

Untersuchungen zum Einfluss der Hypoxie und  
Angiotensin II auf die Expression des Hypoxie-  
induzierbaren Faktors-1 $\alpha$  in alveolären Epithelzellen und  
pulmonalarteriellen Fibroblasten

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Jutta Appel

aus Büdingen

Giessen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik II  
Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger  
des Universitätsklinikums Giessen

Gutachter: PD Dr. Hänze  
Gutachter: Prof. Dr. Kummer

Tag der Disputation: 24. September 2007

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

***Meinen Eltern***

## Abkürzungsverzeichnis

A549-Zellen	Adenocarcinomzelllinie
ABL	Acid Base Laboratory
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	adult respiratory distress syndrome
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear translocator
AT-1	Angiotensin Rezeptor Typ 1
AT-2	Angiotensin Rezeptor Typ 2
BSA	bovines serum albumin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
FB <sub>PA</sub>	pulmonalarterielle Fibroblasten
FCS	fetales Kälberserum
h	Stunden
H	Hypoxie
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIF-1 $\alpha$	hypoxia inducible factor-1 $\alpha$
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HRE	hypoxia responsive element
HRP	horseradish peroxidase
IE	internationale Einheiten
KCL	Kaliumchlorid
kDA	Kilo Dalton

/kgKG	pro Kilogramm Körpergewicht
M	mol/l, z.B. in M, mM, nM, $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
N	Normoxie
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NiCl <sub>3</sub>	Nickelchlorid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHD	Prolyl-Hydroxylase
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PVDF	polyvinylidene fluoride
pVHL	von Hippel Lindau Protein
RLU	relative lights units
RNA	ribonucleic acid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
r-Pul-Adv.	Pulmonalarterielle Fibroblasten vom Kaninchen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Typ I Zellen	alveoläre Epithelzellen Typ I
Typ II Zellen	alveoläre Epithelzellen Typ II
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor

<b>VORWORT</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Die Mechanismen der alveolären Adaptation an Hypoxie	2
1.2 Die Effekte der Hypoxie in der pulmonalen Strombahn	3
1.3 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ): Struktur und Regulation	4
1.4 Die Rolle von Hypoxie in alveolären Epithelzellen	7
1.5 Die Rolle von Hypoxie in pulmonalarteriellen Fibroblasten	8
1.6 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	10
1.7 Fragestellung	12
<b>2 MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>13</b>
2.1 Materialien und Agenzien	13
2.2 Zellkulturmedien	15
2.3 Geräte	16
2.4 Isolation von pulmonalarteriellen Fibroblasten vom Kaninchen	16
2.4.1 Präparation der isolierten Kaninchenlunge	16
2.4.2 Präparation der Fibroblasten aus den Lungenarterien	18
2.5 A549-Zellen	18

## Inhaltsverzeichnis

<b>2.6</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>19</b>
2.6.1	„Splitten“ von Zellen	19
2.6.2	Einfrieren von Zellen	19
2.6.3	Auftauen von Zellen	20
<b>2.7</b>	<b>Versuchsablauf: Bestimmung von HIF-1<math>\alpha</math> auf Proteinebene</b>	<b>20</b>
2.7.1	Hypoxie	20
2.7.2	Präparation des nukleären Extraktes	22
2.7.3	Proteinbestimmung nach Bradford	23
2.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.7.5	Western Blot	26
2.7.6	Bestimmung der optischen Dichte	29
<b>2.8</b>	<b>HIF-Reporter-gen-Assay</b>	<b>29</b>
<b>2.9</b>	<b>Statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	Übersicht	31
3.2	Der Effekt von Hypoxie auf die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ in alveolären Epithelzellen (A549-Zellen)	31
3.3	Angiotensin II verstärkt die hypoxieinduzierte HIF-1 $\alpha$ Proteinexpression in alveolären Epithelzellen (A549-Zellen)	33



## Inhaltsverzeichnis

<b>3.4</b>	<b>Der Effekt von Hypoxie auf die Proteinexpression von HIF-1<math>\alpha</math> in pulmonalarteriellen Fibroblasten vom Kaninchen</b>	<b>36</b>
<b>3.5</b>	<b>Angiotensin II verstärkt die hypoxieinduzierte HIF-1<math>\alpha</math> Proteinexpression in pulmonalarteriellen Fibroblasten vom Kaninchen</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	
<b>7</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	

**Lebenslauf**

**Danksagung**

## Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis April 2001 in dem Laborbereich der klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger am Zentrum für Innere Medizin durchgeführt. Unter der Betreuung von Herrn PD Dr. F. Rose wurde eine Gruppe aufgebaut, die intensiv Untersuchungen zur Rolle des Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) als Schlüsselprotein für die frühe genregulatorische Antwort auf Hypoxie durchführte. Meine Aufgabe bestand darin, in unserer Arbeitsgruppe die Methode der Westernblot-Analyse zum Nachweis von HIF-1 $\alpha$  nach Präparation des nukleären Extraktes zu etablieren. Anschließend untersuchte ich den Einfluss von Hypoxie und Angiotensin II auf die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression an zwei Zellsystemen der Lunge (alveoläre Epithelzellen und pulmonalarterielle Fibroblasten). Diese Ergebnisse haben Eingang in Publikationen und verschiedene Poster gefunden (siehe Publikationsverzeichnis im Anhang).

## 1. Einleitung

Die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase ist für das Überleben aller Säugetiere entscheidend. Für die zuverlässige Regulation von Sauerstoffverfügbarkeit und -verbrauch besitzen multizelluläre Organismen ein komplexes System, das neben Veränderungen der O<sub>2</sub>-Aufnahme aus der Umgebung (Respiration) den O<sub>2</sub>-Transport im Körper (Zirkulation) und die Anpassung alternativer Energieproduktion (anaerober Stoffwechsel) beeinflusst.

Zustände mit alveolärer Hypoxie stellen für den Gesamtorganismus eine Bedrohung dar und haben zahlreiche Adaptationsvorgänge des respiratorischen Systems zur Folge. Der durch Hypoxie-induzierbare Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) scheint eine frühe genregulatorische Antwort auf reduzierte Sauerstoffspannung in Zellen zu sein. Damit könnten Untersuchungen zur HIF-1 $\alpha$  Induktion und im Weiteren zur HIF-1 $\alpha$  Signalkaskade helfen, therapeutische Ansätze zu entwickeln, um die hypoxisch bedingten Gewebsschäden zu verringern bzw. zu verhindern.

Im Folgenden werden zunächst die zellulären Grundlagen und die Interaktionen zwischen HIF-1 $\alpha$  und den Zellsystemen unter Einfluss der Hypoxie sowie die in der Arbeit zu beantworteten Fragestellungen erläutert. Im Kapitel 2 folgt eine Darstellung der verschiedenen Untersuchungsmethoden mit den benützten Materialien. Anschließend werden im Kapitel 3 die Untersuchungsergebnisse dargestellt, bevor abschließend im 4. Kapitel die Diskussion folgt.

## **1.1 Die Mechanismen der alveolären Adaptation an Hypoxie**

Im Säugerorganismus gibt es viele physiologische Systeme, die auf die Sauerstoffhomöostase angewiesen sind. Während sich eine Unterversorgung während der Embryonalentwicklung oft letal auswirkt, hat der weiter entwickelte Organismus verschiedene Möglichkeiten auf zellulärer und systemischer Ebene darauf zu reagieren [28]. Ursprünglich wurde das Messen der Sauerstoff-Spannung spezialisierten Chemorezeptoren wie beispielsweise dem Glomus caroticum zugeschrieben [45, 46, 69]. Mittlerweile ist bekannt, dass alle eukaryoten Zellen im menschlichen Körper die Sauerstoff-Spannung messen und auf sie reagieren können [76]. Wie in anderen physiologischen Systemen tritt eine Reaktion bei akut eingetretenem Sauerstoffmangel bereits innerhalb weniger Sekunden bis Minuten durch Aktivierung vorhandener Proteine ein, während bei chronischem Sauerstoffmangel erste Reaktionen nach Minuten bis Stunden und noch später durch entsprechende Änderung der Gen-Expression zu erwarten sind [98].

Dem Alveolarepithel kommt als Grenzflächenstruktur eine besondere Bedeutung zu. Es muss für den Gesamtorganismus einen ausreichenden Gasaustausch gewährleisten. Eine chronisch alveoläre Hypoxie kann extra-pulmonale Ursachen haben (Bewohner großer Höhen, neurologische Regulationsstörungen, Thoraxdeformitäten). Meistens ist sie jedoch auf den Mechanismus der alveolären Hypoventilation oder den Verlust an ventilierbarem Alveolarlumen bei obstruktiven, restriktiven oder inflammatorischen Atemwegs- und Lungenerkrankungen

zurückzuführen (z.B. COPD= chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Fibrose, ARDS= akutes Lungenversagen (adult respiratory distress syndrome) oder Pneumonie). Dabei sind die Zellen des Alveolarepithels direkt den Änderungen der Sauerstoffspannung ausgesetzt. Damit auch bei Sauerstoffmangel ein Überleben der Zelle möglich ist, hat das Alveolarepithel verschiedene Anpassungsmöglichkeiten entwickelt [66]. Die Umbauprozesse in Folge von Hypoxie sind durch eine chronologische Abfolge parenchymaler Veränderungen gekennzeichnet. Durch einen Verlust von epithelialen Lamellarkörperchen der Typ II Zellen sinkt die Surfactantsekretion. In der Folge kommt es zur Atelektasenbildung und gesteigerter Ödembildung [87]. Durch Reduktion des aktiven transepithelialen Natrium-Transportes und somit der begleitenden aktiven Flüssigkeitsresorption aus dem Alveolarraum wird die Ödemneigung unter den Bedingungen einer alveolären Hypoxie weiter gesteigert. Diese beruht nach gegenwärtigen Kenntnisstand auf einer Inhibition der epithelialen Natrium-Kanal Expression sowohl in den Typ II, wie auch in den Typ I Zellen und einer verminderten Aktivität der basolateralen Natrium-Kalium-ATPase [48]. In der Spätphase alveolärer Hypoxie treten epitheliale Reparations- und Differenzierungsvorgänge in den Vordergrund, die morphologisch mit einer Hyperplasie der Typ II Zellen einhergehen. Diese Entwicklung wirkt einer Ödemneigung sowie einem irreversiblen Verlust des Alveolarraumes entgegen, besitzt jedoch nachteilige funktionelle Konsequenzen für die Gasaustauschfunktion an der alveolären Oberfläche [16, 87].

## **1.2 Die Effekte der Hypoxie in der pulmonalen Strombahn**

In der Lungenstrombahn ruft alveoläre Hypoxie eine Vasokonstriktion hervor, während Hypoxie im systemischen Kreislauf eine Vasodilatation auslöst. Diese Besonderheit der pulmonalen Strombahn dient der Anpassung der Perfusions- an die Ventilationsbedingungen. Daraus resultiert eine Optimierung des pulmonalen Gasaustauschs. Man nennt diesen Mechanismus hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV; von Euler-Liljestrand Mechanismus). Das Prinzip der HPV ist eine Drosselung der Perfusion unzureichend ventilierter und somit hypoxischer

alveolärer Lungenareale, da dort ein niedriger Sauerstoffpartialdruck herrscht und somit keine ausreichende Oxygenierung des Blutes stattfinden könnte [14, 23, 91]. Eine Daueraktivierung dieses Regulationsprinzips bei persistierender alveolärer Hypoxie (z.B. im Verlauf chronisch obstruktiver und restriktiver Lungenerkrankungen) führt durch Verringerung des Gefäßgesamtquerschnittes der pulmonalen Strombahn zu einer schweren pulmonalen Druck- und Widerstandserhöhung. Durch langfristige Umbauvorgänge der Gefäße entsteht eine strukturelle Fixierung der vaskulären Widerstandserhöhung vom Phänomen des vaskulären Remodellings [17].

Mit dem vaskulären Remodelling werden strukturelle Veränderungen bereits existierender Gefäße bezeichnet. Hierzu gehören alle Veränderungen der Gefäßwand, aber auch Proliferation und Regression von Gefäßen [80]. Durch Zellhypertrophie, Zellproliferation, Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix sowie Zelltod wird das Gefäßsystem an den jeweiligen Bedarf adaptiert.

### **1.3 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ): Struktur und Regulation**

Der Transkriptionsfaktor HIF wurde im Rahmen von Untersuchungen an Erythropoetin als Modell für hypoxisch regulierte Genexpression entdeckt [4, 61]. Deletionsstudien des EPO-Gens identifizierten eine kleine Region, die für die hypoxische Induzierbarkeit verantwortlich war. Wurde dieser Bereich aus einem Transgen herausgeschnitten, so konnte keine weitere Induktion unter Hypoxie gezeigt werden. Dies war durch Reexpression reversibel. Somit waren die Charakteristika eines Enhancer-Elementes erfüllt. Semenza und Kollegen beschrieben die Hypoxie abhängige Bindung nukleärer Proteine und prägten den Begriff Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 (HIF-1) [73]. Nachdem die Klonierung von HIF-1 gelungen war, konnte in der Folge die bindende DNA-Region auf die Nukleotide 5'-R-CGTG-3' weiter eingegrenzt werden. Diese Konsensus-Sequenz wird als Hypoxie Responsives Element (HRE) bezeichnet [92].

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer  $\alpha$ - (120 kDa) und  $\beta$ - (91-94 kDa) Untereinheit besteht [35, 93]. Beide gehören zu einer Familie von Faktoren mit ähnlicher Primärstruktur, den basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)

Transkriptionsfaktoren mit PAS-Domain-Proteinen. Die bHLH und PAS Region dieser Transkriptionsfaktoren ist für die Dimerisierung mit dem jeweiligen Bindungspartner und für die DNA-Bindung der Zielgene verantwortlich [74]. Nach Aufreinigung der beiden Untereinheiten stellten Wang und Semenza 1995 fest, dass die  $\beta$ -Einheit bereits bekannt war und zuvor als aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) bezeichnet wurde [92]. HIF-1 $\beta$ /ARNT hat vielseitige Funktionen, da es auch anderen bHLH-PAS Proteine als Dimerisationspartner dient [75]. HIF-1 $\beta$  wird nicht O<sub>2</sub> abhängig reguliert, sondern liegt konstitutiv im Zellkern vor [32, 77].

HIF-1 $\alpha$  war ein neu identifiziertes Protein, welches eine strikte O<sub>2</sub>-Abhängigkeit zeigt und somit diejenige Untereinheit darstellt, die für die Regulation des Komplexes entscheidend ist [65]. Bei einer physiologisch relevanten Verminderung der Gewebe-Sauerstoffspannung wird HIF-1 $\alpha$  zunehmend stabilisiert. Dieser Effekt ist bei einer Gewebe-Sauerstoffspannung von 0,5% maximal [97]. Die HIF-1 $\alpha$  mRNA Spiegel sind relativ konstant und unterliegen keiner signifikanten Regulation [99]. Unter normoxischen Bedingungen ist HIF-1 $\alpha$  instabil. Es wird sofort über einen Ubiquitin-Proteosom-System nach Hydroxylierung zweier Prolin-Reste [7, 33] durch spezifische Prolyl-Hydroxylasen (PHD) abgebaut [31, 75]. Die Degradation wird durch ein Genprodukt des Tumorsuppressorgens von Hippel-Lindau (pVHL) vermittelt. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Hydroxylierung mit anschließendem Abbau geblockt. Dies führt zu einer raschen Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  [32]. Nach Translokation in den Zellkern dimerisieren die beiden Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ . Unter Rekrutieren von CBP/p300, einem generellen Koaktivator vieler Transkriptionsfaktoren [3], bindet der HIF-Komplex an das Hypoxie Responsives Element (HRE) [72]. HRE ist bei vielen adaptiven Genen in der Promotorregion vorhanden. Dies führt zur transkriptionellen Aktivierung zahlreicher Zielgene. Dadurch hat HIF-1 $\alpha$  in der Vermittlung der Hypoxie induzierten Veränderungen der alveolären Homöostase eine zentrale Bedeutung [12] und scheint dabei am Anfang der pathogenetischen Sequenz zu stehen [21, 51, 77, 103]. Bisher konnten ca. 80 Proteine/Zielgene identifiziert werden, die von HIF-1 $\alpha$  induziert werden. Hierzu gehören unter anderem VEGF und Erythropoetin [78]. Man geht heute davon aus, dass HIF über seine Zielgene überwiegend protektiv auf die exprimierenden Zellen wirkt, indem es einerseits den Sauerstoffverbrauch senkt, andererseits die Sauerstoffzufuhr steigert [98]. Neben der zentralen Stellung, die

HIF-1 $\alpha$  bei den physiologischen Reaktionen auf Hypoxie hat, scheint es auch eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie von chronischen Lungenerkrankungen [79] zu spielen. In Studien mit heterozygoten HIF-1 $\alpha$  knockout Mäusen konnte eine verzögerte Entwicklung von pulmonaler Hypertonie, Remodelling der pulmonalvaskulären Gefäße und rechtsventrikulärer Hypertrophie gezeigt werden [103]. Damit scheint ein direkter Zusammenhang zwischen Hypoxie, dem daraus resultierenden vaskulären Remodelling und dem Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  zu bestehen. Des Weiteren wird ein direkter Zusammenhang zwischen HIF-1 $\alpha$  und Apoptose [58] sowie Karzinomentstehung [78] diskutiert.

