

Beeinflussung der Stabilisierung von HIF- 1 α in HepG2-Zellen und ihrer Vitalität durch Zitratzyklusmetabolite in einem Organtransplantationsmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nele Howold
aus Ottersberg

Gießen 2008

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. W. Kummer

1.Gutachter: Prof. Dr. W.Kummer

2.Gutachter: PD Dr. S.Immenschuh

Tag der Disputation: 11.08.2008

Inhaltsverzeichnis:

<u>1. Einleitung</u>	7
1.1 Organtransplantation	7
1.1.1 Ischämie und Reperfusion	8
1.1.2 Schutz vor Ischämie- und Reperfusionsschäden	14
1.1.2.1 Organkonservierungslösungen	14
1.1.2.2 Zitratzyklusmetabolite in der Prävention von Ischämie- bzw. Hypoxieschäden	18
1.2 HIF-1	21
1.2.1 Struktur	21
1.2.1.1 HIF-1 α	23
1.2.1.2 HIF-1 β	24
1.2.2 Regulation von HIF-1	24
1.2.2.1 Prolylhydroxylierung	25
1.2.2.2 Asparaginyhydroxylierung	27
1.2.2.3 Regulation des HIF-Abbaus	29
1.2.3 Zusätzliche Regulationsmechanismen von HIF-1	35
1.2.4 Genregulation durch HIF	37
1.3 Verwendung der Zelllinie HepG2	39
1.4 Ziele der Promotionsarbeit	40
 <u>2. Material und Methoden</u>	 42
2.1 Geräte (alphabetisch geordnet)	42
2.2 Zellkultur	43
2.2.1 Zelllinie	43
2.2.2 Kulturbedingungen	43
2.2.3 Splitting	43
2.3 Durchführung der Hypoxieversuche	44
2.3.1 Aussaat der Zellen	44
2.3.1.1 Vorbereitung der Zellen	44
2.3.1.2 Inkubation	44
2.3.2 Herstellung von Zellextrakten für HIF-1 α -Westernblots ..	44
2.4 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate- Polyacrylgelelektrophorese)	45
2.4.1 Herstellung der Elektrophorese-Gele	45

2.4.2 Vorbereitung der Proben und Beladung der Gele.....	46
2.5 Westernblot	46
2.6 Immunhistochemische Färbung von HepG2-Zellen mit anti-HIF-1 α	47
2.7 MTT-Test	48
2.8 Quantitative Auswertung.....	49
2.9 Statistische Auswertung und Boxplots	50
2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer (alphabetisch geordnet).....	50
 3. Ergebnisse	 54
3.1 Generelles.....	54
3.1.1 Spezifität des verwendeten Antikörpers	54
3.1.2 Zellproliferation während der Versuchsdurchführung	54
3.2 HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z, Celsior, HTK und UW	55
3.2.1 HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen, die bei 37°C unter normoxischen Bedingungen in DMEM+Z kultiviert wurden....	55
3.2.2 Einfluss der Organkonservierungslösungen auf das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen bei Inkubation der Zellen unter 37°C Normoxie	56
3.2.3 Vergleich der verwendeten Lösungen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior unter Normoxie bei 4°C	56
3.2.4 Vergleich der HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z, HTK, UW und Celsior unter Hypoxie bei 37°C	56
3.2.5 Vergleich der unterschiedlichen Lösungen unter Hypoxie 4°C	59
3.2.6 Einfluss von Insulin und Dexamethason in UW auf die HIF-1 α -Stabilisierung.....	59
3.3 Einfluss der Zitratzyklusmetabolite Fumarat, Malat und Succinat auf das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen bei Inkubation in DMEM+Z, Celsior, HTK und UW	59
3.3.1 HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen mit Celsior nach Zugabe von 15 mM Fumarat, Malat oder Succinat	60
3.3.2 HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen mit HTK nach Zugabe von 15 mM Fumarat, Malat oder Succinat	60
3.3.3 HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen mit UW nach Zugabe von 15 mM Fumarat, Malat oder Succinat	60
3.4 MTT-Test	61

3.4.1 Nachweis der Vitalität von HepG2-Zellen in DMEM+Z, Celsior, HTK und UW unter verschiedenen Bedingungen durch den MTT-Test.....	61
3.4.2 MTT-Test von HepG2-Zellen in Celsior, HTK und UW mit dem Zusatz von Malat, Fumarat und Succinat unter verschiedenen Bedingungen.....	62
<u>4. Diskussion</u>	86
4.1 Spezifität des benutzten Antikörpers und Aussagekraft der Methode Westernblot	86
4.2 HIF-1 α -Stabilisierung unter Normoxie in HepG2-Zellen ...	86
4.3 Gründe für die signifikant höhere HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z.....	87
4.4 Einsatz von UW-Lösung ohne Zusatz von Dexamethason, Insulin und Penicillin.....	89
4.5 Ursachen der fehlenden HIF-1 α -Stabilisierung bei 4°C.....	91
4.6 Einfluss der Zitratzyklusmetabolite Succinat, Fumarat und Malat auf die HIF-1 α -Stabilisierung	93
4.7 HIF-1 α und Organtransplantation.....	99
4.7.1 Betrachtung transplantationsrelevanter Eigenschaften von HIF-1 α	101
4.7.1.1 Induktion der Hämoxigenase-1 durch HIF-1 α	101
4.7.1.2 HIF-1 α und das Immunsystem	102
4.8 Bedeutung der HIF-1 α -Stabilisierung in hypoxischen Zellen.....	103
4.8.1 Einfluss der HIF-1 α -Stabilisierung auf den Energiestoffwechsel der Zelle	103
4.8.2 Die Rolle von HIF-1 α bei der hypoxie-induzierten Apoptose.....	104
4.8.3 Die Rolle von HIF-1 α in unterschiedlichen Geweben....	105
4.9 Vitalitätsmessung mit Hilfe des MTT-Tests	106
4.9.1 Vitalitätsmessung von HepG2-Zellen nach Inkubation in den Organkonservierungslösungen Celsior, HTK und UW	107
4.9.2 Vitalitätsmessung von HepG2-Zellen nach Inkubation in Organkonservierungslösungen mit dem Zusatz von Malat, Fumarat und Succinat.....	109
<u>5. Zusammenfassung</u>	113

6. Summary	114
7. Literaturverzeichnis.....	116

1. Einleitung

1.1 Organtransplantation

Seit der Chirurg Joseph Murray im Jahr 1954 die erste erfolgreiche Nierentransplantation bei eineiigen Zwillingen durchführte, haben sich sowohl die Operationstechniken als auch die medikamentösen Möglichkeiten stetig verbessert, so dass die Organtransplantation zu einem Routineeingriff geworden ist. Die Entdeckung des Immunsuppressivums Azathioprin Anfang der 60iger Jahre ermöglichte dann Transplantationen zwischen genetisch nicht identischen Individuen. Heutzutage stellt die Organtransplantation für viele Patienten mit chronischen Erkrankungen der inneren Organe sowohl die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit als auch die Standardtherapie dar (Lechler et al., 2005).

Im Januar 2006 warteten 1.623 Patienten auf eine Transplantatleber (Deutsche Stiftung Organspende, www.dso.de). Trotz steigender Zahlen bei den Lebertransplantationen wird nur wenig mehr als die Hälfte dieser Patienten ein Spenderorgan bekommen, da die Kluft zwischen verfügbaren Spenderorganen und Patienten auf der Warteliste in den letzten Jahren eher größer als kleiner geworden ist. Um trotz knapper Ressourcen möglichst viele Patienten mit einem Spenderorgan versorgen zu können, wurden unterschiedliche Strategien entwickelt. Einerseits nehmen seit einigen Jahren die Lebendspenden und Teillebertransplantationen zu, andererseits werden inzwischen auch sogenannte marginale Organe transplantiert (Loinaz und Gonzalez, 2000). Marginale Organe sind Organe, die von nicht ganz idealen Spendern, wie z.B. Hypertonikern oder älteren Spendern stammen, wobei vor allem die Organe von älteren Spendern in den letzten Jahren mit zunehmendem Erfolg transplantiert werden (Wiesner RH et al., 2003).

Grundsätzlich besteht also das Bestreben, möglichst jedes Spenderorgan zu transplantieren und dieses im Empfänger so lange wie möglich funktionstüchtig zu halten. Die 1-Jahres-Funktionsrate der Organe von Todspendern (NHBD, non-heartbeating donor) liegt bei primärtransplantierten Patienten zwischen 70 Prozent (Leber) und 90 Prozent (Niere). Nach 5 Jahren sinkt die Transplantatfunktionsrate auf fast 60 Prozent (Leber) bzw. 70 Prozent (Niere) (www.dso.de). Noch schlechter ist das Ergebnis bei retransplantierten Patienten. Die 5-Jahres-Funktionsrate liegt nach Leberretransplantation bei 40 Prozent (www.dso.de).

Die Leber ist das Organ, welches von einem fremden Organismus am ehesten toleriert wird. Danach folgen mit großem Abstand Herz, Niere, Inselzellen des Pankreas und die Haut (Lechler et al., 2005). Die Gründe für Funktionsversagen nach Lebertransplantation sind daher weniger auf akute (5%) und chronische (7,4%) Abstoßung, als auf primäres

Organversagen (24,3%), Gefäßthrombose (14,9%) und Infektionen (14,9%) zurückzuführen. Innerhalb des ersten Jahres nach Lebertransplantation versterben anteilmäßig die meisten Patienten, danach nimmt die Wahrscheinlichkeit des Todes durch Transplantatversagen wieder deutlich ab. Die Hauptursache für das Transplantatversagen nach dem ersten Jahr ist mit 24,3% das primäre Versagen des Transplantats („primary graft failure“), wobei die Gründe hierfür vielfältig sind (United Network of Organ Sharing, www.unos.org). An erster Stelle steht die Wiederkehr der Krankheit, welche die Ursache für die Organtransplantation war. Vor allem Hepatitiden und Neoplasien, aber auch Immunerkrankungen können nach Transplantation wieder auftreten (Abbasoglu et al., 1997). Schwere Infektionen, vor allem auch mit opportunistischen Erregern, führen als zweit häufigste Ursache zum Tod des Organempfängers. Durch jahrelange Immunsuppression geschwächt, sind vor allem ältere Patienten für tödlich verlaufende Infektion anfällig. Desweiteren führt die Immunsuppression zu einer Erhöhung der kardiovaskulären Risikofaktoren und damit zum Tod der Patienten aufgrund von kardiovaskulären Komplikationen, wie Gefäßthrombosen (Abbasoglu et al., 1997).

1.1.1 Ischämie und Reperfusion

Ischämie ist eine infolge mangelnder Blutzufuhr entstehende Blutleere einzelner Organe. Sie führt zu Sauerstoffmangel (Hypoxie, Anoxie) mit Abblassung, Abkühlung und Volumenabnahme der betroffenen Gewebe, bei längerem Bestehen oder hohem Hypoxiegrad zur Nekrose (www.gesundheit.de/roche). Während der Ischämie besteht in der Regel nicht nur ein Versorgungsdefizit, sondern auch eine Störung des Blutabflusses und damit auch ein verminderter Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Die Reperfusion ischämischen Gewebes ist die Wiederherstellung der Blutzufuhr und damit der Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen. Ischämie- und Reperfusionsschäden sind für bis zu 10% des sogenannten frühen Organversagens, also dem Funktionsverlust des Transplantats innerhalb der ersten Wochen, verantwortlich und erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer akuten oder chronischen Abstoßung signifikant (Fondevila et al., 2003). Ischämie (Hypoxie) führt primär zu einem Verbrauch der Energiereserven, später zu Veränderungen im Membranpotenzial, erhöhtem intrazellulären Volumen, Elektrolytentgleisungen und erniedrigter Membranfluidität sowie Veränderungen im Zytoskelett (Carden und Granger, 2000).

Man unterscheidet grundsätzlich drei Formen der Ischämie: kalte, warme und Erwärmungs-Ischämie (= Reperfusion) (Balabaud et al., 2004). Kalte Ischämie ist das Organ in der Zeit von der Entnahme bis zur Implantation ausgesetzt. Um es über längere Strecken

transportieren zu können, wird es in 4°C kalte Organkonservierungslösung überführt. Dadurch kommt es zu einer Reduktion der Stoffwechselaktivitäten, die Überlebensdauer des Transplantats wird erhöht. Die kalte Ischämiezeit beträgt für über Eurotransplant transplantierte Lebern im Median neun Stunden. Laut CTS (Collaborative Transplant Study) führt diese Ischämiezeit zu einer 3-Jahresüberlebensrate von 70% (Schemmer et al., 2005). Als warme Ischämie bezeichnet man diejenigen Phasen mangelnder Blutzufuhr, während derer das Organ noch im Körper ist. Im Rahmen einer Lebertransplantation erfolgt dies z.B. durch das so genannte Pringle-Manöver. Beim Pringle-Manöver wird zur Vermeidung eines massiven Blutverlustes bei der Organentnahme der Blutfluss in Pfortader und Arteria hepatica unterbunden (Bilzer et al., 2002). Erwärmungsischämie findet man in der Phase der Implantation, in der das Transplantat der Raum- bzw. Körpertemperatur ausgesetzt ist, während der Chirurg die vaskuläre Rekonstruktion durchführt (Balaboud et al., 2004). Kalte Ischämie schädigt vor allem die nicht-parenchymalen Zellen der Leber (Endothelzellen, Kupffer-Zellen, Itozellen), während warme Ischämie von den Hepatozyten schlecht toleriert wird (Balaboud et al., 2004; Selzner et al., 2003; Kupiec-Weglinski und Busuttil, 2005). Als Folge der Ischämie kommt es zum Erliegen des intrazellulären Energiestoffwechsels. Die zellulären Energiereserven, d.h. die Adenosintriphosphat-Vorräte, nehmen ab. Es kommt zu einem Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration und damit zum Zellödem (Kupiec-Weglinski und Busuttil, 2005; Kukan und Haddad, 2001). Die sinusoidalen Endothelzellen runden sich aufgrund von Veränderungen im Zytoskelett und der extrazellulären Matrix ab und lösen sich dann von der Basalmembran (Selzner et al., 2003, Carden und Granger, 2000). Der vorhandene Zellschaden wird durch die nachfolgende Reperfusion vervielfacht (Carden und Granger, 2000). Nach einer kurzen Zeit der kalten Ischämie führt Reperfusion alleine in der Regel kaum zu Schäden, sondern es ist das Zusammenkommen von längerer kalter Ischämie und darauf folgender Reperfusion, welches die nicht-parenchymalen Zellen schädigt (Fondevila et al., 2003).

In der frühen Phase des Ischämie- und Reperfusionsschadens spielt die lokale Aktivierung des Komplementsystems eine wichtige Rolle, indem es Kupffer-Zellen stimuliert und chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt (Arumugam et al., 2004).

Endothelzellen tragen auf ihren Oberflächen Proteine wie DAF (decay-accelerating factor) und MCP (membrane cofactor protein), welche eine Aktivierung des Komplementsystems unterdrücken. Durch Ischämie und Reperfusion können diese Oberflächenproteine geschädigt werden, was zu einer Aktivierung des Komplementsystems führen kann (Arumugam et al.,

2004). Das Komplementsystem gehört zum angeborenen Immunsystem und dient der unspezifischen Abwehr von Fremdkörpern wie Bakterien, die in den Körper eingedrungen sind. Die Aktivierung von Komplement kann sowohl über den sogenannten „klassischen Weg“ durch Antikörper der Klassen IgG und IgM, als auch über den „alternativen Weg“ durch das Vorhandensein von „fremden“ Zelloberflächen getriggert werden. Letztendlich führt eine Aktivierung von Komplement zu der Bildung eines Membran-Angriff-Komplexes (MAK), welcher Zellmembranen zerstören kann. Das Komplementsystem spielt außerdem eine Rolle bei der Förderung des Abtransports von Immunkomplexen, der Regulation der humoralen Immunantwort und auch direkt bei der Immunabwehr durch Opsonisierung von infektiösen Keimen und anderen Fremdstoffen durch den Komplementfaktor 3b (C3b). Die Komplementfaktoren 3a, 4a und 5a (C3a, C4a, C5a) werden Anaphylatoxine genannt, sie können eine inflammatorische Kaskade auslösen, indem sie die Degranulation von Basophilen und Mastzellen verstärken (Kayser et al., 2001). Der Komplementfaktor 5a (C5a) ist eines der stärksten proinflammatorischen Peptide. C5a bindet über den C5a-Rezeptor an Makrophagen, Neutrophile und Monozyten. Dort erhöht er die Bindungsfähigkeit von Neutrophilen an eingedrungene Bakterien, stimuliert die Produktion von ROS (reactive oxygen species) und induziert die Sekretion von lysosomalen Enzymen aus Kupffer-Zellen (Arumugam et al., 2004).

Kupffer-Zellen sind die ortständigen Makrophagen der Leber. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung eines I/R(Ischämie/Reperfusion)-Schadens in der Leber (Arumugam et al., 2004; Schemmer et al., 2005; Kupiec-Weglinski und Busuttil, 2005; Jaeschke, 1996). Kupffer-Zellen werden einerseits durch Komplement, andererseits auch direkt durch I/R beeinflusst (Arumugam et al., 2004). Durch die Ischämie und Reperfusion kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration, welcher zu einer Aktivierung der Kupffer-Zellen führt. Die Kupffer-Zellen reagieren mit Degranulation, Steigerung ihrer Phagozytoserate (Schemmer et al., 2005) und der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie PAF (platelet activating factor), IL-1 (Interleukin-1), TNF- α (Tumornekrosefaktor-alpha), IL-6 und IFN- γ (Interferon-gamma) (Kouwenhoven et al., 2000; Kupiec-Weglinski und Busuttil, 2005; Howard et al., 1990). Zusätzlich kommt es zur Produktion von ROS, welche zytotoxisch sowohl auf Hepatozyten als auch auf Endothelzellen wirken, indem sie die Apoptose induzieren (Selzner et al., 2003, Kupiec-Weglinski und Busuttil, 2005).

Die ausgeschütteten Zytokine führen in Endothelzellen zu einer erhöhten Expression von Genen, die für Zelladhäsionsmoleküle (P-Selektin, ICAM-1[intercellular adhesion molecule-1]) und andere Zelloberflächenmoleküle einschließlich HLA (human leucocyte antigen) kodieren (Kupiec-Weglinksi und Busuttill, 2005; Banga et al., 2005; Hancock, 2003). Diese Oberflächenveränderung der Endothelzellen erleichtert es neutrophilen Granulozyten, welche in der späteren Phase des Reperfusionsschadens in das Gefäßsystem der Leber einwandern (Jaeschke, 1996), an die Endothelzellen zu binden und sie zu schädigen. Gleichzeitig verändert sich die Syntheseleistung der Endothelzellen. Einerseits kommt es zu einer erhöhten Produktion von z.B. Endothelin, Thromboxan A2 und auch ROS, andererseits kommt es zu einer verminderten Synthese von z.B. Prostazyklinen und NO (Stickstoffmonoxid) (Carden und Granger, 2000).

NO wird in der Leber durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) oder die induzierbare NO-Synthase (iNOS) generiert. Die iNOS wird in der Leber sowohl von Endothelzellen als auch von Hepatozyten exprimiert (Jaeschke, 2003). Die kontinuierliche NO-Produktion durch die eNOS führt zu einer Vasodilatation der kleinen Gefäße, die den steten Blutfluss durch die Leber gewährleistet. Daneben verhindert eine ausreichende NO-Produktion die Plättchenaggregation und damit die Thrombusbildung in den Gefäßen und sie minimisiert die adhäsiven Interaktionen zwischen Endothel und Leukozyten (Carden und Granger, 2000; Jaeschke, 2003).

Exzessive NO-Produktion durch die iNOS, wie sie während der Reperusionsphase möglich ist, kann dagegen zu einem Peroxynitrit-induzierten Zellschaden, aber auch zu systemischen Komplikationen wie Hypotension und Schock führen (Jaeschke, 2003).

Während der Ischämie und Reperfusion kommt es zu einer erhöhten Endothelin- und einer erniedrigten NO-Produktion durch die eNOS in den Endothelzellen. Endothelin ist stark vasokonstriktiv wirksam. Durch die verminderte NO-Produktion kann die Wirkung des Endothelins nicht antagonisiert werden, was somit zu einer generellen Vasokonstriktion führt (Jaeschke, 2003). Während der Reperfusion kommt es neben der Vasokonstriktion zusätzlich zu einer erhöhten PAF-Expression durch die Endothelzellen, was zu mikrovaskulären Durchblutungsstörungen führt und damit zu einer parenchymalen Ischämie trotz eigentlich wiederhergestellter Zirkulation (Kukan und Haddad, 2001). Während innerhalb weniger Minuten nach I/R die NO-Produktion absinkt, steigt die ROS-Produktion in den Endothelzellen. ROS stimulieren die Produktion von PAF über die Aktivierung der Phospholipase, induzieren die Aktivierung und Ablagerung von Komplement auf der

Endothelzelloberfläche, mobilisieren die gespeicherten P-Selektinvorräte auf der Endothelzelloberfläche und initiieren damit das „rolling“ der Leukozyten (Carden und Granger, 2000; Selzner, 2003).

Typisch für die späte Phase des I/R-Schadens ist das Einwandern von Neutrophilen in das geschädigte Organ. Diese werden chemotaktisch durch freigesetzte CXC-Zytokine (z.B. IL-8) angelockt (Lentsch et al., 2000; Hancock, 2003).

Der zentrale Mediator dieser inflammatorischen Reaktion ist TNF- α , welcher sowohl von Kupffer-Zellen als auch von Hepatozyten exprimiert wird. Eine wichtige Rolle spielt auch IL-12, welches während der Ischämie und der frühen Phase der Reperfusion von den Hepatozyten gebildet wird. IL-12 ist essenziell für die TNF- α -Expression und damit für die Ausbildung des klassischen I/R-Schadens (Lentsch et al., 2000). TNF- α induziert die Freisetzung der neutrophilen-anziehenden CXC-Zytokine und auch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen (Lentsch et al., 2000; Hancock, 2003). Dies führt in der Folge zu einer festen Anheftung der eingewanderten Neutrophilen an die Endothelzellen, gefolgt von der Einwanderung in das parenchymale Gewebe. Dort binden die Neutrophilen mit ihrem LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1). Rezeptor an das auf den Hepatozyten exprimierte ICAM-1. Diese Bindung führt zu einer Degranulation mit der Freisetzung von Proteasen und langanhaltendem, bindingsbedingtem oxidativen Stress (Jaeschke, 2003). Oxidativer Stress in Form von ROS führt zu einer Oxidation von Pyridin-Nukleotiden, Akkumulation von Kalzium in den Mitochondrien und letztendlich zum Zusammenbruch des Membranpotenzials an der inneren Mitochondrienmembran (Jaeschke, 2003). Des weiteren schädigen ROS Proteine, Enzyme, das Zytoskelett und Zellmembranen (Fondevila, 2003). ROS inaktivieren zusätzlich eine Oxidantien-sensitive-Plasma-Antiprotease und erhöhen somit die Verletzlichkeit der Hepatozyten gegenüber der Proteasen der Neutrophilen (Jaeschke, 2003). Die Serinproteasen der Neutrophilen, wie Elastase und Cathepsin G, schädigen direkt die Zellmembranen der Hepatozyten, wogegen ihre Metalloproteasen eher die Basalmembran und die interzelluläre Matrix schädigen (Lentsch et al., 2000). Mit steigender Ischämiezeit kommt es auch in den Hepatozyten selber vermehrt zu einer Generation von ROS durch die Xanthinoxidase und auch speziell durch die Mitochondrien (Jaeschke, 2003). Hypoxie oder Ischämie induzieren die Konversion der Xanthinoxidase von der NAD-reduzierenden Dehydrogenase-Form in die Sauerstoff-reduzierenden Oxidase-Form. Dies führt zu einer Akkumulation von Hypoxanthin und damit zu einer erhöhten Superoxid- und Wasserstoffperoxidproduktion, sobald im Rahmen der Reperfusion wieder Sauerstoff zur Verfügung steht (Carden und Granger, 2000). Die

endogene ROS-Generation wird durch die Zytokine TNF- α , IL-1 und IFN- γ , die während der Reperfusion freigesetzt werden, nochmals verstärkt (Selzner et al., 2003).

Obwohl per Definition der I/R-Schaden ein Antigen-unabhängiger Prozess ist, so wird ein Transplantat durch verlängerte Ischämiezeit „immunogener“ und daher empfänglicher für die T-Zellantwort des Immunsystems (Fondevila et al., 2003; Howard et al., 1990). Die in der frühen Reperusionsphase freigesetzten Zytokine rekrutieren und aktivieren auch CD4⁺ T-Lymphozyten. CD4⁺ T-Lymphozyten können wiederum Zytokine wie TNF- β , IFN- γ und GCSF (granulocyte colony stimulating factor) freisetzen und die Kupffer-Zell-Aktivierung vervielfachen und weitere Neutrophile anlocken (Jaeschke, 2003).

Wie bereits erwähnt, erhöht der I/R-Schaden die Expression von HLA Klasse I und II Molekülen auf Endothelzellen (Kouwenhoven et al., 2000; Kupiec-Weglinski und Busuttil, 2005; Banga et al., 2005; Ysebaert et al., 2004) und von HLA Klasse II Molekülen auf Kupffer-Zellen (Howard et al., 1990) und damit auch die Wahrscheinlichkeit, dass T-Zellen des Organempfängers an diese im Transplantatgewebe binden. Des weiteren weisen die sinusoidalen Endothelzellen der Leber Oberflächenmarker auf, die sonst nur auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) zu finden sind, und können somit für CD4⁺ und CD8⁺ Zellen als APZ dienen (Fondevila et al., 2003; Ysebaert et al., 2004).

Die Produktion von CXC-Zytokinen wird von TNF- α nicht nur lokal induziert, sondern kann auch eine massive systemische inflammatorische Reaktion hervorrufen. Diese wird SIRS (systemic inflammatory response syndrome) oder MODS (multiple organ dysfunction syndrome) genannt und kann zu schweren Schäden an allen lebenswichtigen Organen führen (Arumugam et al., 2004; Carden und Granger, 2000; Lentsch et al., 2000). Obwohl SIRS jedes Organ betreffen kann, manifestiert es sich meist in der Lunge durch eine schwere respiratorische Insuffizienz bis hin zum ARDS (acute respiratory distress syndrome) innerhalb von 24-72 Stunden nach dem ischämischen Ereignis. Daneben lässt sich MODS durch Fehlfunktionen des Gerinnungssystems und des Immunsystems charakterisieren. Folgen sind Thrombosen, disseminierte intravasale Gerinnung und mangelnde Immunabwehr (Carden und Granger, 2000).

Verlängerte Ischämiezeiten sind ein Risikofaktor für die akute (Howard et al., 1990) und die chronische Abstoßung (Joosten et al., 2003), sowie auch ein Risikofaktor für thrombotische Ereignisse (Wiesener und Narayanan Menon, 2001), eine häufige Komplikation nach

Lebertransplantation und die Hauptursache für das späte Transplantatversagen (www.unos.org).

Da Organe nur in einem begrenzten Umfang zur Verfügung stehen und die Wartelisten für Lebertransplantationen immer länger werden, wird es immer notwendiger, die Transplantate vor Ischämie- und Reperfusionsschäden zu schützen. Dazu gibt es verschiedene Ansätze, wie z.B. die ischämische Präkonditionierung, aber auch den Versuch, immer bessere Organkonservierungslösungen für die Aufbewahrung und den Transport der Transplantate zu entwickeln.

1.1.2 Schutz vor Ischämie- und Reperfusionsschäden

1.1.2.1 Organkonservierungslösungen

Eine der ersten Strategien, um Organe nach der Entnahme haltbar zu machen, war die Reduktion der Stoffwechselaktivitäten durch Herabkühlen des Organs auf 1°C bis 4°C. Während die Leber bei Raumtemperatur nur ca. eine Stunde Ischämie toleriert, lässt sich die Ischämiezeit durch reine Kühlung auf acht Stunden erhöhen (Selzner et al., 2003).

Um die Transplantate noch effektiver aufbewahren zu können, reicht Kühlung alleine nicht aus, sondern es ist zusätzlich eine Organkonservierungslösung notwendig.

Die Aufgaben einer Organkonservierungslösung sind in erster Linie das Blut auszuwaschen, das Organ zu kühlen, es vor Ischämie/Reperfusionsschäden wie Zellschwellung und interstitieller Ödembildung zu schützen und Azidose zu vermeiden (Panzer et al., 2005; Belzer und Southard, 1988).

Eine der ersten Konservierungslösungen war die von Collins in Los Angeles entwickelte Collins-Lösung, deren Elektrolytzusammensetzung dem intrazellulären Milieu entspricht. Diese wurde von Eurotransplant nochmals modifiziert und beherrschte jahrelang als Eurocollins-Lösung den Markt. Inzwischen wird die Eurocollins-Lösung nicht mehr verwendet, da sie den neueren Organkonservierungslösungen wie UW (University of Wisconsin-Lösung) oder HTK (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung) deutlich unterlegen ist (Mühlbacher et al., 1999).

Der Durchbruch in der Entwicklung von Organkonservierungslösungen kam 1979 mit der Entwicklung der University of Wisconsin-Lösung durch den amerikanischen Forscher Dr. Belzer. Belzer und seine Mitarbeiter hatten bereits jahrelang auf dem Gebiet der Organtransplantation geforscht. Dr. Belzer übernahm 1974 den Lehrstuhl für Chirurgie an der

University of Wisconsin, 1984 wurde die Lösung dort nochmals modifiziert und damit verbessert (www.viaspan.de).

Belzers Ziel war es, eine Organkonservierungslösung zu entwickeln, die

1. das hypothermie-induzierte Zellschwellen vermindert
2. intrazelluläre Azidose verhindert
3. die Expansion des interstiellen Raumes durch die Zugabe von Kolloiden vermindert
4. vor allem während der Reperfusion die Zellen vor Schäden durch Sauerstoffradikale schützt
5. Substrate zur Regenerierung von hoch-energetischen Phosphatverbindungen bereitstellt

(Belzer und Southard, 1988).

Mit der UW-Lösung (siehe Tabelle 2) war es nun möglich, die Ischämiezeit des Transplantats auf bis zu 48 Stunden auszudehnen, und damit war der Transport von Organen auch über weite Strecken möglich (Selzner et al., 2003). Die UW ist zur Zeit die Standardlösung für Leber, Niere und Pankreas. Versuche, die UW auch bei Herztransplantationen zu nutzen, waren nicht erfolgreich (Mühlbacher et al., 1999; Karam et al., 2005).

Die Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) (siehe Tabelle 3), deutscher Handelsname Custodiol, wurde von dem deutschen Arzt Hans Jürgen Bretschneider aus Göttingen entwickelt. Primär wurde HTK als kardioplegische Lösung entwickelt und erst sekundär als Organkonservierungslösung für Organe verwendet. Durch ihre spezielle Zusammensetzung soll die HTK eine Azidose verhindern (Histidin), Membranschäden verhindern (Tryptophan) und Substrate für die Energiegewinnung bereitstellen (Ketoglutarat) (Upadhyya und Strasberg, 2000). HTK hat seinen festen Platz in der Präservierung von Herzen und wird in Europa routinemäßig bei der Transplantation von Abdominalorganen eingesetzt. In den USA wird die HTK erst seit 2002 und auch nur selten zur Präservierung von diesen Organen eingesetzt (Eghtesad et al., 2006). Erste Studien in den USA zeigen jedoch, dass HTK, wie in Europa bereits verwendet, ohne Nachteile im Vergleich zu der UW-Lösung problemlos auch bei Transplantationen von Leber, Niere und Pankreas eingesetzt werden kann (Eghtesad et al., 2006; Mangus et al., 2006).

Die jüngste Organkonservierungslösung, Celsior (siehe Tabelle 1), wurde 1994 von Menasché und Mitarbeitern entwickelt. Celsior wurde primär zur Präservierung von Herzen entwickelt, wird aber auch erfolgreich bei Lungentransplantationen eingesetzt (Karam et al., 2005). Die

Eignung der Celsior in der Präservation von abdominalen Organen wird zur Zeit in klinischen Studien untersucht (Mühlbacher et al., 1999). Bisher scheint Celsior bei der Transplantation von Leber, Niere und Pankreas der UW und der HTK ebenbürtig zu sein, weitere Studien sollen allerdings noch folgen (Karam et al., 2005).

Celsior

0,037 g	Calciumchlorid 2 H ₂ O	0,25 mmol
2,942 g	Glutaminsäure	20 mmol
0,921 g	Glutathion	3 mmol
4,650 g	Histidin	30 mmol
1,118 g	Kaliumchlorid	15 mmol
28,664 g	Lactobionsäure	80 mmol
2,642 g	Magnesiumchlorid 6 H ₂ O	13 mmol
10,930 g	Mannitol	60 mmol
4,000 g	Natriumhydroxid	100 mmol

Tabelle 1.1 Arzneilich wirksame Bestandteile in 1000 ml Celsior (Datenblatt des Herstellers)

Zusätzlich enthält Celsior noch Natriumhydroxid (1 N) und steriles Wasser. Der pH-Wert bei Raumtemperatur beträgt 7,3.

Wirkungsweise laut Hersteller:

- Vorbeugung von durch freie Radikale verursachten oxidativen Läsionen durch die hauptsächliche Verwendung von reduziertem Glutathion als Antioxidanz
- Vorbeugung von Hypothermie-induzierten Zellschwellungen und Ödemen durch die Verwendung membranundurchgängiger Substanzen ("Impermeants"), Mannitol und Lactobionsäure halten Wasser im extrazellulären Kompartement zurück (osmotischer Effekt)
- Verringerung der Calciumbelastung durch die Verwendung einer geeigneten Lösung, z.B. geringe Calciumkonzentration, mäßig hohe Kaliumkonzentrationen (leicht hyperkaliämisch) und hohe Natrium- und Magnesiumkonzentrationen (wie im extrazellulären Milieu)
- Regeneration der hochenergetischen Moleküle durch die Versorgung mit einem energiereichen Substrat, d.h. Glutamat, das Energieproduktion in anaeroben Situationen erlaubt
- Bereitstellung eines Pufferpotenzials durch Verwendung von Histidin, das eine durch Milchsäureakkumulation hervorgerufene pH-Wert-Erniedrigung verhindert

1,340 g	Adenosin	5 mmol
0,136 g	Allopurinol	1 mmol
0,922 g	Glutathion	3 mmol
50,000 g	Hydroxyethylstärke	
5,610 g	Kaliumhydroxid	100 mmol
3,400 g	Kaliumphosphat	25 mmol
35,830 g	Lactobionsäure	100 mmol
1,230 g	Magnesiumsulfat 7 H ₂ O	5 mmol
17,830 g	Raffinose 5 H ₂ O	30 mmol

Tabelle 1.2 Arzneilich wirksame Bestandteile in 1000 ml UW (Datenblatt des Herstellers)

Zusätzlich enthält UW noch Natriumhydroxid/HCl und steriles Wasser. Der pH-Wert bei Raumtemperatur beträgt 7,4.

Laut Hersteller sollen der UW-Lösung vor Gebrauch zum Zwecke einer Organtransplantation noch folgende Inhaltstoffe hinzugefügt werden:

1. Penicillin G 200.000 IE
2. Normalinsulin 40 IE
3. Dexamethason 16 mg

Wenn bei einzelnen Versuchen die UW inklusive dieser Zusätze verwendet wurde, so ist sie als UWplus bezeichnet.

Laut Datenblatt des Herstellers kann das in der Lösung vorhandene Glutathion oxidieren. Der Hersteller weist darauf hin, dass bei Bedarf direkt vor Gebrauch nochmals 3 mmol/l Glutathion hinzugefügt werden kann.

Die Zusammensetzung der UW besteht aus drei Prinzipien:

- das osmotische Verhalten wird nicht durch metabolisch wirksame Glukose, sondern durch metabolisch unwirksame Substanzen wie Lactobionsäure und Raffinose bestimmt
- die Lösung enthält einen kolloiden Trägerstoff, Hydroxyethylstärke
- Zusatz von Antioxidantien wie Glutathion, Allopurinol und Adenosin

(Mühlbacher et al., 1999)

HTK

0,0022 g	Calciumchlorid 2 H ₂ O	0,015 mmol
27,9289 g	Histidin	180 mmol
3,7733 g	Histidinhydrochlorid-Monohydrat	18 mmol
0,6710 g	Kaliumchlorid	9 mmol
0,1842 g	Kaliumhydrogen-2-Ketoglutarat	1 mmol
0,8132 g	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	4 mmol
5,4651 g	Mannitol	30 mmol
0,8766 g	Natriumchlorid	15 mmol
0,4085 g	Tryptophan	2 mmol

Tabelle 1.3 Arzneilich wirksame Bestandteile in 1000 ml HTK (Datenblatt des Herstellers)

Zusätzlich enthält HTK Kaliumhydroxidlösung und steriles Wasser, der pH-Wert bei Raumtemperatur beträgt 7,0 -7,2.

Wirkungsweise laut Hersteller:

- Histidin/Histidin-HCl verlangsamt den pH-Abfall im Gewebe während der Organischämie. Dadurch wird der Wirkungsgrad der anaeroben glykolytischen Energiebereitstellung erhöht.
- Kaliumhydrogen-2-oxopentandioat ist Substrat für die aerobe Energiegewinnung.
- Tryptophan wird eine membranprotektive Wirkung zugeschrieben.
- Mannitol soll die Entstehung eines Zellödems verhindern. Die Gesamtosmolarität der Lösung liegt geringfügig über der normalen Osmolarität des Plasmas und des Intrazellulärtraumes.

1.1.2.2 Zitratzyklusmetabolite in der Prävention von Ischämie- bzw. Hypoxieschäden

Der universelle Energieträger der Zelle ist Adenosintriphosphat (ATP). Die Zelle stellt ATP durch den Abbau von Nahrungsbestandteilen und durch die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette her (Alberts et al., 2002). Am Anfang der aeroben Energiegewinnung steht die Glykolyse, der zentrale Abbauweg des Kohlenhydratstoffwechsels. Die Glykolyse findet im Zytosol statt und benötigt keinen Sauerstoff. Aus einem Molekül Glukose entstehen letztendlich zwei Moleküle Pyruvat und zwei Moleküle ATP (Karlson et al., 1994). Die Glykolyse ist mit einer „Energieausbeute“ von zwei ATP pro Molekül Glukose nicht effizient genug, um die hohen Energiemengen zu produzieren, die die meisten Zellen zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels benötigen (Kovacic et al., 2005).

Das Endprodukt der Glykolyse, Pyruvat, wird unter anaeroben Bedingungen zu Laktat abgebaut, dabei wird ein Molekül NADH zu NAD oxidiert. Unter aeroben Bedingungen wird das anfallende Pyruvat in die Mitochondrien transportiert und dort durch die Pyruvatdehydrogenase (PHD) in das Schlüsselmolekül des Intermediärstoffwechsels, Acetyl-CoA, überführt (Alberts et al., 2002). Neben Kohlenhydraten werden auch Fette zu Acetyl-CoA abgebaut, um dann zur weiteren Energiegewinnung im Zitratzyklus abgebaut zu werden. Proteine bzw. Aminosäuren können auch im Zitratzyklus verstoffwechselt werden, indem sie in Zwischenprodukte des Zitratzyklus überführt werden (Kovacic et al., 2005). Der Zitratzyklus ist damit die gemeinsame Endstrecke des Abbaus der einzelnen Nahrungsstoffe. Die Hauptaufgabe des Zitratzyklus ist die Gewinnung von energiereichen Verbindungen durch Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten. Diese werden dann folgend der Atmungskette zur Energiegewinnung zur Verfügung gestellt. Gleichermäßen dienen die Zwischenprodukte des Zitratzyklus als Reservoir für den Aufbau von zelleigenen Materialien wie der Resynthese von Aminosäuren und dem Aufbau des Häms (Alberts et al., 2002).

Nachdem in den 1980er Jahren die UW-Lösung als Organkonservierungslösung eingeführt wurde, begann man sich intensiv mit den Stoffwechselvorgängen in ischämischen (hypoxischen) Gewebe auseinander zusetzen. Die Arbeitsgruppe um Grieshaber, Wiesner und Rösen beschäftigte sich mit dem Stoffwechsel ischämischer Rattenherzen (Wiesner RJ et al., 1988; Hohl et al., 1987). Um seinen Energiebedarf in Zeiten von Ischämie bzw. Hypoxie decken zu können, erhöht das Myokard sowohl die Rate seiner anaeroben Glykolyse als auch seinen Aminosäurekatabolismus (Hohl et al., 1987). Hohl et al. wiesen 1987 nach, dass Hypoxie in isolierten adulten Rattenherzzellen die Produktion und die Freisetzung von Succinat, nach Zugabe eines Gemisches aus jeweils 5 mM α -Ketoglutarat und Malat, stimuliert. In aerob-kultivierten Zellen ist die Freisetzung von Succinat deutlich niedriger und wird auch durch den Zusatz von α -Ketoglutarat und Malat nicht signifikant erhöht (Hohl et al., 1987). Versuche von Wiesner et al. an isolierten Rattenherzen führten zu ähnlichen Ergebnissen. Während unter Normoxie trotz Zugabe der Zitratzyklusmetabolite α -Ketoglutarat, Malat und Fumarat kaum Succinat freigesetzt wird, weisen die Rattenherzen bereits unter Hypoxie ohne Zusätze eine erhöhte Succinatfreisetzung auf, welche nach Zugabe der Zitratzyklusmetaboliten nochmals signifikant erhöht ist (Wiesner RJ et al., 1988).

Malat wird im Rahmen des Zitratzyklus durch das Enzym Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat abgebaut. Oxalacetat ist ein kompetitiver Hemmstoff der Succinatdehydrogenase (SDH) und erhöht so die Konzentration von Succinat durch Hemmung seines Abbaus (Karlson et al., 1994). Hohl et al. wiesen in Tracer-Versuchen nach, dass Malat unter

hypoxischen Bedingungen als direkter Vorläufer von Succinat dienen kann, indem es zu Fumarat dehydriert wird, welches durch die Succinatdehydrogenase (SDH) zu Succinat reduziert wird (Hohl et al., 1987). α -Ketoglutarat wird normalerweise im Zitratzyklus über das Zwischenprodukt Succinat mit einer energiereichen Thioesterbindung an Coenzym A gebunden. In einem weiteren Schritt spaltet das Enzym Succinyl-CoA-Synthetase die energiereiche Thioesterbindung, es entstehen unter Gewinn eines Moleküls Guanosintriphosphat (GTP) freies Coenzym A und Succinat (Karlson et al., 1994). Hohl et al. zeigten jedoch, dass in hypoxischen Rattenkardiomyozyten α -Ketoglutarat nicht über Succinyl-CoA zu Succinat abgebaut wird, sondern dass α -Ketoglutarat den Transfer von Reduktionsäquivalenten in die Mitochondrien und damit indirekt die Erhöhung der Succinatkonzentration stimuliert. In hypoxischen Kardiomyozyten erhöht die Präsenz von Malat und α -Ketoglutarat sowohl die Succinatsynthese, als auch die Überführung der Aminosäuren Glutamat und Aspartat in Metabolite des Zitratzyklus (Hohl et al., 1987).

