

**Quantitative Analyse des Hypoxie-
induzierbaren Faktors in glatten Muskel-
zellen und Fibroblasten
der Pulmonalarterie und Aorta**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von Volker Ulrich Pies
aus Trier

Gießen 2010

**Quantitative Analyse des Hypoxie-
induzierbaren Faktors in glatten Muskel-
zellen und Fibroblasten
der Pulmonalarterie und Aorta**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von Volker Ulrich Pies
aus Trier

Gießen 2010

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II
des Universitätsklinikums Gießen und
Marburg GmbH

Leiter: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Jörg Hänze

Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Tag der Disputation: 15.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1)	2
1.2	Die Struktur des HIF-1	4
1.3	Die Regulation des HIF-1	6
1.4	HIF-Subtypen	9
1.4.1	HIF-2 α	10
1.4.2	HIF-3 α	11
1.5	Zielgene von HIF	12
1.6	Der <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	15
1.7	Pulmonale hypoxische Anpassungsvorgänge	16
1.8	Die Beteiligung des HIF am pulmonal-vaskulären Remodeling	18
1.9	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Methoden	24
2.1	Kaninchenpräparation	24
2.2	Zellpräparationen	26
2.2.1	Pulmonalarterielle Zellpräparation (P-SMC und P-FBC)	26
2.2.2	Aortale Zellpräparation (A-SMC und A-FBC)	28
2.3	Zellkultur	29
2.3.1	Identifizierung der Zellisolate	29
2.3.2	Kultivierung von Zellen	30
2.4	Einfrieren von Zellen	31
2.5	Zellkultur-Medien	32
2.6	Reportergen-Assay	33
2.7	Plasmidkonstrukte für den Reportergen-Assay	35
2.8	Transfektion der Versuchszellen mit Plasmiden	36
2.9	Transfektionsnachweis über das grün fluoreszierende Protein (GFP)	36
2.10	Experimentelles Protokoll: Inkubation der Versuchszellen	37

3	Materialien	40
	3.1 Präparationsmaterial	40
	3.2 Zellkulturmaterial	42
	3.3 Apparate zur Zellkultivierung	43
	3.4 Apparate zur Versuchsdurchführung	44
	3.5 Materialien für den Reporter-Gen-Assay	44
4	Ergebnisse	46
	4.1 Isolierung von aortalen und pulmonal- vaskulären SMC und FBC	46
	4.2 Plasmid-Transfektion	50
	4.3 Quantifizierung HIF-abhängiger Genregulation durch den Einsatz von Reporter-Gen-Plasmiden	51
	4.4 Quantifizierung hypoxischer Genregulation durch HRE-Plasmidkonstrukte	53
5	Diskussion	56
	5.1 Isolation und Kultivierung von glatten Muskel- zellen und Fibroblasten aus der Pulmonalarte- rie und Aorta des Kaninchens	56
	5.2 Etablierung eines HIF-spezifischen dualen Re- porter-Gen-Assays	58
	5.3 HIF vermittelte Gen-Induktion in pulmonalarte- riellen und aortalen Zellen	59
	5.4 Ausblick	62
6	Zusammenfassung	63
7	Summary	65
8	Literaturverzeichnis	67
9	Anhang	81
	9.1 Erklärung	81
	9.2 Publikationsverzeichnis	81
	9.3 Danksagung	82

Abkürzungsverzeichnis

- ACE Angiotensin-konvertierendes Enzym
- A-FBC Fibroblasten der aortalen Tunica adventitia
- AP-1 *Activating protein-1* (synonym verwendet mit HIF-2 α)
- A-SMC Glatte Muskelzellen der aortalen Tunica muscularis
- ARNT *Hydrocarbon nuclear translocator* (synonym verwendet mit HIF-1 β)
- ATP Adenosintriphosphat
- AT1R *Angiotensin II receptor type 1*
- bHLH-PAS-Proteine Basic-helix-loop-helix-PAS Proteine
- Bp Basenpaare
- CBP *CREB-binding protein*
- CO₂ Kohlendioxid (Summenformel)
- COPD Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
- CTAD C-terminale transaktivierende Domäne
- DMEM *Dulbecco's modified eagle medium* (Kulturmedium mit Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und Phenolrot als pH-Indikator)
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- EDTA Ethylendiamin-Tetraessigsäure
- EMSA Elektromobilitäts-Shift-Analyse
- eNOS Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
- EPAS-1 *Endothelial PAS domain protein 1* (synonym verwendet mit HIF-2 α)
- EPO Erythropoetin
- ET-1 Endothelin-1

- FBC Fibroblasten-Zellen (Fibroblast cells)
- FCS *Fetal calf serum*
- FIH *Factor inhibiting HIF*
- g Erdschwerebeschleunigung
- GFP Grün fluoreszierendes Protein
- HBS HIF-1 Bindestelle
- HIF Hypoxie-induzierbarer Faktor
- HLF *HIF-1 α -like factor* (synonym verwendet mit HIF-2 α)
- HO-1 Häm-Oxygenase-1
- H₂O Wasser (Summenformel)
- HPV Hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion
- HRE Hypoxie-responsives Element
- HRF *HIF-related factor* (synonym verwendet mit HIF-2 α)
- IGF *Insulin-like-growth-factor*
- IPAS Inhibitorische PAS-Domäne
- iNO-Synthase Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
- Kb Kilobasen
- MAPK Mitogen aktivierte Proteinkinase
- MOP2 *Member of PAS superfamily 2* (synonym verwendet mit HIF-2 α)
- mRNA *messenger-Ribonukleinsäure*
- N₂ Stickstoff (Summenformel)
- NF- κ B *Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells*
- NO *Nitric oxid* (Stickstoffmonoxid)
- NTAD N-terminale transaktivierende Domäne
- ODD Sauerstoff-abhängige Degradationsdomäne

- O₂ Sauerstoff (Summenformel)
- PCR Polymerase-Kettenreaktion
- PBS Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
- PDGF *Platelet derived growth factor*
- P-FBC Fibroblasten der Tunica adventitia der Arteria pulmonalis
- PH Pulmonale Hypertonie
- PHD Prolyhydroxylase
- pHVL von Hippel-Lindau-Tumor-Suppressorprotein
- PI3-Kinase Phosphoinositid-3-Kinase
- PO₂ Sauerstoffpartialdruck
- PRL *Renilla*-Luciferase (aus *Renilla reniformis*)
- P-SMC Glatte Muskelzellen der Tunica muscularis der Arteria pulmonalis
- RDGF *Retina derived growth factor*
- ROS *Reactive oxygen species*
- RT-PCR *Reverse transcription polymerase chain reaction*
- SIAH *Seven in absentia homolog*
- SUMO *Small ubiquitin-related modifier*
- SV 40 *Simian-virus 40*
- TK Thymidin-Kinase
- VEGF *Vascular endothelial growth factor*
- VEGFR *Vascular endothelial growth factor receptor*
- ZNS Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Das menschliche Leben ist zwingend mit der Anwesenheit von Sauerstoff verknüpft. Ohne Sauerstoff kann die Energiegewinnung und somit das Leben des Organismus nur über kurzfristig nutzbare Stoffwechselwege aufrechterhalten werden. Der Makroorganismus reagiert deshalb empfindlich auf akuten Sauerstoffmangel, so beispielsweise bei einer massiven Kohlenmonoxidvergiftung mit Bewusstlosigkeit, Asystolie, Apnoe und rasch eintretendem Tod.

Anders stellt sich das Bild bei einem chronischen Sauerstoffmangel mit Partialdrücken dar, welche einerseits noch mit dem Leben vereinbar sind, andererseits jedoch Anpassungsvorgänge des Körpers induzieren.

Diese Adaptationen des Körpers finden auf genetischer Ebene über einen ubiquitären Mechanismus statt, in dem ein von G. L. Semenza erstmalig beschriebener Transkriptionsfaktor die Schlüsselfunktion einnimmt, der als Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1) bezeichnet wird. Dieser Transkriptionsfaktor kumuliert spezifisch unter hypoxischen Bedingungen intrazellulär und steuert Modulations- und Anpassungsvorgänge auf genetischer Ebene.

Betrachtet man solche Adaptationsvorgänge im menschlichen Körper, so findet unter Chronifizierung hypoxischer Bedingungen im pulmonalen Gefäßsystem ein vaskuläres Remodeling mit pathologischer Verdickung der Tunica media und Adventitia statt. Dieses Remodeling leitet allmählich zur Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie mit kompensatorisch vergrößertem rechtem Herzen, dem Cor pulmonale. Im Gegensatz dazu kommt es im extrapulmonalen Kreislauf durch chronische Hypoxie nicht zum strukturellen Umbau des Gefäßbetts, sondern zur Adaptation der Gewebe über vermehrte Perfusion durch angiogenetische Prozesse.

Nähere Erkenntnisse über diese grundlegend unterschiedlichen Anpassungsvorgänge sind von Bedeutung zum Verständnis der Pathogenese diverser Krankheiten sowie zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

Dem HIF-1 kommt in diesem Zusammenhang möglicherweise eine bedeutende Rolle zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde die HIF-Aktivierung nach hypoxischem Stimulus in vaskulären Zellen der systemischen und pulmonalen Strombahn gemessen.

Intention der Arbeit war es, die Genregulation in Hypoxie, vermittelt durch den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF), an pulmonalarteriellen und aortalen Gefäßzellen zu quantifizieren und zu analysieren.

Dazu wurden primäre glatte Muskelzellen und adventitielle Fibroblasten aus Pulmonalarterie und Aorta des Kaninchens isoliert und kultiviert. Weiterhin wurde mit einem HIF-spezifischen Reporter-gen-Assay an diesen Primärzellen eine Methode etabliert, welche geeignet war, die Induktion der HIF abhängigen Zielgene in den Versuchszellen quantitativ zu erfassen. Insbesondere sollte die Induktion von HIF an pulmonalarteriellen Zellen im Vergleich zu aortalen Zellen quantifiziert werden.

1.1 Der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1)

Hypoxie spielt bei vielen schwerwiegenden Erkrankungen eine fundamentale Rolle. Beispiele dafür sind Herzinfarkt, Schlaganfall, Tumorerkrankungen oder chronische Lungenerkrankungen.

Die Schlüsselrolle in der zellulären Antwort auf Hypoxie nimmt der HIF-1 ein (10, 11, 12, 38). Er stellt die Verbindung zwischen der

Registrierung der Hypoxie und der Aktivierung der Transkription von Zielgenen dar (10, 11, 12, 22, 38, 46, 48).

Infolge der Hypoxie kommt es durch zunehmende Aktivität des HIF-1 zu Veränderungen der Genexpression mit den Charakteristika Steigerung der anaeroben Energiebereitstellung und Optimierung der Gewebeoxygenierung durch de novo-Bildung von Blutgefäßen (Vaskulogenese), Erweiterung des Gefäßsystems (Angiogenese), Blutflusssteigerung durch Proliferation kleiner Gefäße (Arteriogenese) und Beeinflussung des Vasotonus (60, 62). Dadurch kann der Organismus zum einen eine Adaptation an die Hypoxie erreichen, zum anderen ist jedoch unter bestimmten Bedingungen die Entwicklung pathologischer Prozesse möglich. So führt die Chronifizierung hypoxischer Bedingungen im pulmonalen System zum vaskulären Remodeling mit Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertonie und Ausbildung eines Cor pulmonale (46, 48).

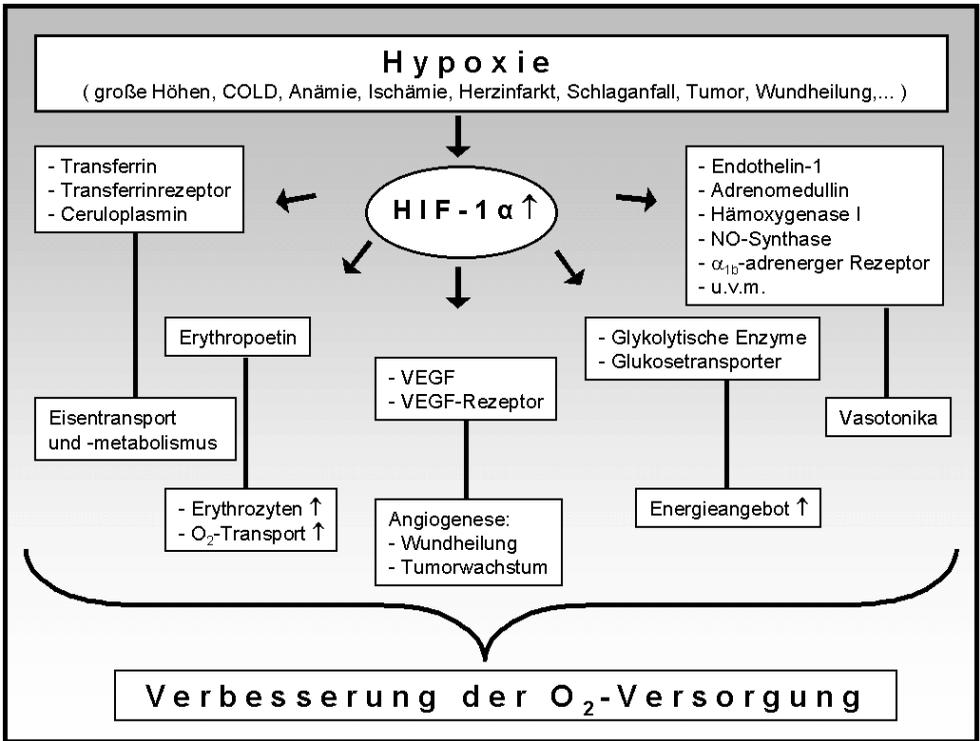


Abb. 1:

Hypoxie bedingt die Konzentrationserhöhung von HIF-1α. Dies führt zur Hochregulierung spezifischer Zielgene, deren Funktion es ist, trotz des Sauerstoffdefizits, eine Homöostase des Organismus aufrecht zu erhalten bzw. Adaptationsvorgänge einzuleiten.

1.2 Die Struktur des HIF-1

Der HIF-1 wurde erstmals von G. L. Semenza et al. identifiziert. Er ist eine heterodimere Verbindung aus den beiden bHLH-PAS-Untereinheiten HIF-1α und HIF-1β. HIF-1β wird auch synonym mit

der Bezeichnung ARNT (*Aryl-hydrocarbon-receptor nuclear translocator*) verwendet. Ursprünglich war HIF-1 β als Dimerisierungspartner des Dioxinrezeptors isoliert worden.

Beide Einheiten gehören zur Familie der bHLH-PAS (*basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim*) Transkriptionsfaktoren. Der bHLH-Abschnitt am N-Terminus von HIF-1 ermöglicht die Bindung an das HRE (Hypoxie-responsives Element) der DNA. Auf den bHLH-Abschnitt folgt die PAS-Domäne, welche der Dimerisierung der Einheiten dient. Dabei leitet sich die Bezeichnung PAS ab von den eng verwandten Genen aus *Per* (*Drosophila period*), *human ARNT* und *Sim* (*Drosophila single-minded*) (8).

Von HIF-1 α existieren weitere Homologe, die mit HIF-2 α und HIF-3 α bezeichnet werden, Homologe von ARNT existieren ebenfalls und sind mit ARNT2 und ARNT3 benannt. Sie sind auf unterschiedlichen Genen codiert. Zusätzlich sind Splice-Varianten von HIF-1 α und HIF-3 α beschrieben (27, 28), wovon eine der Splice-Varianten von HIF-3 α als IPAS (Inhibitorische PAS-Domäne) aufgrund ihrer dominant-negativen Eigenschaften bezeichnet wird. Allen HIF-Isoformen schließt sich eine NTAD (N-terminale transaktivierende Domäne) an, welche teilweise mit der ODD (Sauerstoff-abhängige Degradationsdomäne) überschneidet. Innerhalb der ODD befinden sich zwei Proline, welche bei hohem Sauerstoffpartialdruck hydroxyliert werden und mit diesem Schritt den Abbau von HIF-1 α einleiten. In HIF-1 α und HIF-2 α liegt zusätzlich eine CTAD (C-terminale transaktivierende Domäne) vor, welche im nicht hydroxylierten Zustand, also bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck, Koaktivatoren wie p300 und cAMP-bindendes Protein binden kann (9, 15, 19, 26, 27, 28, 49, 60, 62, 64, 65).

1.3 Die Regulation des HIF-1

Als Heterodimer besteht HIF-1 aus einer α - und einer β -Einheit. Die β -Einheit ist in ihrer Expression und Aktivität unabhängig von der Sauerstoffkonzentration (38).

Ebenfalls kontinuierlich exprimiert, wird die α -Einheit jedoch nur unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert, so dass die Aktivierung des Heterodimer HIF-1 ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen erfolgt. Dies wird über die verschiedenen regulatorischen Abschnitte der α -Einheit vermittelt (ODD, NTAD, CTAD). Bei Vorhandensein von Sauerstoff wird HIF-1 α rasch über eine Ubiquitin/Proteasom-Degradationskaskade abgebaut. Unter normoxischen Bedingungen liegt die Halbwertszeit von HIF-1 α ungefähr im Bereich von zehn Minuten (69).

Der Abbau wird durch PHD (Prolylhydroxylasen) eingeleitet, welche sich innerhalb der ODD (O_2 -abhängige Degradationsdomäne) des HIF-1 α befinden. Die Proline 402 und 564 werden in der ODD hydroxyliert. Dabei ist die Hydroxylierung von PHD abhängig von der Interaktion des Proteins OS9 (67). Durch die Hydroxylierung markiert, ist das Protein pHLV (Tumorsuppressor-Gen von Hippel-Lindau) in der Lage, HIF-1 α zu erkennen. Es enthält die E3 Ubiquitin Ligase (68), die die Ubiquitinierung von HIF-1 α nach sich zieht. Im nächsten Schritt können die ubiquitinierten HIF-1 α durch Proteasomen abgebaut werden.