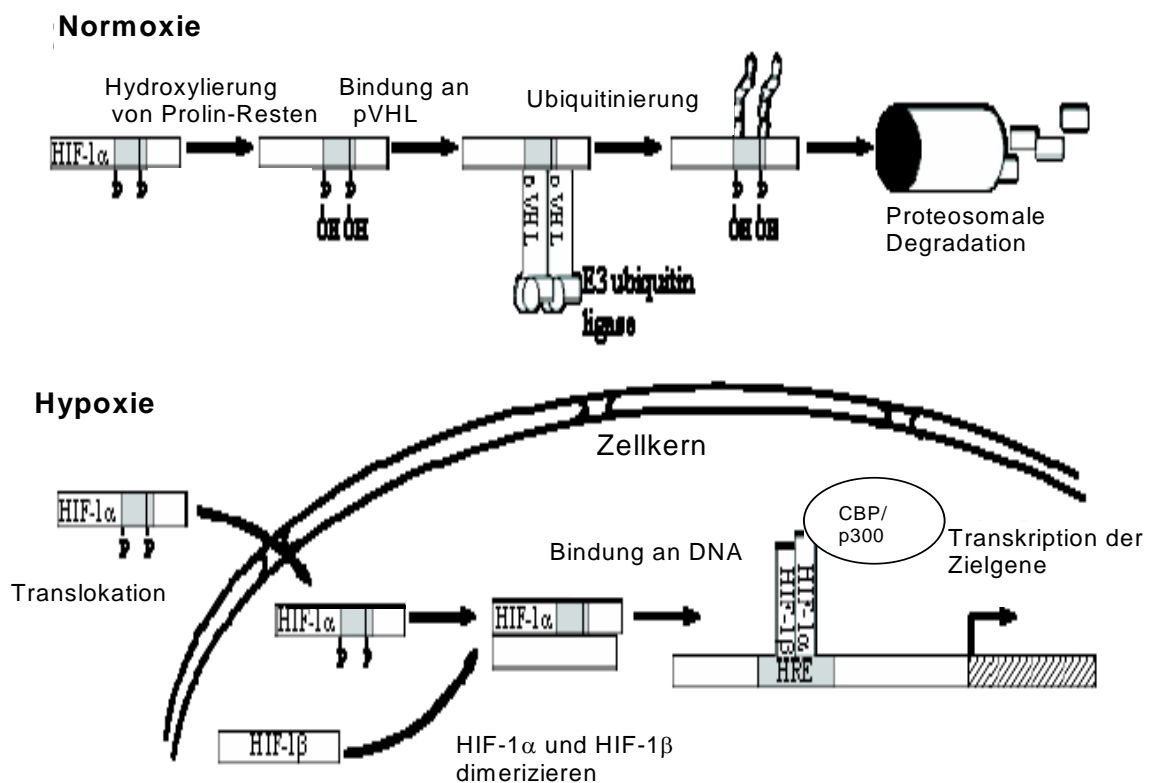


Abb. 1: Modell der HIF-1 $\alpha$  Regulation (modifiziert nach Zagorska und Dulak [104]). In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (Normoxie) wird HIF-1 $\alpha$  durch Prolyl Hydroxylasen (PHD) hydroxyliert. Die PHDs ermöglichen einer E3-Ubiquitin Ligase (E3-UL) mit dem von Hippel Lindau Protein (pVHL) als Erkennungskomponente HIF-1 $\alpha$  direkt zu binden und es für die Destruktion durch Ubiquitinierung und nachfolgender proteosomaler Degradation zu markieren. Unter hypoxischen Bedingungen stabilisieren die HIF-1 $\alpha$  Untereinheiten, akkumulieren und translozieren in den Zellkern. Dort dimerisieren sie schließlich mit HIF-1 $\beta$  und komplexieren mit

p300/CBP. Anschließend erfolgt über eine Bindung an HRE die Transkription zahlreicher Zielgene.

## 1.4 Die Rolle von Hypoxie in alveolären Epithelzellen

Die Lunge des Menschen dient der Aufnahme von Sauerstoff und der Abgabe von Kohlendioxid. Die Gasaustauschfläche wird durch die alveolo-kapilläre Membran mit äußerst geringer Diffusionsbarriere (ca. 0,3  $\mu\text{m}$ ) gebildet [27, 94]. Durch Aufzweigung der Luftwege, ausgehend von der Trachea über Bronchien, Bronchiolen und terminale Bronchiolen (dienen dem Gastransport) bis zu den Acini wird die große Oberfläche der Lunge erreicht. Die Acini, die dem Gasaustausch dienen, bestehen aus den respiratorischen Bronchiolen mit den anschließenden Alveolargängen, Alveolarsäcken und traubenförmig angeordneten Alveolen. Die Alveolen werden vom Alveolarepithel, das eine Gesamtfläche von ca. 130  $\text{m}^2$  hat, ausgekleidet [94]. Das Alveolarepithel setzt sich aus den Alveolarepithelzellen Typ I (Typ I Zellen), die die Oberfläche bilden, und den Alveolarepithelzellen Typ II (Typ II Zellen), die sekretorische Funktionen besitzen, zusammen. Diese beiden Zelltypen sind durch „tight junctions“ miteinander verbunden, so dass ein kontinuierliches Epithel entsteht [71].

### Alveolarepithelzelle Typ I

Die Typ I Zellen sind sehr dünn, lang gestreckt und komplex verzweigt. Sie bilden etwa 97% der Alveolaroberfläche [52], wobei eine Typ I Zelle eine Oberfläche von ca. 4000  $\mu\text{m}^2$  hat. Dies entspricht fast der vierfachen Fläche einer Kapillarendothelzelle. Die große Oberfläche wird durch bis zu 50  $\mu\text{m}$  lange, 0,1 - 0,3  $\mu\text{m}$  dünne zytoplasmatische Zellausläufer erreicht [95]. Die Anzahl der Typ I Zellen liegt unter der der Typ II Zellen [13, 26, 52]. Typ I Zellen sind nicht zur Mitose fähig, sie rekrutieren sich aus umgewandelten Typ II Zellen [30]. Ultrastrukturell weisen Typ I Zellen nur wenig Zellorganellen auf. Zu ihren Funktionen gehört die Bildung der Blut-Luft-Schranke. Diese auch als respiratorische Membran bezeichnete 0,2 - 0,4  $\mu\text{m}$



dicke Schicht besteht aus den Fortsätzen der Endothelzellen und den Typ I Zellen sowie der mittig gelegenen Basalmembran [26, 95, 100]. Außerdem sind die Typ I Zellen bedeutsam für die mechanisch-statische Stabilität der Alveolen.

## **Alveolarepithelzelle Typ II**

Die Typ II Zellen sind kubische Zellen, die häufig in den von Kapillaren im Interstitium gebildeten Nischen der Alveolarwand anzutreffen sind, daher werden sie auch Nischenzellen genannt [52]. Sie bilden nur 3% der Alveolaroberfläche, obwohl sie mit einem Anteil zwischen 12% und 16% an der Gesamtzellzahl der Lunge zahlreicher als die Typ I Zellen sind [13]. Die Typ II Zellen sind reich an Zellorganellen. Das Zytoplasma enthält zahlreiche Mitochondrien und Multivesikularkörperchen sowie viel rauhes endoplasmatisches Retikulum und ein gut entwickeltes perinukleär lokalisiertes Golgifeld [24, 95]. Die charakteristischen intrazytoplasmatischen Strukturen stellen jedoch die 0,5 - 1 µm großen rundlichen bis ovalen Lamellarkörperchen (osmiophilen Einschlusskörperchen) dar. Typ II Zellen können proliferieren. Aus ihnen gehen die Typ I Zellen hervor. Deshalb kann man nach Verletzung der Alveolaroberfläche nur eine Proliferation der Typ II Zellen als pluripotente Stammzelle des Alveolarepithels mit anschließender Differenzierung in Typ I Zellen beobachten [25, 100]. Funktionell handelt es sich bei den Typ II Zellen um sezernierende Zellen, die Surfactant im endoplasmatischen Retikulum bilden [101]. Das Surfactant, eine oberflächenaktive Substanz, die zur Herabsetzung der Alveolarspannung beiträgt, wird in den Lamellarkörperchen gespeichert. Von dort erfolgt eine Abgabe an die Zelloberfläche über Exozytose [87].

## **1.4 Die Rolle von Hypoxie in pulmonalarteriellen Fibroblasten**

In der Lunge wird ein funktioneller Blutkreislauf von einem ernährenden Blutkreislauf unterschieden. Der ernährende Blutkreislauf dient der Versorgung des

Bronchialbaums und der größeren Äste der Arteriae pulmonales. Als funktioneller Lungenkreislauf, in dem der Gasaustausch stattfindet, wird das Gefäßsystem bestehend aus Pulmonalarterien (zuleitenden Gefäße), Pulmonalvenen (ableitenden Gefäße) und dem sie verbindenden Kapillarnetz bezeichnet [43]. Die Äste der Pulmonalarterien haben im Vergleich zu gleichkalibrigen Körperarterien eine geringere Wandstärke, da der Lungenkreislauf ein Niederdrucksystem (arterieller Druck und vaskulärer Widerstand betragen nur ca.  $\frac{1}{8}$  der Werte des großen Kreislaufes) ist. Der Wandaufbau der Pulmonalarterien setzt sich von innen nach außen aus folgenden Schichten zusammen: Tunica intima, sie besteht aus einem einschichtigen Endothel, subendothelialen lockerem Bindegewebe und der Membrana elastica interna. Anschließend kommt die Tunica media, diese besteht im Wesentlichen aus glatten Muskelzellen (der Gefäßtonus wird unter anderem über Angiotensin-1 Rezeptoren in den glatten Gefäßmuskelzellen reguliert). Als äußere Schicht schließt sich die Tunica externa, auch Adventitia genannt, an. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe mit elastischen Fasern. Das Bindegewebe stützt das Epithelgewebe und dient als Verschiebeschicht sowie als Wasserspeicher. Es setzt sich aus Fibroblasten/-zyten, Makrophagen und Grundsubstanzen (= amorphe Interzellulärsubstanzen), wie z.B. Glykoproteine sowie Kollagenfasern zusammen. Fibroblasten sind ortsansässige Bindegewebszellen. Sie sind verzweigt und stehen durch verschieden breite Zytoplasmafortsätze miteinander in Verbindung. Ihre Zellkerne sind oval, groß und hell mit feinem Chromatin und deutlichem Nukleolus. Das Zytoplasma ist reich an granulärem endoplasmatischem Retikulum und der Golgi-Apparat ist gut entwickelt. Fibroblasten sind sehr teilungsaktiv und dienen der Faserbildung, außerdem synthetisieren sie amorphe Interzellulärsubstanzen. Wenn Fibroblasten ihre Syntheseleistung einstellen und in eine ruhende Variante übergehen, nennt man sie Fibrozyten [37].

## 1.6 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein komplexes Regulationssystem zur Konstanthaltung bzw. Normalisierung von Plasmavolumen, -osmolarität und Blutdruck [41], dessen biologisch wirksame Substanzen das Angiotensin II und das von ihm aus der Nebennierenrinde direkt freigesetzte Aldosteron sind.

Als Protease spaltet aktives Renin mit hoher Spezifität Angiotensinogen zu dem physiologisch inaktiven Dekapeptid Angiotensin I. Durch Abspaltung zweier Aminosäuren am C-terminalen Ende mit Hilfe des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), das ubiquitär am Endothel und glatten Muskelzellen von Blutgefäßen der Lunge lokalisiert ist, entsteht der vasoaktive und pro-proliferative Mediator Angiotensin II [70]. Angiotensin II wirkt vasopressorisch und stimuliert die Freisetzung von Aldosteron. Es resultiert eine Natrium- und Wasserretention mit Anstieg des Blutdrucks und des effektiven Blutvolumens. Die Zunahme des Blutdruckes und des Blutvolumens steigert den renalen Perfusionsdruck, wodurch die Reninsekretion sinkt (Rückkopplungs-Mechanismus, Abb.2).

Angiotensin II entfaltet seine Wirkungen über spezifische Rezeptoren, den Angiotensin-Rezeptor Typ 1 (AT-1) und den Angiotensin-Rezeptor Typ 2 (AT-2). Dabei bindet Angiotensin II mit einer hohen Affinität [50].

Während Angiotensin II über den AT-1 Rezeptor neben vasokonstriktiven auch mitogene Effekte vermittelt und damit relevanter Faktor in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie sein könnte [1, 53, 62], scheint es über den AT-2 Rezeptor einen wachstumshemmenden und vasodilatorischen Effekt und damit eine antagonisierende Wirkung zu haben [15, 68].

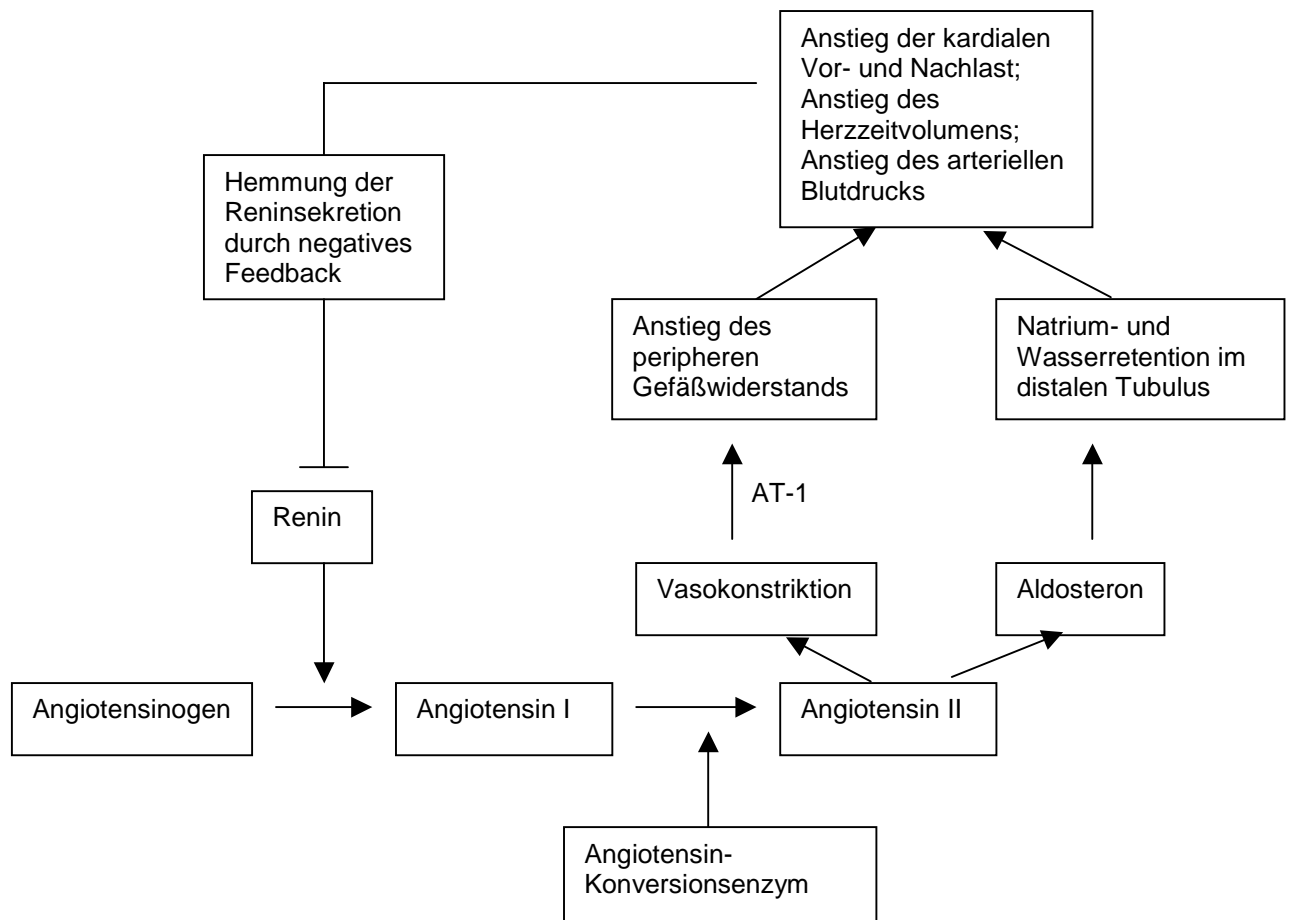


Abb. 2: Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [70, 85]. Das proteolytische Renin spaltet von Angiotensinogen das inaktive Angiotensin I ab, das dann durch Angiotensin-Konversionsenzym in Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II wirkt zum einem über Angiotensin Rezeptor Typ 1 (AT-1) an glatten Gefäßmuskelzellen vasokonstriktorisch, zum anderem stimuliert es die Freisetzung von Aldosteron. Hieraus resultiert unter anderem ein Anstieg des Blutdrucks. Dadurch kommt es in einer negativen Rückkoppelungsschleife zur Hemmung der Reninsekretion.