Unter hypoxischen Bedingungen existiert in Kardiomyozyten durch die SDH, welche in diesem Fall als Fumaratreduktase dient, eine signifikante Bildung von Succinat aus Malat und Fumarat. α -Ketoglutarat stimuliert diese Synthese, indem es den Transport von Reduktionsäquivalenten in die Mitochondrien induziert und vor allem den Fluss des Malat-Aspartat-Shuttle aufrechterhält (Hohl et al., 1987)

Während Hohl et al. in isolierten Kardiomyozyten aus adulten Ratten keinen vorteilhaften Effekt einer erhöhten Succinatkonzentration in Form einer ansteigenden ATP-Konzentration oder einer verbesserten Membranintegrität nachweisen konnten (Hohl et al., 1987), zeigte die Arbeitsgruppe um Wiesner, dass isolierte Rattenherzen unter Hypoxie von einer Erhöhung der Succinatkonzentration durch eine Verbesserung der kardialen Performance profitieren (Wiesner RJ et al., 1988). Hypoxische Rattenherzen, die mit einer Mischung aus je 5 mM α -Ketoglutarat, Malat und Fumarat perfundiert wurden, wiesen höhere enddiastolische Drücke und damit eine höhere Kontraktilität auf, als die Kontrollgruppe. Gleichzeitig führte die Perfusion der Rattenherzen mit den Zitratzyklusmetaboliten zu einer Erhöhung des ATP-Gehaltes im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Wiesner RJ et al., 1988).

Durch Perfusion mit den Zitratzyklusmetaboliten Fumarat, Malat und α -Ketoglutarat erhöht sich die Succinatkonzentration in hypoxischen Rattenherzen um das drei- bis vierfache. Die erhöhte Succinatkonzentration scheint über eine Erhöhung der Gesamtenergie in den Rattenherzen kardioprotektiv zu wirken. Wiesner et al. führen die kardioprotektiven Effekte der Zitratzyklusmetabolite, wie eine Erhöhung des linksventrikulären Drucks bzw. des enddiastolischen Drucks und eine Verkürzung der posthypoxischen Erholungszeit, auf eine

Verbesserung des zytosolischen Redoxstatus und damit der Ermöglichung einer effizienteren Glykolyse zurück (Wiesner RJ et al., 1988). Obwohl der Umsatz von Malat und Fumarat zu Succinat durch die SDH grundsätzlich zu dem Gewinn von 1 Molekül ATP führt, scheint dies keinen signifikanten Effekt auf den Gesamtenergiegehalt der Zellen zu haben (Wiesner RJ et al., 1988; Hohl et al., 1987).

Die Zitratzyklusmetabolite α -Ketoglutarat, Malat, Fumarat und Succinat beeinflussen vermutlich auch den Transkriptionsfaktor HIF-1 bzw. dessen hypoxie-regulierte α Untereinheit (Pollard et al., 2005; Selak et al., 2005; Lu et al., 2005; Brière et al., 2005a). HIF-1 ist ein Schlüsselmolekül der hypoxie-induzierten Genantwort und es gibt Hinweise, dass HIF-1 eine adaptive hypoxische Antwort induziert (Seagroves et al., 2001; Cai et al., 2003; Date et al., 2005)

1.2 HIF-1

Alle Säugetiere benötigen zur Energiegewinnung über die mitochondriale Atmungskette Sauerstoff. Organismen und ihre Zellen haben daher unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um eine adäquate Sauerstoffversorgung sicherzustellen bzw. sich an Sauerstoffmangelzustände anzupassen.

Ein wichtiges Regulatorprotein der zellulären Sauerstoffhomöostase ist HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1). HIF-1 wurde aufgrund seiner Bindungskapazität für ein HRE (hypoxia-response-element) in der 3'-Flankenregion des Erythropoetin-Gens 1995 von Wang und Semenza entdeckt (Wang und Semenza, 1995). Weitere Untersuchungen zeigten, dass HIF-1 in den meisten Säugerzellen nachzuweisen ist, völlig unabhängig davon, ob sie Erythropoetin produzieren oder nicht. Gleichzeitig zeigte sich, dass HIF-1 auch andere hypoxieabhängige Antworten steuert (Schofield und Ratcliffe, 2004).

1.2.1 Struktur

HIF-1 ist ein heterodimeres Protein, das aus den zwei Untereinheiten HIF-1 α (120 kD) und HIF-1 β (91-94 kD) besteht. Beide Untereinheiten haben eine bHLH (basic helix-loop-helix)- und eine PAS (PER-ARNT-SIM)-Domäne (Semenza, 1999).

Die bHLH-Domäne definiert eine große Superfamilie dimerer eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Dabei dient die HLH-Domäne der Dimerisierung und die basische Domäne der Bindung an die DNA. HIF-1 gehört zu einer kleineren Unterfamilie der bHLH-Proteine, die zusätzlich noch eine PAS-Domäne besitzen und nur in mehrzelligen Organismen zu finden sind (Semenza, 2000).

Üblicherweise bestehen PAS-Domänen aus 100-120 Aminosäuren, welche sich in ein fünfsträngiges antiparalleles β -Faltblatt anordnen, das von mehreren α -Helices umgeben ist (Briuck, 2003). PAS-Domänen finden sich hauptsächlich in Proteinen, die direkt oder indirekt an der Signaltransduktion beteiligt sind. Sie sind wichtige Signalmodule bei der Messung von Veränderungen der Lichtintensität, im Redoxpotenzial, im Energiehaushalt und auch im Sauerstoffgehalt der Zelle (Taylor und Zhulin, 1999).

Die Familie der bHLH-PAS-Proteine lässt sich in zwei Gruppen unterteilen, welche untereinander Heterodimere bilden können und sowohl ihre HLH-Domäne als auch ihre PAS-Domäne zur Dimerbildung nutzen (Semenza, 2000). Zu der ersten Gruppe gehören neben HIF-1 α auch die Proteine HIF-2 α und HIF-3 α . HIF-2 α wird auch „endothelial PAS protein-1“ (EPAS-1) genannt, besitzt strukturell starke Ähnlichkeit mit HIF-1 α und wird ebenfalls unter Hypoxie stabilisiert (Semenza, 1999; Semenza, 2000; Chun et al., 2002). HIF-3 α weist weniger strukturelle Ähnlichkeit mit HIF-1 α auf und scheint auch mindestens einen sauerstoffabhängigen Regulationsmechanismus zu haben, welcher eine zentrale Domäne beinhaltet, die der CODDD (C-terminal oxygen-dependent degradation domain) von HIF-1 α zumindest ähnlich ist (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Zu der zweiten Gruppe gehören die ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator)-Proteine, zu denen ARNT bzw. HIF-1 β , ARNT2 und ARNT3 gehören (Semenza, 2000). Alle Proteine der ersten Gruppe können mit Proteinen der zweiten Gruppe Heterodimere bilden, deren Funktion allerdings nur bei HIF-1 α und HIF-1 β genauer bekannt ist (Semenza, 1999).

Sowohl HIF-1 α als auch HIF-1 β werden in den meisten, wenn auch nicht allen menschlichen Geweben exprimiert. HIF-2 α , HIF-3 α , ARNT2 und ARNT3 zeigen deutliche Zell-Spezifität. HIF-2 α findet sich in sich entwickelnden endothelialen Zellen, fetalen Lungen, Katecholamin-produzierende Zellen (Semenza, 2000) und vor allem auch in sehr vielen neoplastischen Zellen (Metzen und Ratcliffe, 2004). HIF-3 α , welches in den unterschiedlichsten Geweben vorkommt, existiert in unterschiedlichen Spleißformen. Eine dieser Spleißformen, iPAS (inhibitory PAS protein), wurde 2002 von Makino et al. entdeckt und hat keine Transaktivierungsfunktion. Es bindet an die PAS-Domäne von HIF- α -Proteinen (auch HIF-1 α), verhindert die Dimerisation mit HIF-1 β und damit das Zustandekommen eines funktionellen HIF-1-Komplexes (Makino et al., 2002). iPAS wird im Cornealepithel des Auges stark exprimiert, wo es die HIF-1 induzierte Angiogenese trotz kontinuierlicher hypoxischer Bedingungen effektiv unterdrückt wird (Wenger, 2002).

Bekannt sind außerdem drei andere natürlich vorkommende HIF-1 Antagonisten, deren biologische Funktion noch völlig unklar ist: aHIF, eine antisense Komplementär-RNA zu der

3'untranslatierten Region von HIF-1 α , HIF-1 α Z eine Zink-induzierbare Isoform, und eine HIF1 α -Isoform, welcher die Exons 11 und 12 fehlen (Wenger, 2002).

1.2.1.1 HIF-1 α

Das HIF-1 α -Gen besteht aus 15 Exons und 14 Introns und kodiert für insgesamt 826 Aminosäuren (AS) (Chun et al., 2002). Vergleicht man die menschliche cDNA von HIF-1 α mit der cDNA von Mäusen und Ratten, so ergibt sich eine abgeleitete Aminosäuresequenzgleichheit von >90%, was ein hohes Maß an evolutionärer Konservierung bedeutet (Semenza, 1999).

In seiner N-terminalen Hälfte enthält HIF-1 α einen basischen Teil (AS 17-30), eine HLH (AS 31-71) und eine PAS-Domäne (AS 85-298). Die PAS-Domäne lässt sich in zwei Unterdomänen, PAS-A (AS 85-158) und PAS-B (AS 228-289), unterteilen (Chun et al., 2002). Die N-terminale Hälfte mit seiner bHLH-Domäne und seiner PAS-Domäne dient vor allem der Dimerisierung und der DNA-Bindung (Semenza, 2000). Die bHLH-Domäne wird als Interface für die Heterodimerbildung genutzt, während die PAS-Domäne für zusätzliche Stabilität und Spezifität des HIF-Moleküls sorgt (Taylor und Zhulin, 1999).

In der C-terminalen Hälfte des HIF-1 α -Moleküls finden sich zwei Transaktivierungs-Domänen (TAD), welche durch eine inhibitorische Domäne (ID) getrennt sind. Bei AS 531-575 liegt die N-terminale TAD (NAD), die C-terminale TAD (CAD) bei AS 786-826 (Chun et al., 2002).

Vor allem unter normoxischen Bedingungen unterdrückt die inhibitorische Domäne die TAD-Funktion (Semenza, 1999). Während die N-terminale TAD als interne Aktivierungs-Domäne dient, spielt die C-terminale TAD durch ihre Assoziation mit der CH1 (Cystein/Histidinreich)-Domäne von CBP/p300, einem Co-Aktivator von HIF-1, eine wichtige Rolle bei der HIF-vermittelten Transkription (Schofield und Ratcliffe, 2004). Daneben finden sich im C-terminalen Teil von HIF-1 α auch zwei PEST-ähnliche Motive (AS 499-518 und AS 581-600). PEST-Motive sind reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T). Proteine, die PEST-Motive aufweisen, haben in der Regel eine Halbwertszeit von <2 Stunden und sind meist Ziele schnellen intrazellulären Abbaus (Chun et al., 2002; Taylor und Zhulin, 1999).

In der zentralen Region von HIF-1 α befinden sich zwei unabhängig voneinander funktionierende sauerstoffabhängige Domänen, NODDD (N-terminal oxygen-dependent degradation domain) und CODDD (C-terminal oxygen-dependent degradation domain), welche für die Proteolyse des Moleküls unverzichtbar sind. CODDD überlappt dabei mit der

N-terminalen TAD. Die drei Elemente NODDD, CODDD und CAD der C-terminalen Hälfte des Moleküls sind essenziell für die Stabilisation von HIF-1 α unter Hypoxie (Schofield und Ratcliffe, 2004).

1.2.1.2 HIF-1 β

HIF-1 β oder ARNT wurde im Zusammenhang mit dem Dioxinrezeptor (AHR) entdeckt. AHR ist ein ligandenaktivierter bHLH-PAS-Rezeptor, welcher mit ARNT dimerisiert, an die DNA bindet und dort Dioxin-induzierbare Gene reguliert (Taylor und Zhulin, 1999).

Wie HIF-1 α wird auch HIF-1 β konstitutiv exprimiert. Im Gegensatz zu HIF-1 α wird es jedoch nicht durch Hypoxie beeinflusst (Bell et al., 2005). Von HIF-1 β sind zwei unterschiedliche Isoformen (aus 774 bzw. 789 Aminosäuren) bekannt (Jiang et al., 1996). Auch HIF-1 β hat in seiner N-terminalen Hälfte neben der basischen Domäne eine HLH-Domäne, außerdem besitzt es eine PAS-Domäne und in der C-terminalen Hälfte eine TAD (Taylor und Zhulin, 1999). HIF-1 β -Moleküle dimerisieren nicht nur mit HIF-1 α , sondern auch mit anderen Partnern aus unterschiedlichen Systemen der Genregulation (Masson und Ratcliffe, 2003).

1.2.2 Regulation von HIF-1

Während HIF-1 β konstitutiv exprimiert und in seiner Stabilität nicht signifikant vom Sauerstoffgehalt der Zelle beeinflusst wird, ist HIF-1 α die regulatorische Untereinheit, welche unter Hypoxie bereits nach wenigen Minuten stabilisiert wird (Bell et al., 2005). Unter normoxischen Bedingungen dagegen hat HIF-1 α eine sehr kurze Halbwertszeit und liegt nur in geringen Mengen in der Zelle vor (Masson und Ratcliffe, 2003). Zwei unterschiedliche Mechanismen zur sauerstoffabhängigen Regulation von HIF-1 α , der sauerstoffabhängigen Untereinheit von HIF-1, sind bisher bekannt.

Die Hydroxylierung von spezifischen Prolin-Resten ermöglicht die Bindung von pVHL (von-Hippel-Lindau Tumor-Suppressor-Protein) und damit den proteolytischen Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Pfad (Schofield und Ratcliffe, 2004; Metzen und Ratcliffe, 2004; Huang und Bunn, 2003; Chun et al., 2002). Zusätzlich verhindert die Hydroxylierung eines Asparagin-Restes die Assoziation der C-terminalen TAD mit dem Co-Aktivatoren p300/CBP und damit die HIF-induzierte Transkription (Schofield und Ratcliffe, 2004; Appelhoff et al., 2004; Masson und Ratcliffe, 2003).

Neben den zwei sauerstoffabhängigen gibt es auch sauerstoffunabhängige Mechanismen der HIF-1 Regulation (Schofield und Ratcliffe, 2004; Brière et al., 2005b; Bell et al., 2005; Bilton

und Booker, 2003). Auch der Abbau von HIF-1 unterliegt noch weiteren Regulationsmechanismen (Aprelikova et al., 2004).

1.2.2.1 Prolylhydroxylierung

Wie bereits beschrieben, hat HIF-1 α zwei ODDD (NODDD und CODDD), welche durch die Trans-4-Hydroxylierung der Prolin-Reste Pro-402 (NODDD) und Pro-564 (CODDD) unabhängig voneinander mit pVHL interagieren können (Masson und Ratcliffe, 2003). Beide Prolin-Reste sind in das AminosäureMotiv LXXLAP (Leucin-X-X-Leucin-Alanin-Prolin) eingebettet, welches man konserviert sowohl bei verschiedenen Spezies als auch in HIF-2 α findet (Huang und Bunn, 2003; Chun et al., 2002). pVHL ist die Erkennungs-Untereinheit einer Multiprotein-Ubiquitin-Ligase (pVHL-elonginB-elonginC-Cul2-Rbx), welche in Normoxie hydroxyliertes HIF-1 α durch den Ubiquitin-Proteasom-Pfad abbaut. Dabei erhöht die Hydroxylierung der Prolin-Reste der ODDDs die Affinität von HIF-1 α zu dem pVHL-elonginB-elonginC-Komplex (VBC) mindestens um das Dreifache (Schofield und Ratcliffe, 2004). Das hydroxylierte HIF-1 α bindet über zwei Stellen (HIF-1 α -Residuen 560-567 inklusive Hydroxyprolin (Hyp).-Residuum 564 und Residuen 571-577) an die β -Domäne des pVHL. Die erste Bindungsstelle verschwindet in einer Falte von pVHL, wobei die Verbindung mit den pVHL Residuen Ser111 und His115 über eine Sauerstoff-Wasserstoff-Bindung zustande kommt. Diese Sauerstoff-Wasserstoff-Bindung kommt nur zwischen Hydroxyprolin und Ser111/His115 zustande, obwohl Prolin prinzipiell auch in die Bindungsstelle passt (Masson und Ratcliffe, 2003). Dieser Mechanismus ist essenziell für die Spezifität der Bindung zwischen pVHL und hydroxyliertem HIF-1 α , während die zweite Bindungsstelle (Residuen 571-577) lediglich die Bindungsaffinität zwischen den beiden Proteinen erhöht. Grundsätzlich verläuft die Bindung zwischen NODDD und pVHL nach den gleichen Prinzipien. Allerdings scheint es signifikante Unterschiede in den Bindungen zwischen pVHL und NODDD bzw. CODDD zu geben, welche man bisher allerdings noch nicht versteht (Masson und Ratcliffe, 2003).

Kommt es zu einer Bindung an pVHL, dann wird HIF-1 α polyubiquitiniert, wobei sich die Ubiquitinierungsstellen in der CODDD (AS 390-417) und der NODDD (AS 549-582) befinden. Der Polyubiquitinierung folgt dann der proteasomale Abbau (Taylor und Jobin, 2005). Katalysiert wird die Hydroxylierung von HIF-1 α durch die HIF-Prolylhydroxylase (HPH, auch PHD Prolylhydroxylase), eine Sauerstoff- und α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase (Wenger, 2002).

Dioxygenasen zeichnen sich durch die Übertragung von molekularem Sauerstoff (O_2) aus. Während der Katalyse spaltet die HPH das Sauerstoffmolekül und koppelt diese Reaktion an die Hydroxylierung von HIF-1 α und die oxidative Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinat, wobei CO_2 abgespalten wird (Schofield und Ratcliffe, 2004). Ein Sauerstoffatom wird hierbei in den Alkohol eingelagert, welcher in das HIF-1 α Molekül eingefügt wird, das andere wird genutzt, um unter CO_2 -Abspaltung Succinat zu generieren (Masson und Ratcliffe, 2003).

Die α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen-Superfamilie ist die größte Familie der nicht-Häm Eisen (Fe^{2+})-abhängigen Enzyme, welche ein konserviertes Zwei-Histidin (His199, His279)-Ein-Aspartat (Asp201)-Motiv nutzen, um das Fe^{2+} am katalytischen Zentrum auszurichten (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Neben Eisen (Fe^{2+}) benötigen die HPHs auch Ascorbinsäure als Co-Substrat, ihre Aktivität wird also durch einen Mangel an Ascorbinsäure vermindert (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Die α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen sind absolut auf molekularen Sauerstoff als Co-Substrat angewiesen und haben daher eine deutlich reduzierte Aktivität unter Hypoxie (Masson und Ratcliffe, 2003; Appelhoff et al., 2004). Strukturell gesehen bestehen die α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen aus einem Kern aus acht β -Strängen, welche zu einem „jelly-roll“ Motiv geformt sind. Die drei Eisen-koordinierenden Residuen eines sogenannten „facial triad“-Motivs finden sich in der Nähe des zweiten und siebten β -Stranges, eine Anordnung, die man bei allen Mitgliedern der α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen-Superfamilie findet (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Bisher konnten drei unterschiedliche HPHs (HPH1, 43,6 kD; HPH2, 46 kD und HPH3, 27,3 kD) in Säugerzellen identifiziert werden (Appelhoff et al., 2004). Alle drei HPHs sind *in vitro* in der Lage, HIF-1 α zu hydroxylieren (Schofield und Ratcliffe, 2004; Appelhoff et al., 2004).

Die unterschiedlichen HPHs zeigen eine gewebespezifische Expression und, zumindest wenn sie überexprimiert werden, auch unterschiedliche subzelluläre Verteilungsmuster. Man findet die mRNA für HPH2 vor allem in Fettgewebe, die mRNA für HPH1 vor allem im Hoden und die mRNA für HPH3 vor allem im Herzmuskel und in der Plazenta (Masson und Ratcliffe, 2003). Während die HPH2 vor allem im Zytoplasma lokalisiert ist, findet sich die HPH1 vor allem im Kern (Briuck, 2003; Huang et al., 2002). Über die HPH3 finden sich gegensätzliche Aussagen in der Literatur. Während Bruick et al. von einer gleichmäßigen Verteilung HPH3 in beiden Kompartimenten sprechen (Briuck, 2003), so beschreiben Huang et al. die Verteilung der HPH3 als primär zytoplasmatisch und ihr Ratten-Homolog Sm-20 als in den Mitochondrien lokalisiert (Huang et al., 2002).

Die Expression sowohl der HPH2 als auch der HPH3 (aber nicht der HPH1) wird durch Hypoxie stark induziert, was zu einer erhöhten Hydroxylaseaktivität und damit zu einem rapiden HIF-1 α -Abbau führt, sobald der Zelle nach einer Periode der Hypoxie wieder Sauerstoff zugeführt wird (Schofield und Ratcliffe, 2004; Berra et al., 2003).

Unter normoxischen Bedingungen nimmt die HPH2 die dominierende Rolle bei der HIF-1 α -Hydroxylierung ein (Berra et al., 2003), vermutlich auch, weil in den meisten Geweben die HPH2 im Vergleich zu den anderen HPHs am stärksten exprimiert wird (Appelhoff et al., 2004; Briuck, 2003).

In Zellen, in welchen die HPH2 durch siRNA (small interfering RNA) ausgeschaltet ist, bleibt HIF-1 α in den ersten zehn Minuten nach Reoxygenierung (nach einer hypoxischen Periode) stabil, d.h. es wird nicht abgebaut und transloziert sogar unter Normoxie in den Kern (Berra et al., 2003). In Zellen, in welchen die HPH2 fehlt, wird zugleich eine deutlich größere Menge HIF-1 α stabilisiert, als in normalen Zellen nach vier Stunden Hypoxie (Mazure et al., 2004).

In bestimmten Zellen wird unter Hypoxie dagegen strikt die HPH3 induziert. Die HPH3 reguliert primär HIF-2 α , scheint aber unter hypoxischen Bedingungen eine ähnlich wichtige Rolle für die HIF-1 α -Regulation zu spielen wie HPH2 (Appelhoff et al., 2004). Huang et al. zeigten 2002, dass die CODDD von HIF-1 α am effektivsten von der HPH2, aber auch von der HPH3 und der HPH1 hydroxyliert wird. Gleichzeitig tolerieren die HPHs Mutationen in der CODDD in jeder der Positionen der LXXLAP-Sequenz, außer natürlich an dem Pro-564, der Hydroxylakzeptor-Aminosäure (Huang et al., 2002).

Die NODDD von HIF-1 α wird dagegen nur von der HPH2 und nicht von der HPH3 hydroxyliert (Appelhoff et al., 2004).

1.2.2.2 Asparaginyhydroxylierung

Fedele, Whitelaw und Peet haben 2002 gezeigt, dass neben den ODDDs auch die C-terminale TAD von HIF-1 α sauerstoffabhängig hydroxyliert wird. Während es in den ODDDs zu einer Prolylhydroxylierung kommt, wird in der CAD von HIF-1 α ein Asparagin-Residuum (Asn803) hydroxyliert (Fedele et al., 2002). 2001 entdeckte Mahon ein Protein, welches er FIH (Factor inhibiting HIF) nannte und welches mit der C-terminalen TAD von HIF-1 α interferieren und die Transkriptionsaktivität von HIF unterdrücken kann (Masson und Ratcliffe, 2003). FIH findet sich auch unter hypoxischen Bedingungen vor allem im Zytoplasma (Mazure et al., 2004). Inzwischen weiß man, dass es sich bei FIH um das Enzym handelt, welches Asn803 im C-terminalen TAD hydroxyliert (Appelhoff et al., 2004; Masson und Ratcliffe, 2003; Fedele et al., 2002). FIH oder die HIF-Asparaginyhydroxylase (AHD),

von der nur eine Isoform bekannt ist, gehört wie die HPH zu der Superfamilie der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, besitzt aber eine unterschiedliche Sequenz (Schofield und Ratcliffe, 2004; Fedele et al., 2002).

Die HIF-Asparaginyhydroxylase gehört zu den Jumonji Transkriptionsfaktoren, welche unter anderem beim Zellwachstum und bei der Herzentwicklung eine Rolle spielen (Schofield und Ratcliffe, 2004). Unter Normoxie bindet das CAD an die CH-1 Domäne des Co-Aktivators p300. Strukturanalysen von der Bindung zwischen CH-1 und HIF-1 α zeigen, dass Asn803 Teil einer α -Helix ist, welche sich tief in die Kopplungsstelle eingräbt (Schofield und Ratcliffe, 2004; Fedele et al., 2002). Die Hydroxylierung erfolgt am C3-Kohlenstoff von Asn803 und scheint sowohl die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Molekülen als auch die Ausbildung der α -Helix zu verhindern, welche bei dieser Verbindung von der CAD gebildet wird. Im Hydroxylierungszentrum geht das CAD mehrere Wasserstoffbrückenbindungen mit der Asparaginyhydroxylase ein und bildet dabei eine Drehung aus, welche Asn803 in Richtung des Eisens im katalytischen Zentrum ausrichtet. Im aktiven Zentrum bildet sich eine Wasserstoffbrücke zwischen dem einem der drei Eisenkoordinierenden Zentren (Asp201) und dem Zielasparagin in HIF-1 α , welche vermutlich vor der Bindung von Sauerstoff gelöst werden muss. Distal davon bildet der Teil des CAD um Asn803 eine Schleife und lagert sich an eine hydrophobe Region der Oberfläche der AHD an (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Zusätzlich scheint FIH mit pVHL zu interagieren, obwohl pVHL nicht notwendig für eine volle Hydroxylaseaktivität von FIH ist. Der Mechanismus ist noch unbekannt (Masson und Ratcliffe, 2003).

Die HIF-Asparaginyhydroxylase stellt somit einen zweiten sauerstoffabhängigen Mechanismus in der HIF-Regulation dar (Schofield und Ratcliffe, 2004). Wie bereits erwähnt, ist die HPH2 unter Normoxie das Haupt-Regulatorprotein für HIF-1 α , die AHD reguliert den Anteil von HIF-1 α , welcher der HPH „entkommt“ (Mazure et al., 2004). Versuche von Berra haben allerdings gezeigt, dass in Zellen, in denen die HPH2 geblockt ist, HIF-1 α nicht nur stabilisiert, sondern auch in den Kern transloziert und Transkription aktiviert. Da unter Normoxie die CAD blockiert ist, ist dies vermutlich das Resultat einer Aktivierung der N-terminalen TAD (Mazure et al., 2004; Berra et al., 2003).

1.2.2.3 Regulation des HIF-Abbaus

Feedback-Regulation durch HIF-1

Die Expression der HPH2 und 3 wird über einen Feedback-Mechanismus von HIF-1 und HIF-2 induziert. Dabei wird die HPH2 nur von HIF-1 und die HPH3 sowohl von HIF-1 als auch von HIF-2 induziert. Unter Normoxie hat HIF-1 α keinen Einfluss auf die Expression der HPH2, ebenso nicht in kurzen hypoxischen Episoden (4 h). Unter chronischer Hypoxie (16 h) dagegen induziert HIF-1 α die Expression der HPH2 und nimmt damit einen regulatorischen Einfluss auf seine eigene Aktivität (Aprelikova et al., 2004). Die hypoxische Induktion der HPHs unterdrückt möglicherweise einen Teil der hypoxischen HIF-Induktion und vermittelt vermutlich den schnelleren Abbau der α -Untereinheit nach Reoxygenierung (Briuck, 2003). Zusätzlich ist die Expression der unterschiedlichen HPHs noch durch andere Stimuli induzierbar. Die HPH1-Expression ist in einigen Brustkrebs-Zelllinien durch Östrogen induzierbar, während die Expression von HPH3 durch p53, einem Tumorsuppressorgen, induziert werden kann (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Sauerstoff

HPHs sind für die Hydroxylierung von HIF-1 α auf molekularen Sauerstoff angewiesen. Unter Anoxie können die HPHs HIF-1 α nicht hydroxylieren (Bell et al., 2005).

In vitro Studien mit rekombinanten HPHs haben gezeigt, dass die K_m für Sauerstoff für alle drei HPHs mit 230-250 μ M im Bereich von Raumluft liegt (Bell et al., 2005). Dies bedeutet, dass bei einer Sauerstoffkonzentration von 21% die HPHs nur noch ihre halbmaximale Aktivität haben.

Damit liegen die K_m der HPHs deutlich über dem Sauerstoffgehalt, den die meisten Zellen unter normoxischen Bedingungen zur Verfügung haben. Sollten die K_m der rekombinanten HPHs mit denen der *in vivo* vorkommenden HPHs übereinstimmen, so würde es sich um Enzyme handeln, welche nicht unter Gleichgewichtsbedingungen arbeiten und daher auch durch kleinste Änderungen im Sauerstoffpartialdruck beeinflusst werden können (Briuck, 2003).

Wenn die Sauerstoffkonzentration in der Zelle von 21% auf 10% sinkt, so sinkt auch signifikant die Aktivität der HPH. Bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen nimmt die Aktivität der HPH stark ab (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Stickstoffmonoxid

Über den Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) auf die HIF-1 α Stabilisierung gibt es kontroverse Befunde.

NO ist ein *in vitro* Inhibitor der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, die mit Sauerstoff um die Bindung am Eisen im aktiven Zentrum der HPH konkurrieren und damit den Abbau von HIF-1 α verhindern (Schofield und Ratcliffe, 2004; Köhl et al., 2006). In Normoxie erhöht NO die HIF-1 α Stabilisierung, die DNA-Bindung und seine Transkriptionsaktivität sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen, Hep3B- und LLC-PK₁-Zellen (Wenger, 2002; Bilton und Booker, 2003). Unter hypoxischen Bedingungen dagegen inhibiert NO die DNA-Bindungsaktivität und die Stabilisierung von HIF-1 α (Schofield und Ratcliffe, 2004; Bilton und Booker, 2003). Die Transkription der iNOS wird wiederum von HIF-1 kontrolliert. Unter Hypoxie kommt es daher zu einer vermehrten Expression der iNOS und damit zu einer vermehrten NO-Produktion (Chun et al., 2002; Bilton und Booker, 2003).

Hagen et al. wiesen 2002 nach, dass die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette durch NO die Stabilisierung von HIF-1 α unter 3% O₂ verhindert. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass NO als Inhibitor des mitochondrialen Komplex IV (Cytochrom Oxidase) die Atmungskette hemmt, dadurch die Sauerstoffkonzentration der Zelle ansteigt und der HIF-1 α -Abbau über die HPH induziert wird (Hagen et al., 2003).

Warum der Effekt von NO so gegensätzlich ist, ist nicht bekannt. Möglicherweise spielen die Konzentration (Chun et al., 2002), die chemische Zusammensetzung des NO-Donors (Schofield und Ratcliffe, 2004), der Zelltyp oder die Sauerstoffkonzentration (Bilton und Booker, 2006) eine Rolle. Eventuell ist der Effekt von NO auf HIF-1 auch abhängig von der Länge der Exposition (Wenger, 2002).

Zitratzyklusmetabolite

Die Konzentration von Zitratzyklusmetaboliten scheint einen Einfluss auf die Enzymaktivität der HPH zu haben (Maxwell, 2005).

Die Succinatdehydrogenase (SDH) ist sowohl Teil des Zitratzyklus als auch ein Enzym der Atmungskette. Sie überträgt Wasserstoff von Succinat auf Ubiquinon, ohne dabei Protonen über die innere Mitochondrienmembran zu transportieren. Die SDH besteht aus einer hydrophilen Domäne, welche in die Matrix der Mitochondrien hereinreicht, und einer hydrophoben Domäne, welche in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist (Ackrell, 2000; Hägerhäll, 1997). Die hydrophile Domäne besteht aus einer Flavoprotein-Untereinheit (SDHA) mit einer molekularen Masse von 70 kD mit einem kovalent gebundenen FAD als

Teil des aktiven Zentrums und einer Eisen-Schwefel-Protein-Untereinheit (SDHB) mit einer Größe von 30 kD, welche drei unterschiedliche Eisen-Schwefel-Cluster (S1,S2,S3) beinhaltet (Ackrell, 2000; Hägerhäll, 1997; Brière et al., 2005a). Die hydrophobe Domäne besteht beim Menschen aus zwei Protein-Untereinheiten und einer Häm-Gruppe. Die größere Untereinheit, SDHC hat eine molekulare Masse von 15 kD und fünf Helices (1L-5L), die kleinere SDHD hat eine molekulare Masse von 12 kD und vier Helices (1S-4S) (Müller et al., 2005). Defizite der SDH, wie defekte Untereinheiten etc., führen zu abnormal hohen Konzentrationen von HIF-1 α (Brière et al., 2005a).

Die Arbeitsgruppe um Selak zeigte, dass die Inhibierung der SDH durch gegen ihre D-Untereinheit gerichtete siRNA (small interfering RNA) zur Akkumulation von Succinat in der Zelle führt, was wiederum eine Reduktion der HPH-Aktivität bewirkte (Selak et al., 2005).

Auch in SDHA-mutierten Fibroblasten lässt sich in Normoxie eine deutliche Erhöhung der Succinatkonzentration im Vergleich zu normalen Fibroblasten und eine deutlich erhöhte Rate an in den Kern transloziertem HIF-1 α nachweisen. Durch Zugabe von α -Ketoglutarat fiel die Rate an transloziertem HIF-1 α wieder in einen regulären Bereich, was dafür spricht, dass sich die nukleäre Translokation auf eine Substrat/Produkt-Beeinflussung der HPH zurückführen lässt (Brière et al., 2005b).

Bi-allelische Fumarathydrogenase-Mutationen in Tumorzellen von Individuen mit HLRCC (hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer) führen zu einer erhöhten Succinat- und Fumaratkonzentration, während bei bi-allelische SDHB-Mutationen in Tumorzellen von Individuen mit HPGL (hereditary paragangliomatosis with pheochromocytomas) erhöhte Succinatkonzentration im Zytoplasma detektierbar sind. Sowohl in den HLRCC- als auch in den HPGL-Zellen ist die HIF-1 α -Konzentration stark erhöht im Vergleich zu normalem Gewebe. Dies spricht auch für eine Beeinflussung der HIF-1 α -Konzentration durch Succinat (Pollard et al., 2005).

Das Zuführen von Succinat und damit die Erhöhung der intrazellulären Succinatkonzentration führen je nach Arbeitsgruppe zu einer Erhöhung der HIF-1 α -Konzentration (Selak et al., 2005) oder auch nicht (Lu et al., 2005).

Die Akkumulation von Pyruvat, dem Endprodukt der aeroben Glykolyse, führt zu einer Erhöhung der HIF-1 α -Stabilisierung und auch zu einer Aktivierung der HIF-1-induzierten Genexpression unter normoxischen Bedingungen. Auch Laktat, das Endprodukt der anaeroben Glykolyse, kann die HIF-1 α -Stabilisierung erhöhen, muss dazu aber vorher durch die LDH in Pyruvat überführt werden (Lu et al., 2005). Daneben erhöht auch Oxalacetat, ein Zitratzyklusmetabolit und genau wie Pyruvat eine α -Ketosäure, die Stabilisierung von HIF-1 α

(Lu et al., 2005; Dalgard et al., 2004). Ng zeigte bereits 1991, dass Pyruvat und Oxalacetat Inhibitoren von α -Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen sind (Ng et al., 1991).

In vitro Experimente mit gereinigter HPH belegen, dass Pyruvat und Oxalacetat, aber weder Fumarat, Succinat, noch Malat, die HPH durch einen Mechanismus inhibieren, welcher durch Ascorbinsäure reversibel ist (Lu et al., 2005).

Mitochondriale Atmungskette

Versuche mit Zellen, in denen das Gen für Cytochrom c ausgeschaltet wurde, zeigen, dass diese unter Hypoxie nicht mehr in der Lage sind, HIF-1 α zu stabilisieren. Auch das Ausschalten der Rieske-Eisen-Schwefel-Untereinheit von Komplex III durch siRNA führt zu fehlender Stabilisierung von HIF-1 α unter Hypoxie (Bell et al., 2005).

Sogenannte ρ^0 -Zellen, welche Aufgrund von fehlenden Untereinheiten der Komplexe I, III und IV keine intakte Atmungskette mehr haben, können unter Hypoxie HIF-1 α nicht mehr stabilisieren (Bell et al., 2005). Auch aus Hep3B generierte ρ^0 -Zellen zeigen während Hypoxie keine HIF-1 DNA-Bindungsaktivität mehr (Chandal et al., 1998). Eine intakte Atmungskette scheint daher für die HIF-1 α -Stabilisierung unter Hypoxie notwendig zu sein (Bell et al., 2005; Chandal et al., 1998).

Es gibt jedoch auch gegensätzliche Versuchsergebnisse. So zeigten Srinivas et al. in zwei ρ^0 -Zelllinien (aus einer Osteosarkomzelllinie und einer Fibroblastenzelllinie), dass die hypoxische Aktivität des HIF-1-Komplexes ebenso vorhanden war wie seine nukleäre Translokation und seine hypoxie-induzierte Transaktivierungs-Aktivität (Srinivas et al., 2001).

Auch die Arbeitsgruppe um Ratcliffe zeigte in Versuchen mit diversen ρ^0 -Zelllinien und anderen Zellen, die Defekte in der mitochondrialen Atmungskette aufwiesen, dass eine nicht-funktionstüchtige mitochondriale Atmungskette keinen Einfluss auf die Stabilisierung von HIF-1 α und die HIF-1-Transaktivierungs-Aktivität hat (Vaux et al., 2001).

Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch die Prozedur der Gewinnung der ρ^0 -Zellen oder durch Unterschiede in den verwendeten Zelllinien erklären (Srinivas et al., 2001).

Doege et al. zeigten 2005, dass in herkömmlichen gasundurchlässigen Zellkulturgefäßen bei einer Begasung mit 0,1% O₂ die Akkumulation von HIF-1 α unabhängig von einer Inhibition der mitochondrialen Atmungskette erfolgte. Bei höheren Sauerstoffkonzentration (3% O₂) ist nach Inhibition der mitochondrialen Atmungskette zwar noch eine geringe Menge an HIF-1 α nachweisbar, diese ist allerdings deutlich geringer als in Zellen mit einer funktionsfähigen

Atmungskette. Bei Versuchen in speziellen gasdurchlässigen Zellkulturgefäßen ist jedoch die HIF-1 α -Stabilisierung bei einer Begasung mit 3% Sauerstoff völlig unabhängig von einer Inhibition der mitochondrialen Atmungskette (Doege et al., 2005).

Die Mitochondrien- und auch die ROS-abhängige Induktion von HIF-1 α lässt sich anscheinend nur unter hypoxischen, nicht jedoch unter fast anoxischen bzw. anoxischen (0% O₂) Bedingungen oder wenn die HPHs chemisch inhibiert werden nachweisen (Wenger, 2006).

Doege et al. zeigten zusätzlich, dass die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette die intrazelluläre Sauerstoffkonzentration erhöht. Dadurch, dass die Mitochondrien keinen Sauerstoff mehr verbrauchen, steht somit der HPH mehr freier Sauerstoff zu Verfügung, was zu einer verbesserten Funktion und damit zu einer vermehrten Hydroxylierung von HIF-1 α führt. Damit würden einzelne Komplexe der mitochondrialen Atmungskette die HIF-1 α -Stabilisierung nicht direkt beeinflussen, sondern der Verlust der oxidativen Phosphorylierung würde zu einem erhöhten Sauerstoffangebot und somit zu einer gesteigerten HPH-Funktion führen (Wenger, 2006; Doege et al., 2005).

Komplex IV oder Cytochrom-Oxidase ist das Schlüsselenzym der mitochondrialen Atmungskette. Es besteht aus 13 Untereinheiten (beim Rind), wobei einige Untereinheiten in der mitochondrialen DNA kodiert werden und an mitochondrialen Ribosomen translatiert werden (Khalimonchuck und Rödel, 2005). Untereinheit II hat ein Kupfer-Zentrum (Cu_A) und erhält als erste die Elektronen von Cytochrom c. Danach werden die Elektronen auf ein Häm α der Untereinheit I übertragen. Untereinheit I enthält das aktive Zentrum des Enzymkomplexes in Form eines Häm α_3 /Cu_B-Redoxzentrums. Das aktive Zentrum überträgt die Elektronen über mehrere Zwischenschritte auf Sauerstoff (Saraste, 1999; Khalimonchuck und Rödel, 2005).

Die Aktivität der Cytochrom-Oxidase ist nicht abhängig von der Sauerstoffkonzentration bevor diese nicht auf extrem niedrige Werte (Anoxie) fällt (1 μ M bzw. $\ll$ 0,1% O₂). Die mitochondriale Atmungskette scheint somit an dieser Stelle zwar als „Anoxie-Sensor“, nicht jedoch als „Hypoxie-Sensor“ dienen zu können (Guzy und Schumacker, 2006).

ROS

ROS wie Superoxid und Wasserstoffperoxid dienen möglicherweise in vielen Systemen als „second messenger“ im Rahmen der intrazellulären Signalvermittlung (Wenger, 2000). Ob und welchen Einfluss ROS bei der intrazellulären Signalvermittlung einnehmen, ist bisher noch unklar. So konnten Höhler et al. in PC12-Zellen keinen Nachweis für einen

Zusammenhang zwischen ROS und der hypoxischen Hochregulation der Expression der Tyrosinhydroxylase erbringen (Höhler et al., 1999). Chandel et al. sehen dagegen einen direkten Zusammenhang zwischen einer erhöhten ROS-Produktion und der Induktion der Genexpression in Hypoxie, da Inhibitoren der Atmungskette die hypoxisch gesteigerte mRNA-Expression mehrerer Zielgene in Hep3B-Zellen unterdrücken (Chandel et al., 1998).

Unklar ist auch, ob und wie die ROS-Produktion an sich durch Hypoxie beeinflusst wird.

Während sich in Hypoxie eine Zunahme der ROS-Produktion in PC12-Zellen (Höhler et al., 1999), Hep3B-Zellen (Chandel et al., 1998), Kardiomyozyten (Duranteau et al., 1998) und Myozyten der Pulmonalarterie (Waypa et al., 2001) nachweisen lässt, so zeigten Yang und Block jedoch, dass es in Endothelzellen der Pulmonalarterie des Schweins in Hypoxie zu Abnahme der intrazellulären ROS-Produktion kommt (Yang und Block, 1995).

Über den Einfluss von ROS in Normoxie und Hypoxie auf die Stabilisierung von HIF-1 α und die HIF-1 DNA-Bindungskapazität finden sich in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse.

