

**Analyse zum Einfluss der Hypoxie induzierbaren
Faktoren HIF-1 und HIF-2 auf
die Angiogenese von Endothelzellen**

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur Martin Hahne
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Leif-Alexander Garbe

Gutachter: Prof. Dr. med. Frank Buttgereit

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster

Gutachter: Prof. Dr. Jens Kurrek

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 01.März 2013

Berlin 2013

D83

Die Arbeit wurde an der Charité Universitätsmedizin Berlin und am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Blutgefäßsystem und die Sauerstoffverfügbarkeit im menschlichen Körper	1
1.2. Angiogenese	2
1.3. Bioenergetik.....	8
1.3.1. Energiegewinnung der Zelle unter aeroben Bedingungen.....	8
1.3.2. Energiegewinnung der Zelle unter anaeroben Bedingungen	9
1.4. Hypoxie	10
1.4.1. Physiologische Hypoxie	10
1.4.2. Pathophysiologische Hypoxie	11
1.4.3. Hauptregulatoren unter Hypoxie	11
1.4.3.1. Der Hypoxie induzierbare Faktor HIF	12
1.5. Die Rolle der Angiogenese in Erkrankungen mit hypoxischem Erscheinungsbild	18
1.5.1. Rheumatoide Arthritis	18
1.5.2. Tumorgenese	22
1.6. Ableitung der Fragestellung.....	26
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1. Material.....	27
2.1.1. Zelllinien und Bakterienstämme	27
2.1.2. Medien	27
2.1.3. Plasmide und Vektoren	28
2.1.4. Antikörper und Antikörperkonjugate	29
2.1.5. Synthetische Oligonukleotide.....	29
2.1.6. Antibiotika, Chemikalien, Enzyme und Molgewichtstandards	30
2.1.7. Lösungen, Puffer und Kits.....	33
2.1.8. Geräte und sonstige Materialien.....	34
2.1.9. Software	36
2.2. Methoden	37
2.2.1. Mikrobiologische Methoden	37
2.2.1.1. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	37
2.2.1.2. Kultivierung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	37
2.2.2. Zellbiologische Methoden	37
2.2.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen	38

2.2.2.2.	Kultivierung von adhärenen Zellen	38
2.2.2.3.	Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer	39
2.2.2.4.	Durchführung eines 2D-Angiogenese Assays	39
2.2.2.5.	Transfektion und Transduktion von Zelllinien.....	40
2.2.2.6.	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS).....	42
2.2.3.	Biochemische und molekularbiologische Methoden.....	43
2.2.3.1.	RNA- und DNA-Methoden.....	43
2.2.3.2.	Proteinanalysen.....	56
2.2.3.3.	ADP/ATP Bestimmung mittels Chemilumineszenz	60
2.2.4.	Statistik.....	60
3.	ERGEBNISSE.....	61
3.1.	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen – Charakterisierung der Zelllinie HMEC-1.....	61
3.1.1.	Angiogenese, Morphologie und Oberflächenmarker von HMEC-1 Zellen.....	61
3.1.2.	Angiogenese und Morphologie von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie.....	62
3.1.3.	Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie	63
3.1.4.	Die Expression des Hypoxie induzierbaren Faktors HIF in HMEC-1 Zellen	65
3.1.5.	Kinetik zur Genexpression Hypoxie-regulierter Gene in HMEC-1 Zellen unter Hypoxie	67
3.1.5.1.	Kinetik zur Expression von HIF1A und HIF2A	67
3.1.5.2.	Kinetik zur Expression von Bioenergetik-assoziierten Genen.....	68
3.1.5.3.	Kinetik zur Expression von Angiogenese-assoziierten Genen.....	69
3.1.6.	Genexpression Hypoxie-regulierter Gene in HMEC-1 Zellen unter Hypoxie	70
3.1.6.1.	Die Expression von HIF1A und HIF2A	70
3.1.6.2.	Die Expression von Bioenergetik-assoziierten Genen	71
3.1.6.3.	Die Expression von Angiogenese-assoziierten Genen.....	72
3.1.7.	Kinetik zur Sekretion löslicher Faktoren von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie	73
3.1.8.	Die Sekretion löslicher Faktoren von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie	77
3.1.9.	Der zelluläre Energiepool in Form von ATP und ADP	81
3.2.	Der Knockdown von HIF-1α oder HIF-2α in HMEC-1 Zellen.....	81
3.2.1.	Durchflusszytometrische Kontrolle der Frequenz an Knockdown-Plasmid enthaltenden HMEC-1 Zellen.....	82
3.2.2.	Nachweis des Knockdowns von HIF-1 α oder HIF-2 α auf Proteinebene	83
3.2.3.	Nachweis des Knockdowns von HIF-1 α oder HIF-2 α auf RNA-Ebene.....	85
3.3.	Der Einfluss eines Knockdowns von HIF-1α oder HIF-2α auf HMEC-1 Zellen.....	86
3.3.1.	Angiogenese von HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown	86
3.3.2.	Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown.....	89
3.3.3.	Die Genexpression Hypoxie-regulierter Gene in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie.....	92

3.3.3.1.	Die Expression von Bioenergetik-assoziierten Genen in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie	92
3.3.3.2.	Die Expression von Angiogenese-assoziierten Genen in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie	94
3.3.4.	Die Sekretion löslicher Faktoren in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie	95
3.3.5.	Der zelluläre Energiepool in Form von ATP und ADP in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie.....	99
3.3.6.	Microarray-Analyse von HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie und von HIF-1 α sowie HIF-2 α Knockdownzellen	101
4.	DISKUSSION	109
4.1.	HMEC-1 Zellen als Modellsystem für die Angiogenese von Endothelzellen	109
4.2.	Hypoxie führt zu einer differentiellen Genexpression in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 und HIF-2 als Hauptregulatoren.....	110
4.3.	Hypoxie und die Expression von Genen der Glykolyse und Angiogenese	113
4.4.	Modulation der Angiogenese durch Zytokinsekretion unter Hypoxie	115
4.5.	Die Verwendung der Knockdown-Technologie zur Klärung der Rolle von HIF-1 α und HIF-2 α	118
4.6.	Der Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α hat einen negativen Einfluss auf die Angiogenese	119
4.7.	Der Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α verändert die differentielle Genexpression unter Hypoxie	119
4.8.	Die Bioenergetik von HMEC-1 Zellen wird durch HIF-1 und HIF-2 reguliert	120
4.9.	HIF-2 moduliert vorrangig die Angiogenese	121
4.10.	HIF-1 und HIF-2 - Team oder Konkurrenten?	123
5.	REFERENZEN	127
6.	ANHANG	133
6.1.	Abkürzungsverzeichnis	133
6.1.1.	Vorkommende Abkürzungen	133
6.1.2.	Vorkommende Einheiten / SI-Einheiten	138

6.2.	Abbildungsverzeichnis.....	139
6.3.	Tabellenverzeichnis.....	142
7.	DANKSAGUNG.....	145
8.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	147
9.	LEBENS LAUF/CURRICULUM VITAE.....	149
9.1.	Persönliche Angaben.....	149
9.2.	Schulbildung.....	149
9.3.	Universität	149
9.4.	Grundwehrdienst	149
10.	PUBLIKATIONEN UND AUSZEICHNUNGEN IM RAHMEN DIESER ARBEIT.....	151
10.1.	Vorträge.....	151
10.2.	Poster.....	152
10.3.	Publizierte Artikel.....	153
10.4.	Auszeichnungen.....	155

Zusammenfassung

Hypoxie und Angiogenese stellen ein charakteristisches Merkmal von chronisch entzündeten, verletzten oder tumorösen Geweben dar. Die Transkriptionsfaktoren Hypoxie induzierbarer Faktor (HIF)-1 und (HIF)-2 steuern die zelluläre und metabolische Antwort auf den verminderten Sauerstoffpartialdruck durch die Induktion von Angiogenese sowie die Adaptation der Bioenergetik von Endothelzellen, was wiederum einen Einfluss auf die Ausprägung der Pathogenese von Erkrankungen mit hypoxischen Erscheinungsbild hat. In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Rollen von HIF-1 und HIF-2 bei der Adaptation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) an Hypoxie mittels eines Knockdowns von HIF-1 α und HIF-2 α untersucht. Der spezifische Knockdown von HIF-1 α und HIF-2 α wurde mittels einer lentiviral-basierten shRNA-Technologie durchgeführt. Die Angiogenese von HMEC-1 Zellen wurde unter Normoxie (~18% O₂) und Hypoxie (<1% O₂) durch die Ermittlung der Länge der gebildeten Tubuli und der Anzahl der Verzweigungen funktionell charakterisiert. Des Weiteren wurden zur Bestimmung der Funktionen von HIF-1 und HIF-2 im angiogenen Prozess das Transkriptom, der bioenergetische Status sowie die sekretierten Zytokine der Zellen untersucht. Der Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α führt zu einem Verlust der unter Hypoxie induzierten Angiogenese in Form von Sprossung und Verzweigung. Ferner ändert sich das Transkriptom von HMEC-1 Zellen mit Knockdown und spiegelt sowohl die überlappenden als auch die distinkten Funktionen von HIF-1 und HIF-2 wider. Dabei scheint HIF-1 der Hauptregulator der bioenergetischen Adaptation von HMEC-1 Zellen zu sein, da für Zellen mit HIF-1 α Knockdown eine reduzierte ATP Verfügbarkeit nachweisbar war. Der Knockdown von HIF-2 α resultierte in einer verminderten Induktion von Angiogenese modulierenden Faktoren wie VEGF, IL-8 und IL-12, was die Hauptregulatorfunktion von HIF-2 in diesem Prozess repräsentiert. Zusammenfassend fungieren sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α als wichtige Regulatoren der Angiogenese. HIF-1 und HIF-2 unterscheiden sich aber voneinander in ihrem Potential, den zellulären Energiemetabolismus bzw. die Angiogenese zu regulieren. Dabei beeinflusst HIF-2 α die Angiogenese direkt durch die Regulation proangiogener Faktoren, wohingegen HIF-1 α den zellulären Energiemetabolismus regelt und damit indirekt die Angiogenese beeinflusst. Die in dieser Arbeit gewonnenen neuen Erkenntnisse zur Rolle von HIF-1 und HIF-2 im Prozess der Angiogenese ermöglichen neue Ansätze zur Behandlung von Erkrankungen mit hypoxischem Erscheinungsbild und sind daher von klinischer Relevanz.

Abstract

Hypoxia and angiogenesis are features of chronically inflamed and injured tissues as well as tumor tissue. The transcription factors Hypoxia inducible factor (HIF)-1 and (HIF)-2 control cellular and metabolic response to decreased oxygen tension thereby promoting angiogenesis and the adaptation of bioenergetics with implications on the pathogenesis of diseases with a hypoxic environmental pattern. The distinct roles of HIF-1 and HIF-2 in the adaptation of human microvascular endothelial cells (HMEC-1) towards hypoxia were investigated by the knockdown of HIF-1 α and HIF-2 α , respectively. This was achieved by the specific knockdown of HIF-1 α or HIF-2 α using lentiviral-based shRNA technology. Angiogenesis of HMECs was studied by investigating both tubuli and node formation under hypoxia (<1% O₂) versus normoxia (~18% O₂). Furthermore, the transcriptome, the bioenergetic state and the secreted factors of HMEC-1 cells were under investigation in order to determine the roles of HIF-1 and HIF-2. The knockdown of HIF-1 α or HIF-2 α resulted in a loss in the hypoxia induced node and tubuli formation. The transcriptome of transduced cells was changed in comparison to control cells and reflected the overlapping as well as the distinct functions of HIF-1 and HIF-2. HIF-1 seems to be a key regulator of the bioenergetic adaptation of HMEC-1 cells, as evidenced by the reduced ATP availability in HIF-1 α knockdown cells. The knockdown of HIF-2 α resulted in a reduced induction of angiogenesis modulating factors like VEGF, IL-8 and IL-12 representing the leading role of HIF-2 in the control of angiogenic factors of endothelial cells. In conclusion, HIF-1 α and HIF-2 α are both important regulators of angiogenesis. However, they do differ in their ability to regulate cellular energy metabolism and angiogenesis, what leads us to conclude that HIF-2 α does directly influence angiogenesis via regulating the synthesis of proangiogenic factors, whereas HIF-1 α affects angiogenesis via effects on cellular energy metabolism. These findings provide new insights into regulation of angiogenesis in diseases with a hypoxic environment and are, therefore, considered to be of clinical relevance.

1. Einleitung

1.1. Das Blutgefäßsystem und die Sauerstoffverfügbarkeit im menschlichen Körper

Die Ausbildung von Blutgefäßen ist essentiell für das Wachstum von Organen sowie deren Reparatur und entwickelte sich im evolutionären Prozess in höheren Spezies, um in einem großen Organismus Sauerstoff im Blut zu binden und jeweils bis zu den einzelnen Zellen eines Organs transportieren zu können. Der Prozess der Blutgefäßbildung wird dabei im Allgemeinen als Angiogenese bezeichnet [1]. Die Blutgefäße bilden somit eine bedeutende Schnittstelle zwischen der Umgebung und dem Organismus, indem sie Sauerstoff und Nährstoffe zu den Zellen transportieren und dadurch den zellulären Metabolismus bestimmen [2]. Betrachtet man die Sauerstoffverfügbarkeit im menschlichen Körper, so ist diese von mehreren Einflussfaktoren abhängig. Dazu zählen in erster Linie die Sauerstoffaufnahme an sich, die Sauerstofftransportkapazität des Blutes, die Ausbildung des Blutgefäßsystems als Transportweg des Sauerstoffs zu den einzelnen Zellen und schlussendlich auch die Zellatmung selbst. Das Zusammenwirken dieser Parameter führt zu einem spezifischen Profil der Sauerstoffverfügbarkeit und Sauerstoffpartialdrücke in den einzelnen Kompartimenten des Körpers, wie es Abbildung 1-1 wiedergibt. Auf normalem Meeresniveau beträgt der prozentuale Anteil an Sauerstoff in der Luft 21%, was einem Sauerstoffpartialdruck pO_2 von ca. 160mmHg entspricht. In den Alveolen der Lunge diffundiert dieser Luftsauerstoff durch den Sauerstoffgradienten getrieben in den Blutkreislauf und besitzt in den angeschlossenen Körperarterien einen Partialdruck von 80-110mmHg (10-14%). Dieser Wert sinkt über die Arteriolen (50mmHg) bis hin zu den Kapillaren auf einen Sauerstoffpartialdruck von 40mmHg (5%) und liegt innerhalb des Gewebes bei ca. 30mmHg (4%) [3-6]. Innerhalb des Gewebes findet der Sauerstofftransport wiederum durch Diffusion statt und ist dabei maßgeblich davon abhängig, wie groß der Sauerstoffgradient zwischen dem Zytosol der Zelle und der Umgebung ist. Dabei variiert der pO_2 im Zytosol je nach Sauerstoffverbrauchsrate und Sauerstoffversorgung zwischen 8 und 16mmHg [7]. Von Bedeutung ist dabei der Aspekt, dass das Diffusionslimit für molekularen Sauerstoff im Gewebe bei ca. 100-200 μ m liegt [8]. Aufgrunddessen, dass multizelluläre Organismen größere und komplexere Organe bilden und

das Diffusionslimit für Sauerstoff überschritten wird ist die Ausbildung von Gefäßen mittels Vaskulogenese und Angiogenese in Wirbeltieren notwendig.

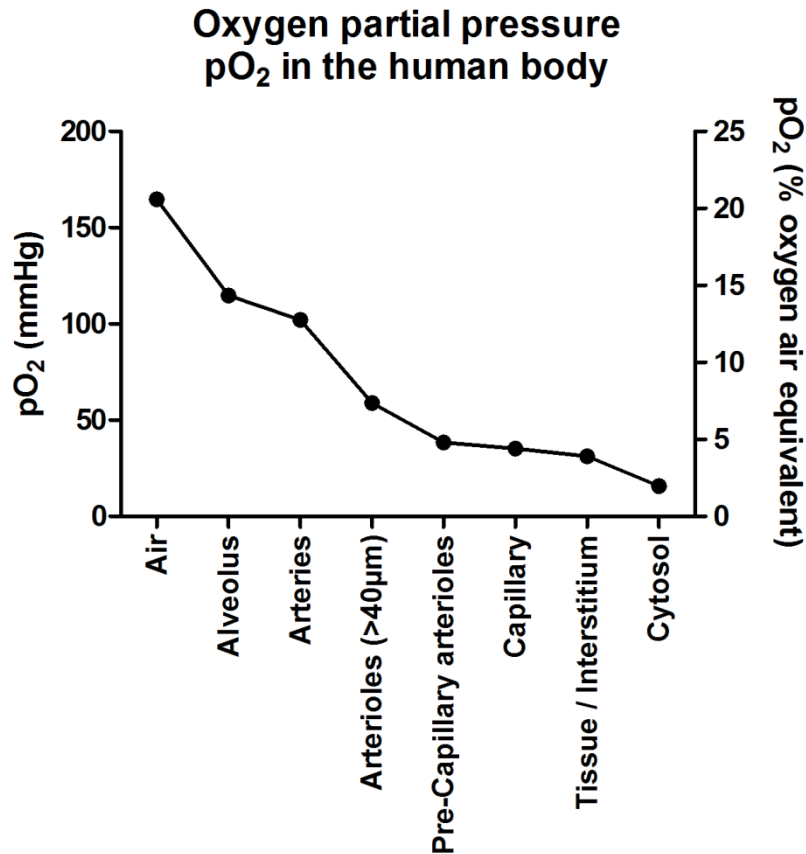


Abbildung 1-1 Sauerstoffpartialdrücke im menschlichen Körper.

Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) und damit die Sauerstoffverfügbarkeit im menschlichen Körper nimmt von der eingeatmeten Luft über das Blutgefäßsystem hin zum Gewebe stetig ab. Der Sauerstoffpartialdruck der eingeatmeten Luft liegt bei ca. 160mmHg (21% Sauerstoffanteil in der Luft). Der Sauerstoffpartialdruck sinkt innerhalb der Alveolen und den nachfolgenden Arterien auf Werte zwischen 110mmHg (14%) und 80mmHg (10%). In den Kapillaren des Körpers werden Werte von ca. 40mmHg pO₂ (5%) erreicht. Anschließend erfolgt der Sauerstofftransport durch Diffusion und der pO₂ sinkt bis auf Werte von 30mmHg (4%) im Gewebe (Abbildung nach [4]).

1.2. Angiogenese

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, kann eine adäquate Sauerstoffversorgung des Körpers nur gewährleistet werden, wenn ein hinreichend ausgebildetes Blutgefäßsystem den Transport des Sauerstoffs bis hin zum Organ auf Zellebene innerhalb des Diffusionslimits ermöglicht. Ein Ungleichgewicht zwischen dem Prozess der Blutgefäßbildung und dem zellulären Metabolismus in den Organen führt zu einer Vielzahl maligner, entzündlicher,

ischämischer, infektiöser oder immunologischer Störungen, auf die in einem späteren Kapitel (siehe Kapitel 1.5) eingegangen wird [1].

Betrachtet man die embryonale Entwicklung, so dienen Blutgefäße nicht ausschließlich der Sauerstoffversorgung der sich entwickelnden Organe. Über ihre versorgende Funktion hinaus liefern sie Signale, welche die Organmorphogenese steuern und anregen [9]. Blutgefäße entstehen aus endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten), wobei sie einen gemeinsamen Ursprung mit hämatopoetischen Vorläuferzellen teilen. Im sich entwickelnden Embryo sind mesodermale Stammzellen der Ursprung für die Bildung eines Hämangioblasten, aus dem dann entweder eine endotheliale Vorläuferzelle in Form eines Angioblasten oder eine hämatopoetische Stammzelle hervorgeht [10] (Abbildung 1-2).

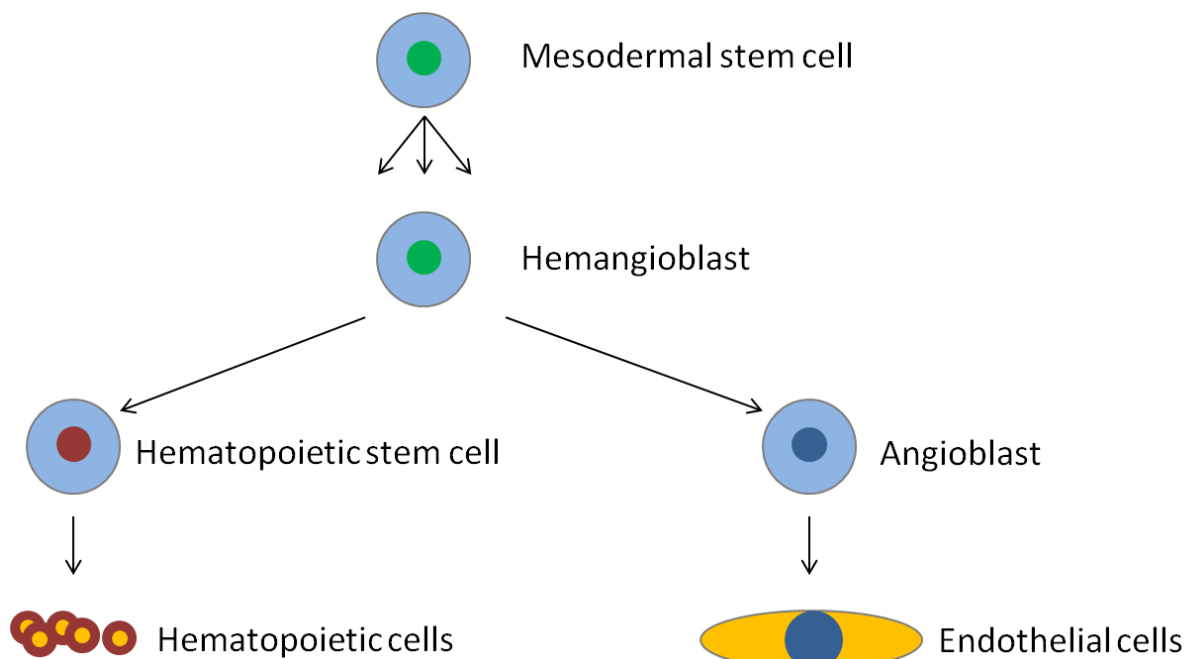


Abbildung 1-2 Herkunft von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen.

Endothelzellen (engl. endothelial cell) und hämatopoetische Zellen (engl. hematopoietic cell) entwickeln sich aus dem Hämangioblasten (engl. hemangioblast) als gemeinsame Vorläuferzelle mit mesodermalem Ursprung (Abbildung nach [10-11]).

Die enge Verknüpfung von Blutgefäßsystem und Blutzellen ist dabei für die Angiogenese während des gesamten Lebens von großer Bedeutung, da sie, wie oben bereits angedeutet, bei einer Störung die Ausbildung einer Vielzahl von malignen Krankheitsformen begünstigt. Bei der Bildung von Blutgefäßen sammeln sich in einem ersten Schritt die endothelialen Vorläuferzellen (engl. endothelial progenitor cells – EPCs, oder auch Angioblast) in einem einfachen vaskulären Geflecht kleiner Kapillaren. Dieser Schritt wird als Vaskulogenese bezeichnet. Bereits in diesem Stadium findet eine Differenzierung der EPCs in Endothelzellen (engl. endothelial cells – ECs) statt und es ist für die Kapillaren vorherbestimmt, ob sie für die Bildung eines arteriellen oder eines venösen Gefäßes bestimmt sind. Es wird angenommen, dass die Unterscheidung zwischen arteriellen und venösen Gefäßen nicht ausschließlich durch die in den Gefäßen wirkenden hämodynamischen Kräfte sondern auch durch eine genetische Programmierung ausgelöst wird [9]. Bei der auf die Vaskulogenese folgenden Angiogenese findet eine progressive Vermehrung des vaskulären Geflechts statt, währenddessen die ECs aus dem noch einfachen vaskulären Verband durch Remodellierung, Sprossung und Verzweigung ein stark organisiertes, regelmäßiges Netzwerk an Kapillargefäßen hervorbringen, wobei sich größere Gefäße in immer kleinere Gefäße verästeln [2, 9, 12]. In einem dritten Schritt, der Arteriogenese, werden die in der Entstehung begriffenen Gefäße aus Endothelzellen von Perizyten und glatten Muskelzellen (engl. smooth muscle cells - SMCs) umhüllt. Dadurch wird zum Einen das entstandene Geflecht stabilisiert und gestärkt und zum Anderen die Möglichkeit geschaffen, die Gefäßdurchblutung zu regulieren [1, 12]. Dieser Prozess wird in Abbildung 1-3 noch einmal verdeutlicht. Die Angiogenese kann dabei nach ihrer Form in 4 Unterarten unterteilt werden. Die Vermehrung des vaskulären Geflechts kann dabei über Sprossung (engl. sprouting), das Hineinsprossen von Gefäßen nach Teilung in einen Interkapillarraum (engl. intussusceptive growth), Verzweigung (engl. branching) und eine Verästelung bei der Gefäßrückbildung (engl. regression pruning) erfolgen [12].

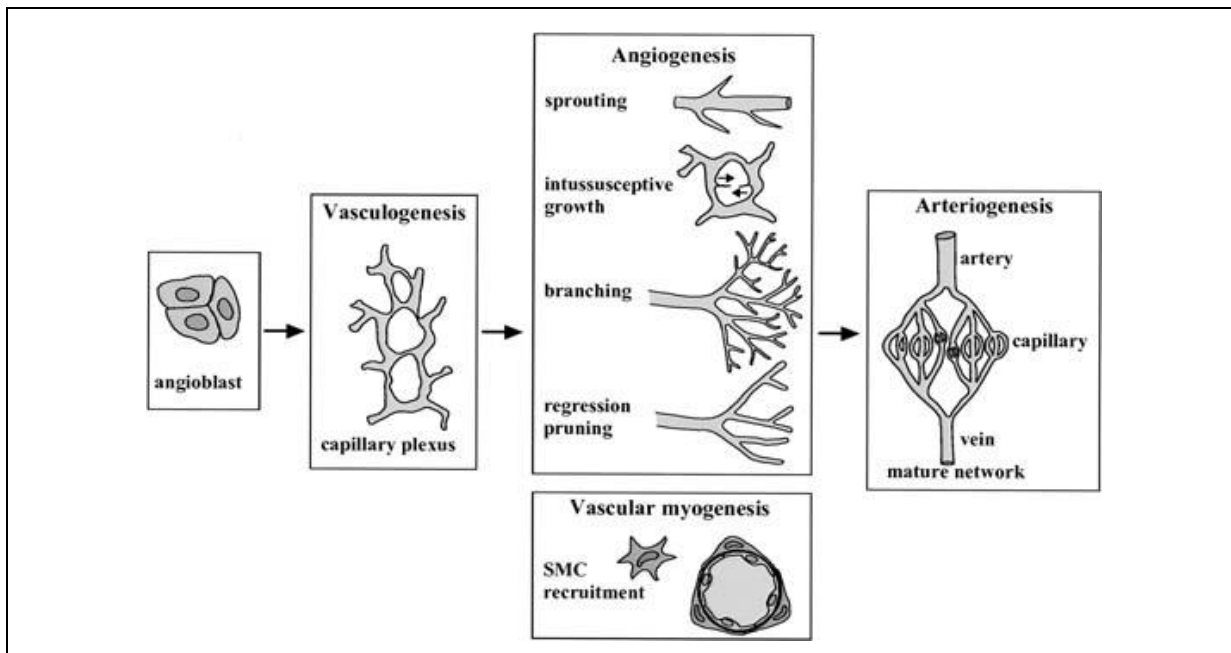


Abbildung 1-3 Bildung neuer Blutgefäße mittels Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.

Angioblasten als endotheliale Vorläuferzellen differenzieren in Endothelzellen, welche ein einfaches kapillares Geflecht bilden (Vaskulogenese). Das kapillare Geflecht wird mittels Sprossung (engl. sprouting), das Hineinsprossen von Gefäßen nach Teilung in einen Interkapillarraum (engl. intussusceptive growth), Verzweigung (engl. branching) und einer Verästelung bei der Gefäßrückbildung (engl. regression pruning) remodelliert und bildet ein regelmäßiges kapillares Netzwerk (Angiogenese). Gleichzeitig werden glatte Muskelzellen (engl. smooth muscle cells – SMC) rekrutiert (Vaskuläre Myogenese). Während der Arteriogenese wird das entstandene Geflecht durch Anlagerung der SMCs stabilisiert und gestärkt und bildet ein reifes Gefäßsystem [12].

Charakterisiert man die Angiogenese mittels Sprossung näher, so beinhaltet dieser Prozess den enzymatischen Abbau des umgebenden Gewebes, die Proliferation von Endothelzellen, die gerichtete Migration von Endothelzellen, die Gefäßbildung, die Anbindung der Gefäße verbunden mit einer Gefäßrückbildung und die Stabilisierung durch Perizyten [10]. Diese Form der Angiogenese findet hauptsächlich in schlecht mit Sauerstoff versorgten Geweben statt und wird durch die Ausschüttung proangiogener Faktoren wie dem *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) gefördert. Die Sprossung der Endothelzellen findet dabei gerichtet zur Quelle des proangiogenen Faktors hin statt [13-16]. Abbildung 1-4 verdeutlicht noch einmal das Prinzip der Sprossung. Dabei fungiert eine Endothelzelle, welche der höchsten Konzentration des proangiogenen Faktors ausgesetzt ist, als Sprossspitze (engl. tip-cell). Die sogenannte „tip-cell“ Endothelzelle bildet an ihrer Spitze Filopodien aus und sekretiert große Mengen proteolytischer Enzyme, welche den Verdau der extrazellulären Matrix (engl. extracellular matrix – ECM) ermöglichen [17-18]. Darüber hinaus besitzen die Filopodien

Rezeptoren für VEGF, sodass ein gerichtetes Wachstum entlang eines VEGF-Gradienten stattfinden kann. Durch Proliferation der auf die „tip-cell“ Endothelzelle folgenden „stalk cell“ Endothelzellen findet eine Elongation des Sprosses statt. Nach Vereinigung zweier „tip-cells“ und Bildung eines Lumens sowie Durchblutung, wird das Gewebe mit Sauerstoff versorgt und die Sekretion von VEGF vermindert. Die neu entstandene Kapillare wird im Anschluss durch die Anlagerung von Perizyten stabilisiert [15].

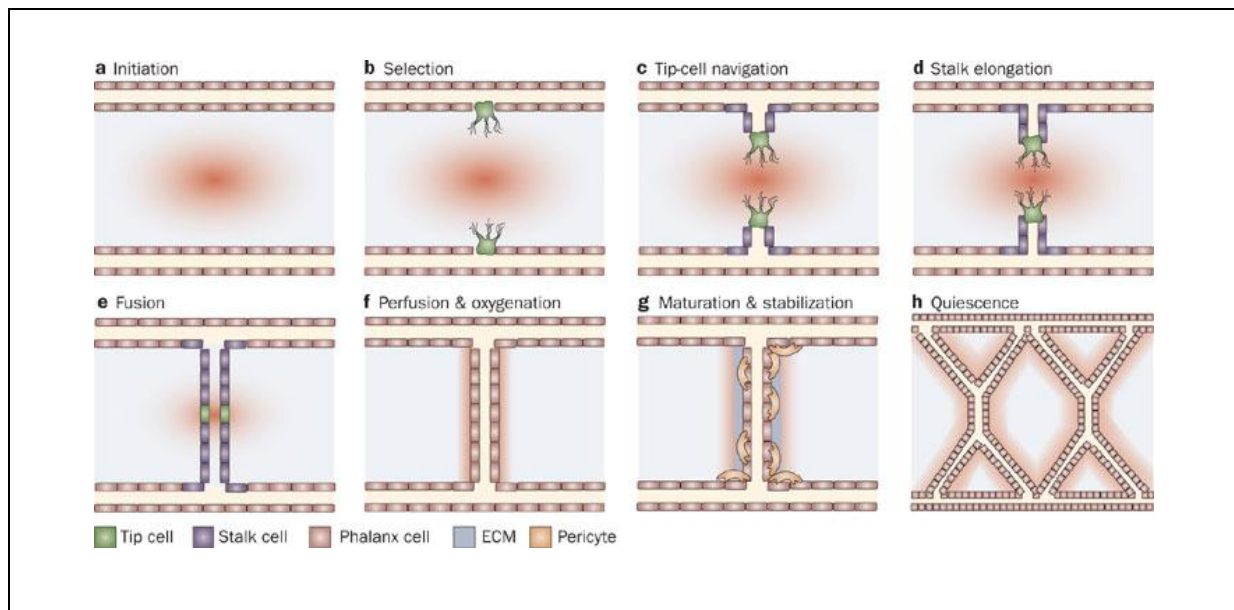


Abbildung 1-4 Verlauf der Angiogenese mittels Sprossung.

Infolge einer Mangelversorgung des Gewebes mit Sauerstoff werden von den Zellen im Gewebe proangiogene Faktoren (hier als rote Wolke dargestellt, z.B. vascular endothelial growth factor – VEGF) sekretiert. Endothelzellen, die der höchsten VEGF-Konzentration ausgesetzt sind fungieren als Sprossspitze (engl. tip-cell). Mittels Filopodien der tip-cells und nachfolgender, proliferierender Endothelzellen (stalk-cells) findet eine gerichtete Angiogenese statt. Nach Vereinigung zweier tip-cells, Durchblutung des Gewebes und Stabilisation des entstandenen Gefäßes durch Perizyten ist die Angiogenese abgeschlossen [15].

Anhand der Angiogenese mittels Sprossung wird deutlich, dass als Haupttriebkraft bei der Entwicklung des vaskulären Netzwerkes das lokale Vorhandensein von Sauerstoff sowie der Metabolismus der Zellen zu nennen sind. Aufgrund des hohen energetischen Potentials molekularer Sauerstoffs O_2 ist eine Vielzahl von Organismen von dem Vorhandensein und der Versorgung der Zellen des Organismus mit Sauerstoff abhängig [2]. Sauerstoff dient bei der aeroben Atmung als finaler Elektronenakzeptor in einer Kette von Oxidations- und Reduktionsreaktionen, welche zur Bereitstellung des Energiespeichermoleküls ATP führen. Darüber hinaus wird Sauerstoff als Substrat für den Aufbau und auch Abbau einer Vielzahl

zellulärer Bestandteile benötigt [4]. Eine Änderung des Sauerstoffpartialdruckes pO_2 beeinflusst das Maß an Angiogenese im Körper. Endothelzellen, aber auch andere Zellen des Körpers, verfügen über Mechanismen, veränderte Sauerstoffpartialdrücke und Sauerstoffversorgungsbedingungen wahrzunehmen [2]. Diese Mechanismen können auch als Sauerstoffsensoren betrachtet werden, welche grob in zwei Klassen eingeteilt werden. Die erste Klasse ist dabei abhängig von und reagiert auf Störungen der mitochondrialen Funktion und des Energielevels und kann dem Bereich Bioenergetik zugehörig gezählt werden. Zu dieser Klasse können in erster Linie die Mitochondrien an sich gezählt werden, welche durch eine Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes im Zytosol (und damit einhergehend einer Beeinflussung der Elektronentransportkette) zahlreiche Effektormechanismen auslösen [4]. Ferner dieser Klasse zugehörig sind der Energiestatus der Zelle in Form von ADP/ATP- und AMP/ATP-Ratio, der Redoxstatus und die Menge reaktiver Sauerstoffspezies ROS (engl. reactive oxygen species – ROS) zu nennen. Die zweite Klasse von Sauerstoffsensoren reagiert hingegen auf Störungen der sauerstoffabhängigen Synthese oder Degradation von Mediatoren und kann dem Bereich Biosynthese zugeordnet werden [4]. Hierzu zählen die sauerstoffsensitiven NADPH Oxidasen, Hämoxygenasen, Cytochrom P-450 Monooxygenasen und der Hypoxie induzierbare Faktor HIF bzw. genauer genommen die Prolyl- und Asparaginyll-Hydroxylasen, auf welche im Kapitel 1.4.3.1 über den Hypoxie induzierbaren Faktor HIF näher eingegangen wird [4]. Zusammenfassend ist die Bildung von Gefäßen als ein komplexes und balanciertes Zusammenspiel von stimulatorischen und inhibitorischen Signalen zu sehen, zu denen die oben beschriebenen Sauerstoffsensoren, aber auch Integrine, Angiopietine, Chemokine und endogene Inhibitoren gehören [1].

1.3. Bioenergetik

Der bioenergetische Status der Zelle hat wie oben beschrieben einen starken Einfluss auf die Förderung der Angiogenese. Grundsätzlich sind Zellen in der Lage, abhängig vom Vorhandensein von Sauerstoff, Energie in Form von ATP durch Kopplung der Glykolyse mit der oxidativen Phosphorylierung unter aeroben Bedingungen oder mittels Glykolyse unter anaeroben Bedingungen zu generieren.

1.3.1. Energiegewinnung der Zelle unter aeroben Bedingungen

Die Energiegewinnung und Energieversorgung der Zelle erfolgt unter aeroben Bedingungen durch die Kopplung der Glykolyse mit der oxidativen Phosphorylierung. Essentiell für die Glykolyse ist das Vorhandensein von Glucose, welche das Ausgangsmolekül des glykolytischen Prozesses darstellt und mittels des transmembranen Transportproteins Glucosetransporter (GLUT, SLC2A) in die Zellen gelangt. Im ersten Schritt der Glykolyse wird Glucose durch das Enzym Hexokinase (HK) in Glucose-6-phosphat überführt. Aus Glucose-6-phosphat entsteht durch eine Isomerisierungsreaktion Fructose-6-phosphat, welches durch das Enzym Phosphofructo-Kinase phosphoryliert wird und Fructose-1,6-Bisphosphat bildet. Mittels einer Aldolase-Reaktion und Isomerisierung entstehen aus einem Molekül Fructose-1,6-Bisphosphat durch Spaltung zwei Moleküle Glycerinaldehyd-3-phosphat. Dieser Prozess verbraucht für die Phosphorylierungsreaktionen zwei Moleküle ATP. Das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) überführt im Anschluss Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat, welches dann mittels des Enzyms Phosphoglycerat-Kinase (PGK) in 3-Phosphoglycerat unter Gewinn eines Moleküls ATP umgewandelt wird. Mittels des Enzyms Phosphoglycerat-Mutase wird die Phosphogruppe innerhalb des Moleküls transferiert und es entsteht 2-Phosphoglycerat. Das Enzym Enolase katalysiert unter Abspaltung von einem Molekül Wasser die Entstehung von Phosphoenolpyruvat, welches durch das Enzym Pyruvat-Kinase unter Gewinn eines Moleküls ATP dephosphoryliert wird und Pyruvat bildet.

Das gebildete Pyruvat geht anschließend über einen Decarboxylierungsschritt in Acetyl-CoA über und tritt in den Tricarbonsäurezyklus (TCA)-Zyklus ein. Dort wird Acetyl-CoA in mehreren Reaktionsschritten vollständig in Kohlendioxid CO_2 überführt. Die während der Reaktionsschritte frei werdenden Elektronen werden in Form von NADH/H^+ und FADH_2

zwischengespeichert und gelangen in dieser Form in die mitochondriale Elektronentransportkette.

Innerhalb der Mitochondrien findet der Prozess der oxidativen Phosphorylierung statt, bei dem die gespeicherte Energie der Elektronen genutzt wird, um einen elektrochemischen Gradienten aufzubauen. Ein Überschuss an Protonen liegt im Mitochondrienmembran-Zwischenraum vor und strömt durch die ATP-Synthase zurück in das Mitochondrium. Dabei katalysiert die ATP-Synthase die Erzeugung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat. Die Elektronen werden am Ende der Reaktion auf Sauerstoff übertragen und reagieren mit Protonen unter Bildung von Wasser. Zusammenfassend wird ATP unter aeroben Bedingungen durch Glykolyse, Bildung von Acetyl-CoA, TCA-Zyklus und oxidative Phosphorylierung gebildet. Dabei wird zwischen ATP-Synthase via Substratkettenphosphorylierung bei der Glykolyse und ATP-Synthase mittels Elektronentransportkette und oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) unterschieden [19].

1.3.2. Energiegewinnung der Zelle unter anaeroben Bedingungen

Steht der Zelle nicht ausreichend Sauerstoff zur Verfügung, erfolgt die ATP Produktion mittels anaerober Glykolyse. In diesem Fall läuft die Glykolyse wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben bis zur Bildung von Pyruvat wie unter aeroben Bedingungen ab. Bei Sauerstoffmangel aber akkumuliert das während der Glykolyse entstandene Pyruvat aufgrund der Inhibition des TCA-Zyklus und wird mittels des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDHA) zu Laktat reduziert [19].

1.4. Hypoxie

Der Begriff Hypoxie kann nicht numerisch durch Messung eines Sauerstoffpartialdruckes definiert werden. Wie bereits im Kapitel 1.1 beschrieben, ist die Sauerstoffverfügbarkeit im menschlichen Körper abhängig vom betrachteten Gewebe, wobei der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von der eingeatmeten Luft über das Blutgefäßsystem hin zum Gewebe stetig abnimmt. Zur genauen Begriffsklärung ist es daher notwendig, zwischen physiologischer und pathophysiologischer Hypoxie zu unterscheiden. Allgemein kann man den Begriff Hypoxie aber als den Zustand einer Zelle definieren, bei dem der Bedarf an Sauerstoff in den Mitochondrien nicht durch die Versorgung mit Sauerstoff gedeckt werden kann. Hierfür können grobe Richtwerte für die Sauerstoffkonzentrationen, wie in Tabelle 1-1 gezeigt, angegeben werden [20].

Tabelle 1-1 Richtwerte für die Begriffsverwendung “Hypoxie” anhand des Sauerstoffpartialdruckes.

Die Unterteilung der Sauerstoffpartialdrücke in Normoxie, physiologische Hypoxie, Hypoxie sowie Anoxie zeigt einen weitreichenden Bereich für die jeweilige Begriffsdefinition und spiegelt die in der Literatur nicht eindeutige Definition des Begriffes „Hypoxie“ wider (nach [20]).

Kondition	Sauerstoffpartialdruck pO_2 [mmHg]	Prozentualer Sauerstoffanteil in der Luft[%]
Normoxie	159	21
Physiologische Hypoxie	15-68	2-9
Leichte Hypoxie	8-38	1-5
Hypoxie	<8	<1
Anoxie	<0,08	<0,1

1.4.1. Physiologische Hypoxie

Für das Überleben aller multizellulären Organismen ist es essentiell über Mechanismen zu verfügen, welche die Sauerstoff-Homöostase aufrechterhalten. So können z.B. sehr hohe Sauerstoffkonzentrationen (Hyperoxie) zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species – ROS) führen, welche die Zellorganellen und die DNA beschädigen. Das Gegenteil, sehr geringe Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie), kann dazu führen, dass die wie in Kapitel 1.3.1 beschriebene Energiegewinnung und Energiebereitstellung in der Zelle

mittels ATP unzureichend ist und dadurch essentielle metabolische Prozesse in der Zelle nicht mehr ablaufen können. Dabei verfügen Zellen aber über verschiedene Mechanismen, um die zelluläre Sauerstoff-Homöostase zu gewährleisten [21]. Solange die Zellen in der Lage sind, ihre Sauerstoff-Homöostase aufrecht zu erhalten, kann man trotz der in Kapitel 1.1 beschriebenen geringen Sauerstoffpartialdrücke im gesunden Gewebe von bis um die 30mmHg (ca. 3% O₂-Luftanteil) zwar von einer Hypoxie, aber einer physiologischen Hypoxie sprechen.