## 1.7 Fragestellung

Chronische Hypoxie löst im alveolären Kompartiment sowie im pulmonalen Gefäßsystem umfangreiche Anpassungsvorgänge aus. Im alveolären Epithel konnte eine Sequenz von Veränderungen, die durch Inhibition der epithelialen Surfactantsekretion, Lungenödembildung und partiellen Verlust der alveolo-epithelialen Barriereintegrität gekennzeichnet sind, gezeigt werden [87]. Im pulmonalen Gefäßsystem kommt es zur protrahierten Vasokonstriktion und vaskulärem Remodelling. Beteiligt an der Gefäßregulation sind vaskuläre Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten [17]. Eine zentrale Rolle bei diesen Anpassungsvorgängen scheint der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  als genregulatorische Antwort auf Hypoxie zu haben. Obwohl die Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  vielfältig untersucht und charakterisiert wurde, ist bisher wenig über die Induktion von HIF-1 $\alpha$  im Alveolarepithel und in pulmonalarteriellen Fibroblasten bekannt. Aus diesem Grund soll als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit die Expression von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie im Alveolarepithel und in pulmonalarteriellen Fibroblasten dargestellt werden. Im Weiteren sollen vor dem Hintergrund, dass das vasokonstriktorisch wirkende Angiotensin II in glatten Muskelzellen der Lunge als HIF-1 $\alpha$  Induktor bereits unter normoxischen Bedingungen agiert [63], Untersuchungen zum Einfluss von Angiotensin II auf die HIF-1 Induktion in alveolären Epithelzellen und pulmonalarterielle Fibroblasten durchgeführt werden.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat Hypoxie auf den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  in alveolären Epithelzellen und pulmonalarteriellen Fibroblasten?
2. Induziert Angiotensin II in alveolären Epithelzellen und pulmonalarteriellen Fibroblasten HIF-1 $\alpha$ ?

## 2. MATERIAL UND METHODIK

### 2.1 Materialien und Agenzien

- 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (TRIS), Calbiochem (San Diego, USA)
- A 1153 (Aprotinin), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- A 3678 (Ammoniumpersulfat), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Acrylamid, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Bromphenol blau, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- C 4176 (Casting Clamps), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- C 4301 (Comb), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Cell-Scraper, Falcon, BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
- D 0632 (Dithiothreitol), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- D 5637 (3,3´Diaminbenzidine), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Dodecylsulfat (SDS), Serva (Heidelberg, Deutschland)
- Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega (Mannheim, Deutschland)
- FCS, fetales Kälberserum, PAA (Linz, Österreich)
- Filter (0,2 µm), Nalgene (Hereford, U.K.)
- Filterpapier, Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
- Full Range Rainbow, Amersham Life Science (Braunschweig, Deutschland)
- Fungizone (Amph. B), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- G 2650 (Gasket), Sigma, (Taufkirchen, Deutschland)
- G 3150 (Glas-Platten), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- G 7403 (Glycin), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- G1351 (Zweitantikörper, Anti-Chicken IgY Meerrettich-Peroxidase konjugiert), Promega (Mannheim, Deutschland)
- Gentamicin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Glove Bag, Roth (Karlsruhe, Deutschland)

- Heparin, Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Whylen, Deutschland)
- HEPES, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- HIF-1 $\alpha$  Antikörper wurde von PD Dr. Max Gassmann aus dem Institut für Physiologie der Universität Zürich zur Verfügung gestellt
- Homogenisator Teflon-Pistill, Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland)
- Homogenisator, konisch 2 ml Glasgefäß, Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland)
- Hypoxiekammer, Keutz (Reiskirchen, Deutschland)
- Ketanest, Park-Davis GmbH (Wedel, Deutschland)
- Kollagenase, Worthington Biochemical Corporation (Freehold, New Jersey, USA)
- L 2023 (Leupeptin), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- L-Glutamin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Medium DMEM (mit Glucose und Pyruvat), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Medium F12 (mit Pyridoxin), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol, Fluka (Taufkirchen, Deutschland)
- NaCl, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Natrium(meta)vanadat (NaVO<sub>3</sub>), Fluka (Taufkirchen, Deutschland)
- Nicht essentielle Aminosäuren, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Nickel III Chlorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- P 0914 (Protein Standard), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- P 5318 (Pepstatin), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- P 7626 (PMSF, Phenylmethylsulfonyl Fluoride), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- P 7949 (Tween 20), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- P 8139 (Phorbol 12-Myristate 13acetate), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Penicillin G, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Propanol, Fluka (Taufkirchen, Deutschland)
- Protein Assay, BioRad (München, Deutschland)
- PVDF BioTrace, Pall Gelman Laboratory (Darmstadt, Deutschland)
- Rompun 2%, Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)

- S 3900 (Spacers), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Natrium Pyruvat, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Streptomycin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Superfect, Qiagen (Hilden, Deutschland)
- T 9281 (Temed), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Vitamine, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
- Xylocain 2%, Astra GmbH (Wedel, Deutschland)
- Zellkulturplatten 150er (145 cm<sup>2</sup>), Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturplatten 24-Loch-Platten, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturplatten 96-Loch-Platten, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

## 2.2 Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien wurden steril unter der laminar air flow angesetzt und bei + 4 °C gelagert. Durch Erhitzen auf 56°C über 30 Minuten wurde das FCS inaktiviert. Vor Gebrauch musste es noch steril filtriert werden.

- Medium für A549-Zellen (500 ml Kulturmedium): 430 ml F12, 50 ml FCS, 5 ml Antibiotika (Penicillin G/Streptomycin), 5 ml L-Glutamin, 5 ml nicht essentielle Aminosäuren und 5 ml Vitamine
- Medium für pulmonalarterielle Fibroblasten vom Kaninchen (500 ml Kulturmedium): 330 ml F12, 50 ml FCS, 110 ml DMEM, 5 ml Antibiotika (Penicillin G/Streptomycin), 5 ml L-Glutamin und 500 µl Pyruvat
- Transportmedium für pulmonalarterielle Fibroblasten vom Kaninchen (500 ml Medium): 280 ml F12, 100 ml FCS, 110 ml DMEM, 5 ml Antibiotika (Penicillin G/Streptomycin), 5 ml L-Glutamin und 500 µl Pyruvat



## 2.3 Geräte

- ABL 330 (Acid Base Laboratory), Radiometer (Willich, Deutschland)
- CO<sub>2</sub> –Inkubator IR 1500, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- E 5889 (Elektrophorese), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Elisa-Reader, Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
- Eppendorfkühlzentrifuge, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- Homogenisator-Antrieb, Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland)
- Milli Q Wasseraufbereitungsanlage, Millipore (Eschborn, Deutschland)
- Power-Supply, Amersham Pharmacia Biotech (Wien, Österreich)
- Semi-dry Blotkammer, Keutz (Reiskirchen, Deutschland)
- Sterilbank (laminar air flow) Typ BSB, 4a, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Waage, Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanta, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

## 2.4 Isolation von pulmonalerteriellen Fibroblasten vom Kaninchen

Die verwendeten Zellen wurden aus den Gefäßen der Kaninchenlunge isoliert. Hierfür wurde als erstes die Lunge nach dem Modell der isolierten Lunge herauspräpariert, wobei besonders auf eine Schonung der großen Gefäße geachtet werden musste. Anschließend erfolgte eine Isolation der Zellen aus den Gefäßen.

### 2.4.1 Präparation der isolierten Kaninchenlunge

Die Kaninchen werden mit einem Gemisch aus Ketanest und Rompun (Verhältnis 3:2) analgosediert und mit 1000 IE Heparin pro kgKG antikoaguliert. Die Applikation erfolgt über einen peripheren Zugang. Nach Erreichen einer

ausreichenden Relaxation bei erhaltener Spontanatmung des Tieres wird eine Lokalanästhesie des ventralen Halses mit 2%igem Xylocain 3 cm unterhalb des Larynx durchgeführt. Danach kann die Trachea schmerzfrei durch schichtweises Präparieren unter Schonung der großen Gefäße mobilisiert und nach Anfertigung eines Tracheostomas eine endotracheal eingebrachte Trachealkanüle durch eine äußere Ligatur fixiert werden. Die Beatmung mit 30 ml Hubvolumen und einer Frequenz von  $30 \text{ min}^{-1}$  erfolgt initial mit Raumluft und einem endexpiratorischen Druck von  $1 \text{ cm H}_2\text{O}$ . Bei nun gesicherter maschineller Beatmung wird die Narkose über ca. 10 min bis zur völligen Analgesie unter palpatorischer Kontrolle der Herzfrequenz vertieft.

Daraufhin kann die Haut durch Schnitte über dem Sternum und entlang der Rippenbögen weiträumig mobilisiert werden. Über eine Inzision im Epigastrium erfolgen eine Oberbauchlaparotomie, die Anklammerung des Processus xiphoideus und die breite Eröffnung des Abdomens entlang der Rippenbögen unter Schonung des Diaphragmas. Nach stumpfer Ablösung des Diaphragmas vom Sternum gelingt die Eröffnung beider Pleurahöhlen ohne Lungenläsion. Es folgen eine mediane Sternotomie bei weiterhin beatmeten Lungen und die stumpfe Entfernung des Thymusgewebes. Im nächsten Schritt wird das Perikard eröffnet sowie Aorta und Pulmonalis mit je einem Faden angeschlungen.

Daraufhin wird die Beatmung auf das normoxische Gasgemisch mit 4%  $\text{CO}_2$  umgestellt, um eine optimale pH-Wert-Einstellung unter bevorstehender kalter Perfusion der Lunge mit Bikarbonat-gepuffertem Perfusionsmedium zu erreichen. Nach Inzision des rechtsventrikulären Ausflusstraktes des schlagenden Herzes folgt das sofortige Einbringen und Fixieren des pulmonalarteriellen Katheters (Innendurchmesser 4 mm) ohne Unterbrechung der Lungenperfusion. Der Katheter ist mit  $4^\circ\text{C}$  kaltem Perfusat blasenfrei vorgefüllt, die Perfusion beginnt sofort mit einem Fluss von ca. 20 ml/min. Mit der beschriebenen Technik können Luftembolien der pulmonalen Strombahn weitgehend verhindert werden. Es schließt sich die Resektion der Spitze des linken Ventrikels an, damit sich kein Abflusswiderstand aufbauen kann, der zur Erhöhung des pulmonalvaskulären Filtrationsdruckes mit konsekutivem Lungenödem führen könnte. Danach erfolgt die Ligatur der Aorta proximal des Koronararterienabganges mittels des liegenden Fadens. Die Lunge ist hiermit perfusions- und ventilationsseitig vollständig vom Tierkörper isoliert.

## 2.4.2 Präparation der Fibroblasten aus den Lungenarterien

Nach Herausnahme der Lunge aus dem Tierkörper wird diese unter kontinuierlicher Perfusion mit Hilfe des Beatmungsschlauchs und Perfusionsschlauchs an einem Stativ fixiert. Nun beginnt die Feinpräparation der Lunge. Zunächst wird die Aorta am Aortenbogen und der Ösophagus abgetrennt. Im Weiteren wird das umgebende Fett- und Bindegewebe zur Darstellung der A. pulmonalis entfernt. Nachdem die Lunge mit 1 l Elektrolytlösung perfundiert wurde, wird die Beatmung und Perfusion gestoppt. Der in die A. pulmonalis eingelegte Katheter wird entfernt und die Arterie wird kurz vor Eintritt in die Lunge abgesetzt und anschließend zur Aufbewahrung in Transportmedium gegeben. Die Lunge wird nun zur weiteren Präparation unter der Lupe auf eine Korkplatte mit 4 Kanülen fixiert. In darauffolgenden Schritten wird bis zu einem Gefäßdurchmesser von 300-500 µm teilweise mit einer Schere, teilweise auch stumpf mit zwei Pinzetten präpariert. Die herausgetrennten Gefäßabschnitte werden ebenfalls in Transportmedium gegeben.

Zur weiteren Präparation der Fibroblasten wird die Media der pulmonalarteriellen Gefäße nach vollständiger mechanischer Entfernung des Endothels eingeritzt und mit Hilfe einer Sterilupe mit Skalpell und Pinzette von der Adventitia getrennt. Die Adventitia-Stücke werden jeweils zerkleinert und mit Kollagenase für 1 Stunde unter leichtem Rotieren inkubiert. Nach Zentrifugation werden die Gewebestücke mit Kulturmedium überschichtet. Die Fibroblasten wachsen bereits nach 1-2 Tagen.

## 2.5 A549-Zellen

Die Zelllinie A549 ist aus einem humanen Lungenkarzinom (Adenokarzinom) isoliert und von der Firma ATCC (American Type Culture Collection, Massassas, VA, USA) bezogen. A549-Zellen entsprechen von ihrer Morphologie her epithelialen Zellen mit Eigenschaften von humanen Lungenalveolarepithelzellen Typ II [44] und bilden einen adhärennten Monolayer. Die Zellen werden bei 90%

Konfluenz, etwa alle drei Tage, passagiert. Im Inkubator werden die Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Raumluft kultiviert.

## **2.6 Zellkultur**

### **2.6.1 „Splitten“ von Zellen**

Nachdem sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hat, können die Zellen subkultiviert werden. Dazu wird von den 150er Petrischalen das Medium abgesaugt und die Zellen werden 2 x mit serumfreien Medium (37°C) gewaschen. Anschließend wird mit 10 ml temperierter Trypsin-EDTA-Lösung (37°C) inkubiert, bis sich der Zellmonolayer nach ca. 1 Minute vom Boden der Schale löst. Dieser Vorgang wird im Mikroskop kontrolliert und durch leichtes Klopfen unterstützt. Die Trypsin-EDTA-Lösung mit den Zellen wird nun in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, das bereits 1 ml FCS zum Inaktivieren des Trypsins enthält. Durch mehrmaliges Spülen der Schale werden auch die restlichen Zellen abgelöst. Das Zentrifugenröhrchen wird bei 250 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet resuspendiert und die Zellen werden auf drei 150er Petrischalen gleichmäßig verteilt. Wenn sich nach weiteren 2-3 Tagen wieder ein vollständiger Zellrasen ausgebildet hat, kann dieser Vorgang wiederholt oder die Zellen können für einen Versuch eingesetzt werden.

### **2.6.2 Einfrieren von Zellen**

Zur längeren Aufbewahrung können Zellen in Stickstoff (-196°C) eingefroren werden. Hierfür wird ein spezielles Einfriermedium verwendet, das zur Verhinderung der Ruptur von Zellen 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) enthält.

Medium A: 9 ml Kulturmedium + 1 ml 0,2 M HEPES, Lösung auf Eis kühlen

Medium B: 4 ml von Medium A + 1 ml DMSO, Lösung muss sterilfiltriert werden

Nach Vorbereitung der Medien werden die Zellen zunächst wie unter 2.6.1 beschrieben von den Kulturplatten mit Trypsin gelöst. Nach Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl von Medium A aufgenommen. Nach 5 minütigem Kühlen auf Eis wird erneut resuspendiert und die Suspension in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt. Anschließend werden 500 µl von Medium B hinzugegeben. Die Kryoröhrchen werden nun zunächst 2 Stunden im Gefrierfach und dann über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, bevor sie schließlich in den Stickstofftank überführt werden können.