Enomoto et al. wiesen nach, dass unter Hypoxie in HeLa-Zellen ohne intakte Atmungskette zwar keine ROS-Produktion mehr stattfindet, jedoch die Akkumulation von HIF-1 α und die erhöhte Aktivität der Zielgene von HIF-1 wie in Wildtyp-Zellen weiterhin nachweisbar sind (Enomoto et al., 2002). Unter Normoxie vermitteln neben Zytokin-, Hormon- und Wachstumsfaktor-induzierter ROS-Bildung (Köhl et al., 2006) auch exogen zugeführte ROS (Chandel et al., 2000; Mansfield et al., 2005) die Akkumulation von HIF-1 α . Auch Köhl et al. beobachteten, dass eine Zunahme der intrazellulären ROS-Konzentration in einer humanen pulmonalen Epithelzelllinie (A549) zu einer vermehrten Stabilisierung und Kerntranslokation von HIF-1 α führt und sich die Transkriptionsaktivität von HIF-1 erhöht. Durch einen in vivo Bindungs-Assay zeigten Köhl et al. außerdem, dass die beobachtete HIF-1 α -Akkumulation sich auf eine konzentrationsabhängige Inhibition der HPH durch die ROS zurückführen lässt (Köhl et al., 2006).

ROS können auch in Zellen gebildet werden, die keine intakte Atmungskette mehr haben (Köhl et al., 2006). Daher scheint es mehr als nur einen Bildungsort für ROS zu geben.

Obwohl sich Literatur auch Hinweise auf NAD(P)H-Oxidasen als Bildungsorte der endogenen ROS finden, so favorisieren viele Arbeitsgruppen die mitochondriale Atmungskette als Hauptbildungsort für ROS. Die genaue Bildungsstelle für mitochondriale ROS lässt sich aus den vorliegenden Experimenten jedoch noch nicht bestimmen (Paddenberget al., 2003).

Unter Normoxie scheint die ROS-Bildung sowohl von einem funktionstüchtigen Komplex I als auch einem intakten Q-Zirkel von Komplex III abhängig zu sein. Sowohl die Hemmung

von Komplex I durch Rotenon als auch die Hemmung von Komplex III durch Antimycin A führen zu einer verminderten ROS-Produktion (Paddenberg et al., 2003; Chandel et al., 2000; Chandel et al., 1998). Paddenberg et al. haben zudem Hinweise für eine essenzielle Rolle des Komplex II bei der hypoxischen ROS-Produktion gefunden. Unter Hypoxie scheint Komplex II nicht als SDH, sondern als Fumaratreduktase zu agieren und dabei Succinat zu akkumulieren sowie ROS zu generieren (Paddenberg et al., 2003).

1.2.3 Zusätzliche Regulationsmechanismen von HIF-1

Die Aktivierungskaskade von HIF beinhaltet die post-translationale Phosphorylierung, die Translokation in den Nukleus, Dimerisation mit HIF-1 β , die Bindung an die DNA, die Rekrutierung von Co-Aktivatoren für die Transkription und die Zielgen-Transaktivierung. Dies legt nahe, dass HIF-1 nicht nur über seinem Abbau durch die α -Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen kontrolliert wird, sondern dass es auch noch andere Mechanismen zur Modulation und Regulation der HIF-1-Antwort gibt (Wenger, 2002).

Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von HIF-1 α hat keinen Einfluss auf die Stabilisierung unter Hypoxie, scheint aber eine Rolle bei der Regulation der Transkriptionsaktivität von HIF-1 zu spielen (Wenger, 2002; Huang und Bunn, 2003). Gradin et al. haben Hinweise für eine funktionelle Phosphorylierung eines konservierten Threonin-Rests in der C-terminalen TAD, ganz in der Nähe von Asn803, welche durch die Asparaginyhydroxylase hydroxyliert wird (Schofield und Ratcliffe, 2004). Lange Zeit vermutete man, dass HIF-1 α ein Substrat von MAPK (mitogen activated protein kinase) sei, da eine Erhöhung der MAPK-Aktivität zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität von HIF-1 führt. Heute weiß man, dass die MAPK ihren Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von HIF-1 über eine Phosphorylierung des Co-Faktors p300 ausübt (Metzen und Ratcliffe, 2004).

Ein weiterer Mechanismus der HIF-1-Regulation ist die Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase(PI3K)/Akt/mTOR-Kaskade (mTOR = mammalian Target of rapamycin), welche die Regulation von HIF durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren wie Insulin oder IGF-1 (insulin like growth factor-1) vermittelt (Metzen und Ratcliffe, 2004; Huang und Bunn, 2003). Gleichzeitig kann HIF-1 α aber auch direkt über das „regulatory associated protein of mTOR (raptor)“ reguliert werden, welches an ein mTOR Signalmotiv (TOS) im n-terminalen Ende von HIF-1 α bindet (Land und Tee, 2007).

Acetylierung

Die Acetylierung eines Lysin-Residuums (Lys532) durch die N-Acetyltransferase ARD1 (arrest-defective-1 protein) ist eine weitere post-translationale Modifikation von HIF-1 α . Die Acetylierung von Lys532 führt zu einer Destabilisierung von HIF-1 α unter Normoxie, wobei die Ursachen und Wirkungen dieses Mechanismus noch nicht bekannt sind (Metzen und Ratcliffe, 2004).

ARD1

ARD1 gehört zu der Familie der N-Acetyltransferasen. Acetylierung von Lysin532 in der ODDD in der Nähe von Hydroxyprolin564 scheint die Bindung an pVHL und damit den Abbau von HIF-1 α zu erleichtern (Mazure et al., 2004). Neben der Prolylhydroxylierung scheint die Acetylierung durch ARD1 ein zweiter negativer Regulationsmechanismus von HIF-1 α zu sein, welcher im Gegensatz zu den HPHs nicht sauerstoffabhängig ist und daher sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie zu finden ist (Mazure et al., 2004; Giaccia et al., 2003). Ansonsten ist über den ARD1-Mechanismus noch nicht viel bekannt (Giaccia et al., 2003).

Sonstige

Die HIF-1 α -Stabilisierung unter Normoxie wird des weiteren über eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflusst. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche HIF-1 α unter Normoxie stabilisieren.

Faktor		Referenz
Insulin		Zelzer et al. (1998)
IGF-1	(insulin-like growth factor 1)	Tazuke et al. (1998)
IGF-2	(insulin-like growth factor 2)	Feldser et al. (1999)
EGF	(epidermal growth factor)	Agani und Semenza (1998)
FGF-2	(fibroblast growth factor 2)	Das et al. (2005)
IL-1 β	(Interleukin 1- β)	Hellwig-Bürgel et al. (1999)
TNF- α	(Tumornekrosefaktor α)	Hellwig-Bürgel et al. (1999)
AT-II	Angiotensin II	Chen et al. (2005)
Thrombin		Görlach et al. (2001)
TGF- β ₁	(transforming growth factor 1- β)	Berger et al. (2003)
PDGF	(platelet-derived growth factor)	Zhang et al. (2003)
HGF	(hepatocyte growth factor)	Tacchini et al. (2001)

Tabelle 1.4 Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche die HIF-1 α -Stabilisierung in Normoxie induzieren (Wenger, 2002)

Ursprünglich wurde HIF-1 aufgrund seiner Bindungskapazität für ein HRE (hypoxia-response-element) in der 3'-Flankenregion des Erythropoetin-Gens 1995 von Wang und Semenza entdeckt (Wang und Semenza, 1995). Das EPO-Gen ist somit ein Zielgen von HIF-

1. Neue Studien zeigen, dass unter hypoxischen Bedingungen EPO wiederum zu einer erhöhten HIF-1 α -Expression führen kann (Imamura et al., 2007).

1.2.4 Genregulation durch HIF

Unter Normoxie ist der HIF-1 α -Spiegel sehr niedrig und nicht in allen Zellarten messbar, wohingegen in vielen Tumorzelllinien HIF-1 α auch unter Normoxie stabilisiert wird (Masson und Ratcliffe, 2003). Während sich HIF-1 α in Normoxie vor allem im Zytoplasma findet, so ist es in Hypoxie vor allem im Kern nachweisbar. Die Translokation in den Kern kann dabei neben Hypoxie auch durch Eisenchelatoren induziert werden (Masson und Ratcliffe, 2003) und ist unabhängig von HIF-1 β (Wenger, 2002). Der Mechanismus der Kern-Translokation von HIF-1 α ist bisher nicht geklärt, wird aber vermutlich über die aktive Verhinderung der Translokation unter Normoxie gesteuert (Schofield und Ratcliffe, 2004).

Im Kern dimerisiert HIF-1 α mit HIF-1 β , wobei die bHLH-Domäne als Interface für die Heterodimerbildung dient und die PAS-Domäne für zusätzliche Stabilität und Spezifität des HIF-Moleküls sorgt (Taylor und Zhulin, 1999). Das HIF-1 α /HIF-1 β -Dimer HIF-1 bindet an ein spezielles Motiv der DNA (G/ACGTG), die HIF-1 DNA Bindungsstelle (HBS), welche in sogenannten Hypoxia-Response Elementen (HRE) einer Reihe von Zielgenen zu finden ist (Schofield und Ratcliffe, 2004). Für die Transaktivierung rekrutiert HIF-1 über seine beiden TADs in HIF-1 α und über die C-terminale TAD von HIF-1 β transkriptionale Co-Aktivatoren wie die Histon-Acetyltransferase CBP/p300 (Wenger, 2000). Co-Aktivatoren von HIF-1 wie p300 (auch CBP, core binding protein), SRC-1 (steroid-receptor co-activator 1) und TIF2 (transcription intermediate factor 2) werden ubiquitär exprimiert, spielen eine wichtige Rolle bei der Transkription und nehmen somit Einfluss auf Zellwachstum, Differenzierung, Transformation und Zelltod (Mazure et al., 2004). Redox-empfindliche Cystein-Residuen in der TAD und der DNA-Bindungsstelle erklären die erleichterte Rekrutierung der Co-Faktoren CBP/p300, SRC-1 und TIF2 in Anwesenheit des Redoxfaktors Ref-1 (Wenger, 2002). p300 bindet mit seiner Cystein-Histidin-reichen Domäne (CH1) an die C-terminale TAD von HIF-1 α und erhöht die Transaktivierungsrate vermutlich durch eine erhöhte Histon-Acetylierung. Dies führt lokal zu einer Änderung der Chromatinstruktur, was die Affinität der DNA zu Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 erhöht. p300 erhöht zusätzlich die Transaktivierungsaktivität von HIF-1 α auch über die N-terminale TAD, der Mechanismus ist allerdings noch unbekannt (Mazure et al., 2004).

1.2.5 Übersicht einiger Zielgene von HIF-1

Energiegewinnung		Vasomotorische Regulation	
Glukose-Transporter 1	Ebert et al. (1995)	Endothelin-1	Hu et al. (1998), Minchenko & Caro (2000), Camenisch et al. (2001)
Hexokinase-2	Riddle et al. (2000)	Adrenomedullin	Cormier-Regard et al. (1998), Nguyen & Claycomb (1999)
6-Phosphofrukto-1-Kinase L	Semenza et al. (1994)	Tyrosinhydroxylase	Norris & Millhorn (1995)
Glycerolaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	Graven et al. (1999)	α 1B-Adrenorezeptor	Eckhart et al. (1997)
Aldolase-A	Semenza et al. (1994 u. 1996)	iNOS (induzierbare NO-Synthase)	Melillo et al. (1995)
Phosphoglycerat-Kinase 1	Semenza et al. (1994), Firth et al. (1994)	eNOS (endotheliale NO-Synthase)	Coulet et al. (2003)
Laktatdehydrogenase A	Semenza et al. (1994), Firth et al. (1994 u. 1995)	Hämoxygenase	Lee et al. (1997)
6-Phosphofrukto-2-Kinase	Minchenko et al. (2002)	ANP (atrial natriuretic peptide)	Chun et al. (2003)
Carboanhydrase-9	Wykoff et al. (2000)		
		Wachstum und Apoptose	
Hormonale Regulation		Insulin-like growth-factor-binding protein-1	Tazuke et al. (1998)
Erythropoietin	Semenza & Wang (1992)	Nip3	Bruick (2000)
Leptin	Grosfeld et al. (2002)	Endoglin	Sanchez-Elsner et al. (2002)
		Wilms-Tumor-Suppressor	Wagner et al. (2003)
Angiogenese		α -Fetoprotein (negative Regulation)	Mazure et al. (2002)
VEGF A	Levy et al. (1995), Liu et al. (1995), Forsythe et al. (1996)	Calcitonin-receptor-like-receptor	Nikitenko et al. (2003)
Endothelial-gland-derived VEGF	LeCouter et al. (2001)		
VEGF-Rezeptor-1 (Flt-1)	Gerber et al. (1997)	Regulation der Transkription	
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1	Kietzmann et al. (1999), Fink et al. (2002)	DEC1 und DEC2	Miyazaki et al. (2002)
		ETS1	Oikawa et al. (2001)
Zellmigration		p35srj	Bhattacharya et al. (1999)
Chemokinrezeptor CXCR4	Staller et al. (2003)		
c-Met	Pennacchietti et al. (2003)	Transport	
		Transferrin	Rolfs et al. (1997)
Virusassoziiert		Transferrin-Rezeptor	Tacchini et al. (1999), Lok & Ponka (1999)
Retrotransposon VL30	Estes et al. (1995)	Coeruloplasmin	Mukhopadhyay et al. (2000)
		Multidrug-resistent P-Glykoprotein	Comerford et al. (2002)
Matrix und Barriere-Funktionen			
Prokollagen-Prolylhydroxylase- α 1	Takahashi et al. (2000)	Sonstige	
Intestinal trefoil factor	Furuta et al. (2001)	CD 55	Louis et al. (2005)
Ecto-5'-Nukleotidase	Synnestvedt et al. (2002)	Glukokortikoid-Rezeptor	Leonard et al. (2005)
		β 2-Integrin	Kong et al. (2004)
		COX-2	Hellwig-Bürgel et al. (2005)

Tabelle 1.5 Übersicht über einige Zielgene von HIF-1 α (Schofield und Ratcliffe, 2004 außer „sonstige“)

1.3 Verwendung der Zelllinie HepG2

Für die folgenden Versuche wurde die Zelllinie HepG2 (auch Hep G2 bzw. Hep-G2) verwendet. Die Zelllinie wurde 1975 aus dem hepatozellulären Karzinom eines 15jährigen männlichen Argentiniers gewonnen. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer bzw. in kleinen Aggregaten. Sie haben eine Verdopplungszeit von ungefähr 50-60 Stunden. HepG2 ist frei von Hepatitis B-Virus, Hepatitis C-Virus und HI-Virus (www.dsmz.de). Die Zelllinie wird von der Firma ATCC, Rockville, Maryland, USA unter der Nummer HB 8065 geführt.

Mit dem Ziel ein Zellkultursystem zu entwickeln, welches Erythropoetin (Epo) produziert, hat 1987 die Arbeitsgruppe um Goldberg und Bunn eine Vielzahl von renalen und hepatischen Zelllinien auf ihre Expression von Epo getestet. Dabei fielen die beiden humanen Zelllinien HepG2 und Hep3B durch eine hohe Epo-Produktion auf. HepG2-Zellen sind in der Lage ihre Epo-Produktion durch Hypoxie oder auch durch die Behandlung von Cobalt(II)Chlorid zu verdreifachen. HepG2-Zellen weisen weiterhin eine große strukturelle und biochemische Ähnlichkeit zu primären Hepatozyten auf (Goldberg et al., 1987). Bis Mitte der 1990er Jahre wurden HepG2-Zellen vor allem wegen ihrer Eigenschaft der hypoxie-induzierbaren Epo-Produktion verwendet (z.B. Dittmer und Bauer, 1992; Görlach et al., 1993; Herkens et al., 1994; Fandrey et al., 1994; Wenger et al., 1995). 1995 entdeckten Wang und Semenza (in Hep3B-Zellen) den Transkriptionsfaktor HIF-1 aufgrund seiner Bindungskapazität für ein HRE (hypoxia-response-element) in der 3'-Flankenregion des Erythropoetin-Gens und identifizierten seine beiden Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β (Wang und Semenza, 1995). Weitere Untersuchungen von Semenza an Hep3B- und HepG2-Zellen zeigten, dass die hypoxie-induzierte Produktion von Epo von HIF-1 abhängig ist (Semenza, 1994). Seit Mitte der 1990er Jahre werden HepG2-Zellen von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen für Untersuchungen an HIF-1 α und hypoxie-induzierten Genantworten verwendet (z.B. Kallio et al., 1997; Tacchini et al., 2001; Minchenko et al., 2004; Piret et al., 2004; Zhu et al., 2005). Wir haben HepG2-Zellen für unsere Versuche gewählt, da sie eine hypoxie-induzierte HIF-1 α -Stabilisierung aufweisen und zusätzlich recht einfach zu kultivieren sind. Da es sich bei unseren Versuchen die Bedingungen während einer Lebertransplantation simuliert werden sollen, ist es ideal, dass HepG2-Zellen eine große Ähnlichkeit zu primären Hepatozyten aufweisen.

1.4 Ziele der Promotionsarbeit

Auf dem deutschen Markt sind zur Zeit drei Organkonservierungslösungen erhältlich, welche auch bei Lebertransplantationen verwendet werden. Neben der vor allem im amerikanischen Raum verwendeten UW-Lösung ist in Europa und somit auch Deutschland die HTK-Lösung (auch aus Kostengründen) weit verbreitet. Sei einiger Zeit wird auch die Celsior-Lösung, eine neue Organkonservierungslösung aus Frankreich, für die Lagerung und den Transport von Bauchorganen verwendet.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, in einem Organtransplantationsmodell mit HepG2-Zellen aufzuzeigen, welchen Einfluss die drei unterschiedlichen Organkonservierungslösungen auf die Vitalität und die Hypoxieantwort von in ihnen inkubierten HepG2-Zellen haben.

Die Vitalität von in den drei unterschiedlichen Organkonservierungslösungen inkubierten HepG2-Zellen wurde mit Hilfe eines MTT-Tests unter den Versuchsbedingungen 37°C Normoxie (21% O₂), 37°C Hypoxie (1% O₂), 4°C Normoxie (21% O₂) und 4°C Hypoxie (1% O₂) nach jeweils 6, 12 und 24 Stunden gemessen.

Der MTT-Test ist ein weit verbreitetes Messverfahren zur Bestimmung der Zellvitalität. In vitalen Zellen wird MTT, ein Tetrazoliumsalz, zu seinem farbigen Metaboliten MTT-Formazan reduziert. Diese Farbreaktion lässt sich quantitativ auswerten (Vistica et al., 1991; Vellonen et al., 2004)

Als Marker für die Hypoxieantwort wurde HIF-1 α im Westernblot nachgewiesen. HIF-1 α ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF, einem wichtigen Regulatorprotein der Hypoxieantwort. Der Abbau der α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1 ist sauerstoffabhängig. Während die Halbwertszeit von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen nur wenige Minuten beträgt, wird HIF-1 α unter Hypoxie in der Zelle stabilisiert (Semenza, 2000; Wenger, 2000; Schofield und Ratcliffe, 2004; Metzen und Ratcliffe, 2004). HIF-1 α ist somit einerseits ein zuverlässiger Marker für hypoxische Zustände, andererseits beeinflusst HIF-1 als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von intrazellulären Vorgängen, die mit der Adaption der Zellen an hypoxische Zustände verbunden sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist, an einem Zellkulturmodell mit HepG2-Zellen mögliche Unterschiede in der HIF-1 α -Stabilisierung in den Organkonservierungslösungen HTK, UW und Celsior nachzuweisen. Dazu wurde HIF-1 α aus HepG2-Zell-Extrakten nach 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation unter 37°C Normoxie (21% O₂), 37°C Hypoxie (1% O₂), 4°C Normoxie (21% O₂) und 4°C Hypoxie (1% O₂) im Westernblot nachgewiesen und quantifiziert.

Bereits in den 1980er Jahren haben die Arbeitsgruppe um Grieshaber, Wiesner und Rösen nachgewiesen, dass einzelne Metabolite des Zitratzyklus einen Einfluss auf die Stoffwechselvorgänge in ischämischen Gewebe haben (Wiesner et al., 1988; Hohl et al., 1987).

Daher wurde in einem zweiten Teil dieser Arbeit mit Hilfe eines MTT-Testes versucht einen möglichen Einfluss der Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und Succinat auf die Vitalität von HepG2-Zellen durch die Zugabe zu den Organkonservierungslösungen HTK, UW und Celsior aufzuzeigen und die HIF-1 α -Stabilisierung in den einzelnen Organkonservierungslösungen durch Zugabe der Zitratzyklusmetabolite Succinat, Fumarat und Malat zu beeinflussen.

Von den Ergebnissen erwarten uns einen Einblick auf einen möglichen Einfluss der Zitratzyklusmetabolite auf die Vitalität von Leberzellen, welche in Organkonservierungslösungen aufbewahrt wurden, sowie auf die Stabilisierung von HIF-1 α . HIF-1 α ist das zentrale Regulatorprotein der hypoxischen Antwort und möglicherweise ein Parameter, um eine Anpassung von Zellen an hypoxische Zustände darzustellen. Nur wenige Arbeitsgruppen haben sich bisher mit einer möglichen Rolle von HIF-1 α im Rahmen einer Organtransplantation beschäftigt. Sowohl die niederländische Arbeitsgruppe um Baan et al. (Baan et al., 2003) als auch die spanische Arbeitsgruppe um Lario et al. (Lario et al., 2003) haben die mRNA von HIF-1 α in transplantierten Nieren bestimmt. Da HIF-1 α , die hypoxiesensitive Untereinheit von HIF-1, auf Proteinebene reguliert wird und beispielsweise die Arbeitsgruppe um Abraham et al. in Untersuchungen an lungentranplantierten Patienten keine Änderung in der mRNA-Expression, sehr wohl jedoch in der HIF-1 α -Stabilisierung nachwiesen (Abraham et al., 2004), kamen wir zu der Entscheidung, HIF-1 α in unserem Organtransplantationsmodell im Westernblot nachzuweisen und zu quantifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte (alphabetisch geordnet)

Brutschrank für Zellkultur (Brutschrank Function line Typ BB 16, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)

Elektrophoresekammer (Mighty Small II, Serva Feinbiochemie GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 imaging, Carl Zeiss AG, Hamburg, Deutschland)

Gasmischanlage für Hypoxiekammer (37°C) (Witt-Gasetechnik GmbH & Co KG, Witten, Deutschland)

Gefrierschrank -20°C (Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland)

Gefrierschrank -80°C (HFU 686 Basic, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)

Heizblock (Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland)

Hypoxiekammer (37°C) (Eigenkonstruktion, Glasglocke mit Anschluss an Gasmischanlage im Brutschrank Typ B 5042, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)

Hypoxieglocke (4°C) (Eigenkonstruktion, Glasglocke mit Gasflaschenanschluss im 4°C Lagerraum des Instituts, Gasflasche mit Gasgemisch 1% O₂, 5% CO₂)

Kugelmühle (Kugelmühle Typ MM 300, Retsch GmbH, Haan, Deutschland)

Kühlmaschine für Elektrophorese (Lauda Dr.R.Wobser GmbH Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland)

Magnetrührer (Big Squid Ikamag Froggy, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)

Normoxiekammer (37°C) (Brutschrank Typ B 5042, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)

pH-Meter (pH526 MutiCal, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland)

Photometer (Uniskan II, Titertek, Huntsville, USA)

PowerSupply (RS 500 XT DC, Hoefer Scientific Instruments, CA- San Francisco, USA)

Schüttler (VXR basic IKA-Vibrax, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)

Waage (Feinwaage) (R200D Sartorius AG, Göttingen Deutschland)

Waage (Grobwaage) (Europe 1000, Gibertini Elettronica, Novate Milanese, Italien)

Wasserdestillationsanlage (MilliQ Q Gard 3, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland)

Westernblotkammer (Semi Dry Electrobloetter, Sartorius AG, Göttingen Deutschland)

Zentrifuge (Megafuge 1.0.R, Heraeus Instruments GmbH & Co. KG, Frankfurt a.M., Deutschland)

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinie

Für die folgenden Versuche wurde die Zelllinie HepG2 (DSMZ Nummer: ACC 180) verwendet. Die Zelllinie wird von der Firma ATCC, Rockville, Maryland, USA unter der Nummer HB 8065 geführt. Die Zellen wurden in Medium mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) bei -180°C in flüssigen Stickstoff langzeitgelagert bzw. bei -80°C im Gefrierschrank kurzfristig für bis zu 6 Monate gelagert.

2.2.2 Kulturbedingungen

HepG2-Zellen wurden als Monolayerkultur in 25 cm² bzw. 80 cm² Zellkulturflaschen (Nunclon/Polystyrol, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ Begasung kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM High Glucose mit L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) verwendet. Dem Medium wurden 10% FCS (fetales Kälberserum) (PAA), 1% NEAA (Non Essential Aminoacids, PAA), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA) und 1% Pyruvat (PAA) zugesetzt. Das so zusammengesetzte Zellkulturmedium wird im folgenden als DMEM+Z bezeichnet. Je nach Zellkulturflaschengröße wurden 5 bzw. 10 ml Medium pro Flasche verwendet. Mediumwechsel erfolgte drei Mal pro Woche, d.h. alle zwei oder drei Tage. Die Zellen wurden in den Passagen 50 bis 80 verwendet.

2.2.3 Splitting

Die Kultur wurde mindestens einmal pro Woche gesplittet. Dazu wurde das alte Medium aus den Zellkulturflaschen abpipettiert und den Zellen wurden je nach Kulturflaschengröße 1,5-3 ml Trypsin-EDTA[Ethylendiamintetraessigsäure] (PAA) zugesetzt. Wenn sich nach ca. 3 min die Zellen abgelöst hatten, wurde das dreifache des zugesetzten Trypsin-EDTA-Volumens an Medium hinzugefügt, das Gemisch in ein Greiner-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt und 5 min bei 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und 10 ml Medium zugesetzt. Das Zellpellet wurde

durch das Trituieren mittels einer silikonisierten Pasteurpipette (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) gelöst und die Zellsuspension 5 min bei 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Dann wurde ein weiteres Mal frisches Medium zugesetzt und ca. 1-2 Millionen Zellen auf neue 25 cm² Zellkulturflaschen verteilt.

2.3 Durchführung der Hypoxieversuche

2.3.1 Aussaat der Zellen

24-48 Stunden vor Versuchsbeginn wurden ca. 1-2 Millionen Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

2.3.1.1 Vorbereitung der Zellen

Nach Entfernen des Zellkulturmediums wurden die Zellen zweimal mit 5 ml der entsprechenden Organkonservierungslösung gewaschen. Dann wurden jeweils 5 ml DMEM+Z, Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK, deutscher Handelsname Custodiol, Dr.Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland), University of Wisconsin-Lösung (UW, deutscher Handelsname ViaSpan, Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA, München, Deutschland) bzw. Celsior (Genzyme GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) auf die Zellen gegeben.

Im zweiten Versuchsteil wurde den jeweiligen Lösungen Malat, Fumarat oder Succinat in einer Endkonzentration von 15 mM zugesetzt.

2.3.1.2 Inkubation

Die vorbereiteten Kulturen wurden für 6, 12 oder 24 Stunden in warmer Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 37°C), warmer Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 37°C), kalter Normoxie (Raumluft, 4°C) und kalter Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 4°C) inkubiert.

2.3.2 Herstellung von Zellextrakten für HIF-1 α -Westernblots

Die Zellkulturflaschen wurden nach Beendigung der Normoxie/Hypoxie-Exposition aus dem jeweiligen Versuchsaufbau genommen und das Medium wurde abgeschüttet. Die Zellen wurden zwei Mal mit 10 ml kaltem PBS (4°C) (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) in 5 ml PBS vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in ein Greiner-Röhrchen (Greiner Bio-One) überführt und 5

min bei 2500 Umdrehungen/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert und in ein leeres Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Vor Verwendung wurde das Leergewicht des Eppendorfcups bestimmt. Die Zellsuspension wurde erneut 5 min mit 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert (4°C). Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Eppendorfcup gewogen und das Gewicht des Zellpellets aus der Differenz „leeres Eppendorfcup/volles Eppendorfcup“ bestimmt. Nach Zugabe des fünffachen Gewichts des Zellpellets an Harnstoff-Puffer (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) wurden die Proben für 3 min bei maximaler Frequenz (30 Hz) in der Kugelmühle zerkleinert. Die Zellextrakte wurden bei –20°C eingefroren und gelagert.

2.4 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-Polyacrylgelelektrophorese)

2.4.1 Herstellung der Elektrophorese-Gele

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE erfolgte erst der Zusammenbau der Gelgießkammern gemäß Herstellerangaben, dann wurden Trenn- und darüber Sammelgel gegossen. Die folgenden Mengenangaben ergeben jeweils zwei Trenn- und Sammelgele.

Substanz	Hersteller	Menge
Rotiphorese Gel 30 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid, 37,5 : 1	(Carl Roth GmbH)	3,75 ml
2 M TRIS-Puffer pH 8,8	siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer	2,80 ml
20% SDS	(Carl Roth GmbH)	75 µl
Aqua dest.		8,40 ml
TEMED	(Carl Roth GmbH)	7,5 µl

Tabelle 2.1 Trenngel (7,5%)

Substanz	Hersteller	Menge
Rotiphorese Gel 30 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid,	(Carl Roth GmbH)	0,5 ml
1 M TRIS-Puffer pH 6,8	siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer	0,625 ml
20% SDS	(Carl Roth GmbH)	25 µl
Aqua dest.		3,85 µl
TEMED	(Carl Roth GmbH)	5 µl
10% APS	siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer	40 µl

Tabelle 2.2 Sammelgel

Die einzelnen Komponenten wurden in o.a. Reihenfolge unter ständigem Rühren zusammenpipettiert. Das Gemisch wurde in eine vorbereitete Gießkammer überführt. Danach wurde das Gel mit 0,5% SDS (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) überschichtet. Das Sammelgel wurde nach ca. 30 min, sobald das Trenngel auspolymerisiert war, hinzugefügt.

2.4.2 Vorbereitung der Proben und Beladung der Gele

In einem Eppendorfcup wurden jeweils 4 µl Zellextrakt, 8 µl Probenpuffer und 8 µl Aqua dest gemischt. Das Gemisch wurde 10 min bei 95°C im Heizblock gekocht.

Die fertigen Gele wurden aus den Gießkammern entfernt und in die Elektrophoresekammern eingespannt. Nach Befüllen mit Elektrophoresepuffer (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) wurden die vorbereiteten Proben auf die Gele aufgetragen. Pro Gel standen zehn Taschen zur Verfügung, davon wurde eine Tasche mit 10 µl des Proteinstandards Precision Plus Dual Color Prestained (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit Referenzbanden bei 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kD beladen.

Die Elektrophoresekammer wurde an das Power-Supply angeschlossen und bei 100 V wurden die Proteine im Sammelgel fokussiert. Sobald die Fokussierung abgeschlossen war, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Spannung von 200 V wurde beibehalten, bis die Bromphenolblaubanden sich am unteren Rand des Gels befanden.

2.5 Westernblot

Drei mit Transfer-Puffer (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) getränkte Filterpapiere (Gel Blotting Paper GB002, Schleicher & Schüll BioScience GmbH, Dassel, Deutschland) wurden auf dem Boden der Westernblotkammer gestapelt (entspricht dem negativen Pol) und mit dem Gel belegt. Auf dieses wurde die in Transfer-Puffer getauchte Nitrozellulose-Membran (Pure Nitrocellulose Membrane (0,45 µm), Bio-Rad Laboratories GmbH) gelegt. Den Abschluss bildeten drei weitere mit Transfer-Puffer durchtränkte Filterpapiere. Die Kammer wurde geschlossen und an ein Power-Supply angeschlossen, wobei der Deckel der Westernblotkammer dem positiven Pol entspricht.

Der Transfer fand für 90 min bei einer Stromstärke von 200 mA statt.

Zur Kontrolle des Protein-Transfers wurden die Membranen mit Poinceau S Solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gefärbt. Danach wurde die Membran mit 1 M TRIS, pH 6,8 (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer), wieder entfärbt.

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran bei Raumtemperatur 60 min in 10% Milchpulver-TTBS [TRIS buffered saline + Tween 20] (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) geschwenkt. Danach wurden die Membranen in 5% Milchpulver-TTBS (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) mit dem Primärantikörper anti-human-HIF-1 α (BD Transduction Laboratories; 250 mg/ μ l; Cat. No. 610959) im Verhältnis 1:333 (Antikörper:TTBS-Lösung) versehen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Konservierung der Milchpulverlösung wird eine kleine Spatelspitze Natriumazid (Serva Feinbiochemie GmbH, Heidelberg, Deutschland) dazugegeben.

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 20 min mit TTBS (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper Peroxidase-konjugiertem-Anti-Maus IgG (H+L) aus der Ziege (Lot. 98121832, Pierce, Rockford, USA) in 2,5% Milchpulver-TTBS (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) für 60 min inkubiert (1:10000). Anschließend wurden durch dreimaliges Waschen (je 20 min) mit TTBS ungebundene Sekundärantikörper entfernt.

Jeweils 2,5 ml von Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution und Super Signal West Pico Luminol/Enhancer (beide Bestandteil des Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit, Pierce) wurden gemischt, auf die Membran aufgetragen und 5 min lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden Röntgenfilme (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences UK Ltd., Buckinghamshire, UK) jeweils für 1 min, 5 min und 60 min belichtet. Diese wurden nach dem Entwickeln (Developer G138i, Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG, Köln, Deutschland), Fixieren (Rapid fixer G334i, Agfa) und Wässern getrocknet, eingescannt und abgespeichert.

2.6 Immunhistochemische Färbung von HepG2-Zellen mit anti-HIF-1 α

Einen Tag vor Versuchbeginn wurden ca. 30.000 Zellen pro Well auf zwei Cultureslides (Nunc GmbH) ausgesät und insgesamt mit 500 μ l DMEM+Z pro Well überdeckt. Am folgenden Tag wurden die Zellen nach Entfernen des Zellkulturmediums zweimal mit der entsprechenden Organkonservierungslösung gewaschen. Dann wurden pro Well jeweils 500 μ l DMEM+Z, HTK (Dr.Franz Köhler Chemie), UW (Bristol-Myers Squibb) bzw. Celsior (Genzyme) auf die Zellen gegeben.

Nach Inkubation über 6 Stunden jeweils bei 37°C Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) und Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) wurden die Zellen kurz mit PBS (PAA) gewaschen und

dann mit 4% Paraformaldehyd (Merck) fixiert. Als nächstes wurden die HepG2-Zellen nochmals für 10 min mit PBS (PAA) gewaschen, anschließend für 10 min mit 0,1 % Triton X 100 (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) permeabilisiert und danach nochmals für 10 min mit PBS gewaschen.

Nach Zugabe des Primärantikörpers anti-human-HIF-1 α (BD Transduction) im Verhältnis 1:250 (Antikörper:PBS-Lösung) wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS (PAA) für jeweils 10 min ungebundene Primärantikörper entfernt. Danach wurden die Zellen für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Cy3-konjugiertes-anti-Maus IgG vom Esel (Lot 64515, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) im Verhältnis von 1:2000 (Antikörper:PBS-Lösung) inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurden danach zunächst überschüssige Sekundärantikörper entfernt, bevor die Zellen mit Carbonat-gepufferten Glycerol (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) eingedeckelt (Deckgläschen: R.Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Teningen, Deutschland) wurden. Als letztes wurden die so präparierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem Erregerfilter in der Bandbreite von 545-580 nm, einem Langpass-Sperrfilter von 610 nm und mit der am Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera fotografiert.

2.7 MTT-Test

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden ca. 30 000 HepG2-Zellen pro Well (bzw. 3 Tage vor Versuchsbeginn 15 000 HepG2-Zellen in der zweiten Versuchsreihe) auf einer 96-Well-Platte (Nunc) ausgesät und in DMEM+Z inkubiert. Am Versuchstag wurden die Zellen nach Entfernen des Zellkulturmediums einmal mit der entsprechenden Organkonservierungslösung gewaschen.

Für die erste Versuchsreihe wurden dann pro Well jeweils 150 μ l DMEM+Z, HTK (Dr.Franz Köhler Chemie), UW (Bristol-Myers Squibb) bzw. Celsior (Genzyme) auf die Zellen in jeweils fünf Wells pipettiert. In fünf separaten Wells wurde jeweils 150 μ l DMEM+Z mit dem Zusatz von 100 μ M H₂O₂ (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) auf die Zellen gegeben. Das H₂O₂ tötet dabei die HepG2-Zellen ab, so dass die Ansätze mit H₂O₂ als Positivkontrolle für den Nachweis für das Absterben von Zellen dienten. Die vorbereiteten 96-Well-Platten wurden im ersten Versuchsteil für 6 Stunden in warmer Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 37°C), warmer Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 37°C), kalter Normoxie (Raumluft, 4°C) und kalter Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 4°C) inkubiert. Nach Versuchsende wurden die Platten

noch jeweils für eine Stunde bei 37°C Normoxie inkubiert. Die Überstände wurden danach verworfen, pro Well 100 µl DMEM+Z 0,5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zugegeben und für weitere 90 min bei 37°C Normoxie inkubiert.

In der zweiten Versuchsreihe wurden dann pro Well jeweils 150 µl DMEM+Z und DMEM+Z mit dem Zusatz von 100 µM H₂O₂ (siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer) auf die Zellen gegeben. Zusätzlich wurde auf die Zellen in jeweils sechs Wells HTK (Dr.Franz Köhler Chemie), UW (Bristol-Myers Squibb) bzw. Celsior (Genzyme) pur sowie mit dem Zusatz von 15 mM Malat, Fumarat und Succinat pipetiert. Die so vorbereiteten 96-Well Platten wurden nun für 24 Stunden in warmer Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 37°C), warmer Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 37°C), kalter Normoxie (Raumluft, 4°C) und kalter Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 4°C) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 3,5 Stunden unter warmer Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 37°C). Danach wurden die Überstände verworfen und zu den Zellen pro Well 100 µl DMEM+Z 0,5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zugegeben und für weitere 2 Stunden inkubiert.

Nach dem Entfernen der Überstände wurden die adhärenenten Zellen in beiden Versuchsreihen mit je 75 µl 0,1 N HCl (Merck KGaA, D-64293 Darmstadt) in Isopropanol (Merck) („saures Isopropanol“) gelöst. Das Photometer wurde mit Isopropanol (Merck) kalibriert und die optische Dichte der lysierten Zellen bei 570 nm bestimmt. Um Einfluss durch Zelltrümmer auszuschließen, wurde zusätzlich bei 630 nm gemessen und die optische Dichte, die bei 630 nm bestimmt wurde, von der optischen Dichte, die bei 570 nm bestimmt wurde, abgezogen.

Das Zellüberleben wurde nach der Formel [(Absorption behandelte Zellen/Absorption unbehandelte Zellen) x 100] bestimmt.

2.8 Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung der Banden in den Westernblots erfolgte am Computer mit dem Programm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Das Ausmaß der HIF-1α-Stabilisierung wurde in HepG2-Zellen bestimmt, die bei 37°C bzw. 4°C für 6, 12 oder 24 Stunden unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Als Referenzwert diente eine Probe von HepG2-Zellen, die entsprechend für 6, 12 oder 24 Stunden bei 37°C in DMEM+Z unter Hypoxie inkubiert wurde. Diese eine Referenzprobe wurde bei jedem Westernblot mit aufgetragen, analysiert und ihr Grauwert in der Auswertung auf 100% gesetzt.

In den Versuchen mit den Zitratzyklusmetaboliten Fumarat, Malat und Succinat, diente immer die im gleichen Versuch gewonnene DMEM+Z-Probe als Referenzprobe.

Im Folgenden beziehen sich die ermittelten Grauwerte daher auf einen Referenzwert und sind in Prozent angegeben. In einzelnen Abbildungen sind ausnahmsweise die Absolutwerte dargestellt, dies ist jeweils gekennzeichnet.

Für die Auswertung der zweiten Versuchreihe (Organkonservierungslösungen mit Zusätzen) des MTT-Tests wurden zum Ausschluss von versuchsabhängigen Einzelfaktoren die Werte der Differenz der optischen Dichte für die einzelnen Organkonservierungslösungen ohne Zusatz auf 100 Prozent gesetzt. Bei den ermittelten Werten für die Lösungen mit Zusätzen ergeben sich daher auch Prozentualwerte.

2.9 Statistische Auswertung und Boxplots

Die statistische Auswertung und Darstellung mit Boxplots der densitometrischen Werte der Westernblots und des MTT-Testes erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows. In den mit SPSS erstellten Boxplots sind immer die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentile 25 und 75 der Daten angegeben. Nach der explorativen Datenanalyse und der Erstellung der Boxplots wurden die vorhandenen Datensätze zunächst im Test für k-unabhängige Stichproben (Kruskal-Wallis-Test) statistisch ausgewertet. Wenn sich dort $p \leq 0,05$ zeigte, dann wurden die jeweiligen Datengruppen noch mit dem Mann-Whitney-Test auf statistisch signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede getestet.

2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer (alphabetisch geordnet)

(10%) APS

0,5 mg APS (Ammoniumpersulfat, (Carl Roth GmbH)) wurden in 5 ml Aqua dest gelöst und in Portionen von 200 µl bei -20°C aufbewahrt. APS wurde für jede Gelherstellung frisch aufgetaut, Reste wurden verworfen.

Carbonat-gepuffertes Glycerol, pH 8,6

Es wurden 500 ml einer 1,5 M NaHCO_3 -Lösung vorgelegt (63 g NaHCO_3 auf 500 ml Aqua dest.). Mit einer 1,5 M Na_2CO_3 -Lösung (15,9 g auf 100 ml Aqua dest.) wurde daraufhin der pH-Wert 8,6 eingestellt. Als nächstes wurde die entstandene Lösung im Verhältnis 1:1 mit wasserfreiem Glycerol (Carl Roth GmbH) gemischt.

Complete-Mini Protease Inhibitor Cocktail

Eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde in 500 µl Aqua dest gelöst. Der Protease-Inhibitor-Cocktail wurde bei – 20°C gelagert.

DTT (1 M)

154,2 mg DTT (Dithiothreitol, Sigma-Aldrich Chemie) wurden mit 1 ml Aqua dest gelöst und bei -20°C gelagert.

Elektrophorese-Puffer (10x)

30 g TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth GmbH) wurden mit 144 g Glycerol (Merck) versetzt und auf 1 l mit Aqua dest aufgefüllt.

H₂O₂ (100 µM)

H₂O₂ 30%ig (Carl Roth GmbH) wurde mit DMEM+Z im Verhältnis 1:100 gemischt (H₂O₂:DMEM). Zu den Versuchsansätzen wurden dann 0,153 µl dieses Gemisches zugegeben, wobei 0,153 µl pro 100 µl DMEM+Z im Well einer Konzentration von 100 µM entsprechen.

Harnstoffpuffer zur Herstellung von Zellextrakten

Substanz	Hersteller	Menge
8 M Harnstoff	(Merck)	1000 µl
1/10 Volumen Glycerol	(Merck)	100 µl
1/20 Volumen 20% SDS	(Carl Roth GmbH)	50 µl
1/200 Volumen 1 M DTT	(siehe 2.10 Rezepturen eingesetzter Lösungen und Puffer)	5 µl
1/100 Volumen 1 M TRIS pH 6,8	(Carl Roth GmbH)	10 µl
Complete Mini-Lösung	(siehe 2.6 Rezepturen eingesetzter Lsg und Puffer)	58 µl

Tabelle 2.3 Herstellung eines Harnstoffpuffers, in Anlehnung an Wiesener et al., 1998 modifiziert durch Christiane Hoger und Nele Howold

Harnstoff-Lösung (8 M)

24,02 mg Harnstoff (Merck) wurden mit Aqua dest auf 50 ml aufgefüllt.

