte Morphologie auf: Die Kugelstruktur der Monozyten war kaum noch vorhanden, die Zellen wirkten seltsam deformiert und vermittelten keinen vitalen Eindruck mehr. Darüber hinaus wurde im Western Blot nach Zugabe von Echinomycin eine verminderte HIF-1 α -Proteinakkumulation detektiert, obwohl diese durch eine Echinomycin-Inkubation mit der vorliegenden Konzentration nicht beeinflusst werden sollte. Auch dieser Befund stellt die Vitalität der Zellen in Frage. Die verminderte Adhäsion unter hypoxischen Bedingungen könnte also in einer reduzierten Vitalität begründet liegen. Eine Transfektion von THP-1-Zellen mit siRNA gegen HIF-1 α bzw. HIF-2 α führt nicht zu Veränderungen der ICAM-1 mRNA-Expression. Darüber hinaus wurde die monozytäre Adhäsion durch einen Knock-out des monozytären HIF-1 α nicht beeinflusst. Nachdem Hypoxie-induzierbare Faktoren also für die Regulation von monozytärem ICAM-1 keine entscheidende Rolle zu spielen schienen, musste ein anderer Transkriptionsfaktor für dessen Expressionssteigerung unter Hypoxie zuständig sein. Daher wurden THP-1-Zellen zunächst mit dem PHD-Hemmstoff DMOG (Dimethyloxallylglycin) inkubiert um hypoxische Bedingungen zu simulieren. Dabei erhielt man unter normoxischen Bedingungen eine Akkumulation des ICAM-1-Proteins, unter Hypoxie war die Akkumulation nach DMOG-Zugabe jedoch gegenüber der hypoxischen Kontrolle leicht vermindert. Die Zugabe von DMOG resultiert durch die Hemmung der PHD-Aktivität in einer vermehrten Akkumulation von HIF- α -Untereinheiten bereits unter normoxischen Bedingungen, da die Proteine nicht fortlaufend abgebaut werden (Jaakaola et al., 2001). Wie bereits erwähnt bestätigen jedoch neuere Erkenntnisse, dass die Hemmung der PHDs auch zu einer Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalwegs führen kann. Vor allem die Prolylhydroxylasen PHD-1 und PHD-2

sind offensichtlich in der Lage, den IKK-Komplex zu hydroxylieren, was diesen in seiner Aktivität hemmt (Cummins et al., 2006). Fehlt diese Hemmung, resultiert die Freilassung des p65/p50 Heterodimers und NF- κ B-Zielgene werden transkribiert. Im Einklang mit Cummins et al. konnte in Kernextrakten DMOG-behandelter Monozyten tatsächlich eine erhöhte p65-Proteinmenge festgestellt werden. Darüber hinaus führte der Knock-down von PHD-1 bzw. PHD-2 zu einer tendenziell gesteigerten ICAM-1 mRNA-Expression unter Normoxie. Hierbei wurde bei künstlich verminderter PHD-1-Expression die stärkere Induktion bezüglich der ICAM-1 mRNA festgestellt als nach einem PHD-2 Knock-down. Dies würde nahelegen, dass das Enzym PHD-1 offensichtlich stärker für die Hydroxylierung des IKK-Komplexes verantwortlich ist als die PHD-2. Ganz aktuell gibt es jedoch auch Daten von Chan et al. (2009), die in PHD-2 Knock-out Mäusen zwar eine vermehrte Induktion des NF- κ B-Signalwegs finden, jedoch postulieren, dass diese unabhängig von der Hydroxylierungsaktivität des Enzyms sei. In unserem Modell führte eine Behandlung der THP-1-Zellen mit DMOG zwar zu einer vermehrten Adhäsion unter normoxischen Bedingungen, diese blieb jedoch hinter den mittels hypoxischer Stimulation erreichbaren Werten zurück. Dies könnte dafür sprechen, dass die PHDs in der Lage sind, den klassischen NF- κ B-Signalweg sowohl mittels Hydroxylierung als auch mit Hilfe eines anderen Mechanismus zu beeinflussen, der jedoch noch völlig unbekannt ist. Eine Hemmung des klassischen Signalwegs durch die Zugabe von Bortezomib (Tan et Waldmann, 2002) resultierte hingegen in einer völligen Blockade der Adhäsion unter hypoxischen Cokulturbedingungen. Darüber hinaus unterstützte dieser Versuch nochmals die Annahme, dass HIF-1 α keine entscheidende Rolle bei der hypoxisch gesteigerten Adhäsion der Monozyten zukommt: Als Proteasomeninhibitor verhinderte Bortezomib nicht nur die Aktivierung von NF- κ B, sondern führte besonders in der frühen Phase der Inkubation auch zu einer Akkumulation des HIF-1 α -Proteins. Bei einer zentralen Rolle des Hypoxie-

induzierbaren Faktors für die Adhäsion würde man in diesem Fall also eine deutlich erhöhte Anzahl adhärenter Monozyten erwarten; genau das Gegenteil ist jedoch der Fall. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Regulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Monozyten mit sehr großer Wahrscheinlichkeit HIF-unabhängig stattfindet und somit ein Beispiel für eine hypoxische Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B darstellt. Dies steht in Übereinstimmung mit Parry und Mackman, die bereits 1994 postulierten, dass die Transkription von ICAM-1 in humanen THP-1-Zellen durch ein Heterodimer der NF- κ B-Mitglieder p65/c-Rel induziert wird (Parry et Mackman, 1994). Die kurzfristige, massive Induktion der Expression von ICAM-1 an der Zelloberfläche der Monozyten kann hierbei in der Klinik schwerwiegende Folgen haben: In einem murinen Herzinfarktmodell, das unsere Arbeitsgruppe in Kooperation mit Forschern aus Bonn durchgeführt hat, wurde nach der Unterbrechung der Blutzufuhr der Koronararterie und anschließender Reperfusion eine drastisch erhöhte Anzahl adhärenter Monozyten entlang der Gefäßwände beobachtet. Diese Immunzellen können die ohnehin desolate Situation im Infarktgebiet noch zusätzlich verschlechtern: Sie sezernieren inflammatorische Zytokine, Chemokine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), was einerseits einen zusätzlichen Stressfaktor für umgebende Zellen darstellt, andererseits weitere Immunzellen in das betroffene Gebiet rekrutiert. Diese verschlechtern dann wiederum die Umgebungsbedingungen für die Endothelzellen und Kardiomyozyten im betroffenen Gewebe. Eine massiv gesteigerte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen unter akuter, schwerer Hypoxie kann also auch klinisch von immenser Bedeutung sein.