### **2.6.3 Auftauen von Zellen**

Die Kryoröhrchen werden aus dem Stickstofftank genommen und bei Raumtemperatur beobachtet. Sofort nach dem Auftauen werden die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend für 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Pellet in Kulturmedium aufgenommen und auf Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag folgt ein Mediumwechsel, dadurch entfernt man sowohl tote Zellen (ca.  $\frac{1}{3}$  der Zellen wird beim Einfrieren abgetötet) als auch ausgetretenen Zellinhalt und noch restliches DMSO (aus dem Einfriermedium).

## **2.7 Versuchsablauf: Bestimmung von HIF-1 $\alpha$ auf Proteinebene**

### **2.7.1 Hypoxie**

Zur Herbeiführung der Hypoxie wird in einem Hypoxiesack (Glove bag, Firma Roth, Karlsruhe), der mit einem Gasmisch (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) gefüllt ist, gearbeitet (Abb. 3). Nach Entfernen des Kulturmediums wird zweimal mit temperiertem (37°C) und äquilibriertem PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit äquilibriertem serumfreiem Medium und zur Stimulation mit

Angiotensin II, der Konzentrationen 1 nM, 10 nM oder 100 nM bedeckt. Während der Hypoxieexposition wird die Hypoxiekammer in ein erwärmtes Wasserbad (37°C) gestellt (Abb. 4). Zum Aufrechterhalten der Hypoxie wird alle 14 Minuten über eine Minute mit einem Gasgemisch (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) mit einem Flow von 500 ml/Minute begast.

**Äquilibrieren der Medien:** Das Versuchsmedium (Kulturmedium ohne FCS) bzw. PBS wird solange mit einem Gasgemisch (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) begast bis der Sauerstoffgehalt bei 1% liegt (Kontrolle über ABL). Bei den durchgeführten Kontrollen zeigte sich der pH stabil zwischen pH 7,35- 7,42.



Abb. 3: Fotografie des Versuchsaufbaus. Man sieht den mit Gasgemisch gefüllten Hypoxiesack, in dem die Hypoxiekammer, die Zellkulturplatten und die verschiedenen Versuchsmedien, neben Verbrauchsmaterial stehen.

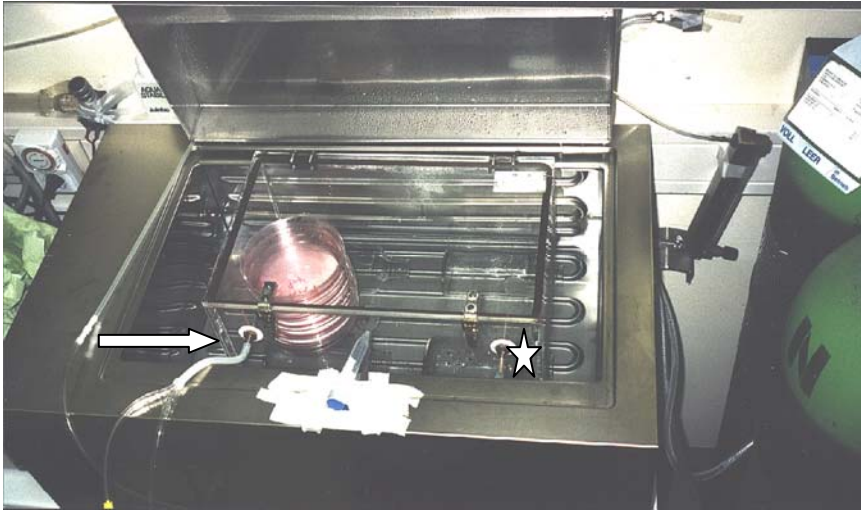


Abb. 4: Fotografie der Versuchskonditionen während der Hypoxie. Die Hypoxiekammer steht im temperierten Wasserbad. Über einen Zugang (Pfeil) wird alle 14 min ein Gasgemisch (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) zur Aufrechterhaltung der Hypoxie zugeführt. Über einen Plastikschlauch (Stern), der unter die Wasseroberfläche geführt wird (Wasserschloss) kann Gas zur Vermeidung von Überdruck austreten.

### 2.7.2 Präparation des nukleären Extraktes

Die konfluenten Zellen werden jeweils mit serumfreiem Medium versorgt, je nach Versuchsansatz wird teilweise Angiotensin II zur Stimulation hinzugegeben. Die Zellkulturen, die der Hypoxie ausgesetzt wurden, werden wie unter 2.7.1 beschrieben in die Hypoxiekammer gestellt. Die Dauer der Hypoxieexposition variiert zwischen 1 und 48 Stunden und ist im entsprechenden Ergebnisteil angegeben. Die Kontroll-Kultur (Normoxie) wird zunächst wie die „Hypoxiegruppe“, wobei keine äquilibrierten Medien benutzt werden, behandelt. Anschließend wird sie während der Versuchsdauer bei 37°C im Wärmeschrank (5% CO<sub>2</sub>, Rest Raumluft) kultiviert.

Zur Beendigung der Hypoxie werden die Kulturplatten aus der Hypoxiekammer herausgenommen und auf Eis gestellt. Anschließend wird sofort 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach werden die Zellen mit Hilfe eines Cell-scraper von der Kulturschale abgeschabt und in 5 ml PBS aufgenommen. Die Suspension wird bei 4°C mit 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Es ist darauf zu achten, dass man

schnell arbeitet (Halbwertszeit von HIF-1 $\alpha$  < 1 Minute [102]) und zu keiner Zeit die Kühlkette unterbricht. Nach dem Zentrifugieren wird das Pellet in seinem vierfachen Volumen in Puffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl) + Proteaseninhibitions-gemisch (1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss werden die Zellen in einem Homogenisator für 10 Sekunden bei 3000 Umdrehung/Minute lysiert. Danach wird erneut bei 4°C mit 4500 g für 5 Minuten zentrifugiert, das Pellet entspricht dann den Zellkernen, die in ihrem zweifachen Volumen in Puffer C (20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM KCl, 20% Glycerol) + Proteaseninhibitions-gemisch (0,5 mM DTT, 0,4 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin, 2 µg/ml Aprotinin) resuspendiert werden. Nach 30 minütigem Schütteln bei 4°C wird zum Abschluss nochmals 30 Minuten bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand entspricht dem nukleären Extrakt. Der Proteingehalt wird mit dem Bradford Protein Assay (BioRad) ermittelt, als Standard wird Bovines Serum Albumin benutzt. Der nukleäre Extrakt wird mit flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Präparation des nukleären Extraktes der Kontroll-Kultur (Normoxie) wird analog durchgeführt.

Ansatz für 500 ml zehnfach konzentrierten PBS-Puffer: 40 g NaCl, 14,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1 g KCl und 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; zur Herstellung von einfach konzentriertem PBS-Puffer wird mit Aqua. Dest. verdünnt, anschließend wird auf pH 7,4 eingestellt.

### 2.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode erfolgt nach dem BioRad-Proteinassay® Protokoll der Firma BioRad [6]. Verwendet werden blaue Säurefarbstoffe, die als Coomassie-Brilliantblau bezeichnet werden. In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich im sauren Milieu das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblau G250 von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form). Dabei korreliert die Menge an Protein mit der Absorption bei



595 nm, was eine Quantifizierung des Proteingehaltes einer Lösung ermöglicht [47].

**Durchführung:**

1 µl der Proben mit unbekannter Proteinkonzentration werden mit 799 µl BiAqua-Dest. und 200 µl des Farbstoffkonzentrates (BioRAD-Proteinassay®, Coomassie-Brilliantblau) versetzt, durchmischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wird bei 595 nm im ELISA-Reader gemessen (Programm: EASY-FIT). Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter BSA-Konzentration (0-8 µg) gelöst in Puffer C (= Hintergrund).

## 2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können nach Denaturierung mit SDS (Natriumdodecylsulfat) in einer Polyacrylamidmatrix unter Einwirkung eines äußeren elektrischen Feldes gemäß ihrer Molekulargröße separiert werden. Die unterschiedliche Ladung der Proteine wird dabei durch das zugesetzte SDS aufgehoben, indem sich SDS-Protein-Komplexe mit konstanten Ladungs-/Massen-Verhältnis bilden. Dadurch ist die Auftrennung in einer dreidimensionalen Polyacrylamid-Matrix nach der Größe der Moleküle möglich. Das Polyacrylamidgel selbst kann je nach Anwendungszweck in Dicke, Größe, Vernetzungsgrad bzw. Porengröße variiert werden. Das Gel besteht aus zwei Teilen, dem Sammelgel und dem Trenngel. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung unseres nukleären Extraktes wird ein 7,5%iges kontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet.

**Vorbereitung der Gele:** Die gereinigten Elektrophoreseplatten werden mit Methanol entfettet, mit Spacern (1 cm) versehen und mit dem Gasket abgedichtet. Nach Vorbereitung der Trenngellösung wird durch Hinzugabe von APS (Ammoniumpersulfat) die Polymerisation gestartet. Nach dem Einfüllen des Trenngels wird der obere Gelrand mit 75 µl Propanol zur besseren Polymerisation und zur Vermeidung von Luftblasen überschichtet. Die Polymerisation ist bei Zimmertemperatur nach etwa 35 Minuten abgeschlossen. Nach Entfernen der

Überschichtung wird der Oberrand des durchpolymerisierten Gels mit 3 x 1 ml Aqua dest. gewaschen, das Sammelgel aufgetragen und mit dem Probenkamm versehen. Die Polymerisation des Sammelgels dauert ca. 25 Minuten.

Anschließend kann der Kamm entfernt und die „Elektrophorese“ zusammengebaut werden. Hierfür werden die Elektrophoreseapparatur mit Elektrodenpuffer (Laufpuffer) vorgefüllt und die durchpolymerisierten Elektrophoreseplatten eingespannt. Anschließend wird noch der fehlende Elektrodenpuffer nachgefüllt. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen am unteren Rand der Platten befinden, da diese den Stromfluss behindern könnten. Nun werden die Proben nach entsprechender Vorbereitung, die Positivkontrolle und der Marker (Full Range Rainbow) aufgetragen.

#### **Trenngel 7,5%**

Acrylamid	3,3 ml
Trenngelpuffer	3,3 ml
Aqua dest.	6,4 ml
10% SDS	130 µl
Temed	10 µl
APS	75 µl

Zur Herstellung von 200 ml Trenngelpuffer werden 36,5 g Tris (1,5 M) in 150 ml Aqua dest. gelöst, mit konzentrierter Salzsäure wird pH 8,8 eingestellt und das fehlende Volumen mit Aqua dest. aufgefüllt.

10% SDS Lösung: 10 g Natriumdodecylsulfat werden in 100 ml Aqua dest. gelöst, um eine schnelle Lösung der Substanz zu erzielen, empfiehlt sich eine leichte Wärmezufuhr.

#### **Sammelgel 4%**

Acrylamid	1,34 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqua dest.	6 ml
10% SDS	100 µl
Temed	10 µl
APS	75 µl

Zur Herstellung von 50 ml Sammelgelpuffer werden 3,0 g Tris (1,5 M) in 40 ml Aqua dest. gelöst, mit konzentrierter Salzsäure wird pH 6,8 eingestellt und das fehlende Volumen mit Aqua dest. aufgefüllt.

### **Elektrodenpuffer (Laufpuffer)**

Zur Herstellung von 2 l Elektrodenpuffer werden 6 g Tris (25 mM), 28,8 g Glycin (192 mM) und 20 ml 10% SDS (0,1%) in 1,8 l Aqua dest. gelöst. Anschließend wird das fehlende Volumen mit Aqua dest. aufgefüllt.

**Vorbereitung der Proben:** 10 µg nukleärer Extrakt werden in 8 µl PBS, das mit Bromphenolblau gefärbt ist und 2 µl 10fach konzentrierten Laemmli-Puffer (als Endkonzentration resultiert 1x) pipettiert. Nach 5 minütigem Denaturieren bei 95°C kommen die Proben direkt auf Eis. Das anschließende Beladen des Gels erfolgt mit einer Hamiltonpipette.

**Trennung:** Die Protein-Trennung erfolgt bei einer Spannung von 100 V. Die Spannung bleibt während der Trennung/Durchlaufen der Proteine im Sammelgel unverändert. Die Laufstrecke der Farbmarker Bromphenolblau und Full Range Rainbow geben einen Hinweis darauf, wann der Elektrophoreselauf abzubrechen ist. Die Auftrennung dauert ca. 75 Minuten.

## **2.7.5 Western Blot**

Die Bezeichnung Western Blot geht auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik namens Edwin Southern zurück, der die Methode 1971 für die Auftrennung von DNA Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als Southern Blotting eingeführt hatte. In Anlehnung an seinen Namen wurde die entsprechende Auftrennung von Proteinen als Western Blotting bezeichnet. Beim Western Blot werden in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran aus Nitrocellulose/PVDF transferiert. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Transfermembran gebunden.

Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteine können von Antikörpern erkannt werden, da sie renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiär-, nicht jedoch ihre Quartärstruktur einnehmen. Für diesen elektrophoretischen Transfer sind zwei unterschiedliche Systeme im Einsatz, das von uns verwendete Semidry-Blot-System und das Tank-Blot-System.

Um unspezifische Bindungen des zur Detektion verwendeten Primärantikörpers an der Membran zu verhindern, wird nach dem Transfer der Proteine zuerst mit einem für den Primärantikörper nicht erkennbaren Protein inkubiert. Dafür eignen sich sowohl BSA (Bovine Serum Albumin) als auch Milchpulver. Um die spezifische Bindung der Primärantikörper an die Epitope des Antigens nachzuweisen, wird ein spezies-spezifischer Sekundärantikörper verwendet, der mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase = HRP) gekoppelt ist. HRP kann verschiedene Substrate umsetzen, darunter Diaminobenzidin. Die Produkte bilden ein sichtbares Präzipitat um den Antigen-Antikörper-Komplex.

Mit der Western Blot Technik ist es möglich, Proteine aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen zu übertragen und später mit einem spezifischen Antikörper zu detektieren. Die Gele werden nach Entnahme aus der Elektrophoreseapparatur für 5 Minuten in Blot Puffer (für 1 l Ansatz: 6 g Tris, 3 g Glycin, 200 ml Methanol, Restvolumen Aqua. Dest.) äquilibriert. Dieser Schritt ist nötig, um einer Größenveränderung des Gels während des Transfers vorzubeugen, da das Gel durch das enthaltene Methanol schrumpft. Tritt diese Größenveränderung während des Transfers auf, ergeben sich diffuse und verzerrte Banden.

Bei der PVDF-Membran erfolgt die Äquilibration durch sukzessives Tauchen in 100% Methanol (bis die Membran transparent ist, jedoch max. 5 Sekunden), danach wird 3 x 5 Minuten in Blot Puffer gewaschen.

**Transfer der separierten Proteine auf die PVDF-Membran:** Bei einer Semi-dry-Vorrichtung erfolgt der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran zwischen zwei horizontal angeordneten Plattenelektroden. Hierfür werden das Gel und die PVDF-Membran zwischen 2 x 3 Lagen von in Blot Puffer getränktem Filterpapier luftblasenfrei gelegt. Das „Sandwich“ wird dann zwischen den

Kohleplattenelektroden (unten: Anode, oben: Kathode) und der Blotting Apparatur platziert (Anode - 3 Lagen Filterpapier – PVDF-Membran – Gel – 3 Lagen Filterpapier – Kathode). Auch hier ist es wichtig, dass keine Luftblasen vorhanden sind, da diese den Stromfluss und damit den Transfer stören würden. Bei allen Schritten wird fettfrei mit Gummihandschuhen gearbeitet. Anschließend erfolgt das Blotting mit einer Stromstärke von  $1,25 \text{ mA/cm}^2$  Gel über einen Zeitraum von 60 Minuten.

**Blockieren der freien Bindungsstellen:** Die Membran wird nach dem Blot für 60 Minuten in 1% BSA gelöst in PBS mit 0,5% Tween 20 inkubiert. Dadurch werden unspezifische Bindungsstellen blockiert.

**Inkubation mit Antikörpern:** Nach Blockieren der freien Bindungsstellen wird die Membran über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit dem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Der Erstantikörper wird in 10 ml 1% BSA in PBS verdünnt (1:1000). Nach der Inkubation wird 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der Meerrettich-Peroxidase konjugierte Zweitantikörper (anti-chicken IgY) wird ebenfalls in 10 ml 1% BSA/PBS verdünnt, anschließend wird die Membran für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur in dieser Lösung bewegt. Im Anschluss erfolgt wiederum dreimaliges Waschen der Membran mit PBS.