TTBS-Milchpulver 2,5%, 5% und 10%

2,5 g, 5 g oder 10 g Milchpulver (Carl Roth GmbH) wurden mit TTBS auf 100 ml aufgefüllt.

Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS- Puffer) (1x), pH 7,4

100 ml 10x PBS (Dulbecco's PBS 10x, PAA) wurden mit Aqua dest auf 1 l aufgefüllt.

Probenpuffer (5x) für Gelelektrophorese

Substanz	Hersteller	Menge
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	(Carl Roth GmbH)	1,96 g
SDS	(Carl Roth GmbH)	2,5 g
Bromphenolblau	(Sigma-Aldrich Chemie)	12,5 mg
mit Aqua dest auf 20 ml auffüllen		
pH 6,8 einstellen mit HCl (25%)	(Merck)	

Tabelle 2.4 Probenpuffer (5x) für Gelelektrophorese

Der Probenpuffer wurde portioniert, bei -20°C gelagert und direkt vor Gebrauch frisch aufgetaut. Dem 5x Probenpuffer wurden vor Verwendung 20% des Puffervolumens an SDS 20%ig (Endkonzentration SDS: 0,3%) und einige Krümel DTT (Dithiothreitol, Sigma-Aldrich Chemie) zugegeben.

SDS-Lösung (5% und 20%)

5 g bzw. 20 g SDS (Carl Roth GmbH) wurden mit Aqua dest auf 100 ml aufgefüllt.

TBS (10x), pH 8,0

12,11 g TRIS (Carl Roth GmbH) wurde mit 87,66 g NaCl (Carl Roth GmbH) und 800 ml Aqua dest vermischt. Der pH-Wert wurde mit HCl (Merck) auf pH 8,0 eingestellt. Dann wurde mit Aqua dest auf 1 l aufgefüllt.

TTBS

100 ml TBS (10x) wurden mit 0,5 ml Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, Sigma-Aldrich Chemie) versetzt und auf 1 l mit Aqua dest aufgefüllt.

Transfer-Puffer für Westernblot

2,5 ml NuPAGE Transfer Buffer (20x) (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden mit Aqua dest auf 50 ml aufgefüllt.

Triton X 100 0,1 % in PBS

1 ml Triton X 100 (Carl Roth GmbH) werden mit PBS (PAA) auf 1000 ml aufgefüllt.

TRIS-Puffer (1 M), pH 6,8

12,1 g TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth GmbH) wurden in 50 ml Aqua dest gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl (Merck) auf pH 6,8 eingestellt. Dann wurde mit Aqua dest auf 100 ml aufgefüllt.

TRIS-Puffer (2 M), pH 8,8

2,1 g TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth GmbH) wurden in 50 ml Aqua dest gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl (Merck) auf pH 8,8 eingestellt. Dann wurde mit Aqua dest auf 100 ml aufgefüllt.

3. Ergebnisse

3.1 Generelles

3.1.1 Spezifität des verwendeten Antikörpers

Um die Spezifität des verwendeten Antikörpers zu überprüfen und um einen Einblick in die subzelluläre Verteilung von HIF-1 α unter Normoxie und Hypoxie zu bekommen, wurden neben HIF-1 α Westernblots auch immunhistochemische Markierungen von HepG2-Zellen mit anti-HIF-1 α durchgeführt.

Die HepG2-Zellen wurden für jeweils für 6 Stunden unter 37°C Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 74% Stickstoff) und Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% Stickstoff) in DMEM+Z und in den Organkonservierungslösungen Celsior, HTK und UW inkubiert. Dabei zeigt sich, dass die Intensität der Markierung in allen Ansätzen, welche unter 37°C Hypoxie inkubiert wurden, höher ist, als in den Ansätzen, die unter 37°C Normoxie inkubiert wurden. HIF-1 α lässt sich unter normoxischen Bedingungen vor allem im Zytoplasma nachweisen, während es unter hypoxischen Bedingungen im Kern nachzuweisen ist (Abb. 1a-h).

In den von uns durchgeführten Westernblots zeigte sich HIF-1 α als deutlich zu erkennenden Bande bei 120 kD. Zusätzlich zeigten sich unregelmäßig zwei unspezifische Banden bei 50 kD und ca. 35 kD. In unseren Westernblots liefert die Bande des DMEM+Z-Versuchsansatzes im Vergleich zu den anderen Versuchsansätzen das stärkste Signal (Abb. 2).

3.1.2 Zellproliferation während der Versuchsdurchführung

Vor allem unter Normoxie, aber auch in geringerem Maße in Hypoxie kam es in den Versuchsansätzen mit DMEM+Z bei 37°C während der Versuchsdurchführung zu einer weiteren Zellproliferation. Während die Zelldichte in den Ansätzen mit den Organkonservierungslösungen mikroskopisch betrachtet nicht sichtbar zunahm, wuchsen die Zellen in den DMEM+Z-Ansätzen vor allem bei längeren Inkubationszeiten zu vollständiger Konfluenz und gelegentlich sogar mehrlagig. Dabei zeigten die Zellen lichtmikroskopisch eine normale Morphologie.

Betrachtet man das Pelletgewicht der einzelnen Versuchsansätze (DMEM+Z, Celsior, HTK und UW), so zeigt sich, dass nach 24-stündiger Inkubation unter 37°C Normoxie das

Pelletgewicht der Ansätze mit DMEM+Z deutlich höher war. Es besteht zwar nur zwischen den Ansätzen mit DMEM+Z und den Ansätzen mit UW ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,032$), im Vergleich mit HTK zeigt sich jedoch ein Trend zu einem höheren Pelletgewicht in den Ansätzen mit DMEM+Z ($p = 0,056$) (Abb. 3)

In den Ansätzen mit DMEM+Z findet sich bei $n=5$ ein Ausreißer. Wenn man diesen Wert nicht berücksichtigt, ist das Pelletgewicht der Ansätzen mit DMEM+Z im Vergleich zu allen Organkonservierungslösungen signifikant höher.

3.2 HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z, Celsior, HTK und UW

Zum Nachweis, dass wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proteinextrakte keinen Einfluss auf die Menge des HIF-1 α hatte, welches im Westernblot nachgewiesen werden konnte, wurde eine DMEM+Z-Probe, welche am 16.1.2006 nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C Hypoxie gewonnen wurde, insgesamt 17mal über einen Zeitraum von mehreren Wochen im Westernblot analysiert. Die ermittelten Grauwerte bewegen sich bei einem Maximum von 231 und einem Minimum von 171 um einen Median von 211 (Mittelwert von 207 mit einer Standardabweichung von 13,17) (Abb. 4). Die gewonnenen Werte bewegen sich im gesamten Zeitraum sehr stabil um den Median von 211, was bedeutet, dass die Stabilität der gewonnenen Proben über einen Zeitraum von mindestens 8 Wochen gewährleistet ist.

3.2.1 HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen, die bei 37°C unter normoxischen Bedingungen in DMEM+Z kultiviert wurden

Betrachtet man die HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen unter 37°C Normoxie im Westernblot, so zeigt sich, dass die Menge der HIF-1 α -Stabilisierung nach 6 Stunden im Median 71 % der Referenzprobe (gleich lange Inkubation unter Hypoxie) beträgt. Nach 12 Stunden beträgt sie 91 % und nach 24 Stunden Inkubation erhöht sie sich auf 109 %. Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Inkubationszeiten, es zeigt sich jedoch ein Trend, dass die HIF-1 α -Menge zeitabhängig zunimmt (Abb. 5). Vor allem die 6 Stunden-Werte zeigen insgesamt eine große Streubreite.

3.2.2 Einfluss der Organkonservierungslösungen auf das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen bei Inkubation der Zellen unter 37°C Normoxie

Im Vergleich zu DMEM+Z findet die Stabilisierung von HIF-1 α in den drei getesteten Organkonservierungslösungen Celsior, HTK und UW auf einem niedrigeren Niveau statt. Während das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung in den Versuchsansätzen mit DMEM+Z nach 6 Stunden Inkubation unter 37°C Normoxie 71 % (Median), nach 12 Stunden 91 % (Median) und nach 24 Stunden 108 % (Median) beträgt (vgl. 3.2.1), so beträgt sie in allen drei Organkonservierungslösungen bei allen Inkubationszeiten im Median 0 %.

Nach 6, 12, sowie auch nach 24 Stunden Inkubation findet sich in HepG2-Zellen, die in DMEM+Z inkubiert wurden, eine hoch signifikant größere Menge an HIF-1 α im Vergleich zu den Zellen, die in den Organkonservierungslösungen inkubiert wurden. Zwischen den einzelnen Organkonservierungslösungen gibt es zu keiner der Inkubationszeiten (6, 12, 24 Stunden) signifikante Unterschiede (Abb. 6a, b, c).

3.2.3 Vergleich der verwendeten Lösungen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior unter Normoxie bei 4°C

Eine HIF-1 α -Stabilisierung konnte in HepG2-Zellen, die bei 4°C unter Normoxie in DMEM+Z kultiviert wurden, nicht nachgewiesen werden. Da die Begasung bei 4°C durch Raumluft erfolgte, DMEM+Z jedoch die Zufuhr von 5% CO₂ zur Aufrechterhaltung seines pH-Wertes benötigt, kam es zu deutlichen pH-Wert-Änderungen des Mediums und damit zum Absterben der Zellen.

In den Versuchsansätzen mit den drei Organkonservierungslösungen konnte HIF-1 α bei 4°C unter Normoxie kaum nachgewiesen werden. Es gibt sowohl zwischen den verschiedenen Lösungen bei allen Inkubationszeiten als auch innerhalb der einzelnen Lösungen zwischen 6, 12 und 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede (Abb. 7a, b, c)

3.2.4 Vergleich der HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z, HTK, UW und Celsior unter Hypoxie bei 37°C

Das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung ist nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C Hypoxie in DMEM+Z signifikant höher als bei 37°C Normoxie. Unter 37°C Normoxie liegt die HIF-1 α -Stabilisierung bei 71 % (Median) und somit ca. 1/3 niedriger als unter 37°C Hypoxie (107 %, Median). Nach jeweils 12 und 24 Stunden gibt es keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Normoxie und Hypoxie (bei 37°C). Während die HIF-1 α -Stabilisierung nach 6 Stunden Inkubation unter 37°C Normoxie im Vergleich zu der Referenzprobe 71 % im

Median beträgt, so nimmt sie nach 12 Stunden Inkubation auf 91 % und nach 24 Stunden Inkubation auf 108 % zu. Unter 37°C Hypoxie bleibt die HIF-1 α -Stabilisierung dagegen mit 101 % nach 12 Stunden und 110 % nach 24 Stunden ungefähr auf dem gleichen Niveau der Stabilisierung nach 6 Stunden Inkubation (siehe Abbildung 8a). Vergleicht man die unter 37°C Hypoxie erhobenen Werte der einzelnen Inkubationszeiten untereinander, so finden sich erwartungsgemäß keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 10a).

In Celsior besteht in 37°C Hypoxie im Vergleich zu 37°C Normoxie nach 6 und 24 Stunden Inkubation eine signifikant und nach 12 Stunden Inkubation eine hoch signifikant höhere Stabilisierung von HIF-1 α (Abb. 8b). Die Menge von HIF-1 α liegt in Celsior unter 37°C Normoxie bei allen drei Inkubationszeiten im Median bei 0 %. Nach 6 Stunden erhöht sie sich auf 77 % (Median), nach 12 Stunden auf 57 % (Median) und nach 24 Stunden auf 50 % (Median). Vergleicht man die unter 37°C Hypoxie gewonnenen Werte miteinander, so zeigt sich, dass sich in der HIF-1 α -Stabilisierung zwischen den drei Inkubationszeiten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen lassen, obwohl ein Trend zur zeitabhängigen Abnahme besteht (Abb. 10b).

Bei einer Inkubation in HTK lassen sich nach 6 Stunden und nach 12 Stunden Inkubation hochsignifikante Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie (37°C) nachweisen. Wie in Celsior liegt die HIF-1 α -Stabilisierung in HTK unter 37°C Normoxie im Median bei 0 %. Nach 6 Stunden Inkubation nimmt sie unter 37°C Hypoxie auf 51 % (Median) und nach 12 Stunden Inkubation auf 53 % (Median) zu. Nach einer hypoxischen Inkubationszeit von 24 Stunden nimmt die HIF-1 α -Stabilisierung wieder ab und beträgt nur noch 12 % (Median), womit es nach 24 Stunden Inkubation keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen 37°C Normoxie und 37°C Hypoxie gibt (Abb. 8c). Vergleicht man das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung nach 6 und 12 Stunden Inkubation unter 37°C Hypoxie, so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Dagegen liegt die HIF-1 α -Stabilisierung mit 12 % (Median) nach 24 Stunden mit einem Viertel des 12 Stunden-Wertes signifikant niedriger als nach 12 Stunden Inkubation. Obwohl die HIF-1 α -Menge nach 6 Stunden im Median bei 51 % und nach 24 Stunden bei 12 % liegt, so gibt es zwischen den beiden Inkubationszeiten keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 10c).

Bei den Versuchen, die mit UW durchgeführt wurden, liegt die HIF-1 α -Stabilisierung wie bei Celsior und HTK unter 37°C Normoxie nach allen Inkubationszeiten im Median bei 0%. Vergleicht man die Ansätze bei Normoxie 37°C und Hypoxie 37°C miteinander, so steigt das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung nach 6 Stunden auf 59 % (Median), nach 12 Stunden auf 40 % (Median) und nach 24 Stunden auf 52 % (Median). Bei allen drei Inkubationszeiten

wird in UW unter 37°C Hypoxie somit signifikant mehr HIF-1 α stabilisiert als unter 37°C Normoxie (Abb. 8d). Vergleicht man die unter 37°C Hypoxie ermittelten Werte untereinander, so zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 10d).

Nach einer 6-stündigen hypoxischen Begasung bei 37°C (Abb. 9a) findet man in den Zellen, welche in den Organkonservierungslösungen (HTK, UW, Celsior) inkubiert wurden, eine deutlich niedrigere HIF-1 α -Menge als in der DMEM+Z-Vergleichsprobe. Das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung beträgt im Median in DMEM+Z 108 % und liegt damit mehr als doppelt so hoch wie in HTK (Median 51 %). In UW wird im Median 59 % HIF-1 α stabilisiert. In Celsior beträgt die HIF-1 α -Stabilisierung mit im Median 77 % ungefähr 2/3 der Menge der HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z. Vergleicht man die einzelnen Lösungen untereinander, so finden sich zwischen den Lösungen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Auch nach 12 Stunden Hypoxie (Abb. 9b) liegt weiterhin eine hoch signifikant geringere HIF-1 α -Stabilisierung in den Organkonservierungslösungen vor, verglichen mit DMEM+Z. Während die HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z im Median 101 % beträgt, so liegt sie in HTK auch nach 12 Stunden Inkubation mit 53 % (Median) ungefähr bei der Hälfte. In UW ist das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung mit 40 % (Median) nochmals niedriger. Im Vergleich lassen sich zwischen HTK, UW und Celsior keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Auch in den Ansätzen mit Celsior wird signifikant weniger HIF-1 α stabilisiert als in den Ansätzen mit DMEM+Z, aber auch bei einer Inkubationszeit von 12 Stunden zeigt sich der Trend, dass in Celsior mit 77 % (Median) im Vergleich zu den beiden anderen Organkonservierungslösungen mehr HIF-1 α stabilisiert wird.

Während auch nach 24 Stunden Hypoxie (Abb. 9c) weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen HTK/UW und UW/Celsior besteht, lässt sich dagegen ein signifikanter Unterschied zwischen HTK und Celsior nachweisen. Während die Menge an HIF-1 α in den Ansätzen mit UW nach 24 Stunden Inkubation im Median nur noch bei 12 % liegt, so findet sich bei den Ansätzen mit Celsior eine HIF-1 α -Stabilisierung von 50 % (Median). Obwohl in den Ansätzen mit UW im Median 52 % HIF-1 α stabilisiert wird, besteht kein signifikanter Unterschied zu der Stabilisierung in HTK. Dies lässt sich mit der großen Streubreite der UW-Werte erklären. Im Vergleich zu DMEM+Z wird in den Zellen in Organkonservierungslösung weiterhin hoch signifikant weniger HIF-1 α stabilisiert. Im Median werden in den Versuchsansätzen mit DMEM+Z 110 % HIF-1 α stabilisiert. Während in UW und Celsior im Median ungefähr die Hälfte der Menge der Ansätze in DMEM+Z stabilisiert wird (UW 52 %, Celsior 50 %).

Celsior 50 %), so liegt das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung in HTK mit einem Median von 12 % auf einem sehr niedrigen Niveau.

3.2.5 Vergleich der unterschiedlichen Lösungen unter Hypoxie 4°C

Sowohl in Celsior als auch in HTK und UW bestehen bei allen drei Inkubationszeiten in 4°C keine signifikanten Unterschiede in der HIF-1 α -Stabilisierung zwischen Normoxie und Hypoxie (Abb. 8 a-c).

Bei Hypoxie in 4°C wird sowohl nach 6 Stunden als auch nach 12 Stunden bzw. 24 Stunden Inkubation im Median kein (0 %) HIF-1 α stabilisiert, dabei gibt es weder zwischen den einzelnen Organkonservierungslösungen, noch im Vergleich zu DMEM+Z signifikante Unterschiede (Abb. 11 a-c).

3.2.6 Einfluss von Insulin und Dexamethason in UW auf die HIF-1 α -Stabilisierung

Die UW-Lösung wurde für die Versuche ohne den Zusatz von Penicillin G (200.000 IE/l), Normal-Insulin (40 IE/l) und Dexamethason (16 mg/l) verwendet. Um zu überprüfen, ob der Verzicht auf die Zusätze einen Einfluss auf die HIF-1 α -Stabilisierung hat, wurde eine begrenzte Anzahl von Versuchen zusätzlich mit einer UW-Lösung inklusive der Zusätze (UWplus) durchgeführt.

Sowohl nach einer Inkubation von 6 Stunden als auch von 24 Stunden bei 37°C Hypoxie lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der HIF-1 α -Stabilisierung zwischen UW und UWplus nachweisen (Abb. 12a und b).

3.3 Einfluss der Zitratzyklusmetabolite Fumarat, Malat und Succinat auf das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen bei Inkubation in DMEM+Z, Celsior, HTK und UW

Da sich in den Vorversuchen zeigte, dass die HIF-1 α -Stabilisierung bei 4°C sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie je nach Inkubationszeit nur auf sehr niedrigem Niveau bzw. gar nicht stattfindet, wurden die folgenden Versuche nur bei 37°C durchgeführt. Im Vergleich zu DMEM+Z fand die Stabilisierung von HIF-1 α in den drei getesteten Organkonservierungslösungen Celsior, HTK und UW in Normoxie nur auf einem deutlich niedrigeren Niveau statt. Daher wurden letztendlich nur die bei 37°C Hypoxie gewonnenen Proben im Westernblot ausgewertet. In den Abbildungen 13 a und b ist jeweils ein

Westernblot dargestellt, in dem es auch nach Zugabe der Zitratzyklusmetabolite zu keiner HIF-1 α -Stabilisierung in 37°C Normoxie kam.

Als Inkubationszeiten wurden 6 Stunden und 24 Stunden ausgewählt, um einen eventuell vorhandenen zeitabhängigen Unterschied deutlich darzustellen.

Als Referenzprobe wurde jeweils eine im gleichen Versuch ermittelte Probe (DMEM+Z, Hypoxie 37°C) verwendet. Diese wurde dann im Westernblot mit den anderen Proben eines Versuchs aufgetragen und ihr Grauwert auf 100 % gesetzt.

3.3.1 HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen mit Celsior nach Zugabe von 15 mM Fumarat, Malat oder Succinat

Weder nach einer Inkubation über 6 Stunden bei 37°C Hypoxie, noch nach einer Inkubation über 24 Stunden bei 37°C Hypoxie zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der HIF-1 α -Stabilisierung in Celsior ohne Zusatz im Vergleich mit den Versuchsansätzen mit Celsior und dem Zusatz von 15 mM Fumarat, Malat und Succinat (Abb. 14 a und b). Nach einer Inkubation über 24 Stunden liegt die HIF-1 α -Stabilisierung in den Versuchsansätzen mit Celsior plus dem Zusatz von 15 mM Succinat im Median bei 11 % und damit niedriger als in Celsior ohne Zusätze (Median 33 %). Aufgrund der großen Streubreite der Werte besteht dennoch kein signifikanter Unterschied.

3.3.2 HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen mit HTK nach Zugabe von 15 mM Fumarat, Malat oder Succinat

Auch bei den Versuchen mit der Lösung HTK ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Ansätzen mit Celsior.

Weder nach einer Inkubation über 6 Stunden bei 37°C Hypoxie, noch nach einer Inkubation über 24 Stunden bei 37°C Hypoxie gibt es einen signifikanten Unterschied in der HIF-1 α -Stabilisierung in HTK ohne Zusatz im Vergleich mit den Versuchsansätzen mit HTK und dem Zusatz von 15 mM Fumarat, Malat und Succinat (Abb. 15 a und b).

3.3.3 HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen mit UW nach Zugabe von 15 mM Fumarat, Malat oder Succinat

Bei den Versuchen mit UW zeigt sich, dass es auch hier zwischen der Lösung ohne Zusatz und der Lösung mit den einzelnen Zusätzen keinen signifikanten Unterschied gibt. Dies gilt sowohl für eine Inkubationszeit von 6 Stunden als auch für 24 Stunden. Bei der 6-stündigen Inkubation gibt es daher auch zwischen UW und UW mit 15 mM Succinat keinen

signifikanten Unterschied, es liegt allerdings ein Trend ($p = 0,078$) zu einer eher niedrigeren HIF-1 α -Stabilisierung bei Zusatz von Succinat vor (Abb. 12 a und b).

3.4 MTT-Test

3.4.1 Nachweis der Vitalität von HepG2-Zellen in DMEM+Z, Celsior, HTK und UW unter verschiedenen Bedingungen durch den MTT-Test

Um Aussagen über die Vitalität der HepG2-Zellen unter den verschiedenen Bedingungen machen zu können, wurde ein MTT-Test nach einer Inkubation von 6 Stunden bei 37°C Normoxie und Hypoxie bzw. 4°C Normoxie und Hypoxie durchgeführt. Als Kontrollprobe wurden HepG2-Zellen verwendet, die mit 100 μ M H₂O₂ in DMEM+Z geschädigt wurden. Im Vergleich zu allen verwendeten Lösungen - DMEM+Z, HTK, UW und Celsior - wurde in den Ansätzen mit DMEM+Z/H₂O₂ bei allen Bedingungen signifikant weniger MTT umgesetzt.

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede im MTT-Umsatz zwischen den bei 37°C Normoxie und 37°C Hypoxie inkubierten Zellen (Abb. 16 a).

In den Versuchsansätzen mit DMEM+Z wird unter 37°C Normoxie signifikant mehr MTT umgesetzt als in den Ansätzen mit HTK und UW ($p=0,008$ für HTK, $p=0,016$ für UW). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit DMEM+Z und Celsior ($p=0,310$) (Abb. 16 b). Zwischen den Organkonservierungslösungen untereinander gibt es keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zu den Kontrollproben (DMEM+Z/H₂O₂) wird in allen Lösungen hoch signifikant mehr MTT umgesetzt.

In den bei 37°C Hypoxie durchgeführten MTT-Tests finden sich weder zwischen DMEM+Z und den Organkonservierungslösungen, noch zwischen den Organkonservierungslösungen untereinander signifikante Unterschiede (Abb. 16 c).

Bei den Versuchsansätzen bei 4°C (Normoxie und Hypoxie) finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Lösungen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior (siehe Abb.17).

Betrachtet man den MTT-Umsatz in HepG2-Zellen nach einer Inkubation unter den unterschiedlichen Bedingungen über 24 Stunden, so zeigen sich sehr ähnliche Ergebnisse.

Unter 37°C Normoxie wird in DMEM+Z liegt die Differenz der optischen Dichte im Median bei 0,44. Im Vergleich dazu liegt die optische Dichte und damit der MTT-Umsatz in Celsior (Median 0,24, $p=0,041$), HTK (Median 0,21, $p=0,015$) und UW (Median 0,09, $p=0,009$) signifikant niedriger.

In den nach 37°C Hypoxie durchgeführten MTT-Tests finden sich auch nach einer Inkubation von 24 Stunden weder zwischen DMEM+Z (Median 0,38) und den Organkonservierungslösungen (Celsior Median 0,121, HTK Median 0,127, UW Median 0,134), noch zwischen den Organkonservierungslösungen untereinander signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test $p=0,994$).

Bei den Versuchansätzen bei 4°C (Normoxie und Hypoxie) finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Lösungen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior (Kruskal-Wallis-Test, Normoxie $p=0,062$, Hypoxie $p=0,069$) (Signifikanzniveaus sind nicht grafisch dargestellt).

3.4.2 MTT-Test von HepG2-Zellen in Celsior, HTK und UW mit dem Zusatz von Malat, Fumarat und Succinat unter verschiedenen Bedingungen

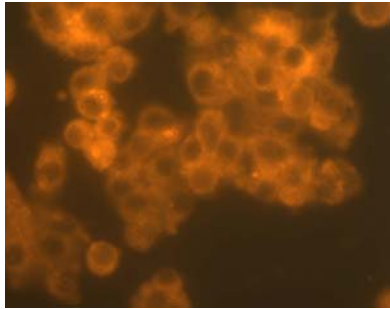
Wie in den Versuchen ohne Zusätze (Abb.16a) bereits gezeigt, gibt es unter 37°C Normoxie nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Organkonservierungslösungen. Der Zusatz der Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und Succinat führt unter 37°C Normoxie nach 24 Stunden Inkubation zu keiner signifikanten Veränderung des MTT-Umsatzes (Abb. 18 a). Unter 37°C Hypoxie ergibt sich ein ähnliches Bild. Auch hier hat die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite keinen signifikanten Einfluss auf den MTT-Umsatz in den HepG2-Zellen (Abb. 18 b).

Bei einer Inkubation über 24 Stunden unter 4°C Normoxie führt die Zugabe von Succinat in allen drei Organkonservierungslösungen zu einer signifikanten Erhöhung der Vitalität ($p=0,002$ in allen drei Fällen) (Abb.18c). Der Zusatz von Succinat führt im Median in Celsior zu einem 53 %, in HTK zu 21 % und in UW zu einem 29 % höheren Umsatz von MTT. In den Versuchansätzen mit Celsior erhöht zudem der Zusatz von Fumarat den Umsatz von MTT signifikant ($p = 0,002$).

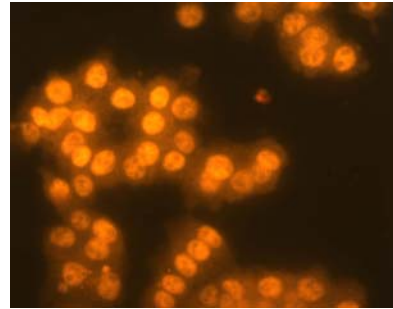
Ein ähnliches Bild findet sich in den Versuchansätzen, in welchen unter 4°C Hypoxie für 24 Stunden inkubiert wurde. Die Zugabe von Succinat führt in den Ansätzen mit Celsior und HTK zu einem signifikant höheren MTT-Umsatz. Dabei erhöht sich der MTT-Umsatz im Median in Celsior um 38 % und in HTK um 17 %. In den Ansätzen mit UW führt die Zugabe von Succinat aufgrund der großen Streubreite der Ergebnisse zu keiner signifikanten Erhöhung des MTT-Umsatzes, es gibt jedoch auch hier einen Trend zu einem erhöhten MTT-Umsatz (Zunahme um 21 % im Median). Zusätzlich lässt sich unter 4°C Hypoxie nach Zusatz von Fumarat in den Ansätzen mit UW ein signifikant erhöhter MTT-Umsatz beobachten (Abb. 18 d).

Abbildung 1 Immunhistochemischer Nachweis von HIF-1 α in HepG2-Zellen. Nach einer Inkubation für 6 Stunden unter 37°C Hypoxie (siehe Abbildungen b, d, f und h) ist das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung in allen Versuchsansätzen höher als nach einer 6 stündigen Inkubation unter 37°C Normoxie (siehe Abbildungen a, c, e und g). Gleichzeitig zeigt sich, dass HIF-1 α sich unter normoxischen Bedingungen vor allem im Zytoplasma nachweisen lässt (siehe Abbildungen a, c, e und g), wonach es nach einer 6 stündigen Inkubation unter Hypoxie sich vor allem im Kern darstellt (siehe Abbildungen b, d, f und h).

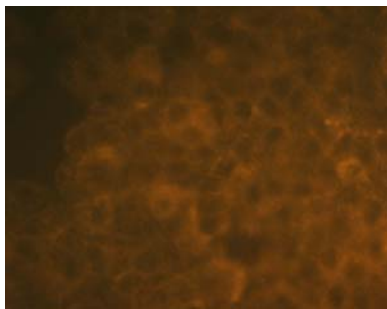
a) Normoxie, DMEM+Z



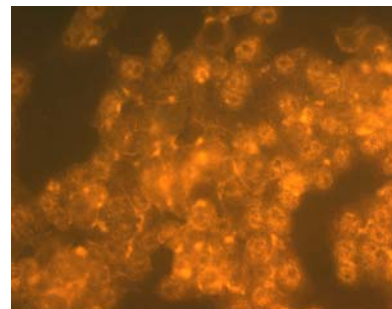
b) Hypoxie, DMEM+Z



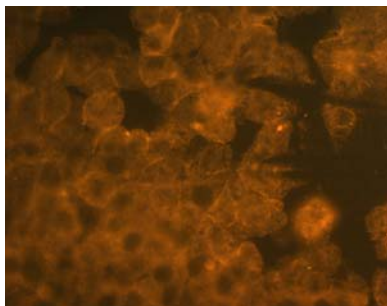
c) Normoxie, Celsior



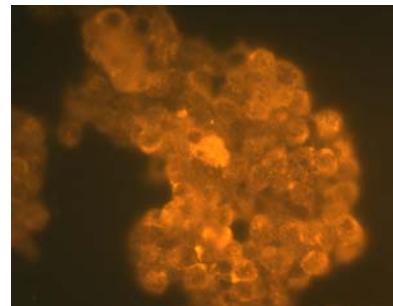
d) Hypoxie, Celsior



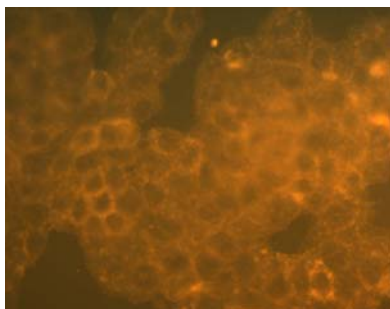
e) Normoxie, HTK



f) Hypoxie, HTK



g) Normoxie, UW



h) Hypoxie, UW

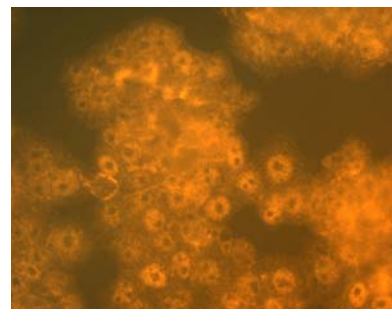


Abbildung 2. Beispiel eines Anti-human-HIF-1 α -Westernblots mit Extrakten aus HepG2-Zellen nach Inkubation über 6 Stunden unter Hypoxie bei 37°C (Proben vom 07.02.2006). Deutlich erkennbar ist die spezifische HIF-1 α -Bande bei 120 kD. Der vorliegende Westernblot zeigt Zellextrakte von Zellen, die in unterschiedlichen Versuchslösungen inkubiert wurden. Deutlich sichtbar ist hier, dass die Zellextrakte von in Zellkulturmedium (DMEM+Z) inkubierten HepG2-Zellen das Signal mit der stärksten Intensität liefern. Daneben zeigen sich noch zwei unspezifische Banden bei 50 kD und bei ca. 35 kD.

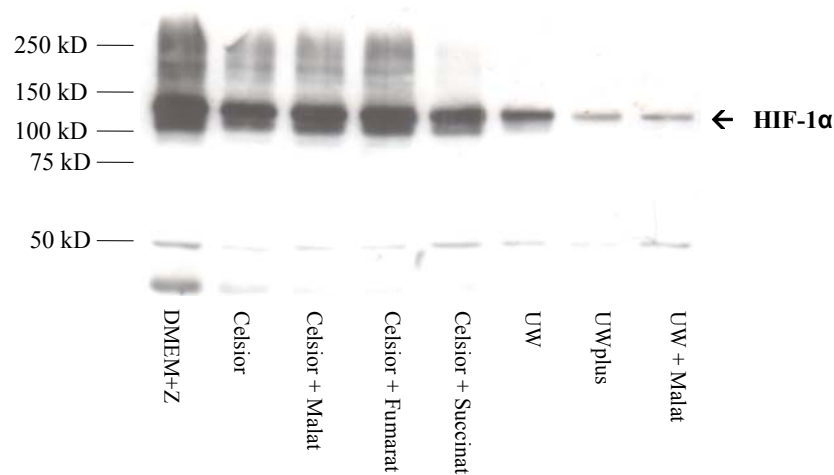


Abbildung 3. Pelletgewicht der HepG2-Zellen nach Inkubation unter 37°C Normoxie über 24 Stunden. Es besteht zwischen den Ansätzen mit DMEM+Z und UW ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Mann-Whitney-Test). Zwischen DMEM+Z und HTK läßt sich mit $p = 0,056$ (Mann-Whitney-Test) ein Trend nachweisen. Mit dem Viereck ist ein Ausreißer gekennzeichnet.

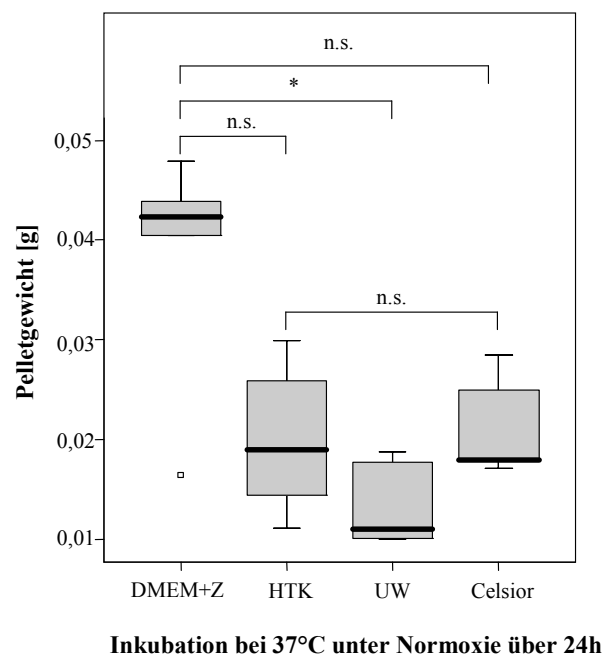


Abbildung 4. HIF-1 α -Menge eines HepG2-Zellextraktes nach Inkubation mit DMEM+Z bei 37°C Hypoxie (21% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) vom 16.1.2006, dargestellt als densitometrisch gemessener Grauwert der immunreaktiven Bande im Western Blot. Die gewonnene Probe wurde an 17 verschiedenen Tagen über 8 Wochen verteilt im Westernblot dargestellt. Die dabei gewonnen Ergebnisse sind in dieser Abbildung grafisch dargestellt. Die ermittelten Grauwerte bewegen sich um einen Mittelwert von 207 mit einer Standardabweichung von 13. Damit zeigt sich, dass die gewonnenen Zellextrakte mindestens über einen Zeitraum von 8 Wochen stabil sind.

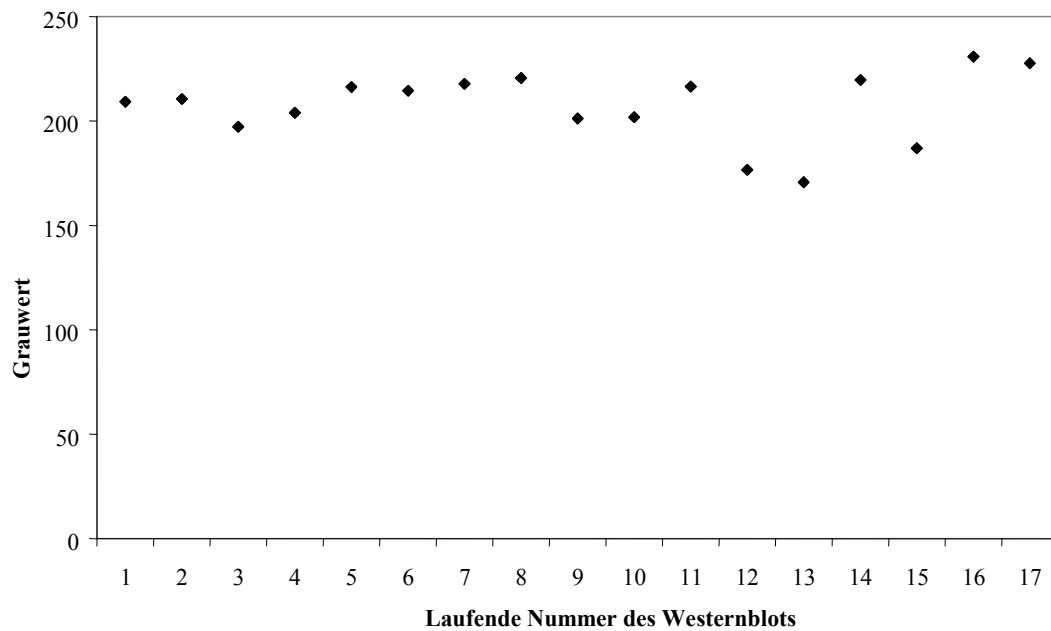


Abbildung 5. Densitometrische Auswertung der immunreaktiven Banden von HIF-1 α -Westernblots nach Inkubation von HepG2-Zellen über 6, 12 und 24 Stunden unter 37°C Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) in DMEM+Z (n.s. $p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Die Menge der HIF-1 α -Stabilisierung beträgt nach 6 Stunden im Median 70,74 %, nach 12 Stunden 91,28 % und nach 24 Stunden Inkubation erhöht sie sich auf 107,99 %. Obwohl die HIF-1 α -Menge nach jeweils 6 Stunden Inkubation um ca. 20 % im Median zunimmt, bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Inkubationszeiten.

* (6,23 %) und ° (121,95 %) bezeichnen Ausreißer.

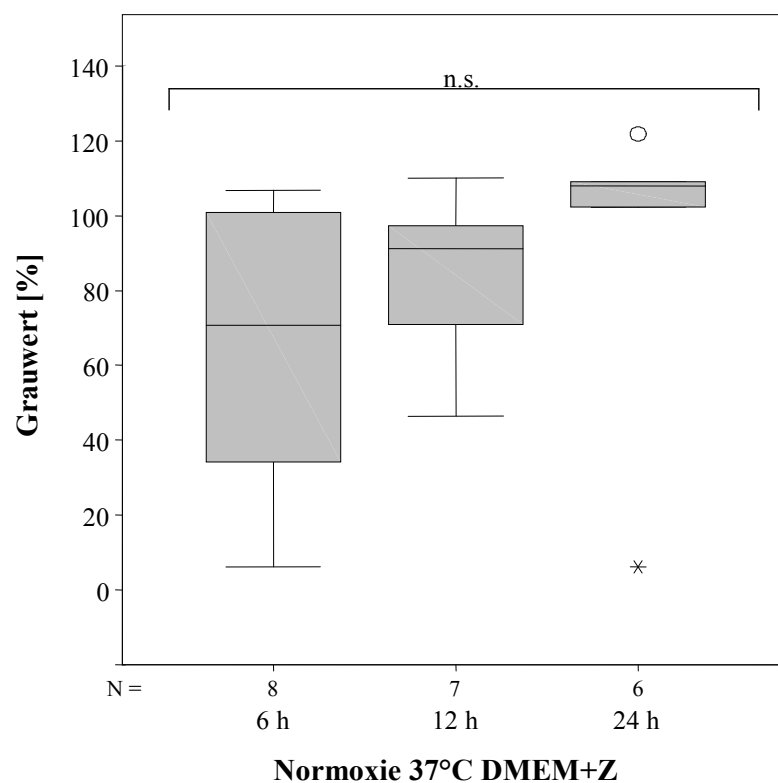


Abbildung 6. Densitometrische Auswertung der HIF-1 α -Westernblots zum Vergleich des Einflusses der Lösungen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior auf die Stabilisierung von HIF-1 α nach einer Inkubation von 6 (a), 12 (b) und 24 Stunden (c) unter 37°C Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) (** $p \leq 0,01$; n.s. $p > 0,05$; Mann-Whitney-Test) Bei allen drei Inkubationszeiten wird in mit DMEM+Z inkubierten Zellen hoch signifikant mehr HIF-1 α stabilisiert, als in den drei Organkonservierungslösungen. Der Median der Menge der HIF-1 α -Stabilisierung liegt bei allen drei Organkonservierungslösungen bei allen Inkubationslösungen bei 0 %. Mit den Vierecken und dem Kreis sind Ausreißer gekennzeichnet.