1.4.2. Pathophysiologische Hypoxie

Nach der oben eingeführten Definition ist die pathophysiologische Hypoxie dadurch charakterisiert, dass die betroffenen Zellen nicht in der Lage sind, ihre Sauerstoff-Homöostase aufrecht zu erhalten. Die Störung der Sauerstoff-Homöostase kann dabei unterschiedlichste Ursachen haben, welche größtenteils ihren pathogenetischen Hintergrund teilen. Man spricht in diesem Fall von einer pathophysiologischen Hypoxie, welche z.B. durch eine Verletzung des Kapillarnetzwerkes wie bei Wunden und Frakturen, durch akute und chronische Entzündungsprozesse mit gesteigertem Sauerstoffbedarf sowie durch solide Tumoren entstehen kann. Diese Form von Hypoxie ist bei einem Sauerstoffpartialdruck von kleiner 8mmHg (<1% Sauerstoffluftäquivalent) anzusiedeln [20, 22].

1.4.3. Hauptregulatoren unter Hypoxie

Um adäquat auf eine Änderung des Sauerstoffpartialdruckes und damit verbunden die Beeinflussung der Sauerstoffhomöostase reagieren zu können, müssen Zellen in der Lage sein, diese Veränderungen wahrzunehmen. Dazu verfügen Endothelzellen und andere Zellen des Körpers wie in Kapitel 1.2 angeführt über Mechanismen, die als Sauerstoffsensoren fungieren und so eine Reaktion der Zelle ermöglichen [2, 4]. Zu diesen Sauerstoffsensoren gehören auch die sauerstoffabhängigen Enzyme Prolyl-Hydroxylase und Asparaginy-Hydroxylase, welche einen direkten Einfluss auf die Aktivität des Hypoxie induzierbaren Faktors HIF besitzen [23].

1.4.3.1. Der Hypoxie induzierbare Faktor HIF

Der Hypoxie induzierbare Faktor HIF fungiert als Hauptregulator bei der Adaptation der Zelle an hypoxische Bedingungen [24]. Bei dem Faktor HIF handelt es sich um einen konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktor, welcher kontinuierlich von der Zelle neu gebildet wird, aber nur unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert wird und als Transkriptionsfaktor wirken kann [24].

HIF besteht in seiner aktiven Form aus einer α - und einer β -Untereinheit und stellt ein Heterodimer dar. Es gibt drei α -Untereinheiten (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), welche sauerstoffabhängig sind und unter normoxischen Bedingungen (21% Luftsauerstoffäquivalent) der proteosomalen Degradation unterliegen. Die konstitutiv gebildete β -Untereinheit (auch bekannt als engl. aryl hydrocarbon nuclear translocator – ARNT) ist unabhängig von der Sauerstoffkonzentration im Kern der Zelle lokalisiert [20, 25-26]. Die genannten α - und β -Untereinheiten gehören zur Familie der bHLH/PAS-Proteine (engl. basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM) und weisen z.B. im Vergleich von HIF-1 α und HIF-2 α eine 48%ige Aminosäuresequenz-Homologie auf [20, 26]. Die strukturellen Domänen von HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α sowie HIF-1 β werden in Abbildung 1-5 aufgezeigt [20].

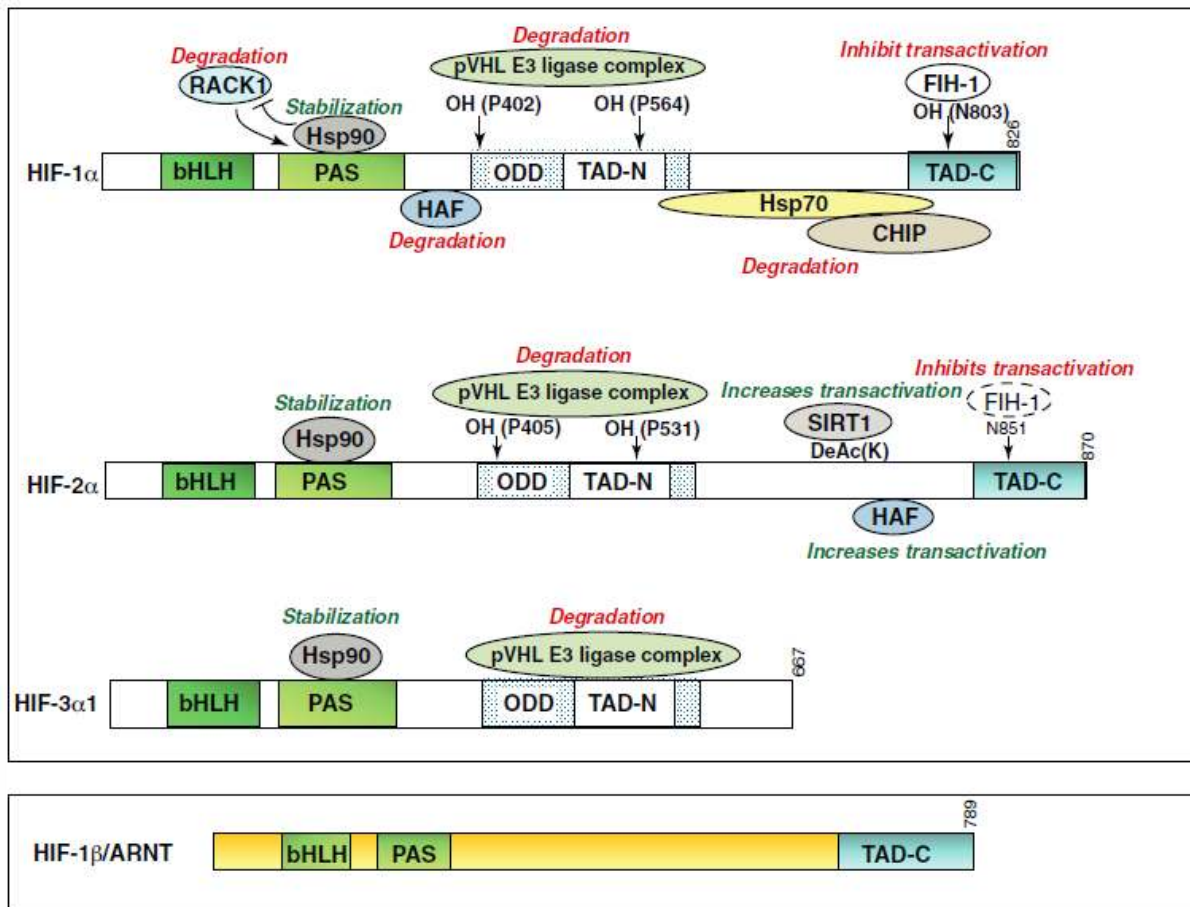


Abbildung 1-5 Darstellung der strukturellen Domänen von HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α sowie des Bindungspartners HIF-1 β .

Die Bildung des heterodimeren Transkriptionsfaktors HIF-1, HIF-2 oder HIF-3 geschieht durch Dimerisierung der sauerstoffsensitiven α -Untereinheit HIF-1 α , HIF-2 α oder HIF-3 α mit dem transkriptionellen Bindungspartner HIF-1 β . Das basic helix-loop-helix (bHLH) Motiv sowie die PER-ARNT-SIM (PAS) Domäne sind für die Bindung an die DNA sowie die Heterodimerisierung notwendig. Die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (engl. oxygen dependent degradation domain – ODD) spielt eine Rolle bei der sauerstoffabhängigen Hydroxylierung und Degradation. HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-1 β verfügen über eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD-C) und HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α über eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD-N), welche jeweils für die transkriptionelle Aktivierung notwendig sind. Die jeweiligen HIF- α Untereinheiten interagieren mit verschiedenen Faktoren, welche eine aktivierende Wirkung (grüne Schrift) oder eine inhibierende Wirkung (rote Schrift) auf den Transkriptionskomplex haben können (pVHL - von Hippel-Lindau Protein E3 Ligase Komplex, FIH – engl. factor inhibiting HIF, RACK-1 – engl. receptor for activated protein kinase C1, HSP – engl. heat shock protein, HAF – engl. hypoxia-associated factor, CHIP – engl. carboxy terminus of HSP70-interacting protein, SIRT1 – Sirtuin 1) [20].

Die Sauerstoffabhängigkeit von HIF-1 α entsteht durch die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne ODD, in denen die Aminosäuren Prolin 402 und 564 lokalisiert sind und die in Anwesenheit von Sauerstoff hydroxyliert werden. Die Untereinheit HIF-2 α besitzt ebenfalls eine ODD, bei der die Proline 405 und 531 unter Anwesenheit von Sauerstoff hydroxyliert werden. Für die Hydroxylierung der Prolingruppen sind HIF-1 α und HIF-2 α spezifische Enzyme zuständig, die als PHDs bezeichnet werden (engl. prolyl-hydroxylase domain-containing enzymes - PHD). Für die Hydroxylierungsreaktion mittels PHD sind zudem neben Sauerstoff die Co-Faktoren 2-Oxoglutarat, Ascorbat und zweiwertiges Eisen (Fe²⁺) notwendig. Die Hydroxylierung der Prolingruppen innerhalb der ODD von HIF-1 α bzw. HIF-2 α führt dazu, dass das von Hippel-Lindau Protein (pVHL) dort bindet [27]. Die Markierung der α -Untereinheit durch pVHL ermöglicht das Binden des E3-Ubiquitin-Ligase Komplexes und damit die Polyubiquitylierung sowie die anschließende proteasomale Degradation in den 26S Proteasomen [28]. Unter hypoxischen Bedingungen hingegen, also bei einem Sauerstoffpartialdruck kleiner 38mmHg (<5% Sauerstoffluftäquivalent), ist die PHD Aktivität mangels Sauerstoff inhibiert, das Binden von pVHL findet nicht statt und HIF-1 α bzw. HIF-2 α werden stabilisiert, translozieren in den Zellkern und dimerisieren dort mit der β -Untereinheit, um einen aktiven Transkriptionsfaktor zu bilden. Dies geschieht durch Bindung an konservierte DNA-Sequenzen, sogenannte HREs (engl. hypoxia responsive elements – HREs), was zu einer Transaktivierung einer Vielzahl Hypoxie-regulierter Gene führt (siehe weiter unten in diesem Kapitel) [29]. Neben dieser Form der Regulation von HIF, findet unter Anwesenheit von Sauerstoff durch das Enzym Asparaginy-Hydroxylase, auch bekannt als FIH (engl. factor inhibiting HIF) eine Hydroxylierung des Asparagin 803 in HIF-1 α statt. Dies unterbindet, da sich Asparagin 803 innerhalb der C-terminalen Transktivierungsdomäne befindet, das Binden der Transkriptions-Co-Aktivatoren p300/CBP (engl. CREB binding protein – CBP) und damit die transaktivierende Funktion von HIF-1 [30]. Das Protein HIF-2 α kann ebenfalls an Asparagin 851 hydroxyliert werden, wobei dies aber mit geringerer Effektivität als bei HIF-1 α geschieht [31]. Die oben beschriebene Regulation der HIF- α Stabilität unter Normoxie und Hypoxie gibt Abbildung 1-6 noch einmal vereinfacht wieder [32].

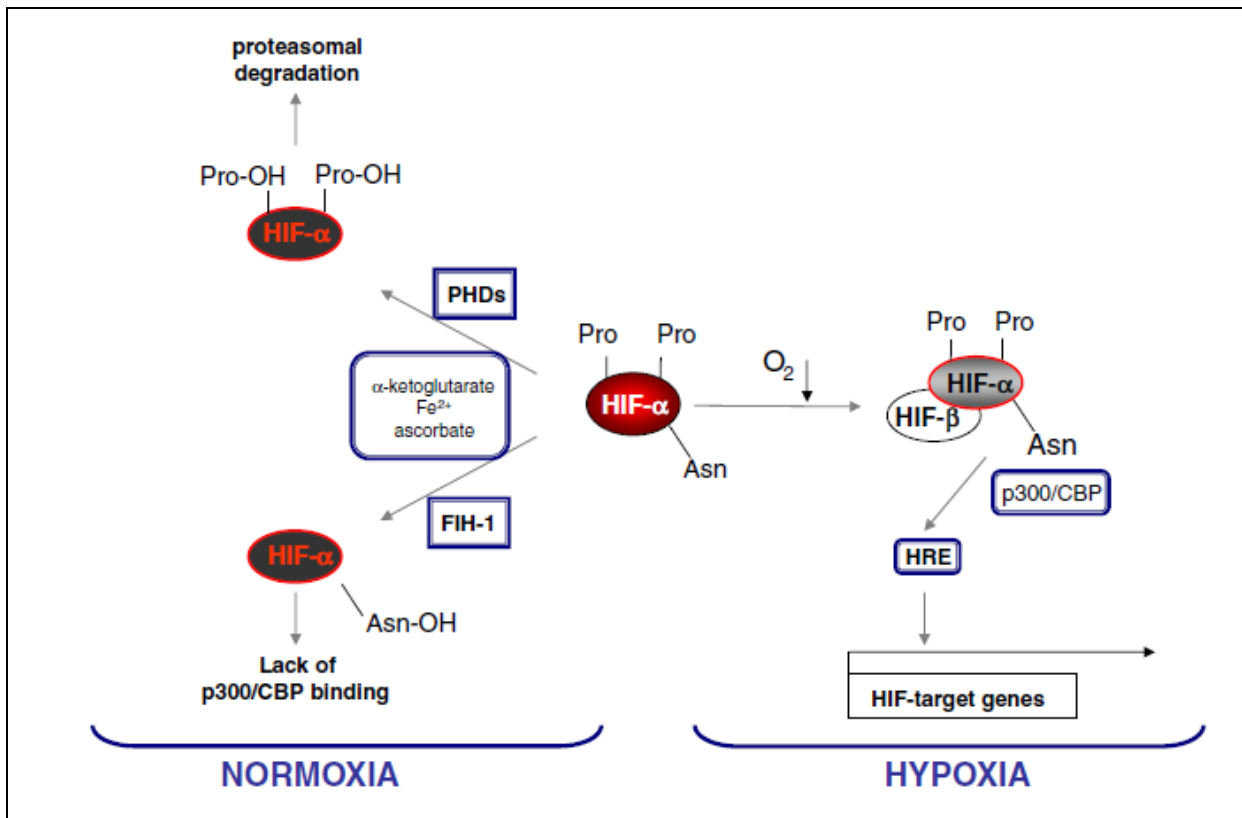


Abbildung 1-6 Schematische Darstellung der HIF- α Regulation unter Normoxie und Hypoxie.

Unter Normoxie findet eine Hydroxylierung der Prolin-Gruppen der HIF- α Untereinheit mittels Prolyl-Hydroxylasen (PHD) unter Anwesenheit der Co-Faktoren 2-Oxoglutarat, Ascorbat und zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) statt und führt zu einer Degradation im 26S Proteasom. Die Hydroxylierung von Asparagin mittels des HIF inhibierenden Faktors (engl. factor inhibiting HIF – FIH) führt zu einer Inhibition der Bindung der Transkriptions-Co-Aktivatoren p300/CBP und einer Inhibition der Transkriptionsaktivität von HIF. Unter Hypoxie findet keine Hydroxylierung der Prolin- und Asparagin-Reste der HIF- α Untereinheit statt, die HIF- α Untereinheit wird stabilisiert, transloziert in den Zellkern und dimerisiert mit der HIF- β Untereinheit. Dort bindet der Transkriptionsfaktor HIF zusammen mit den Co-Aktivatoren p300/CBP an den hypoxia responsive elements (HREs) im Promotor-Bereich von HIF-Zielgenen und löst deren Transkription aus [32].

Die Darstellung der strukturellen Domänen von HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α und des Bindungspartners HIF-1 β in Abbildung 1-5 zeigt neben der Regulation von HIF-1 α und HIF-2 α durch Hydroxylierung von Prolin und Asparagin weitere Mechanismen, die einen Einfluss auf die Stabilisierung der α -Untereinheit von HIF unter Hypoxie bzw. die Degradation der α -Untereinheit unter Normoxie haben. Diese Mechanismen können sowohl sauerstoffabhängig als auch sauerstoffunabhängig sein und entweder nur eine HIF- α Untereinheit betreffen oder mehrere. Als sauerstoffunabhängig gilt der Faktor RACK1 (engl. receptor of activated protein kinase C – RACK), welcher kompetitiv zum Hitzeschockprotein HSP90 (engl. heat shock protein – HSP) innerhalb der PAS Domäne von HIF-1 α bindet. HSP90 fungiert dabei nach Stabilisierung von HIF- α unter Hypoxie als Chaperon und schützt

vor Degradation. Die kompetitive Bindung von RACK1 führt hingegen zur Degradation der α -Untereinheit durch Interaktion mit Elongin C und Ubiquitynylierung. Für die α -Untereinheit von HIF-2 ist bislang nicht bekannt, ob dort RACK1 ebenfalls innerhalb der PAS Domäne binden kann und somit einen Einfluss auf die Stabilität hat [33]. Durch die Kompetition von HSP90 und RACK1 wird die Halbwertszeit von HIF- α reguliert [34]. Darüber hinaus gibt es regulative Mechanismen, die nur eine HIF- α Untereinheit betreffen und somit selektiv für HIF-1 α oder HIF-2 α sind. Dazu zählt das Protein HAF (engl. hypoxia associated factor – HAF), welches für HIF-1 α mittels Bindung an Aminosäure 654 und 800 sowie Ubiquitynylierung degradierend, für HIF-2 α aber stabilisierend und bei anhaltender Hypoxie als die Transaktivierung fördernd wirkt [35]. Vergleichbar dazu führt ein Binden des HSP70/CHIP Komplexes (engl. carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein - CHIP) bei lang andauernder Hypoxie sowie hohen Glucose-Spiegeln zu einer selektiven Degradation von HIF-1 α im Vergleich zu HIF-2 α [36]. Selektiv für die Aktivierung von HIF-2 α ist darüber hinaus die Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) beschrieben worden [37-38].

Wie weiter oben bereits kurz angedeutet dient HIF zusammen mit den Co-Aktivatoren p300/CBP als Transkriptionsfaktor einer Vielzahl von Genen, die der Zelle eine Adaptation an Sauerstoffmangelbedingungen ermöglichen. Die durch HIF regulierten Gene lassen sich in mehrere Klassen einordnen, zu denen die Bioenergetik, die Angiogenese, der Eisenmetabolismus, Signalwege der Wachstums- und Apoptosemechanismen, die Regulation des pH-Wertes, der Nukleotidmetabolismus sowie Faktoren der Migration und Matrix-Remodellierung gehören [24]. Dabei scheint von Bedeutung, dass HIF-1 und HIF-2 in vielen Bereichen überlappende Funktionen haben, in der Literatur aber auch exklusive Zielgene des Transkriptionsfaktors HIF-1 oder HIF-2 beschrieben werden [38]. Darüber hinaus ist die Zuordnung exklusiver Zielgene von HIF-1 und HIF-2 auch einem stetigen Wandel unterzogen und vom untersuchten Zelltyp und Gewebe abhängig, wie es das Beispiel des HIF Zielgens *EPO* (Erythropoietin) zeigt. So wurde anfangs HIF-1 als an das HRE von *Epo* bindend beschrieben, um später nach genauer Charakterisierung festzustellen, dass HIF-2 der Hauptregulator der *EPO* Expression in intakten Zellen ist [39-41]. Keith veröffentlichte kürzlich eine repräsentative Liste von HIF-1 und HIF-2 regulierten Genen, welche in Tabelle 1-2 gekürzt und mit Fokus auf Angiogenese und Bioenergetik wiedergegeben ist [38].

Tabelle 1-2 Übersicht HIF-1 und HIF-2 regulierter Gene der Angiogenese und Bioenergetik (nach [38]).

Die Regulation von Genen der Angiogenese und Bioenergetik kann diskret durch HIF-1 oder HIF-2 oder durch beide Faktoren überlappend erfolgen.

Gen	Funktion	HIF-1α reguliert	HIF-2α reguliert
<i>GLUT1</i>	Glucose-Transport	+	+
<i>ADM1</i>	Angiogenese	+	+
<i>VEGF</i>	Angiogenese	+	+
<i>HK1</i>	Glykolyse	+	-
<i>HK2</i>	Glykolyse	+	-
<i>PFK</i>	Glykolyse	+	-
<i>ALDA</i>	Glykolyse	+	-
<i>PGK1</i>	Glykolyse	+	-
<i>LDHA</i>	Glykolyse	+	-
<i>EPO</i>	Erythropoiese	-	+
<i>DLL4</i>	NOTCH Signalweg, Sprossung von Endothelzellen	-	+
<i>ANG2</i>	Umbau von Blutgefäßen	-	+

Zusammenfassend kann man die Aktivierung von Zielgenen unter Hypoxie durch HIF-1 oder HIF-2 nur im Kontext des untersuchten Zelltyps und Gewebes einordnen und darf zusätzlich die unterschiedliche Regulation der HIF-1 α und HIF-2 α Stabilität unter Hypoxie nicht vernachlässigen [20]. In welchem Zusammenhang Hypoxie und die Angiogenese sowie Bioenergetik von Zellen stehen wird deutlich, wenn man Erkrankungen mit hypoxischen Erscheinungsbild betrachtet.

1.5. Die Rolle der Angiogenese in Erkrankungen mit hypoxischem Erscheinungsbild

Es ist unumstritten, dass eine gestörte Balance zwischen Angiogenese und zellulärem Metabolismus zu einer Vielzahl maligner, entzündlicher, ischämischer, infektiöser oder immunologischer Störungen führen kann [1]. Während der Embryogenese und nach der Geburt trägt die Angiogenese zum Wachstum von Organen bei und wird im gesunden erwachsenen Organismus größtenteils eingestellt. So spricht man im erwachsenen Organismus von "ruhenden" Blutgefäßen und Angiogenese findet hauptsächlich nur noch bedingt durch den monatlichen Zyklus der Frau oder während der Schwangerschaft in der Plazenta statt [1]. Nichtsdestotrotz behalten Endothelzellen die Eigenschaft, sich bei hypoxischen Stimuli schnell zu teilen und Angiogenese einzuleiten. So wird die Angiogenese durch Endothelzellen z.B. bei der Wundheilung oder bei dem Versuch der Neuversorgung ischämischer Regionen, wie z.B. nach Herzinfarkt, reaktiviert [1, 22]. In diesem Zusammenhang wird nach Strategien gefahndet, wie man die Angiogenese zur Revaskularisierung ischämischer Gebiete fördern kann [42]. Häufig wird aber auch das gegenteilige Ziel, die Unterbindung der Angiogenese, angestrebt. So kann die Angiogenese bei der Tumorprogression oder bei chronischen entzündlichen Erkrankungen wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis einen negativen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen haben. In den beiden nachfolgenden Kapiteln soll dies verdeutlicht werden.

1.5.1. Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) wird als am häufigsten vorkommende entzündliche Erkrankung der Gelenke beschrieben. Bei der RA handelt es sich um eine symmetrische polyartikuläre Arthritis, welche vor allem die kleinen Gelenke der Hände und Füße betrifft. Maßgeblich zum Krankheitsbild beitragend ist zum Einen die Entzündung des Synoviums und zum Anderen die Infiltration und Zerstörung lokaler artikulärer Strukturen durch sogenanntes Pannusgewebe. Bei dem Pannusgewebe handelt es sich um Granulationsgewebe sowie hyperplastische synoviale Fibroblasten. Im Pannusgewebe akkumulieren unter anderem CD4+ T Zellen, Makrophagen und B Zellen und die Bildung des Pannus führt lokal zur Freisetzung von degradierenden Enzymen, welche die extrazelluläre Matrix abbauen und zur Zerstörung der Knorpelstruktur führen [43]. Infolge der massiven Infiltration von Immunzellen und der Proliferation der synovialen Fibroblasten kommt es zu einem stark

erhöhten Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen [44]. Zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase findet vermehrt Angiogenese im Pannus der RA statt, was zur Aufrechterhaltung und Chronifizierung des entzündlichen Prozesses beiträgt, wie es Abbildung 1-7 wiedergibt.

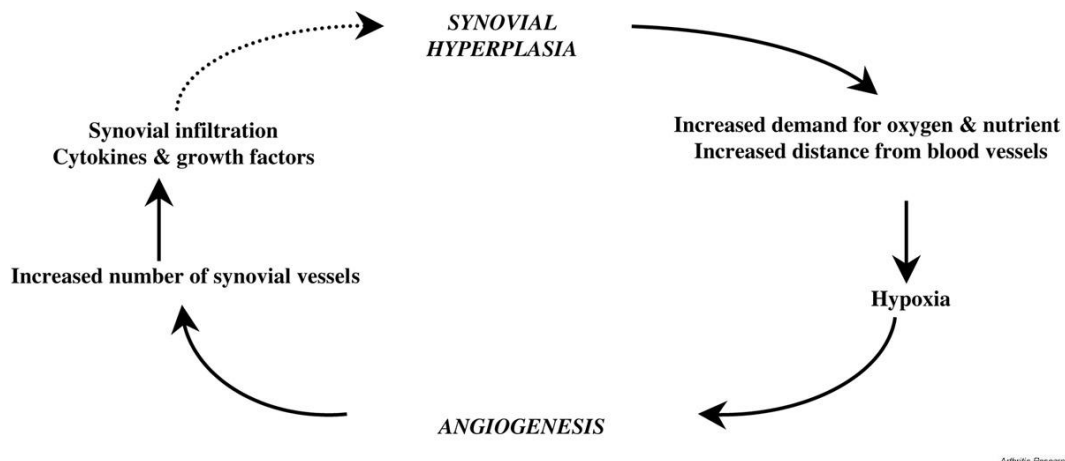


Abbildung 1-7 Zusammenspiel von Angiogenese und synovialer Hyperplasie in der Rheumatoiden Arthritis.

Durch die Entzündung des Synoviums und das Einwandern von Immunzellen sowie die Hyperproliferation von Synoviozyten entsteht ein erhöhter Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen. Zusätzlich vergrößert sich die Distanz zwischen versorgendem Gefäß und dem Gewebe, was zur Ausbildung einer lokalen Hypoxie führt. Durch die Hypoxie werden die angrenzenden Endothelzellen zur Angiogenese veranlasst. Dies führt zu einer Zunahme der Anzahl an Blutgefäßen im Bereich des Synoviums, was zur vermehrten Bereitstellung von (pro)inflammatorischen Zytokinen sowie Wachstumsfaktoren führt. Dadurch wird die synoviale Hyperplasie verstärkt und die Erkrankung gewinnt an Chronizität [44].

Um den Kreislauf aus synovialer Hyperplasie und Angiogenese zu unterbrechen und so den Krankheitsverlauf zu mildern oder zu beenden, stellen die für die Angiogenese verantwortlichen Endothelzellen einen Ansatzpunkt dar. Dabei spielen neben den von den Zellen im hypoxischen Milieu sekretierten löslichen Faktoren auch Endothelzellrezeptor-Adhäsionsmoleküle eine Rolle, welche die Endothelzellen zu einer vermehrten Angiogenese anregen. Die folgende Abbildung 1-8 und Tabelle 1-3 stellen dies noch einmal graphisch dar und listen die in der Literatur diskutierten möglichen Ansätze, also die bekannten Angiogenese modulierenden Moleküle, zur Kontrolle bzw. Inhibition der Angiogenese in der Rheumatoiden Arthritis auf [45].

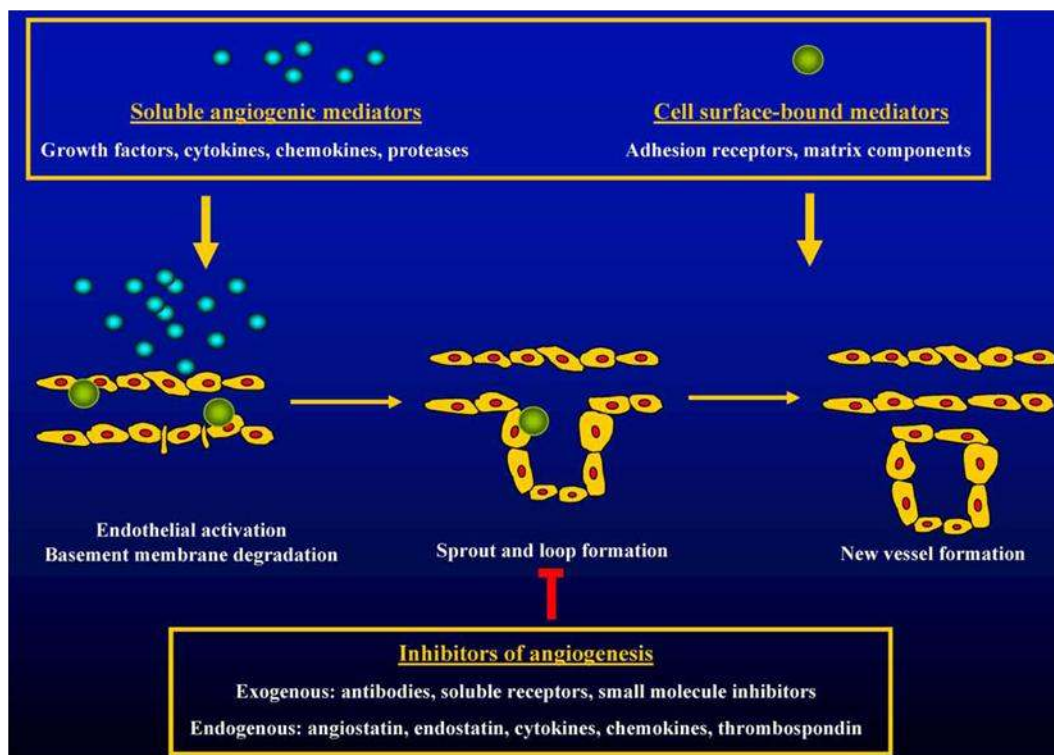


Abbildung 1-8 Der Einfluss von löslichen Faktoren und an der Zelloberfläche von Endothelzellen gebundenen Faktoren auf die Angiogenese.

Zu den löslichen, die Angiogenese fördernden Faktoren zählen Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und Proteasen. An der Zelloberfläche von Endothelzellen befinden sich unter anderem Rezeptoren für die Adhäsion. Sowohl lösliche als auch gebundene Faktoren führen zur Aktivierung des Endothels, zur Degradation des umliegenden Gewebes, zur Sprossung und zur Bildung eines neuen Gefäßes. Inhibitoren der Angiogenese können in endogene Faktoren (z.B. Angiostatin, Endostatin, Zytokine, Chemokine, Thrombospondin) und exogene Faktoren (z.B. Antikörper, lösliche Rezeptoren, niedermolekulare Inhibitoren) eingeteilt werden (Abbildung aus [45]).

Tabelle 1-3 Mediatoren und Inhibitoren der Angiogenese von Endothelzellen.

Unterteilt in die Klassen Wachstumsfaktor, Zytokin, Chemokin, Matrixmolekül, Zelladhäsionsmolekül, Proteolytisches Enzym, Mikromilieu und andere. Direkt mit der Hypoxie in Zusammenhang stehende Faktoren sind fett gedruckt (adaptiert nach [45]).

	Mediatoren	Inhibitoren
Wachstumsfaktoren	VEGF , aFGF, bFGF, HGF, HIF-1 , HIF-2 , PDGF, EGF, KGF, IGF-I, TGF- β , PIGF	
Zytokine	TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, IL-18, G-CSF, GM-CSF, Oncostatin M, MIF	IFN- α , IFN- γ , IL-4, IL-12, LIF

	Mediatoren	Inhibitoren
Chemokine / Chemokin-Rezeptoren	IL-8/CXCL8, ENA-78/CXCL5, Gro α /CXCL1, CTAP-III/CXCL6, SDF-1/CXCL12, MCP-1/CCL2, Fractalkine/CX3CL1, CXCR2, CXCR4, CCR2	PF4/CXCL4, M β g/CXCL9, IP-10/CXCL10, SLC/CCL21, CXCR3
Matrixmoleküle	Type I collagen, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Tenascin, Proteoglycan	Thrombospondin-1, -2
Zelladhäsionsmoleküle	β 1 and β 3 Integrine, E-Selectin, VCAM-1, ICAM-2, CD34, Lewis ^x /H, MUC18, PECAM-1, Endoglin, JAM-A, JAM-C	
Proteolytische Enzyme	MMPs, Plasminogene Aktivatoren	TIMPs, PAIs
Faktoren des Mikromilieus	Hypoxie	–
Andere Faktoren	Angiopoietin 1/Tie-2, Angiotropin, Pleiotrophin, Angiogenin, Survivin, COX/Prostaglandin E2, PAF, NO, ET-1, Serum Amyloid A, Histamin, Substanz P, Adenosin, Erythropoietin, Prolactin, Thrombin	Angiopoietin 2, Angiostatin, Endostatin, Kallistatin, type IV Collagen Derivate, Paclitaxel, 2-Methoxyestradiol, Osteonectin, Opioide, Troponin I, Chondromodulin

Trotz der Vielzahl der bekannten Faktoren, welche die Angiogenese in der RA fördern und damit einen Beitrag zum Fortbestand der chronischen Entzündung tragen, sind die Hauptregulatoren unter Hypoxie HIF-1 und HIF-2 bisher nicht genauer beleuchtet worden und stellen bis zum heutigen Zeitpunkt keinen Ansatz für die Behandlung von Erkrankungen mit hypoxischen Erscheinungsbild und gesteigerter Angiogenese dar. Eine weitere schwere Erkrankung, die ein solches Erscheinungsbild zeigt und durch vermehrte Angiogenese vorangetrieben wird, ist der Krebs und damit verbunden die Tumorgenese [1].

1.5.2. Tumorgenese

Die Hypoxie stellt ein typisches Charakteristikum vieler Tumorerkrankungen dar und etabliert sich, wenn das Wachstum des Tumors die mit dem Wachstum des Tumors einhergehende Angiogenese überholt. Die Tumorzellen werden in diesem Fall nicht mehr mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen versorgt [46]. Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits beschrieben, stellt der Hypoxie induzierbare Faktor HIF einen Hauptregulator bei der Anpassung von Zellen an hypoxische Bedingungen dar [26, 47]. Für eine Isoform von HIF, HIF-1, wird gezeigt, dass sie direkt die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF (engl. vascular endothelial growth factor – VEGF) und seines Rezeptors VEGFR erhöht und damit das Tumorstadium fördert [48-49]. Des Weiteren korreliert die Expression von HIF-1 und VEGF mit der Stärke der durch den Tumor gebildeten Läsionen und die Größe des Tumors ist vom Vorhandensein von HIF-1 abhängig. Eine Destabilisierung von HIF-1 führt zur verminderten Ausschüttung von VEGF und die autokrine Stimulation des Tumors über VEGF und VEGFR wird unterbrochen [50-53]. Aus den genannten Gründen stellt HIF-1 und die Unterbindung der durch HIF-1 über VEGF vermittelten Angiogenese ein mögliches Ziel für die Bekämpfung maligner Tumoren dar [54]. Darüber hinaus werden noch eine Vielzahl weitere mögliche Mechanismen diskutiert, um die Tumorstadium und somit die Tumorgenese zu unterbinden. Die folgende Abbildung 1-9 gibt einen Überblick über die diskutierten Strategien [1]. Ziel der angewandten Strategien ist es in jedem Fall die Tumorstadium zu verhindern. Dies kann direkt über die Gabe von Chemotherapeutika mit Einfluss auf die Tumorzellen geschehen oder über die Beeinflussung der an der Angiogenese beteiligten Zellen. So können die Endothelzellen mittels antiangiogener Substanzen an der Angiogenese gehindert werden, die die Gefäße stabilisierenden SMCs können inhibiert werden, die Freisetzung proangiogener Faktoren durch Leukozyten kann verhindert werden und der Wirkstofftransport an sich kann verbessert werden [1].

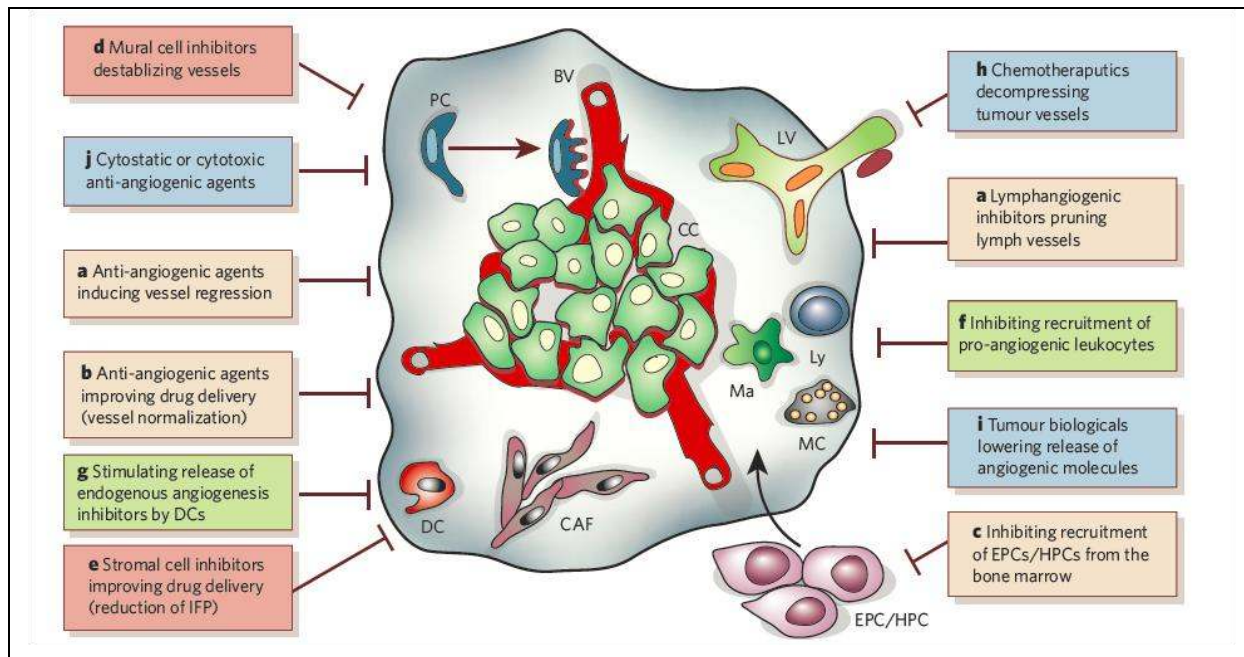


Abbildung 1-9 Strategien zur Unterbindung der Tumor-assoziierten Angiogenese durch Beeinflussung von Endothelzellen und von nicht-endothelialen Zellen.

Eine mögliche Strategie zur Unterbindung der Tumor-assoziierten Angiogenese ist die Beeinflussung der Endothelzellen über die (a) Gabe von antiangiogenen Substanzen, welche die Rückbildung von Blutgefäßen fördern, (b) den Wirkstofftransport zum Tumor hin verbessern oder (c) die Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) aus dem Knochenmark verhindern. Auch die nicht-endothelialen Zellen spielen bei der Stabilisierung der Angiogenese eine Rolle und können Ziel einer antiangiogenen Therapie sein. So können (d) die gefäßstabilisierenden Zellen inhibiert werden und (e) der Wirkstofftransport verbessert werden. Auch die anwesenden Leukozyten stellen ein Therapieziel dar, indem (f) die Rekrutierung von proangiogenen Faktoren sekretierenden Leukozyten verhindert oder (g) die Freisetzung endogener antiangiogener Faktoren durch Dendritische Zellen (DCs) gefördert wird. Eine direkte Beeinflussung der Tumorzellen durch chemotherapeutische Ansätze (h,i,j) mit der Verwendung zytostatischer und antiangiogener Substanzen ist ebenfalls möglich [1].

Im Zusammenhang mit der Tumorgenese und dem Einfluss von Hypoxie und Angiogenese werden auch die unterschiedlichen Rollen von HIF-1 und HIF-2 diskutiert. Es wird beschrieben, dass sowohl Patienten mit erhöhten HIF-1 Spiegel als auch Patienten mit erhöhtem HIF-2 Spiegel eine schlechtere Prognose bei der Krankheit haben [55-56]. Zudem üben HIF-1 und HIF-2 unterschiedliche Funktionen aus, wie es in einer Untersuchung an einem Nierenzellkarzinom gezeigt wurde. HIF-1 dient der schnellen Anpassung an eine akute Hypoxie und wird eher als die Tumorgenese verlangsamernd eingestuft, während HIF-2 die führende Rolle bei einer chronischen Hypoxie übernimmt und die Tumorgenese fördert [57]. Ein Modell für die unterschiedlichen Rollen von HIF-1 und HIF-2 in der Tumorbilogie beschreibt Koh, in dem die Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α als akute Antwort auf Hypoxie stattfindet und bei einer chronischen Hypoxie - vermittelt über den Faktor HAF -

eine Stabilisierung von HIF-2 α erfolgt während HIF-1 α degradiert wird (Vergleich auch siehe Kapitel 1.4.3.1). Die folgende Abbildung 1-10 beschreibt noch einmal das angeführte Modell [20].

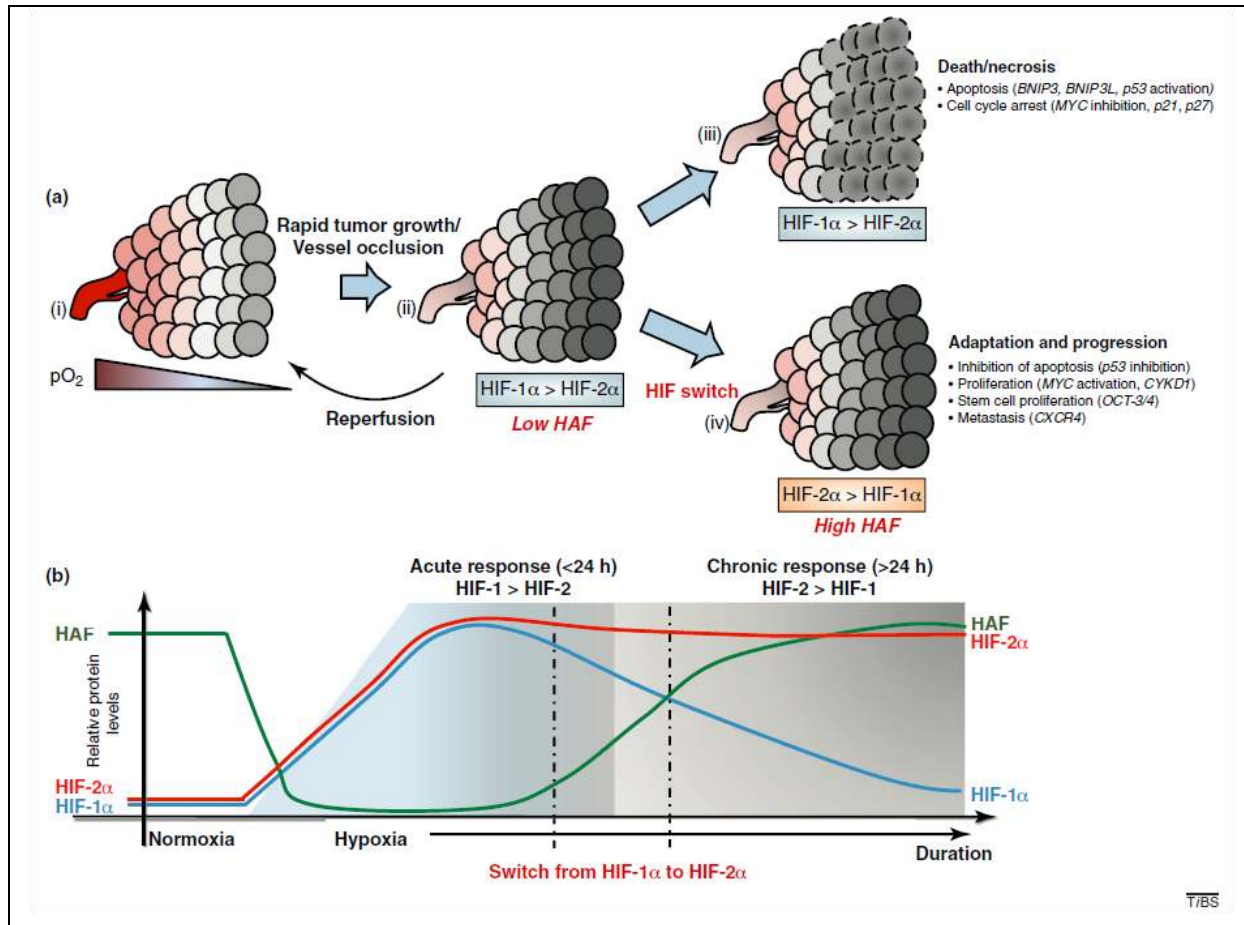


Abbildung 1-10 Die Rolle von HIF-1 und HIF-2 in der Tumorgnese und der Wechsel des Einflusses von HIF-1 auf HIF-2 mittels des Faktors HAF bei langanhaltender Hypoxie.