**Detektion der Proteinbanden:** In Gegenwart eines Oxidationsmittels ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) katalysiert die Meerrettich-Peroxidase eine Umwandlung von Diaminobenzidin (DAB) zu einem farbigen, immobilisierten Endprodukt. Dazu werden 60 mg DAB in 90 ml PBS und 10 ml 0,3%igen  $\text{NiCl}_3$ -Lösung gelöst. Gibt man diesem Gemisch  $100 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzu, startet die Reaktion. Die Membran wird mit der Substratlösung bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach ausreichender Visualisierung der Proteinbanden und vor Verfärbung des Membranhintergrundes wird die Reaktion durch Entfernen des Wasserstoffperoxid mittels Spülen mit PBS abgebrochen.

## 2.7.6 Bestimmung der optischen Dichte

Nach Visualisierung der Proteinbanden wurden die PVDF-Membranen eingescannt, so dass eine Messung der optischen Dichte der Banden stattfinden kann. Für diese densitometrische Messung wird als Software TINA Version 2.09c der Firma raytest Isotopenmessgeräte GmbH benutzt.

## 2.8 HIF-Reportergen Assay

Die Aktivierung der HIF abhängigen Gene wird mit einem Reportergen-Assay analysiert. Hierfür wird der Duale-Reportergen-Assay (Promega) mit Firefly- und Renilla-Luciferase als Reporter gene eingesetzt. Dabei stehen die Firefly-Luciferase-Reporter gene unter der Kontrolle des Hypoxie sensitiven VEGF-Promoters und die Renilla-Luciferase-Reporter gene unter der Kontrolle des nicht Hypoxie sensitiven Herpes-Simplex Thymidin-Kinase-Promoters. Die Reporter-Gen-Vektoren werden mit Hilfe von kationischen Lipiden in die Zellen transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion den Versuchsbedingungen, z.B. Hypoxie, ausgesetzt. Bei Versuche werden die Zellen in 4°C kaltem Luciferase Lysepuffer lysiert. Im Lysat werden die jeweiligen Reporter gen-Aktivitäten, die unter der Kontrolle des Hypoxie-abhängigen und -unabhängigen Promoters stehen mit Hilfe eines Chemilumineszenz Verfahrens in einem Bioluminometer (Berthold) gemessen.

### **Durchführung:**

Zur Vorbereitung der Experimente werden A549-Zellen in 24-Loch-Platten derart ausgesät, dass sie nach dem Anwachsen etwa 70% der Fläche besetzen (subkonfluent). Die Transfektion erfolgt, solange sich die Zellen nach dem Passagieren noch nicht abgesetzt haben. Pro Well der 24-Loch-Platte (1,77 cm<sup>2</sup>) werden 0,2 µg Reporter genvektor (firefly), 0,01 µg Standardisierungsvektor (renilla) und 0,2 µg Transkriptionsfaktor-Plasmid zusammengegeben, mit Grundmedium (Kulturmedium mit 5% FCS, ohne Penicillin und Streptomycin) auf 20 µl aufgefüllt, mit 2 µl Superfect versetzt und gut durchmischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird der Ansatz auf die Zellen gegeben

und für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen den Versuchsbedingungen ausgesetzt. Die Inkubation wird durch die Zelllyse beendet. Hierfür werden die Zellen in 100 µl Lysispuffer pro Vertiefung aufgenommen und kräftig auf- und abpipettiert, um eine vollständige Lyse herbeizuführen. Das Lysat wird bei –80°C gelagert. Zur Messung werden 15 µl Lysat pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte in einem Luminometer mit 75 µl LAR II-Puffer (Bestandteil des Promega-Reagenziensatzes) versetzt. Nach zwei Sekunden Verzögerung, die der Durchmischung dienen, wird die Lichtemission acht Sekunden lang gemessen. Anschließend werden 75 µl Stop & Glow-Lösung eingespritzt und erneut gemessen. Für die Auswertung wird aus den beiden Messwerten der Quotient gebildet. Die aus den drei verschiedenen Ansätzen pro Probe erhaltenen Quotienten werden gemittelt, die Standardabweichung errechnet und graphisch ausgewertet.

## **2.9 Statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse**

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM). Die Daten wurden mittels t-Test auf ihre Signifikanz überprüft. Hierfür wurde die Versuchsgruppe gegen ihre jeweilige Kontrollgruppe getestet. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Übersicht

Im Mittelpunkt der Dissertationsschrift steht der Nachweis der HIF-1 $\alpha$  Expression auf Proteinebene in zwei verschiedenen Zelltypen der Lunge. Zum einen wurden alveoläre Epithelzellen und zum anderen pulmonalarterielle Fibroblasten untersucht.

Zunächst erfolgte eine zeitabhängige Charakterisierung der HIF-1 $\alpha$  Proteinkonzentration im Western Blot-Verfahren unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Vor dem Hintergrund, dass Angiotensin II in glatten pulmonalen Muskelzellen HIF-1 $\alpha$  induziert [63], wurde der Einfluss von Angiotensin II auf die alveolären Epithelzellen und pulmonalarteriellen Fibroblasten untersucht. Im Alveolarepithel wurde zusätzlich die HIF/HRE-Reportergen-Aktivität in Normoxie bzw. Hypoxie sowie nach Stimulation mit Angiotensin II gemessen.

### 3.2 Der Effekt von Hypoxie auf die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ in alveolären Epithelzellen (A549-Zellen)

In dieser Dissertationsschrift sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Hypoxiedauer auf die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression in alveolären Epithelzellen nimmt (Abb. 5). Dafür wurden A549-Zellen unter normoxischen und hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen in einer Zeitreihe kultiviert. Anschließend erfolgte nach Präparation des nukleären Extraktes im Westernblot-Verfahren (eingesetzt wurden 10  $\mu$ g des zellulären Proteinextraktes) eine Darstellung von HIF-1 $\alpha$ . Es zeigt sich, dass die Hypoxiedauer von entscheidender Bedeutung ist. Erst nach 2 h Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) konnte in A549-Zellen auf Proteinebene HIF-1 $\alpha$  nachgewiesen werden (Abb. 5 a). Außerdem zeigt sich ein transients Verlauf der Proteinexpression mit einem Maximum nach 4 h (Abb. 5 b).



Abb. 5 a

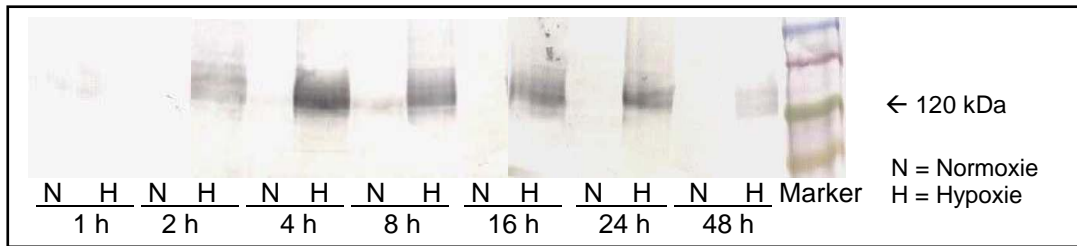
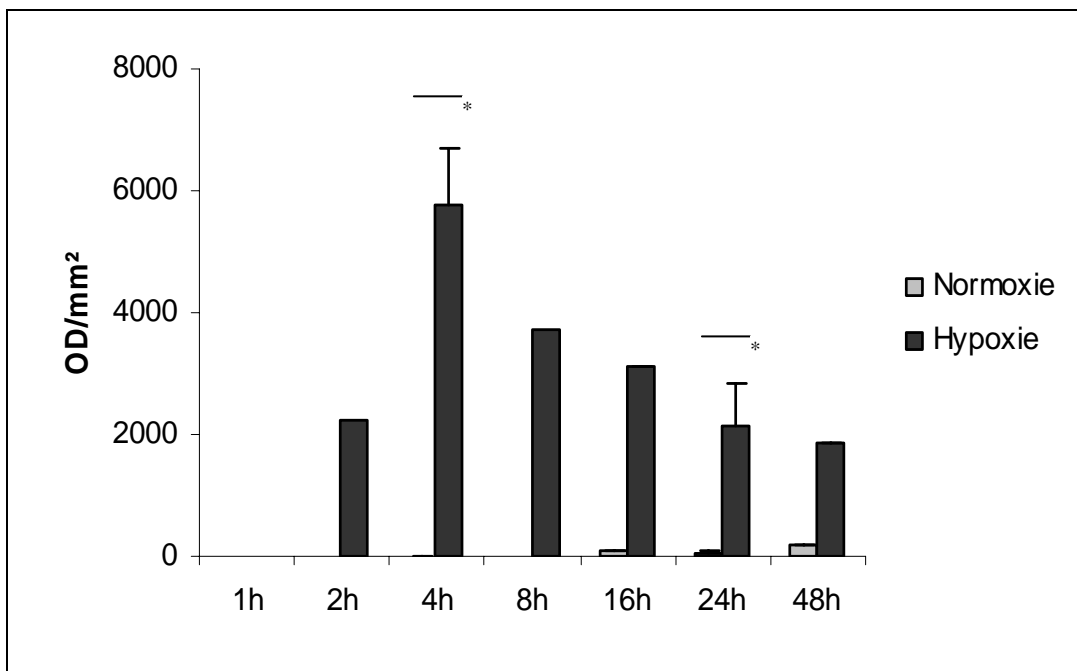


Abb. 5 b



**Abb. 5. Darstellung der Zeitkinetik der HIF-1 $\alpha$  Induktion in A549-Zellen.**

A549-Zellen wurden für 1- 48 h in Normoxie (21% O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) kultiviert. Abb. 5 a zeigt die Zeitreihe im Originalblot. In Abb. 5 b ist die densitometrische Analyse der HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression der Zeitreihe dargestellt. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) stammen aus 4 unabhängigen Experimenten (t-Test \* $p < 0,05$ ). OD/mm<sup>2</sup> steht für die optische Dichte, dies entspricht der Färbung der Blotmembran.

### **3.3. Angiotensin II verstärkt die hypoxieinduzierte HIF-1 $\alpha$ Proteinexpression in alveolären Epithelzellen (A549-Zellen)**

Es sollte untersucht werden, ob das vasokonstriktorisch wirkende Angiotensin II (Ang II) einen Effekt auf die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression in alveolären Epithelzellen hat. Dazu wurde die HIF-1 $\alpha$  Induktion im Westernblot-Verfahren in Abhängigkeit von der Ang II Konzentration in Normoxie und Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) dargestellt (Abb. 6). Als Stimulationsdosis wurden 3 Angiotensin II Konzentrationen gewählt (1 nM, 10 nM und 100 nM). Die Hypoxiedauer betrug 4 bzw. 24 h. Es ergibt sich, dass Ang II in Hypoxie dosisabhängig einen additiven Effekt auf die HIF-1 $\alpha$  Induktion ausübt mit Maximum bei 10 nM Ang II (Abb. 6 a und 6 b). Dieser additive Effekt ist nach 24 Stunden stärker ausgeprägt als nach 4 Stunden bei gleicher Dosisabhängigkeitskurve (Abb. 6 c).

Abb. 6 a

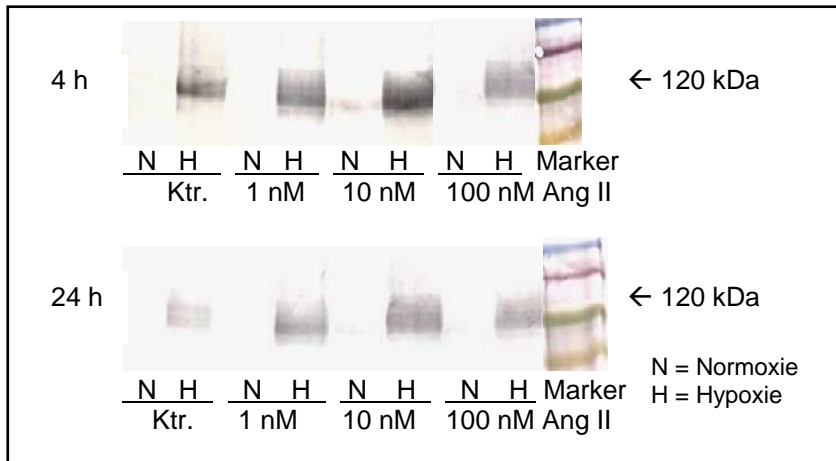


Abb. 6 b

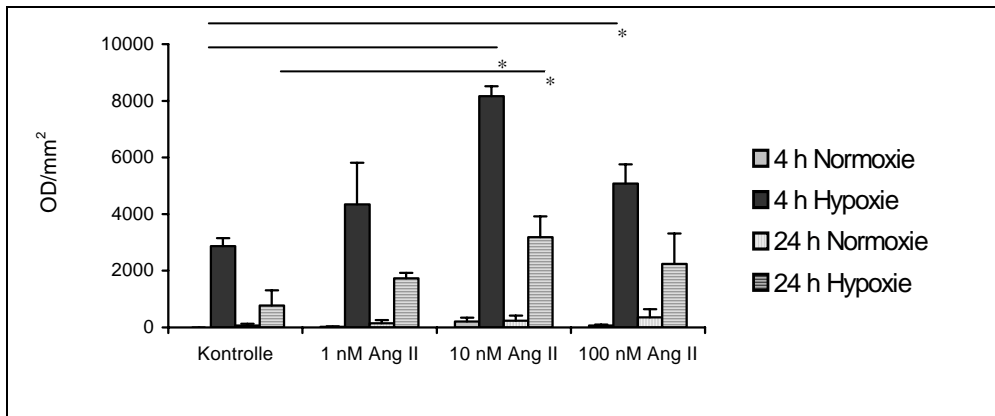
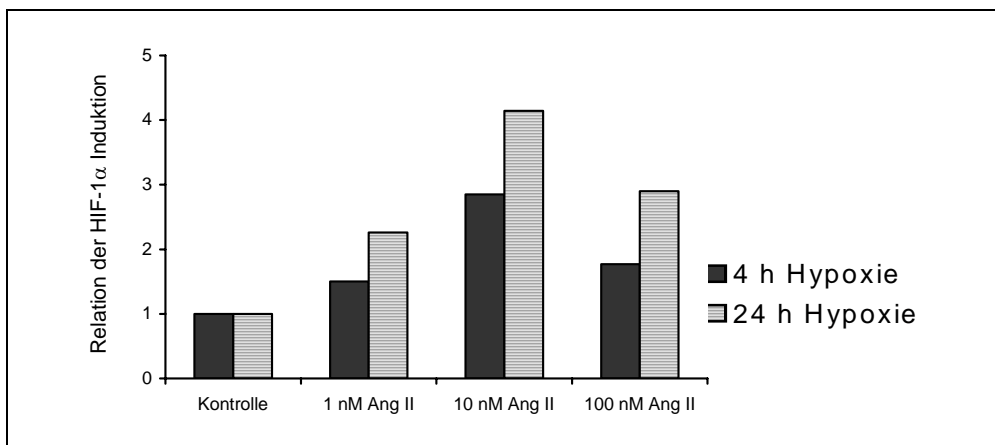


Abb. 6 c



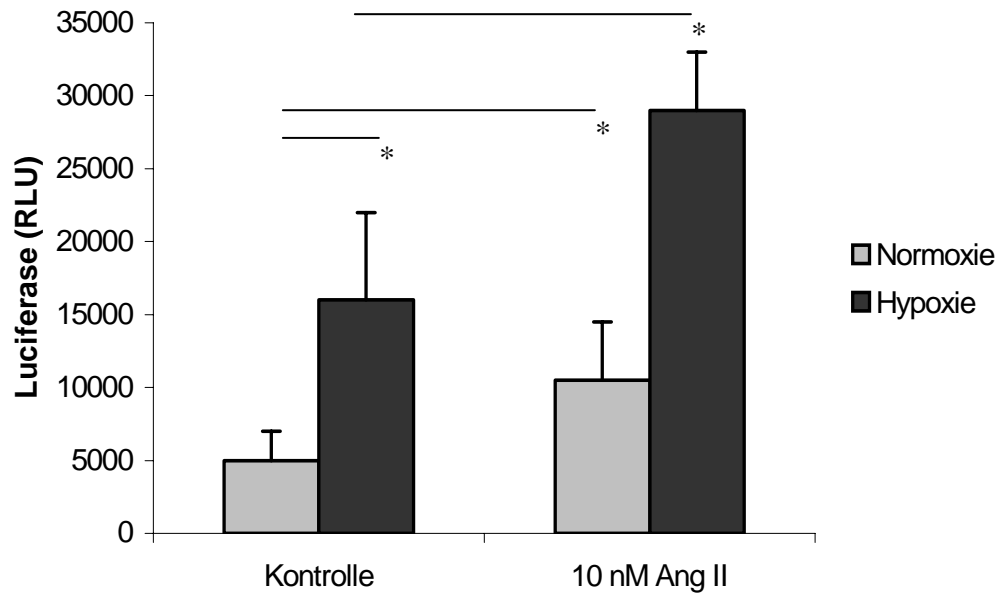
**Abb. 6: Darstellung der HIF-1 $\alpha$  Induktion in A549-Zellen unter Einfluss von Hypoxie und Angiotensin II.**

Die Zellen wurden für 4 bzw. 24 h unter normoxischen bzw. hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen teilweise unter Stimulation mit Ang II (1 nM, 10 nM und 100 nM) kultiviert. Abb 6 a zeigt einen repräsentativen Westernblot. Abb. 6 b zeigt die

densitometrisch erfasste Proteinexpression nach Westernblot-Analyse. In Abb. 6 c wird das Verhältnis der HIF-1 $\alpha$  Induktion unter Stimulation mit Hypoxie und Ang II zur Hypoxie-Stimulation dargestellt. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten (t-Test \* $p < 0,05$ ). OD/mm<sup>2</sup> steht für die optische Dichte, dies entspricht der Färbung der Blotmembran.