In hypoxischen Zuständen fehlt der Prolylhydroxylase der Sauerstoff, es kommt somit nicht zur „Markierung“ und damit zur Stabilisierung von HIF-1 α (7, 14, 38). Auf diese Weise kumuliert HIF-1 α und transloziert in den Zellkern.

Bekannt sind derzeit drei spezifische PHD, eine mögliche vierte PHD wurde ebenfalls beschrieben (66). Eine dominante Rolle der Hydroxylierung unter Normoxie wird der PHD2 zugeschrieben

(70). So starben PHD2 Knock-out Mäuse in der Embryogenese an Placenta- und Herzdefekten, wogegen PHD1 und PHD3 Knock-out Mäuse sich normal entwickeln konnten (71).

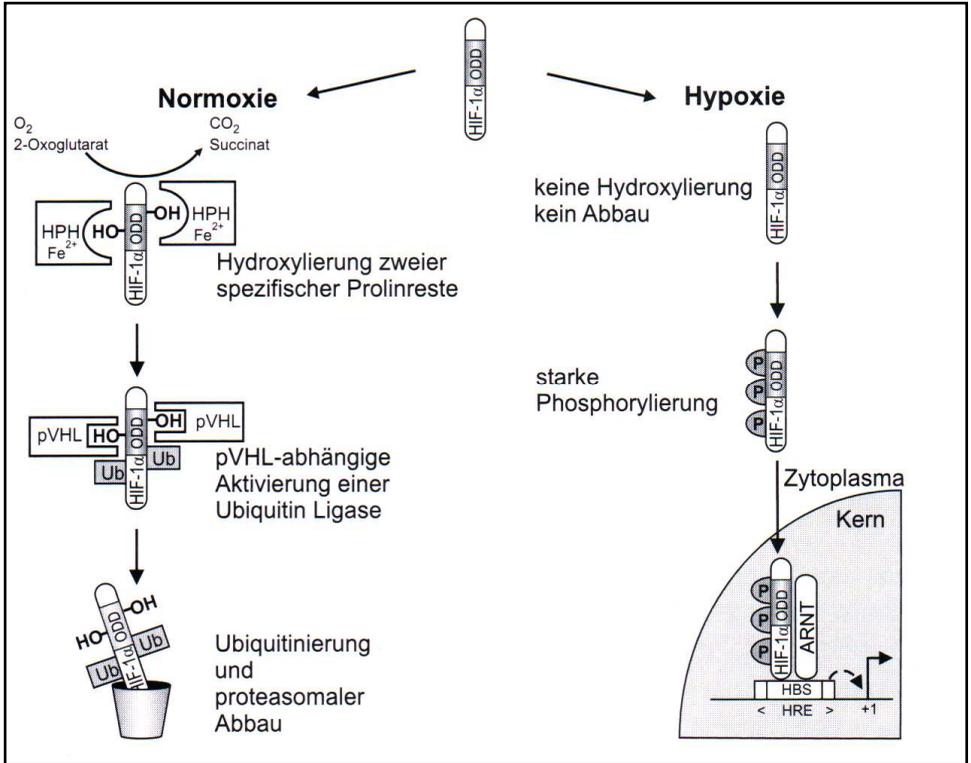


Abb. 2:

Hypoxische Stabilisierung und normoxischer Abbau von HIF-1 α . Der proteosomale Abbau von OH-markiertem HIF-1 α ist als Abfalleimer symbolisiert. Nähere Erläuterungen finden sich im Text. ODD (O_2 -abhängige Degradationsdomäne), HPH (HIF-1 α -Prolylhydroxylase), pVHL (von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein), Ub (Ubiquitin Ligase) (38)

Während andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B, AP-1 und der Tumorsuppressor p53 erst bei nahezu anoxischen Bedingungen aktiviert sind, operiert HIF-1 bereits bei physiologischen Sauerstoffkonzentrationen. Seine Aktivierung ist abhängig von der Hypoxie bedingten Stabilisierung der HIF-1 α -Untereinheit (38).

Neben den Prolylhydroxylasen existiert eine Asparaginyhydroxylase an Position 803, bezeichnet als FIH-1 (*Factor inhibiting HIF-1*). Die Hydroxylierung des Asparagins erfolgt unter normoxischen Bedingungen und führt zur Verhinderung der Interaktion mit den Coaktivatoren CBP und p300, so dass die Transkriptionsaktivität von HIF-1 α bei hohen Sauerstoffpartialdrücken gehemmt wird (72).

PHD und FIH benötigen zur Hydroxylierung neben dem Sauerstoff zusätzlich die Cofaktoren 2-Oxoglutarat, Eisen und Ascorbinsäure. Betrachtet man die Km-Werte der Hydroxylasen für Sauerstoff, so liegen sie für die PHDs bei etwa 100 μ M O₂ und für die FIH-1 bei etwa 90 μ M. Die höheren Km-Werte für die PHDs führen zu deren früheren Inaktivierung bei fallenden Sauerstoffpartialdrücken, wohingegen FIH noch operiert. Da FIH nur innerhalb der C-TAD-Einheit von HIF-1 α und HIF-2 α vorhanden sind und bei HIF-3 α nicht vorliegen, ergibt sich daraus eine bevorzugte Aktivierung von HIF-1 α und HIF-2 α bei niedrigeren Sauerstoffniveaus (60, 62). Zusammengefasst können die PHDs und die FIH-1 als zelluläre Sauerstoffsensoren betrachtet werden, da sie bei Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes unmittelbar ihre enzymatische Aktivität reduzieren und so direkt eine Zunahme von HIF-1 α erfolgt (62).

Neben dem sauerstoffabhängigen Mechanismus über die Protein-stabilität nehmen noch weitere Faktoren Einfluss auf die Regulation von HIF-1 α . Eine Studie konnte bei vaskulären SMC (*Smooth muscle cells*) sogar in der normoxischen Versuchsgruppe höhere HIF-1 α -Spiegel feststellen als in der hypoxisch kultivierten Vergleichsgruppe, ausgelöst durch z.B. Angiotensin II, Thrombin oder PDGF und andere Hormone (16).

Antioxidativ wirkende Substanzen wie die ROS (*Reactive oxygen species*) führen unter Normoxie als auch unter Hypoxie zur Kumulation von HIF-1 α und HIF-2 α (16, 73-84). Ebenso hatte die Phosphorylierung von HIF-1 α durch die Casein Kinase 2 Einfluss auf dessen Aktivität. Des Weiteren wurde die Anhäufung von HIF-1 α im Zellkern über die Hemmung von CRM1 (*Exportin protein*) durch die Phosphorylierung der p42/p44 MAPK-Kaskade beobachtet (85-87).

Ein weiterer Weg die Aktivität und Stabilität von HIF-1 α zu beeinflussen, könnte in der SUMOylierung von HIF-1 α durch das SUMO (*Small ubiquitin-related modifier*) Protein-1 liegen. Für SUMO-1 konnte unter Hypoxie die Hochregulation gezeigt werden (88, 89).

Ebenfalls wird die Stabilisierung von HIF-1 α durch die SIAH1a (*Seven in absentia homolog*) und SIAH2 Proteine vermutet, welche spezifische E3 Ubiquitin Ligasen darstellen, die über einen unklaren Mechanismus unter hypoxischen Bedingungen induziert werden und zur Aktivitätsminderung von PHD1 und PHD3 führen können (90, 91).

Die Transkription von HIF-1 α wird wahrscheinlich durch die Diacylglycerin sensitive Proteinkinase C vermittelt (92).

1.4 HIF-Subtypen

Neben HIF-1 α sind bislang zwei weitere hypoxisch induzierbare Subtypen bekannt:

HIF-2 α und HIF-3 α . Deren spezifische Funktionen in Hinsicht auf die zelluläre Antwort auf Hypoxie sind bislang weitgehend unklar.

1.4.1 HIF-2 α

HIF-2 α wird synonym mit den Bezeichnungen EPAS-1, HLF, HRF oder MOP2 verwendet, da es sich um dasselbe Protein handelt. Dem HIF-1 α nahe verwandt, bildet es ebenfalls mit HIF-1 β Heterodimere und wird vorrangig in Endothelzellen gebildet (13). HIF-2 α mRNA fand sich unter normoxischen Bedingungen in großen Mengen in der Lunge gefolgt von Herzen, der Leber sowie von verschiedenen anderen Organen. Demgegenüber fand sich HIF-1 α mRNA unter denselben Bedingungen in allen Organen in weit geringeren Konzentrationen. Diese hohe Verfügbarkeit unter Normoxie zeigte die Beteiligung von HIF-2 α an der Regelung der Genexpression von VEGF, von verschiedenen glykolytischen Enzymen sowie weiteren HRE getriggerten Gen-Sequenzen und führte zu der Vermutung, dass HIF-2 α eine bedeutende Rolle bei der Vaskulogenese und der Entwicklung der Lunge zukommt (19). Das Wissen über seine Beteiligung an der Bildung des Gefäßsystems und dem pulmonalvaskulären Remodeling zu erweitern, ist Ziel aktueller Forschung. Bisher konnte gezeigt werden, dass HIF-2 α in der Regelung der Katecholamin-Homöostase und der Herzentwicklung während der Embryonalperiode eine bedeutende Rolle zukommt. Des Weiteren wurden ausgeprägte Vaskularisierungsdefekte in Experimenten mit HIF-2 α Knock-out Mäusen deutlich, so dass HIF-2 α in der Regulation des vaskulären Remodelings eine entscheidende Rolle zugesprochen wird (13, 17).

1.4.2 HIF-3 α

HIF-3 α teilt mit HIF-1 α und HIF-2 α zu mehr als 50 % identische Aminosäuresequenzen und kommt in Thymus, Lunge, ZNS, Herz und Niere vor. HIF-3 α bildet ebenfalls Heterodimere mit ARNT und bindet dann an das HRE. Nähere Untersuchungen seiner spezifischen Relevanz stehen noch aus (15).

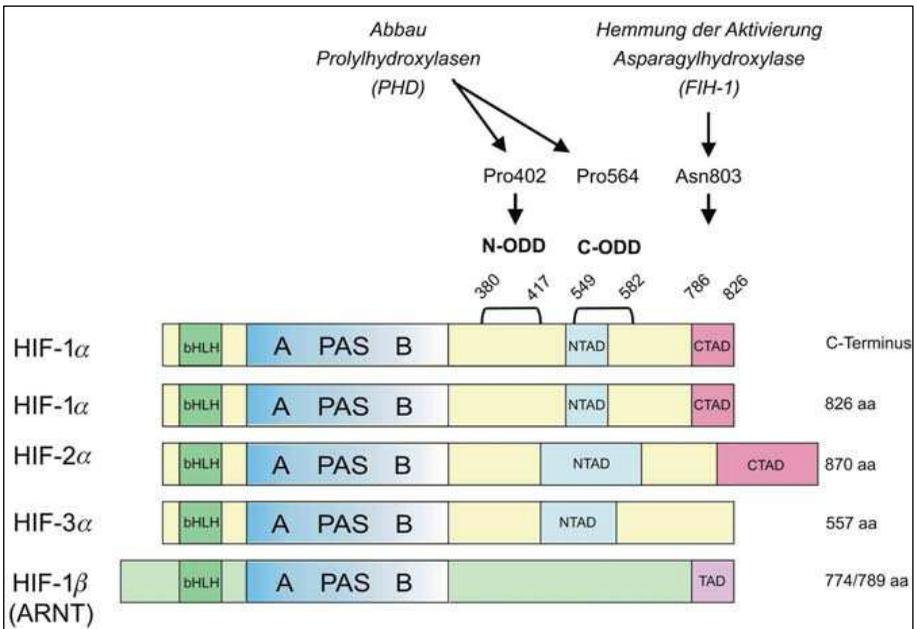


Abb. 3:

Unter hohem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) erfolgt der Abbau (Prolylhydroxylasen, PHDs) als auch die Hemmung der Aktivierung (Asparagylhydroxylase, FIH-1) durch posttranslationale Hydroxylierung von HIF-1 α . Schematische Darstellung der regulatorischen Abschnitte der HIF- α Isoformen und von HIF-1 β im Vergleich.

Abkürzungen: NTAD, CTAD (N- und C-terminale transaktivierende Domäne), N-ODD, C-ODD (N- und C-terminale Sauerstoffabhängige Degradationsdomäne) (62)

1.5 Zielgene von HIF

Die direkten Zielgene des HIF-1 weisen mindestens eine HBS (HIF-1 Bindestelle) auf, welche die typische Sequenz *CGTG* als Herzstück besitzt. Das HRE (Hypoxie- responsives Element) beinhaltet die Sequenz 5`-*RACGTG*-3`. Neben den direkten Zielgenen existieren indirekte Zielgene ohne eine HRE-Sequenz, welche im Rahmen von HIF Knock-out Experimenten entdeckt werden konnten. Ein solches Zielgen codiert beispielsweise für den PLGF (*Placental growth factor*).

Des Weiteren gibt es die direkte Interaktion von HIF-1 α , z.B. mit dem Proteinrezeptor Notch (60).

Eine Unterteilung der Zielgene läßt sich vornehmen in welche, die den anaeroben Energiegewinn steigern und solche, die die Gewebeoxygenierung durch Gefäßneubildung, -umstrukturierung und -weitstellung sowie die Erhöhung der Sauerstoffaufnahmekapazität des Blutes verbessern (62).

Des Weiteren werden HIF-Zielgene von HIF-1 und HIF-2 unterschiedlich aktiviert, so dass auch nach diesem Gesichtspunkt eine Gliederung der Zielgene vorgenommen werden kann. Die Hochregulation von PHD2 beispielsweise ist in erster Linie HIF-1 abhängig (97), demgegenüber geschieht die Aktivierung der eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) vorrangig durch HIF-2 (94).

Insgesamt ist die Aktivierung der Zielgene jedoch komplex und teils noch unerforscht, sowohl die gewebsspezifische Expression von HIF-1 α und HIF-2 α als auch die Interaktion von HIF mit anderen Transkriptionsfaktoren und DNA-Bindestellen scheinen die Spezifität der HIF-Subtypen zu bestimmen (93).

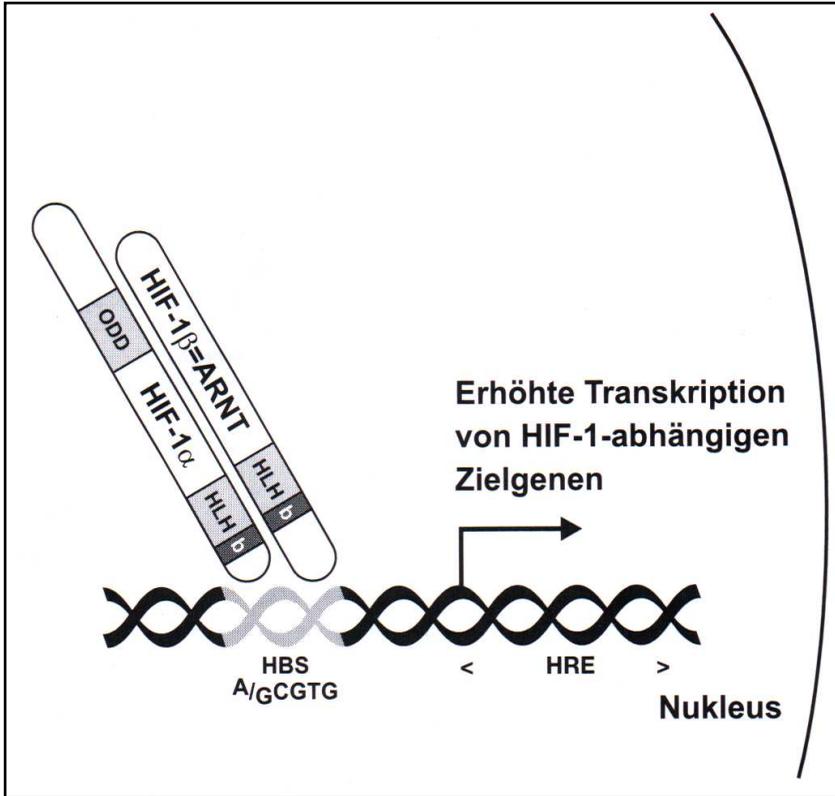


Abb. 4:

Heterodimerisierung von HIF-1 α und HIF-1 β führt zu HIF-1. Dieses bindet an der HRE-Sequenz der DNA von Zielgenen. HBS: HIF-1 Bindestelle, ARNT: Arylhydrocarbon Rezeptor nuclear translocator, bHLH: basic-helix-loop-helix, ODD: Sauerstoff-abhängige Degradationsdomäne (32)

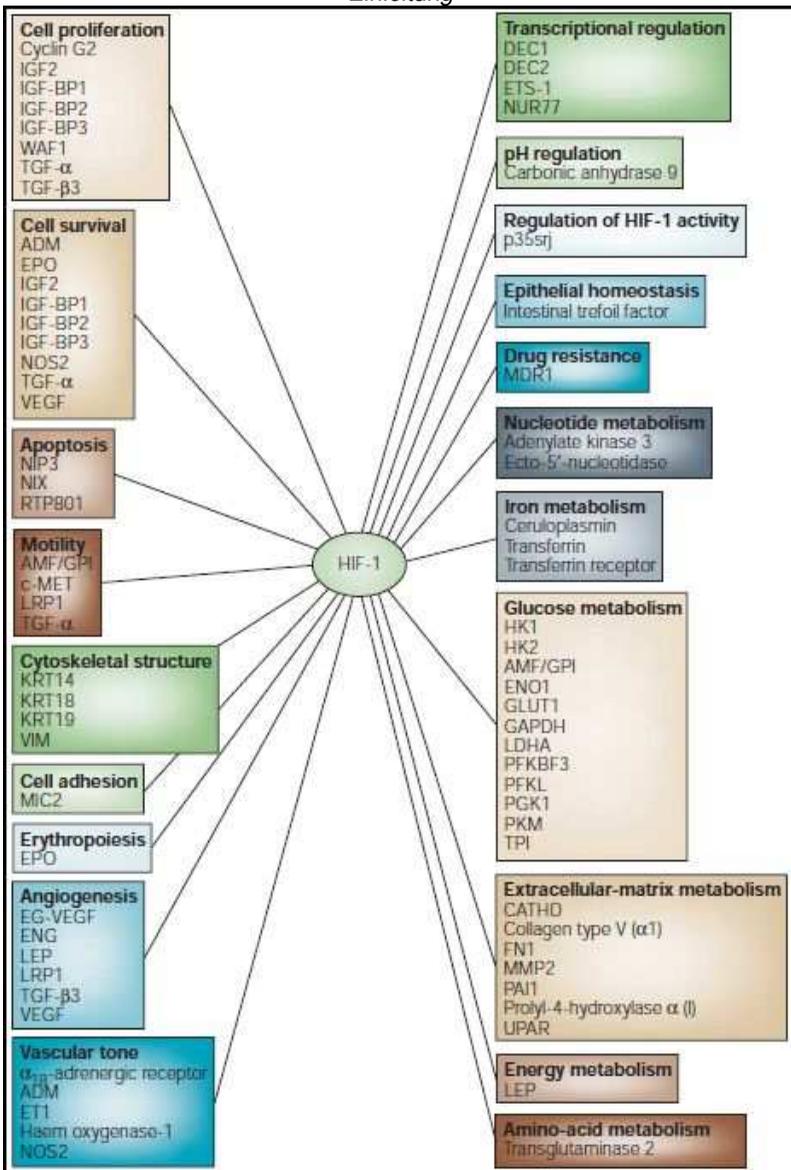


Abb. 5:
Übersicht einiger bekannter Zielgene von HIF-1 (59).