Nach der eingehenden Betrachtung der Auswirkungen von Hypoxie auf das monozytäre Adhäsionsprotein ICAM-1 wurde im Anschluss die endotheliale ICAM-1-Expression in primären humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) untersucht. Hier wurden sowohl die LPS- als auch die Hypoxie-induzierten Veränderungen im Expressionsmuster analysiert und miteinander

verglichen. Eine vierstündige Inkubation mit 1 µg/mL LPS induzierte die Akkumulation von endothelialelem ICAM-1. Die Inkubation von HUVEC-Zellen mit 1mM DMOG resultierte in gesteigerten HIF-1/2 α Proteinmengen. Es fand sich jedoch kein ausgeprägter Effekt auf die Expression des ICAM-1 Proteins, obwohl dieses unter hypoxischer DMOG-Inkubation leicht erniedrigt schien. In humanen THP-1-Zellen fand sich bereits nach einstündiger Inkubation mit DMOG eine Akkumulation des ICAM-1-Proteins, die in HUVEC-Zellen jedoch nicht festgestellt werden konnte. Da zu diesem frühen Zeitpunkt auch keine hypoxische Induktion des endothelialen ICAM-1-Proteins detektiert werden konnte, muss angenommen werden, dass die hypoxische Induktion von p65/c-Rel-Heterodimeren, die auch in HUVEC-Zellen für eine vermehrte Transkription von ICAM-1 sorgen soll (Parry et Mackman, 1994), in diesen Zellen entweder nicht erfolgen kann oder einer anderen Kinetik unterliegt. Allerdings konnten Yoong et al. (2006) zeigen, dass eine 24stündige Inkubation unter Hypoxie in der murinen Endothelzelllinie MS-1 eine Akkumulation des ICAM-1-Proteins auslöst. Da Cummins et al. (2006) eine hypoxiebedingte Hemmung der PHD-1 und PHD-2 für die Induktion von NF- κ B unter diesen Bedingungen verantwortlich machen, könnten die Unterschiede in der hypoxischen Regulation der ICAM-1 mRNA und des Proteins eventuell in unterschiedlicher Expressionsstärke oder Aktivität dieser Prolylhydroxylasen begründet liegen. Dies bleibt allerdings noch genauer zu untersuchen. In Folgeversuchen wurde die intrazelluläre Lokalisation des ICAM-1-Proteins nach LPS-Stimulation und Inkubation unter schwerer Hypoxie betrachtet. LPS-Stimulation führt zur Neusynthese des Proteins im endoplasmatischen Retikulum, anschließend erfolgt der Transport des Moleküls an die Zelloberfläche. Inkubation unter Hypoxie (0.1% O₂) resultiert nicht in einer Neusynthese von ICAM-1 und scheint die Vitalität der Zellen bereits nach sechs Stunden deutlich herabzusetzen. Die Fluoreszenzintensität lässt allerdings auch hier als letztes in den Randbereichen der Zellen nach.

Obwohl also beide Zellarten über die Bausteine des NF- κ B- wie auch des HIF-1/2 α -Signalweges verfügen, führt die kurzfristige Inkubation unter schwerer Hypoxie in Monozyten zu einer signifikanten Steigerung der ICAM-1 mRNA und des Proteins, wohingegen in HUVEC-Zellen keine Veränderungen der ICAM-1-Expression feststellbar sind. Diese Tatsache und die Feststellung, dass HUVEC-Zellen unter Hypoxie deutlich an Vitalität verlieren, könnten darauf hindeuten, dass die hypoxische NF- κ B-Induktion hier insgesamt geringer ausfällt als in den Monozyten.

5.3 Auswirkungen der LPS-Vorbehandlung auf die Monozyten-Endothel-Interaktion

Eine 24stündige Inkubation mit 0.05 ng/mL LPS führt in undifferenzierten humanen Monozyten nicht zur Etablierung einer Endotoxintoleranz, induziert jedoch eine vermehrte Adhäsion dieser Zellen ans Endothel, was eine veränderte Zellfunktion unter physiologischen wie pathologischen Bedingungen zur Folge hat. Mit Hilfe eines DNA-Bindungsassays für verschiedene NF- κ B-Mitglieder konnte nachgewiesen werden, dass die Vorinkubation undifferenzierter THP-1-Zellen mit sehr geringen Dosen LPS zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Bindungsaktivität von p65 und c-Rel führt. Beide NF- κ B-Familienmitglieder werden schon lange mit der Regulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Verbindung gebracht (Parry et Mackman, 1994; Francini et al., 2004). Tatsächlich konnten in LPS-vorbehandelten Zellen erhöhte Protein- und mRNA-Mengen dieses Adhäsionsproteins nachgewiesen werden. Eine Induktion dieses Moleküls kann also nicht nur durch akute Hypoxie und einen starken LPS-Stimulus, sondern auch durch eine längere Inkubation mit sehr geringen LPS-Mengen erreicht werden. Auch in diesem Fall resultiert eine vermehrte monozytäre Adhäsion an Endothelzellen. Klinisch relevant könnte dieser Prozess während der Entstehungsphase einer Endotoxintoleranz sein. Die niedrigen Konzentrationen bakterieller Lipopolysaccharide im Plasma könnten zu einer Aktivierung der Monozyten führen und sie veranlassen, vermehrt ans Endothel zu adhären. SIRS (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom)-Patienten weisen ein Krankheitsbild ähnlich einer Sepsis auf, bei der jedoch keine eindeutige Infektion nachweisbar ist; man spricht von einer Immundisregulation. Im Plasma dieser Patienten lassen sich erhöhte IL-10- und Katecholaminmengen nachweisen, denen eine immunsuppressive Wirkung zugeschrieben wird. Als Folge daraus ist die Fähigkeit von Leukozyten auf inflammatorische Stimuli angemessen zu reagieren in SIRS-Patienten deutlich vermindert (Cavaillon et al., 2004). Obwohl sich bei diesen Patienten in der