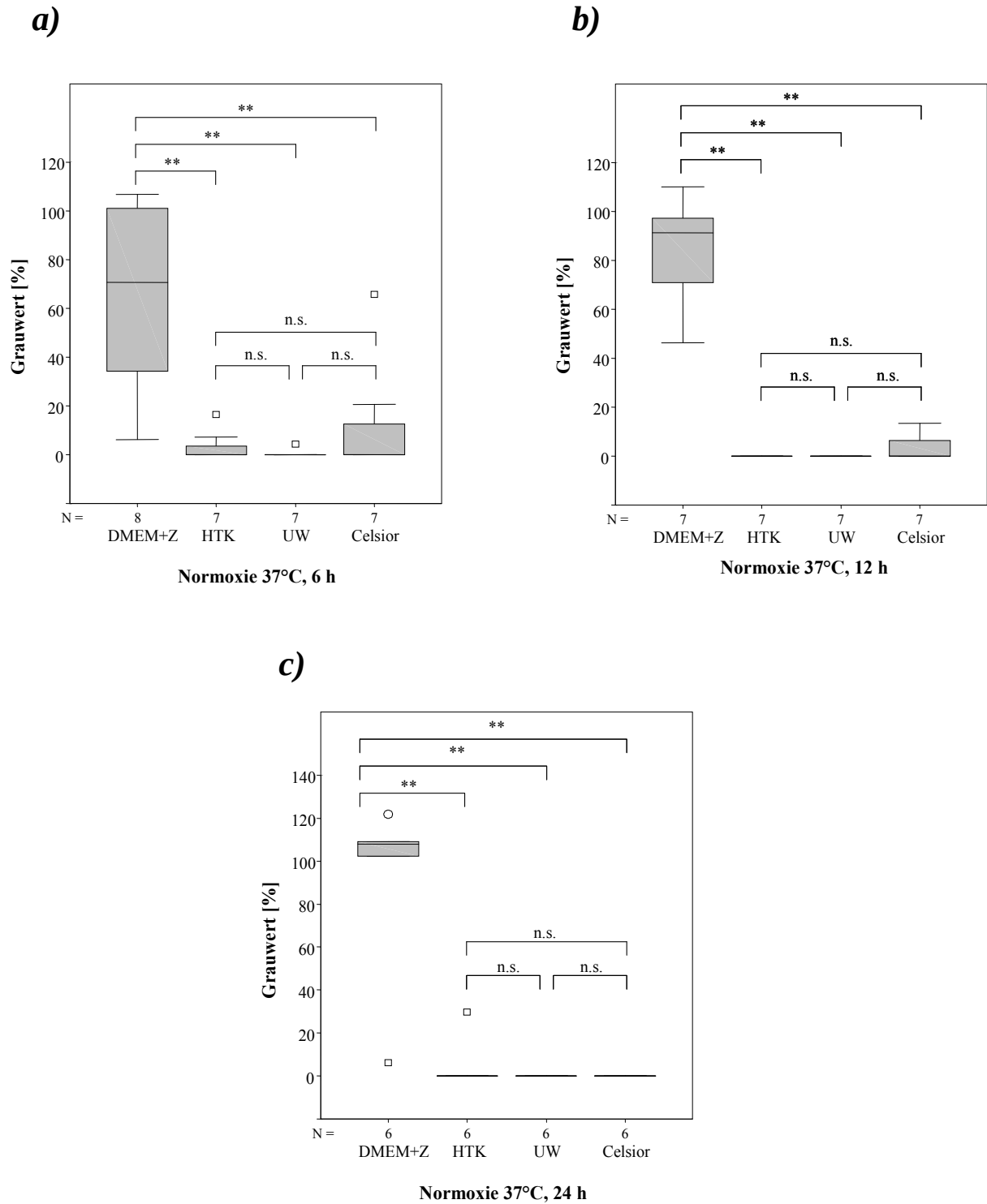


Abbildung 7. Densitometrische Auswertung der HIF-1 α -Westernblots zum Vergleich des Einflusses der Lösungen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior auf die Stabilisierung von HIF-1 α nach einer Inkubation von 6 (a), 12 (b) und 24 Stunden (c) unter 4°C Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) (n.s. $p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Bei keiner der genannten Inkubationszeiten bestehen signifikante Unterschiede in der HIF-1 α -Stabilisierung zwischen den Organkonservierungslösungen HTK, UW und Celsior. Im Median liegt die HIF-1 α -Stabilisierung bei 0 %. Mit dem einzelnen Viereck ist ein Ausreißer gekennzeichnet.

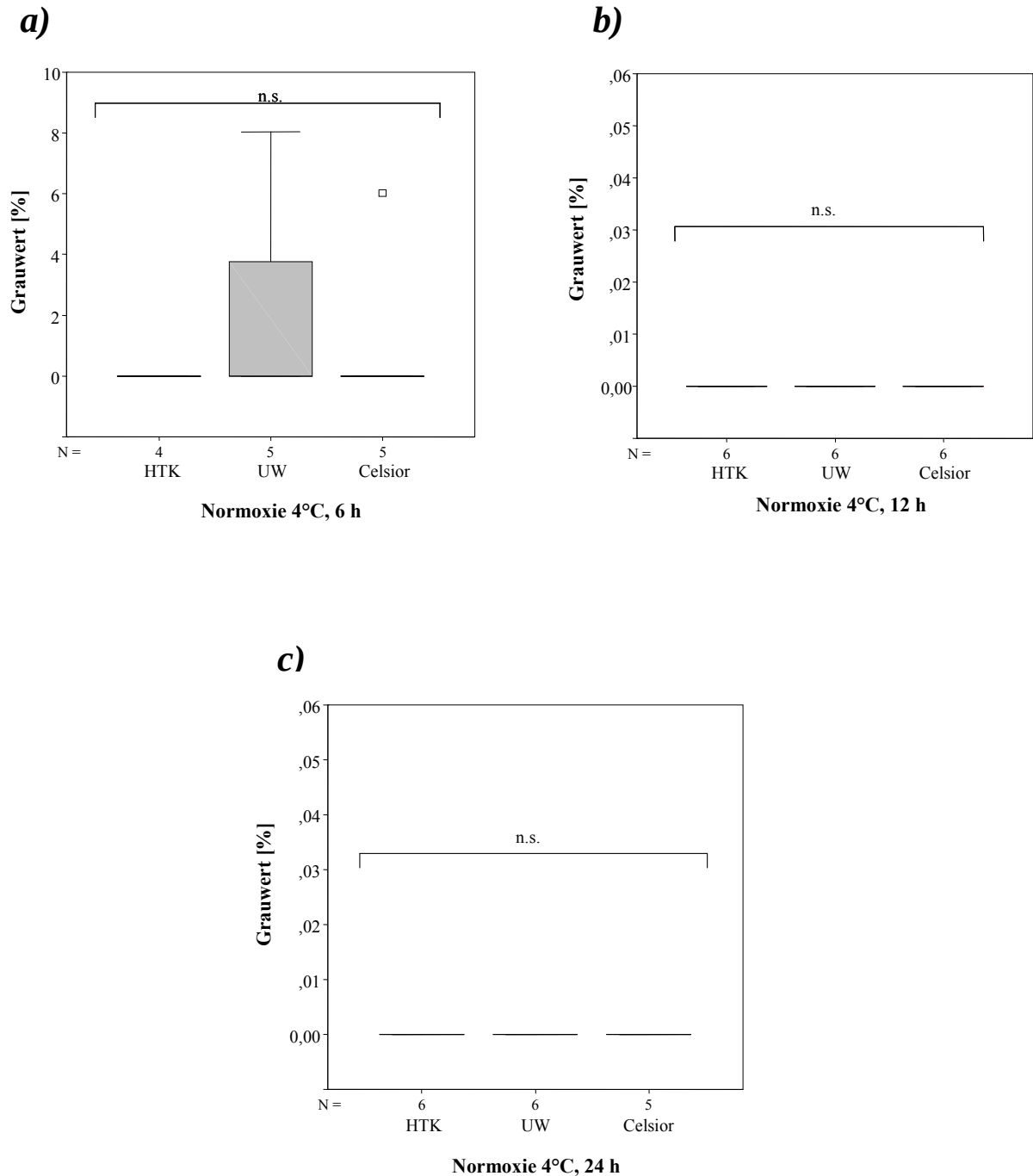


Abbildung 8. Densitometrische Auswertung der HIF-1 α -Westernblots zum Vergleich des Einflusses der Lösungen DMEM+Z (a), HTK (b), UW (c) und Celsior (d) auf die Stabilisierung von HIF-1 α nach einer Inkubation über 6, 12 und 24 Stunden unter 4°C (Raumluft) bzw. 37°C Normoxie (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) und 4°C bzw. 37°C Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; n.s. $p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

In Abbildung a) zeigt sich, dass in DMEM+Z zwischen 37°C Hypoxie und Normoxie nur bei den 6 Stunden-Werten ein signifikanter Unterschied vorliegt. Der Median der normoxischen HIF-1 α -Stabilisierung liegt nach 6 Stunden bei 70,74 % und somit ungefähr 30 % niedriger als nach 12 Stunden (Median=107,0). Bei den beiden anderen Inkubationszeiten (12 und 24 Stunden) lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen 37°C Normoxie und Hypoxie nachweisen. Mit den Vierecken und dem Kreis sind Ausreißer gekennzeichnet.

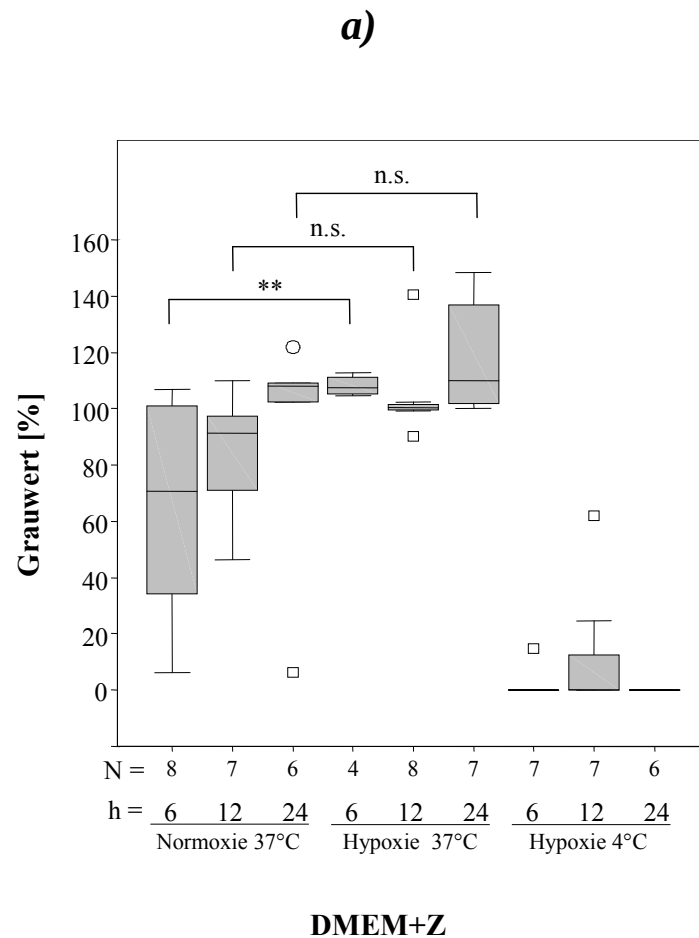


Abbildung 8b). Bei den Ansätzen mit Celsior bei Inkubation in 4°C finden sich keine signifikanten Unterschiede in der HIF-1α-Stabilisierung zwischen Normoxie und Hypoxie. Der Median liegt bei 4°C bei allen Inkubationszeiten sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie bei 0 %. Bei den Versuchen bei 37°C finden sich dagegen signifikante Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie. Nach 6 Stunden Inkubation liegt die HIF-1α-Stabilisierung unter Normoxie bei 0 % (Median), unter Hypoxie bei signifikant höheren 77 % (Median). Auch nach einer Inkubation über 12 bzw. über 24 Stunden finden sich signifikante Unterschiede in der HIF-1α-Stabilisierung zwischen 37°C Normoxie und Hypoxie. Mit den Vierecken und Kreisen sind Ausreißer gekennzeichnet.

b)

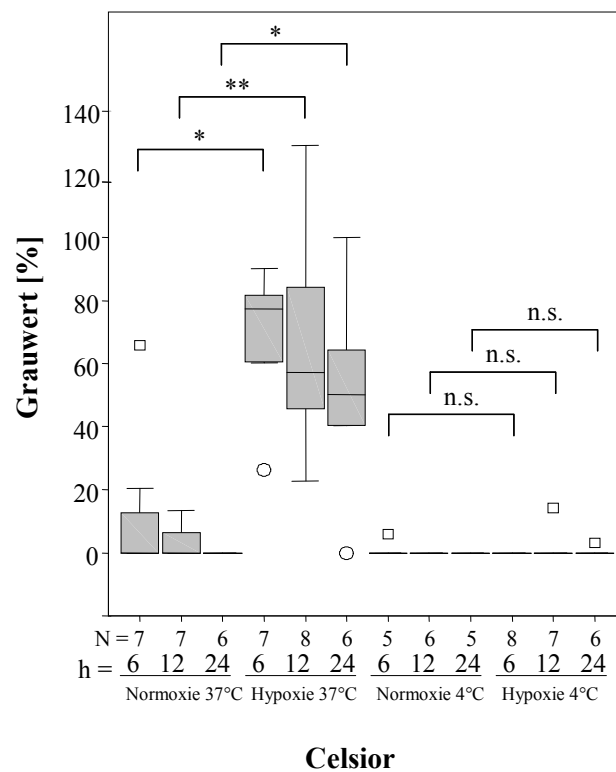


Abbildung 8c). Auch bei den Ansätzen mit HTK bei den Inkubationen in 4°C bestehen keine signifikanten Unterschiede in der HIF-1 α -Stabilisierung zwischen Normoxie und Hypoxie. Der Median liegt bei 4°C bei allen Inkubationszeiten sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie bei 0 %. Bei den Versuchen bei 37°C finden sich dagegen signifikante Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie sowohl nach 6 Stunden Inkubation als auch nach 12 Stunden Inkubation. Während die HIF-1 α -Stabilisierung unter Normoxie im Median 0 % beträgt, so steigt sie unter Hypoxie nach 6 Stunden auf 51 % (Median) bzw. nach 12 Stunden auf 53 % (Median). Nach 24 Stunden nimmt die HIF-1 α -Stabilisierung unter Hypoxie so weit ab, dass sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Normoxie und Hypoxie nachweisen lässt. Mit den Vierecken und dem Kreis sind Ausreißer gekennzeichnet.

c)

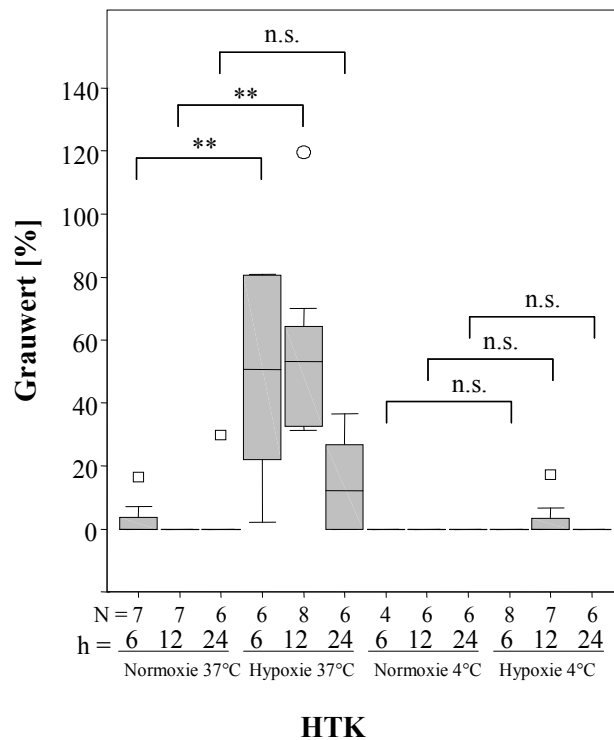


Abbildung 8d). In UW bestehen bei den Inkubationen in 4°C keine signifikanten Unterschiede in der HIF-1α-Stabilisierung zwischen Normoxie und Hypoxie. Der Median liegt bei 4°C bei allen Inkubationszeiten sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie bei 0 %. Bei den Versuchen bei 37°C finden sich dagegen signifikante Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie, sowohl nach 6 Stunden Inkubation als auch nach 12 Stunden und 24 Stunden Inkubation. Während die HIF-1α-Stabilisierung unter Normoxie im Median 0 % beträgt, so steigt sie unter Hypoxie nach 6 Stunden auf 59 % (Median), nach 12 Stunden auf 40 % (Median) und nach 24 Stunden auf 52 % (Median). Mit den Vierecken und dem Kreis sind Ausreißer gekennzeichnet.

d)

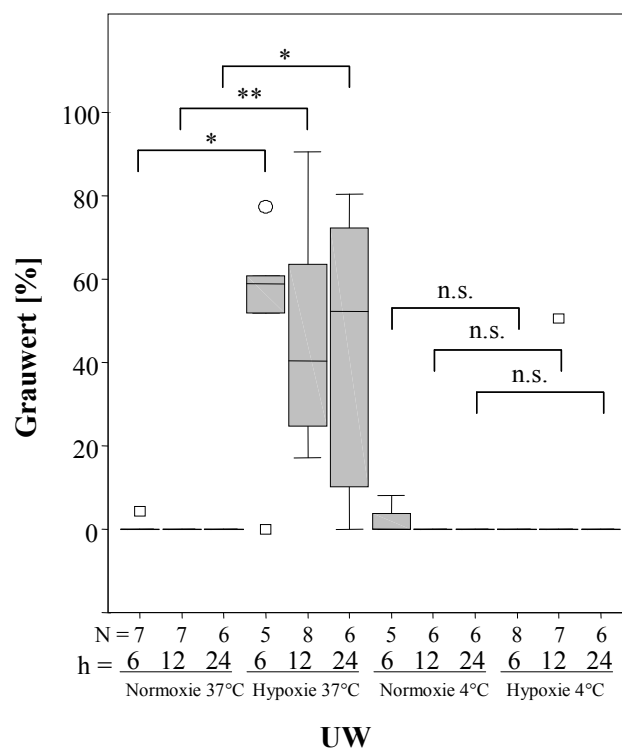


Abbildung 9. Densitometrische Auswertung der immunreaktiven Banden von HIF-1 α -Westernblots zum Vergleich des Einflusses der Lösungen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior auf die HIF-1 α -Stabilisierung nach einer Inkubation von 6 (a), 12 (b) und 24 Stunden (c) unter 37°C Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; n.s. $p > 0,05$) Mann-Whitney-Test

Abbildung a) zeigt die Auswertung der HIF-1 α -Westernblots von Zellextrakten aus HepG2-Zellen nach einer Inkubation über 6 Stunden unter 37°C Hypoxie. In den Versuchsansätzen mit DMEM+Z wird im Vergleich zu den Organkonservierungslösungen HTK, UW und Celsior signifikant mehr HIF-1 α stabilisiert. Im Vergleich mit HTK wird in den Ansätzen mit DMEM+Z im Median mehr als die doppelte Menge an HIF-1 α stabilisiert (HTK 51 %, DMEM+Z 108 %). In UW liegt das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung mit 59 % im Median bei ca. der Hälfte der HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z, und in Celsior werden im Vergleich mit DMEM+Z im Median nur ca. 2/3 der Menge an HIF-1 α stabilisiert. Zwischen HTK, UW und Celsior bestehen keine signifikanten Unterschiede in der HIF-1 α -Stabilisierung. Mit dem Viereck und den Kreisen sind Ausreißer gekennzeichnet.

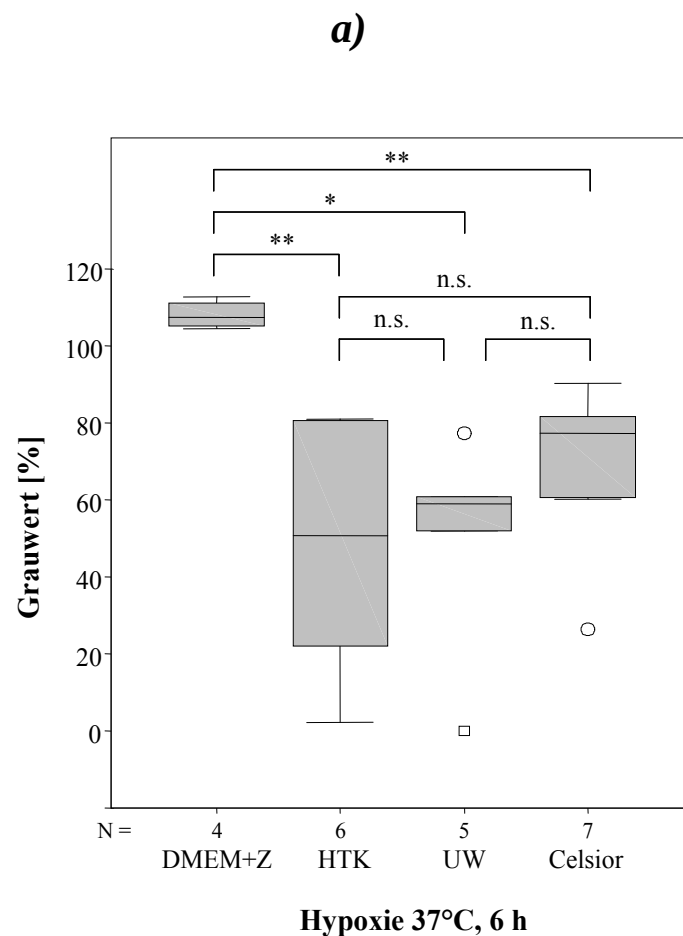


Abbildung b) zeigt die Auswertung der HIF-1 α -Westernblots von Zellextrakten aus HepG2-Zellen nach einer Inkubation über 12 Stunden unter 37°C Hypoxie. Wieder wird in den Ansätzen mit DMEM+Z deutlich mehr HIF-1 α stabilisiert als in den Ansätzen mit den Organkonservierungslösungen. Vergleicht man das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung in HTK mit DMEM+Z, so zeigt sich, dass im Median mit 101 % in DMEM+Z ca. doppelt so viel HIF-1 α stabilisiert wird, wie in HTK mit 53 % (Median) bzw. Celsior mit 57 % (Median). In den Ansätzen mit UW werden im Median nur 40 % HIF-1 α stabilisiert und somit ca. 2/3 weniger als in DMEM+Z. Zwischen HTK, UW und Celsior bestehen weiterhin keine signifikanten Unterschiede in der HIF-1 α -Stabilisierung. Mit den Vierecken und dem Kreis sind Ausreißer gekennzeichnet.

b)

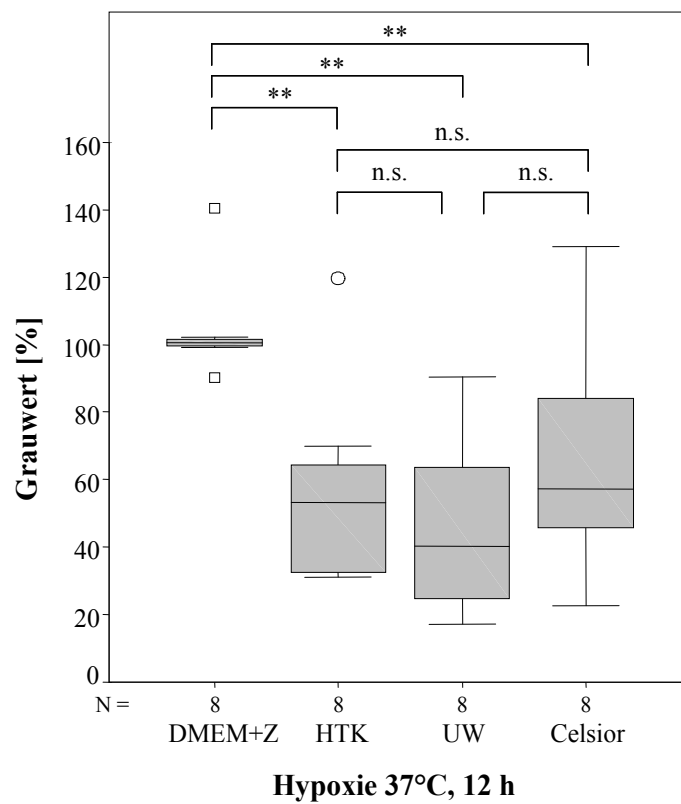


Abbildung c) zeigt die Auswertung der HIF-1 α -Westernblots von Zellextrakten aus HepG2-Zellen nach einer Inkubation über 24 Stunden unter 37°C Hypoxie. Es ergibt sich ein ähnliches Bild wie nach 12 Stunden Inkubation. In den Ansätzen mit DMEM+Z wird deutlich mehr HIF-1 α stabilisiert als in den Ansätzen mit den Organkonservierungslösungen. Das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung sinkt in HTK nach 24 Stunden auf 12,31 % im Median ab und liegt damit um fast 90 % unter der HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z (110 % im Median). In UW und Celsior ist der Unterschied nicht ganz so groß. Die HIF-1 α -Stabilisierung liegt im Median mit 52 % (UW) und 50 % (Celsior) ungefähr bei der Hälfte der HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z. Auch nach 24 Stunden Inkubation gibt es weiterhin keine signifikanten Unterschiede zwischen HTK, UW und Celsior. Mit dem Kreis ist ein Ausreißer gekennzeichnet.

c)

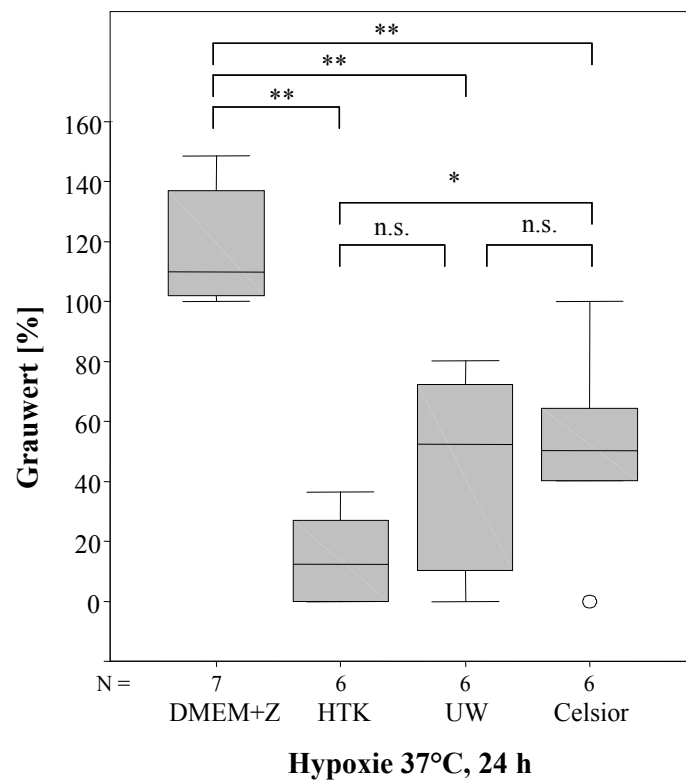
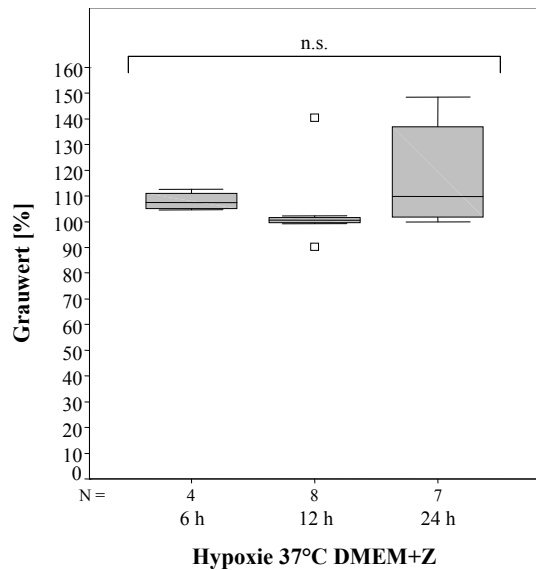
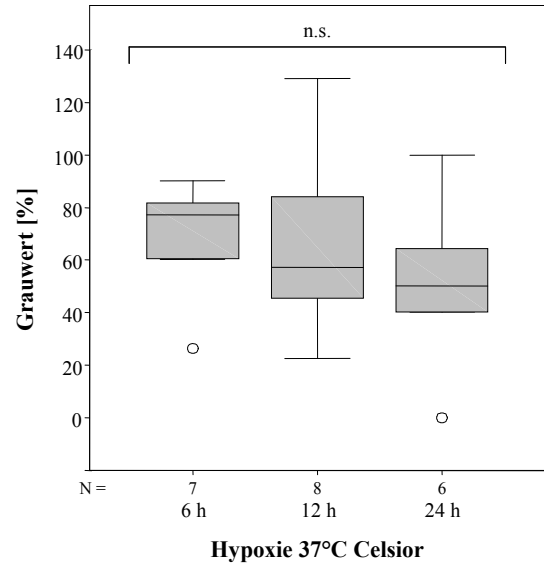


Abbildung 10. Densitometrische Auswertung der HIF-1 α -Westernblots nach Inkubation von 6, 12 und 24 Stunden unter 37°C Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂). In Abbildung a) sind die Ansätze in DMEM+Z dargestellt. In der statistischen Auswertung mit dem globalen Kruskal-Wallis-Test lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Inkubationszeiten nachweisen. Dies gilt auch für die Ansätze mit Celsior (Abbildung b) und UW (Abbildung d). In den Ansätzen mit HTK (Abbildung c), zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der HIF-1 α -Stabilisierung zwischen 12 und 24 Stunden Inkubation. Während die HIF-1 α -Stabilisierung nach 12 Stunden im Median 53 % beträgt, sinkt sie nach 24 Stunden Inkubation auf 12 % ab. (** $p \leq 0,01$; n.s. $p > 0,05$; a,b,c Kruskal-Wallis-Test; c Mann-Whitney-Test). Mit den Vierecken und Kreisen sind Ausreißer gekennzeichnet.

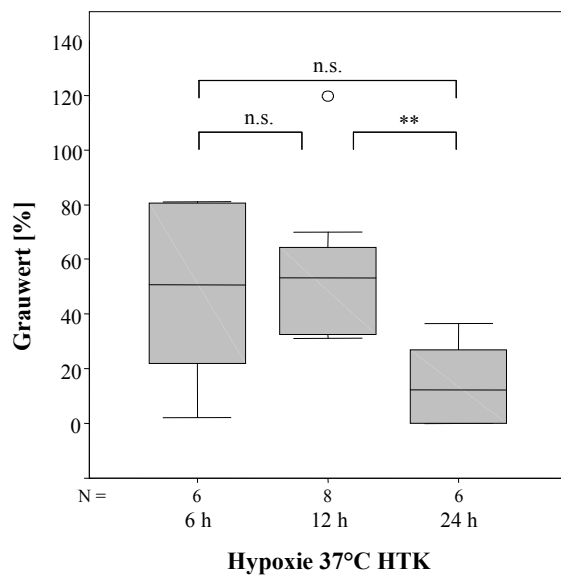
a)



b)



c)



d)

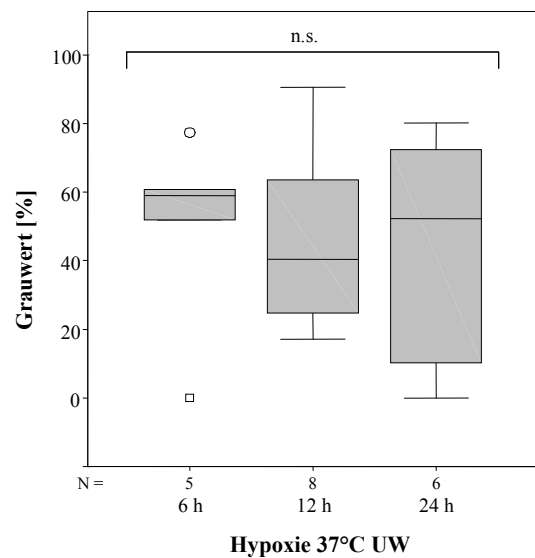


Abbildung 11. Densitometrische Auswertung der HIF-1 α -Westernblots nach Inkubation von 6 (a), 12 (b) und 24 (c) Stunden unter 4°C Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N). Einfluss der Lösungen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior auf die Stabilisierung von HIF-1 α . Wie in den Abbildungen a-c deutlich erkennbar ist, liegt das Ausmaß der HIF-1 α -Stabilisierung in allen Lösungen nach allen Inkubationszeiten im Median bei 0%. Signifikante Unterschiede bestehen bei allen drei Inkubationszeiten zwischen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior nicht (n.s., 0,05; Kruskal-Wallis-Test). Mit den Vierecken sind Ausreißer gekennzeichnet.

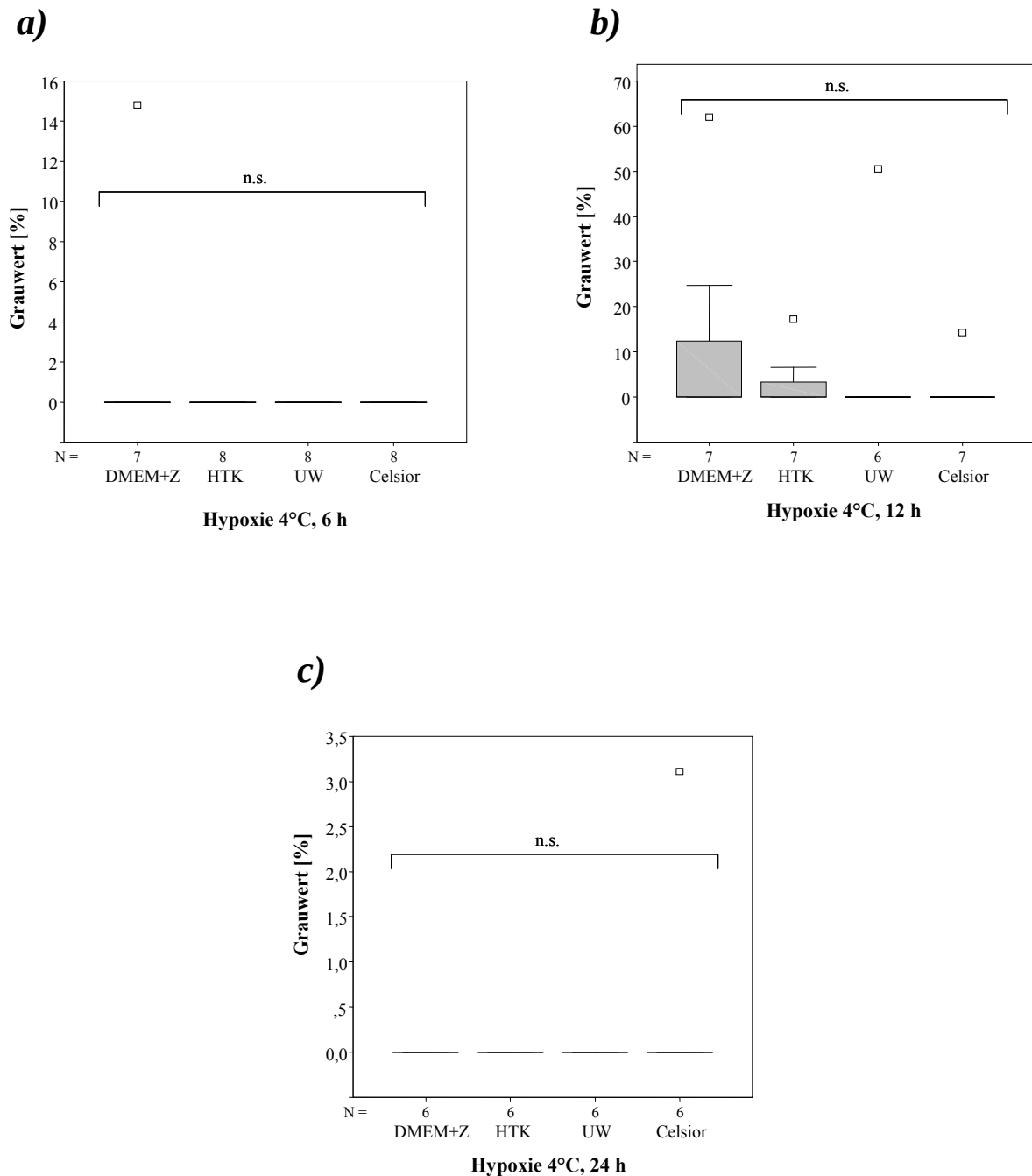


Abbildung 12. Densitometrische Auswertung von HIF-1 α -Westernblots zur Beurteilung des Einflusses von 15 mM Malat, Fumarat und Succinat auf die Stabilisierung von HIF-1 α in UW bei 37°C Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) nach 6 (a) und 24 (b) Stunden Inkubation (n.s. $p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Es lassen sich keine statistisch signifikanten Einflüsse auf die HIF-1 α -Stabilisierung in UW durch die Zugabe von Malat, Fumarat und Succinat nachweisen. Mit den Vierecken und dem Kreis sind Ausreißer gekennzeichnet.

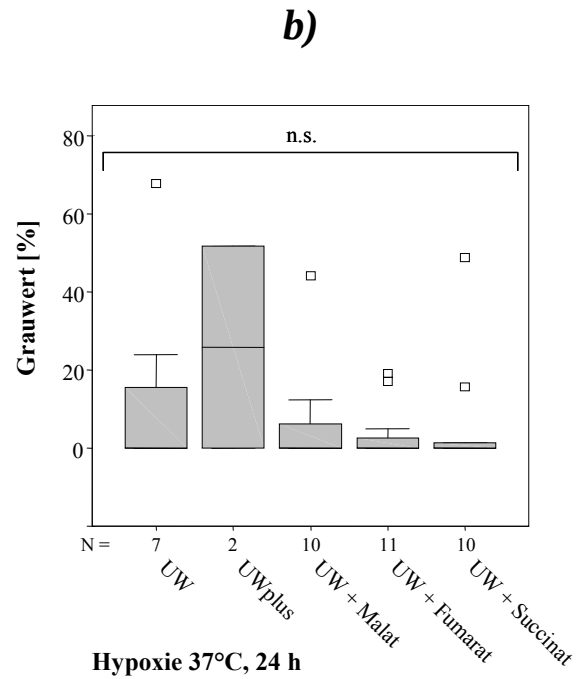
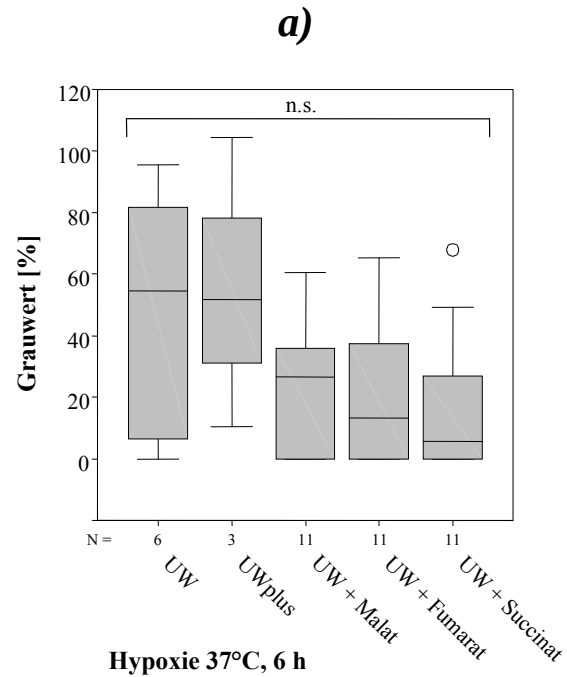


Abbildung 13. Beispiel eines Anti-human-HIF-1 α -Westernblots mit Zellextrakten aus HepG2-Zellextrakten. Dargestellt ist ein Westernblot mit Zellextrakten, welche unter 37°C Normoxie und 37°C Hypoxie in UW(a) bzw. Celsior (b) inkubiert wurden. Sowohl in Abbildung a) als auch in Abbildung b) sieht man, dass die Extrakte der HepG2-Zellen, welche unter 37°C Normoxie mit UW bzw. Celsior inkubiert wurden, kein HIF-1 α -Signal liefern. M=Malat, F=Fumarat, S=Succinat

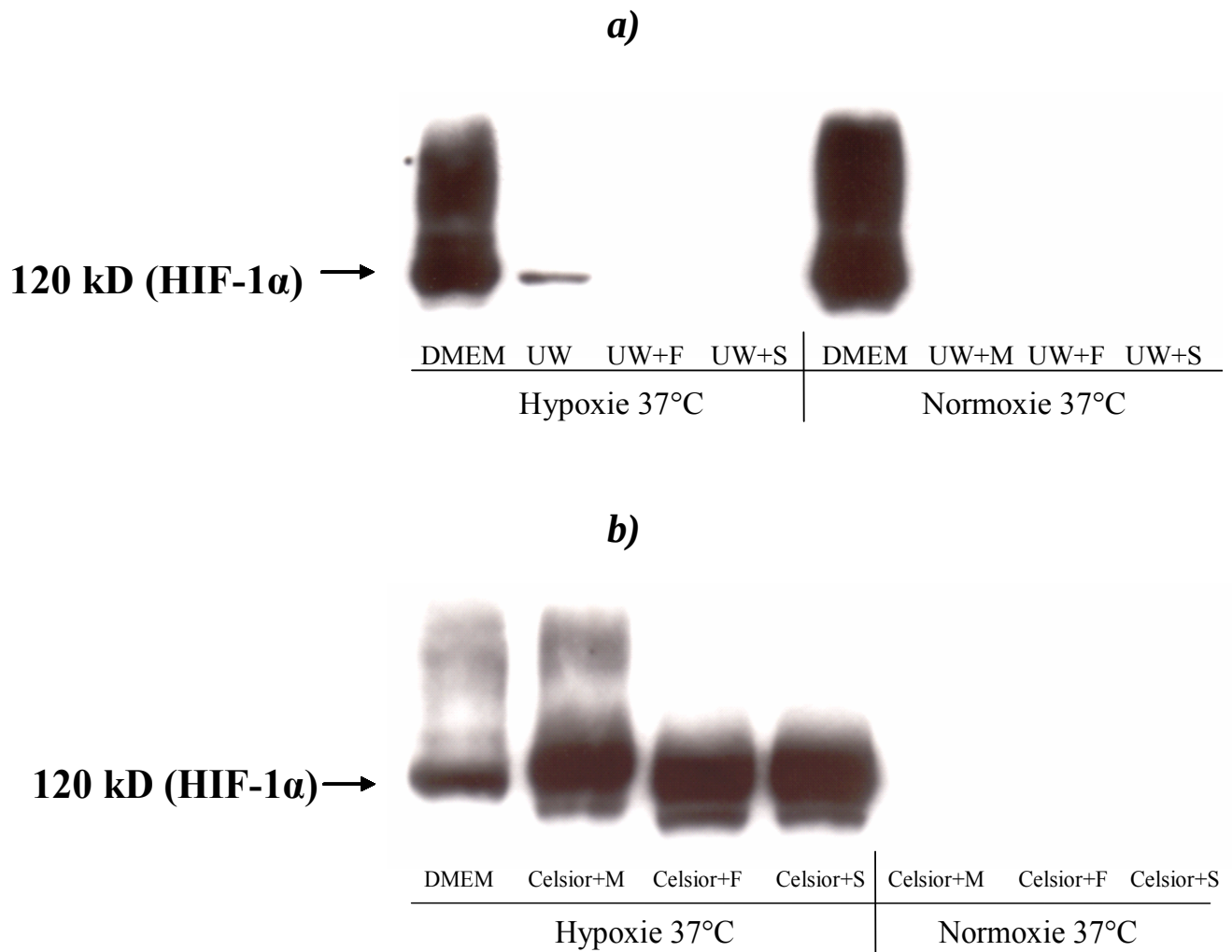


Abbildung 14. Densitometrische Auswertung von HIF-1 α -Westernblots zur Beurteilung des Einflusses von 15 mM Malat, Fumarat und Succinat auf die Stabilisierung von HIF-1 α in **Celsior** bei 37°C Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) nach 6 (a) und 24 (b) Stunden Inkubation (n.s. $p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Es lassen sich keine statistisch signifikanten Einflüsse auf die HIF-1 α -Stabilisierung in Celsior durch die Zugabe von Malat, Fumarat und Succinat nachweisen. Nach einer Inkubation über 24 Stunden liegt die HIF-1 α -Stabilisierung in den Versuchsansätzen mit Celsior + Succinat im Median bei 11 % und damit niedriger als in Celsior ohne Zusätze (Median 33 %). Aufgrund der großen Streubreite der Werte besteht dennoch kein signifikanter Unterschied. Mit dem Viereck ist ein Ausreißer gekennzeichnet.