1.6 Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Aufgrund der Verwendung der regulatorischen DNA-Sequenzen von VEGF in den Plasmidkonstrukten der hier vorliegenden Arbeit wird kurz auf diesen Faktor eingegangen.

Angiogenese, die Formation neuer Kapillaren, ist ein Schritt im Anpassungsprozeß an die Ischämie durch hypoxische Bedingungen. Als herausragender Trigger der Angiogenese stellt sich der VEGF dar. Grund dafür ist die Anwesenheit eines HRE in der Promotor-Region, so dass der VEGF durch HIF-1 in einer Vielzahl von Zellen hypoxisch induziert wird (22). Das HRE befindet sich in der 5'-Region 1kb aufwärts von der Transkriptions-Startstelle (11).

VEGF wird unter Hypoxie nicht nur vermehrt gebildet, sondern auch langsamer abgebaut (23). Durch alternatives Splicing entstehen aus dem VEGF-Gen mehrere Isoformen, die sich hinsichtlich ihrer molekularen Masse und biochemischen Eigenschaften unterscheiden. Aktiviert durch Hypoxie, Onkogene und eine Vielzahl von Cytokinen, induziert VEGF die Proliferation des Endothels, die Zell-Migration, eine höhere Gefäß-Permeabilität und unterbindet die Apoptose. Als Rezeptoren dienen dem Wachstumsfaktor zwei Tyrosin-Kinase Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2, die sich nahezu nur bei Endothelzellen finden (24).

Bei embryonalen Stammzellen von Mäusen hat sich gezeigt, dass HIF-1 α unabdingbar ist für die Induktion von VEGF. Des Weiteren haben sich Parallelen in der Menge von HIF-1 α -Protein im Verhältnis zu der Expression von VEGF-mRNA in den untersuchten Organen Herz und Retina unter hypoxischen, bzw. ischämischen Bedingungen finden lassen (29).

Voelkel et al haben in ihren Studien neben der wichtigen physiologischen Bedeutung des VEGF in der Lunge den VEGF ebenso mit der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie in Verbindung bringen können (25, 63). So haben sich eine deutlich erhöhte VEGF-

Expression bei Patienten sowohl mit primärer idiopathischer pulmonaler Hypertonie als auch mit sekundären Formen der pulmonalen Hypertonie in plexiformen Läsionen der Lungenstrombahn finden lassen (25, 63).

1.7 Pulmonale hypoxische Anpassungsvorgänge

Besonderes Augenmerk bezüglich hypoxischer Anpassung verdient der „kleine Kreislauf“ mit der HPV (pulmonale hypoxische Vasokonstriktion). Die pulmonale Strombahn reagiert auf Hypoxie mit Vasokonstriktion anders als der „große Kreislauf“, der mit Vasodilatation dem Sauerstoffmangel begegnet. Diese HPV wird nach den Entdeckern Euler-Liljestrand-Mechanismus genannt. Erstmals von ihnen 1946 beschrieben, optimiert die pulmonale hypoxische Vasokonstriktion das Ventilations-Perfusionsverhältnis in der Lunge (1).

Weniger belüftete Lungenareale mit einem geringen Sauerstoffpartialdruck (pO_2) werden reflektorisch durch lokale Vasokonstriktion der präkapillaren Gefäße weniger perfundiert, gut belüftete Areale mit einem hohen pO_2 werden durch lokale Vasodilatation forciert perfundiert. Folglich wird der Blutstrom in die gut belüfteten Areale der Lunge geleitet, welche einen hohen Sauerstoffgradienten aufweisen, mit der Möglichkeit eines effizienten Gasaustauschs.

Pathologische Zustände, wie z.B. die COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung) mit anhaltender alveolärer Hypoxie führen zur Daueraktivierung dieses Prinzips, was eine Verringerung des Gesamtquerschnitts der pulmonalen Strombahn zur Folge hat. Weiterführend bedingt dies dann nicht nur eine absurd erscheinende Verschlechterung der Blutoxygenierung, sondern ebenfalls

eine Druck- und Widerstandserhöhung in der Lungenstrombahn. Chronifizierung dieses Zustands leitet zu dem Phänomen des vaskulären Remodelings, bei dem die Gefäßzellen eine Adaptation an die erhöhten Druckbedingungen vornehmen. So findet z.B. die Bildung von Wachstumsfaktoren, Veränderungen der interzellulären Matrix oder die Proliferation von Zellen auf hypoxische Reize statt (2, 3, 4, 60).

Die strukturellen Umbauvorgänge in pulmonalarteriellen Gefäßen sind die Endstrecke verschiedener Pathomechanismen, die jeweils mit einer PH (pulmonale Hypertonie) einhergehen. Ursächlich für die PH ist oftmals eine chronische Hypoxie, entstanden aufgrund von Durchblutungsstörungen wie z.B. embolischen Ereignissen, Herzvitien oder Mangelbelüftung der Lunge im Sinne einer chronischen alveolären Hypoxie.

Folge der umstrukturierten Gefäße ist die Fixierung und Verstärkung des pulmonalen Hypertonus, mündend in einer Rechtsherzbelastung, die bis zum Rechtsherzversagen führen und bei starker Vasokonstriktion zur in-situ-Thrombose reichen kann.

Genesefaktoren der pulmonalen Hypertonie sind in der nachfolgenden Darstellung aufgeführt (39, 50).

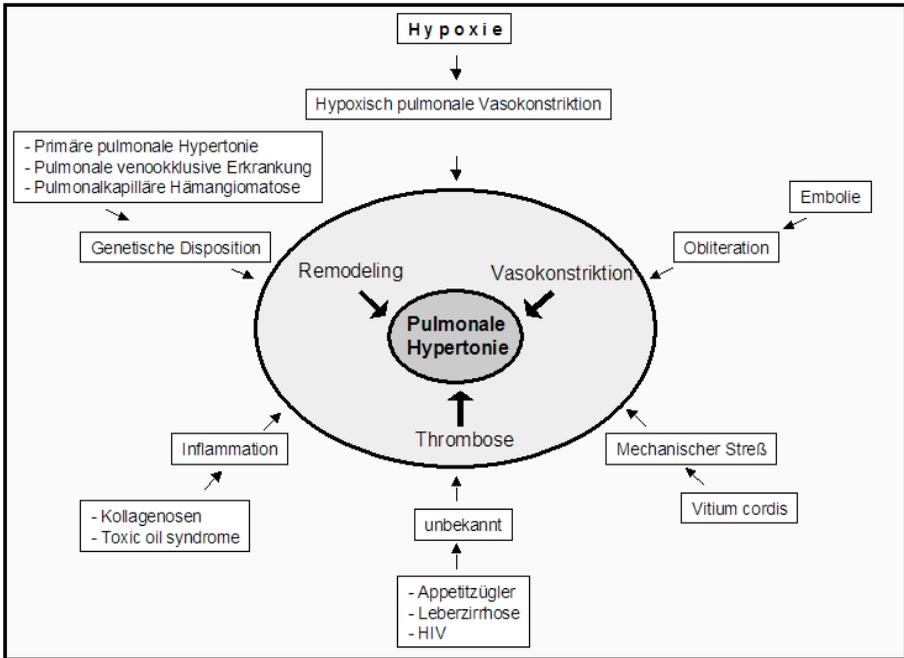


Abb. 6:
Pathogenese der pulmonalen Hypertonie (39, 50).

1.8 Die Beteiligung des HIF am pulmonalvaskulären Remodeling

Im Prozess des pulmonalvaskulären Remodeling, z.B. ausgelöst durch chronische Hypoxie, kommt es zur Verkleinerung des Gefäßlumens durch Neubildung von Muskelgewebe in ansonsten nicht muskularisierten Gefäßabschnitten der kleinen Pulmonalarterienäste sowie zur Verdickung von Tunica media und Adventitia (60). Die Zunahme der glatten Muskelzellen ist ein wesentlicher Faktor im vaskulären Remodeling neben dem Zuwachs der extra-

zellulären Matrix und der Ausbildung von Myofibroblasten (60, 53). Die Strukturveränderungen führen letztlich zum Anstieg des pulmonalarteriellen Widerstandes und damit zur pathologischen Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes. Das Ungleichgewicht von protektiven (Prostacyclin, NO-System) und aggressiven (Thromboxan, Endothelin) Faktoren unterhält die pathogenetische Entwicklung. Kompensatorisch reagiert das rechte Herz mit Hypertrophie der Muskelwand mündend in ein Cor pulmonale mit ungünstiger Prognose.

Die Hochregulation des HIF-1 sowie seiner Subtypen unter Hypoxie ist hinlänglich bekannt. Die zunehmende Aktivität des HIF-1 führt zu Veränderungen der Genexpression mit den Charakteristika Steigerung der anaeroben Energiebereitstellung und Optimierung der Gewebeoxygenierung (60, 62). Der HIF-1 spielt möglicherweise eine beträchtliche Rolle im Prozess des pulmonalvaskulären Remodelings.

Diese Annahme konnte durch Untersuchungen an heterozygoten HIF-1 α (+/-) und HIF-2 α (+/-) Knockout Mäusen gestützt werden. Es zeigte sich eine verzögerte bzw. ausbleibende Entwicklung der pulmonalarteriellen Hypertonie unter Hypoxie. Bei den HIF-1 α (+/-) Mäusen wurde im Gegensatz zur Vergleichsgruppe eine geringere Ausbildung von Polycytämie, rechtsventrikulärer Hypertrophie und pulmonalarterieller Hypertonie beobachtet. Die HIF-2 α (+/-) Mäuse zeigten unter Hypoxie keine Neigung zum pulmonalvaskulären Remodeling, ebenso konnte die beim Wildtyp festgestellte Zunahme von Endothelin-1 und Noradrenalin nicht festgestellt werden (104-106). Sowohl für Endothelin-1 wie auch für Noradrenalin ist ein Induktionsmechanismus über HIF-1 bekannt. Endothelin-1 ist ein typisches HIF-1 induziertes Zielgen mit pro-proliferativen und vasokonstriktiven Eigenschaften (107, 108). Als Wachstumsfaktor und potenter endogener Vasokonstriktor der pulmonalen Zirkulation bildet ET-1 einen der Hauptfaktoren in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie. So konnten Kim et al am Kanin-

chenmodell zeigen, dass die morphometrischen Veränderungen, die mit dem pulmonalvaskulären Remodeling einhergehen, durch Langzeitgabe eines nichtselektiven ET-1-Antagonisten verhindert werden konnten, außerdem zeigte sich in der BREATHE-1 Studie ein signifikanter Therapieeffekt bei Patienten mit primärer und Sklerodermie-assoziiierter pulmonaler Hypertonie (35, 39).

Ebenfalls wird dem alpha1-adrenergem System eine Rolle in der Entstehung der pulmonalen Hypertension zugeschrieben. Agonisten dieses Systems sind z.B. Norepinephrin, Appetitzügler und Kokain. SMC besitzen alpha1-adrenerge Rezeptoren, die der Zelle Kontraktion und Wachstum vermitteln. Zustände, die die Gen-Synthese des Rezeptors induzieren und somit für eine höhere Rezeptordichte und -aktivität sorgen oder die Konzentration von Rezeptoragonisten steigern, führen zur Entwicklung einer PH, ebenfalls einhergehend mit vaskulärem Remodeling (36).

Noradrenalin wird durch die Tyrosin-Hydroxylase synthetisiert, welche durch ein Hypoxie-sensitives Gen kodiert ist und über HIF induziert werden kann (109).

Zudem sind HIF abhängige Faktoren mit proliferativen sowie vasoaktiven Eigenschaften (z.B. ET-1, PDGF, ACE) bei pulmonaler Hypertonie vermehrt festgestellt worden (95, 96, 102, 103). Immunhistologische Analysen aus der Pulmonalarterie mit plexiformen Läsionen von an pulmonaler Hypertonie erkrankten Patienten ergaben neben der erhöhten HIF-1 α und HIF-1 β Expression ebenfalls erhöhte Werte von VEGF und VEGFR2 auf Protein- und mRNA-Ebene, so dass eine Beteiligung dieser Faktoren am pulmonalvaskulären Remodeling vermutet werden kann (110, 111).

Die Beteiligung von HIF am Remodeling wird zusätzlich durch Studien gestützt, welche die Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten unter Hypoxie betrachteten. Es konnte gezeigt werden, dass über HIF induzierte Wachstumsfaktoren die Proliferation dieser Zelltypen anregten (42). Ebenso zeigte sich in einer

anderen Untersuchung durch Unterdrückung der RNA von HIF-1 α und HIF-2 α , dass insbesondere durch HIF-2 α proliferative Prozesse vermittelt werden, wohingegen die Zellmigration von Fibroblasten sowohl durch HIF-1 α wie auch von HIF-2 α vermittelt wird (98). Ein relevanter Mechanismus der Steuerung von Hypoxie vermittelter Zellproliferation und Apoptose-Hemmung wurde in dem AT1R (Angiotensin II/Angiotensin II receptor type 1) und PI3-Kinase-(Phosphoinositid-3-Kinase)Signalweg erkannt. Durch Hypoxie wird sowohl ACE (Angiotensin-konvertierendes Enzym) wie auch AT1R induziert. Seit die Induktion von HIF-1 α durch Angiotensin II gezeigt werden konnte, wird ein positiver Rückkopplungsmechanismus zwischen AT1R/PI3-Kinase und der HIF-1 vermittelten Proliferation von Fibroblasten unter Hypoxie postuliert (16, 56, 99).

Eine weitere Beteiligung des HIF am pulmonalvaskulären Remodeling zeigt sich durch Faktoren, die durch HIF direkt oder indirekt am Remodeling beteiligt sind wie z.B. IGF (*Insulin-like-growth-factor*) oder PDGF (*Plateled derived growth factor*). Bei letzterem konnte im Experiment durch Hemmung des Faktors die pulmonale Hypertension ausgeglichen werden (95, 96, 100, 101).

Zusammengefasst existieren in Verknüpfung mit dem HIF etliche Untersuchungen zellulärer und molekularer Mechanismen, die eine maßgebliche Beteiligung dieses Faktors am pulmonalvaskulären Remodeling belegen.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die Transkriptionsfaktoren HIF mit den Subtypen HIF-1, HIF-2 und HIF-3 spielen auf der Ebene der Genregulation eine entscheidende Rolle für hypoxisch ausgelöste Anpassungsvorgänge. Für diese Faktoren wurde gezeigt, dass sie ihre Zielgene über ein konserviertes HRE (Hypoxie-responsives Element) ihrer regulatorischen DNA-Sequenzen aktivieren. Es sind gegenwärtig etwa 100 Hypoxie-abhängige Zielgene mit HRE beschrieben, die an der Regulation von z.B. Proliferation, Apoptose, Vasotonus und Zellmigration beteiligt sind.

Die Aktivierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren in Zellen von pulmonalarteriellen Gefäßen unter Sauerstoffmangel ist nicht gut bekannt. Kenntnisse darüber sind von Interesse, um insbesondere eine mögliche Rolle von HIF beim hypoxisch ausgelösten pulmonalvaskulären Remodeling aufzuklären.

Der Nachweis der Expression von Hypoxie-induzierbaren Faktoren kann auf mRNA Ebene und Proteinebene z.B. mit Hilfe von RT-PCR oder Western-Blot Analysen spezifisch für die einzelnen HIF-Subtypen durchgeführt werden. Auf transkriptioneller Ebene stehen als Methoden Elektromobilitäts-Shift-Analyse (EMSA) oder die Quantifizierung der Expression HIF-abhängiger Zielgene zur Verfügung. Eine weitere wesentlich empfindlichere Methode stellt der Reporter-Gen-Assay dar. Bei diesem Verfahren wird ein sensitiv quantifizierbares Reporter-Gen, das durch das HRE reguliert wird, mit Hilfe eines Plasmid-Vektors in Zellen transfiziert. Dadurch wird mit dieser Methode die Aktivierung aller HIF-Subtypen erfasst.

Der vorliegenden experimentellen Studie lagen die folgenden Zielsetzungen zugrunde:

- Es sollte eine quantitative Methode zur Messung hypoxischer Genaktivierung durch Hypoxie-induzierbare Faktoren etabliert werden.