Population der ausgewanderten Monozyten/Makrophagen Unterschiede bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber einer erneuten bakteriellen Stimulation finden, ist die Anzahl der ausgewanderten Immunzellen nicht wesentlich verändert (Cavaillon et al., 2005). Insgesamt deuten all diese Ergebnisse darauf hin, dass monozytärem ICAM-1 eine bedeutende Rolle nicht nur in der Aktivierung von T-Zellen, sondern auch innerhalb der Leukozyten-Adhäsionskaskade zukommen könnte.

6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde die Rolle des Transkriptionsfaktorkomplexes HIF-1 α , der eigentlich als zentraler Regulator der Zellantwort auf verminderte Sauerstoffkonzentrationen gilt, um seine Rolle in der inflammatorischen Zellantwort ergänzt. HIF-1 α -defiziente Monozyten und Makrophagen weisen nicht nur eine verminderte Vitalität unter Hypoxie auf, sondern zeigen eine deutlich eingeschränkte Funktion, auf einen inflammatorischen Stimulus hin eine angemessene Immunantwort zu generieren. So weisen sie beispielsweise eine verminderte Infiltration in inflammatorisches Gewebe auf, die durch eine verminderte Adhäsion, Migration, Chemotaxis und Invasion in extrazelluläre Matrix bedingt ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Etablierung einer Endotoxintoleranz *in vitro* und *in vivo* zu einer verminderten HIF-1 α Protein- und mRNA-Expression führt. Als Ursache dafür konnte die Induktion des alternativen NF- κ B-Signalwegs während der Toleranzentwicklung bestimmt werden. Endotoxintolerante Monozyten und Makrophagen wiesen eine verminderte Vitalität unter hypoxischen Bedingungen sowie eine verminderte Invasion in extrazelluläre Matrix auf und verhielten sich somit sehr ähnlich zu HIF-1 α -defizienten Zellen. Insgesamt führten die erzielten Ergebnisse also zu der These, dass mittels Endotoxintoleranz in diesen Zellen ein funktionaler HIF-1 α Knock-down erzielt werden kann.

Bezüglich der Auswirkungen schwerer Hypoxie auf das Adhäsionsverhalten von Monozyten an Endothelzellen konnte eine deutliche Induktion der monozytären Adhäsion festgestellt werden. Diese erfolgte durch hypoxische - jedoch nicht HIF-1 α -abhängige - Induktion des monozytären Adhäsionsmoleküls ICAM-1, das im vorliegenden Fall mit endotheliale ICAM-1 Homodimere ausbilden könnte. Eine Steigerung der Expression dieses Moleküls bedarf einer *de novo* Synthese, die in den Monozyten durch die hypoxische Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalwegs induziert wird. Auch die langfristige Inkubation

der Zellen mit sehr geringen LPS-Dosen führte zu einer vermehrten Expression des monozytären ICAM-1, was eine bis heute völlig unbekannte Bedeutung dieses Moleküls innerhalb der Leukozyten-Adhäsionskaskade nahe legt. Eine Ergänzung dieses Modells zur monozytären Adhäsion um die ICAM-1-ICAM-1-Wechselwirkung erscheint deshalb sinnvoll.

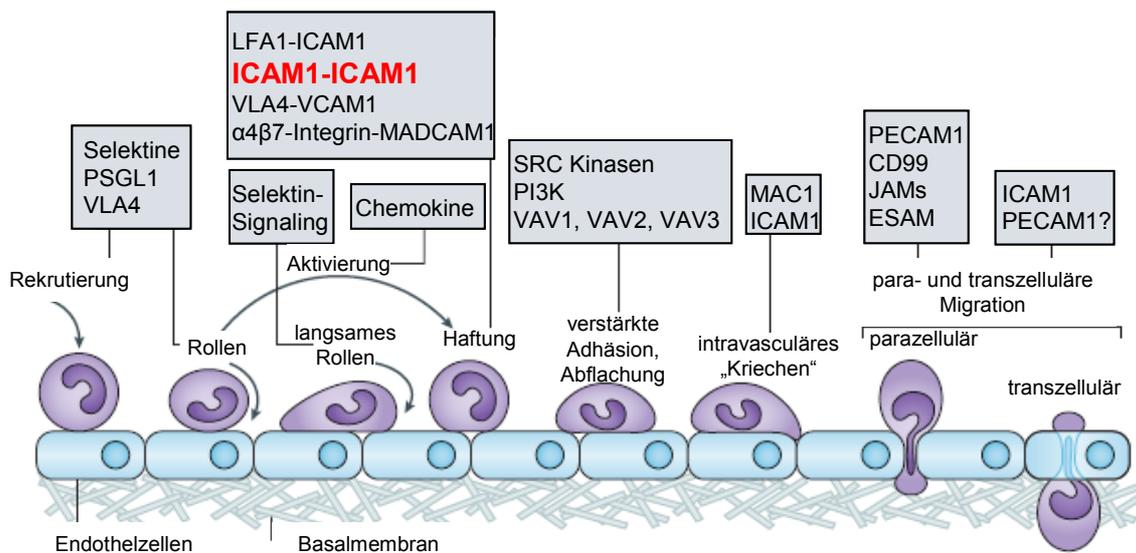


Abb. 6.1.: Ergänzung der Leukozyten-Adhäsionskaskade um die Interaktion zwischen monozytärem und endothelialem ICAM-1.