Durch die Proliferation der Tumorzellen wird das Diffusionslimit für Sauerstoff überschritten und es herrscht innerhalb des soliden Tumors Hypoxie. Als akute Antwort auf die Hypoxie werden die Faktoren HIF-1 und HIF-2 stabilisiert. HIF-1 induziert in Abhängigkeit von der veränderlichen Struktur des Tumors entweder die Vaskularisierung des Tumors oder den Tod der Zellen durch Apoptose oder Zellzyklusarrest. Bei anhaltender Hypoxie akkumuliert der Hypoxie-assoziierte Faktor HAF, welcher HIF-2 α stabilisiert und zu einem Wechsel des maßgeblichen Einflusses von HIF-1 zu HIF-2 führt. Die Stabilisierung von HIF-2 führt zu einer Adaptation des Tumors mit einer Inhibition der Apoptose, einer gesteigerten Proliferation, Metastasierung sowie Revaskularisierung [20].

Beim Übergang von einer akuten Hypoxie in eine chronische Hypoxie findet ein Wechsel des maßgeblichen Einflusses der hypoxischen Hauptregulatoren von HIF-1 auf HIF-2 statt. Bei einer akuten Hypoxie werden die Faktoren HIF-1 und HIF-2 stabilisiert, wobei HIF-1 entweder zur weiteren Vaskularisierung des Tumors führt oder den Tod der Zellen durch Apoptose oder Zellzyklusarrest auslöst. Dauert die Hypoxie über einen längeren Zeitraum an (>24h), erhöht sich die relative Menge des Hypoxie-assoziierten Faktors HAF, was zu einer verstärkten Stabilisierung von HIF-2 in Relation zu HIF-1 führt. Dadurch ist der Tumor in der Lage an die Hypoxie zu adaptieren, und es findet eine Inhibition der Apoptose, eine gesteigerte Proliferation, die Metastasierung und Revaskularisierung des Tumors statt [20].

Anhand der beiden vorangegangenen Kapitel wird deutlich, dass eine enge Verbindung zwischen Erkrankungen mit hypoxischen Erscheinungsbild und dem Prozess der Angiogenese herrscht. Gerade die Adaptation der Zellen an die Hypoxie fördert das Fortbestehen der chronischen Erkrankung wie z.B. im Falle der RA oder zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes wie z.B. im Falle von Tumorerkrankungen. Als Hauptregulatoren bei der Anpassung an die Hypoxie spielen HIF-1 und HIF-2 eine entscheidene Rolle und stehen daher im Fokus der medizinischen Forschung.

1.6. Ableitung der Fragestellung

Die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge, welche es Endothelzellen ermöglichen, sich den Bedingungen lokaler Hypoxie anzupassen und Angiogenese zu betreiben, bildet die Grundlage, um wirksame Strategien zur Behandlung von chronisch inflammatorischen Erkrankungen und Tumorerkrankungen zu entwickeln. Um ein Grundverständnis der Regulation der Angiogenese von Endothelzellen unter Hypoxie mittels HIF-1 und HIF-2 zu erlangen, sollten folgende Fragen im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden:

Welchen Einfluss hat der Faktor Hypoxie auf die Angiogenese und Bioenergetik von Endothelzellen in Form einer Änderung des Transkriptoms und des Proteinsekretionsprofils von Endothelzellen?

Welchen Einfluss haben die Faktoren HIF-1 und HIF-2 auf die Angiogenese und Bioenergetik von Endothelzellen in Form einer Änderung des Transkriptoms und des Proteinsekretionsprofils von Endothelzellen?

Inwiefern überschneiden sich die Funktionen von HIF-1 und HIF-2 in Hinblick auf Angiogenese und Bioenergetik von Endothelzellen?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 2-1 Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Herkunft/Vertrieb
HMEC-1 (CDC-Nummer: E-036-91/0)	Organismus: Homo sapiens Morphologie: „Kopfsteinpflaster“-förmig Herkunft: Vorhaut Zelltyp: Endothelzelle Erkrankung: --- Wachstum: adhärent	Center for Disease Control, Atlanta, USA
HEK293T (ATTC®-Nummer: CRL-11268™)	Organismus: Homo sapiens Morphologie: fibroblastisch Herkunft: Niere Zelltyp: Epithelzellen Erkrankung: Nierenzellkarzinom Wachstum: adhärent	LGC/ATCC Standards GmbH

Tabelle 2-2 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Spezies	Spezifikation	Herkunft/Vertrieb
TOP10 F	<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	chemisch kompetent	Invitrogen GmbH

2.1.2. Medien

Tabelle 2-3 Übersicht der in der Zellkultur verwendeten Medien und ihre Zusammensetzung

Produkt	Supplementierung	Herkunft/Vertrieb
Endothelial Basal Medium	5% (v/v) hitzeinaktiviertes Kälberserum 100U/ml Penicillin 100U/ml Streptomycin 1% (v/v) L-Glutamin (Stock 200mM) 0,01% (v/v) EGF (Stock 100µg/ml) 0,2% (v/v) Hydrocortison (Stock 380µM)	PAA Laboratories GmbH

2. Material und Methoden

Produkt	Supplementierung	Herkunft/Vertrieb
Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM GlutaMAX™	10% (v/v) hitzeinaktiviertes Kälberserum 100U/ml Penicillin 100U/ml Streptomycin 50mM β -Mercaptoethanol (2-ME)	Invitrogen GmbH

Tabelle 2-4 Übersicht der in der Mikrobiologie verwendeten Medien

Produkt	Herkunft/Vertrieb
Agar	Sigma Aldrich Chemie GmbH
LB Medium-Kapseln	MP Biochemicals
SOC-Medium	Sigma Aldrich Chemie GmbH

Für die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien wurde flüssiges LB (engl. lysogeny broth) Medium entsprechend der Herstellervorgabe angesetzt und vor Kultivierung bei 121°C für 20min autoklaviert. Zur Anzucht von *E. coli* Bakterien auf LB-Platten wurde dem Medium zuvor 1,5% Agar zugesetzt. Die Selektion transformierter *E. coli* erfolgte resistenzgenabhängig mittels dem LB-Medium zugesetzten Ampicillin (100 μ g/ml).

2.1.3. Plasmide und Vektoren

Tabelle 2-5 Übersicht der verwendeten Plasmide und Vektoren

Plasmide/Vektoren	Herkunft/Vertrieb
pLL3.7	Addgene, Inc.
psPAX2	Addgene, Inc.
pCL-VSVG	Addgene, Inc.
pLL3.7-scr	Karolina Tykwinska
pLL3.7-HIF-1 α -shRNA	Karolina Tykwinska
pLL3.7-HIF-2 α -shRNA	Martin Hahne

Tabelle 2-6 Übersicht der verwendeten Vektoren und der enthaltenen shRNA Oligonukleotidsequenzen

Vektoren	Enthaltene shRNA Oligonukleotidsequenz
pLL3.7-scr	5'-T gCTATCgAgAAgATCagCC TTCAAgAgA ggCTgATCTTCTTTAgC TTTTTC-3'

Vektoren	Enthaltene shRNA Oligonukleotidsequenz
pLL3.7-HIF-1 α -shRNA	5'-T CCgCTggAgACACAATCATAT TTCAAgAgA ATATgATTgTgTCTCCAgCgg TTTTTTC-3'
pLL3.7-HIF-2 α -shRNA	5'-T gCgCAAATgTACCCAATgATA TTCAAgAgA TATCATTgggTACATTTgCgC TTTTTTC-3'

antisense Sequenz (**fett** gedruckt), synthetisiert durch TIB MOLBIOL GmbH

2.1.4. Antikörper und Antikörperkonjugate

Tabelle 2-7 Übersicht der verwendeten Antikörper und Antikörperkonjugate

Antigen	Klon	Klonalität	Spezies/Isotyp	Konjugat	Herkunft/Vertrieb
hCD31	WM59	monoklonal	Maus IgG1	PE/Cy7	BioLegend, Inc.
hCD36	5-271	monoklonal	Maus IgG2a	APC	BioLegend, Inc.
hCD44	IM7	monoklonal	Maus IgG1	APC	BioLegend, Inc.
hCD54	HA58	monoklonal	Maus IgG1	Pacific Blue TM	BioLegend, Inc.
hHIF-1 α	54	monoklonal	Maus IgG1	-	BD Transduction Laboratories
hHIF-2 α	VEA01	polyklonal	Ziegen IgG	-	R&D Systems GmbH
β -Actin	AC-74	monoklonal	Maus IgG2a	-	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Lamin B	C-20	polyklonal	Ziegen IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Maus IgG	-	polyklonal	k.A.	HRP	Promega GmbH
Ziegen IgG	-	polyklonal	Esel IgG	HRP	Promega GmbH

2.1.5. Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 2-8 Übersicht der verwendeten synthetischen Oligonukleotide

Gen-symbol	Genname	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	MgCl ₂ [mM]	Produkt [bp]
<i>EF1A</i>	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	gTTgATATggTT CCTggCAAgC	TTgCCAgCTCC AgCAGCCT	3	146
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-P- Dehydrogenase	AATgACCCCTT CATTgAC	TCCACgACgTA CTCAGcGc	3	191

2. Material und Methoden

Gen-symbol	Genname	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	MgCl ₂ [mM]	Produkt [bp]
<i>GLUT1</i> (<i>SLC2A1</i>)	Glucosetransporter-1	ACgCTCTgATC CCTCTCAgT	gCAgTACACAC CgATgATgAAg	4	213
<i>HIF1A</i>	Hypoxia-inducible factor-1 α	CCATTAgAAAg CAgTTCCgC	TgggTAggAgAT ggAgATgC	4	194
<i>HIF2A</i> (<i>EPAS1</i>)	Hypoxia-inducible factor-2 α	ACATCAgCAAg TTCATgggAC	TCaggTTCTCA CgAATCTCCTC	4	102
<i>IL8</i>	Interleukin 8	GgACCCCAAgg AAAACtgg	CAACCCTACA ACAgACCCAC AC	3	173
<i>LDHA</i>	Lactat-Dehy drogenase A	ACCCAgTTTCC ACCATgATT	CCCAAATgCA AggAACACT	5	76
<i>PGK1</i>	Phosphoglycerat- Kinase1	ATggATgAggTg gTgAAAgC	CAgTgCTCACA TggCTgACT	4	118
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	AgCCTTgCCTTg CTgCTCTA	gTgCTggCCTTg gTgAgg	5	318
pLL	pLL3.7 Multiple Cloning site	CAgCACAAAAG gAAAACtCACC	ggCggTAATACg gTTATCCA	-	-

synthetisiert durch TIB MOLBIOL GmbH

2.1.6. Antibiotika, Chemikalien, Enzyme und Molgewichtstandards

Tabelle 2-9 Übersicht der verwendeten Chemikalien und Enzyme

Substanz	Herkunft/Vertrieb
2-ME / β -Mercaptoethanol	SERVA Electrophoresis GmbH
5x Sequenzierungspuffer	Applied Biosystems, Inc.
6x Loading Dye	Fermentas GmbH
10x Annealing Buffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH
10x PCR Puffer	Fermentas GmbH
10x RT-PCR Puffer	QIAGEN GmbH
Accutase	PAA Laboratories GmbH
Acrylamid Mix	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose	Invitrogen GmbH

Substanz	Herkunft/Vertrieb
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Aqua dest.	DRFZ
ATP	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Big Dye	Applied Biosystems, Inc
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG
dNTP Mix	Invitrogen GmbH
Endothelial Growth Factor (EGF)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ethidiumbromid	Merck KGaA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Flebogamma, 50mg/ml	Grifols Deutschland GmbH
Gelatine	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hydrocortison	Sigma Aldrich Chemie GmbH
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Magermilchpulver	AppliChem GmbH
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Matrigel TM	BD Transduction Laboratories
Methanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
N,N-bis(hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Oligo dT-Primer	TIB MOLBIOL GmbH
Phosphatase Inhibitor	Cell Signaling Technology, Inc.
Polybren	Sigma Aldrich Chemie GmbH

2. Material und Methoden

Substanz	Herkunft/Vertrieb
Protease Inhibitor	Cell Signaling Technology, Inc.
Random Hexamere	TIB MOLBIOL GmbH
RNase Inhibitor	QIAGEN GmbH
Sensiscript Reverse Transkriptase	QIAGEN GmbH
Shrimp alkaline phosphatase (SAP)	Fermentas GmbH
T4 DNA Ligase	Fermentas GmbH
T4 DNA Ligase Puffer	Fermentas GmbH
T4 Polynukleotid Kinase (PNK)	Promega GmbH
T4 Polynukleotid Kinase (PNK) Puffer	Promega GmbH
Tango-Puffer	Fermentas GmbH
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypanblau (0,04%ige Lsg.)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH

Tabelle 2-10 Übersicht der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Herkunft/Vertrieb
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Penicillin	PAA Laboratories GmbH
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH

Tabelle 2-11 Übersicht der verwendeten Molgewichtstandards

Spezifität	Produkt	Herkunft/Vertrieb
DNA	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH
DNA	O'GeneRuler Ladder Mix	Fermentas GmbH
Protein	Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH

Tabelle 2-12 Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme

Produkt	Herkunft/Vertrieb
KspAI (HpaI)	Fermentas GmbH
XhoI	Fermentas GmbH

2.1.7. Lösungen, Puffer und Kits

Tabelle 2-13 Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer sowie deren Zusammensetzung

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
6x SDS-Lyse-Puffer (Laemmli-Puffer)	1% (w/v) Bromphenolblau, 35% (v/v) Glycerin, 2,5ml β -Mercaptoethanol, 1,5g SDS, 1M Tris, (pH 6,8)
10x SDS Lauf-Puffer pH 8,3	260mM Tris, 1,9M Glycin, 1% (w/v) SDS
10x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer, pH 8,5	0,4M Tris, 0,01M EDTA- Na_2 -Salz, 0,2M Essigsäure
10x Transfer-Puffer, pH 8,1 – 8,4	250 mM Tris, 1,5M Glycin 1-fach Puffer + 10% (v/v) Methanol
BES-Transfektions-Puffer, pH 6,95	50mM BES, 0,28M NaCl, 1,5mM Na_2HPO_4
Block-Puffer	TBS-T + 5% (w/v) Magermilchpulver
PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,6	80mM Na_2HPO_4 , 19mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100mM NaCl, (pH 7,6)
PBS/BSA	PBS + 0,5% (w/v) BSA
TBS (Tris Buffered Saline), pH 6,8	150mM NaCl, 10mM Tris-HCl
TBS-T	TBS + 0,1% (v/v) Tween 20

Tabelle 2-14 Übersicht der verwendeten kommerziell erhältlichen Kits und Testsysteme

Kit	Herkunft/Vertrieb
ApoGlow [®] Assay Kit	Lonza Rockland, Inc.
Bio-Plex Pro Cytokine 27-Plex Panel Human Group I + MIF	Bio-Rad Laboratories GmbH
FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Nuclear Extract Kit	Active Motif
NucleoBond [®] Xtra Midi	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin Extract II [®]	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin Plasmid II [®]	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
RNase-freies DNase-Set	QIAGEN GmbH
RNeasy [®] Mini Kit	QIAGEN GmbH
Sensiscript RT Kit	QIAGEN GmbH

2. Material und Methoden

Kit	Herkunft/Vertrieb
Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer
Whole Human Genome Oligo Microarray 8x60K	Agilent

2.1.8. Geräte und sonstige Materialien

Tabelle 2-15 Übersicht der verwendeten Geräte

Geräte	Herkunft/Vertrieb
Bioanalyzer	Agilent
Biofuge fresco	Heraeus
Bioplex Suspension Array System	Bio-Rad Laboratories GmbH
CO ₂ Brutschrank	Binder GmbH
FACS Calibur™	BD Bioscience GmbH
FACS Sorter, FACS Diva™	BD Bioscience GmbH
Feinwaage R300S	Santorius Research
Geldokumentationsanlage	Hama GmbH & Co. KG
Glomax Integrated Luciferase Technologies	Promega GmbH
Image Picture Computer	Cybertech
Labofuge 400R	Heraeus
LAS3000	FUJIFILM®
Leica EC3	Leica Microsystems GmbH
MACS™ Mix	Miltenyi Biotec
MACSQuant Analyzer	Miltenyi Biotec
Magnetrührer	Typ Ikamag Reo
Mikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems GmbH
Mini-Protean II electrophoresis cell-Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH
MultiScreen vacuum manifold	Millipore GmbH
MxPro™ 3000 realtime PCR System	Stratagene
N ₂ /O ₂ /CO ₂ Brutschrank	Binder GmbH
ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop
PCR-Cycler Mastercycler Gradient	Eppendorf GmbH
Pipettus®-akku	Hirschmann Laborgeräte

Geräte	Herkunft/Vertrieb
Pipetten (10, 100, 200, 1000µl)	Eppendorf GmbH, Thermo Scientific
PowerPack 200	Bio-Rad Laboratories GmbH
Rotationsschüttler TH25	Edmund Bühler
Sequencer ABI PRISM 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Inc.
Sterilbank	HeraSafe Heraeus
Thermomixer Comfort	Eppendorf GmbH
UV-Lampe	Bioblock Scientific
UV-Tisch	Vilber Laurmat
Vortex REAX2000	Heidolph
Waage FA-55001	Faust

Tabelle 2-16 Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Materialien	Herkunft/Vertrieb
0,2µM Filter Preseparation Filter	Miltenyi Biotech GmbH
13ml Bakterienkultur-Röhrchen	Sarstedt AG & Co.
1,5ml Reaktionsgefäße	Eppendorf GmbH
15ml PP-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH
25cm ² (T25) Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH
5ml FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & Co.
5, 10, 20ml Einwegpipetten	Techno Plastic Products AG
50ml PP-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH
6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH
75cm ² (T75) Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH
Cell Scraper, diverse Größen	Sarstedt AG & Co.
Einmalspritzen Norm-Ject®	Henke-Sass, Wolf GmbH
Einweghandschuhe	Kimberly-Clark Worldwide, Inc.
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio- One GmbH
MultiScreen Filter Mikrotiterplatte (96-Loch)	Millipore GmbH
Neubauer-Zählkammer	VEB Jenoptic
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore GmbH
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH

2.1.9. Software

Tabelle 2-17 Übersicht der verwendeten Software und Webpages

Software/WWW	Herkunft/Vertrieb
Adobe® Photoshop® CS Version 8.0.1.	Adobe Systems Inc.
Adobe® Acrobat® Version 6.0	Adobe Systems Inc.
Bioplex Manager Version 4.0	Bio-Rad Laboratories GmbH
Endnote® X3	Thomson Reuters
FlowJo® Version 7.6.5	Tree Star, Inc.
GENtle Version 1.8.1	Magnus Manske
Genome Browser	http://genome.ucsc.edu
GraphPad® Prism Version 5.0	GraphPad Software
Heatmap Builder	http://www.chibi.ubc.ca/matrix2png/bin/matrix2png.cgi
Image Reader LAS3000	FUJIFILM®
ImageJ 1.43u	National Institute of Health NIH
Leica Application Suite	Leica Microsystems GmbH
Microsoft® Office Professional 2007	Microsoft GmbH
MxPro™ QPCR Software v4.1.	Stratagene
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/
SOFTmax ProV 5.0	Molecular Devices

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Molekularbiologisch wird das Verfahren der Transformation als das Einschleusen freier fremder DNA in ein kompetentes Bakterium definiert. Hierfür wurden 50µl der chemisch kompetenten Bakterien vom *E. coli* Stamm Top10 F mit ca. 10ng Plasmid-DNA in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vereint und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30s bei 42°C und das Abkühlen des Ansatzes auf Eis für 2min. Im nächsten Schritt wurden 250µl SOC-Medium hinzugegeben und es folgte eine liegende Inkubation auf dem Rotationsschüttler (200rpm) für 30min bei 37°C. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf bei 37°C vorgewärmten LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.2. Kultivierung chemisch kompetenter *E. coli*

Die Kultivierung der einzelnen von den LB-Platten gepickten Klone transformierter *E. coli* Top10 F erfolgte in 3ml LB-Medium mit Zusatz von 0,1mg/ml Ampicillin. Für die Mini-Plasmid-Präparation mittels NucleoSpin Plasmid II®-Kit erfolgte eine Kultivierung bei 37°C über Nacht auf einem Rotationsschüttler (200rpm). Für die Durchführung einer Midi-Plasmid-Präparation mittels NucleoBond® Xtra Midi-Kit wurde eine Vorkultur mit 3ml LB-Medium mit Zusatz von 0,1mg/ml Ampicillin angelegt und für 6h inkubiert. Anschließend wurden 200µl der Vorkultur entnommen und in 200ml Ampicillin-haltigem LB-Medium für weitere 16h bei 37°C auf einem Rotationsschüttler (200rpm) inkubiert.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

Die zellbiologischen Arbeiten mit den verwendeten Zelllinien HMEC-1 und HEK293T wurden unter Benutzung einer Sterilwerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Die Herstellung der in der Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen fand ebenfalls unter sterilen Bedingungen statt. Die Inkubation der Zellen wurde für die Kultivierung unter Normoxie in einem CO₂-Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 18% O₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) und für die Kultivierung unter Hypoxie in einem N₂-Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 1±0,5% O₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt.

2.2.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um zu gewährleisten, dass durch die Erhöhung der Passagezahl der verwendeten Zelllinien kein Einfluss auf die gemessenen Parameter hervorgerufen wird, wurden gewonnene positiv transduzierte Zellen einer Passage zur Langzeiterhaltung weggefroren und bei Bedarf für weitere Experimente wieder aufgetaut. Dazu wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml Einfriermedium (FKS + 10% DMSO) in Kryo-Röhrchen aufgenommen und schrittweise von -20°C auf -80°C abgekühlt und schließlich bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur erneuten Verwendung der kryokonservierten Zellen wurde ein Aliquot aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, auf Eis gehalten und schonend aufgetaut. Direkt nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 1ml voll supplementiertem Medium versetzt und in einer T25 Zellkulturflasche mit 5ml Medium expandiert. Nach erfolgter Expansion wurden die Zellen in eine T75 Zellkulturflasche überführt und weiterkultiviert.

2.2.2.2. Kultivierung von adhärennten Zellen

2.2.2.2.1. Kultivierung von HMEC-1 Zellen

Die Zelllinie HMEC-1 (Human microvascular endothelial cell) wurde 1992 vom Center for Disease Control (CDC) in Atlanta, USA generiert. Es handelt sich um eine adhärennt wachsende Zelllinie, welche durch Transfektion humaner, dermaler, mikrovaskulärer Endothelzellen mit dem Plasmid PBR-322 hergestellt wurde. Das Plasmid verfügt über eine kodierende Region des Simian Virus 40A Genprodukts, dem „large T antigen“, welches zur Immortalisierung der Zellen beiträgt [58]. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in mit 0,2% Gelatine beschichteten T25 oder T75 Zellkulturflaschen mit Filter in voll supplementiertem Endothelial Basal Medium (siehe Kapitel 2.1.2). Das Beschichten der Zellkulturflaschen ermöglicht ein schonendes Passagieren der Zellen, da diese auf der Gelatine adhärennt wachsen und das Ablösen der Zellen über die Trypsinbehandlung der Gelatineschicht erfolgt. Für die Trypsinierung wurde das Medium entfernt und nach einem Waschschrift mit PBS 1ml Trypsin/EDTA gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Trypsin wirkt als Enzym, welches die Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet und so die Bindung der Zellen an der Materialoberfläche vermindert bzw. bei mit Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen die Gelatine proteolytisch spaltet. Unterstützend wirkt EDTA als Komplexbildner, der besonders stabile Chelatkomplexe mit zwei- und dreiwertigen Kationen bildet, welche oftmals der

Stabilisierung von Membranproteinen dienen. Nach einer Inkubation für ca. 5min bei 37°C lösen sich die Zellen von der Oberfläche und die Reaktion wurde durch Zugabe von 10ml voll supplementiertem Endothelial Basal Medium (EBM) abgestoppt. Zur Weiterkultivierung wurden davon 2ml Zellsuspension abgenommen und in eine neue T75 Zellkulturflasche mit bereits vorgelegten 10ml voll supplementiertem EBM überführt und wie unter Kapitel 2.2.2. beschrieben unter Normoxie kultiviert.

2.2.2.2. Kultivierung von HEK293T Zellen

HEK293T (Human Embryonic Kidney) Zellen sind adhärent wachsende Zellen. Die HEK293T Zelllinie wurde durch Transformation einer menschlichen Nierenzelle mit dem SV40 T-Antigen hergestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T75 Zellkulturflaschen mit Filter in DMEM-Medium (siehe Kapitel 2.1.2). Für das Passagieren der adhärenenten HEK293T Zellen ist ebenfalls ein Trypsinierungsschritt notwendig. Hierfür wurde das DMEM Medium entfernt und nach einem Waschschrift mit PBS 1ml Trypsin/EDTA gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Nach Inkubation der Zellen für 5min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10ml DMEM abgestoppt. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen bei 328g für 8min und das Pellet wurde in 20ml DMEM resuspendiert und im Verhältnis 1 zu 5 in einer T75 Zellkulturflasche mit 16ml vorgelegtem DMEM weiterkultiviert.

2.2.2.3. Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Für die durchgeführten Experimente war es nötig, zu Beginn der Experimente eine definierte Zellzahl auszusäen. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop die Anzahl an Zellen in den 4 Großquadraten bestimmt. Die Zellzahl pro Milliliter ergab sich anhand des Kammerfaktors 10^4 mittels folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{ermittelte Zellzahl} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4}{\text{Anzahl Großquadrate}}$$

2.2.2.4. Durchführung eines 2D-Angiogenese Assays

Für die Durchführung eines 2D-Angiogenese Assays wurden 24-Loch-Mikrotiterplatten verwendet, welche zuvor jeweils mit 50µl MatrigelTM und voll supplementiertem EBM im Verhältnis 4 zu 1 beschichtet wurden. Nach einstündiger Beschichtung der Mikrotiterplatte

mit Matrigel™ wurden jeweils 20000 Zellen pro Loch in einem Milliliter voll supplementiertem EBM ausgesät und für 20h unter Normoxie und Hypoxie (siehe Kapitel 2.1.2.) inkubiert.

Die Auswertung der Angiogenese erfolgte mittels Mikroskopie und fotografischer Aufnahme nach dem unten abgebildeten Schema (Abbildung 2-1). Hierbei wurden pro Loch jeweils 5 Fotos in 100-facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend wurden die Fotos hinsichtlich der Länge der gebildeten Tubuli und der Anzahl der Verzweigungen mit dem Programm ImageJ 1.43u ausgewertet. Die Länge der gebildeten Tubuli wurde hierbei in relativen Längeneinheiten (RLE) ermittelt und stellt eine reproduzierbare Größe dar, da in jedem Assay dasselbe Mikroskop, dieselbe Kamera und dieselbe Vergrößerung gewählt worden.

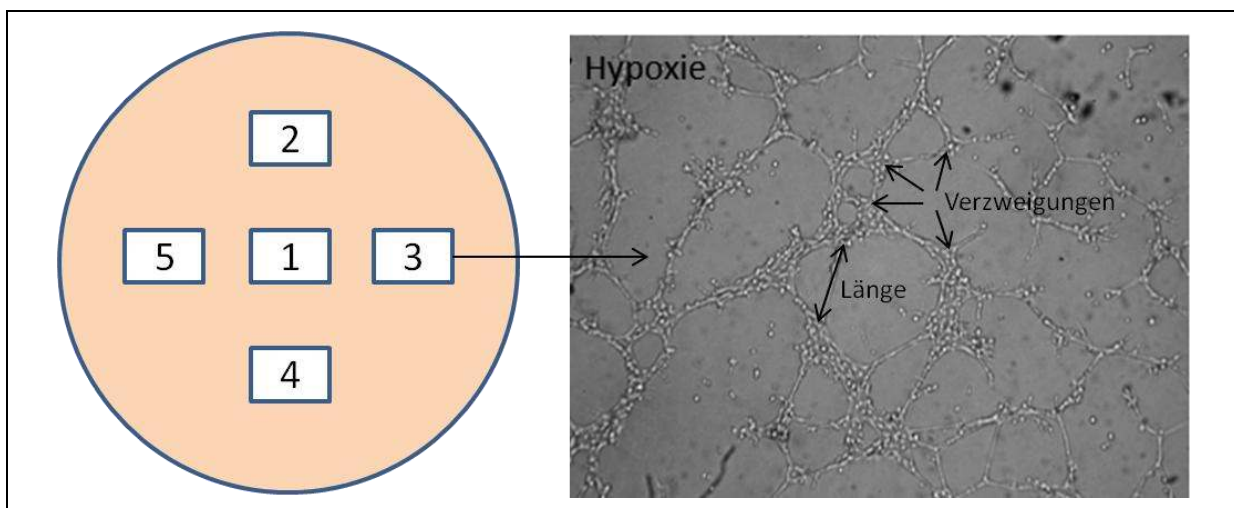


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung der Auswertung eines 2D-Angiogenese Assays.

Nach Inkubation der Zellen werden pro Loch 5 fotografische Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung angefertigt. Die Fotos werden mit Hilfe des Programmes ImageJ hinsichtlich der Länge der gebildeten Tubuli sowie der Anzahl der gebildeten Verzweigungen untersucht.

2.2.2.5. Transfektion und Transduktion von Zelllinien

Für die Durchführung der Versuche in HMEC-1 Zellen mit einem Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α war es zuvor nötig, mittels Transfektion von HEK293T Zellen Virenpartikel herzustellen, welche dann durch virale Transduktion das shRNA tragende Plasmid pLL3.7 in HMEC-1 Zellen einschleusen.

2.2.2.5.1. Transfektion von HEK293T Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation zur Herstellung von Virenpartikeln

Für die Transfektion von HEK293T Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation wurden 24h vor der Transfektion 6 Millionen HEK293T Zellen in einer 10cm Zellkulturschale ausgesät. Die zu transfizierenden Plasmide (shRNA-Expressionsplasmid für scrambled shRNA oder HIF-1 α shRNA oder HIF-2 α shRNA, Verpackungsplasmid psPAX2, Envelope-Plasmid pCL-VSVG) wurden in einer Gesamtmenge von 30 μ g in einem Verhältnis von 3:2:1 in einem FACS-Röhrchen vereint und mit destilliertem Wasser auf 790 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden 200 μ l 1,25M Calciumchlorid hinzupipettiert und unter Lufteinstrom 1ml BES-Puffer tröpfchenweise in die Lösung gegeben. Die entstandene Lösung bildete Präzipitate aus, welche tropfenweise auf die ausgesäten Zellen gegeben worden. Nach einer Inkubation von 4h im Normoxie-Brutschrank wurde das DMEM Medium erneuert und überschüssiges Präzipitat entfernt. Die Zellen wurden anschließend für 48-72h im Normoxie-Brutschrank inkubiert. Es folgte die Abnahme der Virenpartikel mit Hilfe einer Spritze und eines Filters (0,2 μ m), um vorhandene Zelltrümmer und HEK293T Zellen aus dem Virusüberstand herauszufiltrieren. Die Transfektionseffizienz wurde mittels FACS Calibur anhand der GFP Expression des pLL3.7 Plasmids in den transfizierten HEK293T Zellen bestimmt. Die gewonnenen Virenüberstände wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.5.2. Transduktion von HMEC-1 Zellen

Wie in Kapitel 2.2.2.5.1. beschrieben wurden durch Transfektion von HEK293T Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation Virenüberstände gewonnen, die für die lentivirale Transduktion von HMEC-1 Zellen genutzt werden können. Das lentivirale Expressionssystem besteht dabei aus drei Komponenten:

- a) pLL3.7 dient als Expressionsplasmid und enthält das beim späteren Virusaufbau einzuschließende Material mit Transgen, welches u.a. eine Expressionskassette mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) als Positivmarker sowie die jeweilige shRNA-Expressionskassette (scr, HIF-1 α , HIF-2 α) enthält. Außerdem wird hier die Verpackungsinformation kodiert, welche es ermöglicht, dass die neu produzierten Viruspartikel mit RNA gefüllt werden.

- b) pCL-VSVG ist das Envelope-Plasmid und trägt die Information über das Hüllprotein, von welchem das Wirtsspektrum abhängig ist.
- c) psPAX2 liefert die Information für alle notwendigen viralen Bausteine, auf denen der korrekte Virusaufbau basiert.

Für die virale Transduktion von HMEC-1 Zellen wurden 750000 Zellen pro Loch einer 24-Lochplatte in 1ml voll supplementiertem EBM ausgesät und über Nacht ruhen gelassen. Für die darauffolgende Transduktion wurden die entsprechenden Virenüberstände mit 10µg/ml Polybren versetzt und 1ml Virenüberstand pro Loch auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen mit den Virenüberständen in der 24-Lochplatte bei 700g und 37°C für 2h. Danach wurden die Zellen für weitere 2h bei 37°C im Normoxie-Brutschrank inkubiert und darauf folgend der virenhaltige Überstand entfernt und durch 1ml voll supplementiertes EBM ersetzt. Nach 72-96h Inkubation im Normoxie-Brutschrank wurde die erfolgreiche Transduktion anhand der GFP Co-Expression des shRNA-Konstrukts nachgewiesen. Um die Reinheit der shRNA-Konstrukt tragenden Zellen auf über 90% zu erhöhen, wurden die transduzierten HMEC-1 Zellen über die Co-Expression von GFP im FACS Diva durchflusszytometrisch sortiert. Die Frequenz an shRNA-Konstrukt tragenden HMEC-1 Zellen wurde dabei vor Durchführung weiterer Experimente nochmals durch eine durchflusszytometrische Kontrolle der GFP Expression am FACS Calibur ermittelt, um sicherzustellen, dass beobachtete Effekte durch den Knockdown des jeweiligen Faktors zustandekommen.

2.2.2.6. Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS)

Im Kapitel 2.2.2.5.1 und 2.2.2.5.2 wurde die Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS) angewandt, um die Co-Expression von GFP in HEK293T und HMEC-1 Zellen nachzuweisen. Bei der FACS-Analyse handelt es sich um eine Form der Durchflusszytometrie, bei der Zellen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften (Größe, Granularität) sowie mittels des Fluoreszenznachweises gefärbter Merkmale (Cluster of Differentiation CD, Transkriptionsfaktoren, Zytokine, GFP) identifiziert und charakterisiert werden können. Dabei wird die Zellsuspension durch eine Kapillare gesaugt und die Zellen werden mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt. In der Flusszelle passieren die Zellen einen Laserstrahl, wobei sie das Licht streuen. Dabei korreliert die Menge des gestreuten Lichts mit

der Größe der Zelle und mit ihrer Granularität. Genauer ist das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ein Maß für die Beugung des Lichts und hängt von der Größe der Zelle ab. Das gemessene Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward Scatter*) hingegen ist ein Maß für die Brechung des Lichts, welche hauptsächlich von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur des Zellkerns und der Menge der enthaltenen Vesikel der Zelle beeinflusst wird. Auf diese Weise ermöglichen FSC und SSC eine erste morphologische Identifikation und Charakterisierung der Zellen. Darüber hinaus können die Zellen z.B. in unserem Fall durch die Expression von GFP als shRNA-Konstrukt tragend identifiziert werden. Auch das Anfärben von Oberflächenmolekülen mittels spezifischer gegen das jeweilige Epitop gerichteter und gelabelter Antikörper ist möglich. In dieser Arbeit wurden die Oberflächenmoleküle CD31, CD36, CD44 und CD54 auf diese Weise nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden die HMEC-1 Zellen (350000 Zellen pro Ansatz) wie in Kapitel 2.2.2.2.1 beschrieben nach Kultivierung abgelöst, einmal mit PBS/BSA gewaschen und für 15min mit 100µl Flebogamma (1:10 in PBS/BSA verdünnt) geblockt. Anschließend folgten ein Waschschrift mit PBS/BSA und die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern für 15min bei 4°C im Dunkeln. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen im MACSQuant Analyzer oder im FACS Calibur. Die erhaltenen Daten wurden im Anschluss mit FlowJo 7.6.5 ausgewertet.

2.2.3. Biochemische und molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA- und DNA-Methoden

2.2.3.1.1. Klonierung des pLL3.7 Vektors mit HIF-2 α -shRNA-Insert

a. Annealing der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide mit den shRNA Sequenzen für HIF-1 α , HIF-2 α und scr wurden von der Firma TIB MOLBIOL synthetisiert. Die Klonierung des Vektors mit HIF-1 α -shRNA-Insert sowie scr-shRNA-Insert wurde von Karolina Tykwinska (AG Buttgerit, Charité Berlin) durchgeführt. Für die Klonierung des Vektors pLL3.7 mit HIF-2 α -shRNA-Insert war es zunächst nötig, die gelieferten HIF-2 α -shRNA-Oligonukleotide mit destilliertem Wasser in einer Konzentration von 100µM zu lösen. Anschließend fand ein Annealing der *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide statt um doppelsträngige Moleküle zu erzeugen. Die

Annealing-Reaktion fand mit Zusatz von Annealing-Puffer in einem Thermocycler statt und beinhaltete einen 5minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C und darauf folgend ein langsames Abkühlen mit einer Rampengeschwindigkeit von 0,03K/s auf 4°C.

Um die so gewonnenen Inserts erfolgreich in einen geschnittenen Vektor klonieren zu können, ist eine Phosphorylierung des Inserts an der 5'-Hydroxylgruppe notwendig. Die Phosphorylierung, erfolgt mit einer 1:25 Verdünnung des Annealingansatzes in Anwesenheit von einer T4 Polynukleotidkinase (PNK), 10mM ATP sowie PNK-Puffer und einer Inkubation für 30min bei 37°C gefolgt von einer zehnminütigen Inkubation bei 70°C im Thermocycler.

b. Restriktion und Aufreinigung von pLL3.7

Für die Klonierung des wie in Kapitel 2.2.3.1.1.a beschrieben gewonnenen Inserts in pLL3.7 ist die Restriktion des Plasmids notwendig. Dazu fand eine Restriktion in Tango-Puffer mit den Enzymen KspAI und XhoI bei 37°C für eine Stunde statt. Die anschließende Zugabe einer Alkalischen Phosphatase (SAP) führt zu einer Dephosphorylierung des geschnittenen Plasmids und verhindert so die Religation. Die Aufreinigung des geschnittenen pLL3.7 erfolgte in einem 1% Agarosegel und nach den Herstellerangaben mittels NucleoSpin Extract II® Kit von Macherey-Nagel.

c. Ligation von Vektor und Insert sowie Nachweis positiver Klone mittels PCR und Sequenzierung

Der aufgereinigte linearisierte Vektor und das gewonnene phosphorylierte Insert konnten im Anschluss ligiert werden. Zu diesem Zweck wurde mittels T4 DNA Ligase unter Anwesenheit des Co-Faktors ATP die Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'- Phosphatgruppe des Inserts mit der 3'- OH-Gruppe des Vektors geschlossen. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht bei 16°C, wobei das verwendete Verhältnis von Vektor/Insert 1:10 nach Molgewicht betrug. Im Anschluss konnte von diesem Ansatz ausgehend eine Transformation (siehe 2.2.1.1) in *E.coli* Top10 F durchgeführt werden. Der Nachweis positiver Klone gelang durch das Picken mehrerer Klone von der entsprechenden LB-Platte und der Durchführung einer Kolonie-PCR, wobei das zu erwartende PCR-Produkt

289bp (korrekte Insertion) bzw. 239bp (ohne Insert) umfasste. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm sind in Tabelle 2-18 und Tabelle 2-19 aufgelistet.

Tabelle 2-18 Übersicht des PCR-Ansatzes zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung

Substanz	Menge [μ l]
Aqua dest.	10
10x PCR Puffer	2
MgCl ₂ (25mM)	1
dNTPs (je 25 μ M)	0,2
Taq Polymerase (Rapidozym)	0,5
Primer pLL forward	2
Primer pLL reverse	2
Template (gepickter Klon in Aqua dest.)	2,3

Tabelle 2-19 Übersicht des PCR-Programmes zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	Anzahl Wiederholungen
95	3min	-
95	20s	40x
60	15s	
72	30s	
72	10min	
4	∞	

Neben dem Nachweis der korrekten Größe des PCR-Produktes des Vektors mit Insert erfolgte eine abschließende Sequenzierung zum Nachweis eines fehlerfreien Einbaus des Inserts. Hier kam die leicht abgewandelte Sanger-Methode, das *Cyclesequencing* (mit der Anwendung thermostabiler DNA-Polymerasen), zum Einsatz. Zu diesem Zweck wurde der pLL3.7 forward Primer als Sequenzierungsprimer verwendet und neben den unmarkierten dNTPs auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide hinzugemischt, wobei jedes Didesoxynukleotid mit einem unterschiedlichen Farbstoff markiert ist. Das führt dazu, dass beim Einbau eines solchen Nukleotids die Reaktion abgebrochen wird, da die Markierung über die 3'OH-Gruppe erfolgt und diese so für den zu synthetisierenden Strang nicht mehr für den nächsten Schritt zur Verfügung steht. Man erhält letztendlich ein Gemisch von

2. Material und Methoden

unterschiedlich markierten DNA-Fragmenten mit verschiedenen Längen. Nach Aufreinigung der erhaltenen PCR-Produkte mittels Ethanolfällung wurde das gewonnene Gemisch der *Cyclesequencing*-Reaktion über Elektrophorese getrennt. Dies ermöglichte eine Erfassung der Fluoreszenzsignale, also die Identifikation des eingebauten Didesoxynukleotids, in Zusammenhang mit der Position innerhalb der Sequenz anhand der in der Elektrophorese ermittelten Länge. Die Auswertung und die Übersetzung in die Nukleotidsequenz erfolgten dabei mittels GENTle-Software (Abbildung 2-2). Die nachfolgende Tabelle 2-20 und Tabelle 2-21 zeigen den Standard Sequenzierungs-PCR-Ansatz sowie das verwendete Programm.