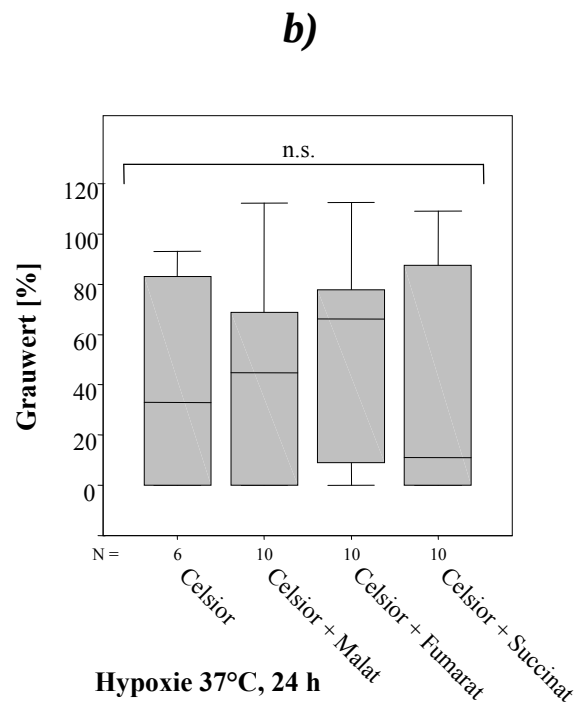
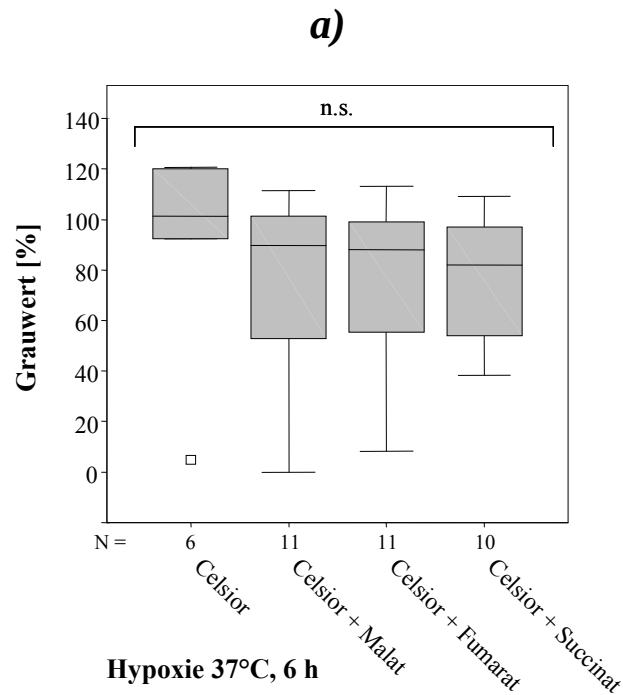


Abbildung 15. Densitometrische Auswertung von HIF-1 α -Westernblots zur Beurteilung des Einflusses von 15 mM Malat, Fumarat und Succinat auf die Stabilisierung von HIF-1 α in **HTK** bei 37°C Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) nach 6 (a) und 24 (b) Stunden Inkubation (n.s. $p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Es lassen sich keine statistisch signifikanten Einflüsse auf die HIF-1 α -Stabilisierung in HTK durch die Zugabe von Malat, Fumarat und Succinat nachweisen.

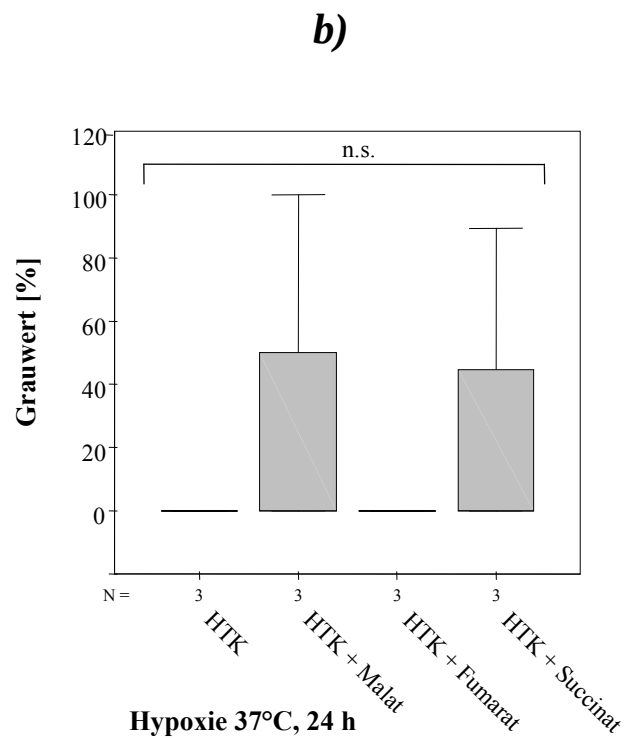
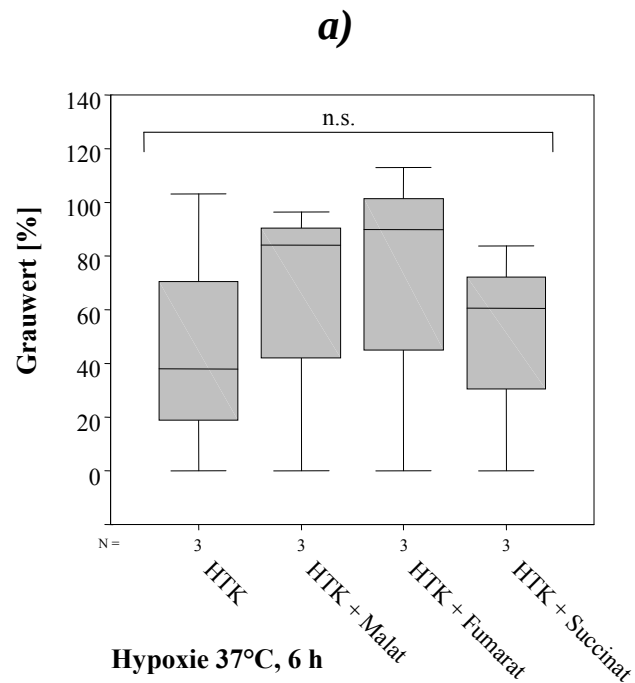
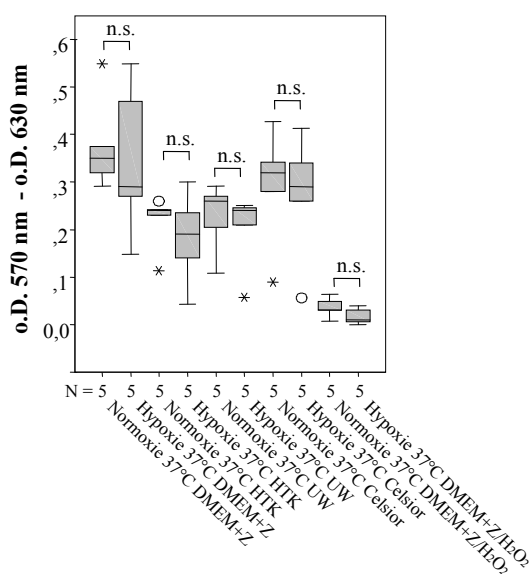
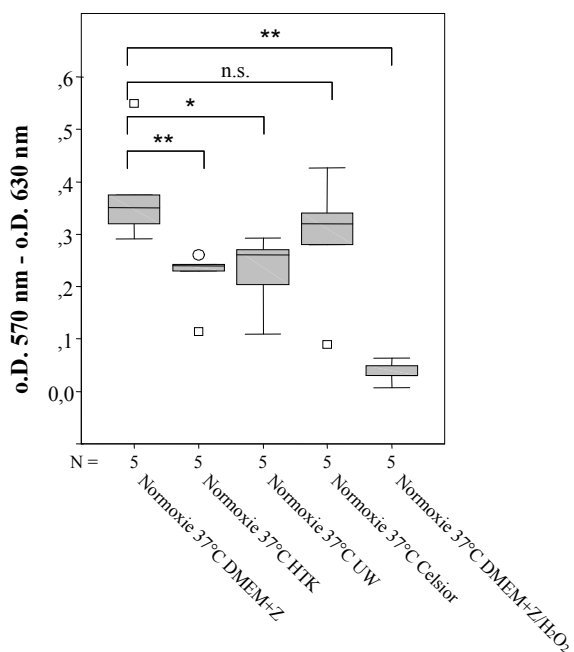


Abbildung 16. Differenz der optischen Dichte im MTT-Test mit HepG2-Zellen nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C Normoxie und Hypoxie in den unterschiedlichen Lösungen. In Abbildung a) zeigt sich, dass weder in DMEM+Z, noch in HTK, UW oder Celsior signifikante Unterschiede in der Vitalität der HepG2-Zellen nach Inkubation über 6 Stunden zwischen 37°C Normoxie und 37°C Hypoxie bestehen. In Abbildung b) sieht man, dass unter 37°C Normoxie sowohl in HTK als auch in UW im Vergleich zu DMEM+Z signifikant weniger Zellen vital sind. Zwischen DMEM+Z und Celsior bestehen nach 6 Stunden keine signifikanten Unterschiede in der Vitalität der HepG2-Zellen. Unter Hypoxie zeigen sich dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede, wenn man DMEM+Z mit den Organkonservierungslösungen vergleicht. Sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Organkonservierungslösungen untereinander (n.s. $p > 0,05$; Mann-Whitney-Test). Mit den Vierecken und Kreisen sind Ausreißer gekennzeichnet. In Abbildung a) sind die Ausreißer mit Kreisen und Sternchen gekennzeichnet. o.D. = optische Dichte.

a)



b)



c)

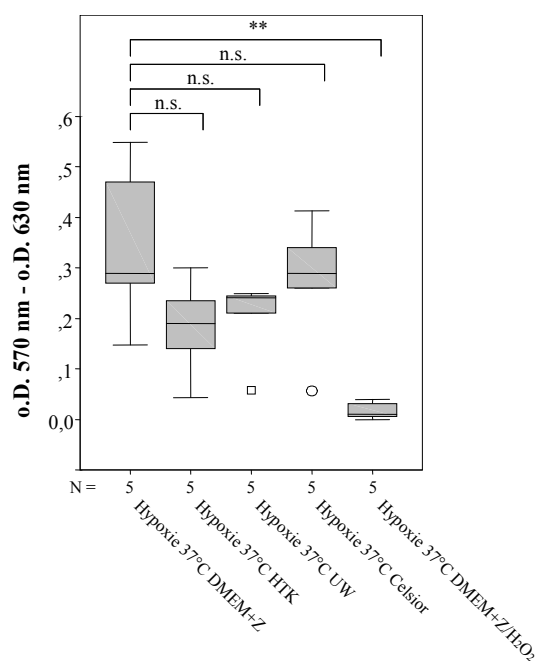


Abbildung 17. Differenz der optischen Dichte im MTT-Test mit HepG2-Zellen nach 6 Stunden Inkubation bei 4°C Normoxie und Hypoxie in den unterschiedlichen Lösungen. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Lösungen oder zwischen normoxischer und hypoxischer Inkubation (Mann-Whitney-Test). Es besteht jedoch sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit DMEM+Z oder den Organkonservierungslösungen und dem Ansatz mit DMEM+Z mit H₂O₂. Mit den Kreisen und Vierecken sind Ausreißer gekennzeichnet. o.D. = optische Dichte.

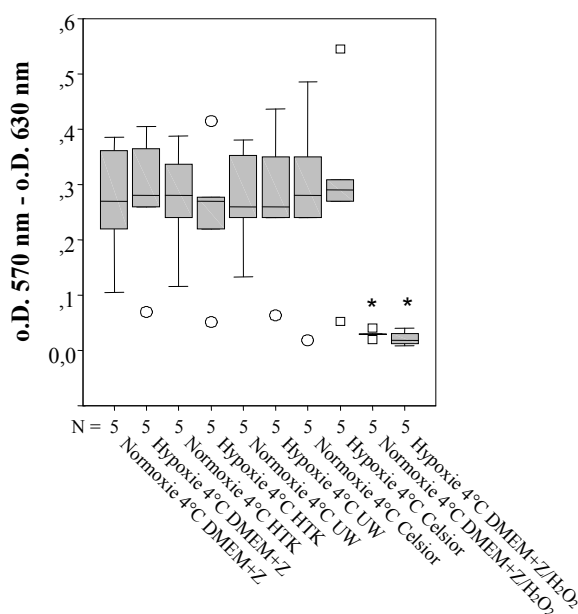
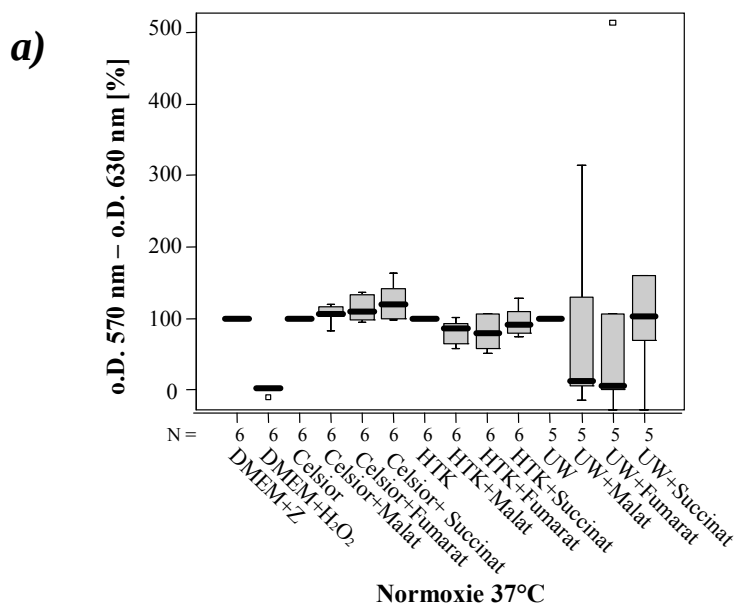


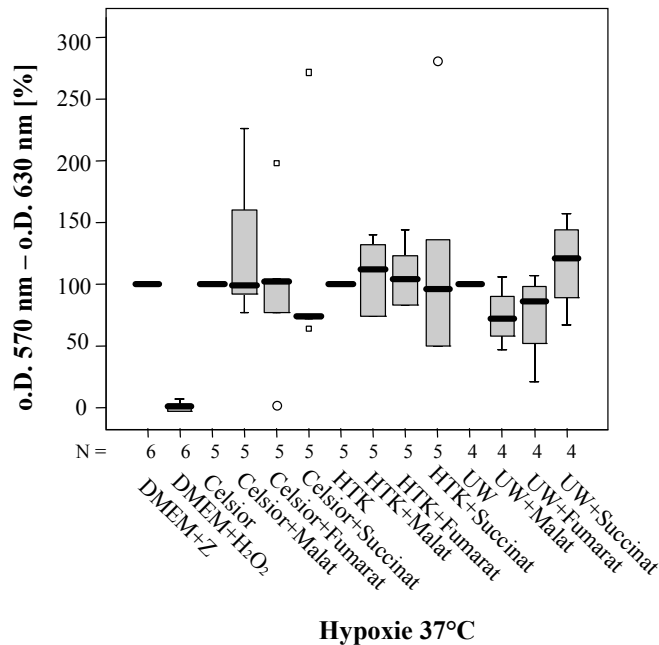
Abbildung 18. Differenz der optischen Dichte im MTT-Test mit HepG2-Zellen nach 24 Stunden Inkubation bei 4°C und 37°C Normoxie bzw. 4°C und 37°C Hypoxie in den unterschiedlichen Lösungen mit dem Zusatz von Malat, Fumarat und Succinat. Die Differenz der optischen Dichte ist im Folgenden in Prozent angegeben, wobei die verwendeten Lösungen ohne Zusätze zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf 100 Prozent gesetzt wurden.

In Abbildung a) zeigt sich, dass die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite unter 37°C Normoxie keinen Einfluss auf die Vitalität der HepG2-Zellen hat. Signifikante Unterschiede bestehen nur zur Kontrollgruppe DMEM+H₂O₂ (Mann-Whitney-Test). Mit den Vierecken sind Ausreißer bezeichnet. o.D. = optische Dichte



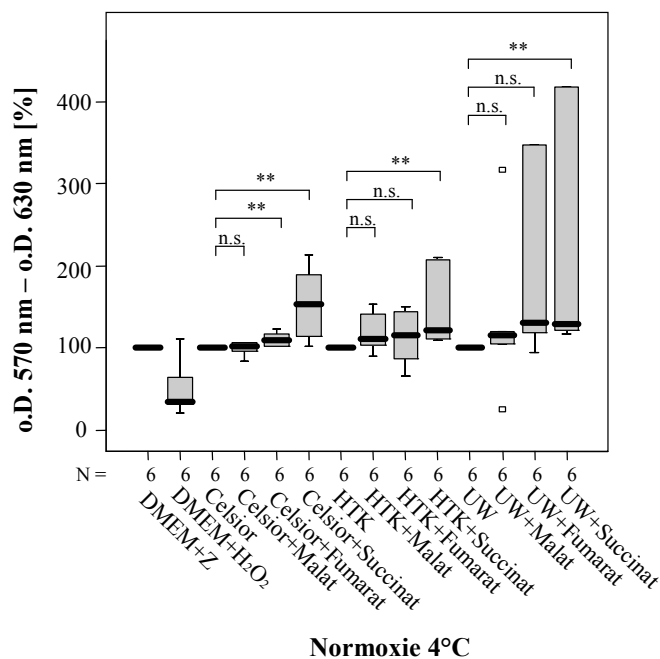
In Abbildung b) zeigt sich, dass die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite auch unter 37°C Hypoxie keinen Einfluss auf die Vitalität der HepG2-Zellen hat. Signifikante Unterschiede bestehen nur zur Kontrollgruppe DMEM+Z/H₂O₂. Mit den Vierecken und Kreisen sind Ausreißer bezeichnet.

b)



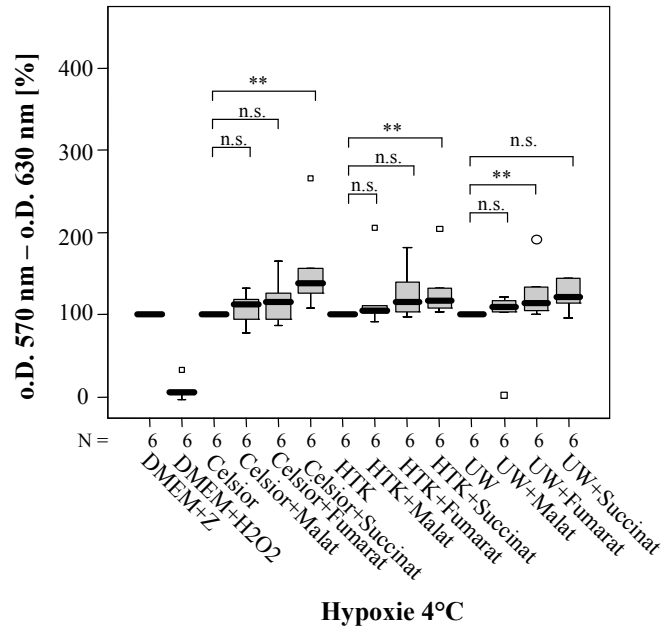
In Abbildung c) zeigt sich, dass im Vergleich zu den Versuchen unter 37°C Normoxie und Hypoxie die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite unter 4°C einen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der HepG2-Zellen hat. Succinat hat in allen drei Organkonservierungslösungen nach 6 Stunden Inkubation einen positiven Effekt auf die Vitalität der HepG2-Zellen. In den Versuchsansätzen mit Celsior hat auch Fumarat einen positiven Einfluss auf die Vitalität der HepG2-Zellen (n.s. $p > 0,05$; ** $p \leq 0,01$; Mann-Whitney-Test). Mit den Vierecken sind Ausreißer gekennzeichnet.

c)



In Abbildung d) zeigt sich, dass die Zugabe der Zitratzyklusmetaboliten Succinat und Fumarat auch unter 4°C Hypoxie einen Einfluss auf die Vitalität der HepG2-Zellen hat. Succinat führt in Celsior und in HTK zu einem signifikant höheren MTT-Umsatz. Fumarat dagegen hat in UW einen positiven Effekt auf die Vitalität der HepG2-Zellen. (n.s. $p > 0,05$; ** $p \leq 0,01$; Mann-Whitney-Test). Mit den Vierecken und dem Kreis sind Ausreißer gekennzeichnet.

d)



4. Diskussion

4.1 Spezifität des benutzten Antikörpers und Aussagekraft der Methode Westernblot

Unter Hypoxie wird HIF-1 α stabilisiert und in den Zellkern transloziert. Um die Spezifität des benutzten Antikörpers überprüfen, wurden zusätzlich zu den Westernblotanalysen noch immunhistochemische Markierungen der HepG2-Zellen durchgeführt. Für die (anti-)HIF-1 α -Immunhistochemie wurden HepG2-Zellen in den Versuchslösungen DMEM+Z, HTK, UW und Celsior für 6 Stunden sowohl bei 37°C Normoxie als auch bei 37°C Hypoxie inkubiert.

HIF-1 α wird bereits unter normoxischen Bedingungen in HepG2-Zellen in nachweisbaren Mengen stabilisiert. Unter Normoxie findet man HIF-1 α vor allem im Zytoplasma. Unter Hypoxie wird in HepG2-Zellen vermehrt HIF-1 α stabilisiert und es transloziert in den Kern. Dieses Verhalten ist in der Literatur schon vielfach für HIF-1 α beschrieben, daher können wir von einer spezifischen Markierung durch unseren Antikörper ausgehen.

Im Westernblot ließen sich unter Hypoxie größere Mengen an HIF-1 α nachweisen als unter Normoxie. Der verwendete Antikörper markierte HIF-1 α dabei zuverlässig bei 120 kD. Die wiederholte Darstellung einer DMEM+Z-Probe zeigte zudem, dass die Proben zumindest über den gemessenen Zeitraum von 10 Wochen stabil sind und dass die verwendete Methode des Westernblots reproduzierbare Ergebnisse liefert. Der Westernblot eignet sich also grundsätzlich, um HIF-1 α in Zellextrakten nachzuweisen und stellt dabei eine zuverlässige und genaue Methode zu Quantifizierung der HIF-1 α -Menge in HepG2-Zellen dar.

4.2 HIF-1 α -Stabilisierung unter Normoxie in HepG2-Zellen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zu vielen Primärzellen HIF-1 α in HepG2-Zellen bereits unter Normoxie in nachweisbaren Mengen stabilisiert wird. Dies steht in Einklang mit den Daten der Arbeitsgruppe um Hellwig-Bürgel und Jelkmann, die genau wie wir HIF-1 α auch unter Normoxie in HepG2-Zellen nachgewiesen haben (Hellwig-Bürgel et al., 1999). Eine HIF-1 α -Stabilisierung unter Normoxie lässt sich auch in vielen anderen Tumorzelllinien nachweisen (Mazure et al., 2004; Brière et al., 2005b; Chandel et al., 2000; Wiesener MS et al., 1998; Chan et al., 2002; etc.). Ursache hierfür scheinen diverse Onkogene zu sein. Ras-

Onkoproteine, welche unter anderem auch eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren spielen, werden in HepG2-Zellen überexprimiert (Zhou et al., 2003). Die HIF-1 α -Stabilisierung in Normoxie kann in embryonalen HIF-1 α -Knockout-Mäusefibroblasten durch eine Kotransfektion mit HIF-1 α und den Onkogenen Ras, v-Src und Akt vermittelt werden, wobei Ras und v-Src die HIF-1 α -Prolylhydroxylase hemmen (Chan et al., 2002). Die Überproduktion von Ras-Onkoproteinen in HepG2-Zellen führt somit zu einer Hemmung der HPH und damit zu einer Stabilisierung von HIF-1 α unter Normoxie.

Zusätzlich von uns durchgeführte immunhistochemische Markierungen zeigten, dass sich HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen in HepG2-Zellen vor allem im Zytoplasma nachweisen lässt, während es unter Hypoxie in großen Mengen vor allem im Kern zu finden ist.

Während unserer Versuche zeigte sich, dass HIF-1 α in allen Versuchsansätzen mit DMEM+Z auch unter 37°C Normoxie in großen Mengen stabilisiert wird. In den Ansätzen mit den Organkonservierungslösungen findet sich dagegen kaum eine Stabilisierung unter 37°C Normoxie.

4.3 Gründe für die signifikant höhere HIF-1 α -Stabilisierung in DMEM+Z

In den Versuchsansätzen mit DMEM+Z bei 37°C findet in Hypoxie in 100% der Versuche eine deutliche Stabilisierung von HIF-1 α statt. In den Organkonservierungslösungen ist die Stabilisierung signifikant niedriger. Gleichzeitig gibt es in DMEM+Z nur nach einer 6-stündigen Inkubation einen signifikanten Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie (37°C), bei längeren Inkubationen findet man keine signifikanten Unterschiede mehr. In den Organkonservierungslösungen dagegen wird in Hypoxie (37°C) mit einer Ausnahme (HTK, 24 Stunden) in Hypoxie immer signifikant mehr HIF-1 α stabilisiert als in Normoxie.

Im Vergleich mit den Organkonservierungslösungen enthält das Kulturmedium DMEM+Z also Inhaltsstoffe, die die HIF-1 α -Stabilisierung fördern. Fetales Kälberserum (FCS), welches in einer Konzentration von 10% dem Medium zugesetzt wurde, enthält eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren. Viele Wachstumsfaktoren, wie IGF-1, IGF-2, EGF (endothelial growth factor), FGF-2 (fibroblast growth factor-2), PDGF (platelet derived growth factor) und auch HGF (hepatocyte growth factor), beeinflussen bekanntermaßen die HIF-1 α -Stabilisierung in Normoxie (Wenger, 2002). Tacchini et al. zeigten 1999 und 2001, dass in normoxischen, subkonfluenten HepG2-Zellen, welche in Medium mit 1% FCS kultiviert wurden, HIF-1 nicht

nachweisbar ist (Tacchini et al., 2001). FCS bzw. seine Inhaltsstoffe scheinen also die HIF-1 α -Stabilisierung positiv zu beeinflussen.

Wie bereits erwähnt, kam es sowohl unter Normoxie als auch in geringerem Maße in Hypoxie in den Versuchsansätzen mit DMEM+Z bei 37°C zu einer weiteren Zellproliferation. Während die Zelldichte in den Ansätzen mit den Organkonservierungslösungen nicht sichtbar zunahm, wuchsen die Zellen in den DMEM+Z-Ansätzen vor allem bei längeren Inkubationszeiten zu vollständiger Konfluenz und gelegentlich sogar mehrlagig. Bei mehrlagigem Wachstum ist davon auszugehen, dass auch in Normoxie nicht mehr alle Zellen ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden und somit nach 24 Stunden Inkubation eine nicht geringe Anzahl von Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt war. Obwohl es unter 37°C Normoxie keinen statistisch signifikanten Unterschied in der HIF-1 α -Stabilisierung zwischen den einzelnen Inkubationszeiten gibt, so zeigt sich doch ein Trend zur zeitabhängigen HIF-1 α Zunahme, was sich mit dem mehrlagigem Wachstum der Zellen erklären lässt. Während die HIF-1 α -Stabilisierung nach 6 Stunden unter 37°C Normoxie 71 % (Median) beträgt, so liegt sie nach 12 Stunden bei 91 % (Median) und nach 24 Stunden bei 108 % (Median). Versuche von Sheta et al. zeigen, dass einerseits die perizelluläre Hypoxie abhängig von der Zelldichte ist, und andererseits parakrine Zellinteraktionen die Translokation von HIF-1 α in den Kern induzieren können (Sheta et al., 2001). Die HepG2-Zellen proliferierten jedoch nur in den Ansätzen mit DMEM+Z stark. In den Ansätzen mit den Organkonservierungslösungen kam es unter allen Versuchsbedingungen zu einem deutlich geringeren Wachstum. Um vergleichbare Versuchsansätze zu haben, mussten wir daher alle Versuche mit subkonfluent gewachsenen HepG2 starten, da wir sonst aus den Ansätzen mit den Organkonservierungslösungen nicht genügend Material für die Westernblotanalyse gewonnen hätten.

Als Basis für unser Zellkulturmedium wurde DMEM high Glucose (25 mM Glukose) von PAA verwendet. Lu et al. haben in ihren Versuchen mit diversen Zelllinien beobachtet, dass die basale HIF-1 α -Menge in denjenigen Tumorzellen am höchsten war, die in Medium mit einer hohen Glukosekonzentration gezüchtet wurden. Versuche mit U251 (humane Glioblastomazellen) haben die Abhängigkeit der basalen HIF-1 α -Menge von der Höhe der Glukosekonzentration im Medium gezeigt (Lu et al., 2005). Eine höhere Glukosekonzentration korreliert mit einem erhöhten Angebot an Energie für die Zelle, sie ermöglicht der Zelle eine Erhöhung ihrer Stoffwechselaktivität. Die Erhöhung der HIF-1 α -Menge in glukosereichen Medium ist vermutlich sowohl auf diese Erhöhung der Stoffwechselaktivität als auch auf einen möglichen Einfluss von Glukosemetaboliten auf die

Stabilisierung von HIF-1 α zurückzuführen. Lu et al. haben gezeigt, dass die Glukosemetabolite Pyruvat und Oxalacetat die HIF-1 α -Stabilisierung erhöhen (Lu et al., 2005).

Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, haben wir unserem Zellkulturmedium 0,1 % Pyruvat zugesetzt. Pyruvat ist das Stoffwechselendprodukt der aeroben Glykolyse. Normalerweise wird es in der Zelle in die Mitochondrien transportiert und wird dort unter Energiegewinn im Zitratzyklus metabolisiert. Lu et al. wiesen in mehreren humanen Krebszelllinien nach, dass bereits 100 μ M Pyruvat die HIF-1 α -Stabilisierung nach 8 Stunden Inkubation unter normoxischen Zellkulturbedingungen induzieren können. Zusätzlich induziert Pyruvat auch die Hypoxie-unabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1. Sowohl die durch Pyruvat induzierte HIF-1 α -Stabilisierung als auch die Aktivierung von HIF-1 sind dabei durch die Zugabe von Ascorbat reversibel. Lu et al. wiesen nach, dass Pyruvat (und ebenso Oxalacetat) direkt mit dem aktiven Zentrum der HIF-Prolylhydroxylase (HPH) interagieren und diese Reaktion durch Ascorbat reversibel ist. Pyruvat bindet an die α -Ketosäure-Bindungsstelle der HPH und hemmt diese kompetitiv (Lu et al., 2005). Die Zugabe von 10 mM Pyruvat zu DMEM erhöhte die HIF-1 α -Stabilisierung in den Versuchen von Lu et al. exzessiv, somit ist davon auszugehen, dass auch in unseren Versuchen der Zusatz von Pyruvat zu DMEM die HIF-1 α -Stabilisierung beeinflusste.

4.4 Einsatz von UW-Lösung ohne Zusatz von Dexamethason, Insulin und Penicillin

Laut Hersteller sollen der UW-Lösung (pro 500 ml) vor Gebrauch als Organkonservierungslösung folgende Inhaltsstoffe hinzugefügt werden:

1. Penicillin G 200.000 IE
2. Normalinsulin 40 IE
3. Dexamethason 16 mg

In der Literatur wird die Verwendung der UW sowohl mit (Mohara et al., 1999; Ohwada et al., 2002) als auch ohne Zusätze (Audet et al., 2001; Mitchell et al., 1996; Michel et al., 2000; Wildhirt et al., 2000; Moutebarrik et al., 1998) beschrieben. Ohwada et al. und Mohara et al. haben auf den Zusatz von Penicillin verzichtet (Mohara et al., 1999; Ohwada et al., 2002). Von anderen Arbeitsgruppen wurden die Zusätze in von den aktuellen Herstellerangaben abweichenden Konzentrationen zugesetzt (Blankensteijn und Tepstra, 1991; Abrahamse et al.,

2002). In einigen Fällen gab es in den Veröffentlichungen auch widersprüchliche Angaben über die Verwendung oder Auslassung der Zusätze (Faenza et al., 2001).

Für unsere Versuche wurde die UW-Lösung ohne den Zusatz der oben genannten Inhaltsstoffe verwendet. Da die Lösung steril aufbewahrt und nur unter sterilen Bedingungen auf die Zellen gegeben wurde und die Versuche für maximal 24 Stunden dauerten, wurde auf die Verwendung von Penicillin G verzichtet. Mikroskopische Kontrollen zeigten, dass es während der Versuchsdurchführung nie zu einer Kontamination mit Bakterien und Pilzen kam.

Das Zytokin TNF- α hat eine starke proinflammatorische Wirkung und ist im Rahmen eines Ischämie-/Reperfusionsschadens an der Induktion der inflammatorischen Kaskade und dem Anlocken der immunkompetenten Zellen beteiligt. Versuche von Chiang et al. und Yu et al. haben in den 1990er Jahren gezeigt, dass der Zusatz von Dexamethason zu der UW-Lösung zu einer signifikanten Erniedrigung der TNF- α -Konzentration führt und zu besseren Überlebensraten führt (Chiang et al., 1997; Yu et al., 1990). Dexamethason inhibiert die TNF- α Produktion und unterdrückt somit die TNF- α induzierte IL-6 Sekretion in Fibroblasten und HeLa-Zellen. IL-6 und somit auch TNF- α sind essenziell für die Regeneration der Leber nach einer Schädigung (Debonera et al., 2003). Debonera et al. haben 2003 den Einfluss einer Dexamethasonbehandlung auf die Regenerationskapazität der Leber nach Transplantation bei Ratten untersucht. Dabei zeigte sich, dass Tiere, die mit Dexamethason behandelt wurden, in den transplantierten Lebern eine deutlich höhere Nekroserate aufwiesen als unbehandelte Tiere (Debonera et al., 2003).

Die Gabe von Dexamethason im Rahmen einer Transplantation stellt einen Eingriff in das Immunsystem dar. Die letztendlichen Auswirkungen einerseits auf das Transplantat und auch systemisch auf den Empfänger müssen getrennt betrachtet werden, da Glukokortikoide vielfältige Wirkungen haben. Da es sich bei unseren Versuchen um ein Zellkulturmodell handelte und somit der Einfluss des Immunsystems auf den Verlauf der Versuche ausgeschlossen war, wurde auf die Zugabe von Dexamethason verzichtet.

Auch auf den Zusatz von 40 IE Normalinsulin haben wir verzichtet.

Jamieson et al. waren 1988 die Ersten, die der UW-Lösung versuchsweise Insulin zusetzten. Belzer und Southard setzten Insulin zu, da sie sich einen vorteilhaften Effekt auf Transplantatherzen versprachen. Das Insulin soll die Glykolyse und damit die Energieproduktion stimulieren (Li et al., 2003).

Welchen Einfluss Insulin auf Lebertransplantate hat, wurde damals nicht untersucht.

Versuche von Yu et al. zeigten jedoch bereits 1990, dass die Überlebensrate von Ratten nach Lebertransplantation, der eine Phase von 9stündiger Präservierung vorausging, dann deutlich vermindert war, wenn die Transplantate in UW mit dem Zusatz von Insulin aufbewahrt wurden. Wurden die Transplantate dagegen in UW ohne den Zusatz von Insulin aufbewahrt, waren die Überlebensraten wesentlich höher (Yu et al., 1990).

Li et al. wiederholten 2003 die Versuche von Yu und kamen zu dem Ergebnis, dass die Aufbewahrung von Transplantatlebern in UW mit dem Zusatz von Insulin vor allem bei längeren Präservationszeiten zu deutlich sichtbaren Ischämie- und Reperfusionsschäden führt. Entsprechend waren die Überlebensraten der Ratten, deren Transplantate in UW mit Insulin aufbewahrt wurden, im Vergleich zu der Gruppe, in der UW ohne Insulin verwendet wurde, deutlich niedriger (Li et al., 2003). Versuche der Arbeitsgruppe um Li zeigten 2004, dass Insulin nur in den ersten 3 Stunden der Präservierung den ATP-Gehalt der Zelle erhöht, danach aber den ATP-Verlust beschleunigt. Zellen von Transplantatlebern, die in UW mit Insulin aufbewahrt werden, haben somit erniedrigte Energiegehalte und damit auch weniger Reserven für die Regeneration nach der Ischämie und Reperfusion (Li et al. 2004).

4.5 Ursachen der fehlenden HIF-1 α -Stabilisierung bei 4°C

Eine Möglichkeit, Zellen in Organtransplantaten vor Schäden durch Hypoxie zu bewahren, ist die Lagerung in einer 4°C kalten Lösung. Durch die Reduktion der Temperatur werden die Stoffwechselvorgänge der Zelle auf ein Minimum reduziert und somit wird auch deutlich weniger Energie in Form von ATP verbraucht (Blankensteijn und Trepstra, 1991). Nur so ist der Transport von Organen über weite Strecken möglich. Die kalte Ischämiezeit beträgt für in Europa über Eurotransplant transplantierte Lebern im Median 9 Stunden (Schemmer et al., 2005).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass HIF-1 α sowohl bei 4°C Normoxie als auch bei 4°C Hypoxie kaum nachweisbar ist. Für den fehlenden Nachweis von HIF-1 α gibt es grundsätzlich zwei Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits könnte der Abbau beschleunigt werden, andererseits kann die Synthese versiegen. Da der Abbau von HIF-1 α bereits unter Normoxie und 37°C sehr schnell erfolgt, ist eher anzunehmen, dass bei 4°C die Synthese von HIF-1 α vermindert wird.

Der (Energie-)Stoffwechsel der Zelle läuft bei 4°C deutlich langsamer ab als bei 37°C. Der Zelle steht daher nicht mehr so viel Energie zur Verfügung. Die Proteinsynthese und der Transport von Ionen über die Zellmembran durch ATPasen sind die Prozesse in der Zelle,

welche unter Standardbedingungen am meisten Energie verbrauchen (Boutillier, 2001). Da die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und die Aufrechterhaltung des Ca^{2+} -Haushaltes essenzielle für das Überleben der Zelle notwendige Prozesse sind, müssen sie möglichst lange aufrecht erhalten werden. Die Protein- und DNA-Synthese als Vorgänge mit niedrigerer Priorität werden daher unter Bedingungen, die den Stoffwechsel verlangsamen, als erstes eingeschränkt. Dies ermöglicht es der Zelle, Energie in Form von ATP zu sparen und diese für die Aufrechterhaltung der primär lebensnotwendigen Funktionen zu verwenden (Boutillier, 2001). Bei 4°C sinkt die Proteinsynthese-Rate in Hepatozyten innerhalb von 4 Stunden um 26% und beträgt nach 24 Stunden nur noch 49% der Syntheserate bei 37°C (Vreugdenhil et al., 1999). Somit ist vermutlich auch die HIF-1 α -Syntheserate bei 4°C bereits nach 6 Stunden deutlich vermindert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die HIF-1 α -Stabilisierung bereits nach 6 Stunden Inkubation unter Normoxie oder Hypoxie im Median 0 % beträgt.

Janßen et al. haben in einem Transplantationsmodel mit primären Hepatozyten nachgewiesen, dass der Energiegehalt in Form von ATP abhängig von der Zeit in den in Organkonservierungslösungen aufbewahrten Zellen deutlich absinkt (Janßen et al., 2003).

Zu Beginn der Versuchsansätze war in den HepG2-Zellen immer eine nachweisbare Menge an HIF-1 α vorhanden, da sie HIF-1 α bereits unter Zellkulturbedingungen (37°C, Normoxie) stabilisieren. Bei Start des Versuchs unter 4°C Normoxie wird das bei Versuchsbeginn vorhandene HIF-1 α über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut, bis die Zellen die Versuchstemperatur von 4°C erreicht haben, während gleichzeitig kaum noch bzw. gar kein HIF-1 α mehr nachproduziert wird. In unserer Versuchsanordnung wurden die verwendeten Lösungen erst mit Versuchsbeginn hypoxisch begast. Somit waren die HepG2-Zellen nicht direkt von Versuchsbeginn an hypoxisch, daher ist anzunehmen, dass das vorhandene HIF-1 α auch in den Ansätzen bei 4°C und Hypoxie zu Beginn des Versuchs abgebaut wurde.

Effekte der HIF-1 α -Stabilisierung spielen im Rahmen der Organtransplantation daher wahrscheinlich nur in den Phasen der warmen Ischämie und der Reperfusion eine Rolle und nicht in der Transportphase des Transplantats. In der Transportphase hat das Transplantat die Transporttemperatur von 4°C erreicht. Wir haben bei unseren Versuchen nachgewiesen, dass HIF-1 α bereits nach 6 Stunden Inkubation bei 4°C im Westernblot nicht mehr nachweisbar ist. Während einer Organtransplantation sind die Organe neben warmer Ischämie (Pringle-Manöver) auch kalter Ischämie (Transport) ausgesetzt. Während der Ischämiezeit wird, abhängig von der Länge der Ischämie, ein Zellschaden gesetzt. Der vorhandene Zellschaden wird durch die nachfolgende Reperfusion vervielfacht, und zwar vor allem deshalb, weil erst

die Reperfusion zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt (Carden und Granger, 2000).

Bei Hypoxie unter niedrigen Temperaturen hält die Zelle sozusagen „Winterschlaf“. Es finden kaum bis gar keine energieverbrauchenden Prozesse und damit kaum bis keine Proteinsynthese und kaum bis keine Transportvorgänge statt. Erst mit Erwärmung der Zellen können die Zellen auf die vorangegangene Schädigung (durch Energieverlust, Membranschäden, etc.) reagieren. Im Rahmen einer Organtransplantation müsste die als erstes stattfindende warme Ischämie im Sinne des Pringle-Manövers zu einer vermehrten Stabilisierung von HIF-1 α führen. Bei der folgenden Abkühlung des Transplantats auf 4°C wird das vorhandene HIF-1 α vermutlich abgebaut, gleichzeitig wird die Proteinsynthese eingestellt. Erst im Rahmen der Reperfusion dürfte sich erneut eine, auch durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren getriggerte, erhöhte Stabilisierung von HIF-1 α nachweisen lassen. Lario et al. haben Hinweise gefunden, dass es in den Tagen nach einer Nierentransplantation zu einer erhöhten HIF-1 α -Stabilisierung und am 5. Tag nach der Transplantation auch zu einer Erhöhung der mRNA von HIF-1 α kommt. Welchen Effekt dies auf das Transplantat hat, muss allerdings noch untersucht werden (Lario et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe um Keränen zeigte 2006 in einem Modell mit ischämischen (nicht-transplantierten) Rattenherzen, dass Ischämie von bis zu 4 Stunden mit nachfolgender Reperfusion zu keiner Veränderung der mRNA-Menge von HIF-1 führt. Immunhistochemisch wiesen Keränen et al. in kalter Ischämie eine Zunahme der Intensität der HIF-1 α -Markierung im Kern nach, was im Gegensatz zu unseren Ergebnissen steht (Keränen et al., 2006). Die Autoren beschreiben leider nicht genau welche Temperatur sie als „kalte Ischämie“ bezeichnen und in welcher Zeit diese erreicht wurde.