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erhalten werden konnten, lassen eine Ergänzung der Leukozyten-Adhäsionskaskade um die Wechselwirkung zwischen monozytärem und endothelialem ICAM-1 zu (modifiziert nach Ley et al., 2007).

7. Literatur

Albelda S.M., Smith C.W., Ward P.A. (1994)

Adhesion molecules and inflammatory injury.

FASEB J. **8**:504-512.

Belaiba RS, Bonello S, Zähringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, Görlach A. (2007)

Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor κ B in pulmonary artery smooth muscle cells.

Mol Biol Cell. **18**:4691-4697.

Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, Fandrey J. (2007)

Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2.

J Biol Chem. **282**:1788-1796.

Bertout J, Patel SA, Simon CE. (2008)

The impact of oxygen availability on human cancer.

Nat Rev Cancer. **8**:967-975.

Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. (1985)

Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines.

J Clin Invest. **76**:2003-2011.

Bezstarosti K, Das S, Lamers MJM, Das DK. (2006)

Differential proteomic profiling to study the mechanism of cardiac pharmacological preconditioning by resveratrol.

J Cell Mol Med. **10**:896-907.

Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, Peet DJ. (2006)

Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α stabilization and transactivation in a graded oxygen environment.

J Biol Chem. **281**: 22575-22585.

Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. (2009)

HIF at a glance.

J Cell Sci. **122**:1055-1057.

Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, Lewis CE. (2003)

Hypoxia-Induced Gene Expression in Human Macrophages-Implications for Ischemic Tissues and Hypoxia-Regulated Gene Therapy.

Am J Physiol. **163**:1233-1243.

Butcher, EC. (1991)

Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity.

Cell. **67**:1033-1036.

Carayol N, Chen J, Yang F, Jin T, Jin L, States D, Wang CY. (2006)

A dominant function of IKK/NF-kappaB signaling in global lipopolysaccharide-induced gene expression.

J Biol Chem. **281**:31142-31151.

Carlos TM., Harlan JM. (1994)

Leukocyte-endothelial adhesion molecules.

Blood. **84**:2068-2101.

Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. (2003)

Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance?

J Endotoxin Res. **9**:101-107.

Cavaillon JM, Fitting C, Adib-Conquy M. (2004)

Mechanisms of immunodysregulation in sepsis.

Contrib Nephrol. **144**:76-93.

Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. (2005)

Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS.

J Endotoxin Res. **11**:311-320.

Chan C, Li L, McCall CE, Yoza BK. (2005)

Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF- κ B transactivation at the IL-1 β promoter.

J Immunol. **175**:461-468.

Chan DA, Kawahara TLA, Sutphin PD, Chang HY, Chi J-T, Giaccia AJ. (2009)

Tumor Vasculature Is Regulated by PHD-2-Mediated Angiogenesis and Bone Marrow-Derived Cell Recruitment.

Cancer Cell **15**:527-538.

Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. (1999)

New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases.

Clin Chem. **45**:7-17.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem. **162**:156–159.

Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase V, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein G, Gerber HP, Ferrara N, Johnson R. (2003)

HIF-1 α is essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation.

Cell. **112**:645-657.

Cramer T, Johnson RS. (2003)

A novel role for the hypoxia inducible transcription factor HIF-1 α .

Cell Cycle. **2**:192-193.

Cummins EP, Berra E, Comerford K M, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT. (2006)

Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF- κ B activity.

Proc Natl Acad Sci USA. **103**:18154–18159.

Cummins EP, Taylor CT. (2005)

Hypoxia-responsive transcription factors.

Pflugers Arch. **450**:363-371.

Diamond MS, Springer TA. (1993)

A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen.

J Cell Biol. **120**:545-556.

Faller DV. (1999)

Endothelial cell responses to hypoxic stress.

Clin Exp Pharmacol Physiol. **26**:74-84.

Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M. (2006)

Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation.

Cardiovasc Res. **71**:642-651.

Franscini N, Bachli EB, Blau N, Leikauf M-S, Schaffner A, Schoedon G. (2004)

Gene Expression Profiling of Inflamed Human Endothelial Cells and Influence of Activated Protein C.

Circulation **110**:2903-2909.

Frede S, Stockmann C, Winning S, Freitag P, Fandrey J. (2009)

Hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α accumulation and HIF target gene expression are impaired after induction of endotoxin tolerance.

J Immunol. **182**:6470-6476.

Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. (2006)

Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB.

Biochem J. **396**:517-527.

Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J. (2005)

The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation.

Cancer Res. **65**:4690-4697.

Frede S, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J. (2007)

Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation.

Methods Enzymol. **435**:405-419.

Freudenberg MA, Galanos C. (1988)

Induction of Tolerance to Lipopolysaccharide (LPS)-D-Galactosamine Lethality by Pretreatment with LPS Is Mediated by Macrophages.

Infection and Immunity. **56**:1352-1357.

Garayoa M, Martinez A, Lee S, Pio R, An WG, Neckers L, Trepel J, Montuenga LM, Ryan H, Johnson R, Gassmann M, Cuttitta F. (2000)

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis.

Mol Endocrinol. **14**:848-862.

Görlach A., Bonello S. (2008)

The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. [erratum 2008, **413**: 571]

Biochem J. **412**:e17-9.

Grimm S, Bäuerle PA. (1993)

The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of its protein subunits.

Biochem J. **290**:297-308.

Gu J, Milligan J, Huang LE. (2001)

Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1 α -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine.

J Biol Chem. **276**:3550–3554.