Diese Methode sollte sodann zum Einsatz kommen, um eine hypoxisch induzierte HIF-abhängige Gen-Induktion an vaskulären Zellen der Pulmonalarterie und der Aorta zu messen.

Es wurden dabei folgende Ansätze verfolgt:

- Isolation und Kultivierung von glatten primären Muskelzellen und adventitiellen Fibroblasten aus der Pulmonalarterie und Aorta des Kaninchens.
- Etablierung und Optimierung eines HIF-spezifischen Reporter-Gen-Assays, bei dem ein sensitiv nachweisbares Reporter-Gen von einem HRE (Hypoxie-responsives Element) enthaltenem Promotor gesteuert wird. Dabei sollten vergleichend verschiedene Plasmide, die sich im Promotor und im HRE unterscheiden, konstruiert werden und zum Einsatz kommen.
- Transfektion dieser HIF-abhängigen Reporter-Plasmide in die genannten primär kultivierten Zellen, um die Induktion HIF-abhängiger Zielgene zu quantifizieren.

2 Methoden

2.1 Kaninchenpräparation

Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 2,5 und 3,5 kg und einem Alter von 4-5 Monaten wurden mit einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin (Verhältnis 3:2) analgosediert und mit 1000 IE Heparin pro kgKG antikoaguliert. Die Applikation erfolgte über einen gesicherten venösen Zugang in einer marginalen Ohrvene. Nach Erreichen einer ausreichenden Relaxation bei erhaltener Spontanatmung des Tieres wurde eine Lokalanästhesie des ventralen Halses mit 2%igem Xylocain ca. 3 cm unterhalb des Larynx durchgeführt. Danach konnte die Trachea schmerzfrei durch schichtweises Präparieren unter Schonung der großen Gefäße und des Nervus vagus mobilisiert werden. Nach Anlage eines Tracheostomas wurde eine endotracheal eingebrachte Trachealkanüle durch eine äußere Ligatur fixiert. Die Beatmung mit 30 ml Hubvolumen und einer Frequenz von 30/min erfolgte initial mit Raumluft und einem endexpiratorischen Druck von 1 cm H₂O. Bei nun gesicherter maschineller Beatmung wurde die Narkose über ca. 10 min bis zur völligen Analgesie unter palpatorischer Kontrolle der Herzfrequenz vertieft.

Daraufhin konnte die Haut durch Schnitte über dem Sternum und entlang der Rippenbögen weiträumig mobilisiert werden. Über eine Inzision im Epigastrium erfolgte eine Oberbauchlaparotomie, die Anklebung des Processus xiphoideus und die breite Eröffnung des Abdomens wurde entlang der Rippenbögen unter Schonung des Diaphragmas vorgenommen. Nach stumpfer Ablösung des Diaphragmas vom Sternum gelang die Eröffnung beider Pleurahöhlen ohne Lungenläsion. Es folgte eine mediane Sternotomie bei weiterhin beatmeten Lungen und die stumpfe Entfernung des Thymusgewebes. Im nächsten Schritt wurde das Perikard eröff-

net, Aorta und Pulmonalarterie wurden folgend mit je einem Faden angeschlossen.

Daraufhin wurde die Beatmung auf das normoxische Gasgemisch mit 4 % CO₂ umgestellt, um eine optimale pH-Wert-Einstellung unter bevorstehender kalter Perfusion der Lunge mit Bikarbonatgepuffertem Perfusionsmedium zu erreichen. Nach Inzision des rechtsventrikulären Ausflußtraktes des schlagenden Herzens folgte das sofortige Einbringen und Fixieren des pulmonalarteriellen Katheters (Innendurchmesser 4 mm) ohne Unterbrechung der Lungenperfusion. Der Katheter war mit 4°C kaltem Perfusat blasenfrei vorgefüllt, die Perfusion begann sofort mit einem Fluss von ca. 20 ml/min. Mit der beschriebenen Technik konnten Luftembolien der pulmonalen Strombahn weitgehend verhindert werden. Es schloss sich die Resektion der Spitze des linken Ventrikels an, damit sich kein Abflusswiderstand aufbauen konnte, der zur Erhöhung des pulmonalvaskulären Filtrationsdruckes mit konsekutivem Lungenödem hätte führen können. Danach erfolgte die Ligatur der Aorta proximal des Koronararterienabganges mittels des liegenden Fadens. Die Lunge war somit vollständig seitens der Perfusion und Ventilation vom Tierkörper isoliert, daraus resultierte die Tötung des Tieres in tiefer Narkose.

Nach Durchtrennung der Vena cava inferior und superior, des Oesophagus sowie der Aorta descendens konnte das Herz-Lungen-Paket unter vorsichtiger Lösung des mediastinalen Bindegewebes atraumatisch explantiert werden. Reste des Bindegewebes wurden extrathorakal entfernt.

Zum Zwecke der Zellisolierung der A-SMC (aortale glatte Muskelzellen) und A-FBC (aortale Fibroblasten) wurde die Aorta distal des Arcus aortae durchtrennt und in Isolationsmedium bei Raumtemperatur in einem Zentrifugenröhrchen für die Zeit der Zellpräparation gegeben (ca. 0,5 bis 1 Stunde).

Das explantierte Herz-Lungen-Paket des Kaninchens wurde mit Hilfe eines Metall-Ständers fixiert. Unter fortwährender Perfusion wurde das Herz um den Truncus pulmonalis, in dem sich der Perfusionskatheter befand, entfernt. Es erfolgte die weitere Präparation mit Entfernung des umgebenden Binde- und Fettgewebes um den Truncus pulmonalis und der rechten sowie linken Pulmonalarterie herum, so dass diese freigelegt vorlagen.

Anschließend wurde Perfusion und Beatmung der Lunge gestoppt. Beide Pulmonalarterien sind proximal der Lunge durchtrennt worden. Das Anschlussstück zur Perfusion der Lunge wurde aus dem Truncus pulmonalis entfernt.

Das Gefäßstück, bestehend aus dem Truncus pulmonalis mit den beiden Pulmonalarterien wurde ebenfalls in Isolationsmedium für die Dauer der sich anschließenden Zellpräparation gegeben.

2.2 Zellpräparationen

2.2.1 Pulmonalarterielle Zellpräparation (P-SMC und P-FBC)

Der Truncus pulmonalis mit den beiden Gefäßabgängen A. pulmonalis dexter und sinister wurde längs aufgeschnitten, so dass das Blutgefäß eine ypsilonförmige Fläche aufwies.

Unter geringer Dehnung wurde die Pulmonalarterie mit der Intima nach oben weisend auf einem Kunststoffbrett mit ca. 8 Kanülen fixiert. Zwischen den Arbeitsschritten wurde ständig Medium auf das Gewebstück geträufelt, um Schädigungen der Zellen zu vermeiden. Mit einem Skalpell wurde die Intima vorsichtig durch kratzende Bewegungen abgelöst. Mit einer Kompresse wurde die

Oberfläche abgetupft sowie mit Isolationsmedium gespült zum Zweck der Beseitigung von gelösten Zellen und Zellresten.

Folgend wurde mit dem Skalpell die Tunica muscularis mit einem ca. 5 mm langen Schnitt oberflächlich leicht eingeritzt. Durch die Fixierung unter leichter Spannung und der Elastizität des Gefäßes entstand ein Gewebsspalt. Mit einer Pinzette wurde die Tunica media am Rand des Spaltes gefasst und senkrecht zur Schnitt-richtung vorsichtig so viel Zug ausgeübt, bis sich ein Gewebstück aus der Tunica muscularis löste. Dieses wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen mit Isolationsmedium überführt. Dieser Prozess wurde wiederholt bis zur weitgehenden Entfernung der oberflächlichen Lagen der Tunica muscularis. Zuletzt wurden die Gewebstücke in dem Zentrifugenröhrchen mit einer Schere soweit wie möglich zerkleinert und dann auf einer 6-Well-Platte zur Kultur aufgebracht, mit Kulturmedium versehen und bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Raumluft inkubiert. Die P-SMC (pulmonalarterielle glatte Muskelzellen) wurden gesplittet, nachdem sie ein konfluentes Wachstum innerhalb von ungefähr zwei Wochen erreichten.

Zur Isolierung der P-FBC (pulmonalarterielle Fibroblasten) wurden die tiefer gelegenen Abschnitte der Tunica media mit Skalpell und Pinzette zunächst abgetragen. Stellenweise konnte so die Adventitia als hauchdünnes transparentes Gewebe freigelegt und herausgetrennt werden. Die präparierten Gewebstücke wurden in ein mit Isolationsmedium enthaltendes Zentrifugenröhrchen übertragen und dort mit einer Schere in möglichst kleine Stücke zerteilt. Folgend wurden die Gewebstücke auf einer 6-Well-Platte ausgesät, mit Kulturmedium bedeckt und bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Raumluft inkubiert. Die Kulturen bildeten innerhalb von ein bis eineinhalb Wochen einen Zellrasen.

2.2.2 Aortale Zellpräparation (A-SMC und A-FBC)

Der asservierte Aorta-Abschnitt wurde auf ein Kunststoffbrett gelegt und mit Isolationsmedium umspült. Folgend wurde das Gefäßstück mit einer Schere längs aufgeschnitten und mit der Intima nach obenweisend auf dem Brett ausgebreitet. Das Blutgefäß wies dadurch eine rechteckige Form auf und konnte mit je einer Kanüle an jeder Ecke unter leichter Dehnung fixiert werden. Dann wurde die Intima durch vorsichtiges Kratzen mit einem Skalpell und anschließendem Betupfen mit einer Kompresse sowie durch wiederholte Spülungen mit Isolationsmedium entfernt.

Folgend wurde die Tunica media mit einem Skalpell oberflächlich eingeritzt. Durch die elastische Eigenschaft des Gefäßes ergab sich durch die vorgedehnte Fixierung ein Gewebsspalt. Weiteres Kratzen mit dem Skalpell und Ziehen mit einer Pinzette an der Tunica media des Gewebsspalt, ermöglichte das Abtrennen der oberflächlich gelegenen Schichten von dem übrigen Gefäß. Es erfolgte der Transfer der Media-Gewebsstücke in ein Zentrifugenröhrchen. Dort wurden die Stücke mit einer Schere weiter zerkleinert. Anschließend wurden die Gefäßstücke auf eine 6-Well-Platte pipettiert, mit Kulturmedium bedeckt und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Raumluft inkubiert. Nach ca. zwei Wochen bildeten die A-SMC Kulturen einen Zellrasen und konnten gesplittet werden.

Zur Anzuchtung der A-FBC wurden die tiefer gelegenen Abschnitte der Tunica media mit Skalpell und Pinzette abgetragen, bis die Adventitia als hauchdünnes transparentes Gewebe abschnittsweise freigelegt werden konnte. Diese Abschnitte wurden herausgetrennt und in ein mit Isolationsmedium (3 ml) versehenem Zentrifugenröhrchen übertragen. Es folgte die Zerkleinerung mittels einer Schere in möglichst kleine Stücke. Folgend wurden die Gewebstücke auf einer 6-Well Platte ausgesät, mit Kulturmedium bedeckt und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Raumluft inkubiert. Die

Ausbildung eines Zellrasens konnte nach ungefähr ein bis eineinhalb Wochen beobachtet werden.

2.3 Zellkultur

Sowohl die FBC als auch die SMC wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Raumluft inkubiert. Beide Zelltypen wurden nach dem Anwachsen der Primärkulturen auf 12er, bzw. 6er Well-Platten gesplittet und auf 100 mm x 20 mm Zellkulturschalen überführt. Dort wurden sie mit 8 bis 10 ml Kulturmedium versorgt, welches 48-stündlich gewechselt wurde bis die Zellen eine konfluente Schicht bildeten.

Dann wurde der Arbeitsschritt des Splittens erneut erforderlich. Durch das Splitten entstanden Subkulturen der Ausgangspopulation. Um eventuellen strukturellen Veränderungen der Zellen durch Mutationen oder Anpassungsvorgänge vorzubeugen, wurden die Kulturen höchstens sechsmal gesplittet.

2.3.1 Identifizierung der Zellisolate

Die verwendeten Zelltypen konnten aufgrund ihrer ähnlichen morphologischen Struktur durch das bloße Auge nicht mit Sicherheit unterschieden werden, so dass ergänzend immunhistologische Methoden zur Differenzierung benutzt wurden. Durch Antikörper gegen muskelspezifisches alpha-Aktin und Myosin konnten die SMC nachgewiesen werden.

Deutliche Unterschiede bezüglich der unterschiedlichen Wachstumseigenschaften zeigten sich in der Primärkultur. Dabei konnte

stets ein schnelleres Wachstum der FBC im Vergleich zu den SMC beobachtet werden.

Ein weiteres Kriterium bildete die Formation der konfluenten Zellen in der Zellkulturschale. FBC wiesen meist mehrere Zentren auf, aus denen radiär Zellen aussprossen. SMC bildeten statt solcher „Keimzentren“ nach Ausbildung eines konfluenten Zellverbandes eher parallel angeordnete „Straßenformationen“.

2.3.2 Kultivierung von Zellen

Das Splitten diente dazu, eine bis zur Konfluenz gewachsene Zellpopulation auf mehrere Zellkulturschalen zu verteilen. Damit wurde dem Absterben der Zellkultur vorgebeugt und gleichzeitig die Möglichkeit gegeben, Subkulturen einer Population anzulegen.

Dazu wurde aus der 100 mm x 20 mm Zellkulturschale das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem und auf 37°C temperiertem Medium gewaschen. Dann wurde der Zellrasen mit 6 ml Trypsin-EDTA-Lösung (37°C) ange-daut, bis sich einzelne Zellen aus dem Verband lösten. Dieser Vorgang konnte unter dem Mikroskop beobachtet werden. Mechanisch wurde durch vorsichtiges Resuspendieren mit einer 10 ml Pipette die Reaktion unterstützt. Nachdem sich die Zellen nach ca. einer Minute in Lösung befanden, wurden sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt. In diesem wurde das Trypsin-EDTA durch 1 ml FCS inaktiviert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des Röhrchens bei 250 g und die Absaugung des Überstands. Das Pellet wurde in 30 ml Kulturmedium resuspendiert und gleichmäßig auf drei 100 mm x 20 mm Zellkulturschalen verteilt. Folgend wurden die Schalen wieder inkubiert.

2.4 Einfrieren von Zellen

Um ein fortwährendes Splitten und dem damit verbundenen Altern der Zellen entgegenzuwirken, konnten Zellpopulationen in flüssigem Stickstoff langfristig aufbewahrt werden.

Aus der Zellkulturschale wurde das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 37°C warmem, serumfreiem Medium gewaschen. Dann wurde der Zellrasen mit 6 ml Trypsin-EDTA-Lösung (37°C) angedaut, bis sich einzelne Zellen aus dem Verband lösten. Nachdem sich die Zellen in Lösung befanden, wurden sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt und dort mit 1 ml FCS inaktiviert. Es erfolgte die Zentrifugation des Röhrchens bei 250 g und die Absaugung des Überstands. Zum Pellet wurden 500 µl Einfriermedium1 (Raumtemperatur) hinzu gegeben. Das Pellet wurde resuspendiert und das Zentrifugenröhrchen für 5 Minuten in Eis gestellt.

Anschließend wurden 500 µl Einfriermedium2 (1°C) hinzu gegeben. Dann wurde die Zellsuspension mit einer Pipette in ein Kryoröhrchen pipettiert. Der Einfrierprozess erfolgte langsam und stufenweise. Um dies zu gewährleisten, wurde das Kryoröhrchen in einen Styroporkasten gestellt und bei -20°C für 2 Stunden gelagert. Dann erfolgte weiteres Kühlen auf -80°C für ca. 20 Stunden. Schließlich wurde das Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff gegeben.

2.5 Zellkultur-Medien

Primärmedium

- 0,1 % Pyruvat
- 0,5 % RDGF
- 1 % Glutamin
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 1 % Fungizone
- 16 % DMEM
- 20 % FCS
- 60,4 % Dulbecco`s MEM / Nut Mix F-12

Kulturmedium

- 0,1 % Pyruvat
- 1 % Glutamin
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 21,9 % DMEM
- 10 % FCS
- 66 % Dulbecco`s MEM / Nut Mix F-12

Versuchsmedium

- 0,1 % Pyruvat
- 1 % Glutamin
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 26,9 % DMEM
- 71 % Dulbecco`s MEM / Nut Mix F-12

Isolationsmedium

- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 1 % Fungizone
- 40 % DMEM+HEPES 25 MM
- 58 % DMEM

Einfriermedium1

- 90 % Primärmedium
- 10 % HEPES (pH 7,4)

Einfriermedium2

- 80 % Einfriermedium1
- 20 % DMSO

2.6 Reporter-gen-Assay

In die zu untersuchenden Zellen wurden Plasmidkonstrukte mittels Liposomentechnik eingebracht. Diese Konstrukte trugen eine Promotor-Region über die sie aktiviert wurden und codierten für ein nicht physiologisch in der Zelle vorkommendes Protein, welches spezifisch gemessen werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden dazu zwei unterschiedliche Luciferasen benutzt: Die PFL (*Firefly*-Luciferase aus *Photinus pyralis*) und die PRL (*Renilla*-Luciferase aus *Renilla reniformis*). Sie haben den Vorteil, dass sie neben oben genannten Bedingungen unabhängig voneinander aus einer Probe gemessen werden können. Mit ihrer Hilfe konnten so zwei Plasmidkonstrukte pro Zelltyp transfiziert werden, deren Aktivitäten im Anschluß sensitiv gemessen werden konnten.