Tabelle 2-20 Übersicht des PCR-Ansatzes zur Sequenzierung des inklonierten Inserts

Substanz	Menge [μ l]
Aqua dest.	4,5
5x Sequenzierungspuffer	2
Big Dye	1
Primer pLL forward (3-5pmol)	0,5
Template (200-300ng)	2

Tabelle 2-21 Übersicht des PCR-Programmes zur Sequenzierung des inklonierten Inserts

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	Anzahl Wiederholungen
95	10s	35x
45	5s	
60	4min	
4	∞	

Die Sequenzierungsreaktion ermöglichte den Nachweis einer zu 100% übereinstimmenden Sequenz der klonierten shRNA mit der ursprünglichen HIF-2 α -shRNA Oligonukleotidsequenz (Abbildung 2-2).

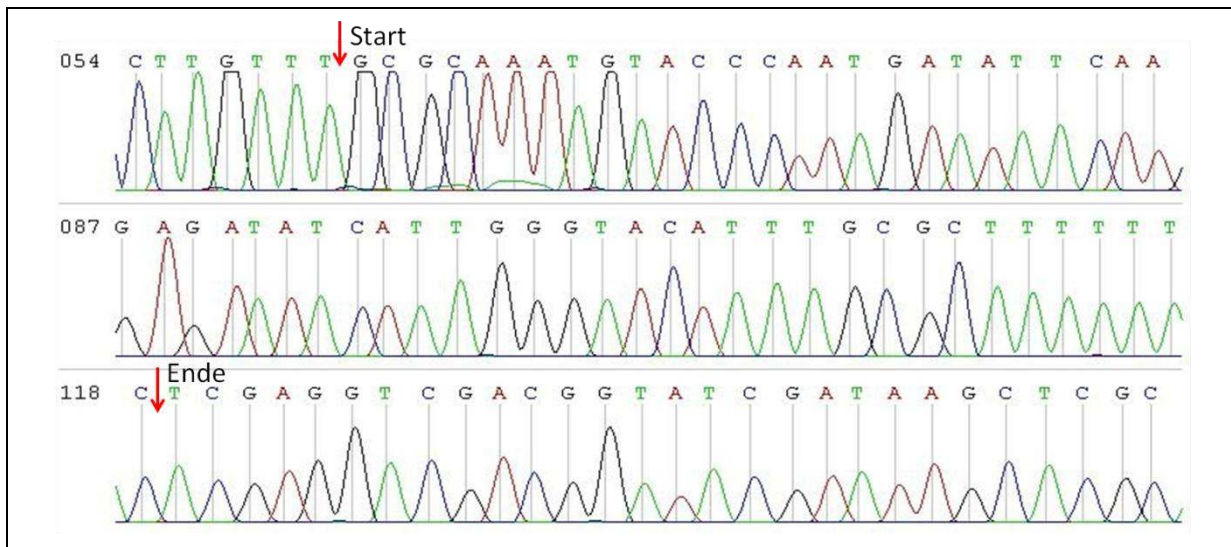


Abbildung 2-2 Nachweis der korrekten Klonierung der HIF-2 α -shRNA mittels *Cyclesequencing*.

Die Auswertung des Cyclesequencing mittels GENTle-Software zeigt beispielhaft die einhundertprozentige Übereinstimmung der Sequenz des klonierten Fragments und der ursprünglichen HIF-2 α -shRNA Oligonukleotidsequenz.

2.2.3.1.2. Isolation von Plasmid-DNA

Für die Plasmid-DNA-Gewinnung in einem großen Maßstab wurden wie im Kapitel 2.2.1.2 beschrieben transformierte *E. coli* in 200ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin expandiert und nach Inkubation bei 6000g für 10min pelletiert. Für die Isolation der Plasmid-DNA wurde nach Verwerfen des Überstands der NucleoBond® Xtra Midi-Kit (Macherey-Nagel) entsprechend der Herstellerangaben verwendet und die isolierte Plasmid-DNA mit destilliertem Wasser eluiert. Da die isolierten Plasmide in der Zellkultur Anwendung fanden, wurden die Plasmide mittels NucleoBond® Finalizer (Macherey-Nagel) entsprechend der Herstellerangaben von Endotoxinen befreit. Anschließend wurde die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA am ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) ermittelt.

2.2.3.1.3. Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentration

Für die Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentrationen macht man sich die Absorptionseigenschaften der aromatischen Ringsysteme der Basen von Nukleinsäuren mit einem Absorptionsmaximum bei 260nm zu Nutze. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die gemessene Absorption dabei proportional zur RNA-/DNA-Konzentration. Die Konzentrationsbestimmungen wurden mittels ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) vorgenommen, wobei 1,3 μ l der Proben unverdünnt auf die Messzelle aufgetragen wurden.

2.2.3.1.4. Isolation von Total-RNA

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur Genexpression wurden jeweils 350000 HMEC-1 Zellen pro Kondition ausgesät. Aus diesem Ansatz erfolgte die RNA-Isolation mittels RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) entsprechend der jeweiligen Herstellerangaben inklusive eines DNA-Verdaus während der Isolation mit Hilfe von RNase-freier DNase I (QIAGEN). Für Genexpressionsanalysen mittels Microarray wurde die Konzentration der Total-RNA am NanoDrop ermittelt und mittels LabChip® Technologie auf dem Bioanalyzer (Agilent) hinsichtlich der rRNA Ratio [28S/18S], als Maß für die RNA Qualität, analysiert. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben an der DRFZ Core Facility Geneexpression. Total-RNA mit einer rRNA Ratio [28S/18S] im Bereich von 1,7-2,1 wurde für die Durchführung eines Microarrays durch Miltenyi Biotec als ausreichend bewertet (Abbildung 2-3).

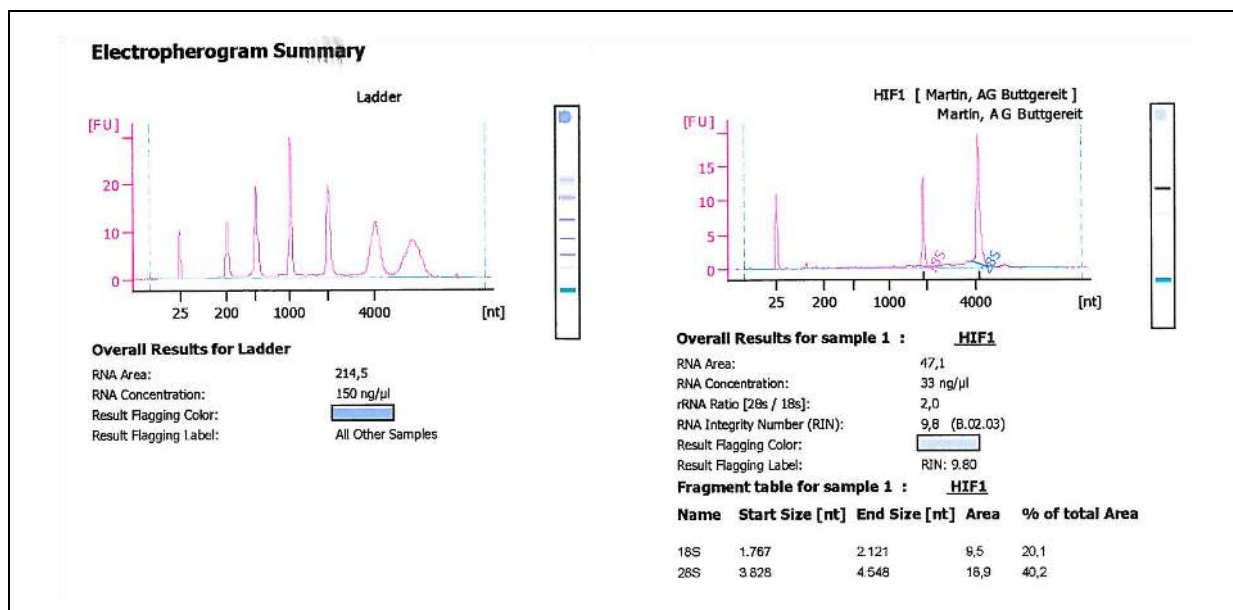


Abbildung 2-3 Ergebnis einer RNA-Qualitätsbestimmung mittels Bioanalyzer.

Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses einer RNA-Qualitätsbestimmung mittels Bioanalyzer. Die rRNA Ratio [28S/18S] beträgt für die RNA-Probe aus HIF-1α Knockdownzellen 2,0 mit einer RNA-Integritätszahl RIN von 9,8 (RIN Zahlen >6 werden für die Durchführung von Microarrays als ausreichend betrachtet).

2.2.3.1.5. cDNA-Synthese

Nach Isolation der Total-RNA mittels RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) erfolgte die cDNA-Synthese mittels Sensiscript RT-Kit (QIAGEN). Abweichend vom Standardprotokoll wurden im Ansatz der Reversen Transkriptions-PCR neben Oligo dT-Primern (10µM) zusätzlich Random Hexamere (10µM) verwendet.

2.2.3.1.6. Genexpressionanalyse mittels realtime PCR im SYBR Green-Format

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wobei die Quantifizierung anhand von Fluoreszenzmessungen (SYBR Green, Roche Diagnostics) durchgeführt wird, die in Echtzeit („realtime“) während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Anhand der Fluoreszenzsignale wird die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, da nur während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Die Methode der realtime PCR ermöglicht es eine Aussage darüber zu treffen, in welchem Maß die untersuchten Gene unter verschiedenen Bedingungen, also unter Normoxie und Hypoxie, bzw. in HMEC-1 Zellen mit Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α im Vergleich zu scr Kontrollzellen, exprimiert werden. Zu diesem Zweck wird eine relative Quantifizierung der exprimierten RNA bzw. der daraus synthetisierten cDNA durchgeführt. Dabei kann anhand eines sogenannten „housekeeping gene“, welches in diesem Fall *EF1A* ist und als konstant exprimiert angenommen wird, auf die Expressionsstärke der Gene *HIF1A*, *HIF2A*, *GAPDH*, *PGK1*, *LDHA*, *GLUT1*, *VEGFA* und *IL8* rückgeschlossen werden. Die nachfolgende Tabelle 2-22 und Tabelle 2-23 listen die für die realtime PCR notwendigen Substanzen sowie das verwendete PCR-Programm auf.

Tabelle 2-22 Übersicht des SYBR Green realtime PCR-Ansatzes

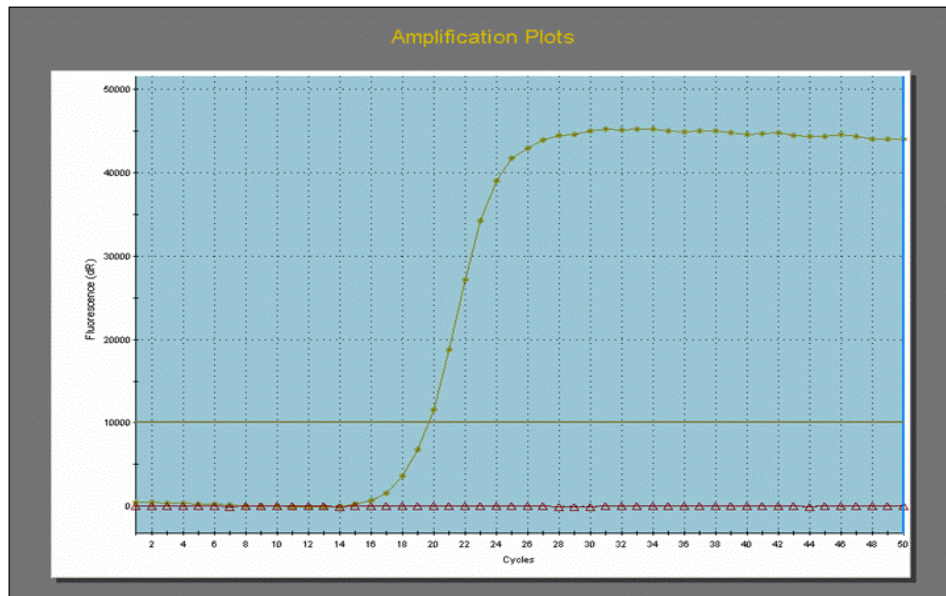
Substanz	Hersteller	Volumen im Mastermix [μ l]
Aqua dest.	DRFZ	1
Roche SYBR Green I Mix	Roche	1
MgCl ₂ (mM Stock, individuell)	Roche	2
Primer forward (5µM)	TIB MOLBIOL	0,5
Primer reverse (5µM)	TIB MOLBIOL	0,5
cDNA Template	-	5

Tabelle 2-23 Übersicht des verwendeten Programmes des SYBR Green realtime PCR-Ansatzes

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Wiederholungen
95	10min	-
95	5s	50x
64	7s	
72	9s	
95	1min	-
55-95	Rampe	-

Da der Nachweis der entstandenen Produkte über den an doppelsträngige DNA bindenden Cyaninfarbstoff SYBR Green I erfolgt, ist im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse notwendig. SYBR Green erhält seine fluoreszenten Eigenschaften durch einen Energietransfer, wenn mehrere SYBR Green Moleküle in räumliche Nähe geraten. So ist es z.B. beim Binden an synthetisierte doppelsträngige DNA der Fall. Aus diesem Grund müssen unspezifische Signale, welche z.B. durch Primer-Dimere zustandekommen, von den gewünschten Produkten der PCR anhand ihres Schmelzpunktes unterschieden werden. Kurze AT-reiche Produkte schmelzen dabei früher auf als lange GC-reiche Produkte. Dies ermöglicht eine Identifikation des gebildeten Produktes. Eine exemplarische Darstellung einer Amplifikationskurve (A) sowie einer Schmelzkurve (B) zeigt Abbildung 2-4.

A



B

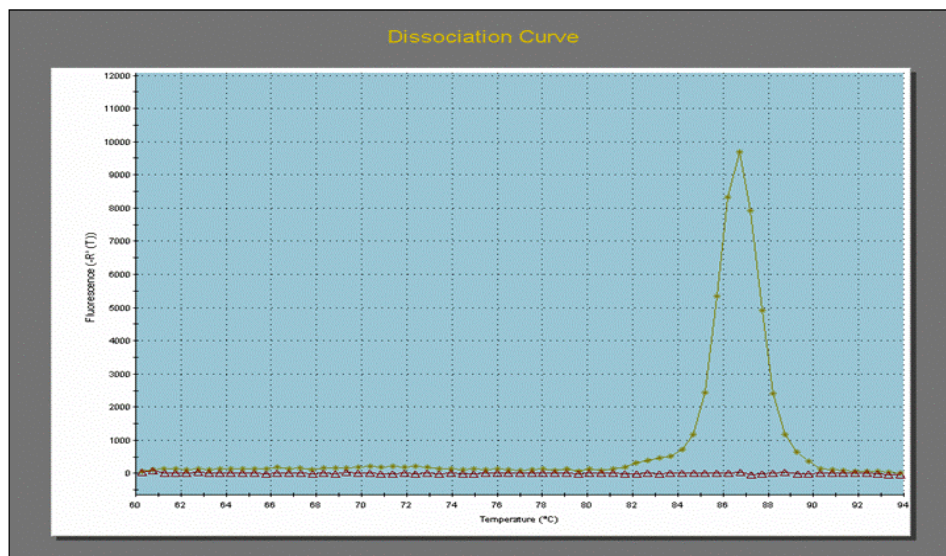


Abbildung 2-4 Amplifikationskurve und Schmelzkurve einer realtime PCR.

Aufgetragen für die Quantifizierung sind Fluoreszenzintensität über Zyklusanzahl zur Bestimmung des Schwellwertzyklus (Amplifikationskurve A) und zur Produktidentifizierung die Schmelzkurve (B) eines Produktes (beige Kurve) jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Templatezugabe (violette Kurve).

Da bei der realtime PCR am Ende einer jeden Elongationsphase im Idealfall eine Verdoppelung der DNA-Menge stattgefunden hat, kann man nach 50 Zyklen laut Potenzgesetz eine auf das 2^{50} -fache der Ausgangsmenge gesteigerte DNA-Menge erwarten. Dabei kann aber die synthetisierte DNA-Menge auf Grund des Verbrauchs der zugegebenen

Substrate nicht unbegrenzt steigen. Mit Hilfe der realtime PCR kann anhand des Echtzeit-Messverfahrens nun eine Aussage über die zu Beginn der PCR vorhandene Template-Menge getroffen werden, ohne die PCR-Produkte auf ein Gel auftragen zu müssen, da die gemessene Fluoreszenzintensität proportional mit der Menge der synthetisierten PCR-Produkte zunimmt. Da für die realtime PCR keine genomische DNA sondern cDNA verwendet wurde, wurde auch nur DNA vervielfältigt, welche zuvor als mRNA von der Zelle exprimiert wurde. Eine Bestimmung des Expressionslevels der untersuchten Gene ist also möglich. Zu diesem Zweck werden die sogenannten Schwellwertzyklen (C_T -Wert) betrachtet, wobei man davon ausgehen kann, dass die synthetisierte DNA-Menge in der jeweiligen Probe beim Erreichen des Schwellwertes nahezu gleich ist. Durch diesen Zusammenhang ist ein Rückschluss auf die cDNA-Menge in der Probe zu Beginn der PCR möglich. Je höher der C_T -Wert, umso weniger cDNA war zu Beginn der PCR in der Probe. In dieser Arbeit findet dabei die Methode der relativen Quantifizierung Anwendung. Dabei dient das „housekeeping gene“ *Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EF1A)* als Referenz und wird in allen Proben als gleich stark exprimiert angenommen. Somit kann die Expression der untersuchten Gene in Relation zum „housekeeping gene“ angegeben werden. Bei einer angenommenen Effizienz der PCR von annähernden 100 % kann von einer Verdoppelung der DNA-Menge in der Probe ausgegangen werden, was zu folgendem mathematischen Zusammenhang führt:

$$rel.Expression_{Gen/EF1A} = \frac{2^{-C_{T,Gen}}}{2^{-C_{T,EF1A}}} = 2^{-(C_{T,Gen} - C_{T,EF1A})} = 2^{-\Delta C_T}$$

Die relative Expression des untersuchten Gens spiegelt sich als Verhältnis der Expressionen des Gens und des „housekeeping gene“ wider, wobei auf das „housekeeping gene“ Bezug genommen wird und dieses deshalb formal im Nenner steht. Die Messungen erfolgen im Einfachansatz und als Negativkontrolle wird der Mastermix ohne Template-Zugabe mitgeführt. Nach eindeutiger Identifizierung des gewünschten Produktes anhand der Schmelzkurve werden die ermittelten C_T -Werte nach oben beschriebener Formel ins Verhältnis gesetzt um die relative Genexpression zu bestimmen. Konnte für eine Probe kein C_T -Wert ermittelt werden, der Nachweis des Gens gelang aber innerhalb des Ansatzes in einer anderen Probe und die Negativkontrolle war negativ, so wurde formal der C_T -Wert für diese Probe auf 50 gesetzt.

2.2.3.1.7. Genexpressionsanalyse mittels Agilent Human Whole Genome Oligo Microarray

Neben der Genexpressionsanalyse mittels realtime PCR im SYBR Green-Format wurde in dieser Arbeit eine globale Genexpressionsanalyse mittels mehrerer Agilent Human Whole Genome Oligo Microarrays durchgeführt. Im Fokus dieser Genexpressionsanalyse standen zum Einen die durch Inkubation von HMEC-1 Zellen bzw. HMEC-1 Knockdownzellen unter Hypoxie ausgelöste differentielle Genexpression im Bereich der Bioenergetik und Angiogenese. Zum Anderen sollte mittels Microarray die durch einen Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α verursachte differentielle Genexpression unter Hypoxie im Bereich Bioenergetik und Angiogenese untersucht werden. Hierzu wurden jeweils 350000 HMEC-1 Zellen bzw. 350000 transduzierte HMEC-1 Zellen (scr, HIF1 kd, HIF2 kd) pro Loch einer 6-Lochplatte in einem Dreieransatz für 20h unter Normoxie und Hypoxie in voll supplementiertem EBM inkubiert. Anschließend wurde die Total-RNA wie in Kapitel 2.2.3.1.4 beschrieben isoliert, der Dreieransatz jeweils gepoolt und die vereinigte Total-RNA mittels Bioanalyzer auf ihre Güte hin überprüft. Die Güte der Proben, gemessen an der rRNA Ratio [28S/18S] lag im Bereich von 1,7-2,1 und wurde als ausreichend für die Durchführung des Microarray Experimentes betrachtet.

Die Durchführung der Microarray Experimente erfolgte bei Miltenyi Biotec in Bergisch Gladbach (Deutschland). Dazu wurden die gewonnenen Total-RNAs auf Trockeneis versendet. Insgesamt wurden 8 Proben versendet, welche jeweils aus 3 Proben gepoolter Total-RNAs für die Konditionen HMEC-1 Zellen, HIF-1 α Knockdownzellen, HIF-2 α Knockdownzellen und scrambled shRNA (scr) Kontrollzellen jeweils unter Normoxie und Hypoxie bestanden. Miltenyi Biotec führte nach Ankunft der Proben abermals eine Qualitätskontrolle der versendeten Total-RNAs durch, wobei die RNA-Integritätszahlen zwischen 9,7 und 10 lagen und ein Wert von 10 einer hervorragenden RNA-Qualität entspricht. Dabei werden alle Werte >6 als ausreichend für die Durchführung eines Microarrays betrachtet. Die RNA-Integritätszahl (engl. RIN value) berechnet sich unter anderem über die im Elektropherogramm erhaltenen Flächen der rRNA Ratio [28S/18S] und der 5S RNA Region. Die Abbildung 2-5A und B zeigt das bei Miltenyi Biotec erstellte Gel bzw. Elektropherogramm für die analysierten Proben.

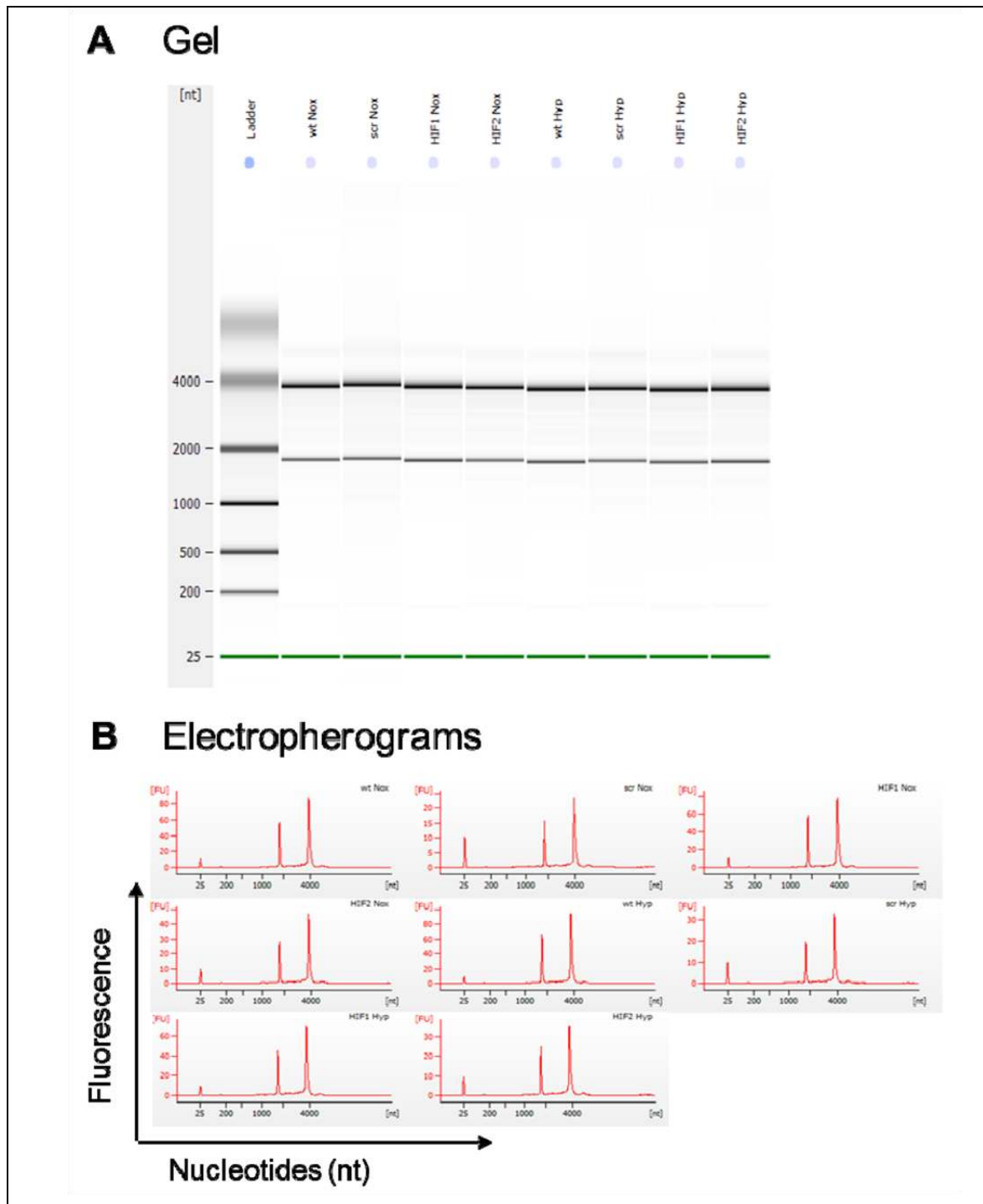


Abbildung 2-5 Gel und Elektropherogram der bei Miltenyi Biotec bearbeiteten Total-RNA Proben für den Microarray.

Abbildung A zeigt die im Gel aufgetragenen Total-RNAs sowie in der ersten Spur den Molgewichtsstandard (wt = HMEC-1 Zellen, HIF1 = HIF-1 α Knockdownzellen, HIF2 = HIF-2 α Knockdownzellen, scr = scrambled shRNA Kontrollzellen, Nox = Normoxie, Hyp = Hypoxie). Abbildung B zeigt die aus dem Gel resultierenden Elektropherogramme mit jeweils zwei signifikanten Peaks für 18S und 28S rRNA (Miltenyi Biotec Service Report).

Da die Qualität der rRNA hervorragend war, wurden die Proben bei Miltenyi Biotec weiterprozessiert und jeweils ein Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray 8x60K pro Probe gefahren. Dies beinhaltete das Labeln der Proben mit Cyanin-3-Cytidin-5'-Triphosphat (Cy3-) und die Hybridisierung auf dem Microarray. Im Anschluss wurden die Microarrays in einem Agilent Microarray Scanner System gescannt und die erhaltenen Bilder mittels Agilent Feature Extraction Software analysiert. Für die Bestimmung der differentiellen Genexpression in Ratio Experimenten, beispielsweise HMEC-1 Zellen unter Normoxie vs. Hypoxie, wurde von Miltenyi Biotec das Rosetta Resolver[®] gene expression data analysis system verwendet. Nach der Datenprozessierung lieferte Miltenyi Biotec Genlisten, welche alle differentiell hoch- oder herunterregulierten Gene mit den jeweiligen Ratios der Expressionen zweier Kultivierungsbedingungen liefert. Dabei sind in der Liste nur Gene aufgeführt, welche mindestens zweifach hoch- oder herunterreguliert wurden und bei denen die statistische Signifikanz $p < 0,01$ ist. Im Anschluss wurden die gelieferten Daten detailliert mittels Microsoft Access und Excel ausgewertet und geordnet. Zuerst wurden den von Miltenyi Biotec gelieferten Agilent Gene IDs mittels Access und DAVID gene conversion tool [59-60] die Entrez Gene IDs zugeordnet. Mit Hilfe der Entrez Gene IDs konnte eine funktionelle Klassifizierung der Gene erfolgen. Dazu wurde mittels Panther Klassifizierungssystem (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) [61-62] eine Zuordnung der differentiell exprimierten Gene zu den Pathways der Bioenergetik und Angiogenese durchgeführt. Folgende regulierte Pathways wurden dabei im Bereich Bioenergetik identifiziert und zugeordnet: Glykolyse, Insulin-IGF-Signalwege, Citratzyklus (TCA-Cycle), ATP-Synthese, Fructose-Glucose-Metabolismus, N-Acetylglucosamin-Metabolismus, Pentose-Phosphat-Weg und Pyruvat-Metabolismus. Folgende regulierte Pathways wurden dabei im Bereich Angiogenese identifiziert und zugeordnet: Angiogenese, Regulation des Zytoskeletts mittels Rho-GTPase, EGF-Rezeptor Signalweg, Endothelin Signalweg, FGF Signalweg, Hypoxie-Antwort mittels HIF-Aktivierung, Oxidative Stress-Antwort, PDGF Signalweg, Plasminogen aktivierte Signalkaskade, VEGF Signalweg und Vasopressin-Synthese. Somit konnten mit dieser Methode die Gene den biologischen Stoffwechselwegen zugeordnet werden, die sie beeinflussen. Um der qualitativen Aussage der beeinflussten Signalwege der Bioenergetik und Angiogenese die quantitativ messbare differentielle Genexpression zuzuordnen, wurde

der numerische Wert der Hoch- oder Herunterregulation der jeweiligen Gene innerhalb der untersuchten Signalwege in einer Heatmap farblich visualisiert (Heatmap-Builder [63]). Dabei sind hochregulierte Gene gelb und herunterregulierte Gene blau dargestellt. Die hier erstellten Heatmaps zeigen dabei zum Einen den Effekt einer hypoxischen Inkubation auf HMEC-1 Zellen bzw. HMEC-1 Zellen mit Knockdown (HIF1 kd, HIF2 kd) oder Kontrolle (scr), zum Anderen den Effekt eines Knockdowns von HIF-1 α bzw. HIF-2 α auf die Genexpression in HMEC-1 Zellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Hypoxie. Die Betrachtung der durch einen Knockdown ausgelösten differentiellen Genexpression im Vergleich zu scr Kontrollzellen ermöglichte darüber hinaus eine Zuordnung, welche Genexpression diskret durch HIF1, HIF2 oder durch beide Faktoren überlappend induziert oder supprimiert wurde.

2.2.3.2. Proteinanalysen

2.2.3.2.1. Proteinisolation nach Zellyse – Gesamtzellextrakt

Für die Gewinnung von Proteinproben aus dem Gesamtzellextrakt wurden jeweils 350000 HMEC-1 Zellen bzw. 350000 transduzierte HMEC-1 Zellen (scr, HIF1 kd, HIF2 kd) pro Loch einer 6-Lochplatte für 20h unter Normoxie und Hypoxie in voll supplementiertem EBM inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1ml PBS auf die adhärenen Zellen gegeben und die Zellen mit einem Cellscrapper von der Oberfläche abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann für 1min bei 13300g und 4°C abzentrifugiert und in 25 μ l Laemmli-Puffer (1x) lysiert. Die so gewonnenen Gesamtzellysate wurden bis zur Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) bei -20°C gelagert.

2.2.3.2.2. Proteinisolation – Gewinnung von zytosolischer Fraktion und Kernextrakt

Für die Gewinnung von Proteinproben zur Durchführung eines Kernextrakts wurden jeweils zweimal 1,5 Millionen HMEC-1 Zellen bzw. HMEC-1 Knockdownzellen (scr, HIF1 kd, HIF2 kd) pro Loch einer 6-Lochplatte für 20h unter Normoxie und Hypoxie in voll supplementiertem EBM inkubiert. Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben des Nuclear Extract Kit (Active Motif) zügig die Aufarbeitung der zytosolischen Fraktion und des Kernextrakts auf Eis. 20 μ l der gewonnenen einzelnen

Fraktionen wurden danach in 5µl Laemmli-Puffer (5x) aufgenommen und bis zur Durchführung der SDS-Page bei -20°C gelagert.

2.2.3.2.3. Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Wie in den beiden vorangegangenen Unterkapiteln beschrieben wurden sowohl Gesamtzelllysate als auch Kernextrakte für eine Analyse mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) gesammelt. Die Methode der SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung der in dem Lysat enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht, wobei dies unabhängig von der Eigenladung und Molekülstruktur der Proteine geschieht. Da für die Gewinnung der Gesamtzelllysate und Kernextrakte jeweils die gleiche Zellzahl pro Probe verwendet wurde, wurde auf eine BCA Proteinbestimmung verzichtet und jeweils die gesamten 25µl Lysat zur Denaturierung für 10min bei 95°C inkubiert und anschließend auf das SDS-Gel aufgetragen. Bei dem SDS-Gel handelt es sich um ein denaturierendes Gel, bei dem die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken (mittels SDS) und der Schwefelbrücken zwischen den Aminosäuren Cystein (mittels enthaltenem β -Mercaptoethanol) aufgelöst werden. Darüber hinaus dient SDS der Überdeckung der Eigenladung der Proteine, da SDS stark negativ geladen ist und so eine Auftrennung nach Molgewicht unabhängig von der Ladung der Proteine ermöglicht. Um eine gerade Lauffront zu erreichen, fand eine Anreicherung der Proteine in einem Sammelgel statt, bevor diese im elektrischen Feld in einem 10%igen Trenngel aufgetrennt wurden (Zusammensetzung der verwendeten Gele siehe Tabelle 2-24). Mit Hilfe des mitgeführten Protein-Molegewichtstandards ließen sich die Molekulargewichte ermitteln und die Proteinbanden von HIF-1 α und HIF-2 α sowie des als Ladungskontrolle und Kernmarker verwendeten Proteins Lamin B und des zytosolischen Markers β -Actin identifizieren.

Tabelle 2-24 Übersicht der Zusammensetzung von SDS-PAGE Sammelgel und Trenngel

Substanz	Sammelgel (12%)	Trenngel (10%)
Aqua dest.	2,1ml	4,0ml
30% Acrylamid Mix	0,5ml	3,3ml
1,5M Tris (pH 8,8)	0,38ml	2,5ml

Substanz	Sammelgel (12%)	Trenngel (10%)
10% SDS	0,03ml	0,1ml
10% APS	0,03ml	0,1ml
TEMED	0,004ml	0,006ml

2.2.3.2.4. Western Blot zur Analyse mittels SDS-PAGE aufgetrennter Proteine

Um die Sensitivität bei der Detektion der untersuchten Proteine zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit das Western Blot Verfahren angewandt. Dabei erfolgt eine schonende Übertragung der nach ihrer Größe aufgetrennten, negativ geladenen Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Trägermembran durch elektrochemischen Transfer im Tank-Blot-System. Das Tank-Blot Verfahren erfolgte in einer mit Transfer-Puffer und Kühlaggregaten gefüllten Kammer in einer BioRad-Gelhaltekassette unter ständigem Rühren bei 4°C und einer angelegten Spannung von 40V über Nacht.

2.2.3.2.5. Nachweis der an PVDF gebundenen Proteine mittels Chemilumineszenz

Mit der Durchführung des Western Blots wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Trägermembran übertragen. Ein Nachweis der in dieser Arbeit im Fokus stehenden Proteine erfolgte mittels spezifischer gegen das Protein gerichteter Antikörper. Das unspezifische Binden der verwendeten Antikörper wurde durch eine initiale Inkubation mit Block-Puffer unterbunden. Darüber hinaus wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch mehrere Waschschrte mit TBS-T wieder entfernt. Dabei erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in TBS-T in der nach Herstellervorgaben angepassten Konzentration für 2h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen des Blots mit TBS-T und der Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus IgG-HRP: 1:10.000 (v/v); anti-Ziegen IgG-HRP: 1:10.000 (v/v)) in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Konjugation des sekundären Antikörpers mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*: HRP) ermöglicht die Proteindetektion mittels Chemilumineszenz. Dabei katalysiert die HRP die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der Licht mit einer Wellenlänge von 428nm emittiert wird. Die Detektion der Lichtemission erfolgte nach dreimaligem Waschen in TBS-T mit 1ml Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer).

Dabei wurde die Lichtemission von einem Fujifilm LAS3000 Kamerasystem erfasst und elektronisch aufgezeichnet.

2.2.3.2.6. Nachweis sekretierter Zytokine mittels Multiplex Suspension Array

In dieser Arbeit wurde neben dem Einfluss von Normoxie und Hypoxie bzw. eines Knockdowns von HIF-1 α oder HIF-2 α in HMEC-1 Zellen auf die Genexpression auch die Änderung des Repertoires sekretierter Faktoren untersucht. Zu diesem Zweck fand die Methode des Multiplex Suspension Arrays Verwendung, welche es ermöglicht, eine gleichzeitige Bestimmung von mehreren sekretierten Proteinen in einer Suspension nach dem Sandwich ELISA Prinzip durchzuführen. Für die Durchführung des Multiplex Suspension Arrays wurden jeweils 350000 HMEC-1 Zellen bzw. 350000 transduzierte HMEC-1 Zellen (scr, HIF1 kd, HIF2 kd) pro Loch einer 6-Lochplatte für 20h unter Normoxie und Hypoxie in voll supplementiertem EBM inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. In dieser Arbeit fand das Bio-Plex Pro Cytokine 27-Plex Panel Human Group I + MIF der Firma Bio-Rad Laboratories Anwendung und mit der technischen Durchführung des Assays war Frau Manuela Jakstadt betraut. Das Prinzip des Multiplex Suspension Array beruht darauf, dass ein Primärantikörper an eine mit Fluoreszenzfarbstoff gefüllte Mikrosphäre gebunden ist und das zu detektierende Antigen fängt. Da in diesem Assay mehrere Faktoren gleichzeitig detektiert werden sollen, ist eine Identifikation der mit unterschiedlichen Primärantikörpern gekoppelten Mikrosphären nötig. Dies geschieht mittels der Beadfluoreszenz (Fluoreszenz 1: 635nm), welche für den jeweils gebundenen Primärantikörper individuell ist. Nach dem Sandwich-Prinzip erfolgt nun die Quantifizierung des an den Primärantikörper gebundenen Antigens. Dazu wird ein biotinylierter Sekundärantikörper sowie eine Streptavidin/PE-Biotin-Komplexbildung genutzt, welche ebenfalls anhand ihrer Fluoreszenz detektierbar ist (Fluoreszenz 2: 532nm). Mit dem hier verwendeten Kit lassen sich theoretisch die folgenden 28 Proteine nachweisen: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-12 (p70); IL-13; IL-15; IL-17; Eotaxin, FGF basic; G-CSF; GM-CSF; IFN- γ ; IP-10; MCP-1; MIP-1 α ; MIP-1 β , PDGF bb; RANTES; TNF- α ; VEGF und MIF. Die Durchführung des Multiplex Suspension Arrays erfolgte gemäß der Herstellerangaben (Bio-Rad). Die Messung wurde in einem Luminex 100 System (auch Bio-Plex; Bio-Rad) durchgeführt. Die Daten wurden mit der Bio-Plex Manager 4.0 Software aufgenommen und analysiert. Dabei wurde bei nicht erfolgter

Detektion eines Faktors die Hälfte der Konzentration des kleinsten messbaren Standards als unteres Detektionslimit festgelegt und im Ergebnisteil angegeben.

2.2.3.3. ADP/ATP Bestimmung mittels Chemilumineszenz

Um neben den Genexpressionsdaten eine Aussage zur Bioenergetik von HMEC-1 Zellen bzw. transduzierten HMEC-1 Zellen (scr, HIF1 kd, HIF2 kd) unter Normoxie und Hypoxie treffen zu können, wurde als Maß für den zellulären Energiespeicher der Zelle eine ADP/ATP Bestimmung durchgeführt.

2.2.3.3.1. ADP/ATP Bestimmung mittels ApoGlow® Assay Kit (Adenylat Nucleotid Ratio Assay der Firma Lonza)

Für die Bestimmung der ADP/ATP Ratio wurde der ApoGlow® Assay Kit nach Herstellerangaben der Firma Lonza verwendet. Dabei handelt es sich um ein Chemilumineszenz-Nachweisverfahren, wobei zunächst die relative Luziferaseaktivität, induziert durch intrazelluläres ATP, bestimmt wird, bis diese Reaktion zum Erliegen kommt (Reaktion/Messung A). Im Anschluss führt die Zugabe des ADP konvertierenden Reagenz in einem weiteren Messschritt zur Ermittlung der sich initial ändernden relativen Luziferaseaktivität (Reaktion/Messung B) sowie nach einer Inkubation von 5min zur Bestimmung der relativen Luziferaseaktivität, was dem finalen Umsatz des in ATP konvertierten ADP (Reaktion/Messung C) entspricht. Daraus ergibt sich für die Ermittlung der ADP/ATP Ratio die folgende Berechnung:

$$\frac{ADP}{ATP} = \frac{Messung C - Messung B}{Messung A}$$

2.2.4. Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism™ Version 5.0 Software ausgeführt. Dabei sind die jeweiligen n-Zahlen und angewendeten statistischen Testverfahren in den Abbildungen angegeben. p-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet, wobei eine Kennzeichnung mit Asteriksen erfolgte (p \leq 0,05 * / p \leq 0,01 ** / p \leq 0,001 ***).

3. Ergebnisse

3.1. Humane mikrovaskuläre Endothelzellen – Charakterisierung der Zelllinie HMEC-1

3.1.1. Angiogenese, Morphologie und Oberflächenmarker von HMEC-1 Zellen

Die HMEC-1 Zelllinie wurde 1992 vom Center for Disease Control (CDC) in Atlanta, USA, etabliert und charakterisiert [58].

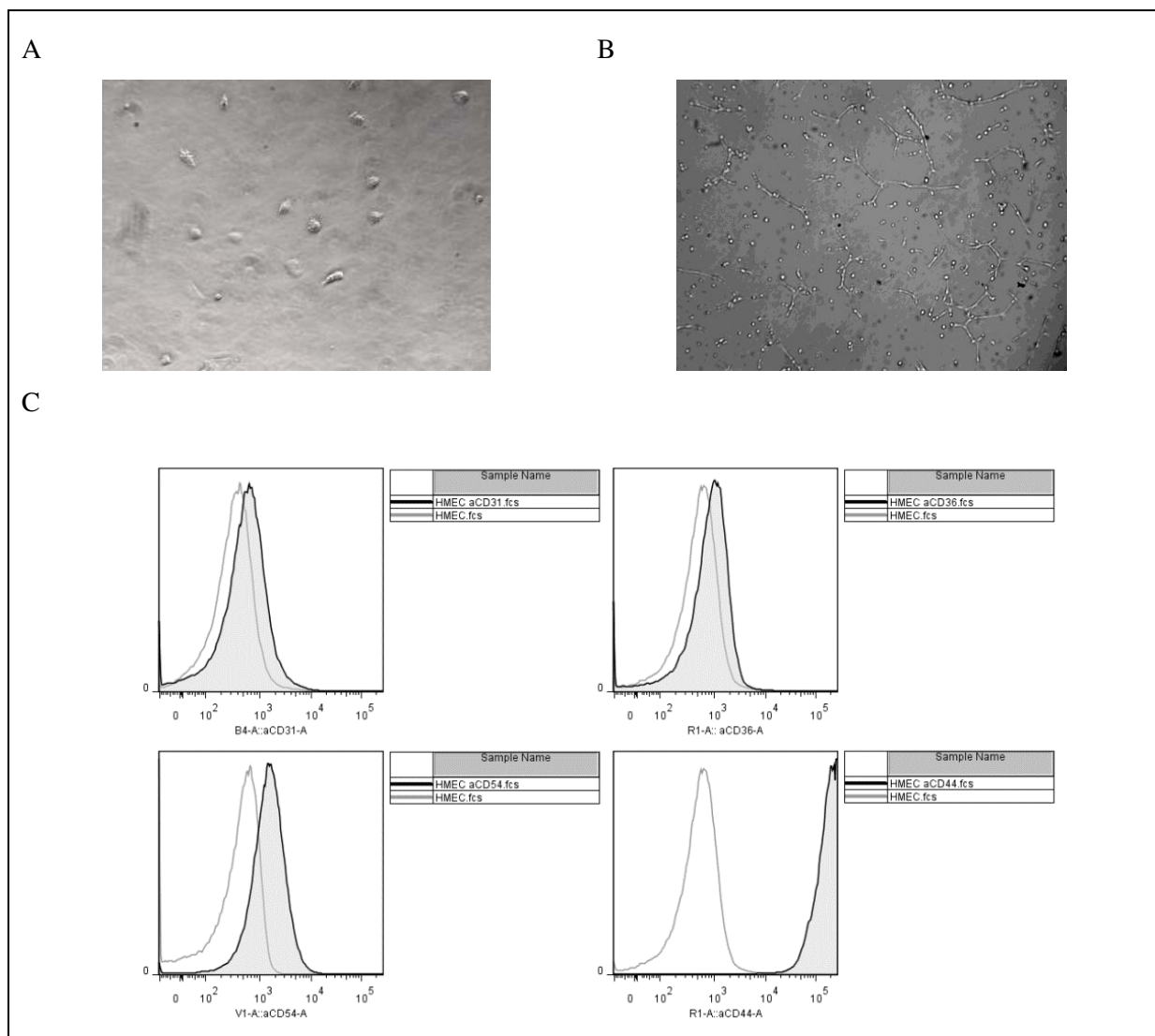


Abbildung 3-1 Morphologische Charakterisierung von HMEC-1 Zellen.