Hagemann T, Biswas SK, Lawrence T, Sica A, Lewis CE. (2009)

Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF- κ B.

Blood. **113**:3139-3146.

Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C, Balkwill FR. (2005)

Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF- κ B and JNK.

J Immunol. **175**:1197-1205.

Harlan JM., Vedder NB., Winn RK., Rice CL. (1991)

Mechanisms and consequences of leukocyte-endothelial interaction.

West J Med. **155**:365-369.

Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J. and Jelkmann, W. (1999)

Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1.

Blood **94**:1561–1567.

Hu L, Hofmann J, Zaloudek C, Ferrara N, Hamilton T, Jaffe RB. (2002)

Vascular endothelial growth factor immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer.

Am J Pathol. **161**:1917–1924.

Hu C-J, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon CE. (2007)

The N-terminal Transactivation Domain Confers Target Gene Specificity of Hypoxia-inducible Factor HIF-1 α and HIF-2 α .

Mol Biol Cell. **18**:4528-4542.

Imhof BA, Aurrand-Lions M. (2004)

Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes.

Nat Rev Immunol. **4**:432-444.

Jaakkola P, Mole DR, Tian Y-M, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ.

Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation

Science. **292**:468-472.

Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH. (2004)

Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis.

J Clin Invest. **114**:1098-1106.

Karhausen J, Haase VH, Colgan SP. (2005)

Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor.

Cell Cycle. **4**:256-258.

Karin M. (2006)

Nuclear factor- κ B in cancer development and progression.

Nature. **441**:431-436.

Kartikasari AE, Georgiou NA, Visseren FL, van Kats-Renaud H, van Asbeck BS, Marx JJ. (2004)

Intracellular labile iron modulates adhesion of human monocytes to human endothelial cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. **24**:2257-2262.

Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T.

(1993)

Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma.

Biochem Biophys Res Commun. **192**:553-560.

Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, Fisher RJ, Shoemaker RH, Melillo G. (2005)

Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity.

Cancer Res. **65**:9047-9055.

Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS. (2004)

Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of β_2 integrin gene expression.

Proc Natl Acad Sci U S A. **101**:10440-10445.

Kong T, Scully M, Shelley CS, Colgan SP. (2007)

Identification of Pur- α as a new hypoxia response factor responsible for coordinated induction of the β_2 integrin family.

J Immunol. **179**:1934-1941.

Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ. (1994)

Hypoxia causes the activation of nuclear factor- κ B through the phosphorylation of I κ B α on tyrosine residues.

Cancer Res. **54**:1425-1430.

Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ, Adler KB. (2000)

Effects of TNF-alpha on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells in vitro. Signaling pathways controlling surface and gene expression.

Am J Respir Cell Mol Biol. **22**:685-692.

Ledebur HC, Parks TP. (1995)

Transcriptional Regulation of the Intercellular Adhesion Molecule-1 Gene by Inflammatory Cytokines in Human Endothelial Cells.

J Biol Chem. **270**:933-943.

Lewis CE, Pollard JW. (2006)

Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments.

Cancer Res. **66**:605-612.

Lewis CE, Murdoch C. (2005)

Macrophage Responses to Hypoxia: Implications for Tumor Progression and Anti-Cancer Therapies.

Am J Pathol. **167**:627-635.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007)

Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.

Nat Rev Immunol. **9**:678-689.

Liao PH, Du XK, Huang B, Yao WX, Cao J. (2009)

Effect of activation of nuclear factor- κ B on modulation of secretion of intercellular adhesion molecule-1 by A549 cell.

Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. **21**:151-154.

Löfstedt T, Fredlund E, Holmquist-Mengelbier L, Pietras A, Ovenberger M, Poellinger L, Pählman S. (2007)

Hypoxia-inducible factor-2 α in cancer.

Cell Cycle. **6**:919-926.

Luo JL, Kamata H, Karin M. (2005)

IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death-a new approach to cancer therapy.

J Clin Invest. **115**:2625-2632.

Majetschak M, Flach R, Heukamp T, Jennissen V, Obertacke U, Neudeck F, Schmit-Neuerburg KP Schade FU. (1997)

Regulation of whole blood tumor necrosis factor production upon endotoxin stimulation after severe blunt trauma.

J Trauma **43**:880-887.

Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. (2001)

Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation.

EMBO J. **20**:5197–5206.

Masson N, Ratcliffe PJ. (2003)

HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels.

J Cell Sci. **116**:3041–3049.

McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. (1997)

Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils.

Blood. **89**:3421-3433.

Metinko AP, Kunkel S L, Standiford TJ, Strieter RM. (1992)

Anoxia-Hyperoxia Induces Monocyte-derived Interleukin-8.

Am Soc Clin Invest. **90**:791-798.

Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. (2005)

Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia.

Int J Cancer. **117**:701-8.

Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. (2005)

Hypoxia Regulates Macrophage Functions in Inflammation.

J Immunol. **175**:6257–6263.

Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. (2004)

Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues.

Blood. **104**:2224-2234.

Murry C, Jennings RB, Reimer KA. (1986)

Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.

Circulation. **74**:1124-1136.

Nguyen SV, Claycomb WC. (1999)

Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes.

Biochem Biophys Res Commun. **265**:382–386.

Oda T, Hirota K, Nishi K, Takabuchi S, Oda S, Yamada H, Arai T, Fukuda K, Kita T, Adachi T, Semenza GL, Nohara, R. (2006)

Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation.

Am J Physiol Cell Physiol. **291**:C104–C113.

Oliver KM, Garvey JF, Teck Ng C, Veale DJ, Fearon U, Cummins EP, Taylor CT. (2009)

Hypoxia Activates NF- κ B-Dependent Expression Through the Canonical Signaling Pathway.

Antioxid Redox Signal. 11: DOI: 10.1089/ars.2008.2400.

Palluy O, Morliere L, Gris JC, Bonne C, Modat G. (1992)

Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion.