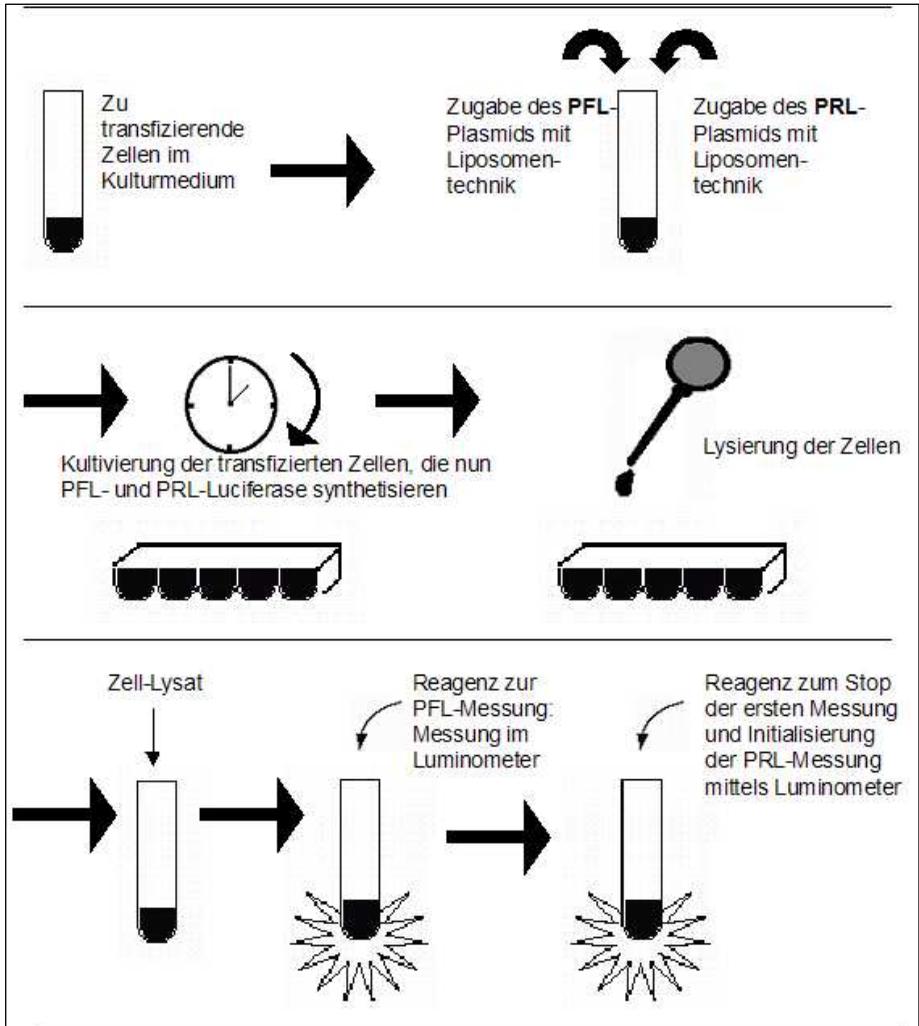


Abb. 7:
Schaubild zur Erläuterung des Reportergen-Assay.

2.7 Plasmidkonstrukte für den Reportergen-Assay

Ein DNA-Fragment (981bp) des VEGF der Ratte, beinhaltend die HRE-Sequenz, wurde mittels PCR konstruiert. Die dabei verwendeten Primer Pvegfprom (aactcgaggaacaagggcctctgtctgccag) und Mvegfprom (aagaattcaagcctctgcgcttctcaccgg) beinhalteten die Restriktionsstellen XhoI und EcoRI. Das Fragment wurde in ein pGL3-Plasmid (Fa. Promega), welches die *Firefly*-Luciferase beinhaltete, eingefügt. Die Plasmidintegrität wurde mittels Sequenzierung überprüft (ABI Prism 310, Perkin Elmer). In vorliegender Arbeit ist dieses Konstrukt folgendermaßen bezeichnet: PFL-VEGF.

Zwei weitere hypoxisch induzierbare Plasmide wurden über ein dreier Tandem der HRE-Sequenz (gccctacgtgtctca) des Erythropoetin-Gens präpariert, zum einen angekoppelt an den SV40 (Simian Virus 40) Promotor, zum anderen angekoppelt an den Herpes Simplex Thymidin-Kinase Promotor (TK). Diese Konstrukte wurden wie folgt bezeichnet: PFL-HRE-SV40, PFL-HRE-TK (siehe Abb. 13).

PFL-HRE-SV40

- Simian Virus 40 Promotor
- 3er Tandem der HRE-Sequenz aus dem Erythropoetin Gen
- *Firefly*-Luciferase aus *Photinus pyralis*

PFL-HRE-TK

- Herpes Simplex Thymidin-Kinase Promotor
- 3er Tandem der HRE-Sequenz aus dem Erythropoetin Gen
- *Firefly*-Luciferase aus *Photinus pyralis*

PFL-VEGF

- VEGF-Sequenz der Ratte, beinhaltend eine HRE-Sequenz
- *Firefly*-Luciferase aus *Photinus pyralis*

PRL-TK

- Keine HRE-Sequenz
- Herpes Simplex Thymidin-Kinase Promotor
- *Renilla*-Luciferase aus *Renilla reniformis*

2.8 Transfektion der Versuchszellen mit Plasmiden

24 Stunden vor Transfektion der Plasmidkonstrukte mit Liposomentechnik wurden die Versuchszellen auf eine 48er-Well-Platte ausgesät. Es kam regelhaft zum Wachstum eines Zellrasens mit einer ca. 50-prozentigen Konfluenz am Transfektionstag.

Die Transfektion der Plasmide erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers des Lipofectamine Plus Reagent (Fa. Promega).

Oben aufgeführte Plasmide wurden cotransfiziert in einem molaren Verhältnis von 5:1 mit einem PRL-TK Plasmid, beinhaltend die *Renilla*-Luciferase unter Kontrolle des Herpes Simplex Thymidin-Kinase Promotors.

2.9 Transfektionsnachweis über das grün fluoreszierende Protein (GFP)

Eine Kontrollgruppe von Zellen wurde jeweils mit GFP transfiziert, so dass die erfolgreiche Transfektion unter Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnte.

2.10 Experimentelles Protokoll: Inkubation der Versuchszellen

Die Zellen wurden zur Transfektion auf eine 48er Well-Platte gleichmäßig gesplittet und nach Kapitel 2.8 transfiziert.

Für jedes Plasmidkonstrukt lagen je zwei Wells für die Normoxie- bzw. Hypoxiegruppe vor. Kontrollgruppen wurden für jede Zellart in gleicher Anzahl durch nicht transfizierte Zellen in der Normoxie- bzw. Hypoxiegruppe gebildet.

Die Zellen wurden nach der Plasmid-Transfektion mit serumfreiem Medium (37°C) zweimal gewaschen, dann mit Versuchsmedium versehen (37°C, 300 µl pro Well) und für 16 Stunden inkubiert.

Dabei musste die Hypoxiegruppe zur analogen Behandlung gesondert in einem 94 cm x 94 cm x 64 cm großen Kunststoffbeutel, welcher als „Hypoxieschleuse“ diente, überführt werden. Alle zur Bearbeitung der hypoxischen Zellen notwendigen Werkzeuge und Materialien wurden zuvor in den Kunststoffbeutel eingebracht (Hypoxiekammer, Waschmedium, hypoxisch konditioniertes Versuchsmedium, Pipetten, Sauger etc.). Die hypoxischen Bedingungen im Beutel wurden durch Auswaschung der Beutel-Luft mit Stickstoff erreicht. Mittels Kontrollmessung wurde eine Sauerstoffkonzentration von 1 % eingestellt.

Die Inkubation der hypoxischen Gruppe erfolgte bei einer Temperatur von 37°C und Gaskonzentrationen von 5 % CO₂, 1 % O₂, Rest Stickstoff in einer Hypoxiekammer. Kontrollmessungen des Kulturmediums ergaben O₂-Konzentrationen zwischen 3 bis 5 %.

Nach 16 Stunden wurden die Inkubation und der Zellstoffwechsel der normoxischen wie hypoxischen Versuchszellen gestoppt, indem die Well-Platten auf Eis gestellt und mit 4°C temperiertem PBS 1x gewaschen wurden.

Dann erfolgte die Lyse der Zellen mit dem *Lysis-Buffer* des *Luciferase-Assay-Systems* (Promega). Anschließend konnten die Proben bei -20°C bis zur Analyse kurzfristig (< 30 Tage) gelagert werden.

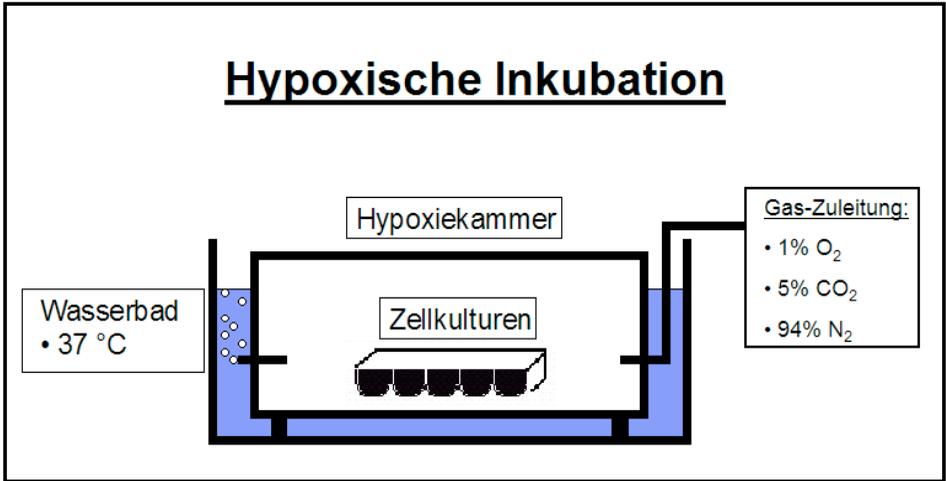


Abb. 8:

Schematischer Aufbau der hypoxischen Zell-Inkubation, Gaszufuhr reguliert über ein Zeitschaltuhr-gesteuertes Ventil.

Vor der Versuchsdurchführung wurde für die hypoxische Versuchsgruppe Versuchsmedium auf hypoxische Gaskonzentrationen konditioniert.

Dazu wurde die für den Versuchsumfang benötigte Menge an Medium in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und mit einem hypoxischen Gasgemisch (1 % O_2 , 5 % CO_2 , Rest N_2) über einen im Medium liegenden Schlauch begast. Der CO_2 -Anteil im Gasgemisch wurde benötigt, um den pH-Wert des Mediums im zellphysiologischen Bereich einzustellen. Das Medium wurde solange begast, bis eine O_2 -Konzentration unter 5 % gemessen werden konnte. Anschlie-

ßend wurde das Zentrifugenröhrchen mit einem Schraub-Deckel verschlossen.

Um die angestrebten hypoxischen Versuchsbedingungen sicher zu erreichen, wurde eine engmaschige Kontrolle der Versuchsbedingungen eingehalten.

Kontrolliert wurden Kulturmedium der hyp- und normoxischen Gruppe in Bezug auf O₂-und CO₂-Konzentration, Temperatur und pH-Wert durch den Versuch begleitende Messungen.

Die Gasanteile innerhalb der Hypoxiekammer bezüglich der O₂- und CO₂-Konzentrationen wurden ebenfalls durch engmaschige Messungen während der Versuchszeiten überwacht.

3 Materialien

3.1 Präparationsmaterial

- Perfusionskatheter Eigenbau aus Kunststoffschlauch und –anschlußstück
- Präparationsbesteck (Scheren, etc.) Fa. Aesculap
- Mullkompressen 10 cm x 12 cm Fuhrmann Verbandstoffe GmbH, Much, Deutschland
- Mulltupfer 20 cm x 20 cm, pflaumengroß Karl Beese GmbH & Co., Barsbüttel, Deutschland
- Durapore, Medizinische Pflaster 3M Health Care, Borken, Deutschland
- Lupe, biokular, Leica MS 5 Fa. Leica
- Mikro-Feder-Schere Fa. Aesculap
- Mikro-Pinzette Martin Instruments
- Beatmungspumpe Modell 6025 UGA BASILE, Italy
- Micro-Flo, Perfusionsbesteck mit Flügel DKS, Italy
- Microlance, sterile Kanülen Becton, Dickinson & Company, New Jersey, USA
- Intrafix Air, Infusionsbesteck B. Braun Melsungen AG, Deutschland
- 3-Wege-Hahn, Connecta Plus 3 OHMEDA, Helsingborg, Sweden

Materialien

- Disposable Scalpel, No. 20 pfm- Produkte für die Medizin AG, Köln, Deutschland
- Elektrolyt-Lösung I/3 Serag-Wiesner KG, Naila, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat 8,4 % Baxter Deutschland GmbH
- Xylocain 2 % Astra GmbH, Wedel, Deutschland
- Liquemin N 25000 Hoffmann La Roche AG
- Rompun 2 %, Injektionslösung BayerVital GmbH & Co. KG
- Ketavet 100 mg/ml Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland

3.2 Zellkulturmaterial

- Kryoröhrchen Corning Incorporated, USA
- Fungizone (Amphotericin B) GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Scotland
- Gewebekulturflasche 48well, steril Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- Acrodisc, Syringe Filters 0.8/0.2 µm PALL Corporation, USA
- 50 ml Centrifuge Tubes, Polypropylene Corning Incorporated, USA
- PP-Röhrchen, 15 ml Greiner Labortechnik, USA
- Cell Culture Dish, 100 mm x 20 mm Style Corning Incorporated, USA
- Multiwell Tissue Culture Plate, 12 Well Becton, Dickinson & Company, New Jersey, USA
- Costar 6 Well, Tissue Culture Treated Corning Incorporated, USA
- Pipettenspitzen Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- Aqua ad injectabile Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
- Isotone Natrium-Chlorid-Lösung 0,9% B. Braun Melsungen AG, Deutschland
- Einmalspritzen B. Braun
- Steritop, Vacuum Driven Disposable Millipore, Bedford Bottle Top Filter, 0.22 µm

- 24 Well Cell Culture Cluster Corning Incorporated, USA
- DMEM PAN Biotech GmbH
- DMEM+HEPES 25 MM PAN Biotech GmbH
- RPMI 1640 PAN Biotech GmbH
- Dulbecco`s MEM / Nut Mix F-12 GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Scotland
- Sodium Pyruvate Solution PAA Laboratories GmbH, Austria
- Trypsin-EDTA (Solution 10x) GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Scotland
- Penicillin-Streptomycin GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., (10000 IU/ML – 10000 UG/ML) Scotland
- L-Glutamin (200mM) PAN Biotech GmbH
- Foetal Calf Serum PAA Laboratories GmbH, Austria
- Gentamicin, 50 MG/ML GIBCO BRL, Life Technologies Ltd., Scotland
- Endothelzellwachstumsfaktor (RDGF) Eigene Herstellung aus Rinder-
augenretina
- Dimethyl Sulfoxide 99,5 % Sigma Aldrich GmbH
- HEPES 200 MM Sigma Aldrich GmbH

3.3 Apparate zur Zellkultivierung

- IR 1500 Automatic CO₂ Incubator Flow Laboratories GmbH

- Zentrifuge, Rotanta RP Fa. Hettich
- GELAIRE BSB 4A (sterile Arbeitsbank) Flow Laboratories GmbH

3.4 Apparate zur Versuchsdurchführung

- Hypoxiekammer Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH
- Acid-Base-Laboratory, ABL 330 Radiometer Copenhagen
- Gasgemische Messer Griesheim, Deutschland
- Wasserbad Memmert
- Kunststoffbeutel Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, (Sekuroka-Glove-Bags), Deutschland
- Ventil Typ Z110A V12 W13 Sirai

3.5 Materialien für den Reporteragen Assay

- Dual-Luciferase Reporter Assay System Promega, USA
- Firefly-Luciferase Plasmid pGL3- Promega, USA
- Renilla-Luciferase pRL-TK Promega, USA
- LipofectAMINE PLUS GIBCO BRL, Life Technologies

Materialien

- | | |
|--|--|
| Reagent | Ltd., Scotland |
| • Green fluorescent protein (GFP) | Promega, USA |
| • Sequenzer | ABI Prism 310, Perkin Elmer |
| • Plasmidkonstrukte | Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jörg Hänze, Arbeitsgruppe Respiratorische Insuffizienz, Justus-Liebig-Universität Gießen |
| • Bioluminometer „Micro-Lumat LB 96 P“ | EG&G Berthold |

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde ein dualer Reporter-gen-Assay etabliert, mit dem die HIF-abhängige Genregulation in pulmonalarteriellen und aortalen Gefäßzellen quantitativ untersucht wurde.

Dazu wurden glatte Muskelzellen und adventitielle Fibroblasten aus der Pulmonalarterie und Aorta des Kaninchens isoliert und kultiviert. Anschließend wurden die Reporter-gen-plasmide in diese Zellen transfiziert und die Aktivität des Reporter-gens nach norm-oxischer sowie hypoxischer Zell-Kultivierung quantitativ analysiert. Der Ergebnisteil ist entsprechend strukturiert. Zunächst wird die Isolierung und Kultivierung der vaskulären Zellen dargestellt, dann die Plasmid-Transfektion der Zellen sowie die Untersuchungen mit Hilfe des Reporter-gen-Assays.

4.1 Isolierung von aortalen und pulmonalvaskulären SMC und FBC

Eine typische Darstellung der Isolation und Kultivierung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten ist in Abb. 9 und Abb. 10 illustriert. Nach Präparation von Zellschichten aus der Tunica Adventitia und Tunica Muskularis aus Pulmonalarterie oder Aorta wurden die Zell-Präparate kultiviert. Es zeigte sich, dass Zellen der Tunica adventitia nach der Isolation schneller proliferierten als Zellen der Tunica muscularis. Weiterhin ergab sich in der Zellkulturschale ein differentes Bild: SMC zeigten im Zustand der Konfluenz eine Konfiguration, welche nahezu an nebeneinander parallel geordnete Zellstränge („Straßenformation“) erinnerte, während FBC ein herdartiges Proliferationsverhalten mit Bildung von „Kreisformationen“ aufwies. Zusätzlich wurden die Zellen mit immunhistochemischen Methoden (Abb. 11) charakterisiert. In SMC konnte das

Muskel-spezifische α -Actin nachgewiesen werden, während diese Anfärbung in FBC wesentlich schwächer war. Diese Charakterisierung bestätigt die Identität der verschiedenen kultivierten Zelltypen. Nach einer Vermehrungsphase der Kulturen mit zweimaligem Umsetzen auf neue Kulturschalen wurden die Experimente durchgeführt.