Korrespondierend zu unseren Ergebnissen zeigen Keränen et al., dass kalte Ischämie mit folgender Reperfusion zu einer deutlich höheren Intensität der HIF-1 α -Markierung führt. Diese nimmt in den Stunden nach der Reperfusion wieder ab. In transplantierten Rattenherzen, die eine akute bzw. chronische Allograftabstoßung zeigten, nahm die Intensität der HIF-1 α -Immunreaktivität wieder deutlich zu (Keränen et al., 2006).

4.6 Einfluss der Zitratzyklusmetabolite Succinat, Fumarat und Malat auf die HIF-1 α -Stabilisierung

Ausgangspunkt für diese Arbeit sind zwei Veröffentlichungen aus den 1980er Jahren. Ende der 1980er Jahre versuchte die Arbeitsgruppe um Grieshaber, Wiesner, Rösen und Hohl den

Stoffwechsel ischämischer Rattenherzen bzw. Rattenkardiomyozyten durch die Zugabe von α -Ketoglutarat, Malat und Fumarat zu beeinflussen.

Hohl et al. perfundierten isolierte Rattenherzen mit α -Ketoglutarat und Malat. Während die Zugabe der beiden Zitratzyklusmetabolite unter normoxischen Bedingungen nur zu einer leichten Zunahme der Succinatbildung führte, so erhöhte sich die Succinatbildung unter hypoxischen Bedingungen um das 14-fache. Die anaerobe Succinatbildung lässt sich dabei durch die Zugabe von Rotenon, jedoch nicht mit Natrium-Cyanid oder Antimycin A inhibieren (Hohl et al., 1987). Rotenon, ein Flavoid, hemmt spezifisch den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Antimycin A, ein Fungizid, blockiert im Komplex III den Elektronentransport von Cytochrom b auf Cytochrom c (Kovacic et al., 2005). Cyanid-Ionen blockieren Cytochrom c, das Substrat von Komplex IV (Bell et al., 2005). Da die Blockierung von Komplex I die anaerobe Succinatbildung verhinderte, vermuteten Hohl et al., dass Komplex II der Atmungskette (Succinatdehydrogenase) unter anaeroben Bedingungen als Fumaratreduktase fungiert, welche die dafür benötigten Elektronen über den Ubiquinonpool von Komplex I erhält.

Obwohl α -Ketoglutarat normalerweise im Zitratzyklus über Succinyl-CoA zu Succinat abgebaut wird, zeigten Hohl et al. in Tracer-Versuchen, dass α -Ketoglutarat in hypoxischen Rattenkardiomyozyten nicht direkt zu Succinat abgebaut wird, sondern den Transfer von Reduktionsäquivalenten in die Mitochondrien und damit indirekt die Erhöhung der Succinatkonzentration stimuliert (Hohl et al., 1987). Die Tracer-Versuche zeigten jedoch, dass Malat unter hypoxischen Bedingungen als direkter Vorläufer von Succinat dienen kann und im Gemisch mit α -Ketoglutarat zu 69 % für die beobachtete Erhöhung der Succinatbildung verantwortlich ist. Unter hypoxischen Bedingungen wird Malat zu Fumarat dehydriert, welches durch eine reverslaufende Succinatdehydrogenase (SDH) zu Succinat reduziert wird (Hohl et al., 1987). Die Reduktion von Fumarat zu Succinat ist dabei unter Gewinn von ATP an die Oxidation von NADH zu NAD durch Komplex I gekoppelt. Unter hypoxischen Bedingungen existiert in Kardiomyozyten durch die SDH, welche in diesem Fall als Fumaratreduktase dient, somit eine signifikante Bildung von Succinat aus Malat. α -Ketoglutarat stimuliert diese Synthese, indem es den Transport von Reduktionsäquivalenten in die Mitochondrien induziert und vor allem den Fluss des Malat-Aspartat-Shuttle aufrechterhält. Das durch diesen Vorgang gewonnene ATP hat dabei jedoch keinen Einfluss auf den Gesamtenergiegehalt der Kardiomyozyten (Hohl et al., 1987).

Versuche von Wiesner et al. an isolierten Rattenherzen führten zu ähnlichen Ergebnissen. Während unter Normoxie trotz Zugabe der Zitratzyklusmetabolite α -Ketoglutarat, Malat und

Fumarat kaum Succinat freigesetzt wurde, wiesen die Rattenherzen unter Hypoxie eine erhöhte Succinatfreisetzung auf, welche nach Zugabe der Zitratzyklusmetaboliten nochmals signifikant erhöht war (Wiesner et al., 1988).

Der von Hohl et al. entdeckte Mechanismus, dass die SDH unter hypoxischen Bedingungen als Fumaratreduktase dienen kann, erklärt zugleich, warum die Zugabe von Fumarat in isolierten Rattenherzen durch die Arbeitsgruppe um Wiesner zu einer erhöhten Succinatkonzentration führte.

Während Hohl et al. in isolierten Kardiomyozyten aus adulten Ratten keinen vorteilhaften Effekt einer erhöhten Succinatbildung in Form einer ansteigenden ATP-Konzentration oder einer verbesserten Membranintegrität nachweisen konnten (Hohl et al., 1987), zeigte die Arbeitsgruppe um Wiesner, dass isolierte Rattenherzen unter Hypoxie von einer Erhöhung der Succinatbildung durch eine Verbesserung der kardialen Performance profitieren (Wiesner et al., 1988). Hypoxische Rattenherzen, die mit einer Mischung aus je 5 mM α -Ketoglutarat, Malat und Fumarat perfundiert wurden, wiesen höhere enddiastolische Drücke und damit eine höhere Kontraktilität auf als die hypoxische Kontrollgruppe. Gleichzeitig führte die Perfusion der Rattenherzen mit den Zitratzyklusmetaboliten zu einer Erhöhung des ATP-Gehaltes im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die erhöhte Succinatbildung scheint somit über eine Erhöhung der Gesamtenergie in den Rattenherzen kardioprotektiv zu wirken. Wiesner et al. führten die kardioprotektiven Effekte der zugesetzten Zitratzyklusmetabolite, wie eine Erhöhung des linksventrikulären Drucks bzw. des enddiastolischen Drucks und eine Verkürzung der posthypoxischen Erholungszeit, auf eine Verbesserung des zytosolischen Redoxstatus und damit der Ermöglichung einer effizienteren Glykolyse zurück (Wiesner et al., 1988).

Zusammengefasst führte die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite α -Ketoglutarat, Malat und Fumarat in dem gemessenen Zeitraum von maximal 50 Minuten unter Hypoxie zu einer erhöhten Succinatbildung. Die erhöhte Succinatbildung wirkte sich protektiv auf die von Wiesner et al. verwendeten ischämischen Rattenherzen aus.

Die HIF-1 α -Prolylhydroxylase gehört zu den Sauerstoff- und α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Wenger, 2002). Die Hydroxylierung von HIF-1 α wird dabei von der oxidativen Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinat begleitet (Schofield und Ratcliffe, 2004). α -Ketoglutarat wird im Zitratzyklus durch eine irreversible Reaktion unter Gewinn von NADH₂ zu Succinyl-CoA verstoffwechselt. Succinat, welches im Zitratzyklus

von der SDH, dem Komplex II der Atmungskette, zu Fumarat verstoffwechselt wird, ist in der Lage, die α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen Prokollagen-Prolylhydroxylase und Thymin-7-Hydroxylase zu inhibieren (Selak et al., 2005). Unsere Arbeitsgruppe vermutete, dass die Zugabe von Succinat zu einer Produkthemmung der HIF-1 α -Prolylhydroxylase führt und damit zu erhöhten HIF-1 α -Konzentration führen würde.

Im Gegenzug müsste der Zusatz von α -Ketoglutarat somit zu einer Verringerung der HIF-1 α -Konzentration in der Zelle führen, da eine erhöhte α -Ketoglutarat-Konzentration zu einer vermehrten Prolylhydroxylierung und damit zu einem vermehrten Abbau von HIF-1 α führt. Tatsächlich wies die Arbeitsgruppe um Matsumoto und Yamamoto 2006 an einem Zellkulturmodell mit He3B-Zellen nach, dass die HIF-1 α -Stabilisierung durch den Zusatz von α -Ketoglutarat konzentrationsabhängig abnimmt (Matsumoto et al. 2006).

Malat wird im Rahmen des Zitratzyklus durch das Enzym Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat abgebaut. Oxalacetat ist ein kompetitiver Hemmstoff der SDH und kann so die Konzentration von Succinat durch Hemmung seines Abbaus erhöhen (Karlson et al., 1994). Hohl et al. wiesen 1987 in Tracer-Versuchen mit Kardiomyozyten von adulten Ratten nach, dass Malat unter hypoxischen Bedingungen auch als Vorläufer von Succinat dienen kann, indem es zu Fumarat dehydriert wird (Hohl et al., 1987).

Unter normalen, d.h. normoxischen, Bedingungen wird Succinat durch das Enzym Succinatdehydrogenase primär zu Fumarat oxidiert. Die Oxidation von Succinat zu Fumarat ist grundsätzlich eine reversible Reaktion, jedoch lässt sich die Reduktion von Fumarat zu Succinat unter aeroben Bedingungen kaum nachweisen (Brière et al., 2005a). Unter hypoxischen Bedingungen dagegen reduziert die SDH signifikante Mengen von Fumarat zu Succinat (Hohl et al., 1987). Sowohl Zugabe von Malat als auch von Fumarat kann unter hypoxischen Bedingungen also eine Erhöhung der Succinatbildung zu Folge haben.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und Succinat zu den Organkonservierungslösungen HTK, UW und Celsior keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Stabilisierung von HIF-1 α in HepG2-Zellen hat.

Betrachtet man jedoch die nach 6 Stunden Inkubation in HTK ermittelten Werte genauer, so zeigt sich ein Trend, dass die HIF-1 α -Menge durch den Zusatz der Zitratzyklusmetabolite in HTK zunimmt. Während die HIF-1 α -Stabilisierung in HTK ohne Zusätze im Median bei 38 % liegt, so erhöht sie sich durch Zusatz von Malat auf im Median 84 %, durch den Zusatz von Fumarat auf im Median 90 % und durch den Zusatz von Succinat auf im Median 61 %.

Bei der 6-stündigen Inkubation gibt es zwischen UW (Median 33 %) und UW mit 15 mM Succinat (Median 11 %) keinen signifikanten Unterschied, es liegt allerdings ein Trend ($p = 0,078$) zu einer eher niedrigeren HIF-1 α -Stabilisierung bei Zusatz von Succinat vor. Ein ähnlichen Trend findet man nach einer Inkubation über 24 Stunden in den Versuchsansätzen mit Celsior. Die HIF-1 α -Stabilisierung liegt in Celsior plus dem Zusatz von 15 mM Succinat nach 24 Stunden Inkubation im Median bei 11 % und damit niedriger als in Celsior ohne Zusätze (Median 33 %). Aufgrund der großen Streubreite der Werte besteht auch hier kein signifikanter Unterschied. Der Zusatz von Fumarat zu Celsior erhöht dagegen die HIF-1 α -Stabilisierung im Median auf 66 %. Die drei Organkonservierungslösungen haben alle eine unterschiedliche Zusammensetzung. Möglicherweise interagieren einzelne Inhaltsstoffe mit den zugegebenen Zitratzyklusmetaboliten. Dies würde die unterschiedlichen Trends der Effekte auf die HIF-1 α -Stabilisierung erklären.

Lu et al. konnten 2005 zwar einen Einfluss der α -Ketosäuren Pyruvat und Oxalacetat auf die HIF-1 α -Stabilisierung, aber keinen Einfluss durch andere Zitratzyklusmetabolite wie Fumarat und Succinat, nachweisen. Lu et al. führten ihre Versuche in Normoxie durch und haben Inkubationszeiten von 4 und 24 Stunden verwendet. Neben diversen humanen (U87, U251, U251-HRE, U373) und Ratten- (C6 ODD-GFP) Gliomazelllinien wurden eine humane Prostatazelllinie (DU145) und zwei humane Oropharyngealkarzinom-Zelllinien (O22, 22B) verwendet. Succinat und Fumarat wurden in der Konzentration von 2–3 mM eingesetzt. In einigen Versuchen wurden die Zellen vorher mit 5 μ M Digitonin permeabilisiert (Lu et al., 2005).

Im Gegensatz zu unseren Versuchen wurden die Zusätze Succinat und Fumarat von der Arbeitsgruppe um Lu nur in Normoxie zu den Versuchsansätzen gegeben. Eigene Versuche in Normoxie bei 37°C zeigen, dass die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite in einer Konzentration von 15 mM zu keiner HIF-1 α -Stabilisierung führt (Abbildung 12).

Die Arbeitsgruppe um Selak et al. wies nach, dass Succinat die HPH in vitro in einer dosisabhängigen Weise hemmt (Selak et al., 2005). Zusätzlich wies die Arbeitsgruppe nach, dass Succinat die HIF-1 α -Stabilisierung erhöhen kann und HIF-1 α vermehrt in den Kern translozierte. Dazu inkubierten sie Zellen für 48 Stunden mit dem membrandurchgängigen Dimethylester-Succinat-Derivat DMS in einer Konzentration von 20 mM unter normoxischen Bedingungen. Näheres zu der Aufnahme, Konversion zu Succinat und den Metabolismus von DMS ist zur Zeit jedoch noch nicht bekannt (Selak et al., 2005). In unseren Ergebnissen hatte die Zugabe von Succinat weder unter Normoxie, noch unter Hypoxie einen statistisch signifikanten Einfluss auf die HIF-1 α -Stabilisierung (in den drei

Organkonservierungslösungen). In dem o.g. Artikel der Arbeitsgruppe um Selak und Gottlieb finden sich leider keine Hinweise auf eine statistische Auswertung der gewonnenen Westernblots und immunhistochemischen Markierungen.

Auch andere Arbeitsgruppen scheinen durch die Untersuchung mit inhibierten oder mutierten SDH-Untereinheiten einen Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der Succinatkonzentration und einer vermehrten HIF-1 α -Stabilisierung nachgewiesen zu haben.

Die Arbeitsgruppen um Pollard und um Brière wiesen 2005 nach, dass sich in Zellen mit mutierten SDH-Untereinheiten (Untereinheit A bei Pollard und Untereinheit B bei Brière) und damit partiellen Defekten der SDH sowohl eine erhöhte Succinatkonzentration als auch eine signifikant erhöhte Stabilisierung von HIF-1 α finden lässt (Pollard et al., 2005; Brière et al., 2005b).

Isaacs et al. stellten bei Untersuchungen an Patienten mit biallelischem Verlust der Fumarathydratase und dem dominanten HLRCC-Syndrom (hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma) fest, dass diese in ihren Tumoren erhöhte HIF-1 und HIF-2 Expression aufweisen (Isaacs et al., 2005).

Obwohl wir in unseren Versuchen keinen statistisch signifikanten Einfluss der Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und Succinat auf die HIF-1 α -Stabilisierung nachweisen konnten, so bieten oben genannte Autoren doch Hinweise, dass es Zusammenhänge zwischen SDH-Defiziten, Succinatakkumulation und HIF-1 α -Stabilisierung gibt. Möglicherweise haben die Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und Succinat wie von Wiesner et al. vermutet auch einen direkten Einfluss auf die Energieverhältnisse der Zelle. Wird es der Zelle durch die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite ermöglicht, effizienter Energie zu gewinnen, so würden sich die Auswirkungen einer möglichen Hypoxie zumindest verzögern. Die in unseren Ergebnissen sichtbaren Trends, die für die verschiedenen Organkonservierungslösungen sehr unterschiedlich ausfallen, lassen sich möglicherweise auch durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Organkonservierungslösungen erklären. So finden sich in der HTK, die die wenigsten Inhaltstoffe hat, die deutlichsten Effekte. Nach Zugabe der Zitratzyklusmetabolite zu den Ansätzen mit HTK nimmt die HIF-1 α -Stabilisierung im Median zu.

Weitere Ursachen für einen abgeschwächten Effekt während unserer Versuche sind neben der Zelllinie, der Konzentration und der Art der verwendeten Metabolite auch Inkubationszeit und Sauerstoffkonzentration. So hat die Arbeitsgruppe um Selak ihre Zellen mit einem speziellen, membrandurchgängigen Succinat inkubiert, dessen Wirkungen und Wechselwirkungen bisher noch nicht bekannt sind (Selak et al., 2005).

Die Zitratzyklusmetabolite α -Ketoglutarat, Malat, Fumarat und Succinat beeinflussen vermutlich auch den Transkriptionsfaktor HIF-1 bzw. dessen hypoxie-regulierte α -Untereinheit (Pollard et al., 2005; Selak et al., 2005; Lu et al., 2005; Brière et al., 2005). HIF-1 ist ein Schlüsselmolekül der hypoxie-induzierten Genantwort und es gibt Hinweise, dass HIF-1 eine adaptive hypoxische Antwort induziert (Seagroves et al., 2001; Cai et al., 2003; Date et al., 2005)

4.7 HIF-1 α und Organtransplantation

Obwohl es weit verbreitet ist, HIF-1 α in Zellkulturmodellen nachzuweisen, gibt es kaum Studien, in denen HIF-1 α im Rahmen eines Organtransplantationsmodells nachgewiesen wurde. Bisher wurde vielfach versucht die einzelnen Funktionen von HIF-1 α bei einem transplantierten Organ auf zellulärer Ebene nachzuweisen. Es gibt jedoch kaum Daten über den Einfluss von HIF-1 α auf Funktion des ganzen Organs und damit über mögliche Zusammenhänge zwischen der Menge der HIF-1 α -Stabilisierung und z.B. der Überlebenszeit des Organs bzw. des Patienten.

Die Arbeitsgruppe um Carla Baan wies 2002 nach, dass die Menge an HIF-1 α mRNA in Nierentransplantaten, welche von lebenden Spendern stammten, deutlich niedriger war als in Nieren, welche von toten Spendern stammten. Bekanntermaßen ist die Transplantation von einer Leichenniere mit einem höheren Risiko für eine Abstoßung bzw. ein Versagen des Transplantats verbunden. Baan et al. sehen in ihren Daten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Länge der Ischämiezeit und der Menge der HIF-1 α mRNA in den Transplantaten. Dabei korrelieren hohe HIF-1 α mRNA-Spiegel mit einer hohen Menge an TGF- β mRNA. TGF- β ist ein Zytokin mit der Fähigkeit, in transplantierten Nieren einen fibrotischen Umbau auszulösen, welcher zu einem Versagen des Transplantats führt. Baan et al. folgern daraus, dass eine Erhöhung der HIF-1 α mRNA-Menge zu einer erhöhten TGF- β -Produktion führt, was wiederum die schlechteren Outcome-Ergebnisse von Nieren aus Leichenspendern erklären würde (Baan et al., 2003). Berger et al. wiesen jedoch 2003 nach, dass TGF- β 1, wie viele andere Wachstumsfaktoren und Zytokine auch, die HIF-1 α -Stabilisierung fördert und nicht umgekehrt (Berger et al., 2003).

Die spanische Arbeitsgruppe um Lario wies 2003 die Expression von HIF-1 α in einem experimentellen Nierentransplantationsmodell an Schweinen nach. Das Ziel der Arbeitsgruppe war es, mögliche Zusammenhänge zwischen Ischämiezeit oder immunsuppressiver Behandlung und HIF-1 α aufzudecken. Es zeigte sich, dass die Expression

von HIF-1 α nicht kurzfristig, sondern erst in den Tagen nach der Transplantation hochreguliert wird. Zu welchem Zeitpunkt es zu einer vermehrten HIF-1 α -Expression kommt, ist nicht genau bekannt, da die Menge an HIF-1 α mRNA nur am Tag der Transplantation und 5 Tage später gemessen wurde. Die Menge der HIF-1 α mRNA verdoppelte sich in allen Versuchsgruppen, unabhängig von der Ischämiezeit und von der immunsuppressiven Behandlung (Lario et al., 2003).

Nach den Ergebnissen von Lario et al. kommt es nach einer Nierentransplantation mit der Verzögerung von einigen Tagen zu einer vermehrten HIF-1 α mRNA-Expression. Diese mRNA-Expression ist im Gegensatz zu den Ergebnissen von Baan et al. unabhängig von der Ischämiezeit. Ob es neben der vermehrten mRNA-Expression auch zu einer Erhöhung der HIF-1 α -Proteinmengen kam, wurde nicht untersucht. Dass die HIF-1 α -Expression unabhängig von einer Immunsuppression und von der Art der Immunsuppression ist, scheint für eine nicht immunologische Ursache der vermehrten Expression zu sprechen. Welchen Einfluss die erhöhte HIF-1 α -Expression auf das Outcome der Transplantate und der Versuchstiere hat, wurde nicht untersucht.

Sowohl die niederländische Arbeitsgruppe um Baan et al. als auch die spanische Arbeitsgruppe um Lario et al. haben die mRNA von HIF-1 α in transplantierten Nieren bestimmt.

Abraham et al. überprüften 2004 die Hypothese, dass HIF-1 die VEGF-gesteuerte Gefäßpermeabilität in Lungentransplantaten reguliert. Bei ihren Untersuchungen zeigte sich, dass, obwohl es in den untersuchten humanen Lungentransplantaten nach einer Ischämiezeit von 5 Stunden ($\pm$ 1 Stunde) im Vergleich zu nicht transplantierten Lungen zu keiner Erhöhung der HIF-1 α mRNA-Menge kam, sich jedoch die HIF-1 α -Proteinmengen deutlich erhöhten (Abraham et al., 2004). Die Messung der mRNA von HIF-1 α ist daher nicht vergleichbar mit der Messung der HIF-1 α -Proteinmenge. Da HIF-1 α auf Proteinebene reguliert wird, scheint es sinnvoller, die HIF-1 α -Stabilisierung zu messen. Es stellt sich die Frage, ob man nur durch die Messung der mRNA überhaupt relevante Aussagen treffen kann. Einen weiteren Hinweis, dass HIF-1 α mRNA und Protein sich unterschiedlich verhalten, lieferte die Arbeitsgruppe um Ning 2006. Ning et al. untersuchten die mRNA-Expression und die Proteinstabilisierung von HIF-1 α in isolierten Rattenherzen. Dabei stellten sie fest, dass nach einer milden Kurzzeit-Hypoxie von 46 Minuten sowohl die mRNA als auch das HIF-1 α Protein nach weiteren 45 Minuten anstiegen. Diese kurze Hypoxieperiode induzierte zugleich die Aktivierung mehrerer HIF-1-Zielgene. Eine Periode unter starker Hypoxie führte dagegen

zu einer Suppression der HIF-1 α -Stabilisierung und der Aktivierung der Zielgene, ebenso wie zu einem Abfall des Energiegehaltes in Form von ATP (Ning et al., 2007).

Die Arbeitsgruppe um Keränen kam Ende 2006 in einem Modell mit Rattenherzen zu einem ganz anderen Ergebnis. Nach ihren Ergebnissen bleibt in kalter und warmer Ischämie die Menge an HIF-1 mRNA unverändert, die Intensität einer immunhistochemischen Markierung von HIF-1 α nimmt zeitabhängig zu (Keränen et al., 2006).

Leider geben Keränen et al. nicht an, welche Temperatur sie mit „kalter Ischämie“ meinen und in welchem Zeitraum diese erreicht wurde. Zudem kann man Hypoxie nicht mit Ischämie gleichsetzen. Da Ning et al. bei milder Kurzzeit-Hypoxie zu einem ähnlichen Ergebnis wie Keränen et al. kommen, ist zu vermuten, dass in den Versuchsansätzen von Keränen keine ausgeprägte Hypoxie herrschte.

4.7.1 Betrachtung transplantationsrelevanter Eigenschaften von HIF-1 α

In unseren Versuchen wurden HepG2-Zellen in Organkonservierungslösungen kultiviert und hypoxisch begast, um die Bedingung bei einer Organtransplantation zu simulieren. Daher soll im Folgenden ein Überblick über die Wirkungen und Eigenschaften von HIF-1 α im Rahmen einer Organtransplantation dargestellt werden.

4.7.1.1 Induktion der Hämoxigenase-1 durch HIF-1 α

Die Hämoxigenase-1 (HO-1) ist die induzierbare Isoform der Hämoxigenase, einem Enzym, das Häm zu Biliverdin, CO und freien Eisenionen oxidiert. Biliverdin wird fast augenblicklich durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert, welches anti-oxidative Eigenschaften hat. Die Produkte der HO-1, Bilirubin und Eisen, können die Zelle vor oxidativem Stress und damit auch vor dem Zelltod bewahren (Dawn und Bolli, 2005). Die HO-1 wird durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli induziert. Neben Entzündungsreaktionen, Hypothermie und Strahlung wird die HO-1 auch durch Hypoxie und Ischämie induziert. In verschiedenen Lebertransplantationsmodellen hat sich die vermehrte Expression der HO-1 als protektiv erwiesen, da eine erhöhte Expression der HO-1 den Ischämie/Reperfusionsschaden vermindert. Eine Erhöhung der HO-1-Expression wirkt sich positiv auf die Überlebenszeit und die Funktion der Organs aus (Katori et al., 2002).

Durch Versuche an einem *in vitro* Modell mit HMEC-1-Zellen (human myocardial endothelial cells-1) und einem *in vivo* Modell mit Kaninchen zeigten Ockaili und seine Kollegen, dass die HO-1-Expression durch HIF-1 induziert werden kann. Die Induktion der HO-1-Expression durch HIF-1 führt zu einer Suppression der IL-8-Produktion, damit zu einer

Reduktion der Neutrophilen-Infiltration und letztendlich zu einer Limitierung der Infarktgröße, was zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion des Herzens nach einem Ischämie/Reperfusionsschaden führt (Dawn und Bolli, 2005).

4.7.1.2 HIF-1 α und das Immunsystem

Im Rahmen einer Organtransplantation spielen immunologische Vorgänge eine wichtige Rolle. Erst seit einigen Jahren ist bekannt, dass HIF-1 α auch Einfluss auf das Immunsystem und seine Regulation hat. HIF-1 α erhöht die Expression der COX-2, einem Akut-Phase-Protein, welches die Entzündungsreaktion durch die exzessive Produktion von Prostaglandinen fördert. In Wunden kommt es zu einer erhöhten HIF-1 α -Stabilisierung, was wiederum zu einer vermehrten iNOS und VEGF-Expression führt, welche beide essenziell für die Wundheilung sind (Hellwig-Bürgel et al., 2005).

Viele Zytokine, wie IL-1 β und TNF- α , erhöhen die HIF-1-Aktivität. Dabei erhöht IL-1 β sowohl HIF-1 α -Proteinmengen durch eine Erhöhung der HIF-1 α -Produktion und die Inhibition des pVHL-abhängigen Abbaus von HIF-1 α als auch die HIF-1-DNA-Bindungskapazität in normoxischen HepG2-Zellen. TNF- α dagegen erhöht selektiv die DNA-Bindungskapazität von HIF-1 und hat keinen Einfluss auf die Menge der HIF-1 α -Stabilisierung (Hellwig-Bürgel et al., 2005).

HIF-1 α induziert außerdem die Expression des Glukokortikoidrezeptors und erhöht damit die Empfindlichkeit der Zelle für entzündungshemmende Glukokortikoide (Leonard et al., 2005). Während Kodama et al. 2003 keinen Hinweis für eine inhibitorische Wirkung von Glukokortikoiden auf die HIF-1-regulierte Genexpression fanden (Kodama et al., 2003), zeigen Studien der Arbeitsgruppe um Hellwig-Bürgel, dass Glukokortikoide die HIF-1 α -Stabilisierung erniedrigen und die HIF-1-abhängige Transkriptionsaktivität vermindern (Hellwig-Bürgel et al., 2005).

Die Rolle von HIF-1 α im Rahmen einer immunologischen Reaktion ist somit sehr komplex und in ihren Details noch unbekannt. Dass HIF-1 α in einem transplantierten Organ vermehrt stabilisiert wird, ist dagegen sehr wahrscheinlich, da es im Rahmen jeder Organtransplantation zu hypoxischen bzw. ischämischen Phasen kommt. Zudem wiesen Keränen et al. 2006 nach, dass in kardialen Transplantaten während der akuten und chronischen Abstoßung sowohl erhöhte HIF-1-Proteinmengen als auch eine erhöhte HIF-1 mRNA-Menge nachweisbar sind (Keränen et al., 2006). In den Versuchen der Arbeitsgruppe um Natarajan führte eine erhöhte HIF-Expression in den Kardiomyozyten zu einer signifikant

niedrigeren TNF- α und ICAM-1-Expression und damit zu einer verringerten Immunantwort. Dies wirkte sich protektiv auf die Kardiomyozyten aus (Natarajan et al., 2007).

4.8 Bedeutung der HIF-1 α -Stabilisierung in hypoxischen Zellen

Letztendlich stellt sich jedoch die Frage, ob hohe HIF-1 α -Spiegel sich eher protektiv oder schädigend für eine Zelle auswirken. Im Folgenden soll ein Überblick über den Einfluss von HIF-1 α auf den Stoffwechsel und vor allem das Überleben der Zelle dargestellt werden.

4.8.1 Einfluss der HIF-1 α -Stabilisierung auf den Energiestoffwechsel der Zelle

In aeroben Organismen wird der Hauptteil der intrazellulären Energie über die mitochondrialen Atmungskette gewonnen. Mit Hilfe der vollständigen Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser gewinnt die Zelle Energie in Form von ATP, dem universellen Energieträger der Zelle (Blankensteijn und Trepstra, 1991). 90% des Sauerstoffs, welcher in die Zellen gelangt, wird durch die Atmungskette verbraucht (Kovacic et al., 2005). Unter hypoxischen Bedingungen steht der Zelle nicht mehr genügend Sauerstoff zur Verfügung, um ATP mit Hilfe der mitochondrialen Atmungskette zu gewinnen. Somit kommt es während einer Organtransplantation nach Entnahme des Transplantats aus dem Spender zu einem Stillstand der Atmungskette aufgrund einer Minderversorgung mit Sauerstoff. Die Zelle hat jedoch noch andere Möglichkeiten ATP zu gewinnen. Mit einer „Energieausbeute“ von zwei ATP pro Molekül Glukose ist die anaerobe Glykolyse jedoch nicht effizient genug, um die hohen Energiemengen zu produzieren, die die meisten Zellen zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels benötigen (Kovacic et al., 2005). Das noch vorhandene ATP wird unter Hypoxie verbraucht und der ATP-Mangel führt zu Zellschädigungen durch die Beeinträchtigung von energieabhängigen intrazellulären Vorgängen. Der ATP-Mangel kann daher als Initiator des Zelltodes angesehen werden (Blankensteijn und Trepstra, 1991).

So besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem ATP-Gehalt eines Lebertransplantats und dem Gallenfluss bzw. der Vitalität. Niedrige ATP-Gehalte weisen nach einer Transplantation auf einen schweren Ischämieschaden hin und damit vermutlich auf einen schlechten postoperativen Verlauf (Li et al., 2004).

Organkonservierungslösungen wie UW, HTK und Celsior wurden dafür entwickelt, hypothermie- und hypoxie-induzierte Schäden der Zellen des Transplantats zu verhindern.

Membranundurchgängige Substanzen beugen der Entwicklung von hypothermie-induzierten Zellschwellungen und Ödemen vor, während effektive Puffersysteme die durch

Milchsäureakkumulation hervorgerufene Azidose verhindern bzw. minimieren. Gleichzeitig wird durch Versorgung mit energiereichen Substraten die Regeneration von hochenergetischen Molekülen ermöglicht und damit die schnelle Erniedrigung des ATP-Gehaltes verhindert.

Seagroves et al. zeigten, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 α in Hypoxie essenziell für den sogenannten Pasteur-Effekt, den Wechsel von aerober zu anaerober Energiegewinnung, ist. Gleichzeitig werden die hypoxie-induzierbaren Proteine Phosphofruktokinase-1 (PGK-1), Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Triose-Phosphat-Isomerase (TPI) vermehrt exprimiert. In Zellen, welche kein HIF-1 α herstellen können, sinkt der ATP-Gehalt unter hypoxischen Bedingungen innerhalb von 8-16 Stunden um 50 % (Seagroves et al., 2001).

HIF-1 α ist also essenziell für die hypoxie-induzierte Expression diverser glykolytischer Enzyme sowie des Glukosetransporters GLUT-1, welcher die Aufnahme von Glukose in die Zelle erhöht (Schofield und Ratcliffe, 2004; Semenza, 2007).

Als Resultat der anaeroben Glykolyse kommt es zu einer Anhäufung von Laktat und Wasserstoffionen, was wiederum zu einer Azidose der Zelle führt (Seagroves et al., 2001). Einerseits kann die Azidose zu einer weiteren Schädigung der Zellen führen, indem sie zu einer Induktion der Lysosomenbildung und zu einer Aktivierung der lysosomalen Enzyme führt. Andererseits zeigten Gores et al., dass eine milde Azidose Hepatozyten vor Ischämieschäden bewahren kann (Blankensteijn und Trepstra, 1991).

Zusammengefasst kann man durch die Betrachtung des Einflusses von HIF-1 α auf den Energiestoffwechsel keine eindeutige Aussage treffen, ob sich HIF-1 α positiv oder negativ auf das Überleben der Zelle auswirkt. Im Folgenden werden daher noch andere Aspekte der HIF-1 α -Wirkungen betrachtet.

4.8.2 Die Rolle von HIF-1 α bei der hypoxie-induzierten Apoptose

HIF-1 α kann auf zwei unterschiedliche Arten in Zellen die hypoxie-induzierte Apoptose einleiten. Einerseits kann HIF-1 α die Stabilität von p53 erhöhen. p53 kann über die Regulation von Proteinen wie Bax den programmierten Zelltod initiieren. Andererseits scheint HIF-1 α die Expression von BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3), einem pro-apoptotischen Protein, zu erhöhen. Zellen, die kein HIF-1 exprimieren, weisen deutlich erniedrigte BNIP3 Mengen auf und zeigen auch eine niedrigere Apoptoserate (Greijer und van der Wall, 2004).

HIF-1 α kann aber nicht nur die Apoptose induzieren, sondern hat möglicherweise auch anti-apoptotische Eigenschaften. In einer Pankreaszelllinie mit einer hohen HIF-1 α -Stabilisierung bereits unter Normoxie wiesen die Zellen eine höhere Resistenz gegen die hypoxie-induzierte Apoptose und auch gegen den Abfall der Glukosevorräte auf als vergleichbare Zellen mit niedrigen normoxischen HIF-1 α -Spiegeln (Greijer und van der Wall, 2004).

Grundsätzlich scheint HIF-1 α also einen Einfluss auf die hypoxie-induzierten Apoptose zu haben. Ob hohe HIF-1 α -Mengen sich eher protektiv oder destruktiv auf die Zelle auswirken, scheint eine Zelltyp-spezifische Eigenschaft zu sein.

4.8.3 Die Rolle von HIF-1 α in unterschiedlichen Geweben

HIF-1 α scheint eine Schlüsselkomponente der frühen zellulären Antwort auf Ischämie/Reperfusion im Gehirn zu sein. Die Stabilisierung von HIF-1 α in neuronalen Zellen ist ein sehr früher Marker für Ischämie (Rayner et al., 2006). Rayner et al. zeigten in einem Zellkulturmodell mit einer Neuroblastomzelllinie, dass die exogene Zugabe des neuroprotektiven Proteins Neuroglobulin zu einer Abnahme der HIF-1 α -Spiegel in der Zelle führt. Die Autoren vermuten, dass eine erhöhte HIF-1 α -Stabilisierung in neuronalen Zellen nicht von Vorteil ist, da die kollektive endogene anti-oxidative Antwort auf Ischämie und Reperfusion in neuronalem Gewebe nicht ausreicht, um die Zelle zu schützen. Das bedeutet, dass die HIF-1 α -Stabilisierung zwar zu einer Induktion von anti-oxidativ wirksamen Enzymen wie z.B. der Hämoxigenase führt, dies aber speziell in neuronalem Gewebe nicht ausreicht, um die Zellen effektiv vor einem Schaden durch Ischämie und Reperfusion zu schützen. Je höher die HIF-1 α -Stabilisierung ist, desto höher scheint der ischämische Schaden der neuronalen Zelle zu sein (Rayner et al., 2006). Die HIF-1 α -Stabilisierung ist in neuronalem Gewebe proportionell zu dem Gewebeschaden, den die neuronale Zelle erlitten hat. Dabei wird die erhöhte HIF-1 α -Stabilisierung von den Autoren nicht an sich als schädigend angesehen, sondern die Induktion von protektiven Mechanismen durch HIF-1 α reicht nicht aus, um neuronale Zellen vor Schäden zu bewahren.

Helton et al. zeigten 2005 jedoch, dass in Gehirn-spezifischen HIF-1 α -Knockout-Mäusen der ischämische Schaden im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich geringer ist. Die Abwesenheit HIF-1 α wirkt sich nach einem akuten hypoxisch-ischämischen Insult also neuroprotektiv aus. Beim Vergleich der Genexpression wurden in HIF-1 α -exprimierenden Wildtyp-Mäusen signifikant mehr pro-apoptotischen Gene exprimiert als in den verwendeten HIF-1 α -Knockout-Mäusen. Erstaunlicherweise gab es keine signifikanten Unterschiede in der Expression typisch HIF-1 α -induzierbarer Gene, wie z.B. VEGF. Die Autoren vermuten, dass

in neuronalen Zellen HIF-1 α vor allem pro-apoptotisch wirkt, während die klassisch HIF-1 α -induzierten Gene von anderen hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren wie HIF-2 kontrolliert werden (Helton et al., 2005).

Eines der ersten Gene, welches im Myokard nach einer ischämischen Periode vermehrt exprimiert wird, ist das HIF-1 α Gen. Gleichzeitig wird das HIF-1 α -Protein vermehrt stabilisiert. Lee et al. wiesen in den ersten 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt eine erhöhte HIF-1 α -Expression in humanen Myokardzellen nach, limitiert auf das ischämische Gebiet. Zusätzlich konnten sie das HIF-1 α -Protein immunhistochemisch in ischämischen Myokard- und Endothelzellen nachweisen (Lee et al., 2000).

Die ischämische (durch das kurze Abklemmen von Gefäßen) bzw. hypoxische (durch die Exposition mit sauerstoffarmer Luft) Präkonditionierung führt zu einer protektiven Wirkung bei einem 24 Stunden später stattfindenden Myokardinfarkt. Da dieser Effekt in Mäusen verloren geht, die nur noch ein funktionsfähiges HIF-1 α -Allel besitzen, scheint HIF-1 α eine adaptive posthypoxische Antwort zu induzieren, die sich protektiv auf Myokardzellen auswirkt (Cai et al., 2003). Versuche der Arbeitsgruppe um Date et al. zeigen, dass ein stabiles Hybridmolekül von HIF-1 α , welches nicht von der HPH abgebaut werden kann, Kardiomyozyten von Ratten vor Ischämie/Reperfusionsschäden durch die Induktion verschiedener Gene schützen kann (Date et al., 2005).

In den Versuchen, die von Cai und Semenza durchgeführt wurden, zeigte sich ebenfalls, dass die Präkonditionierung zu einem signifikanten Anstieg von Erythropoetin (EPO) führt. Die Expression von EPO wird bekanntermaßen von HIF-1 induziert. Erhöhte EPO-Spiegel wirken sich nicht nur protektiv auf Myokardzellen aus, in denen die Apoptoserate sinkt und in vermehrtem Maße die zelluläre Funktion wiederhergestellt wird, sondern haben auch eine anti-apoptotische und damit protektive Wirkung auf neuronale Zellen (Cai et al., 2003).

4.9 Vitalitätsmessung mit Hilfe des MTT-Tests

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist ein Monotetrazolium-Salz, welches nach Reduktion einen farbigen, unlöslichen Niederschlag bildet. Der MTT-Test ist ein gängiges Verfahren, um Zellproliferation, Zytotoxizität und Zellvitalität zu messen (Liu et al., 1997). Lange Zeit dachte man, dass MTT nur von den Mitochondrien lebender Zellen reduziert wird. Liu et al. zeigten allerdings bereits 1997, dass es auch Wege der MTT-Reduktion gibt, die unabhängig von den Mitochondrien sind. Auch

Zellen ohne Mitochondrien sind in der Lage MTT zu reduzieren, wenn auch langsamer als Wildtyp-Zellen. Da MTT jedoch nicht die Zellmembran durchdringen kann, sondern aktiv per Endozytose in die Zelle aufgenommen werden muss, ein Prozess, der nur an lebenden Zellen möglich ist, kann der MTT-Test trotzdem als Zellvitalitätstest genutzt werden (Liu et al., 1997). MTT wird hauptsächlich von nichtmitochondrialen Dehydrogenasen reduziert, womit die Reduktion in großem Maße unabhängig von der Succinatkonzentration ist. Somit kann die Rate der MTT-Reduktion nicht mit der Funktionalität der SDH gleichgesetzt werden (Liu, 1999). Mit dem MTT-Test wird die Reduktion von MTT und damit die Reduktionskapazität der Zelle gemessen. Die Reduktionskapazität ist unter anderem von der Stoffwechselaktivität der Zellen abhängig. Im speziellen ist die Zelle für eine adäquate Endozytose und MTT-Reduktion auf ausreichende Mengen an NADH und ATP angewiesen. Die Reduktion von MTT wird unter anderem durch D-Glukose positiv beeinflusst (Liu et al., 1997; Liu, 1999).

4.9.1 Vitalitätsmessung von HepG2-Zellen nach Inkubation in den Organkonservierungslösungen Celsior, HTK und UW

Unter 37°C Normoxie sollten die HepG2-Zellen in ihrem Nährmedium DMEM+Z optimale Bedingungen vorfinden. Tatsächlich ist die MTT-Reduktion der HepG2-Zellen nach 6 und nach 24 Stunden Inkubation unter 37°C Normoxie in den Ansätzen mit DMEM+Z am höchsten.

Sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden wird in den Ansätzen mit HTK und UW signifikant weniger MTT reduziert. Dagegen findet sich nach einer Inkubation über 6 Stunden unter 37°C Normoxie kein signifikanter Unterschied zwischen der MTT-Reduktion in den Ansätzen mit Celsior und den Ansätzen mit DMEM+Z. Nach 24 Stunden Inkubation ist die MTT-Reduktion dann in den Ansätzen mit Celsior gerade signifikant ($p = 0,041$) niedriger als in den Ansätzen mit DMEM+Z. Im Median beträgt die optische Dichte nach 6 Stunden in DMEM+Z 0,35, in Celsior 0,32 und nach 24 Stunden in DMEM+Z 0,44, in Celsior 0,24. Die Organkonservierungslösung Celsior hält daher über 6 Stunden auch unter 37°C HepG2-Zellen vital. Erst nach längeren Inkubationszeiten verringert sich ihre protektive Wirkung. Vergleicht man die Organkonservierungslösungen HTK, UW und Celsior untereinander, so finden sich weder nach 6, noch nach 24 Stunden signifikanten Unterschiede.