Free Radic Biol Med. **13**:21-30.

Panés J, Perry M, Granger ND. (1999)

Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention.

Br J Pharmacol. **126**:537-550.

Parry GC, Mackman N. (1994)

A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain kappa B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers.

J Biol Chem. **269**:20823-20825.

Peyssonaux C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS. (2005)

HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes.

J Clin Invest. **115**:1806-1815.

Pollard JW. (2004)

Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis.

Nat Rev Cancer. **4**:71-78.

Rankin EB, Giaccia AJ. (2008)

The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis.

Cell death differ. **15**:678-685.

Ramudo L, De Dios I, Yubero S, Vicente S, Manso MA. (2007)

ICAM-1 and CD11b/CD18 expression during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction: effect of N-acetylcysteine.

Exp Biol Med (Maywood). **232**:737-743.

Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. (1986)

A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1.

J Immunol. **137**:1270-1274.

Royds JA, Dower SK, Qwarnstrom EE, Lewis CE. (1998)

Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NF-kB.

J Clin Pathol: Mol Pathol. **51**:55-61.

Sawa Y, Sugimoto Y, Ueki T, Ishikawa H, Sato A, Nagato T, Yoshida S. (2007)

Effects of TNF-alpha on leukocyte adhesion molecule expressions in cultured human lymphatic endothelium.

J Histochem Cytochem. **55**:721-733.

Schmitz ML, B auerle PA. (1991)

The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- κ B.

EMBO J. **10**:3805-3817.

Schymeinsky J, M ocsai A, Walzog B. (2007)

Neutrophil activation via β_2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications.

Thromb Haemost. **98**:262-273.

Semenza GL. (1998)

Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis.

Curr Opin Genet Dev. **8**:588–594.

Semenza GL. (2000)

Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression.

Crit Rev Biochem Mol Biol. **35**:71–103.

Semenza GL. (2000)

HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia.

J Appl Physiol. **88**:1474–1480.

Semenza GL. (2001)

HIF-1, O₂, and the PHDs: How animal cells signal Hypoxia to the nucleus.

Cell. **107**:1-3.

Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Kr ahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M. (2001)

Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway.

Science **293**:1495–1499.

Smith CW. (2008)

3. Adhesion molecules and receptors.

J Allergy Clin Immunol. **121**:375-379.

Springer TA. (1990)

Adhesion receptors of the immune system.

Nature. **346**:425-434.

Tan C, Waldmann TA. (2002)

Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia.

Cancer Res. **62**:1083-1086.

Taylor CT. (2008)

Interdependent roles for hypoxia-inducible factor and nuclear factor- κ B in hypoxic inflammation.

J Physiol. **586**:4055-4059.

Tsakadze NL, Sen U, Zhao Z, Sithu SD, English WR, D'Souza SE. (2004)

Signals mediating cleavage of intercellular adhesion molecule-1.

Am J Physiol Cell Physiol. **287**:C55-C63.

Yoza BK, Hu JY, Cousart SL, Forrest LM, McCall CE. (2006)

Induction of RelB participates in endotoxin tolerance.

J Immunol. **177**:4080-4085.

Vallabhapurapu S, Karin M. (2009)

Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System.

Annual Rev Immunol. **27**:693-733.

Wedel A, Frankenberger M, Sulski G, Petersmann I, Kuprash D, Nedospasov S, Ziegler-Heitbrock HW. (1999)

Role of p52 (NF- κ B) in LPS tolerance in a human B cell line.

Biol Chem. **380**:1193-1199.

Weidemann A, Johnson RS. (2008)

Biology of HIF-1 α .

Cell Death Differ. **15**:621-7.

Wenger RH. (2002)

Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression.

FASEB J. **16**:1151–1162.

Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. (2005)

Integration of oxygen signaling at the consensus HRE.

Sci STKE. **2005**: re(12).

Wissink S, van de Stolpe A, Caldenhoven E, Koenderman L, van der Saag PT. (1997)

NF- κ B/Rel family members regulating the ICAM-1 promoter in monocytic THP-1 cells.

Immunobiology. **198**:50-64.

Yoong C-H, Hur J, Oh I-Y, Park K-W, Kim TY, Shin J-H, Lee C-S, Chung J-K, Park Y-B, Kim H-S. (2006)

Intercellular Adhesion Molecule-1 Is Upregulated in Ischemic Muscle, Which Mediate Trafficking of Endothelial Progenitor Cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. **26**:1066-1072.

Zampetaki A, Mitsialis SA, Pfeilschifter J, Kourembanas S. (2004)

Hypoxia induces macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) gene expression in murine macrophages via NF-kappaB: the prominent role of p42/ p44 and PI3 kinase pathways.

FASEB J. **18**:1090-1092.

Zarembler KA, Malech HL. (2005)

HIF-1 α : a master regulator in host defenses?

J Clin Invest. **115**:1702-1704.

Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. (2007)

Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection.

J Mol Med. **85**:1339-1346.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ADM	Adrenomedullin
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AK	Antikörper
ARNT	Arylhydrocarbon nukleärer Translokator
AS	Aminosäure
bHLH	Basische Helix-Schleife-Helix(-Domänen)
bp	base pair
BSA	bovines Serumalbumin
BZ	Bortezomib
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlendioxid
CSF-1	Kolonie-stimulierender Faktor-1
C57/B16	C57/Black 6
DF	Double-floxed
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMOG	Dimethyloxallylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECGM	Endothelzell-Wachstumsmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EMAP II	Endotheliales Monozyten-aktivierendes Polypeptid II