(A) HMEC-1 Zellen weisen in Monolayer-Kultur eine „Kopfsteinpflaster“-förmige Morphologie auf (100-fache Vergrößerung). (B) HMEC-1 Zellen sind bei Kultivierung auf MatrigelTM fähig zur Angiogenese (40-fache Vergrößerung). (C) HMEC-1 Zellen sind für die Endothelzellmarker CD31 und CD36 und die Zelladhäsionsmoleküle CD44 und CD54 positiv.

Die in den durchgeführten Experimenten verwendeten HMEC-1 Zellen zeigen eine „Kopfsteinpflaster“-förmige Morphologie in Monolayer-Kultur und bilden bei Kultivierung auf MatrigelTM Tubuli aus (Abbildung 3-1 A und B). Des Weiteren präsentieren sie, widergespiegelt durch eine Verschiebung der Population im FACS-Histogramm, die Endothelzellmarker CD31 und CD36 sowie die Zelladhäsionsmoleküle CD44 und CD54 (ICAM-1) auf der Zelloberfläche (Abbildung 3-1 C).

3.1.2. Angiogenese und Morphologie von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie

Die Kultivierung von HMEC-1 Zellen unter hypoxischen Bedingungen ($\leq 1\% \text{ O}_2$) führt zu einer verstärkten Angiogenese. Abbildung 3-2 A zeigt dies exemplarisch in einem mikroskopischen Bild in 40-facher Vergrößerung. Die verstärkte Angiogenese äußert sich dabei durch eine signifikante Zunahme der Länge der gebildeten Tubuli um den Faktor 1,6 ($p=0,0225$) sowie eine signifikante Zunahme der Anzahl der gebildeten Verzweigungen um den Faktor 1,8 ($p<0.0001$) im Vergleich zur Kultivierung unter Normoxie (Abbildung 3-2 A,B,C). Zellen, die unter Hypoxie kein Längenwachstum aufweisen zeigen weiterhin die „Kopfsteinpflaster“-förmige Morphologie (Abbildung 3-2 B).

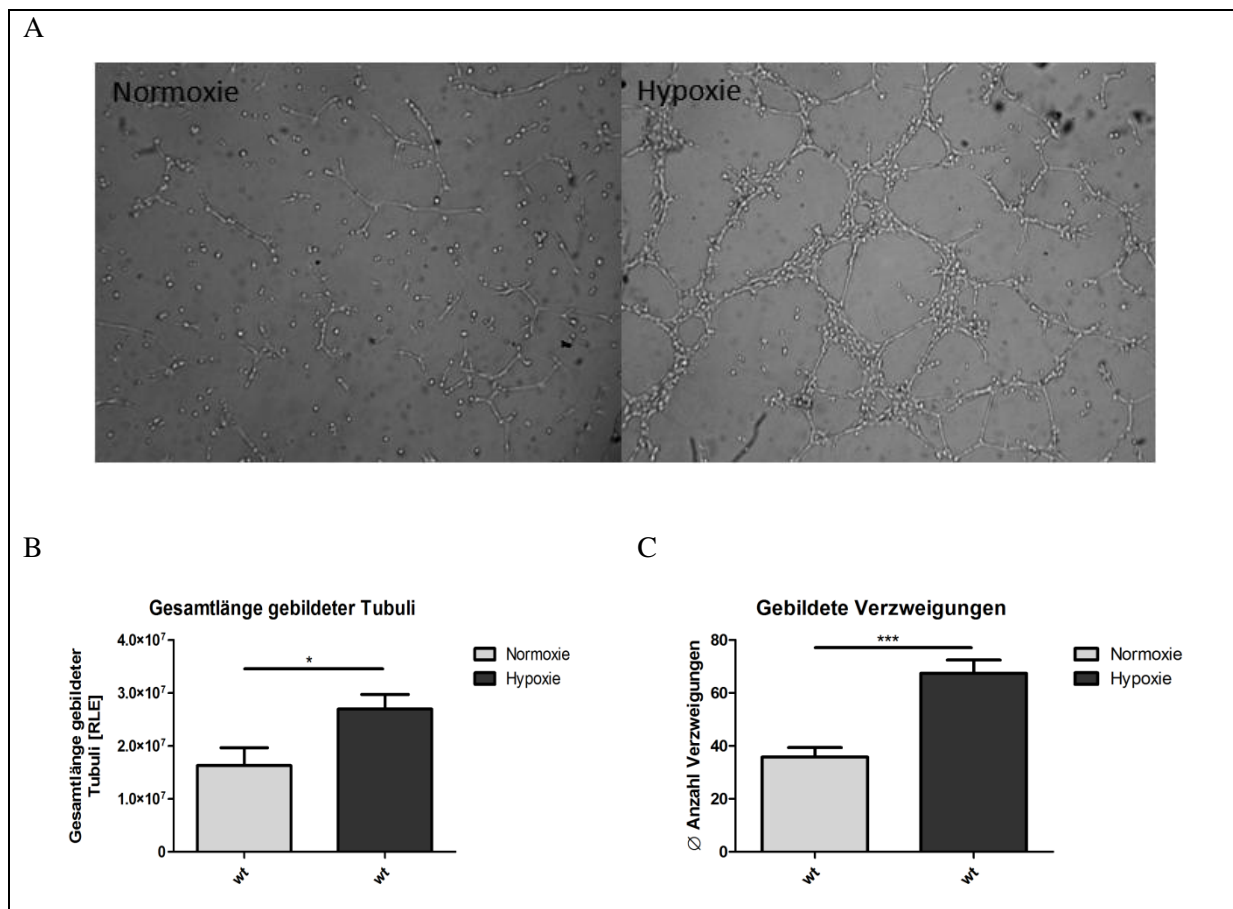


Abbildung 3-2 Morphologische Charakterisierung von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie.

(A) HMEC-1 Zellen (engl. wildtype – wt) sind bei Kultivierung auf MatrigelTM unter Normoxie fähig zur Angiogenese und verstärken die Angiogenese unter Hypoxie (40-fache Vergrößerung). (B+C) HMEC-1 Zellen bilden unter Hypoxie signifikant längere Tubuli ($p=0,0225$) und signifikant mehr Verzweigungen ($p<0.0001$) aus ($n=6$, gepaarter T-Test).

3.1.3. Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie

Die Beobachtungen zur Morphologie und Angiogenese in HMEC-1 Zellen legen nahe, dass in HMEC-1 Zellen unter hypoxischen Bedingungen ($\leq 1\% O_2$) eine differentielle Genexpression stattfindet. Dieser Aspekt wurde mit Hilfe eines Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays zunächst global mit Fokus auf die regulierten Angiogenese- und Bioenergetik-Pathways untersucht.

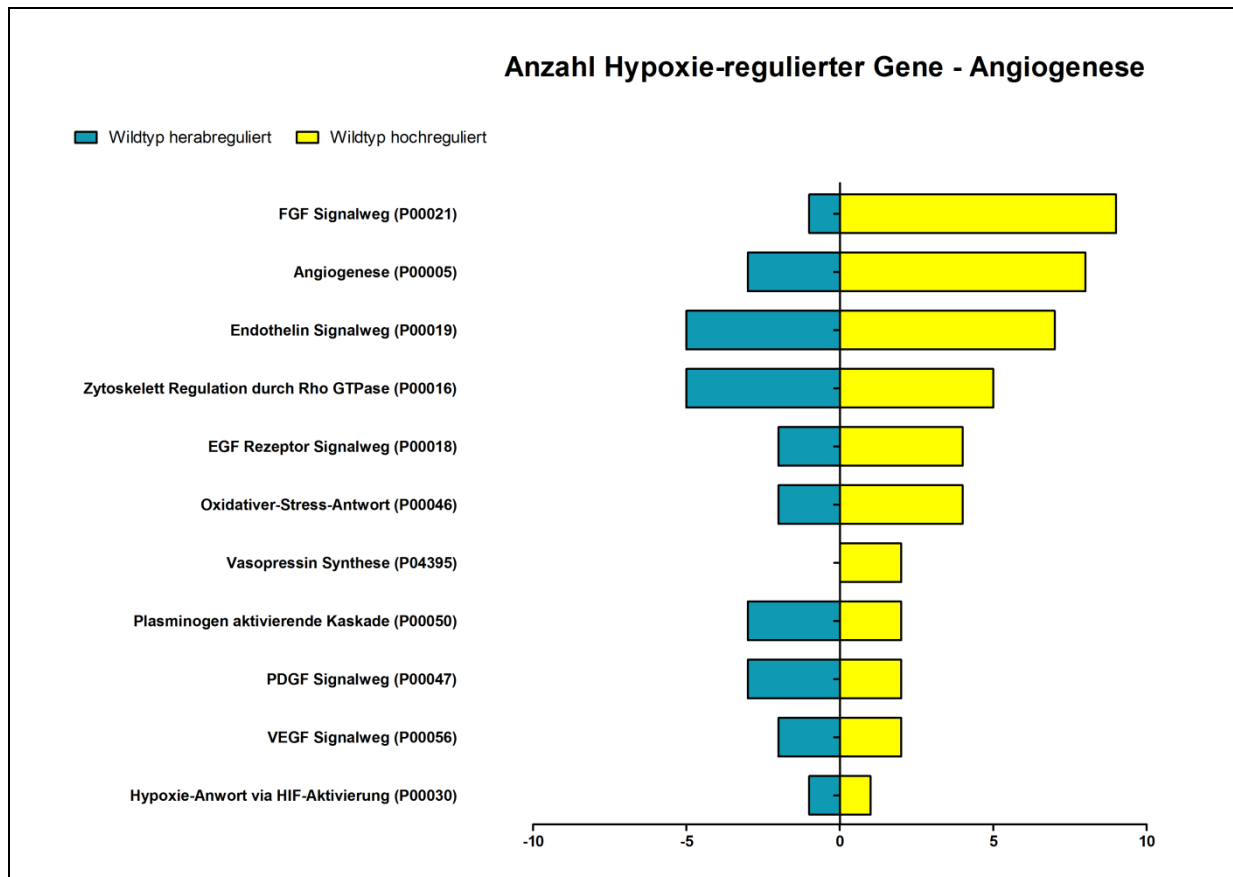


Abbildung 3-3 Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie – Gene der Angiogenese.

HMEC-1 Zellen zeigen unter Hypoxie eine signifikante (n -fache Änderung >2 ; $p < 0,01$) und differentielle Regulation von Genen, die dem Bereich Angiogenese zugeordnet werden können. Eine Zuordnung der Gene mittels Panther Database liefert 11 Angiogenese-assoziierte Pathways mit insgesamt 73 differentiellement regulierten Genen.

Für die Betrachtung der differentiellen Genexpression im Bereich der Angiogenese liefert eine Klassifizierung mittels Panther Database [61-62] 11 Angiogenese-assoziierte Pathways. Insgesamt zeigen die unterschiedlichen Pathways 46 unter Hypoxie signifikant erhöht exprimierte Gene und 27 signifikant vermindert exprimierte Gene. Somit verursacht Hypoxie eine differentielle Genexpression im Bereich Angiogenese.

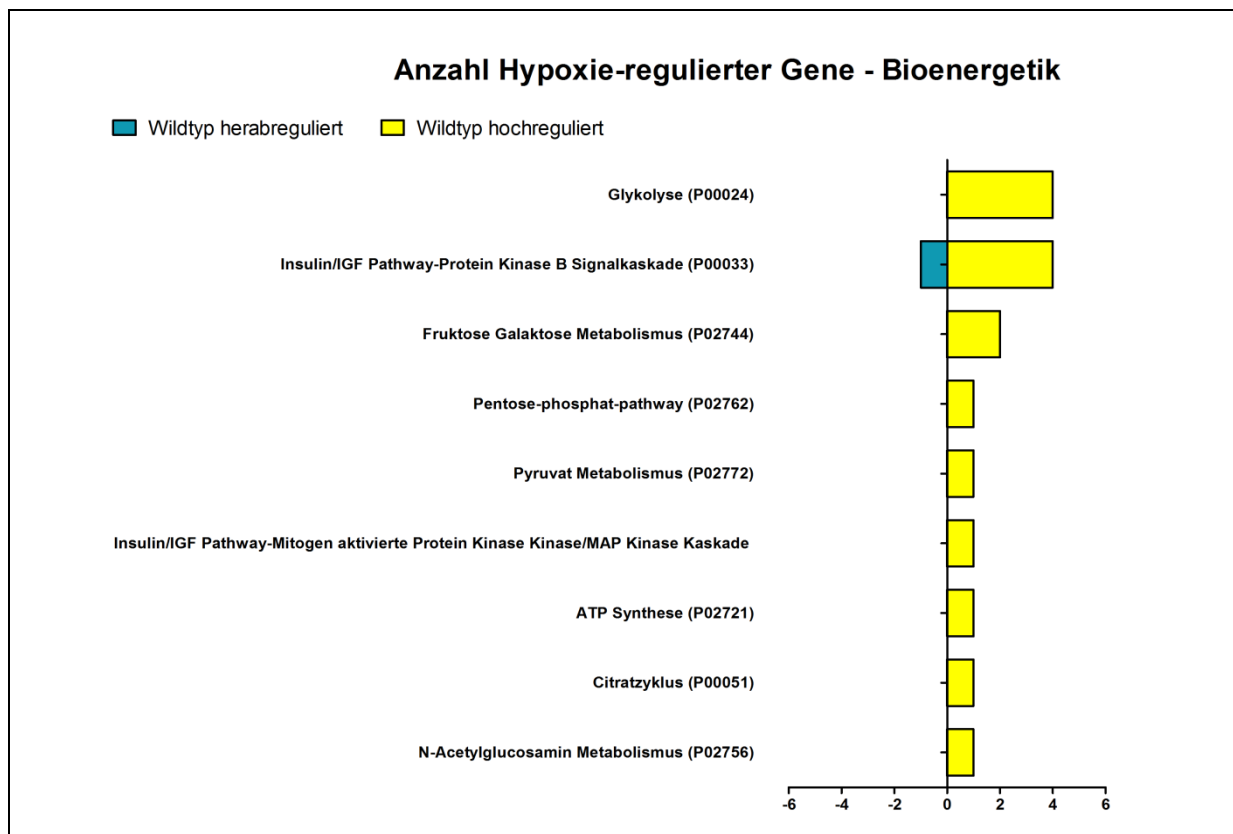


Abbildung 3-4 Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie – Gene der Bioenergetik.

HMEC-1 Zellen zeigen unter Hypoxie eine signifikante (n-fache Änderung >2 ; $p < 0,01$) und differentielle Regulation von Genen, die dem Bereich Bioenergetik zugeordnet werden können. Eine Zuordnung der Gene mittels Panther Database liefert 9 Bioenergetik-assoziierte Pathways mit insgesamt 17 differentiellement regulierten Genen.

Für die Betrachtung der differentiellen Genexpression im Bereich der Bioenergetik liefert eine Klassifizierung mittels Panther Database [61-62] 9 Bioenergetik-assoziierte Pathways. Insgesamt zeigen die unterschiedlichen Pathways 16 unter Hypoxie signifikant erhöht exprimierte Gene und ein signifikant vermindert exprimiertes Gen. Somit verursacht Hypoxie eine differentielle Genexpression im Bereich Bioenergetik.

3.1.4. Die Expression des Hypoxie induzierbaren Faktors HIF in HMEC-1 Zellen

Sowohl die morphologischen Veränderungen als auch die differentielle Genexpression im Bereich Angiogenese und Bioenergetik von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie weisen auf das Vorhandensein eines Hauptregulators unter Hypoxie hin, den Hypoxie induzierbaren Faktor HIF. Der Hypoxie induzierbare Faktor ist ein Heterodimer aus einer sauerstoffsensitiven α -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit. Für die sauerstoffsensitive

3. Ergebnisse

α -Untereinheit sind hier die zwei Isoformen HIF-1 α und HIF-2 α von Interesse, wobei diese jeweils unter Hypoxie stabilisiert werden, in den Kern translozieren, mit HIF-1 β dimerisieren und als aktiver Transkriptionsfaktor HIF1 bzw. HIF2 vorliegen.

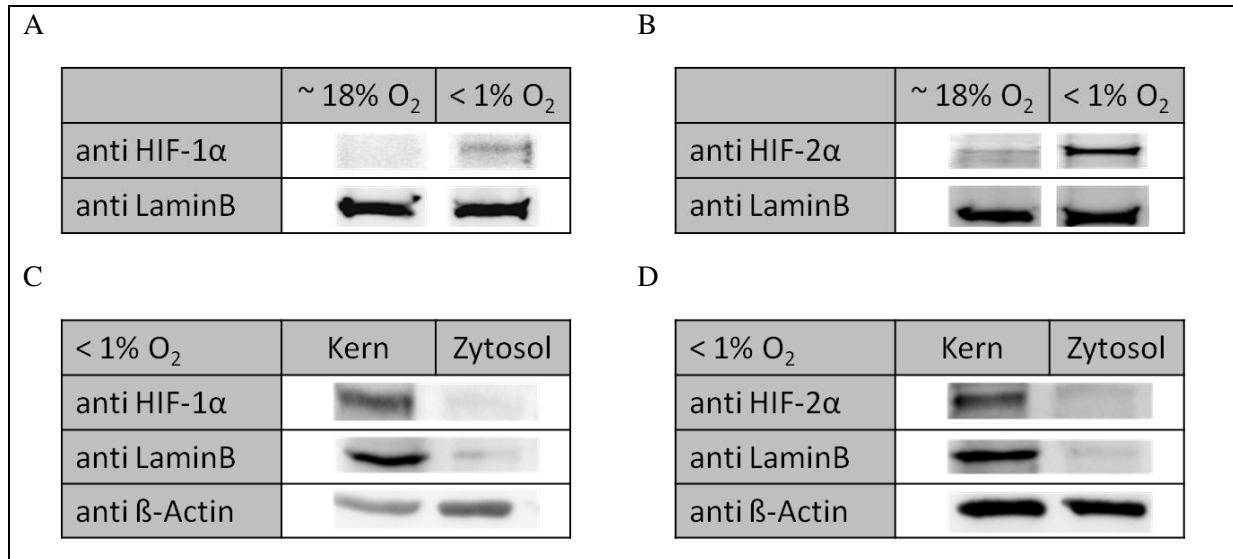


Abbildung 3-5 Western Blot Nachweis von HIF-1 α und HIF-2 α auf Proteinebene in HMEC-1 Zellen unter Hypoxie.

HMEC-1 Zellen zeigen unter Normoxie (18% O₂) kein (A) HIF-1 α und (B) HIF-2 α und stabilisieren unter Hypoxie (\leq 1% O₂) (A) HIF-1 α und (B) HIF-2 α auf Proteinebene. Der Nachweis von Lamin B dient als Ladungskontrolle. Unter Hypoxie stabilisiertes (C) HIF-1 α und (D) HIF-2 α transloziert in den Kern und ist dort nachweisbar. Der Nachweis von Lamin B dient der Identifikation der Kernfraktion und β -Actin als Ladungskontrolle und zytosolischer Marker.

HMEC-1 Zellen exprimieren und stabilisieren unter Hypoxie (\leq 1% O₂) sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α (Abbildung 3-5 A und B). Beide Faktoren translozieren auch in den Zellkern und sind dort mittels Kernextrakt nachweisbar (Abbildung 3-5 C und D). Dabei dient Lamin B als Beladungskontrolle im Gesamtzellextrakt und bei der Durchführung des Kernextraktes als Kernmarker und β -Actin als zytosolischer Marker und Beladungskontrolle im Western Blot.

3.1.5. Kinetik zur Genexpression Hypoxie-regulierter Gene in HMEC-1 Zellen unter Hypoxie

Die beiden Transkriptionsfaktoren HIF1 und HIF2 werden wie unter 3.1.4 gezeigt unter Hypoxie stabilisiert und liegen im Zellkern vor. Dort lösen sie als Transkriptionsfaktor im Komplex mit Co-Aktivatoren die Expression von Hypoxie-regulierten Genen aus. Nachfolgend wurde eine Kinetik durchgeführt um den zeitlichen Verlauf der Genexpression von HIF-Zielgenen unter Hypoxie zu beschreiben.

3.1.5.1. Kinetik zur Expression von HIF1A und HIF2A

Für die Expression von *HIF1A* und *HIF2A* als Zielgene ihrer selbst zeigt sich ein schwankender Verlauf über den Versuchszeitraum von 44 Stunden unter Normoxie und Hypoxie (Abbildung 3-6 A und B). Sowohl *HIF1A* als auch *HIF2A* sind dabei nicht Hypoxie-induziert. Dies spiegelt die Regulation von HIF1 und HIF2 auf Proteinebene wider, wobei das Gen kontinuierlich mit Schwankungen transkribiert, die mRNA translatiert und der Faktor letztendlich auf Proteinebene reguliert wird.

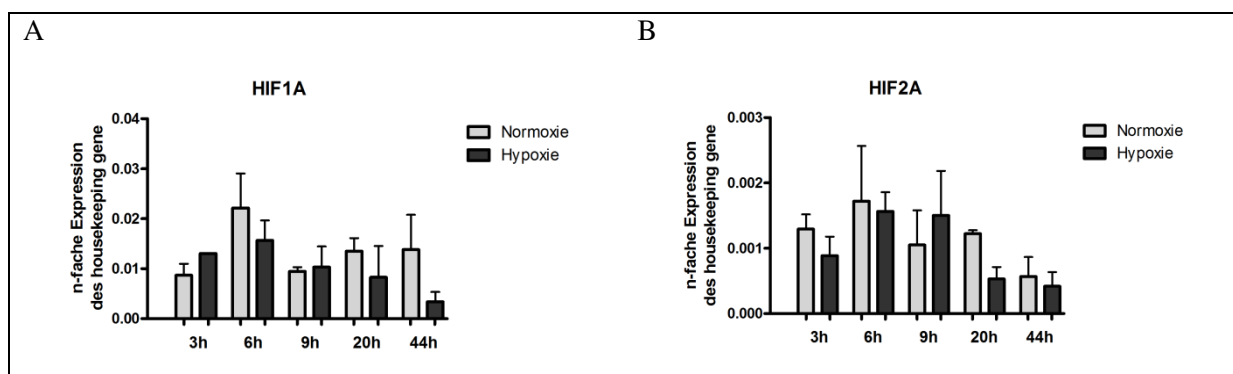


Abbildung 3-6 Kinetik zur Expression der Gene *HIF1A* und *HIF2A* in HMEC-1 Zellen.

HMEC-1 Zellen exprimieren die Gene (A) *HIF1A* und (B) *HIF2A* unter Normoxie und Hypoxie. Im zeitlichen Verlauf von 3h bis 44h unterliegt die Expression der Gene (A) *HIF1A* und (B) *HIF2A* Schwankungen, ohne eine deutliche Suppression oder Induktion unter Hypoxie zu zeigen. Die Expression der Gene wird als n-fache Expression des „housekeeping gene“ *EF1A* dargestellt (n=3, orientierende Untersuchung).

3.1.5.2. Kinetik zur Expression von Bioenergetik-assoziierten Genen

Als typische Hypoxie-regulierte Gene und damit auch HIF-Zielgene werden in der Literatur die Gene *PGK1*, *GAPDH*, *LDHA* und *GLUT1* beschrieben [38]. Alle vier Gene erfüllen dabei wichtige Funktionen im Bereich der Bioenergetik (siehe Kapitel 1.3).

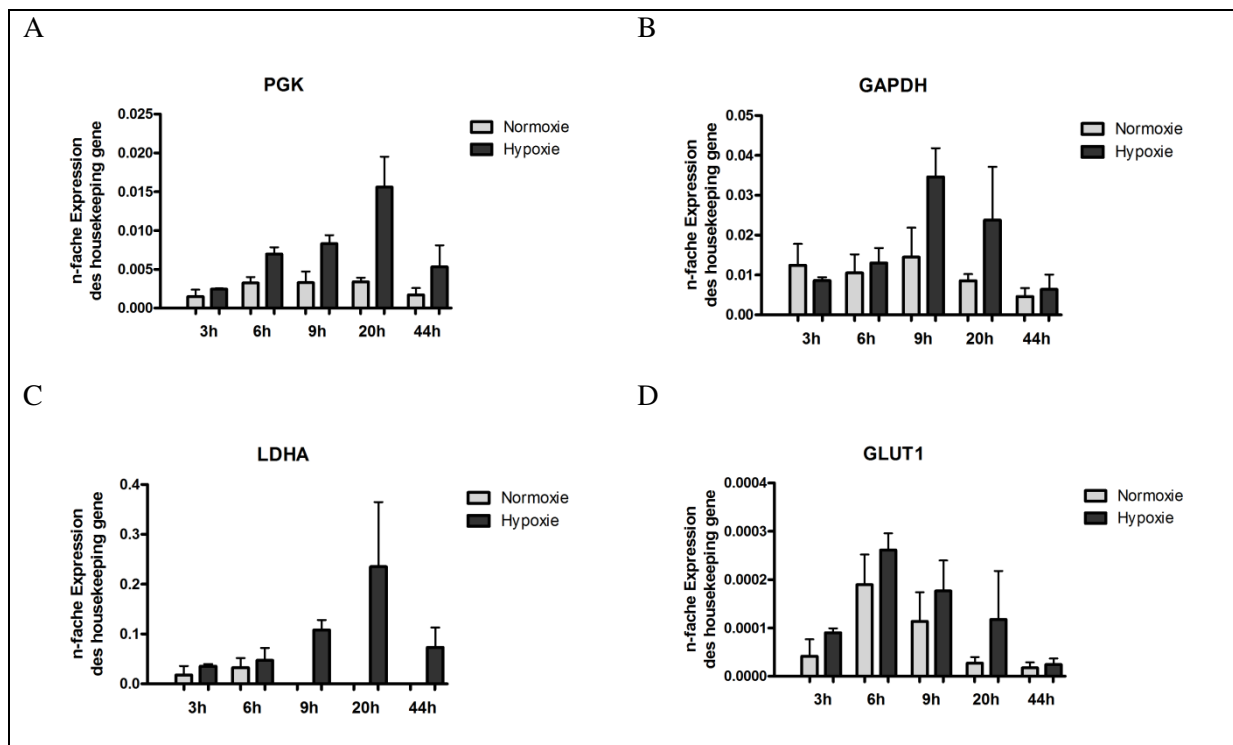


Abbildung 3-7 Kinetik zur Expression der Gene *PGK*, *GAPDH*, *LDHA* und *GLUT1* in HMEC-1 Zellen.

HMEC-1 Zellen exprimieren die Gene (A) *PGK*, (B) *GAPDH*, (C) *LDHA* und (D) *GLUT1* unter Normoxie und Hypoxie. Im zeitlichen Verlauf von 3h bis 44h unterliegt die Expression des Gens (A) *PGK* einer Induktion unter Hypoxie mit einer maximalen Expression nach 20h. Im zeitlichen Verlauf der Kinetik unterliegt die Expression des Gens (B) *GAPDH* einer Induktion unter Hypoxie mit einer maximalen Expression nach 9h. Im zeitlichen Verlauf der Kinetik unterliegt die Expression des Gens (C) *LDHA* einer Induktion unter Hypoxie mit einer maximalen Expression nach 20h, wobei die Expression unter Normoxie am unteren Detektionslimit liegt. Im zeitlichen Verlauf der Kinetik unterliegt die Expression des Gens (D) *GLUT1* einer Induktion unter Hypoxie mit einer maximalen Expression nach 6h. Die Expression der Gene wird als n-fache Expression des „housekeeping gene“ *EF1A* dargestellt (n=3, orientierende Untersuchung).

Die Gene *PGK1*, *GAPDH*, *LDHA* und *GLUT1* zeigen ein Hypoxie-abhängiges Genexpressionsprofil (Abbildung 3-7). Eine Inkubation von HMEC-1 Zellen unter hypoxischen Bedingungen induziert die Genexpression bei allen vier Genen zu jedem Zeitpunkt, mit Ausnahme der Expression von *GAPDH* zum Zeitpunkt von 3h (Abbildung 3-7 B). Für das Gen *PGK1* zeigt sich am deutlichsten die Hypoxie-induzierte Genexpression bei

einer Inkubationsdauer von 20 Stunden mit einer 4,5-fachen Steigerung der Expression unter Hypoxie. Anschließend sinkt das *PGK1*-Expressionsniveau wieder ab (Abbildung 3-7 A). Bei dem Gen *GAPDH* zeigt sich die Hypoxie-induzierte Genexpression am stärksten bei einer Inkubationsdauer zwischen 9 und 20 Stunden mit einer rund 2,5-fachen Steigerung der Expression unter Hypoxie, anschließend sinkt das Expressionsniveau auch hier wieder ab (Abbildung 3-7 B). Das Gen *LDHA* weist die stärkste Induktion unter Hypoxie nach 20 Stunden Inkubation auf, wobei die Expression von *LDHA* unter Normoxie insgesamt sehr gering ist (Abbildung 3-7 C). Das Gen *GLUT1* des Glucosetransporters weist den höchsten Expressionswert nach 6 Stunden Inkubation unter Hypoxie auf, wobei der Unterschied zur Expression unter Normoxie nach 20h Inkubation mit einer Steigerung um den Faktor 4 am deutlichsten ist (Abbildung 3-7 D). Zusammenfassend ist eine eindeutige Induktion der Gene *PGK1*, *GAPDH*, *LDHA* und *GLUT1* unter Hypoxie nachweisbar, welche nach 20-stündiger Inkubation unter Hypoxie am deutlichsten ausfällt.

3.1.5.3. Kinetik zur Expression von Angiogenese-assoziierten Genen

In der Literatur werden die Gene *VEGFA* und *IL8* als HIF-abhängig beschrieben [38, 64]. Im Folgenden ist der zeitliche Verlauf der Genexpression von *VEGFA* und *IL8* in HMEC-1 Zellen über einen Zeitraum von 3 bis 44 Stunden Inkubation dargestellt.

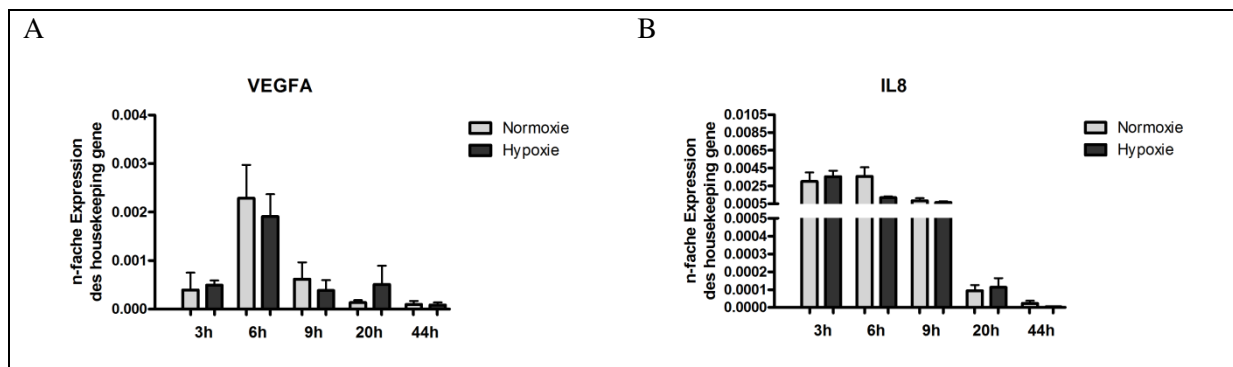


Abbildung 3-8 Kinetik zur Expression der Gene *VEGFA* und *IL8* in HMEC-1 Zellen.

HMEC-1 Zellen exprimieren die Gene (A) *VEGFA* und (B) *IL8* unter Normoxie und Hypoxie. Im zeitlichen Verlauf von 3h bis 44h unterliegt die Expression des Gens (A) *VEGFA* keiner festen Induktion unter Hypoxie, wobei die maximale Expression nach 6h messbar ist. Im zeitlichen Verlauf der Kinetik unterliegt die Expression des Gens (B) *IL8* keiner Induktion unter Hypoxie und weist eine maximale Expression nach 3h auf. Im zeitlichen Verlauf der Kinetik nimmt die Expression von *IL8* stark ab. Die Expression der Gene wird als n-fache Expression des „housekeeping gene“ *EF1A* dargestellt (n=3, orientierende Untersuchung).

Das Gen *VEGFA* zeigt den höchsten Expressionswert nach 6-stündiger Inkubation unter Normoxie. Anschließend sinken die Expressionswerte unter Normoxie und Hypoxie wieder ab. Eine Induktion um den Faktor 3,8 unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie ist nach 20 Stunden Inkubation nachzuweisen (Abbildung 3-8 A). Das Gen *IL8* zeigt in der Kinetik keine eindeutige Induktion unter Hypoxie. Lediglich zum Zeitpunkt von 20 Stunden ist ein numerischer Unterschied mit dem Faktor 1,2 nachweisbar. Insgesamt sinkt die *IL8* Expression im zeitlichen Verlauf sehr stark ab und ist nach 44 Stunden Inkubation kaum noch detektierbar (Abbildung 3-8 B). Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Angiogenese-assoziierten Gene *VEGFA* und *IL8* in der Kinetik keine signifikante Expressionszunahme unter Hypoxie aufweisen. Eine numerische Hypoxie-induzierte Genexpression ist vergleichbar zu den Bioenergetik-assoziierten Genen nach 20-stündiger Inkubation nachweisbar.

3.1.6. Genexpression Hypoxie-regulierter Gene in HMEC-1 Zellen unter Hypoxie

Die Genexpression der Hypoxie-regulierten Gene in HMEC-1 Zellen folgt wie unter 0 beschrieben einer Kinetik. Dabei kann beobachtet werden, dass die Induktion unter Hypoxie zu einem Zeitpunkt von 20 Stunden Inkubation am deutlichsten ausfällt. Dieser Zeitpunkt entspricht zudem dem Erfassungszeitpunkt des Angiogenese-Assays und der Probennahme für die Protein- und RNA-Proben sowie der Zellkulturüberstände. Im Nachfolgenden werden die Genexpressionen Hypoxie-regulierter Gene in HMEC-1 Zellen nach 20-stündiger Inkubation unter Normoxie und Hypoxie dargestellt.

3.1.6.1. Die Expression von HIF1A und HIF2A

Die Expression von *HIF1A* und *HIF2A* spiegelt die Regulation der beiden Faktoren auf Proteinebene wider. Sowohl für die Expression von *HIF1A* als auch *HIF2A* ist keine signifikante Induktion oder Suppression nach 20 Stunden hypoxischer Inkubation messbar (Abbildung 3-9).

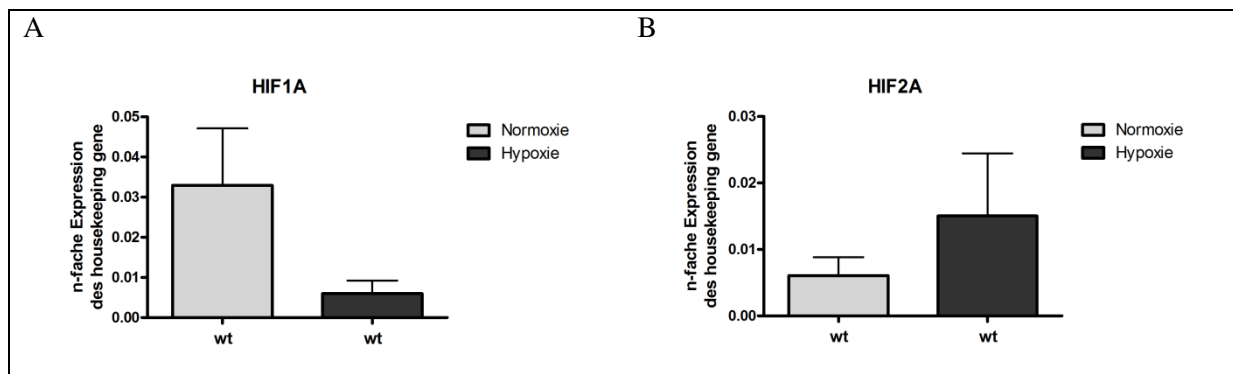


Abbildung 3-9 Die Expression der Gene *HIF1A* und *HIF2A* in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen (engl. wildtype – wt) exprimieren die Gene (A) *HIF1A* und (B) *HIF2A* unter Normoxie und Hypoxie. Die Expression des Gens (A) *HIF1A* ist unter Normoxie numerisch höher als unter Hypoxie ($p=0,3828$). Die Expression des Gens (B) *HIF2A* ist unter Normoxie numerisch niedriger als unter Hypoxie ($p=0,3125$). Die Expression der Gene wird als n-fache Expression des „housekeeping gene“ *EF1A* dargestellt ($n=9$, Wilcoxon signed rank test).

3.1.6.2. Die Expression von Bioenergetik-assoziierten Genen

Betrachtet man die Bioenergetik-assoziierten HIF-Zielgene *PGK1*, *GAPDH*, *LDHA* und *GLUT1* zeigen diese eine Induktion der Genexpression nach 20-stündiger Inkubation unter Hypoxie (Abbildung 3-10).

Die Expression des Gens *PGK1* steigert sich signifikant unter hypoxischen Bedingungen um etwas mehr als das Doppelte. Die Expression von *GAPDH* wird numerisch um das 1,7-fache unter Hypoxie erhöht. Das Gen der Laktat-Dehydrogenase A *LDHA* weist unter Hypoxie eine signifikant gesteigerte Expression um den Faktor 6 auf. Für *GLUT1* beträgt der Wert der signifikanten Induktion 4,5. Zusammengefasst zeigen HMEC-1 Zellen unter Hypoxie eine Induktion der bekannten Bioenergetik-assoziierten HIF-Zielgene.

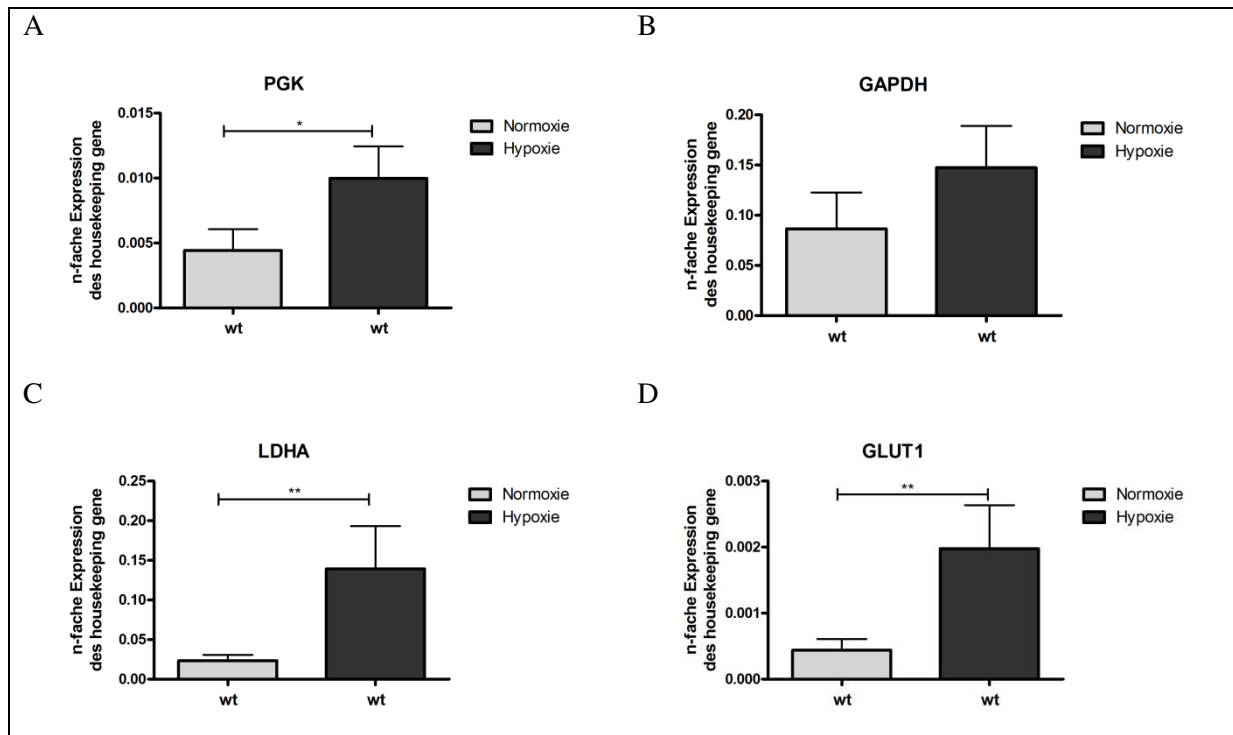


Abbildung 3-10 Die Expression der Gene *PGK*, *GAPDH*, *LDHA* und *GLUT1* in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen (engl. wildtype – wt) exprimieren die Gene (A) *PGK*, (B) *GAPDH*, (C) *LDHA* und (D) *GLUT1* unter Normoxie und Hypoxie. Die Expression des Gens (A) *PGK* ist unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie ($p=0,0137$). Die Expression des Gens (B) *GAPDH* ist unter Hypoxie numerisch höher als unter Normoxie ($p=0,2783$). Die Expression des Gens (C) *LDHA* ist unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie ($p=0,0098$). Die Expression des Gens (D) *GLUT1* ist unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie ($p=0,0098$). Die Expression der Gene wird als n-fache Expression des „housekeeping gene“ *EF1A* dargestellt ($n=12$, Wilcoxon signed rank test).

3.1.6.3. Die Expression von Angiogenese-assoziierten Genen

Die Inkubation von HMEC-1 Zellen für 20 Stunden unter Hypoxie führt zu einer vermehrten Angiogenese wie im Kapitel 3.1.2 gezeigt. Untersucht man die Genexpression der Angiogenese-assoziierten Gene *VEGFA* und *IL8* lässt sich feststellen, dass beide Gene keine signifikante Expressionszunahme unter Hypoxie aufweisen (Abbildung 3-11). Die Expressionswerte sowohl für *VEGFA* als auch *IL8* liegen unter Normoxie und Hypoxie auf annähernd gleichem Niveau.