Abb. 9:
Pulmonalvaskuläre Muskelzellen, Ansicht unter Phasenkontrast, hier noch nicht konfluent.



Abb. 10:
Phasenkontrastansicht von pulmonalvaskulären Fibroblasten in Kultur. Gut erkennbar ist die herdartige Proliferation mit Bildung von „Kreisformationen“ unter Konfluenz der Zellen.

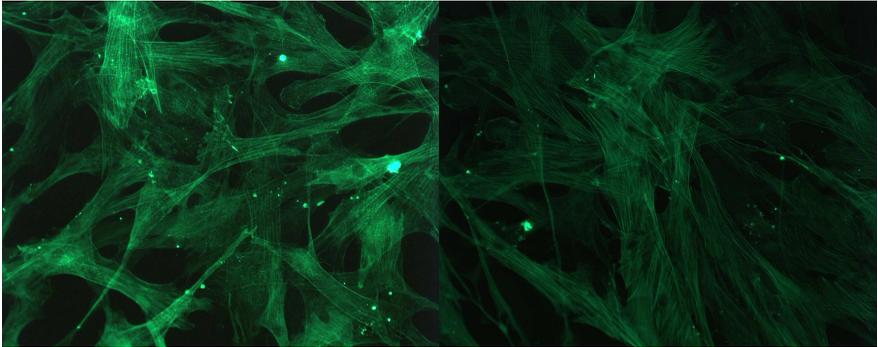


Abb. 11:

Immunzytochemische Anfärbung von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (links) und Fibroblasten (rechts) mit Hilfe eines Antikörpers gegen α -Aktin. SMC zeigen eine deutliche intrazelluläre Markierung der α -Aktin Filamente, während FBC nur vergleichsweise schwache Anfärbungen aufweisen.

4.2 Plasmid-Transfektion

Um den Reporter-Gen-Assay zur Untersuchung der Fragestellung nutzen zu können, wurde eine geeignete Methode erarbeitet, Plasmid-DNA in die vaskulären Versuchszellen zu transfizieren. Dies konnte durch Verwendung von kationischen Lipiden erreicht werden.

Zur Kontrolle des Transfektionserfolgs (siehe 2.9) wurde zunächst ein grün fluoreszierendes Protein-Plasmid (GFP-Plasmid) eingesetzt. Dieses Plasmid kodiert für ein Protein, das in einem bestimmten Lichtwellenlängen-Bereich anregbar ist und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann. Es ist ein Marker für die erfolgreiche Transfektion. Die GFP-Plasmid-Transfektion der Zellen mit kationischen Lipiden ist in Abb. 12 gezeigt.

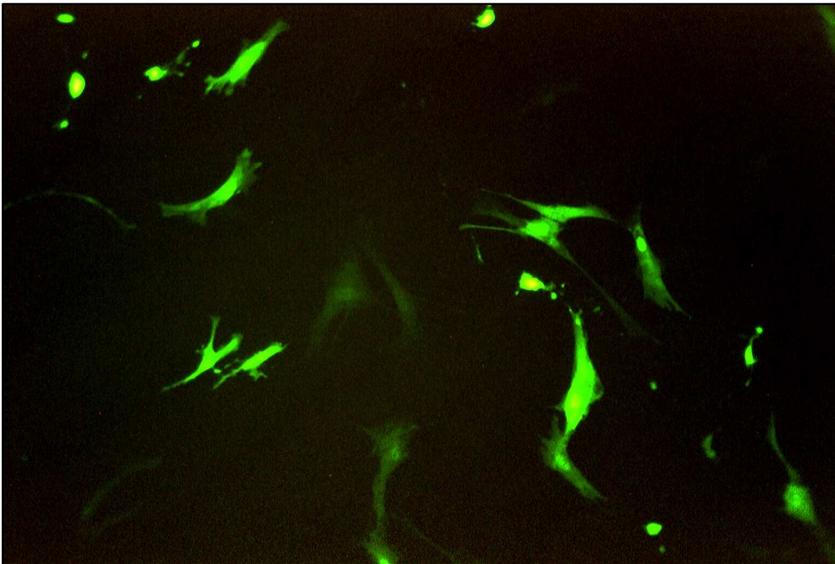


Abb. 12:
Fluoreszenz-mikroskopische Ansicht pulmonalarterieller Fibroblasten 24 Stunden nach Transfektion mit GFP-Plasmid.

4.3 Quantifizierung HIF-abhängiger Genregulation durch den Einsatz von Reporter-Gen-Plasmiden

Aufgrund des Nachweises von HIF in vaskulären Zellen sollte eine Methode erarbeitet werden, die eine Induktion des HIF in vaskulären Zellen quantitativ erfassen konnte. Dazu wurden 4 verschiedene Reporter-Plasmide konstruiert:

Eingesetzt wurden die *Firefly*- und die *Renilla*-Luciferase als Reportergene. Die *Renilla*-Luciferase wurde durch einen nicht Hypoxie-abhängigen Promotor (TK) kontrolliert. Die *Firefly*-Luciferase hingegen stand unter der Kontrolle eines Promotors, der das HRE (Hypoxie-responsives Element) enthielt und somit hypoxisch reguliert wurde.

Für alle drei bekannten HIF-Faktoren ist gezeigt worden, dass sie die HRE Konsensus-Sequenz aktivieren können. Es kamen verschiedene Hypoxie sensitive *Firefly*-Luciferasekonstrukte vergleichend zum Einsatz. Bei zwei artefiziellen Konstrukten wurde das HRE des humanen Erythropoetin Gens in dreifacher Tandem Anordnung entweder an den TK Promotor oder an den SV40 Promotor ligiert. In einem weiteren Konstrukt wurde ein ca. 1,5 kb Fragment des VEGF Promotors eingesetzt, welches ein dem Erythropoetin-Gen verwandtes, jedoch nicht identisches HRE enthielt.

Zur Anwendung kam ein duales Reporter-Gen-Verfahren, bei dem jeweils ein Hypoxie-abhängiges *Firefly*-Luciferase Plasmid mit einem Hypoxie-unabhängigen *Renilla*-Luciferase Plasmid in die Versuchszellen cotransfiziert wurde. Das *Renilla*-Luciferase-Plasmid diente dabei als Referenz für die spezifische Messung einer hypoxischen Induktion, da es im Unterschied zu den *Firefly*-Luciferase-Plasmiden kein HRE besitzt. Außerdem wurden mögliche Abweichungen der experimentellen Prozedur wie eine unterschiedliche Zelldichte oder eine variierende Transfektionseffizienz durch das Verfahren der Cotransfektion ausgeglichen.

Die mit Reporterplasmiden transfizierten Zellen wurden in Hypoxie bzw. Normoxie kultiviert, die Reporter-Gen-Aktivitäten für *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase wurden anschließend gemessen. Das errechnete Verhältnis der Aktivität von *Firefly*- zur *Renilla*-Luciferase lieferte ein Maß für die durch das HRE (Hypoxie-responsive Element) induzierte hypoxische Geninduktion. Die relevanten Abschnitte der Plasmide sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 13).

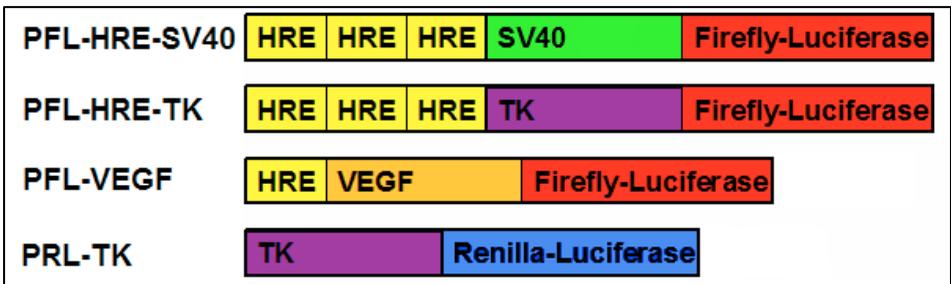


Abb. 13:

Schematische Darstellung der verwendeten Plasmidkonstrukte (nicht maßstabsgetreu). Es ist jeweils der Promotorbereich gezeigt, der die kodierende Region für das daran anschließende Reporter-Gen (*Firefly*- oder *Renilla* Luciferase) reguliert.

Abkürzungen:

- TK: Thymidine Kinase: Promotor von Herpes Simplex
- SV40: Early Promotor von Simian Virus 40
- VEGF: Promotor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors
- HRE: Hypoxie-responsives Element

4.4 Quantifizierung hypoxischer Genregulation durch HRE-Plasmidkonstrukte

Die Reporter-Plasmide wurden in die aortalen, bzw. pulmonalarteriellen FBC und SMC transfiziert. Mit der in einem molaren Verhältnis von 5:1 erfolgten Cotransfektion des PRL-TK-Plasmids, welches keine HRE-Sequenz beinhaltetete, konnte durch den TK-Promotor eine von HRE unabhängige Basis-Induktion gemessen werden.

Die aus dem Zell-Lysat mit Biolumineszenz gemessenen Werte der Firefly- und Renilla- Luciferase wurden durch Quotientenbildung ins Verhältnis gesetzt. Diese Werte sind ein Maß für die HRE-abhängige Geninduktion in Hypoxie.

Alle Plasmidkonstrukte zeigten eine Induktion in Hypoxie an. (Abb.14). Das PFL-HRE-TK erwies sich dabei insgesamt als das sensitivste Konstrukt zum Nachweis der Geninduktion in Hypoxie.

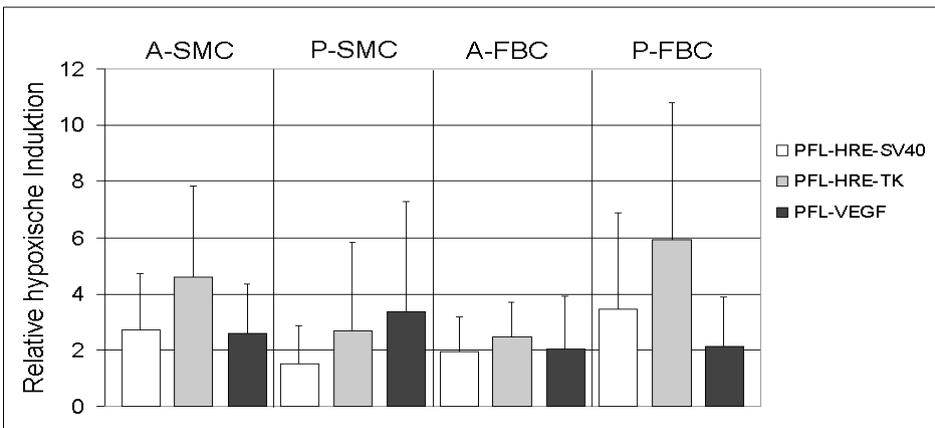


Abb. 14:

Darstellung der relativen hypoxischen Induktion der Plasmidkonstrukte in den Versuchszellen A-SMC (aortale glatte Muskelzellen), P-SMC (pulmonalarterielle glatte Muskelzellen), A-FBC (aortale Fibroblasten), P-FBC (pulmonalarterielle Fibroblasten).

In einer weiteren vergleichenden Darstellung derselben Daten wurden die verschiedenen Zellen bezüglich der HRE-abhängigen hypoxischen Induktion nach den Plasmiden geordnet.

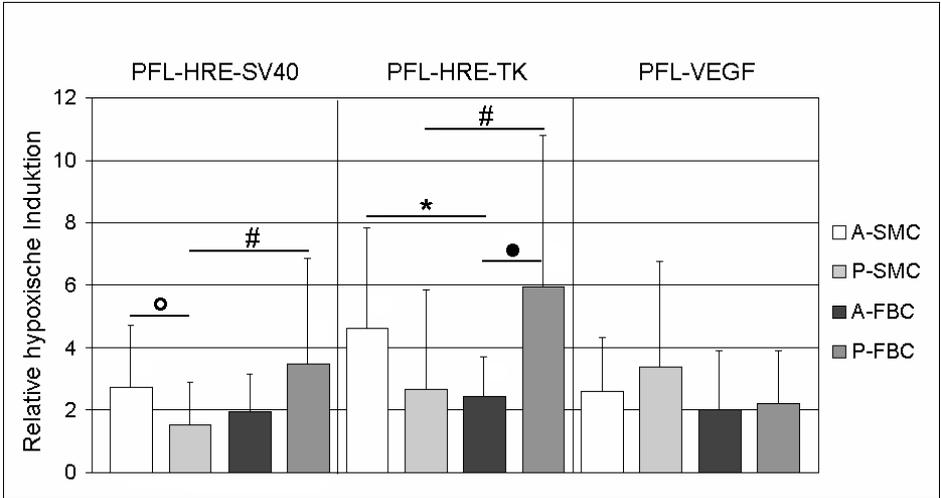


Abb. 15:

Darstellung der relativen hypoxischen Induktion in den Versuchszellen, hier Gliederung nach Plasmidkonstrukten:

° Signifikante Differenz A-SMC zu P-SMC
($N = 24$, $p < 0,05$, gepaarter t-Test)

Signifikante Differenz P-FBC zu P-SMC
($N = 20$, $p < 0,05$, gepaarter t-Test)

* Signifikante Differenz A-SMC zu A-FBC
($N = 20$, $p < 0,05$, gepaarter t-Test)

• Signifikante Differenz P-FBC zu A-FBC
($N = 24$, $p < 0,05$, gepaarter t-Test)

Innerhalb der Plasmidgruppen PFL-HRE-SV40 und PFL-HRE-TK zeigt sich in der graphischen Darstellung ein sehr ähnliches hypoxisches Induktionsmuster: Die stärkste Induktion war in P-FBC

gefolgt von A-SMC zu beobachten, eine vergleichbare Induktion in P-SMC und A-FBC.

Signifikant zeigt sich nach gepaarter t-Test-Analyse der Unterschied in der hypoxischen Aktivierung der P-FBC zu P-SMC innerhalb der Plasmidgruppen PFL-HRE-SV40 und PFL-HRE-TK.

In A-SMC werden die Plasmide PFL-HRE-SV40 und PFL-HRE-TK stärker induziert als in P-SMC, eine Signifikanz zeigt sich dabei bei dem PFL-HRE-SV40-Plasmid.

Des Weiteren werden in A-SMC alle Plasmide stärker induziert als in A-FBC mit Signifikanz in der PFL-HRE-TK-Gruppe.

In P-FBC zeigt sich beim PFL-HRE-TK-Plasmid die stärkste Induktion aller Plasmidgruppen, innerhalb der PFL-HRE-SV40-Plasmidgruppe stellt sich die Induktion bei diesem Zelltyp ebenfalls maximal dar. Alle Plasmidgruppen wurden in P-FBC stärker induziert als in A-FBC mit Signifikanz in der PFL-HRE-TK-Gruppe.

Innerhalb der PFL-VEGF-Gruppe zeigen sich nach gepaarter t-test-Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zellen.

5 Diskussion

5.1 Isolation und Kultivierung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten aus der Pulmonalarterie und Aorta des Kaninchens

Ziel war es, Blutgefäßzellen der Aorta und Pulmonalarterie aus den angestrebten histologischen Schichten (Tunica mucularis, Tunica adventitia) zu gewinnen. Die Zellen wurden mit Hilfe von Markern und auf Grund ihres Proliferationsverhaltens charakterisiert.

Eine rein mikroskopische Differenzierung der Isolate von FBC oder SMC gelingt aufgrund der sehr großen morphologischen Ähnlichkeit der beiden Zelltypen nicht zuverlässig. Folgende Aspekte fanden Berücksichtigung, um einerseits Fehlisolate aus Nachbarschichten zu vermeiden und um andererseits diese unter Zellkultur zu detektieren:

- Das Isolationsgewebe wurde sorgfältig aus eindeutig zuzuordnenden Gewebsschichten gewonnen, Isolate aus Grenzbereichen der Schichten wurden vermieden.
- Die Zellmorphologie wurde mittels immunhistologischer Differenzierungsmethode (Antikörper gegen muskelspezifisches alpha-Aktin und Myosin) überprüft.
- Wachstumsdifferenzen zeigten sich insbesondere in der Primärkultur bezüglich der Eigenschaften Wachstumsgeschwindigkeit und Wachstumsformation:
 - SMC bildeten bei Konfluenz in der Kulturschale einen Zellrasen mit „Straßenformationen“ aus parallel verlaufenden Zellsträngen und proliferierten langsamer im Vergleich zu FBC.
 - FBC zeigten vermehrt ein radiäres, herdförmiges Wachstumsbild mit Bildung von Kreisformationen

unter Konfluenz. Deutlich zeigte sich die schnellere Zellvermehrung im Vergleich zu den SMC, da ein Splitten der FBC früher vorgenommen werden musste als bei zeitgleich isolierten SMC.

Die Zellkulturphase wurde insgesamt kurz gehalten, eine regelmäßige Kontrolle und Pflege der Zellen erfolgte, um morphologische wie funktionelle Veränderungen der Zellen zu vermeiden. Bis zur Einbringung in den Versuch wurden Versuchszellen höchstens bis zu sechsmal gesplittet. Morphologische Veränderungen waren unter Zellkultur nicht zu beobachten. Im Rahmen der dargestellten Bedingungen und durch die Sorgfalt der Präparation, sowie aufgrund der zytologischen Charakterisierungen ist davon auszugehen, dass die isolierten Zellpopulationen FBC und SMC erfolgreich separiert wurden.