Mit dem Ziel die Aktivierung des Hif-1 $\alpha$  Signalwegs in hypoxischen Alveolarepithelzellen zu analysieren wurde neben der Darstellung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  auf Protein-Ebene (Abb. 5) auch die HIF/HRE-Reportergen-Aktivität gemessen (Abb. 7).

Die A549-Zellen wurden für 4 h unter normoxischen bzw. hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen teilweise unter Inkubation mit 10 nM Angiotensin II kultiviert, anschließend erfolgte im Reportergen-Assay eine Messung der HRE-Aktivität (RLU= relative lights units). Es zeigt sich eine Aktivierung der HIF/HRE-Achse bereits in Normoxie. In hypoxischer Atmosphäre (1% O<sub>2</sub>) ist ein Anstieg der HRE-Aktivität um ca. Faktor 3 zu verzeichnen. Betrachtet man den Einfluss von Angiotensin II, zeigt sich bereits in der normoxischen Kontrollgruppe eine Aktivitätssteigerung, die unter Hypoxie noch deutlich zunimmt (Abb. 7).



**Abb. 7: Effekt von Hypoxie und Angiotensin II auf die HRE-Reportergen Aktivität in A549-Zellen.**

A549-Zellen wurden mit einem Luciferase-Reporter Plasmid transfiziert und für 4 h in Normoxie oder Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) kultiviert. Eine Versuchsgruppe war zusätzlich mit 10 nM Ang II stimuliert. Die Angabe der HRE-Aktivität erfolgt in RLU (relative lights units). Die Mittelwerte  $\pm$  SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten (t-Test \* $p < 0,05$ ).

### **3.4 Der Effekt von Hypoxie auf die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ in pulmonalarteriellen Fibroblasten vom Kaninchen**

Basierend auf der Tatsache, dass Hypoxie das pulmonalvaskuläre Remodelling induzieren kann, erfolgte in dieser Dissertationsarbeit eine Charakterisierung der HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression in pulmonalarteriellen Fibroblasten. Zum Einsatz kamen Primärkulturen aus Gefäßen der Kaninchenlunge der 6-8. Passage.

Es wurde der Effekt von Hypoxie auf pulmonalarterielle Fibroblasten untersucht. Die Primärkulturen der pulmonalarteriellen Fibroblasten vom Kaninchen wurden in hypoxischer Atmosphäre (1% O<sub>2</sub>) für 4 bzw. 24 h kultiviert, anschließend erfolgte

nach Präparation des nukleären Extraktes eine Westernblot-Analyse (eingesetzt wurden 10  $\mu\text{g}$  des nukleären Extraktes). Die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression war nach 4 h Inkubation ausgeprägter als nach 24 h. Innerhalb der jeweiligen normoxischen Kontrollgruppe gelang kein Protein-Nachweis (Abb. 8). Vergleichend zu den A549-Zellen ist der zeitliche Verlauf der HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression gleich. In A549-Zellen wird jedoch HIF-1 $\alpha$  nach 4 h Hypoxie ca. 2,3fach stärker exprimiert als in pulmonalarteriellen Fibroblasten (t-Test  $p < 0,05$ ).

Abb. 8 a

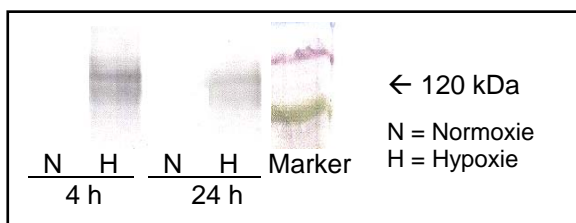
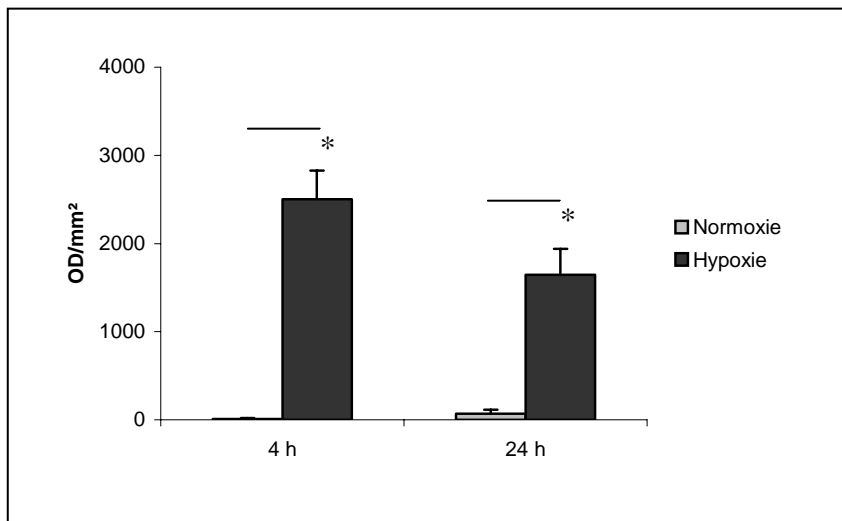


Abb. 8 b



**Abb. 8: Effekt von Hypoxie auf die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression in pulmonalarteriellen Fibroblasten.**

Primärkulturen von pulmonalarteriellen Fibroblasten vom Kaninchen wurden für 4 bzw. 24 h unter hypoxischen Bedingungen (1% O<sub>2</sub>) kultiviert. Abb. 8 a zeigt einen repräsentativen Westernblot. In Abb. 8 b ist die densitometrisch erfasste HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression dargestellt. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) stammen aus 5 unabhängigen Experimenten (t-Test  $*p < 0,05$ ). OD/mm<sup>2</sup> steht für die optische Dichte, dies entspricht der Färbung der Blotmembran.

### **3.5 Angiotensin II verstärkt die hypoxieinduzierte HIF-1 $\alpha$ Proteinexpression in pulmonalarteriellen Fibroblasten vom Kaninchen**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 10 nM Angiotensin II (Ang II) auf A549-Zellen in Hypoxie einen additiven Effekt auf die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression hat, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die genannten Stimuli auf pulmonalarterielle Fibroblasten nehmen. Hierfür wurde die HIF-1 $\alpha$  Induktion im Westernblot-Verfahren nach Inkubation mit 10 nM Ang II in Hypoxie und Normoxie gemessen. Die Inkubationsdauer betrug 4 bzw. 24 h. Unter der Stimulation mit 10 nM Ang II war die HIF-1 $\alpha$  Proteinkonzentration kaum gesteigert, aus diesem Grund erfolgte eine Stimulation mit 100 nM Ang II. Hierunter war die HIF-1 $\alpha$  Induktion deutlicher (Abb. 9 a und 9 b). Betrachtet man die Relation der HIF-1 $\alpha$  Induktion durch Ang II in Hypoxie zur reinen Stimulation durch Hypoxie (Abb. 9 c), ist diese nach 24 h Inkubation ausgeprägter als nach 4 h Inkubation. Der additive Effekt von Hypoxie und Ang II war jedoch in den A549-Zellen stärker als in den pulmonalarteriellen Fibroblasten.

Abb. 9 a

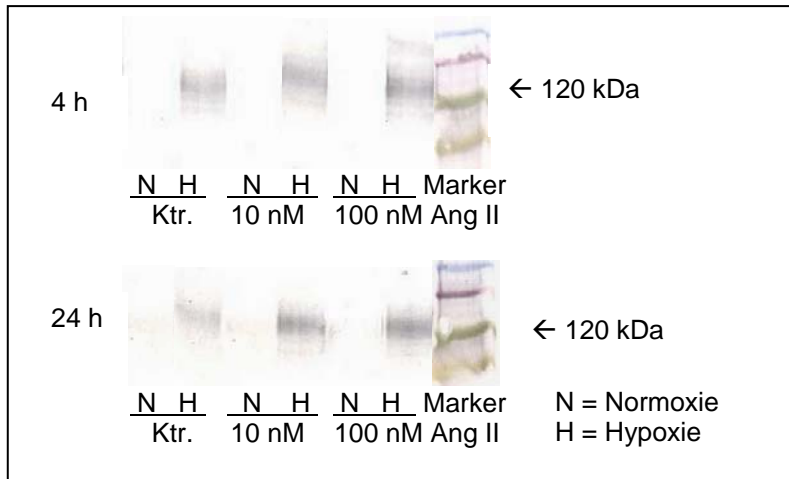


Abb. 9 b

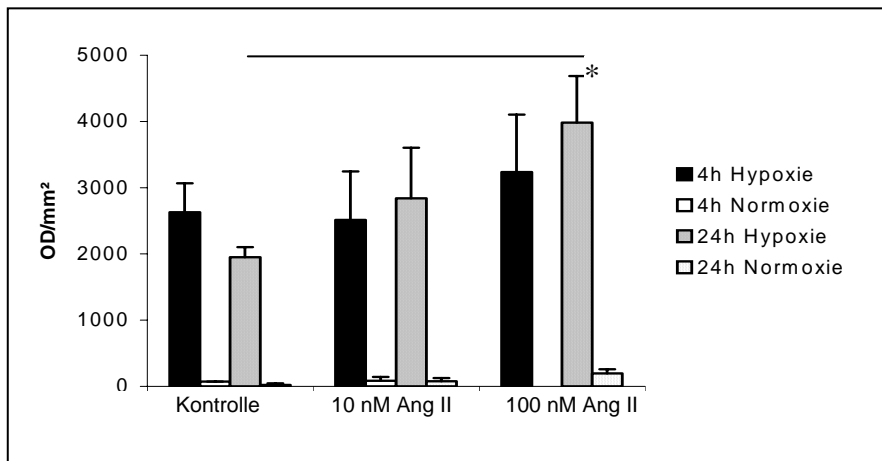
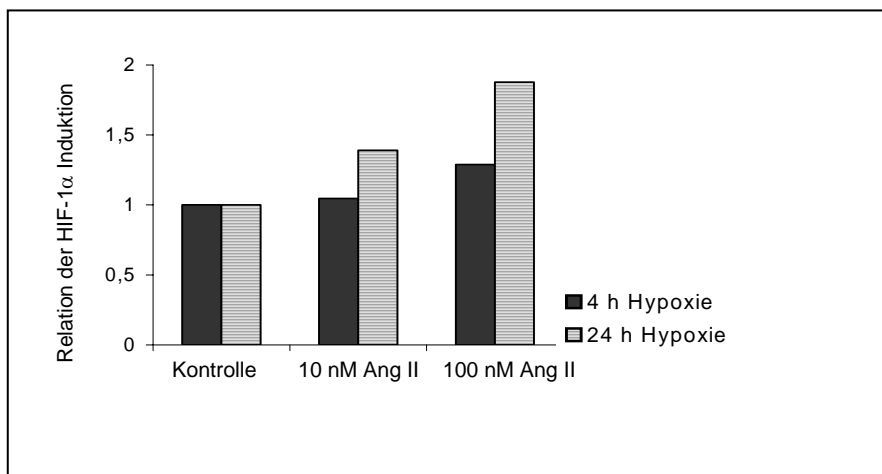


Abb. 9 c



**Abb. 9: Darstellung der HIF-1 $\alpha$  Induktion in pulmonalarteriellen Fibroblasten unter Einfluss von Hypoxie und Angiotensin II.**

Die Zellen wurden für 4 bzw. 24 h unter normoxischen bzw. hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen teilweise unter Applikation von Ang II kultiviert. Abb. 9 a zeigt einen repräsentativen Westernblot. Abb. 9 b zeigt die densitometrisch erfasste



Proteinexpression. In Abb. 9 c wird das Verhältnis der HIF-1 $\alpha$  Induktion unter Stimulation mit Hypoxie und Ang II zur Hypoxie-Stimulation dargestellt. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten (t-Test \* $p < 0,05$ ). OD/mm<sup>2</sup> steht für die optische Dichte, dies entspricht der Färbung der Blotmembran.

## 4 Diskussion

Die zugrunde liegende Fragestellung kann folgendermaßen beantwortet werden:

1. Auf Proteinebene wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  im Alveolarepithel und in den pulmonalarteriellen Fibroblasten durch Hypoxie induziert. Dabei zeigt die Proteinexpression in beiden Zelltypen einen transienten Verlauf mit Maximum nach 4 h Hypoxie. HIF-1 $\alpha$  wird im Alveolarepithel unter Hypoxie signifikant stärker exprimiert als in den Bindegewebszellen. In beiden Zelltypen gelingt in der normoxischen Vergleichsgruppe kein Proteinnachweis.
2. Angiotensin II hat konzentrations- und zeitabhängig sowohl im Alveolarepithel, als auch in den pulmonalarteriellen Fibroblasten auf die HIF-1 $\alpha$  Induktion in Hypoxie einen additiven Effekt. Dabei zeigt sich im Alveolarepithel bereits bei einer Stimulation mit 10 nM Angiotensin II eine signifikante Induktion, während bei pulmonalarteriellen Fibroblasten der Effekt erst nach Stimulation mit 100 nM sichtbar wird. Die Induktion ist in beiden Zelltypen nach 24 h Inkubation ausgeprägter als nach 4 h. Beide Zelltypen zeigen unter Angiotensin II Stimulation unter normoxischen Bedingungen keine HIF-1 $\alpha$  Induktion auf Proteinebene. Betrachtet man hingegen die Aktivierung der HIF-abhängigen Zielgene im Reporteragen-Assay, zeigt sich in A549-Zellen bereits in Normoxie unter Stimulation mit Ang II eine Aktivitätssteigerung. Dieser Effekt ist unter hypoxischen Bedingungen noch ausgeprägter.

Diese Ergebnisse lassen sich folgendermaßen in den wissenschaftlichen Kontext einordnen. Unter langanhaltender Hypoxie kommt es in den Alveolen zu einem Remodelling der pulmonalen Gefäße, indem strukturelle und funktionelle Veränderungen der Intima, Media und Adventitia auftreten [5, 81, 83]. Diese Veränderungen, die zu pulmonalen Hochdruck und nachfolgend zu Cor pulmonale führen, können in vielfältigen obstruktiven und restriktiven Lungenerkrankungen beobachtet werden. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass am vaskulären Remodelling neben pulmonalarteriellen Fibroblasten, die

unter hypoxischen Bedingungen proliferieren, wandern und sich differenzieren [84, 96], glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen beteiligt sind [64, 82, 84, 86]. Im hypoxischen Tiermodell zeigt sich, dass die früheste und drastischste strukturelle Veränderung in der Adventitia der Gefäßwand auftritt und sowohl Gefäßwandversteifung als auch Remodelling der Media und Intima zur Folge hat [18, 82]. Für dieses Remodelling hat die HIF-1 $\alpha$  Induktion als frühe genregulatorische Antwort auf Hypoxie eine zentrale Bedeutung.