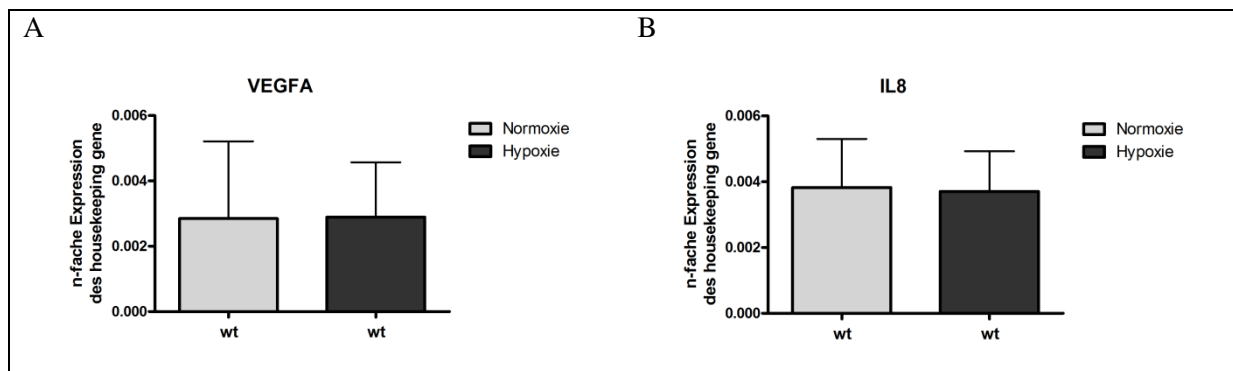


Abbildung 3-11 Die Expression der Gene *VEGFA* und *IL8* in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen (engl. wildtype – wt) exprimieren die Gene (A) *VEGFA* und (B) *IL8* unter Normoxie und Hypoxie. Die Expression des Gens (A) *VEGFA* ist unter Normoxie und Hypoxie nahezu identisch ($p=0,1953$; $n=9$, Wilcoxon signed rank test). Die Expression des Gens (B) *IL8* ist unter Normoxie und Hypoxie nahezu identisch ($p=0,7646$, $n=12$, Wilcoxon signed rank test). Die Expression der Gene wird als n-fache Expression des „housekeeping gene“ *EF1A* dargestellt.

3.1.7. Kinetik zur Sekretion löslicher Faktoren von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie

Die Inkubation von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie löst, wie im Kapitel 3.1.5 und 3.1.6 gezeigt, die Induktion von Genen aus, welche der Zelle eine Adaptation an die veränderte Sauerstoffverfügbarkeit ermöglichen können. Im Folgenden wird die Wirkung von Hypoxie auf sowohl das Repertoire als auch die Menge an sekretierten Faktoren in einer Kinetik beschrieben.

Insgesamt wurden 28 Zytokine und Wachstumsfaktoren auf ihr Vorhandensein und ihre Konzentration im Überstand der kultivierten HMEC-1 Zellen hin untersucht.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Konzentrationsverlauf der in der Kinetik detektierbaren Faktoren in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer der HMEC-1 Zellen unter Normoxie bzw. Hypoxie. Dabei spiegelt die gestrichelte Linie die Norm-Serumwerte wider.

3. Ergebnisse

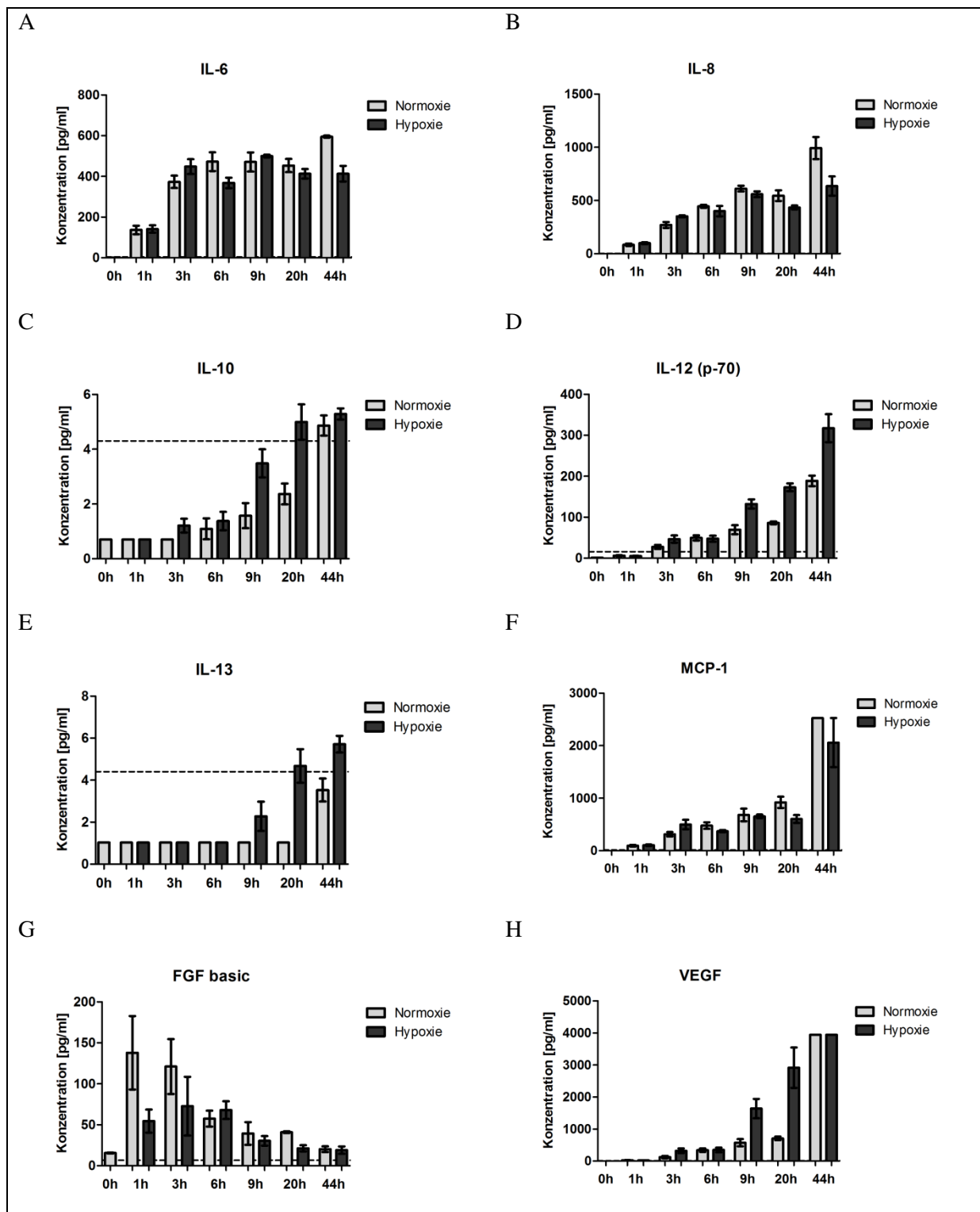


Abbildung 3-12 Kinetik zur Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1, FGF basic und VEGF in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen sekretieren (A) IL-6, (B) IL-8, (C) IL-10, (D) IL-12, (E) IL-13, (F) MCP-1, (G) FGF basic und (H) VEGF unter Normoxie und Hypoxie. Im zeitlichen Verlauf der Kinetik akkumuliert (A) IL-6 im

Zellkulturüberstand und die sekretierten Mengen sind unter Normoxie außer nach 3h und 9h numerisch höher als unter Hypoxie. Im zeitlichen Verlauf der Kinetik akkumuliert auch (B) IL-8 und die sekretierten Mengen sind ab 6h Inkubation unter Normoxie höher als unter Hypoxie. (C) IL-10 akkumuliert im Verlauf der Kinetik im Zellkulturüberstand und weist nach 9h und 20h unter Hypoxie erhöhte Werte im Vergleich zur Normoxie auf. Das Interleukin (D) IL-12 akkumuliert im Verlauf der Kinetik im Zellkulturüberstand und weist unter Hypoxie erhöhte Werte im Vergleich zur Normoxie auf. (E) IL-13 akkumuliert im Verlauf der Kinetik im Zellkulturüberstand und weist nach 20h und 44h unter Hypoxie erhöhte Werte im Vergleich zur Normoxie auf. Das Zytokin (F) MCP-1 akkumuliert im Verlauf der Kinetik im Zellkulturüberstand und weist unter Hypoxie tendenziell verminderte Werte im Vergleich zur Normoxie auf. Der Faktor (G) FGF basic liegt im Verlauf der Kinetik vermindert im Zellkulturüberstand vor und weist unter Hypoxie tendenziell verminderte Werte im Vergleich zur Normoxie auf. Der Wachstumsfaktor (H) VEGF akkumuliert im Verlauf der Kinetik stark im Zellkulturüberstand und weist unter Hypoxie stark erhöhte Werte im Vergleich zur Normoxie auf. Vergleichend zu den gemessenen Konzentrationen im Zellkulturüberstand sind die Norm-Serumwerte mittels gestrichelter Linie dargestellt (n=3, orientierende Untersuchung).

In der Kinetik zeigt sich, dass im Überstand von HMEC-1 Zellen die Interleukine IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13 sowie MCP-1, FGF basic und VEGF detektierbar sind und höhere Konzentrationen als die vom Hersteller angegebenen Norm-Serumlevel aufweisen. Alle weiteren im Multiplex Suspension Array enthaltenen Faktoren lagen im Überstand von HMEC-1 Zellen unterhalb des Detektionslimits.

So liegt das Norm-Serumlevel für IL-6 bei 4,6pg/ml, wobei im gemessenen Überstand der Zellkultur 100-fach höhere Werte gemessen werden. Der höchste gemessene Wert liegt bei 595pg/ml nach 44-stündiger Inkubation unter Normoxie. Dabei ist keine signifikante Induktion unter Hypoxie erkennbar, tendenziell liegen die gemessenen Konzentrationen unter Hypoxie auf gleichem Niveau oder unterhalb der Normoxie-Werte (Abbildung 3-12 A). Vergleichbares gilt für die Sekretion von IL-8, welches über den Versuchszeitraum von 44h im Überstand akkumuliert und im Vergleich zum Norm-Serumwert von 3,9pg/ml bis auf 993pg/ml gesteigerte Werte aufweist. Dabei sind die gemessenen Konzentrationen unter Hypoxie ab 6 Stunden Inkubation geringer als unter Normoxie (Abbildung 3-12 B). Das Interleukin 10 übersteigt im Überstand erst nach 20 Stunden Inkubation unter Hypoxie bzw. nach 44 Stunden unter Normoxie und Hypoxie den Norm-Serumwert von 4,3pg/ml. Hypoxie verursacht hierbei eine tendenziell stärkere Sekretion von IL-10 im Vergleich zur Normoxie (Abbildung 3-12 C). Gleiches gilt für IL-12, welches sich im zeitlichen Verlauf ansammelt und nach 44 Stunden Inkubation unter Hypoxie eine Konzentration von 317pg/ml im Vergleich zum Norm-Serumwert von 15,8pg/ml aufweist (Abbildung 3-12 D). Im Gegensatz dazu übersteigt die Konzentration an Interleukin 13 im Überstand erst nach 20 Stunden Inkubation unter Hypoxie bzw. nach 44 Stunden unter Normoxie und Hypoxie den Norm-Serumwert von 4,4pg/ml. Dabei zeigt sich tendenziell eine verstärkte Sekretion unter

Hypoxie (Abbildung 3-12 E). Anders verhält es sich mit der Konzentration von MCP-1 im Überstand, welche unter Hypoxie tendenziell geringer ist als unter Normoxie. Dabei akkumuliert MCP-1 über den Versuchszeitraum auf das über Eintausendfache des Norm-Serumwertes von 16pg/ml (Abbildung 3-12 F). Im Gegensatz dazu verringert sich die im Überstand detektierbare Konzentration von FGF basic im Laufe der Inkubation. So treten die höchsten Messwerte nach einstündiger Inkubation auf, wobei tendenziell die Konzentrationen unter Normoxie höher liegen als unter Hypoxie um sich gegen Ende der Inkubationszeit anzugleichen (Abbildung 3-12 G). Für den Wachstumsfaktor VEGF zeigt sich im Laufe der Kinetik eine stark erhöhte Sekretion unter Hypoxie gepaart mit einer Akkumulation im Überstand über den Versuchszeitraum, sodass nach 44 Stunden Inkubation bereits das obere Detektionslimit des Testsystems erreicht wird (Abbildung 3-12 H).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass im zeitlichen Verlauf eine Akkumulation der Zytokine IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13 sowie MCP-1 und VEGF im Überstand der Zellen stattfindet. Der Faktor FGF basic nimmt im zeitlichen Verlauf in seiner Konzentration ab. Dabei sind IL-10, IL-12, IL-13 und VEGF unter Hypoxie in höheren Konzentrationen detektierbar während IL-6, IL-8, MCP-1 und FGF-basic unter Hypoxie verminderte Konzentrationen im Zellkulturüberstand aufweisen.

3.1.8. Die Sekretion löslicher Faktoren von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie

Im vorangegangenen Unterkapitel 3.1.7. konnte mittels orientierender Kinetik gezeigt werden, dass HMEC-1 Zellen in der Lage sind, verschiedene Zytokine zu sekretieren, welche dann größtenteils über den zeitlichen Verlauf im Überstand akkumulieren. Im Folgenden gibt Tabelle 3-1 die gemessenen Zytokine, die geringste sowie die höchste detektierte Konzentration im Überstand und die Norm-Serumwerte zum Probenzeitpunkt von 20 Stunden wieder. Hervorgehoben sind dabei die Zytokine und Wachstumsfaktoren, bei denen die detektierte Konzentration im Zellkulturüberstand oberhalb des Norm-Serumwertes liegt.

Tabelle 3-1 Die Sekretion von löslichen Faktoren in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen sekretieren IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1, FGF basic, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 α , VEGF und MIF. Die Spalte c_{\min} gibt die Hälfte der kleinsten messbaren Konzentration im Bio-Plex Pro™ Cytokine Assay (unteres Detektionslimit) an. Die Spalte c_{\max} gibt die höchste gemessene Konzentration des Zytokins im Bio-Plex Pro™ Cytokine Assay an (n.m. nicht messbar). Die Spalte Norm-Serumkonzentration zeigt die Serum-Normwerte an. Hervorgehoben sind Zytokine, die oberhalb der Norm-Serumwerte detektiert wurden (¹Norm-Serumwerte nach [65] und ²Bio-Plex Tech Note 6029).

Zytokin	c_{\min} [pg/ml]	c_{\max} [pg/ml]	Norm-Serumkonzentration [pg/ml] ¹
IL-1 β	≤ 0.89	n.m.	2.6
IL-1ra	≤ 12.49	n.m.	132.6
IL-2	≤ 0.48	n.m.	1.1
IL-4	≤ 0.84	n.m.	2.7
IL-5	≤ 0.84	n.m.	4.4
IL-6	≤ 12.17	= 499.53	4.6
IL-7	≤ 6.50	n.m.	21.3
IL-8	≤ 12.04	= 690.55	3.9
IL-9	≤ 4.60	= 28.09	12.4
IL-10	≤ 1.86	= 6.26	4.3
IL-12 (p70)	≤ 8.82	= 191.91	15.8
IL-13	≤ 1.03	= 6.27	4.4
IL-15	≤ 0.80	n.m.	0.5
IL-17	≤ 5.39	n.m.	21.1
Eotaxin	≤ 5.95	= 12.57	30.8

3. Ergebnisse

Zytokin	c_{\min} [pg/ml]	c_{\max} [pg/ml]	Norm-Serumkonzentration [pg/ml] ¹
FGF basic	≤ 5.20	= 42.26	6.8
G-CSF	≤ 7.08	= 34.85	52.4
GM-CSF	≤ 2.62	n.m.	5.6
IFN- γ	≤ 11.27	= 111.23	77.1
IP-10	≤ 1.17	= 50.74	591.7
MCP-1	= 48.50	= 1102.97	16.0
MIP-1 α	≤ 1.47	= 10.61	6.9
MIP-1 β	≤ 0.41	n.m.	35.4
PDGF bb	≤ 8.05	= 26.41	1571.2
RANTES	≤ 8.54	= 11.08	203.64 ²
TNF- α	≤ 6.65	n.m.	35.3
VEGF	≤ 8.78	= 3938.18	11.0
MIF	≤ 12.32	= 1909.10	250.7

Um nun eine Aussage über die Sekretion der Faktoren unter Hypoxie treffen zu können, sind in Abbildung 3-13 die einzelnen Faktoren, welche im Mittel oberhalb der Norm-Serumwerte liegen, im Diagramm dargestellt.

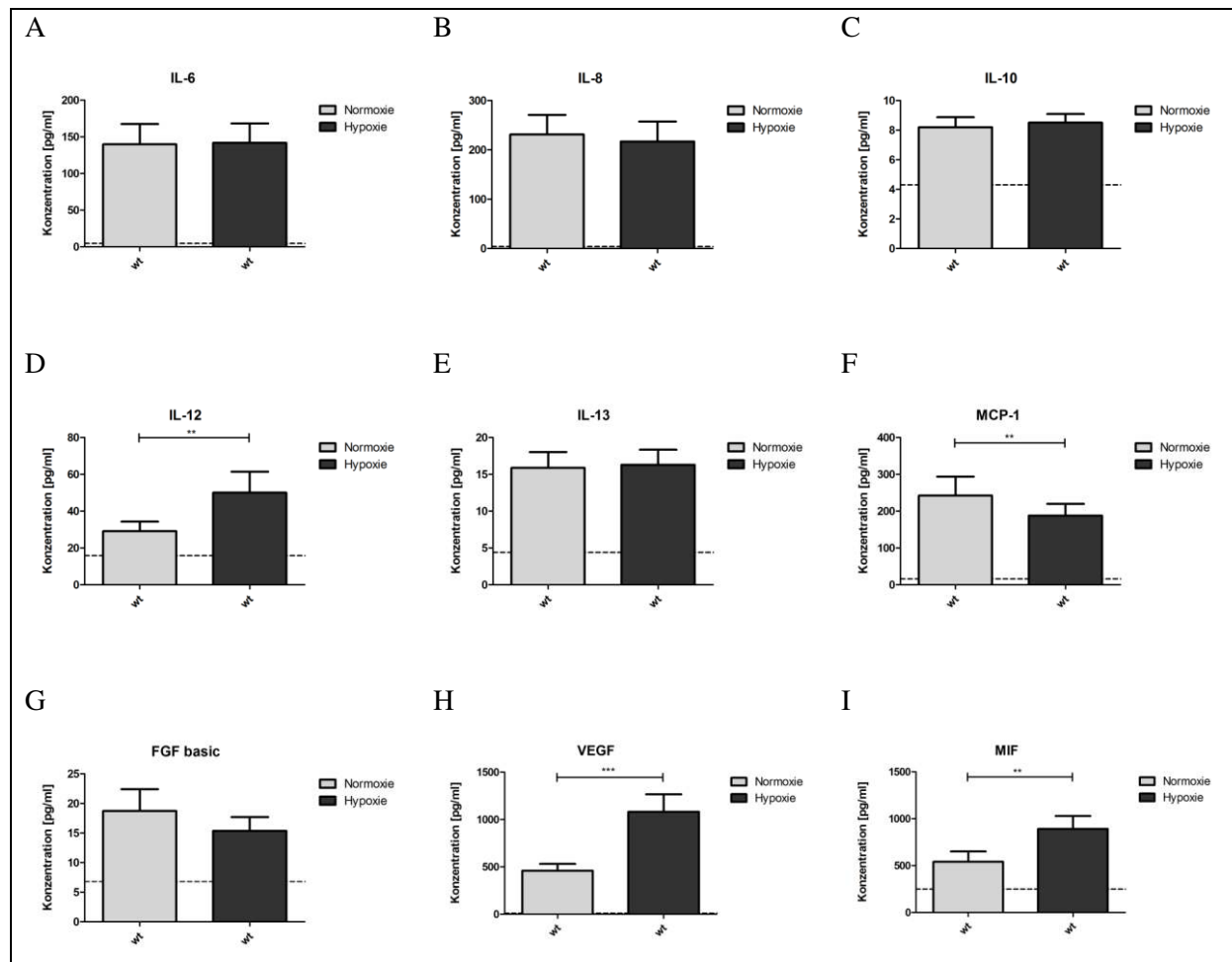


Abbildung 3-13 Die Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1, FGF basic, VEGF und MIF in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen sekretieren (A) IL-6, (B) IL-8, (C) IL-10, (D) IL-12, (E) IL-13, (F) MCP-1, (G) FGF basic, (H) VEGF und (I) MIF unter Normoxie und Hypoxie. (A) Die Sekretion von IL-6 ist unter Normoxie und Hypoxie nahezu gleich ($p=0,8977$; $n=26$). (B) Die Sekretion von IL-8 ist unter Normoxie tendenziell höher als unter Hypoxie ($p=0,0803$; $n=26$). (C) Die Sekretion von IL-10 ist unter Hypoxie numerisch höher als unter Normoxie ($p=0,2500$; $n=26$). (D) Die Sekretion von IL-12 ist unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie ($p=0,0039$; $n=26$). (E) Die Sekretion von IL-13 ist unter Hypoxie numerisch höher als unter Normoxie ($p=0,2500$; $n=26$). (F) Die Sekretion des Faktors MCP-1 ist unter Hypoxie signifikant geringer als unter Normoxie ($p=0,0083$; $n=26$). (G) Die Sekretion des Faktors FGF basic ist unter Hypoxie tendenziell geringer als unter Normoxie ($p=0,1094$; $n=15$). (H) Die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF ist unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie ($p=0,0006$; $n=26$). (I) Die Sekretion des Faktors MIF ist unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie ($p=0,0025$; $n=23$). Vergleichend zu den gemessenen Konzentrationen im Zellkulturüberstand sind die Norm-Serumwerte mittels gestrichelter Linie dargestellt (Statistik: Wilcoxon signed rank test).

Die Sekretion von IL-6 liegt unter Normoxie und Hypoxie bei 140pg/ml (Abbildung 3-13 A) und weist somit keine hypoxische Induktion auf. Das Interleukin IL-8 zeigt eine leicht verminderte Sekretion unter Hypoxie, wobei der Wert tendenziell von 231pg/ml unter Normoxie auf 216pg/ml unter Hypoxie absinkt (Abbildung 3-13 B). IL-10 weist einen minimalen Anstieg der Sekretion unter Hypoxie um 0,3pg/ml auf und liegt knapp über dem Norm-Serumwert von 4,3pg/ml (Abbildung 3-13 C). Das Interleukin IL-12 zeigt eine signifikant erhöhte Sekretion unter Hypoxie mit einem Anstieg der messbaren Konzentration von 29pg/ml unter Normoxie auf 50pg/ml unter Hypoxie (Abbildung 3-13 D). Ähnlich wie IL-10 zeigt IL-13 einen minimalen Anstieg der Sekretion um 0,5pg/ml unter Hypoxie (Abbildung 3-13 E). Das Chemokin MCP-1 zeigt eine signifikant verminderte Sekretion unter Hypoxie. Die messbare Konzentration sinkt von 242pg/ml auf 187pg/ml unter Hypoxie ab (Abbildung 3-13 F). Der Wachstumsfaktor FGF basic zeigt unter Hypoxie ebenfalls tendenziell eine Abnahme der sekretierten Menge (Abbildung 3-13 G). Stark signifikant ist die Induktion der Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF unter Hypoxie in HMEC-1 Zellen. So steigt die messbare Konzentration um mehr als das Doppelte von 459pg/ml auf 1081pg/ml an (Abbildung 3-13 H). Ebenfalls signifikant induziert ist die Sekretion des Zytokins MIF unter Hypoxie. Hier erhöht sich die ermittelte Konzentration im Überstand von 540pg/ml unter Normoxie auf 891pg/ml unter Hypoxie (Abbildung 3-13 I).

Zusammenfassend findet man unter Hypoxie eine signifikant verstärkte Sekretion der Faktoren IL-12, VEGF und MIF sowie eine signifikant verminderte Sekretion des Chemokins MCP-1. Die Interleukine IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 und der Faktor FGF basic sind nicht signifikant erhöht oder vermindert im Überstand der Zellen unter Hypoxie nachweisbar.

3.1.9. Der zelluläre Energiepool in Form von ATP und ADP

Unter dem Aspekt der veränderten Energiegewinnung von Zellen unter Hypoxie, also dem Wechsel von oxidativer Phosphorylierung zu anaerober Glykolyse, wurde im Folgenden der zelluläre Energiepool in Form von ATP und ADP bestimmt. Dazu wurde der Quotient aus vorliegendem intrazellulären ADP und ATP gebildet. Die entstandene Ratio ermöglicht eine Aussage über den Energiegehalt der Zelle. Je höher der Quotient, desto weniger Energie steht der Zelle in Form von ATP zur Verfügung.

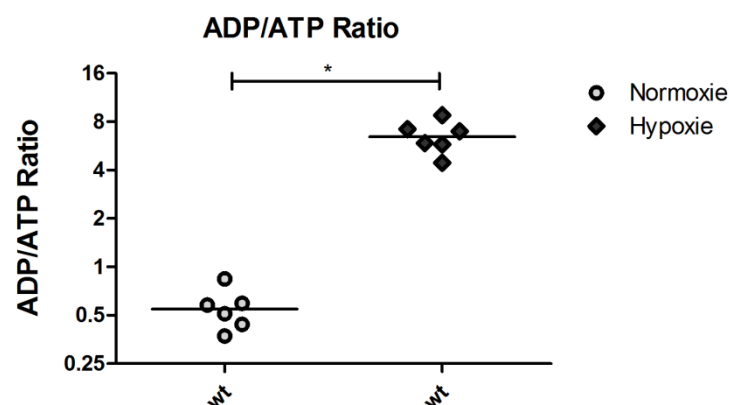


Abbildung 3-14 Der zelluläre Energiepool in Form von ATP und ADP in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen besitzen unter Hypoxie eine signifikant erhöhte ADP/ATP Ratio bzw. verhältnismäßig weniger Energie in Form von ATP normiert auf ADP unter Hypoxie. ($p=0,0313$; $n=6$, Wilcoxon signed rank test).

Bei der Bestimmung der ADP/ATP Ratio in HMEC-1 Zellen wird deutlich, dass die Ratio unter Hypoxie signifikant steigt. Es steht der Zelle also relativ zur Normoxie gesehen weniger ATP zur Verfügung (Abbildung 3-14).

3.2. Der Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α in HMEC-1 Zellen

Anhand der im Kapitel 3.1 beobachteten Effekte unter Hypoxie, wie der Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α , der gesteigerten Angiogenese, der differentiellen Genexpression, der gesteigerten Genexpression von HIF-Zielgenen sowie der gesteigerten Sekretion von Hypoxie-regulierten Faktoren wie VEGF lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die beschriebenen Effekte größtenteils HIF-1 bzw. HIF-2 vermittelt sein müssen. Um diese Hypothese zu verifizieren wurde ein stabiler shRNA-vermittelter Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α durchgeführt.

3.2.1. Durchflusszytometrische Kontrolle der Frequenz an Knockdown-Plasmid enthaltenden HMEC-1 Zellen

Die Reinheit der für die nachfolgenden Experimente verwendeten HMEC-1 Zellen bezüglich des Vorliegens des Knockdown-Plasmids innerhalb der Zelle wurde mittels der Co-Expression des grün fluoreszenten Proteins (GFP) durchflusszytometrisch ermittelt. In den weiteren Experimenten wurden dabei nur Zellen verwendet, die zu mehr als 80% GFP-positiv waren. Die Abbildung 3-15 zeigt exemplarisch ein Histogramm der in den Experimenten verwendeten Zellen. Verglichen werden hierbei untransduzierte HMEC-1 Zellen (wt) mit Zellen, die das Kontrollplasmid (scr) mit einer nicht-zielspezifischen shRNA-Sequenz tragen sowie Zellen, die ein Plasmid mit einer shRNA-Sequenz mit HIF-1 α (HIF1 kd) bzw. HIF-2 α (HIF2 kd) als Ziel tragen. Es sind die zu über 90% GFP-positiven transduzierten Zellen scr, HIF1 kd und HIF2 kd an einer starken Verschiebung der Signalintensität im Fluoreszenzkanal 1 nach rechts, was die Expression des Reporters GFP widerspiegelt, zu erkennen.

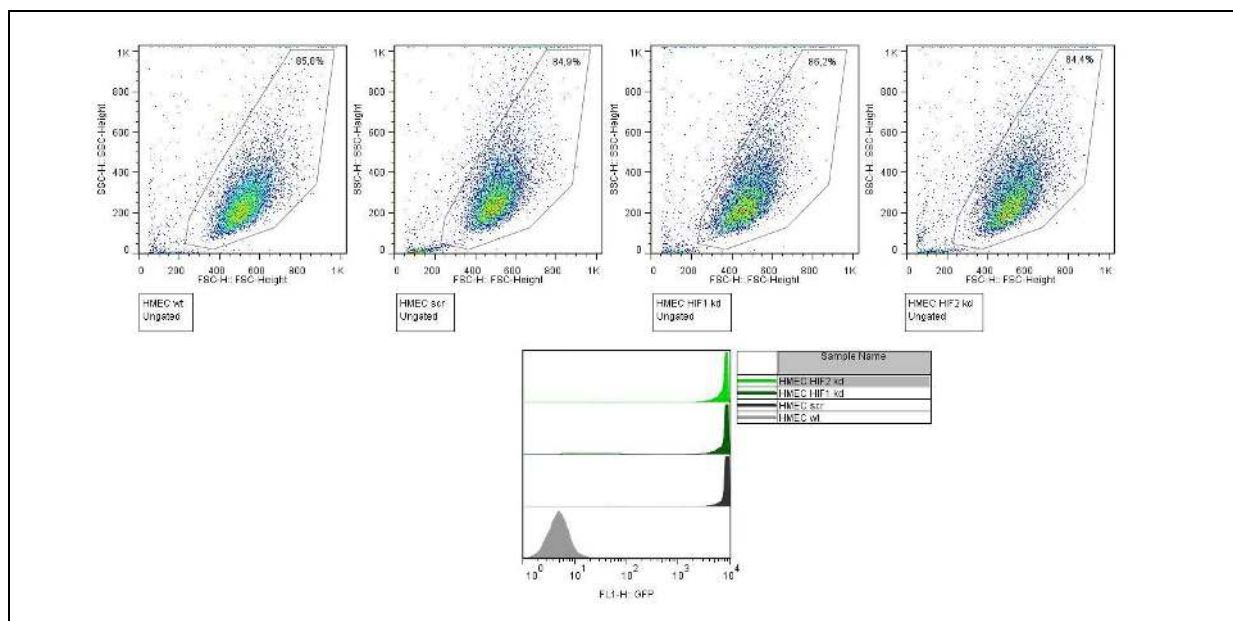


Abbildung 3-15 Nachweis der Aufnahme des Knockdownkonstrukt enthaltenden Plasmids pLL3.7 mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der GFP-Expression.

HMEC-1 Zellen (wt) sowie HMEC-1 Zellen mit pLL3.7-scr-shRNA- (scr), HIF-1 α -shRNA- (HIF1kd) und HIF-2 α -shRNA (HIF2kd) Konstrukt wurden nach Größe und Granularität eingegrenzt und auf ihre GFP-Expression hin untersucht. In allen durchgeführten Experimenten betrug die Frequenz GFP-positiver Zellen mit scr-shRNA, HIF-1 α -shRNA oder HIF-2 α -shRNA mehr als 80% - hier gezeigt eine exemplarische Abbildung zur GFP-Expression.

3.2.2. Nachweis des Knockdowns von HIF-1 α oder HIF-2 α auf Proteinebene

Die Verwendung von HMEC-1 Zellen, welche zu über 80% das Knockdown-Plasmid für HIF-1 α oder HIF-2 α tragen, reicht noch nicht aus, um eine Aussage über den tatsächlichen Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α treffen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Knockdownzellen auf Proteinebene auf das (Nicht-)Vorhandensein der jeweiligen Faktoren hin untersucht.

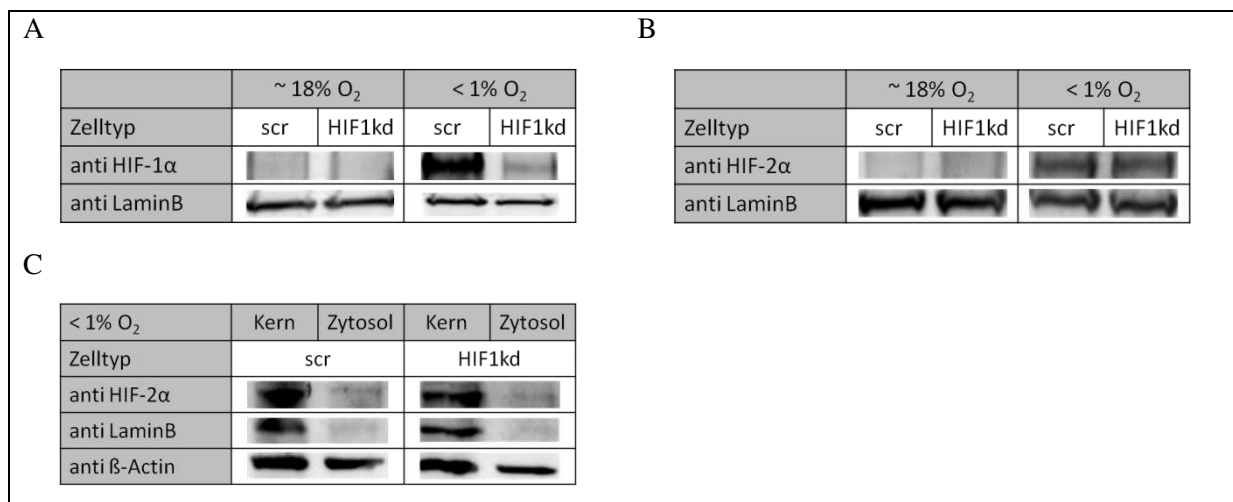


Abbildung 3-16 Western Blot Nachweis des Knockdowns von HIF-1 α und des Vorhandenseins von HIF-2 α auf Proteinebene in HMEC-1 Zellen mit pLL3.7-HIF-1 α -shRNA Konstrukt.

(A) HMEC-1 Zellen zeigen unter Hypoxie ($\leq 1\%$ O₂) eine Stabilisierung von HIF-1 α in scr Kontrollzellen und stark verminderte HIF-1 α Proteinlevel in HIF-1 α Knockdownzellen. (B) HIF-2 α ist in scr Kontrollzellen und HIF-1 α Knockdownzellen auf Proteinebene unter Hypoxie in gleichem Maße nachweisbar. Der Nachweis von Lamin B dient als Ladungskontrolle. Unter Hypoxie stabilisiertes (C) HIF-2 α transloziert in scr Kontrollzellen und HIF-1 α Knockdownzellen in den Kern und ist dort nachweisbar. Der Nachweis von Lamin B dient als Nachweis der Kernfraktion und β -Actin als Ladungskontrolle und zytosolischer Marker.

Abbildung 3-16 A zeigt die Degradation von HIF-1 α unter Normoxie (18% O₂) in scrambled shRNA Kontrollzellen (scr) und HIF-1 α Knockdownzellen (HIF1kd). Es ist kein HIF-1 α unter Normoxie nachweisbar. Unter Hypoxie ($\leq 1\%$ O₂) ist HIF-1 α in scr Kontrollzellen nachweisbar, während es bei gleichem Gesamtproteingehalt (Ladungskontrolle Lamin B) in HIF-1 α Knockdownzellen stark vermindert vorliegt. Der Knockdown von HIF-1 α ist somit erfolgreich. Um unspezifische Effekte der HIF-1 α -shRNA auf die Expression von HIF-2 α auszuschließen, wurde der Proteingehalt von HIF-2 α in HIF-1 α Knockdownzellen bestimmt (Abbildung 3-16 B). Dabei wird HIF-2 α unter Normoxie degradiert. Unter Hypoxie wird HIF-2 α sowohl in scr Kontrollzellen als auch in HIF-1 α Knockdownzellen in vergleichbarem

3. Ergebnisse

Maße stabilisiert. Darüber hinaus transloziert das stabilisierte HIF-2 α unter Hypoxie in den Zellkern, wie aus Abbildung 3-16 C ersichtlich wird. HIF-2 α liegt im Kern von scr Kontrollzellen und HIF-1 α Knockdownzellen in vergleichbarer Menge vor, wobei die Normierung der Proteinmenge über Lamin B als Kernmarker und β -Actin als hauptsächlich zytosolischen Marker erfolgt. Zusammenfassend kann man festhalten, dass der Knockdown von HIF-1 α auf Proteinebene nachweisbar ist und HIF-2 α unverändert unter Hypoxie in den Kern transloziert. Vergleicht man dazu HMEC-1 Zellen mit HIF-2 α -shRNA-Plasmid ergibt sich das folgende Bild (Abbildung 3-17).

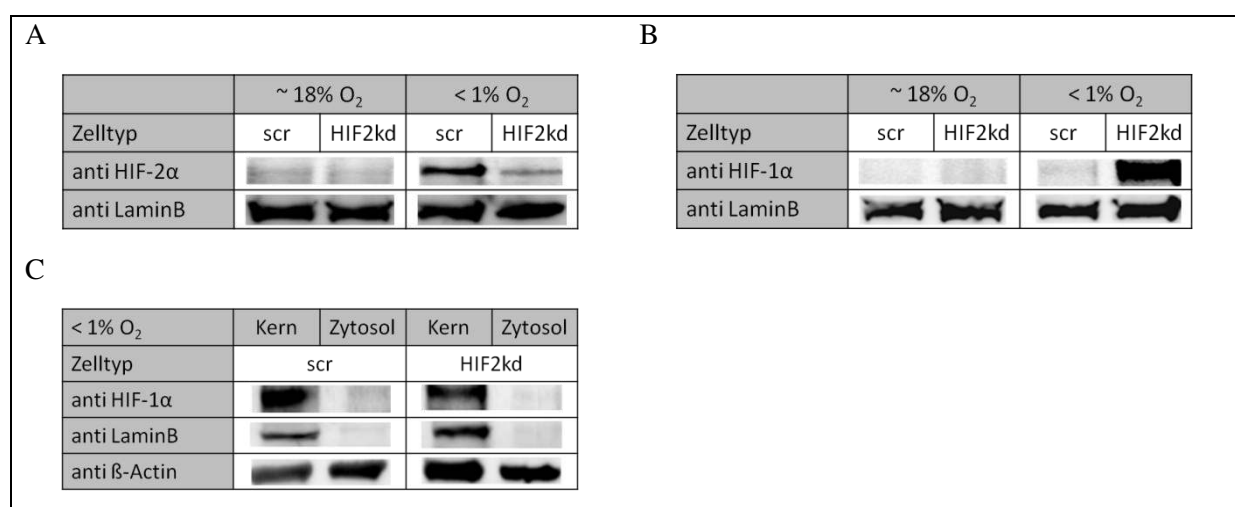


Abbildung 3-17 Western Blot Nachweis des Knockdowns von HIF-2 α und des Vorhandenseins von HIF-1 α auf Proteinebene in HMEC-1 Zellen mit pLL3.7-HIF-2 α -shRNA Konstrukt.

(A) HMEC-1 Zellen zeigen unter Hypoxie ($\leq 1\%$ O₂) eine Stabilisierung von HIF-1 α in scr Kontrollzellen und stark verminderte HIF-2 α Proteinlevel in HIF-2 α Knockdownzellen. (B) HIF-1 α ist in scr Kontrollzellen und in HIF-2 α Knockdownzellen vermehrt auf Proteinebene unter Hypoxie nachweisbar. Der Nachweis von Lamin B dient als Ladungskontrolle. Unter Hypoxie stabilisiertes (C) HIF-1 α transloziert in scr Kontrollzellen und HIF-2 α Knockdownzellen in den Kern und ist dort nachweisbar. Der Nachweis von Lamin B dient als Nachweis der Kernfraktion und β -Actin als Ladungskontrolle und zytosolischer Marker.

Unter Normoxie (18% O₂) findet sowohl in scrambled shRNA Kontrollzellen (scr) als auch in HIF-2 α Knockdownzellen (HIF2kd) eine Degradation von HIF-2 α statt (Abbildung 3-17 A). Unter Hypoxie ($\leq 1\%$ O₂) ist HIF-2 α in scr Kontrollzellen nachweisbar, während es bei gleichem Gesamtproteingehalt (Ladungskontrolle LaminB) in HIF-2 α Knockdownzellen stark vermindert vorliegt. Der Knockdown von HIF-2 α ist somit erfolgreich. Doch auch in diesem Fall müssen unspezifische Effekte der HIF-2 α -shRNA auf die Expression von HIF-1 α ausgeschlossen werden. Dazu wurde der Proteingehalt an HIF-1 α in HIF-2 α

Knockdownzellen bestimmt (Abbildung 3-17 B). Unter Normoxie findet eine Degradation von HIF-1 α statt. Unter Hypoxie zeigen Zellen mit HIF-2 α Knockdown im Vergleich zu scr Kontrollzellen hingegen sogar eine vermehrte Stabilisierung des Proteins HIF-1 α . Des Weiteren transloziert das stabilisierte HIF-1 α unter Hypoxie in den Zellkern, wie aus Abbildung 3-17 C ersichtlich wird. HIF-1 α liegt im Kern von scr Kontrollzellen und HIF-2 α Knockdownzellen in ungefähr vergleichbarer Menge vor, wobei die Normierung der Proteinmenge auch hier über Lamin B als Kernmarker und β -Actin als hauptsächlich zytosolischen Marker erfolgt. Zusammenfassend kann man festhalten, dass der Knockdown von HIF-2 α auf Proteinebene nachweisbar ist und HIF-1 α unverändert unter Hypoxie in den Kern transloziert.

3.2.3. Nachweis des Knockdowns von HIF-1 α oder HIF-2 α auf RNA-Ebene

Da es sich bei dem hier durchgeführten Knockdown der Faktoren HIF-1 α bzw. HIF-2 α um einen shRNA-vermittelten Knockdown handelt, sollte auch ein Effekt auf die messbare mRNA-Menge an *HIF1A* und *HIF2A* Transkript ermittelbar sein. Abbildung 3-18 beschreibt die messbaren mRNA-Mengen an *HIF1A* und *HIF2A* Transkript in Knockdownzellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Normoxie und Hypoxie.