ESAM	Endothelial cell-selective Adhesion Molecule
FBS	Fötale Kälberserum
FIH-1	HIF-inhibierender Faktor-1
Glut-1	Glukosetransporter-1
GTC	Guanidinthiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1/2	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1/2
HRE	Hypoxie-responsives Element
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOX	Hypoxie
HRP	Horseradish Peroxidase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HUVECs	Human Umbilical Vein cord Endothelial Cells
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL-1	Interleukin-1
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
I κ B	Inhibitor der κ Bs
IKK	I κ B-Kinase
JAM	Junctional Adhesion Molecule
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LPS	Lipopolysaccharide
LysM	Lysozym M
Mac-1	Monocyte adhesion complex-1
MADCAM	Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MM	Magermilch
MMP-7	Matrix-Metalloproteinase-7
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Test
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
NF-κB	Nukleärer Faktor- κB
NOX	Normoxie
NTP	Nukleosidtriphosphat
O ₂	Sauerstoff
ODD	Sauerstoff-abhängige Degradationsdomäne
Oligo-dT	Oligomer aus Desoxynukleosidtriphosphaten
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCR	Polymerasekettenreaktion
PECAM-1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
PER	Period
PFA	Paraformaldehyd
PGK-1	Phosphoglyceratkinase-1
PHD 1-3	Prolylhydroxylase 1-3
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
prec.	Präkonditionierung
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Protein

qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	real time Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	Single-minded
siRNA	single-interference RNA
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBS-T	TRIS-buffered saline (Tween 20-versetzt)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrose-Faktor α
TGF- β 1	Transformierender Wachstumsfaktor- β 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VCAM-1	vaskuläres Adhäsionsmolekül-1
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor
WT	Wildtyp

8.2 Einwilligungserklärung zur Nabelschnurspende

Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Rainer Kimmig
Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstraße 55
45122 Essen

Wissenschaftliche Studie
"Monozyten-Endothelzell-Interaktion unter Hypoxie und Entzündung"

Sehr geehrte Patientin,

die Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe und das Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Essen führen eine Studie zur "Monozyten-Endothelzell-Interaktion unter Hypoxie und Entzündung" durch. Diese Untersuchung hat das Ziel, die Ursachen der Auswanderung von Immunzellen (Monozyten) in entzündete und somit gleichfalls durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) gekennzeichnete Areale zu untersuchen. Dieser Prozess korreliert bei vielen Tumorpatienten mit einer negativen Prognose. Voraussetzung für diese Studien ist die Verfügbarkeit von Nabelschnüren, aus denen Zellen für die Zellkultur gewonnen werden. Die Untersuchungen werden in unseren eigenen Forschungslaboratorien (Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Essen) durchgeführt.

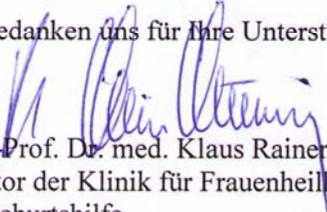
Für die genannten Untersuchungen wird die gesamte Nabelschnur benötigt. Diese wird nach der Geburt in spezieller Nährlösung aufbewahrt, anonymisiert (d.h. der dazugehörige Name wird zu keinem Zeitpunkt notiert, vermerkt wird lediglich das Entnahmedatum) und in das Institut für Physiologie gebracht. Dort werden aus diesem Gewebe Endothelzellen isoliert und zunächst ihr Verhalten unter hypoxischen sowie entzündlichen Bedingungen charakterisiert. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wird dann besonderes Augenmerk auf die Prozesse gelegt, die zwischen Endothel und Immunsystem ablaufen, bevor die Immunzellen schließlich in betroffene Gebiete auswandern.

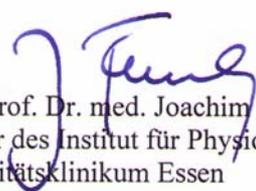
Aus den gewonnenen Zellen werden keine Zelllinien gezüchtet, sondern das gesamte Material für unsere Untersuchungen aufbereitet. Nach Beendigung unserer Untersuchung werden die Proben tiefgefroren gelagert, um Nachuntersuchungen zu ermöglichen.

Wir wären Ihnen sehr dankbar, wenn Sie sich mit der Verwendung der von Ihnen gewonnenen Nabelschnur für ausschließlich wissenschaftliche Fragestellungen einverstanden erklären könnten. Sie haben die Möglichkeit, Ihre Zustimmung ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für Ihre Behandlung zurückzuziehen. Aufgrund der Anonymisierung der Proben ist dies nur bis zum Zeitpunkt der Abgabe der Nabelschnur möglich. Auch eine gezielte Vernichtung nur der aus Ihrer Nabelschnur gewonnenen Zellen ist zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr möglich.

Sollten Sie weitere Fragen zu den geplanten Untersuchungen haben, wenden Sie sich bitte an den betreuenden Arzt unserer Abteilung (Tel. 0201/723-2441).

Wir bedanken uns für Ihre Unterstützung.


Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Rainer Kimmig
Direktor der Klinik für Frauenheilkunde
und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Essen


Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Fandrey
Direktor des Institut für Physiologie
Universitätsklinikum Essen

Einwilligungserklärung

Wissenschaftliche Studie

"Monozyten-Endothelzell-Interaktion unter Hypoxie und Entzündung"

Ich bin damit einverstanden, dass meine Nabelschnur für Forschungszwecke verwendet wird.

Ich erkläre mich einverstanden, dass im Rahmen des Forschungsvorhabens erhobene Daten auf Fragebögen oder elektronischen Datenträgern aufgezeichnet und ohne Namensnennung (anonymisiert) ausgewertet werden dürfen. Dies kann auch eine Veröffentlichung der anonymisierten Daten einschließen.

Meine Fragen bezüglich der geplanten wissenschaftlichen Untersuchungen wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet. Meine Zustimmung kann ich vor Abgabe der Nabelschnur ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für meine Behandlung zurückziehen. Aufgrund der Anonymisierung der Proben ist die gezielte Vernichtung nur der aus meiner Nabelschnur gewonnenen Zellen nach Abgabe der Nabelschnur nicht mehr möglich.