Diese Hypothese lässt sich mit den durchgeführten Untersuchungen folgendermaßen unterstützen:

In beiden Zellsystemen kann unter Einfluss von Hypoxie eine HIF-1 $\alpha$  Induktion mit transientem Verlauf nachgewiesen werden (Abb. 5 und 8). Parallel zur verstärkten Proteinexpression ergibt die Analyse der HRE-Reporter-gen-Aktivität, die repräsentativ für die Aktivität HIF-abhängiger Zielgene ist, eine Aktivitätssteigerung (Abb. 7), so dass über HIF-1 $\alpha$  als hypoxieabhängigen Transkriptionsfaktor eine Adaptation an Hypoxie mit umfangreichen Anpassungs- und Differenzierungsvorgänge eingeleitet werden kann. Dies wird über HIF-abhängige Zielgene, von denen ungefähr fünfzig beschrieben sind, die unter anderem in die Regulation der Zellproliferation (Cyclin G2, Insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein I bis II, TGF $\beta$ 3) [40, 78], der Apoptose (NIP-3, Stabilisierung von p53) [2, 8, 10], der Angiogenese (vascular endothelial growth factor, VEGF) [42, 57, 75] sowie der Erythropoese (Erythropoetin) [19, 22, 75] involviert sind, vermittelt. Dabei unterscheidet sich das Proliferations- bzw. Apoptose-Verhalten in den Zellsystemen. In alveolären Epithelzellen kann ein Hypoxie-induzierter HIF-abhängiger Wachstumsarrest beobachtet werden [29, 38, 67]. Ebenso zeigt sich in HIF-1 $\alpha$  Knockout Stammzellen der Maus in Hypoxie eine HIF-1 abhängige Inhibition der Proliferation (growth arrest) [10]. Dieser Effekt wird zum Teil mit der HIF-abhängigen Aktivierung von p53 und der nachfolgenden Induktion p53 abhängiger pro-apoptotischer und anti-proliferativer Zielgene erklärt [59, 88]. In pulmonalarteriellen Fibroblasten können gegenteilige Effekte beobachtet werden [39]. Hier führt eine Induktion von HIF-1 in Hypoxie kausal zu einer Zunahme der Proliferation [64]. Weiterhin zeigt sich eine gerichtete Interaktion zwischen pulmonalarteriellen Fibroblasten und glatten Muskelzellen. So haben in Hypoxie kultivierte Fibroblasten über eine HIF-abhängige Freisetzung

von Wachstumsfaktoren einen pro-proliferativen parakrinen Effekt auf glatte Muskelzellen [64]. Außerdem ist für pulmonalarterielle Fibroblasten über Aktivierung mehrerer Komponenten des Angiotensinsystems wie dem AT-1 Rezeptor und dem Angiotensin-Konversionsenzym in Hypoxie eine pro-proliferative und anti-apoptotische Wirkung gezeigt [39]. Umgekehrt kann durch Angiotensin II eine Induktion von HIF-1 $\alpha$  in Hypoxie beobachtet werden (Abb. 6 und 9). Dies spricht für ein autologes Regulationsprinzip, welches an den Prozessen des vaskulären Remodellings beteiligt ist und dessen wesentliche Komponenten in Hypoxie HIF-abhängig gesteuert werden. Als zentraler gemeinsamer Signalweg zwischen Hypoxie- und Angiotensin-induzierten Effekten konnte bereits der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweg identifiziert werden. So antagonisiert eine Inhibition der PI-3-Kinase durch den spezifischen Inhibitor LY 294002 sowohl die Hypoxie- als auch die Angiotensin-abhängigen Effekte [34, 56, 63, 68]. Die positive Rückkopplungsschleife des Ang II/AT-1/ACE Signalweges sowie die Rolle der PI-3-Kinase sind in Abb. 10 dargestellt.

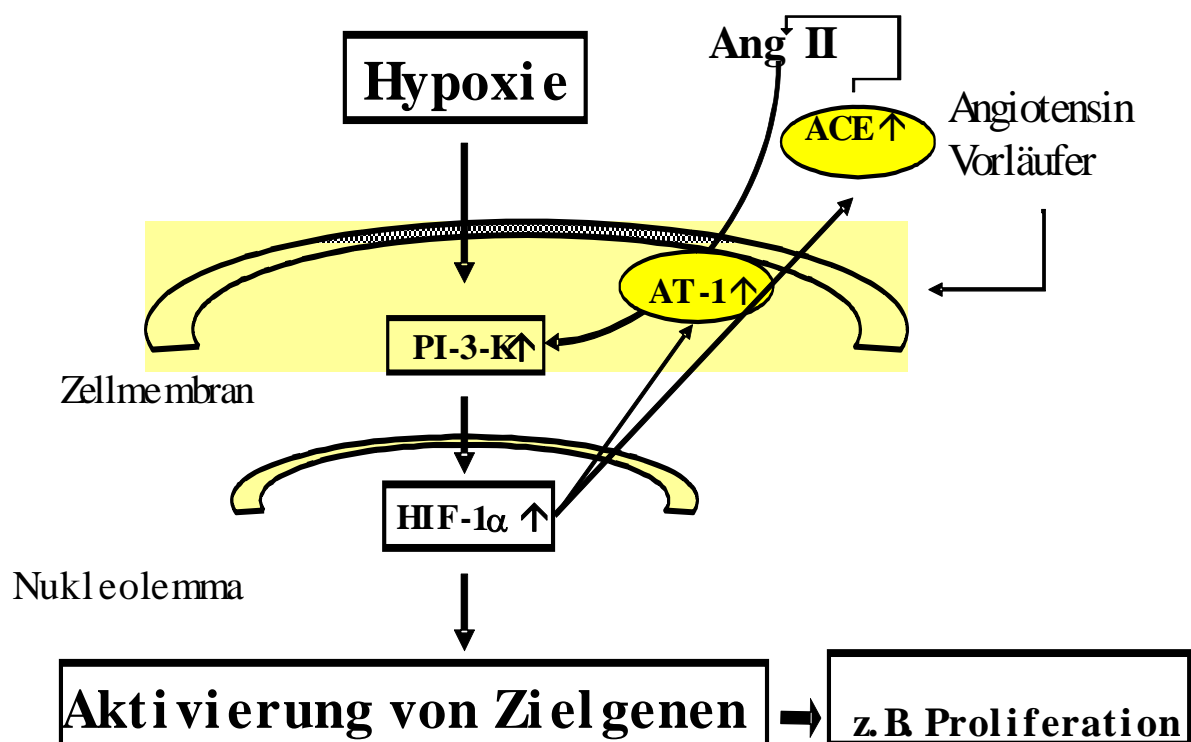


Abb. 10: Vereinfachte und schematisierte Darstellung der HIF-1 $\alpha$  Aktivierung durch Hypoxie und Angiotensin II über die PI-3-Kinase.

Unter normoxischen Bedingungen zeigt sich durch Stimulation mit Angiotensin II keine Proteininduktion (Abb. 6 und 8), aber ein Anstieg der HRE-Aktivität (Abb. 7). Die HRE-Aktivierung deckt sich mit Untersuchungen von Semenza, der eine Induktion von HIF-1 $\alpha$  durch Angiotensin II beschrieben hat [77]. Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz, dass HIF-1 $\alpha$  auf Proteinebene nicht nachweisbar ist, jedoch die abhängige HRE-Aktivierung könnte die Sensitivität der Testverfahren sein.

Die Ergebnisse der Angiotensin II Untersuchungen legen nahe, dass hier ein erfolgversprechender Ansatzpunkt in der Therapie des Remodellings liegen könnte. Denn unter der Stimulation mit dem vasoaktiven und pro-proliferativen Mediator Angiotensin II konnte in den pulmonalarteriellen Fibroblasten eine stärkere Induktion von HIF-1 $\alpha$ , deren Proliferation einer der auslösenden Faktoren der pulmonalen Hypertonie ist, nachgewiesen werden [39]. Des Weiteren wird die Hypoxie-induzierte pulmonalarterielle Hypertonie durch spezifische Antagonisten gegen Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT-1) wie Lorsatan oder aber auch gegen Angiotensin-converting Enzym (ACE) wie Captopril vermindert. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die ACE-Angiotensin II-AT-1 Signalkaskade am vaskulären Remodelling beteiligt ist [11]. Folglich könnten nach vollständiger Identifizierung der HIF-Signalkaskade neue therapeutische Strategien im Sinne eines „Anti-Remodelling“ entwickelt werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Hypoxie und Angiotensin II auf HIF-1 $\alpha$  in zwei Zellsystemen der Lunge dargestellt. Zum einen wurden Untersuchungen im Alveolarepithel durchgeführt. Dabei wurde die Adenokarzinom-Zelllinie A549 mit Eigenschaften der Pneumozyten Typ II verwendet. Zum anderen erfolgten Untersuchungen in pulmonalarteriellen Fibroblasten. Hierfür wurden primär isolierte Zellen aus der Kaninchenlunge verwendet.

Es zeigte sich, dass in beiden Zellsystemen HIF-1 $\alpha$  in Abhängigkeit von der Hypoxiedauer induziert wird, dabei besteht ein transienter Verlauf mit Maximum nach vier Stunden Hypoxie. Vor dem Hintergrund, dass Angiotensin II (Ang II) in SMC HIF-1 $\alpha$  bereits in Normoxie induziert [63], wurde der Einfluss des nicht hypoxischen Stimulus auf beide Zellsysteme untersucht. Die Studie ergab, dass weder in alveolären Epithelzellen, noch in pulmonalarteriellen Fibroblasten eine Induktion von HIF-1 $\alpha$  auf Proteinebene nachgewiesen werden kann. Führt man eine Stimulation in hypoxischer Atmosphäre durch, dann ist eine signifikant gesteigerte HIF-1 $\alpha$  Induktion zu verzeichnen. Die optimale Ang II Dosis unterscheidet sich in den Zellsystemen. Während in den alveolären Epithelzellen bereits unter Stimulation mit 10 nM Ang II eine signifikante Steigerung vorhanden ist, kann man in pulmonalarteriellen Fibroblasten dies erst nach Stimulation mit 100 nM beobachten. Parallel zur verstärkten Proteinexpression in alveolären Epithelzellen ergab die Analyse der HRE-Reporter-Gen-Aktivität, repräsentativ für die Aktivierung bekannter HIF-abhängiger Zielgene, ebenfalls eine starke Induktion in hypoxischen alveolären Epithelzellen. Betrachtet man die HRE-Aktivität nach Ang II Stimulation, ist diese bereits in Normoxie gesteigert, wobei der Effekt unter hypoxischen Bedingungen noch ausgeprägter ist. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass unter Hypoxie über Induktion von HIF-1 $\alpha$  der Gefäßumbau im Sinne des Remodellings und Ausbildung einer Fibrose durch Aktivierung der HIF-abhängigen Zielgene mit Proliferation der Fibroblasten [39] und Apoptose der alveolären Epithelzellen [38] eingeleitet wird. Außerdem induziert der vasoaktive und pro-proliferative Mediator Ang II HIF-1 $\alpha$ , so dass hier möglicherweise durch spezifische Inhibitoren Therapie Strategien im Sinne eines „Anti-Remodelling“ entwickelt werden könnten.

## Summary

The hypoxia inducible transcription factor HIF-1 $\alpha$  is a master regulator in the adaptation to alveolar hypoxia. In our study we analyzed the effect of hypoxia and angiotensin II (Ang II) on HIF-1 $\alpha$  in alveolar epithelial cells (AEC II) and pulmonary artery adventitial fibroblasts (FB<sub>PA</sub>).

Our results showed after exposure to 4 hours of hypoxia a stronger increase of HIF-1 $\alpha$  in both cell systems as after 24 hours O<sub>2</sub> deprivation. As second step, we investigated the effects of Ang II. Dose-dependent increase of HIF-1 $\alpha$  was noted. A strong induction of HIF-1 $\alpha$  protein expression could be observed when AEC II were treated for 4 h with 10 nM Ang II. FB<sub>PA</sub> showed in contrast a strong increase of HIF-1 $\alpha$  after incubation for 24 h with 100 nM Ang II. In addition hypoxia responsive element (HRE) as regulatory component was strongly activated in hypoxic-rendered AEC II.

These reactions of AEC II and FB<sub>PA</sub> may play a central role in lung vascular remodelling under hypoxic conditions resulting in chronic lung disease such as pulmonary hypertension.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adamy, C., Oliviero, P., Eddahibi, S., Rappaport, L., Samuel, J. L., Teiger, E., Chassagne, C.. 2002. Cardiac modulations of ANG II receptor expression in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 283: H733-H740
2. An, W. G., Kanekal, M., Simon, M. C., Maltepe, E., Blagosklonny, M. V., Neckers, L. M.. 1998. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Nature* 392: 405-408
3. Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F., Livingston, D. M.. 1996. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12969-12973
4. Beck, I., Ramirez, S., Weinmann, R., Caro, J.. 1991. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J. Biol. Chem.* 266: 15563-15566
5. Belknap, J. K., Orton, E. C., Ensley, B., Tucker, A., Stenmark, K. R.. 1997. Hypoxia increases bromodeoxyuridine labeling indices in bovine neonatal pulmonary arteries. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16: 366-371
6. Bradford, M. M.. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
7. Bruick, R. K., McKnight, S. L.. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337-1340
8. Bruick, R. K.. 2000. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9082-9087
9. Brusselmans, K., Compornolle, V., Tjwa, M., Wiesener, M. S., Maxwell, P. H., Collen, D., Carmeliet, P.. 2003. Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J. Clin. Invest.* 111: 1519-1527
10. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., Keshert, E.. 1998. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394: 485-490
11. Chassagne, C., Eddahibi, S., Adamy, C., Rideau, D., Marotte, F., Dubois-Randé, J. L., Adnot, S., Samuel, J. L., Teiger, E.. 2000. Modulation of angiotensin II receptor expression during development and regression of hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22: 323-332
12. Compornolle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., Nemery, B., Dewerchin, M., Van Veldhoven, P., Plate, K., Moons, L., Collen, D., Carmeliet, P.. 2002. Loss of HIF-2 $\alpha$  and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat. Med.* 8: 664-666



## Literaturverzeichnis

13. Crapo, J. D., Barry, B. E., Gehr, P., Bachhofen, M., Weibel, E. R.. 1982. Cell number and cell characteristics of the normal lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126: 332-337
14. Cutaia, M., Rounds, S.. 1990. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 97: 706-718
15. de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., Unger, T.. 2000. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52: 415-472
16. Dobbs, L. G., Gonzalez, R. F., Allen, L., Froh, D. K.. 1999. HTI56, an integral membrane protein specific to human alveolar type I cells. *J. Histochem. Cytochem.* 47: 129-137
17. Dumas, J. P., Bardou, M., Goirand, F., Dumas, M.. 1999. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Gen. Pharmacol.* 33: 289-297
18. Durmowicz, A. G., Stenmark, K. R.. 1999. Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Pediatr. Rev.* 20: e91-e102
19. Eckardt, K. U., Kurtz, A.. 2005. Regulation of erythropoietin production. *Eur. J. Clin. Invest.* 35 Suppl. 3: 13-9
20. Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., Fujii Kuriyama, Y.. 1999. 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.* 18: 1905-1914.
21. Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., Fujii Kuriyama, Y.. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4273-4278
22. Fandrey, J.. 2004. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286: R 977-88
23. Fishman, A. P.. 1976. Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ. Res.* 38: 221-231
24. Forrest, J.B.. 1979. Structural aspects of gas exchange. *Fed. Proc.* 38: 209-214
25. Gail, D. B., Lenfant, C. J.. 1983. Cells of the lung: biology and clinical implications. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127: 366-387
26. Gillespie, J. R., Pangborn, J., Addison, R., Tyler, W. S.. 1964. Ultrastructure of the pulmonary blood-air barrier of the horse. *Anat. Rec.* 148: 285
27. Gross, R., Schölmerich, P., Gerok, W.. 1996. *Die Innere Medizin.* Schattauer-Verlag
28. Guillemin, K., Krasnow, M. A.. 1997. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 89: 9-12
29. Hänze, J., Eul, B., Savai, R., Krick, S., Goyal, P., Grimminger, F., Seeger, W., Rose, F.. 2003. RNA interference for HIF-1alpha inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312: 571-577
30. Hirai, K. I., Yamauchi, M., Witschi, H., Cote, M. G.. 1983. Disintegration of lung peroxisomes during differentiation of type II to type I cells in butylated hydroxytoluene-administered mice. *Exp. Mol. Pathol.* 39: 129-138

31. Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M., Lee, F. S.. 2002. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J. Biol. Chem.* 277: 39792-39800
32. Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., Bunn, H. F.. 1996. Activation of hypoxia inducible transcription factor depends primarily upon redox sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 271: 32253-32259
33. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A. V., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J.. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472
34. Jiang, B.-H., Jiang, G., Zheng, J. Z., Lu, Z., Hunter, T., Vogt, P. K.. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* 12: 363-369
35. Jiang, B.-H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., Semenza, G. L.. 1996. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia inducible factor1. *J. Biol. Chem.* 271: 17771-17778
36. Jones, R. C.. 1993. Role of interstitial fibroblasts and intermediate cells in microvascular remodelling in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. Rev.* 3: 569-575
37. Junqueira, L. C., Carneiro, J.. 1996. *Histologie*, Springer-Verlag, 4. Auflage. Seite 142-144.
38. Krick, S., Eul, B., Hänze, J., Savai, R., Grimminger, F., Seeger, W., Rose, F.. 2005. Role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32: 395-403
39. Krick, S., Hänze, J., Eul, B., Savai, R., Grimminger, F., Maus, U., Lohmeyer, J., Klepetko, W., Seeger, W., Rose, F.. 2005. Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: crosstalk between HIF-1 alpha and an autocrine angiotensin system. *FASEB J.* 19: 857-859
40. Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., Semenza, G. L.. 2003. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 63: 1138-43
41. Lavoie, J. L., Sigmund, C. D.. 2003. Minireview: overview of the renin-angiotensin system- an endocrine and paracrine system. *Endocrinology.* 144: 2179-83
42. Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., Kim, K. W.. 2004. Hypoxia inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* Vol. 36: 1-12
43. Lenfant, C.. 1976-1992. *Lung Biology in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York-Basel: Vol. 1-50.
44. Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G.. 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. cancer* 17: 62
45. Lopez-Barneo, J., del Toro, R., Levitsky, K. L., Chiara, M. D., Ortega-Saenz, P.. 2004. Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J. Appl. Physiol.* 96: 1187-95

## Literaturverzeichnis

46. Lopez-Barneo, J., Weir, E. K..1998. Oxygen Regulation of Ion Channels and Gene Expression. New York: Futura
47. Lottspeich, F., Zorbas, H.. 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg. Ref. Type: Serial (Book, Monograph)
48. Mairbaur, H., Mayer, K., Kim, K. J., Borok, Z., Bartsch, P., Crandall, E. D.. 2002. Hypoxia decreases active Na transport across primary rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282: L659-665
49. Mairbaur, H., Wodopia, R., Eckes, S., Schulz, S., Bartsch, P.. 1997. Impairment of cation transport in A549 cells and rat alveolar epithelial cells by hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 273: L797-806.
50. Matsubara, H., Inada, M.. 1998. Molecular insights into angiotensin II type 1 and type 2 receptors: expression, signaling and physiological function and clinical application of its antagonists. *Endocr J.* 45: 137-150
51. Minet, E., Michel, G., Remacle, J., Michiels, C.. 2000. Role of HIF-1 as a transcription factor involved in embryonic development, cancer progression and apoptosis. *Int. J. Mol. Med.* 5: 253-259
52. Morgenroth, K., Kissler, W.. 1980. Morphologie der Alveolaroberfläche. *Prax. Klein. Pneumol.* 34: 67-75
53. Morrell, N. W., Morris, K. G., Stenmark, K. R.. 1995. Role of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II in development of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J. Physiol.* 269: H1186-1194
54. Murphy, J. D., Rabinovitch, M., Goldstein, J. D.. 1981. The structural basis of persistent pulmonary hypertension of the newborn infant. *J. Pediatr.* 98: 962-967
55. Ouidir, A., Planes, C., Fernandes, I., Van Hesse, A., Clerici, C.. 1999. Hypoxia upregulates activity and expression of the glucose transporter GLUT1 in alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21: 710-718.
56. Page, E. L., Robitaille, G. A., Pouyssegur, J., Richard, D. E.. 2002. Induction of Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  by transcriptional and translational mechanisms. *J. Biol. Chem.* 277: 48403-48409
57. Pham, I., Uchida, T., Planés, C., Ware, L. B., Kaner, R., Matthay, M. A., Clerici, C.. 2002. Hypoxia upregulates VEGF expression in alveolar epithelial cells in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283: L1133-L1142.
58. Piret, J.-P., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C.. 2002. Is HIF-1 $\alpha$  a pro- or anti-apoptotic protein? *Biochem. Pharm.* 64: 889-892
59. Piret, J.-P., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C.. 2002. Is HIF-1 $\alpha$  a pro- or anti-apoptotic protein? *Biochem. Pharm.* 64: 889-892
60. Planes, C., Friedlander, G., Loiseau, A., Amiel, C., Clerici, C.. 1996. Inhibition of Na-K-ATPase activity after prolonged hypoxia in an alveolar epithelial cell line. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 271: L70-L78.
61. Pugh, C. W., Tan, C. C., Jones, R. W., Ratcliffe, P. J.. 1991. Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10553-10557
62. Reid, I. A., Morris, B. J., Ganong, W. F.. 1978. The renin-angiotensin system. *Annu. Rev. Physiol.* 40: 377-410
63. Richard, D. E., Berra, E., Pouyssegur, J.. 2000. Nonhypoxic Pathway Mediates the Induction of Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 275: 26765-26771

64. Rose, F., Grimminger, F., Appel, J., Heller, M., Pies, V., Weissmann, N., Fink, L., Schmidt, S., Krick, S., Camenisch, G., Gassmann, M., Seeger, W., Hänze, J.. 2002. Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. *FASEB J.* 16: 1660-1661m
65. Salceda, S., Caro, J.. 1997. Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions: its stabilization by hypoxia depends upon redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272: 22642-22647
66. Saumon, G., Makhloufi, Y.. 1997. Glucose transporter gene expression in rat lung and alveolar type II cells in primary culture. *Am. J. Crit. Care Med.* 155: A831
67. Savai, R., Schermuly, R. T., Voswinckel, R., Renigunta, A., Reichmann, B., Eul, B., Grimminger, F., Seeger, W., Rose, F., Hänze, J.. 2005. HIF-1 $\alpha$  attenuates tumor growth in spite of augmented vascularization in an A549 adenocarcinoma mouse model. *Int. J. Oncol.* 27: 393-400
68. Sward, L., Zahradka, P.. 1997. Angiotensin II Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 81: 249-257
69. Schiebler, T. H., Schmidt, W., Zilles, K.. 1995. *Anatomie*, Springer – Verlag, 6. Auflage. Seite 464.
70. Schmidt, R. F., Thews, G..1995. *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag, 26. Auflage. Seite 396, 528 und 542.
71. Schneeberger, E. E., Karnovsky, M. J.. 1976. Substructure of intercellular junctions in freeze-fractured alveolar-capillary membranes of mouse lung. *Circ. Res.* 38: 404-411
72. Semenza, G. L., Jiang, B.-H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J.-P., Maire, P., Giallongo, A.. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271: 32529-32537
73. Semenza, G. L., Nejfelt, M. K., Chi, S. M., Antonarakis, S. E.. 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5680-5684
74. Semenza, G. L.. 1998. *Transcription Factors and Human Disease*. New York: Oxford University Press.
75. Semenza, G. L.. 2000. Expression of Hypoxia inducible Factor 1: Mechanisms and Consequences. *Biochem. Pharmacol.* 59: 47-53
76. Semenza, G. L.. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 88: 1474-1480
77. Semenza, G. L.. 2000. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir. Res.* 1: 159-162
78. Semenza, G. L.. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3: 721-732
79. Semenza, G. L.. 2005. Pulmonary vascular responses to chronic hypoxia mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2: 68-70
80. Skalak, T. C., Price, R. J.. 1996. The Role of mechanical stresses microvascular remodeling. *Microcirculation* 3: 143-165

## Literaturverzeichnis

81. Stenmark, K. R., Boucey, D., Nemenoff, R., Dempsey, E. C., Das, M.. 2000. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: contribution of the adventitial fibroblasts. *Physiol. Res.* 49: 503-517
82. Stenmark, K. R., Frid, M., Nemenoff, R., Dempsey, E. C., Das, M.. 1999. Hypoxia induces cell-specific changes in gene expression in vascular wall cells: implications for pulmonary hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* 474: 231-258
83. Stenmark, K. R., Gerasimovskaya, E., Nemenoff, R., Das, M.. 2002. Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* 122: 326S-334S
84. Stenmark, K. R., Mecham, R. P.. 1997. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 89-144
85. Stimpel, M.. 1990. *Hypertonie*. Berlin: de Gruyter
86. Strauss, B. H., Rabinovitch, M.. 2000. Adventitial fibroblasts: defining a role in vessel wall remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22: 1-3
87. Sulkowska, M.. 1997. Morphological studies of the lungs in chronic hypobaric hypoxia. *Pol. J. Pathol.* 48: 225-234
88. Suzuki, H., Tomida, A., Tsuruo, T.. 2001. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1 alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* 20: 5779-88
89. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., Yin, Q., Fujio, Y., Walsh, K., Griending, K. K.. 1999. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/Protein Kinase B by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 274: 22699-22704
90. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., Yin, Q., Fujio, Y., Walsh, K., Griending, K. K.. 1999. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/Protein Kinase B by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 274: 22699-22704
91. Voelkel, N. F.. 1986. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133:1186-1194
92. Wang, G. L., Jiang, B.-H., Rue, E. A., Semenza, G. L.. 1995. Hypoxia inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5510-5514
93. Wang, G. L., Semenza, G. L.. 1995. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *J. Biol. Chem.* 270: 1230-1237
94. Weibel, E. R., Taylor, C. R.. 1998. Functional design of the human lung for gas exchange. In: Fishman, A. P. (ed.). *Pulmonary diseases and disorders*. Third edition: 21-62. McGraw-Hill, New York
95. Weibel, E. R.. 1973. Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiol. Rev.* 53: 419-495
96. Welsh, D. J., Peacock, A. J., MacLean, M., Harnett, M.. 2001. Chronic hypoxia induces constitutive p38 mitogen-activated protein kinase activity that correlates with enhanced cellular proliferation in fibroblasts from rat pulmonary but not systemic arteries. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 282-289
97. Wenger, R. H., Gassmann, M.. 1999. HIF-1 and the molecular response to hypoxia in mammals: Environmental stress and gene regulation. BIOS Scientific Publishers, Oxford: 25-45

## Literaturverzeichnis

98. Wenger, R. H.. 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydrolases, hypoxia inducible transcription factor, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* 16: 1151-1162
99. Wiener, C. M., Booth, G., Semenza, G. L.. 1996. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 225: 485-488
100. Williams, M. C.. 1977. Development of the alveolar structure of the fetal rat in late gestation. *Fed. Proc.* 36: 2653-2659
101. Wright, J. R., Dobbs, L. G.. 1991. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 395-414
102. Yu, A. Y., Frid, M. G., Shimoda, L. A., Wiener, C. M., Stenmark, K., Semenza, G. L.. 1998. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia inducible factor-1 in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 275: L818-L826
103. Yu, A. Y., Shimoda, L. A., Iver, N. V., Huso, D. L., Sun, X., McWilliams, R., Beaty, T., Sham, J. S., Wiener, C. M., Sylvester, J. T., Semenza, G. L.. 1999. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *J. Clin. Invest.* 103: 691-696
104. Zagorska, A., Dulak, J.. 2004. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta. Biochim. Pol.* 51: 563-85

## 7 Publikationsverzeichnis

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

Rose, F., Grimminger, F., Appel, J., Heller, M., Pies, V., Weissmann, N., Fink, L., Schmidt, S., Krick, S., Camenisch, G., Gassmann, M., Seeger, W., Hänze, J. FASEB J. 2002. 16: 1660-1661m

Angiotensin II activates the hypoxia-responsive-element (HRE) in human alveolar epithelial cells.

Appel, J., Krick, S., Giannakakis, D., Seeger, W., Grimminger, F., Hänze, J., Rose, F.

Eur. Resp. J. 2001. 18 Suppl. 33: 79s (P592)

The role of HIF in Angiotensin-II-mediated proliferation in human pulmonary artery fibroblasts (PA-FB).

Krick, S., Hänze, J., Appel, J., Giannakakis, D., Grimminger, F., Rose, F.

Basic Res. Cardiol. 2001. 96: 24

Die Rolle von HIF-1 $\alpha$  in der hypoxievermittelten Proliferation von pulmonalarteriellen Fibroblasten.

Krick, S., Hänze, J., Grimminger, F., Appel, J., Weissmann, N., Fink, L., Ghofrani, H. A., Schermuly, R., Seeger, W., Rose, F.

Pneumologie 2002. 56: S71 (V115)

Hypoxie-induzierte Proliferation und HIF-1 $\alpha$  Aktivierung in pulmonalarteriellen Fibroblasten.

Krick, S., Hänze, J., Grimminger, F., Appel, J., Weissmann, N., Fink, L., Ghofrani, H. A., Schermuly, R., Seeger, W., Rose, F.

Med. Klinik 2002. 97: 148 (P252)

Die Hypoxie induzierte Transaktivierung von HIF-1 $\alpha$  führt zur Apoptose in alveolären Epithelzellen (EC).

Krick, S., Hänze, J., Ghofrani, H. A., Grimminger, F., Appel, J., Schermuly, R., Seeger, W., Rose, F.

Med. Klinik. 2002. 97: 148 (P253)

Effect of hypoxia on proliferation and HIF-1 $\alpha$  activation in pulmonary artery fibroblasts.

Krick, S., Hänze, J., Grimminger, F., Appel, J., Weissmann, N., Fink, L., Ghofrani, H. A., Schermuly, R., Seeger, W., Rose, F.

Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2002. 165 (8): A 77

Hypoxic mediation of apoptosis in alveolar epithelial cells by transactivation of HIF-1 $\alpha$ .

Krick, S., Hänze, J., Ghofrani, H. A., Grimminger, F., Appel, J., Schermuly, R., Seeger, W., Rose, F.

Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2002. 165 (8): A 748

## Publikationsverzeichnis

Angiotensin II and hypoxia synergistically induce proliferation in pulmonary artery fibroblasts by a PI-3K and PKC-signaling pathway through HIF-1 $\alpha$  and upregulation of Angiotensin II-receptors type I.

Krick, S., Hänze, J., Appel, J., Ghofrani, H. A., Schermuly, R., Grimminger, F., Seeger, W., Rose, F.

Eur. Resp. J. 2002. 20 Suppl. 38: 378s (P2352)

Hypoxia synergistically enhances Ang II induced apoptosis in alveolar epithelial cells by the activation of HIF-1 $\alpha$  and Ang II-receptor type 1.

Krick, S., Appel, J., Hänze, J., Schmidt, S., Weissmann, N., Ghofrani, H. A., Grimminger, F., Schermuly, R., Seeger, W., Rose, F.

[Abstract] Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2003. 167 (7): A 798

Hypoxie-induzierte Apoptose in Alveolarepithelzellen durch Hochregulation des Hypoxie induzierten Faktors HIF-1 $\alpha$ .

Krick, S., Hänze, J., Appel, J., Eul, B., Savai, R., Edukulla, R., Grimminger, F., Fink, L., Seeger, W., Rose, F.

Pneumologie 2004

Hypoxie-induzierte Apoptose in Alveolarepithelzellen durch Hochregulation des Hypoxie-induzierten Faktors HIF-1 $\alpha$ .

Krick, S., Hänze, J., Appel, J., Eul, B., Savai, R., Edukulla, R., Grimminger, F., Fink, L., Seeger W., Rose, F.

Med. Klinik 2004



## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger für die freundliche Überlassung des Themas und bei Herrn PD Dr. F. Rose für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit bedanken. Meinen weiteren Dank gilt Herrn PD Dr. Jörg Hänze, der freundlicherweise die Tätigkeit des Erstgutachters übernahm.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich Gudrun Albohn und der Arbeitsgruppe im Seltersberg Haus C danken. Ihre Hilfsbereitschaft schuf ein angenehmes Arbeitsklima und ermöglichte produktives Arbeiten.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Hier sind besonders Nadja, Sascha und „meine“ Schwestern der Säuglingsintensiv-Station Bad Hersfeld zu nennen. Ihre moralische Unterstützung ermöglichte es mir, diese Arbeit fertig zu stellen.

## LEBENS LAUF

Jutta Appel	Vogelsbergstr. 78, 63654 Büdingen Email: juttaappel@web.de Tel.: 06042-6699
20.01.1976	Geburt in Büdingen, Hessen, Eltern: Karin Appel und Karl-Heinz Appel
1982-1986	Grundschule Büdingen
1986-1992	Mittelpunktschule Büdingen
1992-1995	Wolfgang Ernst Gymnasium Büdingen
Juni 1995	Abitur
September 1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
September 1997	Physikum
August 1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998-2001	Beginn der Dissertation im Laborbereich von Prof. Dr. Dr. F. Grimminger am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität (Leiter: Prof. Dr. W. Seeger)
April 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001-2002	Praktisches Jahr am Klinikum Bad Hersfeld
April 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002-2003	ÄiP in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Klinikum Bad Hersfeld
Seit Juli 2007	Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin
Seit November 2003	Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Klinikum Bad Hersfeld