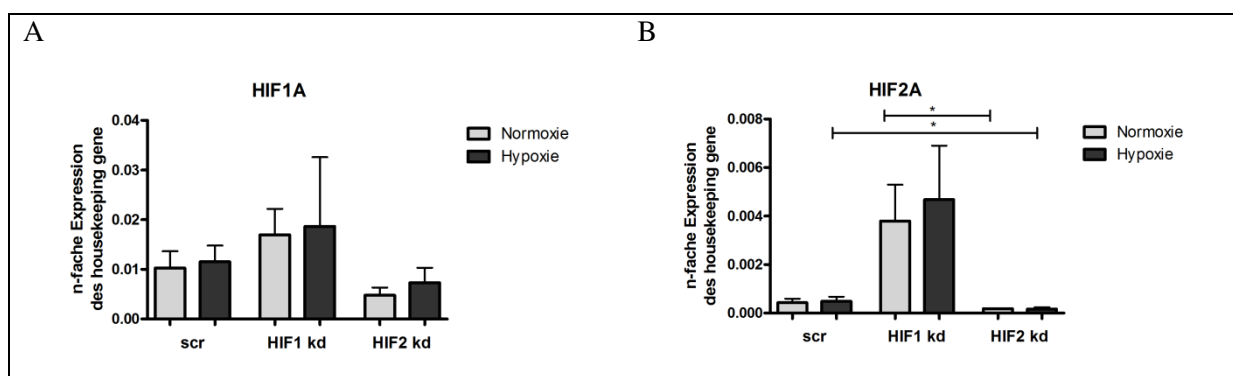


Abbildung 3-18 Die Expression der Gene *HIF1A* und *HIF2A* in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt exprimieren die Gene (A) *HIF1A* und (B) *HIF2A* unter Normoxie und Hypoxie. Die Expression des Gens (A) *HIF1A* ist in HIF-1 α Knockdownzellen (HIF1 kd) numerisch höher und in HIF-2 α Knockdownzellen (HIF2 kd) numerisch geringer als die jeweilige Referenz der scr Kontrollzellen (scr) unter Normoxie und Hypoxie. Die Expression des Gens (B) *HIF2A* ist in HIF-1 α Knockdownzellen (HIF1 kd) numerisch höher als die jeweilige Referenz der scr Kontrollzellen (scr) unter Normoxie und Hypoxie. In HIF-2 α Knockdownzellen (HIF2 kd) ist die Expression von *HIF2A* unter Hypoxie im Vergleich zur Referenz der scr Kontrollzellen (scr) signifikant vermindert ($p=0,0313$). Die Expression der Gene wird als n-fache Expression des „housekeeping gene“ *EF1A* dargestellt ($n \geq 6$, Wilcoxon signed rank test).

Betrachtet man die Transkriptmengen von *HIF1A* in scr Kontrollzellen zeigt sich keine signifikante Induktion der Genexpression unter Hypoxie (Abbildung 3-18 A.). Die Expression von *HIF1A* in HIF-1 α Knockdownzellen zeigt gegenüber den scr Kontrollzellen numerisch erhöhte Werte. Dies weist zusammen mit den Beobachtungen zur HIF-1 α Proteinmenge (siehe Kapitel 3.2.2) auf einen Knockdown von HIF-1 α mittels Translationsinhibition hin. Die Expression von *HIF1A* in HIF-2 α Knockdownzellen zeigt gegenüber den scr Kontrollzellen numerisch verminderte Werte, welches sich aber nicht auf die vorhandene HIF-2 α Proteinmenge auswirkt (siehe Kapitel 3.2.2).

Vergleichend dazu zeigt die Transkriptmenge von *HIF2A* in scr Kontrollzellen ebenfalls keine signifikante Induktion der Genexpression unter Hypoxie (Abbildung 3-18 B). Die Expression von *HIF2A* in HIF-1 α Knockdownzellen zeigt gegenüber den scr Kontrollzellen numerisch erhöhte Werte, was sich aber nicht auf Proteinebene widerspiegelt (siehe Kapitel 3.2.2). Die Expression von *HIF2A* in HIF-2 α Knockdownzellen zeigt gegenüber den scr Kontrollzellen signifikant verminderte Werte unter Hypoxie sowie signifikant verminderte Werte im Vergleich zu HIF-1 α Knockdownzellen unter Normoxie. Dies deutet auf einen Knockdown von HIF-2 α mittels RNA-Interferenz hin.

Fasst man die in Kapitel 3.2.2 und 3.2.3 dargestellten Ergebnisse zusammen, kann gezeigt werden, dass sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α auf Proteinebene in den jeweiligen Knockdownzellen signifikant vermindert vorliegen und die im Nachfolgenden gemachten Beobachtungen auf den Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α zurückzuführen sind.

3.3. Der Einfluss eines Knockdowns von HIF-1 α oder HIF-2 α auf HMEC-1 Zellen

3.3.1. Angiogenese von HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown

HMEC-1 Zellen zeigen eine gesteigerte Angiogenese im 2D-Angiogenese Assay auf MatrigelTM unter hypoxischen Bedingungen ($\leq 1\%$ O₂) (siehe Kapitel 3.1.2). Durch einen Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α ist die Fähigkeit zur Angiogenese verändert. Abbildung 3-19 zeigt dies exemplarisch in mikroskopischen Bildern in 40-facher Vergrößerung.

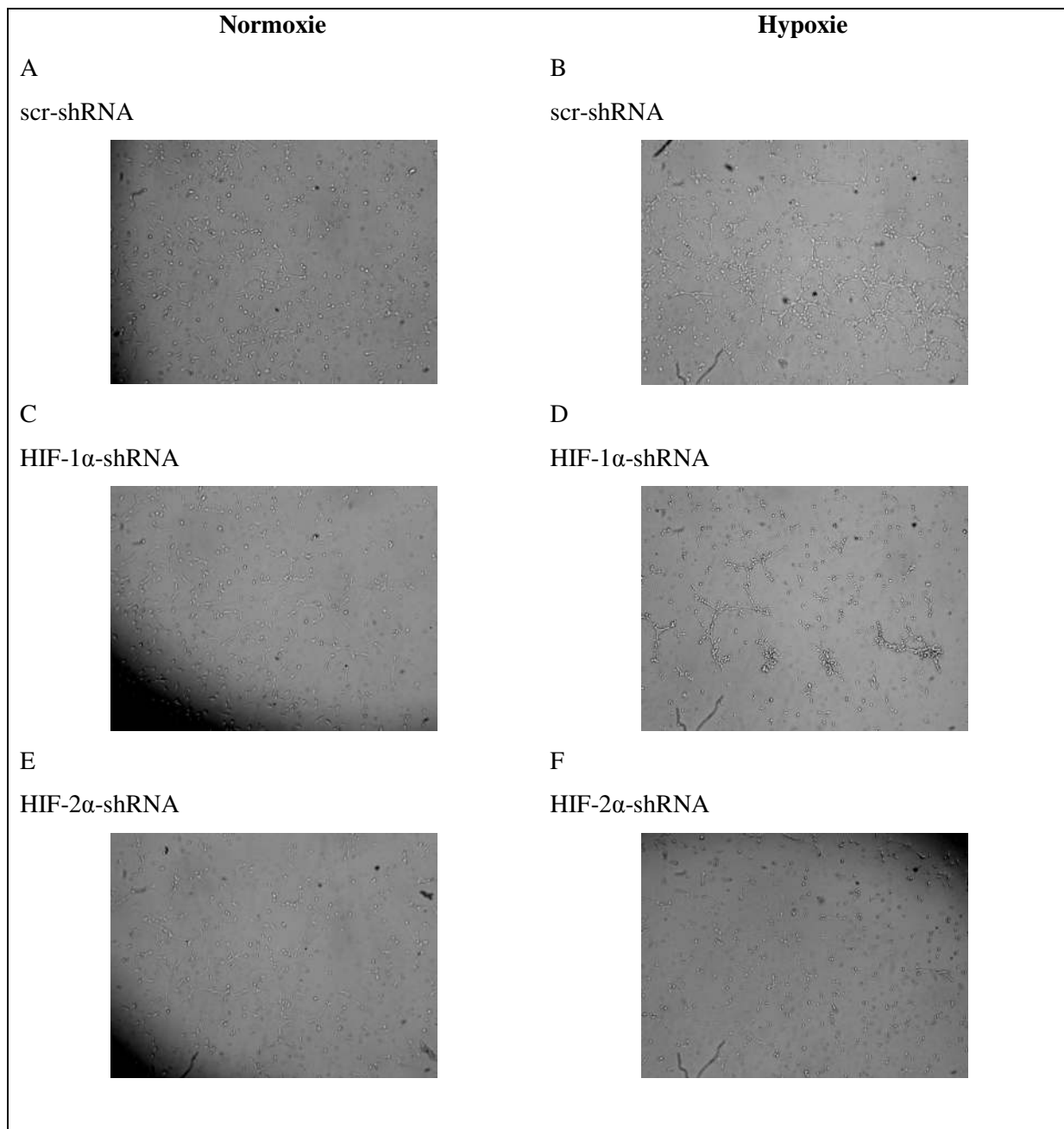


Abbildung 3-19 Morphologische Charakterisierung der Angiogenese von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.

(A+B) HMEC-1 Zellen mit scr Kontrollplamid sind bei Kultivierung auf Matrigel™ unter Normoxie fähig zur Angiogenese und verstärken die Angiogenese unter Hypoxie. (C+D) HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α -shRNA Konstrukt zeigen unter Normoxie und Hypoxie eine verminderte Angiogenese und eine verminderte Induktion der Angiogenese unter Hypoxie im Vergleich zu scr Kontrollzellen. (E+F) HMEC-1 Zellen mit HIF-2 α -shRNA Konstrukt zeigen unter Normoxie und Hypoxie eine verminderte Angiogenese und eine verminderte Induktion der Angiogenese unter Hypoxie im Vergleich zu scr Kontrollzellen (jeweils 40-fache Vergrößerung).

3. Ergebnisse

Im Vergleich von Normoxie zu Hypoxie zeigen scr Kontrollzellen eine stark gesteigerte Angiogenese unter Hypoxie (Abbildung 3-19 A und B). Sowohl HIF-1 α Knockdownzellen als auch HIF-2 α Knockdownzellen zeigen hingegen unter Hypoxie im Vergleich zu scr Kontrollzellen ein vermindertes Maß an Angiogenese (Abbildung 3-19 C-F). Numerisch belegt lässt sich der visuelle Eindruck durch die Bestimmung der Länge der gebildeten Tubuli und der Anzahl der Verzweigungen. Abbildung 3-20 gibt diese Parameter wieder.

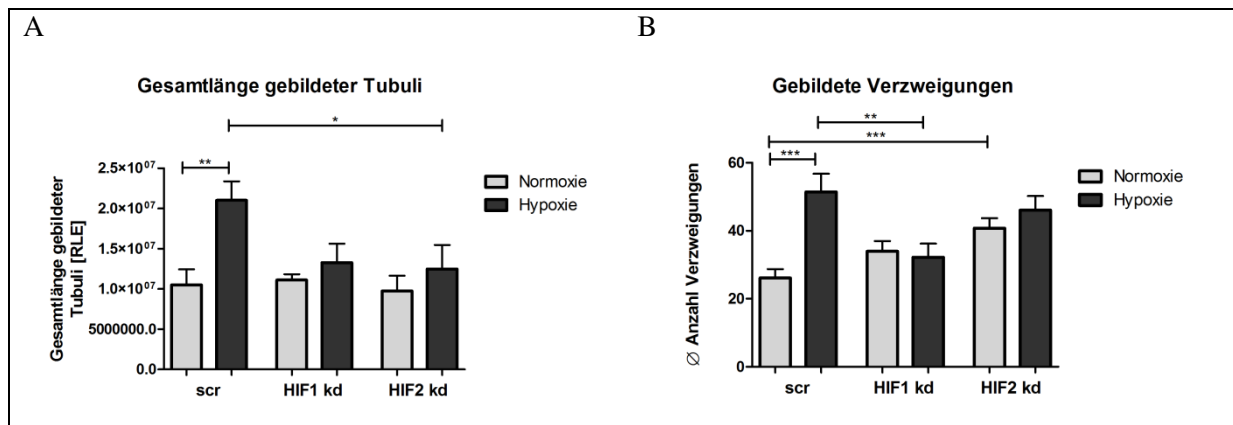


Abbildung 3-20 Charakterisierung der Angiogenese von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.

(A) HMEC-1 Zellen mit scr Kontrollplamid (scr) zeigen unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie einen signifikanten Zuwachs der Länge der gebildeten Tubuli ($p=0,0047$). HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α -shRNA Konstrukt (HIF1 kd) oder HIF-2 α -shRNA Konstrukt (HIF2 kd) zeigen keine signifikante Erhöhung der Tubulilänge unter Hypoxie. HMEC-1 Zellen mit HIF-2 α -shRNA Konstrukt (HIF2 kd) haben signifikant kürzere Tubuli als scr Kontrollzellen unter Hypoxie ($p=0,0444$). (B) HMEC-1 Zellen mit scr Kontrollplamid (scr) zeigen unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie einen signifikanten Zuwachs an Verzweigungen ($p=0,0001$). HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α -shRNA Konstrukt (HIF1 kd) oder HIF-2 α -shRNA Konstrukt (HIF2 kd) zeigen keine signifikante Erhöhung der Anzahl an Verzweigungen unter Hypoxie. HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α -shRNA Konstrukt (HIF1 kd) haben signifikant weniger Verzweigungen als scr Kontrollzellen unter Hypoxie ($p=0,0067$). HMEC-1 Zellen mit HIF-2 α -shRNA Konstrukt (HIF2 kd) haben signifikant ($p=0,0006$) mehr Verzweigungen als scr Kontrollzellen unter Normoxie ($n=7$, ungepaarte T-Tests).

Die Bestimmung der Länge der gebildeten Tubuli zeigt für scr Kontrollzellen eine unter Hypoxie signifikant um das Doppelte erhöhte Länge der Tubuli im Vergleich zur Normoxie. Für HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen ist eine geringe numerische aber keine signifikante Verlängerung der gebildeten Tubuli unter Hypoxie ermittelbar. Im Vergleich zu scr Kontrollzellen zeigen dabei die HIF-2 α Knockdownzellen eine signifikant um 40% verminderte Länge der gebildeten Tubuli unter Hypoxie (Abbildung 3-20 A). Ein weiteres Merkmal einer gesteigerten Angiogenese ist die Zunahme der Anzahl von Verzweigungspunkten (Abbildung 3-20 B). Hier zeigen scr Kontrollzellen vergleichbar zur

gesteigerten Länge der Tubuli ebenfalls eine signifikante Verdoppelung der gebildeten Verzweigungen unter Hypoxie. HIF-1 α Knockdownzellen weisen keine Zunahme der Anzahl von Verzweigungspunkten unter Hypoxie auf und haben im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Hypoxie eine signifikant geringere Menge an Verzweigungen. Interessanterweise zeigen HIF-2 α Knockdownzellen unter Normoxie signifikant mehr Verzweigungen als scr Kontrollzellen. Allerdings ist auch bei ihnen unter Hypoxie keine signifikante Zunahme an Verzweigungen messbar, wie es im Gegensatz dazu bei scr Kontrollzellen der Fall ist.

Insgesamt zeigen HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen unter Hypoxie ein signifikant vermindertes Maß der Induktion von Angiogenese in Form von Längenwachstum und Verzweigungsbildung im Vergleich zu scr Kontrollzellen.

3.3.2. Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, zeigen HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen ein unter Hypoxie vermindertes Maß der Induktion von Angiogenese. Dies lässt vermuten, dass eine differentielle Genexpression sowohl unter Hypoxie als auch im Vergleich zu scr Kontrollzellen stattfindet. Mit Hilfe eines Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays wurde dieser Aspekt zunächst global mit Fokus auf die regulierten Angiogenese- und Bioenergetik-Pathways hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Klassifizierung mittels Panther Database durchgeführt und die differentiell exprimierten Gene den Pathways der Bioenergetik und Angiogenese zugeordnet.

Die Abbildung 3-21 gibt diesen Zusammenhang wieder, wobei dem Diagramm die Anzahl der unter Hypoxie differentiell exprimierten Gene in den jeweiligen Knockdownzellen bzw. Kontrollzellen entnommen werden kann. Die Klassifizierung mittels Panther DB zeigt für die Expression von Genen, die eine Rolle in der Angiogenese spielen, dass insgesamt 11 Signalwege durch eine Inkubation unter Hypoxie ein differentiell exprimiertes Genprofil aufweisen. Ein Knockdown von HIF-1 α beeinflusst dabei im Vergleich zum Kontrollplasmid scr 9 von 11 Signalwegen und ein Knockdown von HIF-2 α 8 von 11 Signalwegen. Somit verursachen sowohl ein Knockdown von HIF-1 α als auch von HIF-2 α unter Hypoxie eine differentielle Genexpression im Bereich Angiogenese.

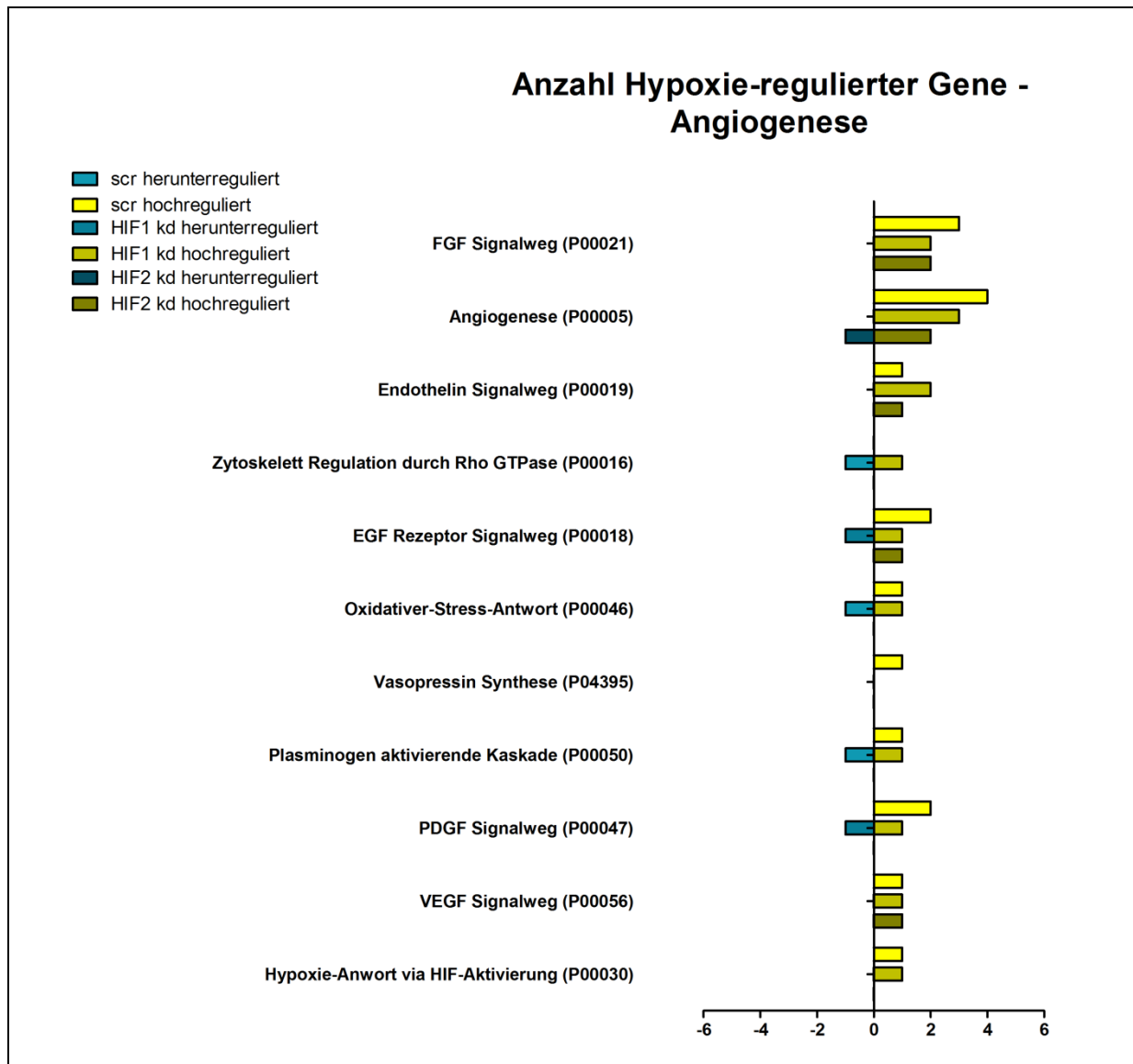


Abbildung 3-21 Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Hypoxie – Gene der Angiogenese.

HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt (HIF1 kd und HIF2 kd) und Kontrollzellen (scr) zeigen unter Hypoxie eine signifikante (n-fache Änderung >2; $p < 0,01$) und differentielle Regulation von Genen, die dem Bereich Angiogenese zugeordnet werden können. Der Vergleich von Zellen mit Knockdownkonstrukt und Kontrollzellen zeigt darüber hinaus eine unterschiedliche differentielle Genexpression unter Hypoxie.

Die Betrachtung von Signalwegen, die in der Bioenergetik involviert sind, zeigt ebenfalls eine differentielle Genexpression sowohl unter Hypoxie als auch in HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen (Abbildung 3-22). Nach Klassifizierung mittels Panther DB zeichnet sich ab, dass ein Knockdown von HIF-1 α 5 von 8 und ein Knockdown von HIF-2 α ebenfalls 5 von 8 Signalwegen beeinflusst im Vergleich zum Kontrollplasmid scr.

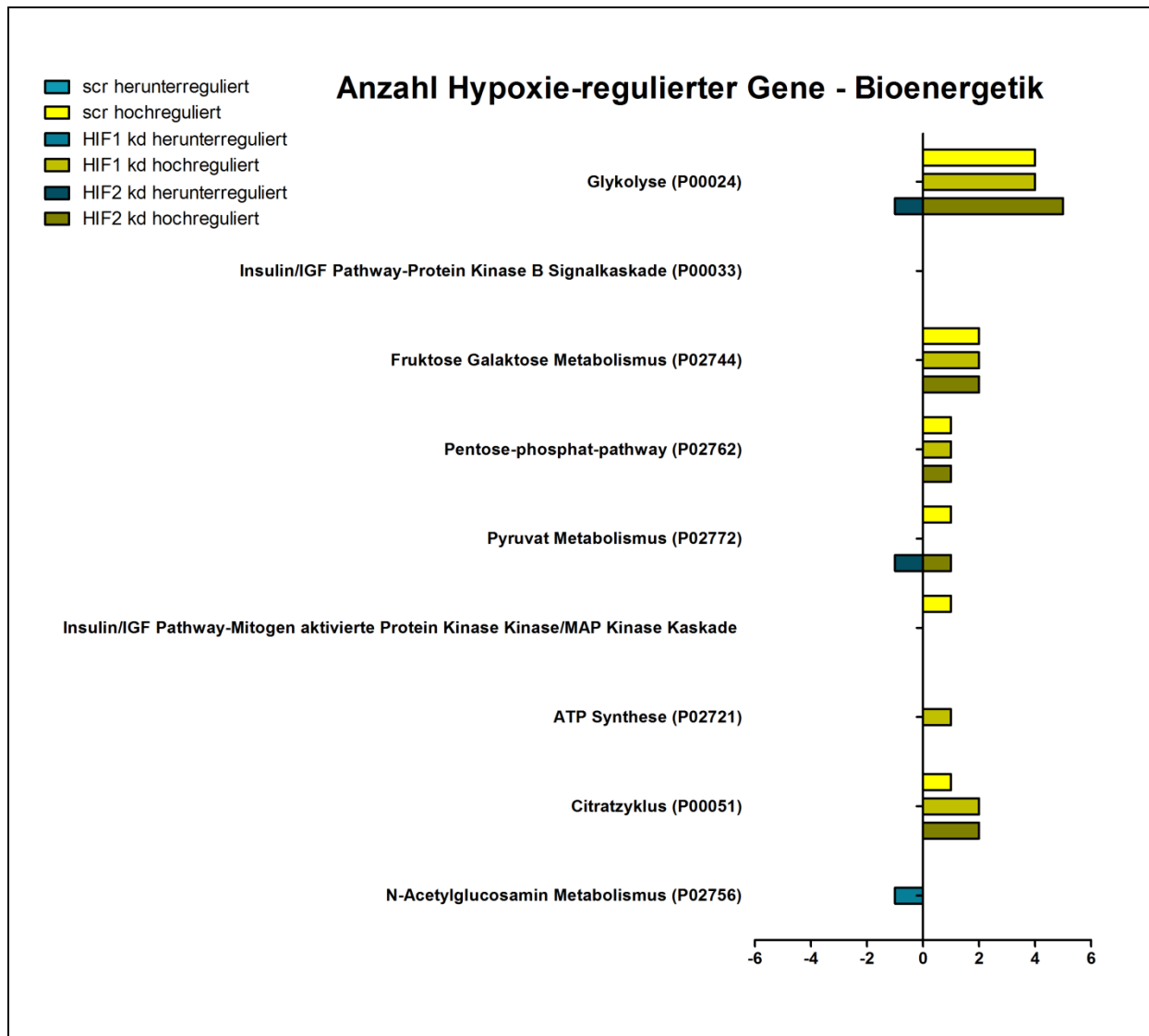


Abbildung 3-22 Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Hypoxie – Gene der Bioenergetik.

HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt (HIF1 kd und HIF2 kd) und Kontrollzellen (scr) zeigen unter Hypoxie eine signifikante (n -fache Änderung >2 ; $p < 0,01$) und differentielle Regulation von Genen, die dem Bereich Bioenergetik zugeordnet werden können. Der Vergleich von Zellen mit Knockdownkonstrukt und Kontrollzellen zeigt darüber hinaus eine unterschiedliche differentielle Genexpression unter Hypoxie.

3.3.3. Die Genexpression Hypoxie-regulierter Gene in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie

3.3.3.1. Die Expression von Bioenergetik-assoziierten Genen in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie

Das Kapitel 3.3.2. spiegelt deutlich wider, dass unter Hypoxie eine Veränderung der Genexpression Bioenergetik-assoziiierter Gene stattfindet. Darüber hinaus führt ein Knockdown sowohl von HIF-1 α als auch von HIF-2 α zu einer differentiellen Genexpression im Vergleich zu scr Kontrollzellen. Die nachfolgende Abbildung 3-23 stellt die Genexpression der Gene *PGK1*, *GAPDH*, *LDHA* und *GLUT1* für scr Kontrollzellen sowie HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen unter Normoxie und Hypoxie dar.

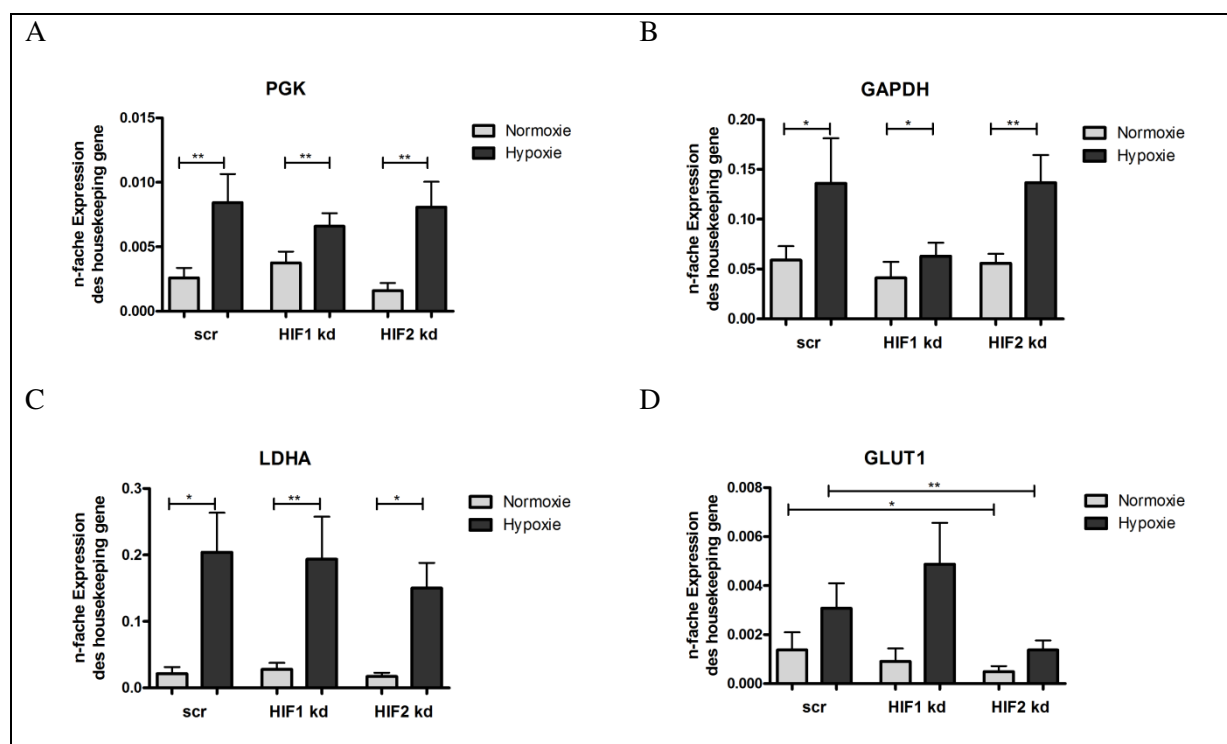


Abbildung 3-23 Die Expression der Gene *PGK*, *GAPDH*, *LDHA* und *GLUT1* in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt (HIF1 kd und HIF2 kd) und Kontrollzellen (scr) exprimieren die Gene (A) *PGK*, (B) *GAPDH*, (C) *LDHA* und (D) *GLUT1* unter Normoxie und Hypoxie. Die Expression des Gens (A) *PGK* ist bei allen HMEC-1 Zellen unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie ($p \leq 0,01$). Die Expression des Gens *PGK* ist bei HIF-1 α Knockdownzellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Hypoxie tendenziell verringert ($p = 0,0938$). Die Expression des Gens (B) *GAPDH* ist bei allen HMEC-1 Zellen unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie ($p \leq 0,05$ bei scr und HIF1 kd, $p \leq 0,01$ bei HIF2 kd). Die Expression des Gens (C) *LDHA* ist bei allen HMEC-1 Zellen unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie ($p \leq 0,05$ bei scr und HIF2 kd, $p \leq 0,01$ bei HIF1 kd). Die Expression des Gens (D) *GLUT1* ist bei allen HMEC-1 Zellen unter Hypoxie tendenziell höher als unter Normoxie ($p \leq 0,1$). Die Expression von *GLUT1* ist in

HMEC-1 Zellen mit HIF-2 α Knockdown unter Normoxie und Hypoxie signifikant geringer als in scr Kontrollzellen ($p \leq 0,05$ Normoxie, $p \leq 0,01$ Hypoxie). Die Expression der Gene wird als n-fache Expression des „housekeeping gene“ *EF1A* dargestellt (n=9, Wilcoxon signed rank test).

Das kodierende Gen für die Phosphoglycerat-Kinase *PGK* wird in scr Kontrollzellen, HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen unter Hypoxie signifikant verstärkt exprimiert. So beträgt der Wert der hypoxischen Induktion in scr Kontrollzellen 3,3, in HIF-1 α Knockdownzellen 1,8 und in HIF-2 α Knockdownzellen 5. Unter Hypoxie ist die Expression von *PGK* in beiden Knockdownzellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen numerisch vermindert, wobei dieser Effekt in HIF-1 α Knockdownzellen am deutlichsten ausfällt ($p=0,0938$, keine Signifikanz).

Das Gen *GAPDH* weist in scr Kontrollzellen, HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen unter Hypoxie eine signifikant verstärkte Expression auf. Dabei sind Steigerungen um den Faktor 2,3 in scr Kontrollzellen, um den Faktor 1,5 in HIF-1 α Knockdownzellen und um den Faktor 2,4 in HIF-2 α Knockdownzellen ermittelbar. Auffällig ist zudem die numerisch um die Hälfte verminderte Expression von *GAPDH* in HIF-1 α Knockdownzellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen und HIF-2 α Knockdownzellen (keine Signifikanz).

Ebenfalls eine unter Hypoxie signifikant verstärkte Expression ist für das Gen *LDHA* in scr Kontrollzellen, HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen nachweisbar. Der Wert der Induktion beträgt hier unter Hypoxie 9,7 in scr Kontrollzellen, 6,9 in HIF-1 α Knockdownzellen und 8,8 in HIF-2 α Knockdownzellen. Numerisch weisen HIF-2 α Knockdownzellen eine um 25% verminderte Expression des Gens unter Hypoxie im Vergleich zu scr Kontrollzellen auf (keine Signifikanz).

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Genen sind für die hypoxische Induktion von *GLUT1* keine Signifikanzen ermittelbar. Tendenziell findet allerdings eine Erhöhung der Genexpression unter Hypoxie um den Faktor 2,2 in scr Kontrollzellen, den Faktor 5,3 in HIF-1 α Knockdownzellen und den Faktor 2,8 in HIF-2 α Knockdownzellen statt ($p \leq 0,1$). Signifikant vermindert ist dabei die *GLUT1* Expression in HIF-2 α Knockdownzellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie.

Zusammenfassend kann sowohl für scr Kontrollzellen als auch HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen für die Gene *PGK1*, *GAPDH* und *LDHA* eine signifikante Induktion der Genexpression unter Hypoxie gezeigt werden. Die Induktion von *GLUT1* ist tendenziell ebenfalls nachweisbar. Der Knockdown von HIF-1 α zeigt zudem numerisch einen negativen Effekt auf die Expression der Gene *PGK1* und *GAPDH* unter Hypoxie. Aus dem Knockdown von HIF-2 α resultiert eine signifikant verminderte Expression von *GLUT1* sowie eine numerisch verminderte Expression von *LDHA* unter Hypoxie.

3.3.3.2. Die Expression von Angiogenese-assoziierten Genen in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie

Der Einfluss eines Knockdowns von sowohl HIF-1 α als auch von HIF-2 α führt zu einer differentiellen Genexpression im Bereich Angiogenese (siehe Kapitel 3.3.2). Im Folgenden wird die Expression der Gene *VEGFA* und *IL8* in scr Kontrollzellen, HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen unter Normoxie und Hypoxie dargestellt (Abbildung 3-24).

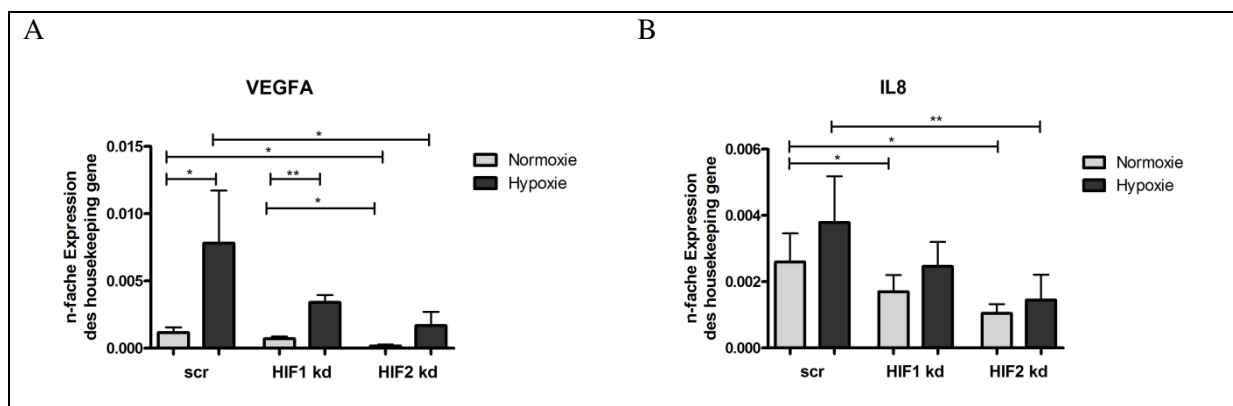


Abbildung 3-24 Die Expression der Gene *VEGFA* und *IL8* in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt (HIF1 kd und HIF2 kd) und Kontrollzellen (scr) exprimieren die Gene (A) *VEGFA* und (B) *IL8* unter Normoxie und Hypoxie. Die Expression des Gens (A) *VEGFA* ist bei HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α Knockdown ($p=0,0039$) und in scr Kontrollzellen ($p=0,0313$) unter Hypoxie signifikant höher und in HIF-2 α Knockdownzellen ($p=0,0938$) tendenziell höher als unter Normoxie. HIF-2 α Knockdownzellen zeigen signifikant verminderte *VEGFA* Expressionslevel im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Normoxie und Hypoxie und zu HIF-1 α Knockdownzellen unter Hypoxie ($p\leq 0,05$). Die Expression des Gens (B) *IL8* ist bei allen HMEC-1 Zellen unter Hypoxie numerisch erhöht. HIF-1 α Knockdownzellen zeigen signifikant verminderte *IL8* Expressionslevel im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Normoxie ($p=0,0313$). HIF-2 α Knockdownzellen zeigen signifikant verminderte *IL8* Expressionslevel im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Normoxie ($p=0,0391$) und Hypoxie ($p=0,0039$). Die Expression der Gene wird als n-fache Expression des „housekeeping gene“ *EF1A* dargestellt ($n=9$, Wilcoxon signed rank test).

Das kodierende Gen *VEGFA* für den proangiogenen Faktor VEGF weist eine signifikante Induktion unter Hypoxie in scr Kontrollzellen und HIF-1 α Knockdownzellen auf. Die hypoxische Induktion von *VEGFA* in HIF-2 α Knockdownzellen ist tendenziell erkennbar ($p=0,0938$). Zudem weisen HIF-2 α Knockdownzellen sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie signifikant verminderte *VEGFA* Transkriptmengen im Vergleich zu scr Kontrollzellen auf. So beträgt die Expression unter Hypoxie nur ein Fünftel der Expression der scr Kontrollzellen. Eine numerische Verminderung um den Faktor 2,3 ist für HIF-1 α Knockdownzellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Hypoxie ebenfalls nachweisbar.

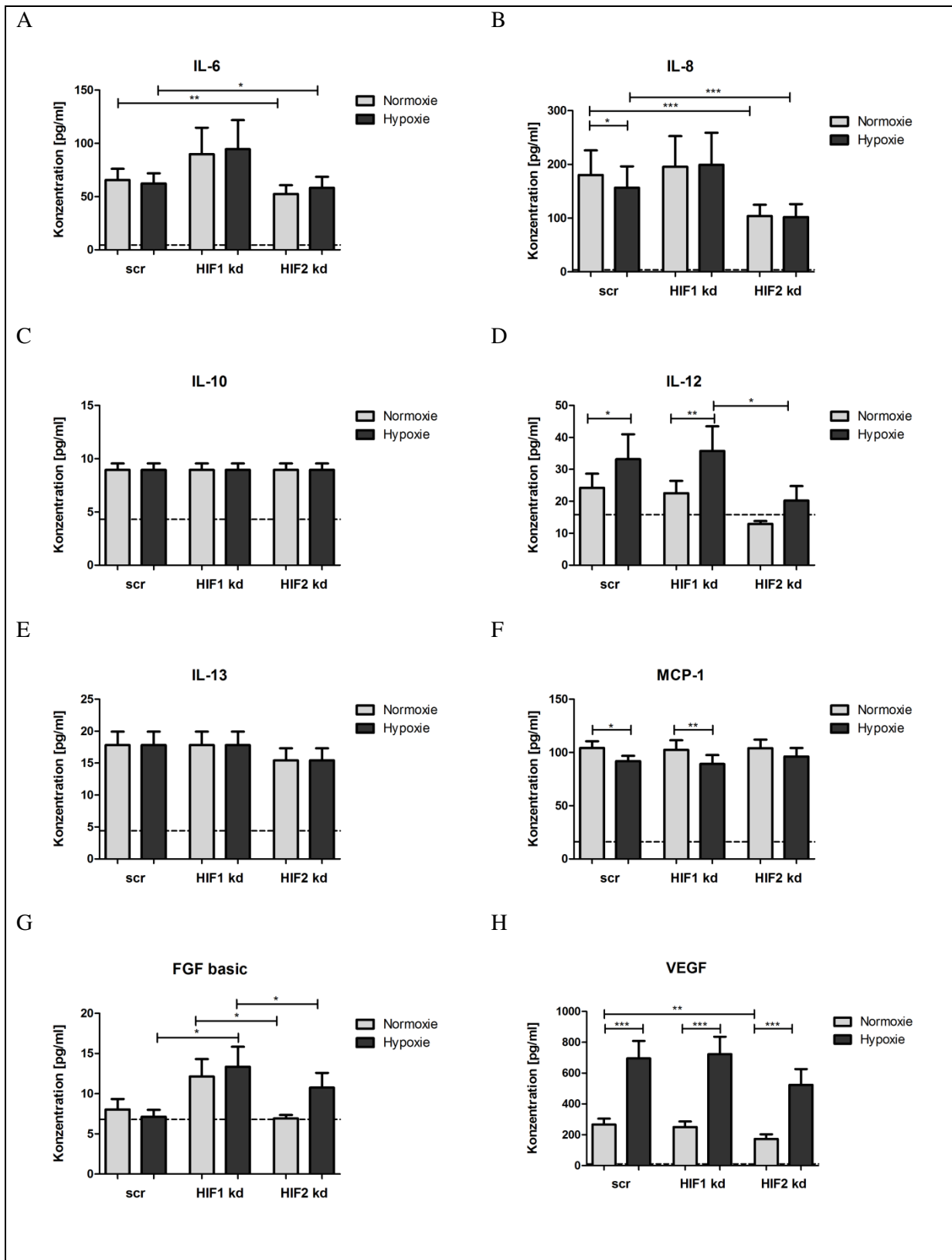
Das Transkript des Gens *IL8* zeigt für scr Kontrollzellen und Knockdownzellen eine numerische Anhebung unter hypoxischer Inkubation. Signifikant vermindert sind die gemessenen *IL8* Expressionen für HIF-1 α Knockdownzellen unter Normoxie (Faktor 1,5) und für HIF-2 α Knockdownzellen unter Normoxie (Faktor 2,5) und Hypoxie (Faktor 2,6) im Vergleich zu scr Kontrollzellen.

Insgesamt beeinflusst ein Knockdown sowohl von HIF-1 α als auch von HIF-2 α die Expression der Gene *VEGFA* und *IL8* negativ. Dabei sind die Effekte in HIF-2 α Knockdownzellen stärker ausgeprägt als in HIF-1 α Knockdownzellen.

3.3.4. Die Sekretion löslicher Faktoren in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie

Im Kapitel 3.1.8. konnte gezeigt werden, dass HMEC-1 Zellen in der Lage sind, die Faktoren IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1, FGF basic, VEGF und MIF zu sekretieren. Dabei zeigte sich für Hypoxie eine signifikant verstärkte Sekretion der Faktoren IL-12, VEGF und MIF sowie eine signifikant verminderte Sekretion des Chemokins MCP-1. Die übrigen Faktoren waren nicht signifikant erhöht oder vermindert im Überstand der Zellen unter Hypoxie nachweisbar. Um eine Verbindung zwischen der Sekretion der genannten Faktoren und dem Vorhandensein von HIF-1 α bzw. HIF-2 α herzustellen, wurde sowohl mit den scr Kontrollzellen als auch den Knockdownzellen eine Analyse der sekretierten Faktoren und ihrer Konzentration im Überstand durchgeführt. Die Graphen in Abbildung 3-25 geben die gemessenen Konzentrationen im Überstand der jeweiligen Zelltypen unter Normoxie und Hypoxie wieder.