Untersuchungen an pulmonalvaskulären SMC und FBC legen jedoch nahe, dass auch innerhalb der Zelltypen (SMC, FBC) Subpopulationen existieren, deren Eigenschaften z.B. auf hypoxischen Reiz differieren und auch morphologische Umstrukturierungen zur Folge haben (31, 51). Vor diesem Hintergrund ist zu vermuten, dass die hier untersuchte HIF-Aktivierung durch Hypoxie die Zellgesamtheit inklusive der Subpopulationen einer Schicht erfasst.

Grundsätzlich zeigt diese Arbeit somit auf, inwiefern in den hier untersuchten Gefäßzellen der Pulmonalarterie und Aorta eine Genaktivierung über HIF nach hypoxischem Stimulus stattfindet.

5.2 Etablierung eines HIF-spezifischen dualen Reporter- Assays

Zunächst wurde ein schonendes Transfektionsverfahren ausgewählt, welches sowohl für SMC als auch für FBC gute Plasmid-Transfektionsraten ermöglichte. Dies gelang durch Verwendung eines kommerziell erhältlichen kationischen Lipids.

Die Transfektion wurde dabei mit Hilfe eines Plasmids kodierend für das grün fluoreszierende Protein (GFP) getestet, das mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wurde (Abb. 12).

Des Weiteren wurden zur Untersuchung der Fragestellung Plasmide konstruiert, welche über HIF-spezifische Bindestellen mit dem darin enthaltenem HRE in unterschiedlicher Anzahl verfügten und mit verschiedenen Promotoren gekoppelt waren (siehe Kapitel 2.7). Da jedoch alle HIF-Subtypen an das HRE binden können, kann keine Aussage darüber getroffen werden, durch welchen HIF-Subtyp die beobachteten Effekte vermittelt wurden.

Dabei wurde deutlich, dass die Transfektionsrate sowie die Gesamtzellzahl in einer transfizierten Zellkultur von Mal zu Mal stark variierten. Dies warf Probleme in der Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen auf, insbesondere der angestrebte direkte quantitative Vergleich der Gruppen war nicht möglich.

Daher wurde das Verfahren der Cotransfektion zweier unabhängiger Plasmide verwendet. Dabei wurde der Ansatz verfolgt, dass eines der Plasmidkonstrukte nach erfolgreicher Transfektion stetig exprimiert wurde (PRL-Plasmid) und somit ein Maß für die Transfektionsrate existierte. Das zusätzlich cotransfizierte Versuchsplasmid (PFL-Gruppe) konnte dann ins Verhältnis zu dem PRL-Plasmid gesetzt werden.

Unter der Annahme, dass die cotransfizierten Plasmide jeweils im gleichen Verhältnis zueinander transfiziert wurden, war es so möglich, trotz variierender Gesamtzellzahlen und Transfektionsra-

ten, die Hypoxie-Induktion der Plasmidkonstrukte in den Versuchszellen quantitativ zu vergleichen.

Bedeutender Vorteil der Reporter-Gen-Assay-Technik ist die hohe Empfindlichkeit der Methode und die Spezifität, die über das HRE vermittelt wird. Bereits geringe Mengen der durch die Plasmidkonstrukte synthetisierten Proteine können nachgewiesen werden, da die gewählten Proteinformen zum einen physiologisch nicht in den Versuchszellen vorkommen, zum anderen diese über ein hochsensibles Messverfahren mittels der Biolumineszenz-Technik nachgewiesen werden können.

Trotz der Verwendung von geringem Zellmaterial zeigen die Messergebnisse dadurch eine hohe Validität auf.

5.3 HIF vermittelte Gen-Induktion in pulmonalarteriellen und aortalen Zellen

Das pulmonalarterielle Remodeling in Hypoxie ist gekennzeichnet durch gesteigerte Zellproliferation in der Gefäßwand mit negativer Auswirkung auf Mikro- und Makrozirkulation (siehe 1.3).

Folge der umstrukturierten Gefäße ist die Fixierung und Verstärkung einer pulmonalen Hypertonie, mündend in einer Rechtsherzbelastung, die bis zum Rechtsherzversagen reichen sowie mit Neigung zur Vasokonstriktion und in-situ-Thrombose einhergehen kann (2, 3, 4, 50). Unter diesem Hintergrund ist die Schwere des Leidens im Sinne einer Lebenserwartung und -qualität deutlich reduzierenden Krankheitsbildes ersichtlich.

Die mögliche Bedeutung von HIF im Prozess des pulmonalvaskulären Remodelings ist begründet in der HIF vermittelten Aktivierung von spezifischen Zielgenen, welche für Umbauvorgänge der Zell- und Matrixstruktur verantwortlich sind (25, 60). In hyp-

oxischen Zellen werden HIF-abhängige Zielgene aktiviert, die in zellspezifischer Weise systemische, lokale und zelluläre Anpassungsvorgänge induzieren.

In Experimenten mit HIF-1 α , HIF-2 α sowie HIF-1 β defizitären Knock-out Mäusen zeigte sich, dass diese während der Embryogenese an vaskulären und kardialen Defekten starben (13, 48). Bei partiell defizitären HIF-1 α oder HIF-2 α heterozygoten Knock-out Mäusen konnte eine normale Entwicklung beobachtet werden, jedoch zeigte sich, dass diese Mäuse unter chronischer Hypoxie eine deutlich geringere pulmonale Hypertonie entwickelten als die Vergleichsgruppe (57, 58). Heterozygot defiziente HIF-2 α Mäuse entwickelten sogar keine pulmonale Hypertonie (58).

Diese Experimente weisen auf die zentrale Bedeutung von HIF-1 α und HIF-2 α im Prozess des pulmonalvaskulären Remodelings hin. Beide genannten Faktoren binden an das Hypoxie-responsive Element (HRE) und konnten in dieser Arbeit über den Reporter-Gen-Assay gemeinsam kumulativ erfasst werden. Eine Aussage über den jeweiligen Anteil, den HIF-1 α in Bezug auf HIF-2 α an der gemessenen Gen-Induktion hat, kann hier nicht getroffen werden. Da jedoch beide Faktoren bedeutenden Anteil in der Pathogenese des Remodelings einnehmen, ist die kumulative Erfassung der HIF-Subtypen sinnvoll.

Diese Arbeit verfolgte die Intention, die hypoxische Induktion von HIF-abhängigen Zielgenen in aortalen und pulmonalvaskulären Zellen quantitativ zu untersuchen. Eine Aussage bezüglich der qualitativen Induktion spezifischer Zielgene in Abhängigkeit vom Zelltyp, kann im Rahmen dieser Untersuchung jedoch nicht getroffen werden.

Aufgezeigt wurde in dieser Arbeit, dass die HIF-abhängige Gen-induktion in Hypoxie in allen untersuchten Zellen zu beobachten war, jedoch ein Unterschied in der Quantität der Induktion besteht.

Die in dieser Analyse durch hypoxischem Stimulus dargelegte HIF-Aktivierung in den untersuchten Zellen, deckt sich mit den Ergebnissen von Untersuchungen anderer Forschergruppen (52, 53). Jedoch konnte hier erstmalig die hypoxische HIF-Induktion in den untersuchten Gefäßzellen der Aorta und Pulmonalarterie quantitativ erfasst und verglichen werden.

Wesentliche Erkenntnis dieser Analyse ist, dass in P-FBC auf hypoxischen Reiz eine signifikant stärkere Geninduktion über HIF stattfand als in P-SMC. Umgekehrt zeigte sich dies in den aortalen Zelltypen mit der deutlicheren HIF-Induktion in den A-SMC im Vergleich zu den A-FBC.

Die zellbiologischen Untersuchungen dieser Studie zeigen, dass HIF unter Hypoxie mit hoher Intensität induziert wird. Dies könnte in vivo über die Induktion spezifischer HIF-abhängiger Gene möglicherweise die strukturelle Veränderung des Gefäßsystems beeinflussen. Aufgrund der starken Induktion der P-FBC könnte deren Bedeutung beim pulmonalvaskulären Remodeling darin bestehen, dass sie verstärkt proliferieren oder über Sekretion von Mitogenen und Matrix-Proteinen wiederum andere Zell-Gruppen zur Proliferation anregen (51, 52, 53).

In diesem Zusammenhang zeigte eine weitere Untersuchung unserer Arbeitsgruppe, dass P-FBC unter hypoxischen Bedingungen HIF-abhängig Faktoren sezernieren, die die Proliferation von P-SMC induzieren. Dieser Effekt war nicht mit dem Medium von hypoxisch kultivierten A-FBC zu beobachten. Dieser Versuch deutet darauf hin, dass die Antwort in Hypoxie zellspezifisch ist und durch die Induktion verschiedener Hypoxie-abhängiger Zielgene bedingt ist (42).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Beobachtung, dass die HIF-abhängige Genregulation ubiquitär ist, sich aber in der Quantität unterscheidet. Neben der Quantität der Hypoxieantwort (Menge an HIF) spielt vermutlich auch die Qualität (Induktion spezifi-

scher HIF-abhängiger Zielgene) eine Rolle der zellspezifischen Antwort (41, 51, 52, 53, 54, 55).

5.4 Ausblick

Es wurde die HIF-abhängige Geninduktion in Hypoxie an pulmonalarteriellen Zellen aufgezeigt. Dies weist in Verbindung mit anderen Studien auf eine möglicherweise bedeutende Rolle von HIF beim pulmonalvaskulären Remodeling durch Hypoxie hin. Somit könnte HIF auch einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt in diesem Zusammenhang darstellen.

Mögliche methodische Ansatzpunkte für die Inhibition von HIF an pulmonalvaskulären Zellen wären das RNA-Interferenzverfahren, das für HIF-1 α und HIF-2 α in verschiedenen Studien etabliert wurde oder der Einsatz von *small molecule inhibitors*, gerichtet gegen HIF. Das RNA-Interferenzverfahren inhibiert HIF-1 α und HIF-2 α auf Expressionsebene, während *small molecule inhibitors* HIF auf Aktivierungsebene blockiert. Die Idee ist, dass bei beiden Ansätzen die Aktivierung HIF-abhängiger Zielgene blockiert wird, die funktionell zum hypoxisch ausgelöstem pulmonalarteriellen Remodeling beitragen (112-115).

6 Zusammenfassung

Zielsetzung der Arbeit war die vergleichende quantitative Analyse der Induktion des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) an pulmonaleriellen und aortalen Gefäßzellen, welche aus Kaninchen isoliert wurden.

Zu diesem Zweck wurde ein Reporter-gen-Assay-Verfahren etabliert. Es wurden Plasmide konstruiert, bei denen das Hypoxie-responsive Element (HRE), das die HIF-abhängige Geninduktion der Zielgene steuert, an verschiedene konstitutive Promotoren gekoppelt wurde, die ein Luciferase-Reporter-gen kontrollieren. Diese Plasmide wurden zur Transfektion der isolierten Versuchszellen verwendet.

Folgende Ergebnisse lassen sich zusammenfassen:

- Glatte Muskelzellen (SMC) und Fibroblasten (FBC) der Pulmonalarterie (P) und Aorta (A) des Kaninchens konnten erfolgreich isoliert und kultiviert werden. Die Identifizierung der Zellen erfolgte über ihr differentes Wachstumsverhalten sowie durch immunhistochemische Methoden.
- Mittels der HRE-Reporter-gen-Plasmide konnte im dualen Reporter-gen-Assay-Verfahren in den untersuchten Blutgefäßzellen der Aorta (A-SMC, A-FBC) und der Pulmonalarterie (P-SMC, P-FBC) die HIF-abhängige Geninduktion quantitativ erfasst werden.
- Der empfindlichste Nachweis einer Hypoxie-induzierten Geninduktion zeigte sich mit Hilfe des Plasmids, bei dem das HRE an den Thymidin-Kinase-Promoter (HRE-TK) gekoppelt wurde im Vergleich zu den Plasmiden mit dem Simian Virus 40-Promotor (SV40) oder dem Promotor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF).

- Mit dem HRE-TK-Plasmid zeigte sich dabei die stärkste hypoxische Induktion an P-FBC gefolgt von A-SMC, P-SMC und A-FBC.
- Pulmonalarterielle Fibroblasten (P-FBC) reagierten stärker auf Hypoxie als P-SMC. In der Aorta hingegen reagierten die A-SMC stärker auf Hypoxie als die A-FBC.

Zusammenfassend zeigten die untersuchten Zellen alle eine HIF-abhängige Gen-Induktion in Hypoxie. Es bestanden jedoch Unterschiede im Grad der Induktion in Abhängigkeit des Zelltyps (SMC und FBC) sowie des Ursprungsgewebes (Aorta und Pulmonalarterie). Insgesamt stützen die Ergebnisse dieser Arbeit die mögliche Bedeutung von HIF beim hypoxisch ausgelösten pulmonalvaskulären Remodeling. Auch weisen sie darauf hin, dass sowohl SMC als auch FBC in der Pathogenese des pulmonalvaskulären Remodeling eine Rolle spielen.

Somit könnte die Beeinflussung der HIF-Signaltransduktion eine therapeutische Perspektive zur Behandlung des hypoxisch ausgelösten pulmonalvaskulären Remodeling darstellen.

7 Summary

The aim of the study was the comparative quantitative analysis of the induction of hypoxia-inducible factor (HIF) to pulmonary artery and aortic vascular cells, which were isolated from rabbits.

For this purpose, a reporter gene assay method was established. Plasmids were constructed in which the hypoxia-responsive element (HRE), which controls the HIF-dependent gene induction of target genes, had been linked to different constitutive promoters, which control a luciferase reporter gene. These plasmids were used for transfection of the isolated cells.

The following results can be summarized:

- Smooth muscle cells (SMC) and fibroblasts (FBC) of the pulmonary artery (P) and the aorta (A) of the rabbit could be successfully isolated and cultured. The identification of the cells was carried out on their different growth behaviour as well as by immunohistochemical methods.
- The HIF-dependent gene induction could be quantitatively detected by HRE-reporter plasmids by using the dual reporter gene assay in the blood vessel cells of the aorta (A-SMC, P-SMC) and the pulmonary artery (P-SMC, P-FBC).
- The most sensitive detection of a hypoxia-induced gene induction was found by the help of the plasmid in which the HRE was linked to the thymidine kinase promoter (HRE-TK) in comparison to the plasmids, which were connected to the simian virus 40 promoter (SV40) or the promoter of vascular endothelial growth factor (VEGF).
- The HRE-TK plasmid showed the strongest hypoxic induction in the P-FBC followed by A-SMC, P-SMC and A-FBC.

- Pulmonary artery fibroblasts (P-FBC) showed a stronger reaction than P-SMC to hypoxia. In contrast, the aortic cells A-SMC responded stronger to hypoxia as A-FBC.

In summary, every examined cell-type in this study showed a HIF-dependent gene induction in hypoxia. However, there were differences in the degree of induction depending on the cell type (SMC and FBC) and the origin tissue (aorta and pulmonary artery). Overall, the results of this study support the possible role of HIF in hypoxia induced pulmonary vascular remodeling. They also point out that both SMC and FBC take part in the development of hypoxic pulmonary vascular remodeling.

Thus, the influence of the HIF signal transduction could represent a therapeutic perspective to the treatment of hypoxia induced pulmonary vascular remodeling.