Unter 37°C Hypoxie finden sich keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen DMEM+Z und HTK bzw. UW. Dabei liegen die optische Dichte und damit die Vitalität der Zellen im Median in allen Versuchsansätzen ca. 20 % niedriger als unter 37°C Normoxie. Statistisch signifikante Unterschiede lassen sich zwischen Hypoxie und Normoxie nicht nachweisen.

Im Vergleich zu allen verwendeten Lösungen, DMEM+Z, HTK, UW und Celsior, wurde in den Ansätzen mit DMEM+Z und der Zugabe von 100 μM H_2O_2 bei allen Bedingungen signifikant weniger MTT umgesetzt, was die grundsätzliche Funktionsfähigkeit des Tests zeigte. Letztendlich stellt sich jedoch die Frage, ob Vitalität mit der Reduktionskapazität gleichgesetzt werden kann. DMEM+Z oder möglicherweise auch Celsior haben vielleicht eine höhere Reduktionskapazität durch ihre Inhaltsstoffe als HTK und UW.

HTK enthält keine speziellen antioxidativ wirksamen Substanzen, was somit eine niedrigere Reduktionskapazität erklären könnte. Während Celsior nur Glutathion als Antioxidans enthält, enthält UW sogar mehrere Antioxidantien, nämlich Glutathion, Allopurinol und Adenosin. Damit hätte UW eine höhere Reduktionskapazität als Celsior, was sich in unseren Ergebnissen nicht so darstellt. DMEM+Z enthält zur Grundversorgung der Zellen einige potenziell antioxidativ wirksame Vitamine wie Riboflavin und Niacinamid. Wie hoch die Reduktionskapazität ist, läßt sich jedoch aus der Zusammensetzung nicht entnehmen. Wir gehen jedoch davon aus, dass unser MTT-Test tatsächlich die Vitalität gemessen hat. Sonst müssten die Ansätze, die in UW inkubiert wurden, eine deutlich höhere Reduktionskapazität aufweisen als die Ansätze in Celsior und HTK.

Unter 4°C Normoxie und Hypoxie bestehen weder nach 6, noch nach 24 Stunden signifikanten Unterschiede zwischen allen verwendeten Lösungen. Wie bereits erwähnt, wurden die Versuchsansätze mit DMEM+Z bei 4°C Normoxie für die Messung der HIF-1 α -Stabilisierung nicht berücksichtigt, da DMEM mit einem Puffersystem ausgerüstet ist, welches eine Begasung mit 5% CO_2 benötigt. In den Ansätzen verfärbte sich immer das Medium und die Zellen lösten sich vom Boden der Zellkulturflasche, was als Anzeichen für den Zelltod anzusehen ist. Unter 37°C Normoxie stellte die Inkubation in DMEM+Z für die HepG2-Zellen noch einen Vorteil dar, bei 4°C normoxischer Raumluft starben die Zellen vermutlich durch das nicht angemessene Puffersystem.

Janßen et al. führten MTT-Tests an HLEC-Zellen (human liver endothelial cells) und primären humanen Hepatozyten mit den drei Organkonservierungslösungen Celsior, HTK und UW durch. Nach 6 Stunden Inkubation bei 4°C Normoxie in verschlossenen Plastikbeuteln fand die Arbeitsgruppe in den HLEC-Zellen eine signifikant höhere MTT-Reduktion in UW als in Celsior sowie eine signifikant höhere in Celsior als in HTK. Zwischen HTK und UW ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen (Janßen et al., 2004). In den primären Hepatozyten gab es nach 6 Stunden Inkubation bei 4°C Normoxie (in verschlossenen Plastikbeuteln) keinen signifikanten Unterschied zwischen UW und Celsior,

jedoch eine signifikant niedrigere MTT-Reduktion in HTK im Vergleich zu Celsior (Janßen et al., 2003).

Nach 6 Stunden Reperfusion unter Zellkulturbedingungen nach vorausgegangener kalter Normoxie in Plastikbeuteln wies die Arbeitsgruppe um Janßen signifikant höhere MTT-Reduktionsraten in UW als in HTK oder Celsior nach. Gleichzeitig wurde in den Ansätzen mit HTK signifikant weniger MTT reduziert als in den Ansätzen mit Celsior (Janßen et al., 2004). In den Hepatozyten ließ sich kein Unterschied zwischen UW und Celsior, jedoch eine signifikant niedrigere MTT-Reduktion in HTK im Vergleich zu Celsior nachweisen (Janßen et al., 2003).

Im Gegensatz zu den Versuchen von Janßen et al. wurden unsere HepG2-Zellen nach Zugabe von MTT nur für 90 Minuten bzw. 2 Stunden und nicht für 4 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Bekanntermaßen werden Hepatozyten während einer Lebertransplantation vor allem in der Phase der Reperfusion geschädigt (Balaboud et al., 2004; Selzner et al., 2003; Kupiec-Weglinksi und Busuttil, 2005). Somit werden eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den Organkonservierungslösungen möglicherweise erst nach einer längeren Phase der Reperfusion deutlich. Weiterhin zeigen die Versuche von Janßen et al., dass die Ergebnisse der MTT-Tests in den beiden von ihm verwendeten Zellarten nicht zu 100% übereinstimmen. Mit der Zelllinie HepG2 haben wir in unseren Experimenten eine dritte Zellart verwendet, so dass sich alleine damit die gezeigten Unterschiede zu den Ergebnissen von Janßen et al. aus dem Jahr 2003 und 2004 erklären lassen.

4.9.2 Vitalitätsmessung von HepG2-Zellen nach Inkubation in Organkonservierungslösungen mit dem Zusatz von Malat, Fumarat und Succinat

In einer zweiten Versuchsreihe haben wir HepG2-Zellen über 24 Stunden nicht nur in den Organkonservierungslösungen inkubiert, sondern haben diese Inkubation auch mit dem Zusatz der Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und Succinat durchgeführt und anschließend die Vitalität mit dem MTT-Test gemessen.

Unter 37°C Normoxie und Hypoxie beeinflusst die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite den MTT-Umsatz nicht signifikant. Die einzelnen Organkonservierungslösungen verhalten sich nach 24 Stunden Inkubation in 37°C ähnlich wie nach 6 Stunden Inkubation.

Erstaunlicherweise erhöht Succinat und in Einzelfällen auch Fumarat die Vitalität der HepG2-Zellen jedoch unter 4°C Normoxie und Hypoxie, also gerade unter den Bedingungen, die eine kritische Rolle im Rahmen einer Organtransplantation spielen.

Unter 4°C Normoxie erhöht die Zugabe von Succinat in allen drei Organkonservierungslösungen signifikant die MTT-Reduktion. Weiterhin erhöht die Zugabe von Fumarat zu Celsior die MTT-Reduktion. Der Zusatz von Succinat führt im Median in Celsior zu einem 53 %, in HTK zu 21 % und in UW zu einem 29 % höheren Umsatz von MTT. Signifikanter Unterschiede gibt es dabei nach Zusatz von Succinat zwischen den drei Organkonservierungslösungen nicht. Unter 4°C Normoxie profitieren somit alle drei Organkonservierungslösungen von dem Zusatz von Succinat, da es unter der angegebenen Bedingung die Vitalität der HepG2-Zellen erhöht. Celsior würde zudem vom Zusatz von Fumarat profitieren, es erhöht den MTT-Umsatz (Median) um 9 %.

Unter 4°C Hypoxie erhöht die Zugabe von Succinat in Celsior und HTK signifikant die MTT-Reduktion und zwar in Celsior um 38 % und in HTK um 17 %. Der Zusatz von Succinat zu UW erhöht die MTT-Reduktion nicht signifikant. Es fällt eine große Streubreite der Einzelwerte auf. Nach Zugabe von Fumarat steigt unter 4°C Hypoxie die MTT-Reduktion signifikant in UW, und zwar erhöht sie sich im Median um 14 %.

Wie bereits erwähnt, wird MTT hauptsächlich von nichtmitochondrialen Dehydrogenasen reduziert, womit die Reduktion in großem Maße unabhängig von der Succinatkonzentration ist. Somit wird die Rate der MTT-Reduktion nicht mit der Funktionalität der SDH gleichgesetzt (Liu, 1999). Trotzdem stellt sich die Frage, ob eine erhöhte Succinatkonzentration nicht doch über Aktivierung der SDH zu einer erhöhten Reduktion des MTT durch die SDH führen kann. In unseren Versuchen zeigt sich, dass der positive Effekt von Succinat (und auch von Fumarat) sich auf die Versuchsbedingungen Normoxie und Hypoxie bei 4°C beschränkt. Wenn Succinat also über den Weg der Enzymaktivierung der SDH die Vitalität der HepG2-Zellen erhöhen würde, so müsste sich auch bzw. gerade bei den Ansätzen unter 37° eine erhöhte MTT-Reduktion zeigen, da unter 37°C die Enzymaktivität der Succinatdehydrogenase höher ist als bei 4°C (www.brenda-enzymes.info). Dies ist jedoch nicht der Fall. Daher gehen wir davon aus, dass Succinat in kalter Normoxie und Hypoxie, also der Phase der kalten Ischämie während einer Organtransplantation, einen positiven Effekt auf die Vitalität von Leberzellen hat.

In den 1980ern zeigten die Arbeitsgruppen um Höhl und Wiesner, dass isolierte Rattenherzen unter Hypoxie von einer Erhöhung der Succinatbildung durch eine Verbesserung der kardialen Performance profitieren. Wiesner et al. gaben in ihren Versuchen die Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und α -Ketoglutarat zu den Spüllösungen für isolierte Rattenherzen dazu. In ihrem Fall führte diese Zugabe sowohl zu einer erhöhten erhöhten

Succinatbildung als auch zu einer Verbesserung der kardialen Performance (Wiesner et al., 1988). Die Zugabe von Malat führte in unseren Versuchsansätzen zu keiner erhöhten Zellvitalität, die Zugabe von Fumarat nur in zwei Fällen, während die direkte Zugabe von Succinat unter kalten Temperaturen durchgehend die Zellvitalität erhöhte. Wiesner vermutete, dass sich die positiven Effekte der erhöhten Succinatbildung auf einen verbesserten Energiestoffwechsel zurückführen lassen. Möglicherweise handelte es sich jedoch um einen direkten Effekt des entstandenen Succinats.

In dem ersten Teil unserer Arbeit haben wir gezeigt, dass der Zusatz von Fumarat, Malat und Succinat zu keiner erhöhten Stabilisierung von HIF-1 α führt. Die HIF-1 α -Prolylhydroxylase (HPH), das Enzym welches den Abbau von HIF einleitet, generiert bei dieser Reaktion aus α -Ketoglutarat unter CO₂-Abspaltung Succinat (Masson und Ratcliffe, 2003). Es gibt Hinweise, dass die Zugabe des Koproductes Succinat die HPH inhibieren kann und dass dies zu einer erhöhten HIF-1 α -Stabilisierung führen kann (Selak et al., 2005). Erhöhte HIF-1 α -Spiegel wirken sich vermutlich protektiv auf hypoxische Zellen aus (Cai et al., 2003; Date et al., 2005). In unseren Versuchen hat die Zugabe von Succinat zu keiner signifikant erhöhten HIF-1 α -Menge geführt, somit erklären wir uns die positiven Effekte der Succinatzugabe nicht über eine erhöhte HIF-1 α -Stabilisierung.

Das Enzym Succinatdehydrogenase (SDH) des Zitratzyklus dehydriert unter aeroben Bedingungen Fumarat zu Succinat. Es gibt jedoch mehrere Hinweise, dass die SDH unter hypoxischen Bedingungen gegensätzlich arbeitet und damit als Fumaratreduktase, dient (Paddenberget al., 2003; Hohl et al., 1987). Funktioniert die SDH als Fumaratreduktase kommt es zu einer vermehrten Bildung von ROS (Paddenberget al., 2003). Möglicherweise hemmt die Zugabe von Succinat, dem Endprodukt der Fumaratreduktase, in Hypoxie diese Reaktion, was zu verminderter ROS-Bildung führen würde. Dieses bedeutet für die Zelle wiederum eine Reduktion des oxidativen Stresses, was sich protektiv auswirken würde. In unseren Versuchen hat Succinat nur bei 4°C einen zellprotektiven Effekt, und zwar unabhängig, ob unter Hypoxie oder Normoxie. Die Endprodukthemmung der Fumaratreduktase erklärt daher den von uns beobachteten positiven Effekt der Succinatzugabe nicht vollständig.

Die Zugabe von Succinat hat in den unterschiedlichsten Systemen des menschlichen Körpers verschiedenste Effekte. Welcher Mechanismus den protektiven Einfluss auf die Zellvitalität bei kalten Temperaturen erklärt, ist jedoch zur Zeit noch unklar.

Während der Zusatz der Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und Succinat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die HIF-1 α -Stabilisierung hatte, so zeigte sich im

Rahmen unserer Versuche, dass sich die Zugabe von Succinat zu den Organkonservierungslösungen Celsior, HTK und auch eingeschränkt zu UW unter 4°C protektiv auf HepG2-Zellen auswirkt. Durch den Zusatz von Succinat erhöhte sich die Vitalität der HepG2-Zellen in kalter Ischämie signifikant. Ein Zusatz von Succinat zu den oben genannten Organkonservierungslösungen könnte diese möglicherweise verbessern, denn eine erhöhte postischämische Zellvitalität würde sich im Rahmen einer Organtransplantation vermutlich in einer besseren Transplantatfunktion niederschlagen.

5. Zusammenfassung

Trotz steigender Zahlen bei den Lebertransplantationen wird nur wenig mehr als die Hälfte der Patienten ein Spenderorgan bekommen, welche eines benötigen. Einer der Hauptfaktoren, welche den Erfolg einer Organtransplantation limitieren, ist der Ischämie/Reperfusionsschaden. Hinter diesem Begriff steht eine Vielzahl von Schädigungen des Transplantats, vor allem auf zellulärer Ebene, welche durch die Organentnahme, den Transport und die darauf folgende Implantation bedingt sind. Um Organe vor Ischämie/Reperfusionsschäden zu schützen wurden spezielle Konservierungslösungen entwickelt und ständig verbessert. In Europa sind zur Zeit vor allem die Organkonservierungslösungen Celsior, HTK und UW in Verwendung.

Versuche der Arbeitsgruppen um Hohl und Wiesner Ende der 1980er Jahre an Rattenherzen, zeigten, dass die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite α -Ketoglutarat, Malat und Fumarat unter Hypoxie zu einer erhöhten Succinatbildung führte und sich protektiv auf die von Wiesner et al. verwendeten ischämischen Rattenherzen auswirkte. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob das von Wiesner verwendete Modell auch Hepatozyten übertragbar ist.

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist ein zentrales Molekül der Hypoxieantwort. Wir haben in einem Zellkulturmodell seine alpha Untereinheit (HIF-1 α), welche sauerstoffabhängig reguliert wird, im Westernblotverfahren nachgewiesen. Es wurde untersucht ob der Zusatz der Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und Succinat zu drei verschiedenen Organkonservierungslösungen (Celsior, HTK oder UW) einen Einfluss auf die HIF-1 α -Stabilisierung in HepG2-Zellen und die Vitalität von HepG2-Zellen hat.

Als Modell wurde die humane Hepatomzelllinie HepG2 verwendet. Die Zellen wurden für die Versuchsdurchführung allen für eine Organtransplantation wichtigen Bedingungen (Normoxie/Hypoxie 37°C und Normoxie/Hypoxie 4°C) ausgesetzt. Danach bestimmten wir die HIF-1 α -Proteinmenge quantitativ im Western Blot und die Vitalität der Zellen mit Hilfe eines MTT-Tests.

Die Zugabe der Zitratzyklusmetabolite Malat, Fumarat und Succinat zu den drei Organkonservierungslösungen führte unter den unterschiedlichen Versuchsbedingungen zu keiner signifikanten Änderung der HIF-1 α -Stabilisierung.

Die Zugabe von Succinat führt jedoch unter 4°C Normoxie in Celsior, HTK und UW, sowie unter 4°C Hypoxie in Celsior und HTK zu einer signifikanten Erhöhung der Zellvitalität. In Celsior nimmt die Zellvitalität nach Zugabe von Succinat unter 4°C Normoxie im Median um 53 % zu und unter 4°C Hypoxie im Median um 38 % zu. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen Celsior, HTK und UW nach Zugabe von Succinat nicht.

Die Organkonservierungslösung Celsior ist uns während der Versuche durch zwei Eigenschaften besonders aufgefallen. Sie präserviert unter 37°C Normoxie über 6 Stunden, also unter warmen Versuchsbedingungen, die HepG2-Zellen genauso gut wie das von uns verwendete Zellkulturmedium DMEM+Z. Zudem bewirkt der Zusatz von Succinat sowohl unter 4°C Normoxie als auch unter 4°C Hypoxie eine Erhöhung der Zellvitalität.

Der Zusatz von Succinat zu Organkonservierungslösungen, speziell zu Celsior, hat in kalten Temperaturen einen protektiven Effekt auf Hepatozyten. Zudem präserviert Celsior Hepatozyten sehr gut bei warmen Temperaturen. In weiteren Studien muss nun nachgewiesen werden, ob die Zugabe von Succinat auch im Rahmen einer in vivo Lebertransplantation einen besonders protektiven Effekt auf die Hepatozyten hat und somit den Schaden am Organ durch die Entnahme, den Transport und die Reperfusion verringert.

6. Summary

Despite of rising number of transplanted livers, only about fifty percent of the patients who need a new liver will receive one. One of the main factors limiting the success of organ transplantation is the ischemia/reperfusion injury. Ischemia/reperfusion injury means a multitude of primarily cellular damage, which occurs during the different phases of organ transplantation. Since the 1980's special transplantation solutions has been developed and constantly improved to prevent organs from ischemia/reperfusion injury. Celsior, UW and HTK are the common transplantation solutions of Europe.

In the end of the 1980's Wiesner and Hohl showed that the perfusion of hypoxic or ischemic myocardium with the Krebs cycle intermediates α -ketoglutarate, fumarate and malate leads to an increased formation of succinate and improves the outcome of the ischemic myocardium.

We tried to prove that the addition of fumarate, malate and succinate to transplantation solutions in a cell culture model would lead to similar effects on liver cells.

In hypoxia HIF-1, a transcription factor, is one of the most important regulatory proteins. In an organ transplantation model it's oxygen-dependent controlled alpha subunit, HIF-1 α , was quantified by westernblot. We examined if the addition of the Krebs cycle intermediates fumarate, malate, and succinate to three common transplantation solutions (Celsior, UW and HTK) has an influence on the HIF-1 α -stabilization in HepG2-cells and/or their viability.

We used the human hepatoma cell-line HepG2 in our cell culture model and incubated the cells under the different critical conditions of transplantation (4°C and 37°C, hypoxia and

normoxia). After incubation we quantified either HIF-1 α in westernblot or the cell viability in a MTT-test.

The addition of the Krebs cycle intermediates malate, fumarate and succinate to the transplantation solutions had no significant influence on the stabilization of HIF-1 α under the different experimental conditions.

The addition of succinate leads to a higher cell viability in Celsior, HTK, and UW under 4°C normoxia and in Celsior and HTK under 4°C hypoxia. Even if there are no statistical significant differences between the three transplantation solutions, there is an remarkable increase in the cell viability in Celsior up to 53 % under 4°C normoxia and 38 % under 4°C hypoxia.

One of the transplantation solutions, Celsior, came to our special interest. In the preservation of HepG2-cells over 6 h under 37°C normoxia Celsior turned out as good as our cell culture medium DMEM+Z. In Celsior the addition of succinate leads to higher cell viability not only in 4°C normoxia but also in 4°C hypoxia.

Under cold conditions, the addition of succinate to transplantation solutions, especially Celsior, has a protective effect on hepatocytes. In 37°C normoxia Celsior preserves hepatocytes as good as DMEM+Z. Now it has to be confirmed in further studies, if the addition of Succinate to transplantation solutions prevents hepatocytes from ischemia/reperfusion injury in a in vivo organ transplantation, too.

7. Literaturverzeichnis

- Abbasoglu O**, Levy MF, Brkic BB, Testa G, Jeyarajah DR, Goldstein RM, Husberg BS, Gonwa TA, Klintmalm GB
Ten years of liver transplantation: an evolving understanding late graft loss
Transplantation. 1997;64:1801-7
- Abraham D**, Krenn K, Seebacher G, Paulus P, Klepetko W, Aharinejad S
Upregulated hypoxia-inducible factor-1 DNA binding activity to the vascular endothelial growth factor- α promoter mediates increased vascular permeability in donor lung grafts
Ann Thorac Surg. 2004;77:1751-5
- Abrahamse ST**, Dinant S, Pfaffendorf M, van Gulik TM
In vitro function of porcine carotid arteries preserved in UW, HTK and Celsior solutions
Fundam Clin Pharmacol. 2002;16:503-511
- Ackrell BAC**
Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II
FEBS Lett. 2000;446:1-5
- Alberts B**, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P
The molecular biology of the cell
Garland Science, New York 2002
- Appelhoff RJ**, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM
Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor
J Biol Chem. 2004;279:38458-38465
- Aprelikova O**, Chandramouli GV, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK, Linehan WM, Barrett JC
Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors
J Cell Biochem. 2004;92:491-501
- Arumugam TV**, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM
The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury
Schock. 2004;21:401-409
- Audet M**, Alexandre E, Mustun A, David P, Chenard-Neu MP, Tiollier J, Jaeck D, Cinqualbre J, Wolf P, Boudjema K
Comparative evaluation of Celsior solution versus Viaspan in a pig liver transplantation model
Transplantation. 2001;71:1731-1735
- Baan C**, van Gelder T, Peeters A, Mol W, Niesters H, Weimar W, IJzermans J
Living kidney donors and hypoxia-inducible factor-1 α
Transplantation. 2003;75:570-571
- Balabaud C**, Cunha AS, Bioulac-Sage P
Microvascular graft dysfunction
J Hepatol. 2004;41:340-343
- Banga NR**, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, Al-Mukthar A, White SA, Prasad KR
Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver
Br J Surg. 2005;92:528-538
- Batts KB**
Acute and chronic hepatic allograft rejection: pathology and classification
Liver Transpl Surg. 1999;5:21-29
- Bell EL**, Emerling BM, Chandel NS
Mitochondrial regulation of oxygen sensing
Mitochondrion. 2005;5:322-332
- Belzer OF**, Southard JH
Principles of solid-organ preservation by cold storage
Transplantation. 1988;45:673-676

- Berger AP**, Kofler K, Bektic J, Rogatsch H, Steiner H, Bartsch G, Klocker H
Increased growth factor production in a human prostatic stromal cell culture model caused by hypoxia
Prostate. 2003;57:57-65
- Berra E**, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J
HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia
EMBO J. 2003;22:4082-4090
- Bilton RL**, Booker GW
The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF α) regulation
Eur J Biochem. 2003;270:791-798
- Bilzer M**, Schauer RJ, Gerbes AL
Prävention von Ischämie-Reperfusionsschäden: Schutz der Leber bei Resektion und Transplantation
Dtsch Ärzteblatt. 2002;99:1980-1982
- Blankensteijn JD**, Trepstra OT
Liver Preservation: the past and the future
Hepatology. 1991;13:1235-1250
- Boutillier RG**
Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia
J Exp Biol. 2001;204:3171-81
- Brière JJ**, Favier J, Bénit P, El Ghouzzi V, Lorenzato A, Rabier D, Di Renzo MF, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P
Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1 α nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions
Hum Mol Genet. 2005b;14:3263-3269
- Brière JJ**, Favier J, El Ghouzzi V, Djouadi F, Bénit P, Gimenez AP, Rustin P
Succinate dehydrogenase deficiency in human
Cell Mol Life Sci. 2005a;62:2317-2324
- Briuck RK**
Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor
Genes Dev. 2003;17:2614-2623
- Cai Z**, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL
Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or Erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury
Circulation. 2003;108:79-85
- Carden DL**, Granger DN
Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury
J Pathol. 2000;190:255-266
- Chan DA**, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ
Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 α
J Biol Chem. 2002;277:40112-40117
- Chandel NS**, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT
Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription
Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:11715-20
- Chandel NS**, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT
Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia
J Biol Chem. 2000;275:25130-25138
- Chiang CH**, Hsu K, Yan HC, Harn HJ, Chang DM
PGE1, dexamethasone, U-74389G, or Bt2-cAMP as an additive to promote protection by UW solution in I/R injury
J Appl Physiol. 1997;83:583-590

- Chun YS, Kim MS, Park JW**
Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha
 J Korean Med Sci. 2002;17:581-588
- Dalgard CL, Lu H, Mohyeldin A, Verma A**
Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors
 Biochem J. 2004;380:419-424
- Date T, Mochizuki S, Belanger AJ, Yamakawa M, Luo Z, Vincent KA, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C**
Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1 α protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury
 Am J Physiol Cell Physiol. 2005;288:C314-20
- Dawn B, Bolli R**
HO-1 induction by HIF-1: a new mechanism for delayed cardioprotection?
 Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;289:H522-H524
- Debonera F, Krasinkas AM, Gelman AE, Aldeguer X, Que X, Shaked A, Olthoff KM**
Dexamethason inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation
 Hepatology. 2003;38:1563-1572
- Doege K, Heine S, Jensen I, Jelkmann W, Metzen E**
Inhibition of mitochondrial respiration elevates oxygen concentration but leaves regulation of hypoxia-inducible factor (HIF) intact
 Blood. 2005;106:2311-2317
- Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT**
Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes
 J Biol Chem. 1998;273:11619-11624
- Eghtesad B, Aucejo F, Fung JJ**
Preservation solutions in liver transplantation: what are the options?
 Liver Transpl. 2006;12:196-198
- Enomoto N, Koshikawa N, Gassmann M, Hayashi J, Takenaga K**
Hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and oxygen-regulated gene expression in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells
 Biochem Biophys Res Commun. 2002;297:346-352
- Faenza A, Catena F, Nardo B, Montalti R, Capocasale E, Busi N, Boggi U, Vistoli F, Di Naro A, Albertazzi A, Mosca F, Cavallari A**
Kidney preservation with University of Wisconsin and Celsior solution: a prospective multicenter randomized study
 Transplantation. 2001;72:1274-1277
- Fedele AO, Whitelaw ML, Peet DJ**
Regulation of gene expression by the hypoxia inducible factors
 Mol Intervent. 2002;2:229-243
- Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW**
Hepatic ischemia/reperfusion injury-a fresh look
 Exp Mol Pathol. 2003;74:86-93
- Giacca A, Siim BG, Johnson RS**
HIF-1 as a target for drug development
 Nat Rev Drug Discov. 2003;2:1-9
- Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF**
The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines
 Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:7972-6
- Greijer AE, van der Wall E**
The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis
 J Clin Pathol. 2004;57:1009-1014
- Guzy RD, Schumacker PT**
Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased ROS during hypoxia
 Exp Physiol. 2006;91:807-19

- Hagen T**, Taylor CT, Lam F, Moncada S
Redistribution of Intracellular Oxygen in Hypoxia by Nitric Oxide: Effect on HIF1 α
Science. 2003;302:1975-1978
- Hägerhäll C**
Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme
Biochim Biophys Acta. 1997;1320:107-141
- Hancock WW**
Chemokine receptor-dependent alloresponses
Immunol Rev. 2003;196:37-50
- Hellwig-Bürgel T**, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W
Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1
Blood. 1999;94:1561-1567
- Hellwig-Bürgel T**, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W
Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reaction
J Interferon Cytokine Res. 2005;25:297-310
- Helton R**, Cui J, Scheel JR, Ellison JA, Ames C, Gibson C, Blouw B, Ouyang L, Dragatsis I, Zeitlin S, Johnson RS, Lipton SA, Barlow C
Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 α reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage
J Neurosci. 2005;25:4099-4107
- Hohl C**, Oestreich R, Rösen P, Wiesner R, Grieshaber M
Evidence for succinate production by reduction of fumarate during hypoxia in isolated rat heart cells
Arch Biochem Biophys. 1987;259:527-535
- Höhrler B**, Lange B, Holzapfel B, Goldenberg A, Hänze J, Sell A, Testan H, Möller W, Kummer W
Hypoxic upregulation of tyrosine hydroxylase gene expression is paralleled, but not induced, by increased generation of reactive oxygen species in PC12 cells
FEBS Lett. 1999;457:53-56
- Howard TK**, Klintmalm GB, Cofer JB, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA
The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient
Transplantation. 1990;49:103-107
<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Internetseite des Programms Image J
- Huang J**, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS
Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3
J Biol Chem. 2002;277:39792-39800
- Huang LE**, Bunn HF
Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance
J Biol Chem. 2003;278:19575-19578
- Imamura R**, Moriyama T, Isaka Y, Namba Y, Ichimaru N, Takahara S, Okuyama A
Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1 α
Transplantation. 2007;83:1371-1379
- Isaacs JS**, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, Merino M, Trepel J, Zbar B, Toro J, Ratcliffe PJ, Linehan WM, Neckers L
HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: Novel role of fumarate in regulation of HIF stability
Cancer Cell. 2005;8:143-153
- Jaeschke H**
Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences
J Hepatol. 1996;25:774-780
- Jaeschke H**
Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003;284:G15-G26

- Janßen H, Janßen PH, Broelsch CE**
Celsior solution compared with University of Wisconsin solution (UW) and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) in the protection of human hepatocytes against ischemia-reperfusion injury
 Transpl Int. 2003;16:515-522
- Janßen H, Janßen PH, Broelsch CE**
UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury
 Liver Transpl. 2004;10:1514-1523
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL**
Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1
 J Biol Chem. 1996;271:1771-1778
- Joosten SA, van Knooten C, Paul LC**
Pathogeneses of chronic allograft rejection
 Transpl Int. 2003;16:137-145
- Karam G, Compagnon P, Hourmant M, Despins P, Duveau D, Noury D, Boudjema K**
A single solution for multiple organ procurement and preservation
 Transpl Int. 2005;18:657-663
- Karlson P, Doenecke D, Koolman J**
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler
 Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 1994
- Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW**
Heme oxygenase-1 system in organ transplantation
 Transplantation. 2002;74:905-912
- Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM**
Medizinische Mikrobiologie
 Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 2001
- Keränen MA, Nykänen AI, Krebs R, Tuuminen R, Sandelin H, Koskinen PK, Lemström KB**
Effect of graft preservation and acute rejection on hypoxia-inducible factor-1 in rat cardiac allografts
 Transplant Proc. 2006;38:3372-3
- Khalimonchuk O, Rödel G**
Biogenesis of cytochrome c oxidase
 Mitochondrion. 2005;5:363-388
- Kodama T, Shimizu N, Yoshikawa N, Makino Y, Ouchida R, Okamoto K, Hisada T, Nakamura H, Morimoto C, Tanaka H**
Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression
 J Biol Chem. 2003;278:33384-33391
- Köhl R, Zhou J, Brüne B**
Reactive oxygen species attenuate nitric-oxide-mediated hypoxia-inducible factor-1 α stabilization
 Free Radic Biol Med. 2006;40:1430-1442
- Kouwenhoven EA, Ijzermans JNM, de Bruin RWF**
Etiology and pathophysiology of chronic transplant dysfunction
 Transpl Int. 2000;13:385-401
- Kovacic P, Pozos SR, Somanathan R, Shangari N, O'Brian PJ**
Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals and structure-activity relationships
 Curr Med Chem. 2005;12:2601-2623
- Kukan M, Haddad PS**
Role of hepatocytes and bile duct cells in preservation-reperfusion injury of liver grafts
 Liver Transpl. 2001;7:381-400
- Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW**
Ischaemia and reperfusion injury in liver transplantation
 Transpl Proc. 2005;37:1653-1656

Land CL, Tee AR

Hypoxia inducible factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR-signalling motif

J Biol Chem. 2007;282:20534-43

Lario S, Mendes D, Bescós M, Iñigo P, Campos B, Alvarez R, Alcaraz A, Rivera-Fillat F, Campistol JM

Expression of transforming growth factor- β 1 and hypoxia inducible factor-1 α in an experimental model of kidney transplantation

Transplantation. 2003;75:1647-1654

Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA

Organ transplantation-how much of the promise has been realized?

Nat Med. 2005;11:605-613

Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA

Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia an infarction

N Engl J Med. 2000;342:626-633

Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ

Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic I/R injury

Hepatology. 2000;32:169-173

Leonard MO, Godson C, Brady HR, Taylor CT

Potentiation of glucocorticoid activity in hypoxia trough induction of the glucocorticoid receptor

J Immunology. 2005;174:2250-2257

Li XL, Man K, Liu YF, Lee TK, Tsui SH, Lau CK, Lo CM, Fan ST

Insulin in University of Wisconsin solution exacerbates the ischemic injury and decreases the graft survival rate in rat liver transplantation

Transplantation. 2003;76:44-49

Li XL, Man K, Ng KT, Lee TK, Lo CM, Fan ST

Insulin in UW solution exacerbates hepatic ischemia/reperfusion injury by energy depletion trough the IRS-2/SREBP-1c pathway

Liver Transpl. 2004;10:1173-1182

Liu Y

Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostatis

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1999;23:377-395

Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D

Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) reduction

J Neurochem. 1997;69:581-593

Loinaz C, Gonzalez EM

Marginal donors in liver transplanatation

Hepatogastroenterology. 2000;47:256-63

Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A

Reversible inactivation of the HIF-1 Prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1

J Biol Chem. 2005;280:41928-41939

Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L

Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus

J Biol Chem. 2002;277:32405-32408

Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, Fridell JA

Comparison of Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation

Liver Transpl. 2006;12:226-230

- Mansfield** KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, Simon MC
Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation
Cell Metab. 2005;1:393-399
- Masson** N, Ratcliffe PJ
HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels
J Cell Sci. 2003;116:3041-3049
- Matsumoto** K, Imagawa S, Obara N, Suzuki N, Takahashi S, Nagasawa T, Yamamoto M
2-Oxoglutarate downregulates expression of vascular endothelial growth factor and Erythropoietin through decreasing hypoxia-inducible factor-1 α and inhibits angiogenesis
J Cell Physiol. 2006;209:333-340
- Mawell** PH
Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator
Exp Physiol. 2005;90:791-797
- Mazure** NM, Brahimi-Horn MC, Berta MA, Benizri E, Bilton RL, Dayan F, Ginouvès A, Berra E, Pouyssegur J
HIF-1: master and commander of the hypoxic world; A pharmacological approach to its regulation by siRNA
Biochem Pharmacol. 2004;68:971-980
- Metzen** E, Ratcliffe PJ
HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing
Biol Chem. 2004;385:223-230
- Michel** P, Hadour G, Rodriguez C, Chiari P, Ferrera R
Evaluation of a new preservative solution for cardiac graft during hypothermia
J Heart Lung Transplant. 2000;19:1089-97
- Mitchell** SJ, Churchill TA, Winslet MC, Fuller BJ
Effects of different cold preservation solutions on restoration of hepatic energy metabolism during cold reperfusion
Cryobiology. 1996;33:413-422
- Mohara** J, Morishita Y, Takahashi T, Oshima K, Yamagishi T, Takeyoshi I, Matsumoto K
A comparative study of Celsior and University of Wisconsin solutions based on 12-hr preservation followed by transplantation in canine models
J Heart Lung Transplant. 1999;18:1202-10
- Moutabarrik** A, Mourid M, Nakanishi I
The effect of organ preservation solutions on kidney tubular and endothelial cells
Transpl Int. 1998;11:58-62
- Mühlbacher** F, Langer F, Mittermayer C
Preservation solutions for transplantation
Transplant Proc. 1999;31:2069-2070
- Müller** U, Troidl Ch, Niemann S
SDHC mutations in hereditary paraganglioma/pheochromocytoma
Fam Cancer. 2005;4:9-12
- Natarajan** R, Salloum FN, Fisher BJ, Ownby ED, Kukreja RC, Fowler AA
Activation of Hypoxia Inducible Factor-1 Via Prolyl-4 Hydroxylase-2 Gene Silencing Attenuates Acute Inflammatory Responses in Post-Ischemic Myocardium
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;293:H1571-80
- Ng** SF, Hanauske HM, England S
Cosubstrate binding site of Pseudomonas sp. AK1 γ -butyrobetaine hydroxylase
J Biol Chem. 1991;266:1526-1533
- Ning** XH, Chen SH, Buroker NE, Xu CS, Li FR, Li SP, Song DS, Ge M, Hyyti OM, Zhang M, Portman MA
Short cycle hypoxia in the intact heart: hypoxia inducible factor 1- α signaling and the relationship to injury threshold
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;292:H333-341

Ohwada S, Sunose Y, Aiba M, Tsutsumi H, Iwazaki S, Totsuka O, Matsumoto K, Takeyoshi I, Morishita Y

Advantages of Celsior solution in graft preservation from non-heart-beating donors in a canine liver transplantation model

J Surg Reas. 2002;102:71-76

Paddenberg R, Ishaq B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, Braun-Dullaues RC, Kummer W

Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003;284:L710-719

Panzer P, Rotelli MT, Salerno AM, Cicco G, Catalano G, D'Elia G, Greco L, Lupo L, Memeo V

Solutions for organ perfusion and storage: haemorheologic aspects

Transplant Proc. 2005;37:2456-2458

Pollard PJ, Brière JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, Hunt T, Mitchell M, Olpin S, Moat SJ, Hargreaves IP, Heales SJ, Chung YL, Griffiths JR, Dalglish A, McGrath JA, Gleeson MJ, Hodgson SV, Poulsom R, Rustin P, Tomlinson IP

Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations

Hum Mol Genet. 2005;14:2231-2239

Rayner BS, Duong TT, Myers SJ, Witting PK

Protective effect of a synthetic anti-oxidant on neuronal cell apoptosis resulting from experimental hypoxia re-oxygenation injury

J Neurochem. 2006;97:211-221

Saraste M

Oxidative phosphorylation at the fin de siècle

Science. 1999;283:1488-1493

Schemmer P, Mehrabi A, Gebhard MM, Schmidt J, Friess H, Gutt CN, Klar E, Büchler MW

Spezielle Aspekte des Ischämie-/Reperfusionsschadens bei der Leber

TransplantLinc. 2005;10:32-43

Schofield C, Ratcliffe PJ

Oxygen sensing by HIF hydroxylases

Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5:343-354

Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS

Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells

Mol Cell Biol. 2001;21:3436-3444

Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E

Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase

Cancer Cell. 2005;7:77-85

Semenza GL

Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1

Annu Rev Cell Dev Biol. 1999;15:551-578

Semenza GL

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

J Appl Physiol. 2000;88:1474-1480

Semenza GL

Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1

Biochem J. 2007;405:1-9

Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, Theodorescu D

Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1 α via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways

Oncogene. 2001;20:7624-34

- Srinivas V**, Leshchinsky I, Sang N, King MP, Minchenko A, Caro J
Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electrontransfer pathway
J Biol Chem. 2001;276:21995-21998
- Tacchini L**, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA
Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells
Carcinogenesis. 2001;22:1363-1371
- Taylor BL**, Zhulin IB
PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light
Microbiol Mol Biol Rev. 1999;63:479-506
- Taylor C**, Jobin C
Ubiquitin protein modification and signal transduction: implications for inflammatory bowel diseases
Inflamm Bowel Dis. 2005;11:1097-1107
- Upadhyia GA**, Strasberg SM
Glutathione, Lactobione, and Histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and Histidine/Tryptophan/Ketoglutarate liver preservation solutions
Hepatology. 2000;31:1115-22
- Vaux EC**, Metzen E, Yeates KM, Ratcliffe PJ
Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain
Blood. 2001;98:296-302
- Vellonen KS**, Honkakoski P, Urtti A
Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity
Eur J Pharm Sci. 2004;23:181-8.
- Vistica DT**, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR
Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production
Cancer Res. 1991;51:2515-2520
- Vreugdenhil PK**, Ametani MS, Haworth RA, Southard JH
Biphasic mechanism for hypothermic induced loss of protein synthesis in hepatocytes
Transplantation. 1999;67:1468-1473
- Wang GL**, Semenza GL
Purification and characterization of hypoxia inducible factor 1
J Biol Chem. 1995;270:1230-7
- Waypa GB**, Chandel NS, Schumacker PT
Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing
Circ Res. 2001;88:1259-1266
- Wenger RH**
Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation
J Exp Biol. 2000;203:1253-1263
- Wenger RH**
Mitochondria: oxygen sinks rather than sensors?
Med Hypo. 2006;66:380-383
- Wiesener MS**, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH
Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-induciblefactor-1alpha
Blood. 1998;92:2260-2268
- Wiesener RH**, Narayanan Menon KV
Late hepatic allograft dysfunction
Liver Transpl. 2001;7:60-73

- Wiesner** RH, Rakela J, Ishitani MB, Mulligan DC, Spivey JR, Steers JL, Krom RA
Recent advances in liver transplantation
 Mayo Clin Proc. 2003;78:197-210
- Wiesner** RJ, Rösen P, Grieshaber MK
Pathways of succinate formation and their contribution to improvement of cardiac function in the hypoxic rat heart
 Biochem Med Metab Biol. 1988;40:19-34
- Wildhirt** SM, Weis M, Schulze C, Conrad N, Rieder G, Enders G, Ihnken K, von Scheidt W, Reichart B
Effects of Celsior and University of Wisconsin preservation solutions on hemodynamics and endothelial function after cardiac transplantation in humans: a single-center, prospective randomized trial
 Transpl Int. 2000;13:S203-S211
- www.dso.de**, Internetseite der Deutschen Stiftung Organspende, bzw. direkt von unos zur Verfügung gestellte Daten
- www.gesundheit.de/roche**, Medizinlexikon der Firma La Roche
- www.unos.org**, Internetseite des United Network of Organ Sharing, USA bzw. direkt von UNOS per Email zur Verfügung gestellte Daten
- www.viaspan.de**, Internetseite des Herstellers der UW-Lösung
- Yang** W, Block ER
Effect of hypoxia and reoxygenation on the formation and release of reactive oxygen species by porcine pulmonary endothelial cells
 J Cell Physiol. 1995;164:414-423
- Ysebaert** DK, De Greef KE, De Beuf A, Van Rompay AR, Vercauteren S, Persy VP, De Broe ME
T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury
 Kidney Int. 2004;66:491-496
- Yu** WM, Coddington D, Bitter-Suermann H
Rat liver preservation.I.The components of UW solution that are essential to its success
 Transplantation. 1990;49:1060-1066
- Zhou** JM, Zhu XF, Pan QC, Liao DF, Li ZM, Liu ZC
Manumycin inhibits cells proliferation and the Ras signal transduction pathway in human hepatocellular carcinoma cells
 Int J Mol Med. 2003;11:767-771

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name : Howold
Vorname : Nele
Geburtsdatum : 20.03.1978
Staatsangehörigkeit : deutsch
Familienstand : verheiratet
Anschrift : Schneflingen Nr. 25, 29378 Wittingen

26.6.1998	Abitur, Berufliches Gymnasium Elisabeth-Knippling-Schule (Schwerpunkt Biotechnologie), Kassel
WS 1998/99 – SS 2000	Studium der Humanbiologie Phillips-Universität Marburg
WS 2000/01 – SS 2006	Studium der Humanmedizin Justus-Liebig-Universität Giessen
23.10.2006	Dritter Abschnitt der Ärztliche Prüfung, Justus-Liebig-Universität Giessen
Seit 15.11.2006	Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum der Stadt Wolfsburg, Wolfsburg

- Nele Howold –