Patientin:

Unterschrift:

Aufklärende/r Ärztin/Arzt:

Unterschrift:

Essen, den

8.3 Publikationsliste

Publikationen

- 1) **Winning S**, Splettstoesser F, Fandrey J, Frede S.
Acute hypoxia induces HIF-1 independent monocyte adhesion to endothelial cells through increased ICAM-1 expression.
J Immunol. (in Revision)
- 2) Frede S, Stockmann C, **Winning S**, Freitag P, Fandrey, J.
HIF-1 α accumulation and HIF-target gene expression are impaired after induction of endotoxin tolerance.
J Immunol. **2009**, **182**: 6470-6.
- 3) Müller C, Wasserberg D, Weemers JJM, Pidko EA, **Hoffmann S**, Lutz M, Spek AL, Meskers S, Janssen RAJ, van Santen RA, Vogt D.
Donor-Functionalized Polydentate Pyrylium Salts and Phosphinines: Synthesis, Structural Characterization, and Photophysical Properties.
Chem. Eur. J. **2007**, **13**: 4568.

Poster und Vorträge

- 1) **Hoffmann S**, Freitag P, Frede S, Fandrey J.
Classical endotoxin tolerance impairs hypoxia induced HIF-1 α accumulation in human monocytes.
Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft
Hannover; **2007** (Poster).
- 2) **Hoffmann S**, Freitag P, Frede S, Fandrey J.
Endotoxintoleranz vermindert die hypoxische HIF-1 α -Akkumulation in humanen Monozyten.
Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen
Essen; **2007** (Poster).
- 3) **Hoffmann S**, Freitag P, Frede S, Fandrey J.
Classical endotoxin tolerance impairs hypoxia induced HIF-1 α accumulation in human monocytes.
Hypoxia, from Integrative Biology to Human Disease.
Monte Verità, Ascona, Switzerland; **2007** (Poster).

- 4) **Hoffmann S**, Freitag P, Frede S, Fandrey J.
Reprogrammed monocytes show a diminished ability to cope with hypoxia due to down-regulated HIF-1 α .
Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft
Köln; **2008** (Vortrag).
- 5) **Hoffmann S**, Freitag P, Frede S, Fandrey J.
Leukocyte reprogramming mimics HIF-1 α knock-out.
20th annual meeting of the European Association for Cancer Research
Lyon, France; **2008** (Poster).
- 6) **Winning S**, Freitag P, Frede S, Fandrey J.
Induction of endotoxin tolerance mimics HIF-1 α knock-out.
BioSymposia, Inc.: Hypoxia, Ischemia, and Inflammation: Essential
Connections.
Boston, USA; **2008** (Poster).
- 7) **Winning S**, Freitag P, Frede S, Fandrey J.
Inflammatorische Präkonditionierung induziert einen funktionalen HIF-1 α knock-out in Monozyten und Makrophagen.
Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen;
Essen; **2008** (Poster).
- 8) **Winning S**, Freitag P, Frede S, Fandrey J.
Induction of endotoxin tolerance mimics HIF-1 α knock-out and affects monocyte-endothelial interaction.
Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft
Gießen; **2009** (Vortrag).
- 9) **Winning S**, Splettstoesser F, Fandrey J, Frede S.
Akute Hypoxie induziert HIF-unabhängig die Monozyten-Adhäsion ans Endothel durch eine verstärkte Expression von monozytärem ICAM-1.
15. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“ des Instituts
für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen
Xanten; **2009** (Vortrag).

Preise

Juli 2008 Auszeichnung des Studienabschlusses durch die
Fakultät Chemie

8.4 Lebenslauf

Name: Sandra Winning
geb. Hoffmann
Geburtsdatum: 22.09.1982
Geburtsort: Wesel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet



Werdegang:

- Seit 01.04.2007
Doktorandin an der Universität Duisburg-Essen
- September 2002 - März 2007
Studium an der Universität Duisburg-Essen
Abschluss: Diplom-Chemikerin (Medizinisch-Biologische Chemie)
- August 1993 - Juli 2002
Andreas-Vesalius-Gymnasium in Wesel; Abschluss: Hochschulreife
- 1989 - 1993
Gemeinschafts-Grundschule Borth-Wallach in Wallach

8.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Die Bedeutung von Hypoxie und Endotoxintoleranz für die Funktion von Monozyten und Makrophagen sowie für die Wechselwirkung von Monozyten und Endothel“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Dezember 2009

Sandra Winning

8.6 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Fandrey für die stets freundliche und motivierende Betreuung dieser Arbeit sowie für die Unterstützung durch viele nützliche Anregungen. Zusammen mit Herrn Prof. Dr. Epple danke ich ihm für die Korrektur dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt meinen Kollegen des Instituts für Physiologie, allen voran Dr. Stilla Frede und Patricia Freitag für die Hilfe und Geduld. Mein gesamtes fach- und methodenspezifisches Wissen durfte ich von ihnen lernen. Darüber hinaus waren Dr. Suzan Tug und Rebecca Konietzny stets eine große Stütze für mich. Frank Splettstoesser danke ich für die Einweisung in die mikroskopische Arbeit.

Bei Yvonne Grüber aus dem Institut für Anästhesiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf möchte ich mich für die Anleitung zur Isolation der HUVEC-Zellen aus Nabelschnüren bedanken. Von Frau Prof. Dr. Rauen erhielten wir freundlicherweise die Rattenendothelzelllinie EC52 und das gesamte Hebammenteam der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen sammelte die Nabelschnüre, aus denen dann später die HUVEC-Zellen isoliert wurden. Besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Herrn Prof. Dr. Kimmig sowie Oberarzt Dr. Schmidt.

Außerdem möchte ich meiner gesamten Familie, vor allem aber meinen Eltern und meinem Mann danken, die mich durch mein Studium begleitet und dabei meinen privaten Ausgleich gebildet haben.