8 Literaturverzeichnis

1. Theissen IL, Meissner A, **Hypoxic pulmonary vasoconstriction.**
Anaesthesist 45, 643-652 (1996)
2. Dumas JP, Bardou M, Goirand F, Dumas M, **Hypoxic pulmonary vasoconstriction.**
Gen. Pharmacol. 33, 289-297 (1999)
3. Wei Huang, Zheng Shen, Norden E. Huang, Yuan Cheng Fung, **Nonlinear indicial response of complex nonstationary oscillations as pulmonary hypertension responding to step hypoxia.**
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1834-1839 (1999)
4. N.F. Voelkel, R.M. Tuder, **Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension.**
Eur. Respir. J. 8, 2129-2138 (1995)
5. Wenger RH, **Mammalian oxygen sensing, remodelling and gene regulation.**
J. Exp. Biol. 8, 1253-1263 (2000)
6. Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A, **Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1.**
Kidney Int. 51(2), 553-555 (1997)
7. Wenger RH, Gasmann M, **Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1.**
Biol. Chem. 378(7), 609-616 (1997)
8. Stephen T. Crews, **Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins.**
Genes & Development 12, 607-620 (1998)
9. Takahata S, Sogawa K, Kobayashi A, Ema M, Mimura J, Ozaki N, Fujii-Kuriyama Y, **Transcriptionally active heterodimer formation of an ARNT-like PAS protein, ARNT3, with HIF1- α , HLF, and clock.**
Biochem. Biophys. Res. Commun. 248(3), 789-794 (1998)
10. Gregg L Semenza, **Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis.**

- Current Opinion in Genetics & Development 8, 588-594 (1998)
11. Semenza GL, Agani F, Iyer N, Jiang B, Leung S, Wiener C, Yu A, **Hypoxia inducible factor 1* From Molecular Biology to Cardiopulmonary Physiology.**
The American College of Chest Physicians Volume 114, Number1 (1998)
 12. Chun Nam Lok, Prem Ponka, **Identification of a Hypoxia Response Element in the Transferrin Receptor Gene.**
J. of Biol. Med. 274(34), 24147-24152 (1999)
 13. Jun Peng, Liyong Zhang, Linsay Drysdale, Guo-Hua Fong, **The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 α plays an important role in vascular remodeling.**
PNAS 97(15), 8386-8391 (2000)
 14. Srinivas V, Zhang LP, Zhu XH, Caro J, **Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha proteins.**
Biochem. Biophys. Res. Commun. 260(2), 557-561 (1999)
 15. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA, **Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia-inducible factor subunit, HIF-3 α .**
Gene. Expr. 7(3), 205-213 (1998)
 16. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J, **Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells.**
J. Biol. Chem. 275(35), 26765-26771 (2000)
 17. Hui Tian, Robert E Hammer, Alvin M Matsumoto, David W Russell, Steven L McKnight, **The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development.**
Genes & Development 12, 3320-3324 (1998)
 18. Kazuhiro Sogawa, Keiko Numayama-Tsuruta, Masatsugu Ema, Manabu Abe, Hisaku Abe, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, **Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric**

oxide donors in hypoxia.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7368-7373 (1998)

19. Masatsugu Ema, Shinichiro Taya, Noboru Yokotani, Kazuhiro Sogawa, Youichi Matsuda, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, **A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development.**
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4273-4278 (1997)
20. Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH, **Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α .**
J.Cell.Sci. 112(8), 1203-1212 (1999)
21. LE Huang, J Gu, M Schau, F Bunn, **Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway.**
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7987-7992 (1998)
22. DJ Bertges, MP Fink, RL Delude, **Hypoxic signal transduction in critical illness.**
Critical Care Medicin 28(4), (2000)
23. JA Forsythe, B Jiang, NV Iyer, F Agani, SW Leung, RD Koos, GL Semenza, **Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1.**
Molecular and Cellular Biology, 4604-4613 (1996)
24. G Neufeld, T Cohen, S Gengrinovitch, Z Poltorak, **Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.**
FASEB J. 13(1), 9-22 (1999)
25. NF Voelkel, M Hoeper, J Maloney, RM Tuder, **Vascular endothelial growth factor in pulmonary hypertension.**
Ann. N. Y. Acad. Sci. 796, 186-193 (1996)
26. Hirose K, Morita M, Ema M, et al., **cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (ARNT2) with close sequence similarity**

- to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT).**
Mol Cell Biol 1996; 16: 1706–1713.
27. Chun YS, Choi E, Yeo EJ, et al., **A new HIF-1 alpha variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses.**
J Cell Sci 2001; 114: 4051–4061.
28. Maynard MA, Qi H, Chung J, et al., **Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex.**
J Biol Chem 2003; 278: 11032–11040.
29. C H Sutter, E Laughner, G L Semenza, **Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations.**
PNAS 97(9), 4748-4753 (2000)
30. E K Weir, H L Reeve, D A Peterson, E D Michelakis, D P Nelson, S L Archer, **Pulmonary Vasokonstriction, Oxygen Sensing, and the role of Ion Channels.**
Chest 114(1) (1998)
31. K R Stenmark, M G Frid, **Smooth muscle Cell Heterogeneity – Role of Specific Smooth Muscle Cell Subpopulations in Pulmonary Vascular Disease.**
Chest 114(1) (1998)
32. M Das, E C Dempsey, D Bouchez D, M E Reyland, K R Stenmark, **Chronic hypoxia induces exaggerated growth responses in pulmonary artery adventitial fibroblasts: potential contribution of specific protein kinase c isozymes.**
Am J Respir Cell Mol Biol, 22(1), 15-25 (2000)
33. K R Stenmark, M Frid, R Nemenoff, E C Dempsey, M Das, **Hypoxia induces cell-specific changes in gene expression in vascular wall cells: implications for pulmonary hypertension.**
Adv Exp Med Biol 474, 231- 258 (1999)

34. N F Voelkel, R M Tuder, **Severe pulmonary hypertensive diseases: a perspective.**
Eur Respir J 14, 1246-1250 (1999)
35. H Kim, G L Yung, J J Marsh, R G Konopka, C A Pederson, P G Chiles, T A Morris, R N Channick, **Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension.**
Eur Respir J 15, 640 – 648 (2000)
36. S S Salvi, **Alpha1-adrenergic hypothesis for pulmonary hypertension.**
Chest 115(6), 1708-1719 (1999)
37. S Kourembanas, T Morita, H Christou, Y Liu, H Koike, D Brodsky, V Arthur, A Mitsial, **Hypoxic Responses of Vascular Cells.**
The American College of Chest Physicians 114(1), (1998)
38. K Heinicke, T Hofer, R H Wenger, M Gassmann, **The cellular response to hypoxia.** Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, J 53, Nr. 10, (2002)
39. H Olschewski, **Medikamentöse Therapie des primären und sekundären pulmonalen Hochdruckes.**
Herz 27, Nr. 5, Urban & Vogel (2002)
40. R Schulz, C Hummel, S Heinemann, W Seeger, F Grimminger, **Serum levels of Vascular Endothelial Growth Factor are elevated in Patients with Obstructive Sleep Apnea and severe Nighttime Hypoxia.**
Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 165, 67-70 (2002)
41. M Das, E C Dempsey, D Bouchey, M E Reyland, K R Stenmark, **Chronic Hypoxia Induces Exaggerated Growth Responses in Pulmonary Artery Adventitial Fibroblasts.**
Am J. Respir. Cell. Mol. Biol., Vol. 22, 15-25, (2000)
42. F Rose, F Grimminger, J Appel, M Heller, V Pies, N Weissmann, L Fink, S Schmidt, S Krick, G Gamenisch, M Gassmann, W Seeger, J Hänze, **Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors.**
FASEB J. Oct;16(12):1660-1661 (2002)

43. DD Kline, Y-J Peng, D J Manalo, G L Semenza, N R Prabhakar, **Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α .**
PNAS Vol. 99, No. 2, 821-826 (2002)
44. J Hänze, C Hegel, L Bader, F Rose, L Fink, R Schermuly, A Ghofrani, W Seeger, F Grimminger, N Weißmann, **NADPH-Oxidase (NOX-1) stimulates HIF dependent expression by increasing reactive oxygen species in pulmonary cells.**
Zentrum für Innere Medizin, Justus-Liebig-Universität, Klinikstr. 36, D-35392 Giessen
45. N Weißmann, A Tadic, J Hänze, F Rose, S Winterhalder, M Nollen, R Schermuly, A Ghofrani, W Seeger, F Grimminger, **Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H₂O₂?**
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2000)
46. G L Semenza, **HIF-1 and human disease: one highly involved factor.**
Genes & Development 14: 1983-1991(2000)
47. G L Semenza, **Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease.**
Respir Res 1: 159-162 (2000)
48. N V Iyer, L E Kotch, F Agani, S W Leung, E Laughner, R H Wenger, M Gassmann, J D Gearhart, A M Lawler, A Y Yu, G L Semenza, **Cellular and developmental control of O₂-homeostasis by HIF-1 α .**
Genes & Development 12: 149-162 (1998)
49. Makino Y, Cao R, Svensson K, et al., **Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression.**
Nature 2001; 414: 550–554.
50. Eckart, Forst, Burchardi, „**Intensivmedizin, Kompendium und Repetitorium zur interdisziplinären Weiter- und Fortbildung**“, Band 2; Kapitel IV, ecomed-Verlag
51. M. Das, E.C. Dempsey, J.T. Reeves, K.R. Stenmark, **Selective expansion of fibroblast subpopulations from pul-**

- monary artery adventitia in response to hypoxia**
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282: L976-L986,2002
52. Anthony, Durmowicz, Stenmark, **Mechanisms of Structural Remodeling in Chronic Pulmonary Hypertension**
Pediatr. Rev. 1999;20;91
53. Stenmark, Fagan, Frid, **Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling – Cellular and Molecular Mechanisms**
Circulation Research 2006: 675 – 691
54. M. Short, R. Nemenoff, W. Zawada, K. Stenmark, M. Das, **Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery fibroblasts into myofibroblasts**
Am J Physiol Cell Physiol 2004: C416-C425
55. B. Strauss, M. Rabinovitch, **Adventitial Fibroblasts – Defining a role in vessel wall remodelling**
Am J Respir Cell Mol Biol 2000: Vol. 22, pp. 1-3
56. Krick S, Hänze J, Eul B, Savai R, Seay U, Grimminger F, Lohmeyer J, Klepetko W, Seeger W, Rose F, **Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system.**
FASEB J 2005 May;19(7):857-9
57. K.-U. Eckhardt, **Erythropoetin: Insights and Perspectives of Oxygen-Dependent Gene Expression**
Onkologie 2001;24(suppl3):1-16
58. G L Semenza, **Pulmonary Vascular Response to Chronic Hypoxia Mediated by Hypoxia-inducible Factor 1**
Proc Am Thorac Soc Vol. 2, 68-70, 2005
59. Semenza GL, **Targeting HIF-1 for cancer therapy.**
Nat Rev Cancer 3: 721-732
60. J. Hänze, N. Weissmann, F. Grimminger, W. Seeger, F. Rose, **Cellular and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor driven vascular remodeling**
Thrombosis and Haemostasis 2007 97 5: 774-787
61. Semenza GL, Koury ST, Nejfelt MK, et al., **Celltype specific and hypoxia-inducible expression of the human**

- Erythropoetin gene in transgenic mice.**
Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 8725–8729.
62. Fandrey J., **Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1.**
Biospektrum 01.2007; 13: 26-28.
63. Voelkel N.F., Vandivier R.W., Tuder R.M., **Vascular endothelial growth factor in the lung.**
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L209-L221, 2006
64. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, et al., **Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus.**
J Biol Chem 2002; 277: 32405–32408.
65. Berra E, Ginouves A, Pouyssegur J., **The hypoxia-inducible factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling.**
EMBO Rep 2006; 7: 41–45.
66. Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, et al., **Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors.**
Biochem Biophys Res Commun 2002; 296: 343–349.
67. Baek JH, Mahon PC, Oh J, et al., **OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha.**
Mol Cell 2005; 17: 503–512.
68. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al., **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.**
Nature 1999; 399: 271–275.
69. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, et al., **Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous.**
FASEB J 2001; 15: 1312–1314.
70. Berra E, Benizri E, Ginouves A, et al., **HIF prolylhydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia.**
EMBO J 2003; 22: 4082–4090.

71. Takeda K, Ho VC, Takeda H, et al., **Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2.**
Mol Cell Biol 2006; 26: 8336–8346.
72. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, et al., **FIH-1 is an asparaginylhydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.**
Genes Dev 2002; 16: 1466–1471.
73. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, et al., **Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.**
Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11715–11720.
74. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, et al., **Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing.**
J Biol Chem 2000; 275: 25130–25138.
75. Liu Q, Berchner-Pfannschmidt U, Moller U, et al., **A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression.**
Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 4302–4307.
76. Gorlach A, Berchner-Pfannschmidt U, Wotzlaw C, et al., **Reactive oxygen species modulate HIF-1 mediated PAI-1 expression: involvement of the GTPase Rac1.**
Thromb Haemost 2003; 89: 926–935.
77. Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, et al., **Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species.**
Free Radic Biol Med 2004; 36: 1279–1288.
78. Hirota K, Semenza GL., **Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1.**
J Biol Chem 2001; 276: 21166–21172.
79. Maranchie JK, Zhan Y., **Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von**

- Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma.**
Cancer Res 2005; 65: 9190–9193.
80. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, et al., **Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms.**
J Biol Chem 2002; 277: 48403–48409.
81. Ema M, Hirota K, Mimura J, et al., **Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300.**
EMBO J 1999; 18: 1905–1914.
82. Kim WJ, Cho H, Lee SW, et al., **Antisense-thioredoxin inhibits angiogenesis via pVHL-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha degradation.**
Int J Oncol 2005; 26: 1049–1052.
83. Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, et al., **The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis.**
Cancer Res 2002; 62: 5089–5095.
84. Zhou J, Damdimopoulos AE, Spyrou G, et al., **Thioredoxin 1 and thioredoxin 2 have opposed regulatory functions on hypoxia inducible factor-1alpha.**
J Biol Chem 2007; epub ahead of print.
85. Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, et al., **The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine.**
J Biol Chem 2002; 277: 23508–23514.
86. Mottet D, Ruys SP, Demazy C, et al., **Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity.**
Int J Cancer 2005; 117: 764–774.
87. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, et al., **Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha.**
J Biol Chem 2006; 281: 33095–33106.

88. Bae SH, Jeong JW, Park JA, et al., **Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity.**
Biochem Biophys Res Commun 2004; 32: 394–400.
89. Shao R, Zhang FP, Tian F, et al., **Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo.**
FEBS Lett 2004; 569: 293–300.
90. Nakayama K, Ronai Z., **Siah: new players in the cellular response to hypoxia.**
Cell Cycle 2004; 3: 1345–1347.
91. Simon MC., **Siah proteins, HIF prolyl hydroxylases, and the physiological response to hypoxia.**
Cell 2004; 117: 851–853.
92. Blouin CC, Page EL, Soucy GM, et al., **Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha.**
Blood 2004; 103: 1124–1130.
93. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, et al., **Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.**
J Biol Chem 1994; 269: 23757–23763.
94. Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, et al., **Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter.**
J Biol Chem 2003; 278: 46230–46240.
95. Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, et al., **Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents.**
Am J Physiol 1995; 268: C1362–1368.
96. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, et al., **Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells.**
Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 4606–4610.

97. Aprelikova O, Chandramouli GV, Wood M, et al., **Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors.**
J Cell Biochem 2004; 92: 491–501.
98. Eul B, Rose F, Krick S, et al., **Impact of HIF-1alpha and HIF-2alpha on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia.**
FASEB J 2006; 20: 163–165.
99. Krick S, Hänze J, Eul B, et al., **Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system.**
FASEB J 2005; 19: 857–859.
100. Feldser D, Agani F, Iyer NV, et al., **Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2.**
Cancer Res 1999; 59: 3915–3918.
101. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, et al., **Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition.**
J Clin Invest 2005; 115: 2811–2821.
102. Li H, Chen SJ, Chen YF, et al., **Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia.**
J Appl Physiol 1994; 77: 1451–1459.
103. Morrell NW, Morris KG, Stenmark KR., **Role of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II in development of hypoxic pulmonary hypertension.**
Am J Physiol 1995; 269: H1186–1194.
104. Brusselmans K, Compennolle V, Tjwa M, et al., **Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia.**
J Clin Invest 2003; 111: 1519–1527.
105. Shimoda LA, Manalo DJ, Sham JS, et al., **Partial HIF-1alpha deficiency impairs pulmonary arterial myocyte**

- electrophysiological responses to hypoxia.**
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L202–208.
106. Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, et al., **Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha.**
J Clin Invest 1999; 103: 691–696.
107. Earley S, Resta TC., **Estradiol attenuates hypoxia induced pulmonary endothelin-1 gene expression.**
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 283: L86–93.
108. Shimoda LA, Sylvester JT, Booth GM, et al., **Inhibition of voltage-gated K(+) currents by endothelin-1 in human pulmonary arterial myocytes.**
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L1115–1122.
109. Norris ML, Millhorn DE., **Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene.**
J Biol Chem 1995; 270: 23774–23779.
110. Tudor RM, Chacon M, Alger L, et al., **Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis.**
J Pathol 2001; 195: 367–374.
111. Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, et al., **Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions.**
J Interferon Cytokine Res 2005; 25: 297–310.
112. Hänze J, Eul BG, Savai R, Krick S, Goyal P, Grimminger F, Seeger W, Rose F; **RNA interference for HIF-1a inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation**
Biochem Biophys Res Commun 2003; 312(3): 571-7.
113. Gillespiel DL, Whang K, Ragell BT, Flynn JR, Kelly DA, Jensen RL; **Silencing of Hypoxia Inducible Factor-1a by RNA Interference Attenuates Human Glioma Cell Growth In vivo.**
Clinical Cancer Research 2007; 13: 2441.

114. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU, **Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: Erythropoetin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells.**
FASEB J. 2004; 12:1462-4.
115. Tan C, De Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Khwaja F, Zhang Z, Zhang H, Teng T, Nicholson AC, Giannakakou P, Zhou W, Olson JJ, Pereira MM, Nicolaou KC, Van Meir EG; **Identification of a Novel Small-Molecule Inhibitor of the Hypoxia-Inducible Factor 1 Pathway**
Cancer Research 2005; 65: 605-612.

9 Anhang

9.1 Erklärung

Die vorgelegte Dissertation habe ich 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 oder nicht 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.

9.2 Publikationsverzeichnis

F Rose, F Grimminger, J Appel, M Heller, V Pies, N Weissmann, L Fink, S Schmidt, S Krick, G Gamenisch, M Gassmann, W Seeger, J Hänze

Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors.

FASEB J. Oct;16(12):1660-1661 (2002)

9.3 Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation entstand in der Zeit von April 1999 bis Juni 2000 am Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II, innerhalb der Forschungsgruppen von Prof. Dr. W. Seeger und Prof. Dr. F. Grimminger.

Für die Aufnahme als Doktorand in die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Seeger bedanke ich mich recht herzlich.

Prof. Dr. med. F. Rose hat mich damals für das Thema gewonnen und zu Beginn der Arbeit betreut. Ihm bin ich dankbar für seine Begeisterungsfähigkeit, die mich damals angesteckt und zu dieser Arbeit motiviert hatte. Im Verlauf übernahm dann hauptsächlich PD Dr. J. Hänze meine Betreuung, dem ich zutiefst zu Dank verpflichtet bin für seine ausgesprochen gute Fürsorge und engagierte Hilfe!

Ebenso danke ich dem ganzen Laborteam, namentlich Gabi Dahlem, Annette Tschuschner, Christiane Hild und Karin Quanz sowie den vielen Mit-Doktoranden, hier besonders Dr. Matthias Nollen, der mir viele Fertigkeiten beibrachte, immer hilfreich zur Seite stand und der insgesamt viel Spaß und gute Laune verprühte.

Diese Arbeit widme ich meiner ganzen Familie. Ausgesprochen dankbar bin ich dabei meinen lieben Eltern, ohne deren Unterstützung mir ein Studium gar nicht möglich gewesen wäre. Dann meinen Geschwistern, Schwiegereltern und Schwägerinnen bis hin zu meinen Kindern Jette und Malte. Jedes Familienmitglied hat mich in irgendeiner Art und Weise bis zur Fertigstellung dieser Arbeit getragen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner großartigen Ehefrau Silke, die mich immer unterstützt hat!