3. Ergebnisse



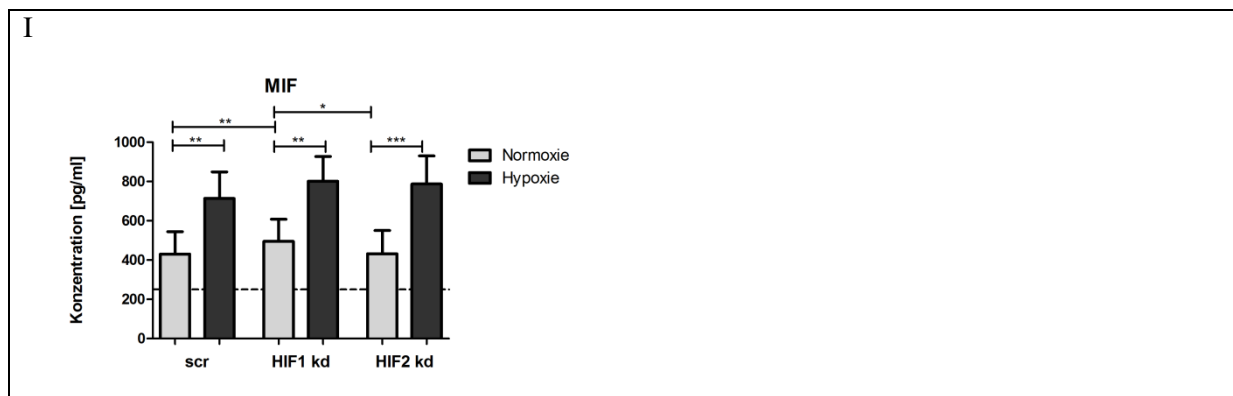


Abbildung 3-25 Die Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1, FGF basic, VEGF und MIF in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt (HIF1 kd und HIF2 kd) und Kontrollzellen (scr) sekretieren (A) IL-6, (B) IL-8, (C) IL-10, (D) IL-12, (E) IL-13, (F) MCP-1, (G) FGF basic, (H) VEGF und (I) MIF unter Normoxie und Hypoxie (n=23). (A) Die Sekretion von IL-6 ist unter Normoxie (p=0,0041) und Hypoxie (p=0,0366) in HIF-2 α Knockdownzellen signifikant vermindert im Vergleich zu scr Kontrollzellen. (B) Die Sekretion von IL-8 ist in scr Kontrollzellen unter Normoxie signifikant höher als unter Hypoxie (p=0,0165). Die Sekretion von IL-8 ist unter Normoxie (p=0,0007) und Hypoxie (p=0,0006) in HIF-2 α Knockdownzellen signifikant vermindert im Vergleich zu scr Kontrollzellen. (C) Die Sekretion von IL-10 ist in allen Zelltypen gleich und liegt am Detektionslimit. (D) Die Sekretion von IL-12 ist in scr Kontrollzellen (p=0,0469) und HIF-1 α Knockdownzellen (p=0,0039) unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie. Die Sekretion von IL-12 ist in HIF-2 α Knockdownzellen signifikant geringer als in HIF-1 α Knockdownzellen (p=0,0313) unter Hypoxie. (E) Die Sekretion von IL-13 ist in allen Zelltypen annähernd gleich und liegt am Detektionslimit. (F) Die Sekretion des Faktors MCP-1 ist in scr Kontrollzellen (p=0,0401) und HIF-1 α Knockdownzellen (p=0,0071) unter Hypoxie signifikant geringer als unter Normoxie. (G) Die Sekretion des Faktors FGF basic ist in HIF-1 α Knockdownzellen unter Hypoxie signifikant erhöht im Vergleich zu scr Kontrollzellen (p=0,0313). Die Sekretion von FGF basic ist unter Normoxie (p=0,0313) und Hypoxie (p=0,0313) in HIF-2 α Knockdownzellen signifikant vermindert im Vergleich zu HIF-1 α Knockdownzellen. (H) Die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF ist in allen Zelltypen unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie (p \leq 0,001). Die Sekretion von VEGF ist unter Normoxie (p=0,0012) in HIF-2 α Knockdownzellen signifikant vermindert im Vergleich zu scr Kontrollzellen. (I) Die Sekretion des Faktors MIF ist unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie (p \leq 0,01 bei scr und HIF1 kd, p \leq 0,001 bei HIF2 kd). Die Sekretion des Faktors MIF ist in HIF-1 α Knockdownzellen unter Normoxie signifikant höher als in scr Kontrollzellen (p=0,0046) und HIF-2 α Knockdownzellen (p=0,0151). Vergleichend zu den gemessenen Konzentrationen im Zellkulturüberstand sind die Norm-Serumwerte mittels gestrichelter Linie dargestellt (Statistik: Wilcoxon signed rank test).

Vergleichbar zu den im Kapitel 3.1.8 gemessenen Konzentrationen an IL-6 zeigen sowohl scr Kontrollzellen als auch Knockdownzellen keine vermehrte Sekretion von IL-6 unter hypoxischen Bedingungen. Trotzdem lassen sich signifikant verminderte Konzentrationen IL-6 im Überstand von HIF-2 α Knockdownzellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Normoxie und Hypoxie nachweisen. Im Gegensatz dazu weisen HIF-1 α Knockdownzellen numerisch erhöhte Konzentrationen von IL-6 im Überstand im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Normoxie und Hypoxie auf.

Das Interleukin IL-8 findet sich in scr Kontrollzellen unter Hypoxie signifikant vermindert wieder. Dies ist bei beiden Knockdownzellen nicht der Fall. Ein Knockdown von HIF-2 α führt aber zu einer signifikant verminderten Konzentration von IL-8 im Überstand im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Normoxie (Faktor 1,7) und Hypoxie (Faktor 1,5).

Eine unter Normoxie und Hypoxie unveränderte Sekretion weist das Interleukin IL-10 auf. Auch ein Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α führt nicht zu einer veränderten Konzentration an detektierbaren IL-10 im Überstand im Vergleich zu scr Kontrollzellen.

Ein signifikante Induktion der Sekretion von IL-12 unter Hypoxie ist in scr Kontrollzellen (Faktor 1,4) und HIF-1 α Knockdownzellen (Faktor 1,6) nachweisbar. In HIF-2 α Knockdownzellen fällt diese Steigerung numerisch aus. Im Vergleich zu scr Kontrollzellen zeigen HIF-2 α Knockdownzellen numerisch verminderte Konzentrationen an IL-12 unter Hypoxie (Faktor 1,6) sowie im Vergleich zu HIF-1 α Knockdownzellen sogar signifikant verminderte Konzentrationen an IL-12 unter Hypoxie (Faktor 1,8).

Ähnlich dem Zytokin IL-10 ist in den scr Kontrollzellen und HIF Knockdownzellen bei dem Interleukin IL-13 keine Änderung der Sekretion im Vergleich von Normoxie und Hypoxie sowie durch Knockdown ermittelbar.

Die Sekretion des Faktors MCP-1 ist in scr Kontrollzellen ($p=0,0401$) und HIF-1 α Knockdownzellen ($p=0,0071$) unter Hypoxie signifikant geringer als unter Normoxie. HIF-2 α Knockdownzellen zeigen keine signifikante Reduktion der MCP-1 Sekretion unter Hypoxie. Ebenso zeigen Knockdownzellen im Vergleich zu Kontrollzellen keine veränderte Sekretion von MCP-1.

Der Faktor FGF basic weist unter Hypoxie eine signifikant erhöhte Konzentration in HIF-1 α Knockdownzellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen auf. Im direkten Vergleich von HIF-1 α Knockdown und HIF-2 α Knockdown können signifikant verminderte FGF basic Konzentrationen unter Normoxie und Hypoxie in HIF-2 α Knockdownzellen nachgewiesen werden.

Der proangiogene Faktor VEGF lässt sich im Überstand von scr Kontrollzellen (Faktor 2,6), HIF-1 α Knockdownzellen (Faktor 2,9) und HIF-2 α Knockdownzellen (Faktor 3) unter

Hypoxie signifikant vermehrt nachweisen. Allerdings weisen HIF-2 α Knockdownzellen im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Normoxie signifikant verminderte Konzentrationen (Faktor 1,5) und unter Hypoxie numerisch verminderte Konzentrationen (Faktor 1,3) an VEGF auf.

Wie im Kapitel 3.1.8 beschrieben handelt es sich bei MIF um einen unter Hypoxie verstärkt im Überstand nachweisbaren Faktor. Diese Aussage kann für scr Kontrollzellen, HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen bestätigt werden, bei denen sich in jedem Fall signifikant erhöhte Konzentrationen an MIF unter Hypoxie im Überstand nachweisen lassen. Dabei zeigen HIF-1 α Knockdownzellen signifikant (Normoxie) bzw. numerisch erhöhte Konzentrationen (Hypoxie) im Vergleich zu scr Kontrollzellen. HIF-2 α Knockdownzellen sekretieren unter Normoxie vergleichbare Mengen MIF wie scr Kontrollzellen und zeigen unter Hypoxie numerisch erhöhte Konzentrationen an MIF im Überstand im Vergleich zu scr Kontrollzellen. Zudem sind die Konzentrationen von MIF im Vergleich zu HIF-1 α Knockdownzellen unter Normoxie signifikant vermindert.

Insgesamt kann in den Knockdownzellen die Hypoxie-induzierte vermehrte Sekretion von IL-12, VEGF und MIF sowie die Hypoxie-induzierte verminderte Sekretion von MCP-1 vergleichbar mit unbehandelten HMEC-1 Zellen nachgewiesen werden. Ein Knockdown von HIF-1 α resultiert in numerisch erhöhten Konzentrationen von IL-6, IL-8, MIF sowie FGF basic im Überstand. Ein Knockdown von HIF-2 α führt zu signifikant verminderten Konzentrationen von IL-6 und IL-8 sowie numerisch verminderten Konzentrationen von IL-12 und VEGF unter Hypoxie im Vergleich zu scr Kontrollzellen.

3.3.5. Der zelluläre Energiepool in Form von ATP und ADP in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 α - oder HIF-2 α -Knockdown unter Hypoxie

Im Kapitel 3.1.9 wird deutlich, dass unter Hypoxie der Zelle weniger Energie in Form von ATP zur Verfügung steht. Im Kapitel 3.3.3.1 wurde zudem numerisch ein negativer Effekt auf die Expression der bioenergetisch relevanten Gene *PGKI* und *GAPDH* unter Hypoxie in HIF-1 α Knockdownzellen beschrieben. Der Knockdown von HIF-2 α resultiert zudem in einer signifikant verminderten Expression von *GLUT1* sowie einer numerisch verminderten Expression von *LDHA* unter Hypoxie. Um zu bestimmen, ob die Verminderung der Genexpression bioenergetisch relevanter Gene auch zu einer Verminderung des zur

Verfügung stehenden zellulären Energiespeichers ATP führt, wurde wie nachfolgend abgebildet der ADP- und ATP-Gehalt der Knockdownzellen bestimmt und die ADP/ATP Ratio ermittelt.

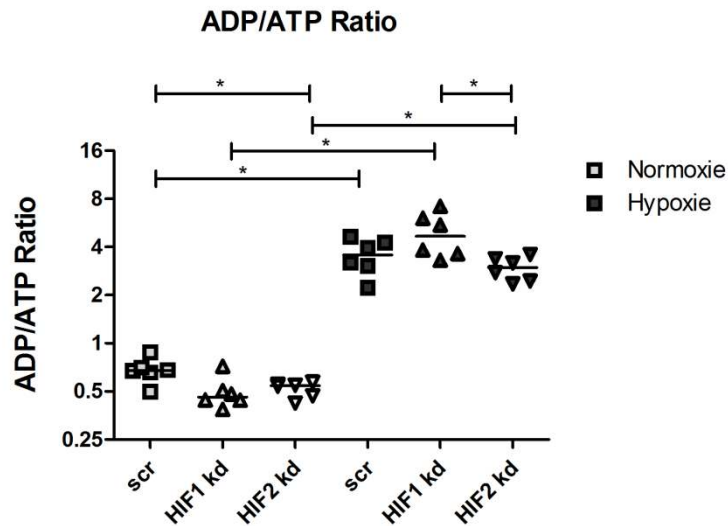


Abbildung 3-26 Der zelluläre Energiepool in Form von ATP und ADP in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.

HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt (HIF1 kd und HIF2 kd) und Kontrollzellen (scr) besitzen unter Hypoxie eine signifikant erhöhte ADP/ATP Ratio bzw. verhältnismäßig weniger Energie in Form von ATP normiert auf ADP unter Hypoxie ($p \leq 0,01$, $n=6$). Unter Normoxie haben HIF-2 α Knockdownzellen eine signifikant geringere ADP/ATP Ratio als scr Kontrollzellen ($p=0,0260$). Unter Hypoxie haben HIF-2 α Knockdownzellen eine signifikant geringere ADP/ATP Ratio als HIF-1 α Knockdownzellen ($p=0,0313$, Wilcoxon signed rank test).

Abbildung 3-26 verdeutlicht, dass unter hypoxischen Bedingungen der Zelle weniger Energie in Form von ATP zur Verfügung steht, was durch die sowohl in scr Kontrollzellen als auch in den Knockdownzellen signifikant gesteigerten ADP/ATP Ratios widerspiegelt wird. Im direkten Vergleich von HIF-1 α Knockdownzellen zu HIF-2 α Knockdownzellen zeigt sich eine unter Hypoxie signifikant verminderte ATP-Menge bzw. eine erhöhte ADP/ATP Ratio in HIF-1 α Knockdownzellen.

3.3.6. Microarray-Analyse von HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie und von HIF-1 α sowie HIF-2 α Knockdownzellen

Die differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen und HMEC-1 Zellen mit einem Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α wurde bereits in Kapitel 3.1.3 bzw. Kapitel 3.3.2 global durch eine Klassifizierung der regulierten Gene mittels Panther Datenbank beschrieben. Es konnte klar gezeigt werden, dass Hypoxie in HMEC-1 Zellen eine differentielle Genexpression im Bereich Bioenergetik und Angiogenese verursacht (siehe dazu Kapitel 3.1.3). Gleiches gilt für den Einfluss von Hypoxie auf die Knockdownzelllinien (siehe dazu Kapitel 3.3.2). Des Weiteren verursachen sowohl ein Knockdown von HIF-1 α als auch von HIF-2 α unter Hypoxie eine differentielle Genexpression im Bereich Bioenergetik und Angiogenese.

Die Klassifizierung mittels Panther Datenbank ermöglicht somit eine grundlegende und globale Aussage zur differentiellen Genexpression im Bereich Bioenergetik und Angiogenese. Um aber genauere Aussagen zur Regulation der einzelnen Signalwege innerhalb des Bereichs Bioenergetik bzw. Angiogenese treffen zu können ist es notwendig, die regulierten Gene innerhalb der Signalwege zu identifizieren und die Änderung der Genexpression quantitativ zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden mittels eines Heatmap-Builders [63] den quantitativen Werten der Genexpressionsanalyse Farbwerte zugeordnet. Dieses Verfahren ermöglicht einen schnellen Überblick darüber, welche Gene durch eine hypoxische Inkubation differentiell reguliert werden bzw. welche Gene unter Hypoxie in HIF-1 α Knockdownzellen und HIF-2 α Knockdownzellen differentiell reguliert werden. Als Resultat können zwei Kernaussagen zu den folgenden Fragen getroffen werden.

- 1) Ist die hypoxische Induktion/Suppression von Genen der Bioenergetik bzw. Angiogenese in Knockdownzellen vergleichbar mit HMEC-1 Zellen?
- 2) Gibt es bestimmte Gene oder komplette Signalwege, die unter Hypoxie allein durch HIF-1 α bzw. HIF-2 α reguliert werden?

Die folgende Abbildung 3-27 A stellt in Form einer Heatmap die zur Bioenergetik gehörenden Pathways und die innerhalb der Pathways regulierten Gene zum Einen für die hypoxische Induktion (Spalte 1-4) und zum Anderen für den Knockdown-Effekt unter Hypoxie (Spalte 5-7) dar. Deutlich zu erkennen ist, dass in HMEC-1 Zellen durch hypoxische

Inkubation eine differentielle Genexpression in den Pathways der Glykolyse, der Insulin-IGF-Signalwege, des Citratzyklus (TCA-Cycle), der ATP-Synthese, des Fructose-Glucose-Metabolismus, des N-Acetylglucosamin-Metabolismus, des Pentose-Phosphat-Stoffwechselweges und des Pyruvat-Metabolismus stattfindet. Am Beispiel der Glykolyse können nun im Folgenden mehrere Kernaussagen getroffen werden. Unter Hypoxie findet in HMEC-1 Zellen (Spalte 1) eine signifikante Induktion der kodierenden Gene für die Enzyme Aldolase, Enolase, Hexokinase und Phosphoglycerat-Kinase statt. Vergleicht man dazu die hypoxische Induktion in scr Kontrollzellen und HIF Knockdownzellen zeigt sich (Spalte 2-4), dass die oben genannten Gene auch hier mit Ausnahme der Phosphoglycerat-Kinase in scr Kontrollzellen signifikant induziert werden. Für die Pyruvat-Kinase lassen sich hingegen Unterschiede in der Induktion der Genexpression feststellen. Das Pyruvat-Kinase Isozym M1/M2 ist hier nur in scr Kontrollzellen und HIF-2 α Knockdownzellen unter Hypoxie signifikant induziert, das Pyruvat-Kinase Isozym R/L nur in HIF-2 α Knockdownzellen unter Hypoxie signifikant supprimiert. Es gibt also Gene, die in HMEC-1 Zellen und Knockdownzellen gleichermaßen Hypoxie-induziert sind, aber auch Gene welche stärker oder weniger stark unter Hypoxie induziert werden. Ein direkter Vergleich des Einflusses eines Knockdowns von HIF-1 α oder HIF-2 α wird bei Betrachtung von Spalte 5 bis 7 in Abbildung 3-27 A möglich. Am Beispiel der Glykolyse sieht man, dass ein Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α nicht zu einer signifikant veränderten Expressionsstärke der Gene im Vergleich zu scr Kontrollzellen unter Hypoxie führt. Die Expressionsstärke der Gene der Glykolyse ist also unter Hypoxie unabhängig von einem Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α . Als weiteres Beispiel kann hier die ATP-Synthese und das kodierende Gen für Cytochrom C betrachtet werden. In HMEC-1 Zellen und HIF-1 α Knockdownzellen führt Hypoxie zu einer signifikant gesteigerten Expression des Gens für Cytochrom C (Spalte 1-4). Darüber hinaus steigert ein Knockdown von HIF-1 α die Expression des Gens signifikant im Vergleich zu scr Kontrollzellen und HIF-2 α Knockdownzellen unter Hypoxie (Spalte 5-7).

Fasst man alle Spalten und kodierenden Gene innerhalb der Bioenergetik-Pathways zusammen, so kann man die folgenden Aussagen treffen. Hypoxie verursacht für eine Vielzahl von Genen der Bioenergetik eine signifikante Induktion der Genexpression in HMEC-1 Zellen. Einzig das Gen *FOXD2* des Insulin-IGF-Signalweges über Proteinkinase B

wird in HMEC-1 Zellen unter Hypoxie herunterreguliert. Auffällig ist die komplette Inhibition der hypoxischen Induktion des Insulin-IGF-Signalwegs in Zellen, die eine virale Transduktion erfahren haben. Ansonsten ist kein klarer Verlust der hypoxischen Induktion durch den Knockdown einer der beiden Faktoren ermittelbar. Als durch einen Knockdown von HIF-1 α diskret unter Hypoxie differentiell exprimierte Gene können *GRB2*, *FOXJ1*, *FOXQ1*, *Cyt C* und das Gen für die N-Acetylneuraminatylase genannt werden. Ein Knockdown von HIF-2 α führt zu keinem diskret unter Hypoxie differentiell exprimierten Gen. Sowohl ein Knockdown von HIF-1 α als auch HIF-2 α führt unter Hypoxie zu einer signifikant verstärkten Expression von PI3K. Es gibt keinen Signalweg innerhalb der Bioenergetik, der unter Hypoxie diskret durch HIF-1 α oder HIF-2 α reguliert wird.

Das wird mit Blick auf Abbildung 3-27 B noch einmal deutlich. Die Zuordnung der in der Heatmap dargestellten differentiell regulierten Gene zu ihren jeweiligen Pathways mittels Panther Database ermöglicht eine Aussage darüber, welche Gene bzw. Pathways diskret durch HIF1 bzw. HIF2 oder durch beide Faktoren zusammen beeinflusst werden. Dazu wurden die differentiell unter Hypoxie regulierten Gene eines HIF-1 α bzw. HIF-2 α Knockdowns dem jeweiligen Pathway sowie dem Faktor HIF1 bzw. HIF2 zugeordnet. Gene, die durch einen Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α gleichermaßen beeinflusst werden, werden dabei der Regulation durch beide Faktoren zugeordnet. Deutlich wird, dass ein Großteil der Gene der Bioenergetik-Pathways sowohl durch HIF1 als auch HIF2 reguliert wird. Innerhalb des N-Acetylglucosamin-Metabolismus und der ATP-Synthese konnte jeweils ein Gen identifiziert werden, dass nur durch HIF1 reguliert wird. Beide Pathways zeichnen sich aber zudem durch weitere beteiligte Gene aus, die im Microarray nicht erfasst werden, da sie nicht (signifikant) reguliert werden. Hier ist davon auszugehen, dass diese Gene ebenfalls durch HIF1 und HIF2 gemeinsam reguliert werden. Stellt man die mittels Microarray erfassbaren regulierten Gene durch die jeweiligen Faktoren noch einmal prozentual dar, so werden 80% der Gene der Bioenergetik durch HIF1 und HIF2 gemeinsam reguliert und 20% durch HIF1 reguliert (Abbildung 3-27 C).

3. Ergebnisse

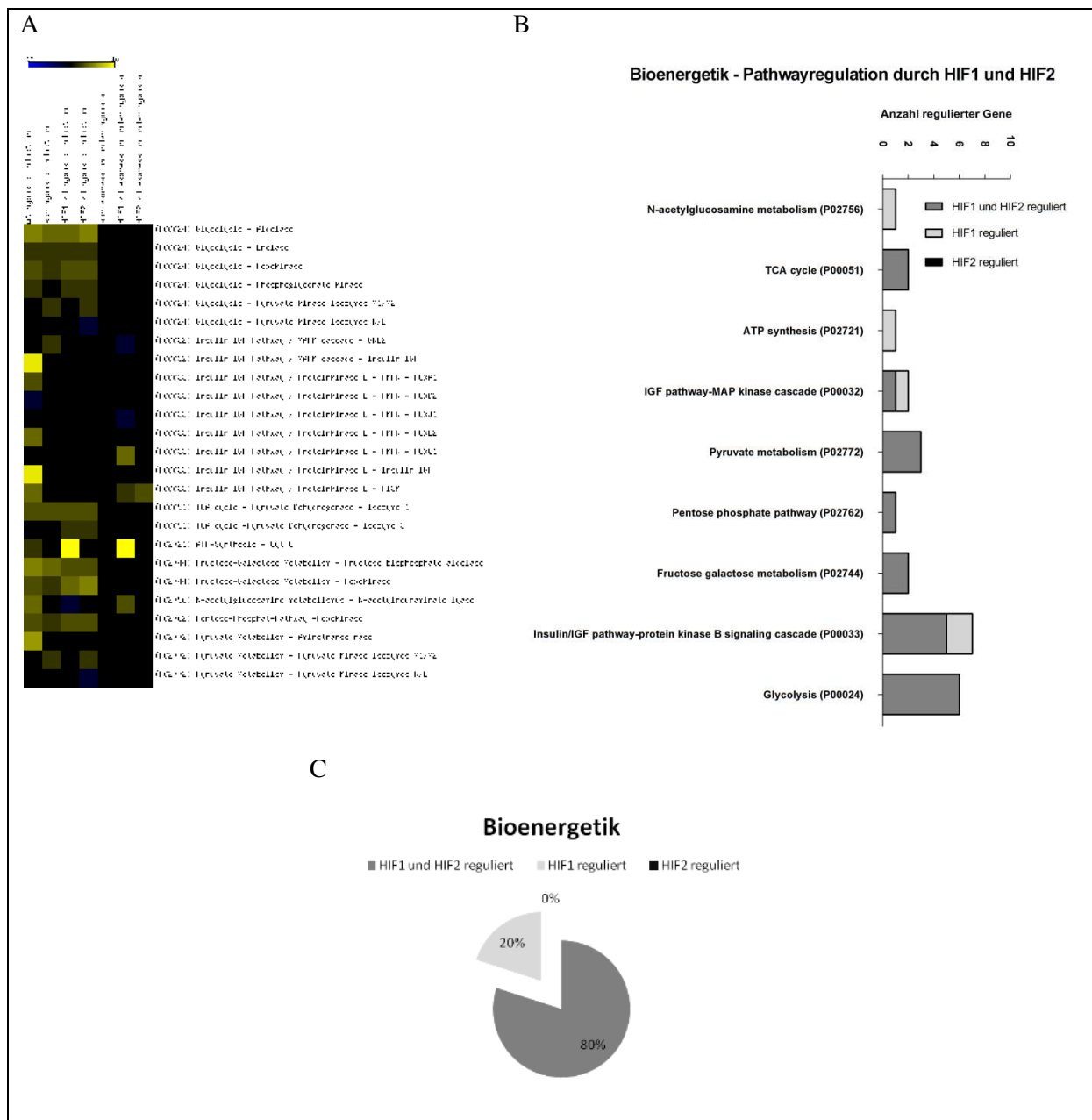


Abbildung 3-27 Microarray-Analyse von HMEC-1 Zellen und HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie – Bereich Bioenergetik.

(A) Visualisierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse mittels einer Heatmap. Farbliche Codierung der Expressionswerte und Auflistung der unter hypoxischer Inkubation signifikant induzierten (gelb) und supprimierten (blau) Gene der Bioenergetik in Spalte 1-4 und der unter Hypoxie im Vergleich zu scr Kontrollzellen signifikant induzierten (gelb) und supprimierten (blau) Gene von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt (HIF1 kd und HIF2 kd) in Spalte 5-7. (B) Zuordnung der Regulation der differentiell unter Hypoxie exprimierten Gene der Bioenergetik zum Faktor HIF-1 α (bzw. HIF1), HIF-2 α (bzw. HIF2) oder beider. (C) Prozentualer Einfluss der Faktoren HIF-1 α , HIF-2 α oder beider bei der Regulation der Genexpression im Bereich Bioenergetik.

Vergleichbar mit der Heatmap für die Gene der Bioenergetik lässt sich eine Heatmap für die Pathways und Gene der Angiogenese erstellen (Abbildung 3-28). Die Abbildung zeigt, dass in HMEC-1 Zellen durch hypoxische Inkubation eine differentielle Genexpression in den Pathways der Angiogenese, der Regulation des Zytoskeletts mittels Rho-GTPase, des EGF-Rezeptor Signalweges, des Endothelin Signalweges, des FGF Signalweges, der Hypoxie-Antwort mittels HIF-Aktivierung, der Oxidativen Stress-Antwort, des PDGF Signalweges, der Plasminogen aktivierten Signalkaskade, des VEGF Signalweges und der Vasopressin-Synthese stattfindet.

Fasst man alle Spalten und kodierenden Gene innerhalb der Angiogenese-Pathways zusammen, so kann man die folgenden Aussagen treffen. Hypoxie verursacht für eine Vielzahl von Genen der Angiogenese eine signifikante Induktion aber auch eine signifikante Suppression der Genexpression in HMEC-1 Zellen. Ein Verlust der hypoxischen Induktion durch den Knockdown von HIF-1 α als auch HIF-2 α ist für die Gene *DUSP8* und *PAM*, ein Verlust der hypoxischen Suppression durch den Knockdown von HIF-1 α als auch HIF-2 α ist für die Gene *BCL2* und *MMP3* ermittelbar. Ein Knockdown von HIF-1 α als auch HIF-2 α führt zu einer gesteigerten Induktion der Expression von *VEGF* unter Hypoxie im Vergleich zu HMEC-1 Zellen. Als durch einen Knockdown von HIF-1 α diskret unter Hypoxie differentiell exprimierte Gene können *GRB2*, *PDGFRB*, *PLD*, *WNT5A*, *MYLK*, *SPRY4*, *PPP2R2B*, *DUSP 10*, *DUSP 26*, *JAK3*, *MMP3* und das Gen *OXT* genannt werden. Ein Knockdown von HIF-2 α führt zu den diskret unter Hypoxie differentiell exprimierten Genen *DLL3*, *HSP27beta2*, *NOTCH4*, *PKC*, *ACTG2*, *MYH2*, *TUBB2B*, *EDNRA*, *ARHGAP9* und *MMP1*. Sowohl ein Knockdown von HIF-1 α als auch HIF-2 α führt unter Hypoxie zu einer signifikant verstärkten Expression von *FRZB*, *HSP27*, *NOTCH3* und *PI3K*. Darüber hinaus führt ein Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α unter Hypoxie zu einer signifikant verminderten Expression von *EDN*. Es gibt keinen Signalweg innerhalb der Angiogenese, der unter Hypoxie diskret durch HIF-1 α oder HIF-2 α reguliert wird.

Auch hier zeigt Abbildung 3-28 B noch einmal, dass die Gene der Angiogenese-Pathways zu einem großen Teil gemeinsam durch HIF1 und HIF2 reguliert werden. Es konnte kein Pathway identifiziert werden, innerhalb dessen alle Gene diskret durch HIF1 oder HIF2 reguliert werden. Für den VEGF-Signalweg und den Endothelin-Signalweg kann man

erkennen, dass über die gemeinsam regulierten Gene hinaus noch diskret durch HIF2 regulierte Gene vorliegen. Gleiches gilt für den Faktor HIF1 bei der Oxidativen Stress-Antwort und Vasopressin Synthese. Stellt man die mittels Microarray erfassbaren regulierten Gene durch die jeweiligen Faktoren noch einmal prozentual dar, so werden 74% der Gene der Angiogenese durch HIF1 und HIF2 gemeinsam, 14% durch HIF1 und 12% durch HIF2 reguliert (Abbildung 3-28 C).

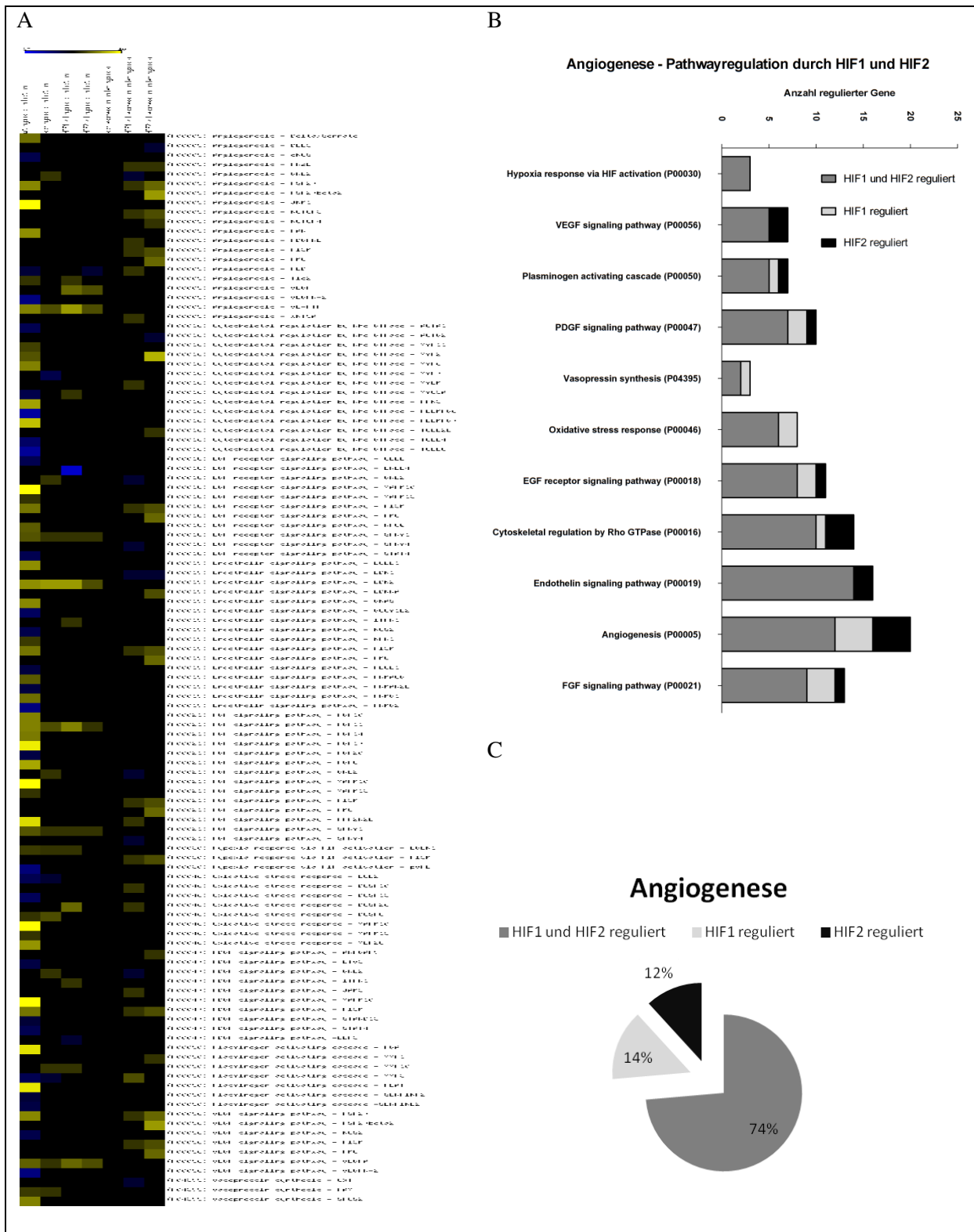


Abbildung 3-28 Microarray-Analyse von HMEC-1 Zellen und HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie – Bereich Angiogenese.

3. Ergebnisse

(A) Visualisierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse mittels einer Heatmap. Farbliche Codierung der Expressionswerte und Auflistung der unter hypoxischer Inkubation signifikant induzierten (gelb) und supprimierten (blau) Gene der Angiogenese in Spalte 1-4 und der unter Hypoxie im Vergleich zu scr Kontrollzellen signifikant induzierten (gelb) und supprimierten (blau) Gene von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt (HIF1 kd und HIF2 kd) in Spalte 5-7. (B) Zuordnung der Regulation der differentiell unter Hypoxie exprimierten Gene der Angiogenese zum Faktor HIF-1 α (bzw. HIF1), HIF-2 α (bzw. HIF2) oder beiden. (C) Prozentualer Einfluss der Faktoren HIF-1 α , HIF-2 α oder beider bei der Regulation der Genexpression im Bereich Angiogenese.

4. Diskussion

Die Zielsetzung im Rahmen dieser Arbeit war es, ein grundlegendes Verständnis der Angiogenese von Endothelzellen zu erlangen. Dazu zählt die Aufklärung molekularer Zusammenhänge, welche es Endothelzellen ermöglichen, sich den Bedingungen lokaler Hypoxie anzupassen und Angiogenese zu betreiben. Ein solches Grundverständnis bildet die Basis, um ein gezieltes Konzept sowie wirksame Strategien zur Behandlung von z.B. chronisch inflammatorischen Erkrankungen und Tumorerkrankungen zu entwickeln. Im Fokus dieser Arbeit stand die Regulation der Angiogenese von Endothelzellen unter Hypoxie mittels HIF-1 und HIF-2, wobei zuerst allgemein der Einfluss des Faktors Hypoxie auf die Angiogenese und Bioenergetik von Endothelzellen untersucht wurde. Darauf aufbauend wurde der Einfluss der Faktoren HIF-1 und HIF-2 auf die Angiogenese und Bioenergetik von Endothelzellen näher untersucht und ein Modell hinsichtlich der sich überschneidenden und der distinkten Funktionen von HIF-1 und HIF-2 in der Angiogenese und Bioenergetik erarbeitet.

4.1. HMEC-1 Zellen als Modellsystem für die Angiogenese von Endothelzellen

In dieser Arbeit dient die immortalisierte humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie (HMEC-1) als Modellsystem für die in Endothelzellen während der Angiogenese stattfindenden Prozesse. Die Zelllinie HMEC-1 wurde 1992 im Center for Disease Control in Atlanta, USA, etabliert und beschrieben [58]. HMEC-1 Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht die typischen Probleme bei der Untersuchung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen, wie die schwierige Isolation sowie Erzielung einer hohen Reinheit bei der Isolation, das langsame Wachstum in *in vitro* Kulturen oder die begrenzte Lebensspanne anderer Endothelzelllinien, aufweisen. HMEC-1 Zellen sind unter Anderem dadurch charakterisiert, dass sie eine „Kopfsteinplaster“-förmige Morphologie aufweisen, auf Matrigel™ Tubuli bilden und die Oberflächenmarker CD31, CD36, CD44 und CD54 (ICAM-1) exprimieren [58]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten HMEC-1 Zellen über die beschriebenen Eigenschaften verfügen. Abbildung 3-1 im Ergebnisteil zeigt die „kopfsteinpflaster“-förmige Morphologie, die Fähigkeit zur Tubulibildung auf Matrigel™ und die Expression der Oberflächenmarker CD31, CD36, CD44 und CD54. Die Färbung der Marker CD31 und CD36 erscheint in der

durchflusszytometrischen Untersuchung relativ schwach, zeigt aber eine deutliche Verschiebung in der Höhe der gemessenen Fluoreszenzintensität. Als Grund für den relativ schwachen Nachweis der beiden Marker kommt der verwendete Antikörper in Frage, welcher sich vom Antikörper zum durchflusszytometrischen Nachweis der Epitope EN-4 und PAL-E damals unterscheidet (Vergleich mit [58]). Zusammenfassend kann aber festgehalten werden, dass die 1992 initial beschriebenen verwendeten HMEC-1 Zellen [58] als Modellsystem für humane mikrovaskuläre Endothelzellen verwendet werden können. Sie weisen sowohl morphologische und phänotypische als auch durch die Tubulibildung funktionelle Charakteristika dieser Zellen auf.

Der Sauerstoffpartialdruck wirkt bei der Regulation der Angiogenese von Endothelzellen als hauptsächlich treibende Kraft. So konnte beobachtet werden, dass z.B. eine Steigerung der Muskelaktivität mit einer Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes innerhalb des Gewebes einhergeht, wodurch die sich etablierende Hypoxie zu einer Ausschüttung proangiogener Faktoren führt. Die proangiogenen Faktoren werden dabei direkt oder indirekt durch die Hypoxie in mangelversorgtem Gewebe moduliert [10]. Der direkte Einfluss einer Sauerstoffmangelversorgung in Form einer Hypoxie mit 1% Sauerstoffluftäquivalent auf die Angiogenese von Endothelzellen wurde in dieser Arbeit untersucht und erstmals numerisch belegt. So führt die Inkubation von Endothelzellen zu einer um den Faktor 1,6 erhöhten signifikanten Steigerung der relativen Länge der gebildeten Tubuli sowie zu einer um den Faktor 1,8 gesteigerten signifikanten Zunahme der gebildeten Verzweigungen (siehe Kapitel 3.1.2) im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Sowohl das Längenwachstum als auch die Zunahme der Verzweigungen belegen die durch hypoxische Inkubation verstärkte Vermehrung des vaskulären Geflechts durch Sprossung und Proliferation von Endothelzellen sowie durch Verzweigung, wie in der Literatur der Prozess der Angiogenese charakterisiert wird [12, 14-15].

4.2. Hypoxie führt zu einer differentiellen Genexpression in HMEC-1 Zellen mit HIF-1 und HIF-2 als Hauptregulatoren

Die Beobachtung des Einflusses einer Inkubation von Endothelzellen unter Hypoxie auf die Angiogenese legt nahe, dass in den Endothelzellen unter Hypoxie eine differentielle Genexpression im Vergleich zur Normoxie stattfindet. Die differentielle Expression von

Genen unter Hypoxie ermöglicht dabei die Modulation des angiogenen Prozesses und steuert das balancierte Zusammenspiel aus stimulatorischen und inhibitorischen Signalen der Angiogenese [1]. Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der Prozesse der Angiogenese an sich und damit untrennbar verbunden die Bioenergetik der Zellen. Bei Betrachtung der Angiogenese als Anpassungsprozess spielt eine große Anzahl von Faktoren eine Rolle, welche jeweils nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen mittels Panther Datenbank in bestimmte Signalwege und Regulationsmechanismen eingeordnet werden können [61-62]. So wird dem *Fibroblast growth factor/Fibroblast growth factor receptor* (FGF/FGFR) Signalweg eine bedeutende Rolle in der Tumorangio-genese zugesprochen [66], und er kann als unter Hypoxie in Endothelzellen differentiell exprimiert nachgewiesen werden (Abbildung 3-3). Auch die Klassifizierung der Angiogenese selbst als Signalweg mittels Panther Datenbank [61-62] und die darin unter Anderem enthaltenen Schlüsselfaktoren der Angiogenese wie der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Angiopoietin 1* (Ang-1), der *Platelet derived growth factor* (PDGF) und der *Fibroblast growth factor* (FGF) zeigen eine differentielle Regulation unter Hypoxie (Abbildung 3-3). Gleiches zeigt sich für das in dieser Arbeit ebenfalls in den Bereich Angiogenese eingeordnete Endothelin-System, das mit seinen drei Liganden Endothelin 1 bis 3 und den Endothelin-Rezeptoren A und B in jüngster Zeit mit dem Prozess der vaskulären Remodellierung und Angiogenese in Verbindung gebracht wird und zuvor als Hauptregulator der Vasokonstriktion betrachtet wurde [67]. Ebenfalls in enger Verbindung mit dem Prozess der Angiogenese von Endothelzellen stehen die Regulation des Zytoskeletts mittels Rho GTPase [68], Signalwege die durch den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) direkt und indirekt die Angiogenese anregen [69], Signalwege mittels Vasopressin Synthese und Einfluss auf die Gefäßbeschaffenheit [70], durch Plasminogen aktivierte proangiogene Signalkaskaden [71] und durch PDGF vermittelte Signalwege [72]. Neben allen bereits genannten Einflussfaktoren auf die Angiogenese von Endothelzellen ist der VEGF Signalweg als der in der Literatur am bedeutendsten beschriebene Signalweg zu nennen, da er zur Pathogenese vieler verschiedener Tumorerkrankungen maßgeblich beiträgt und derzeit einen bedeutenden Behandlungsansatz maligner Tumoren darstellt [72-75]. Auch die in Endothelzellen ausgelöste Antwort auf oxidativen Stress und die HIF-Aktivierung unter Hypoxie sind in den angiogenen Prozess in Endothelzellen einzuordnen und stellen darüber hinaus das Bindeglied zur Bioenergetik von

Endothelzellen dar. Allen vorhergehend genannten Signalwegen gemein ist, dass sie in Endothelzellen unter Hypoxie eine differentielle Genexpression im Vergleich zur Normoxie aufzeigen und die Adaptation der Zelle an die veränderte Sauerstoffverfügbarkeit widerspiegeln (Abbildung 3-3).

Bei Betrachtung der Bioenergetik von Endothelzellen wird ebenfalls deutlich, dass unter hypoxischen Bedingungen eine Vielzahl der der Bioenergetik zuzuordnenden Prozesse differentiell reguliert wird (Abbildung 3-4). So ist die Zelle wie in Kapitel 1.3 beschrieben unter Sauerstoffmangelbedingungen gezwungen, ihre Bioenergetik zu adaptieren, und in Ermangelung des fehlenden finalen Elektronenrezeptors in Form von Sauerstoff und durch Inhibition des TCA-Zyklus auf anaerobe Glykolyse umzuschalten [19]. Dieser Prozess spiegelt sich z.B. in der differentiellen Regulation von Genen der Glykolyse wider. Darüber hinaus wird der Zuckerstoffwechsel auch durch eine differentielle Genregulation im Fructose-Galactose-Metabolismus, im Pentose-Phosphat-Weg, im N-Acetylglucosamin-Metabolismus und innerhalb der Insulin/IGF-Signalkaskaden reguliert. Die Änderung des bioenergetischen Status der Zelle unter Hypoxie wird auch durch die Modulation des Pyruvat-Metabolismus als Vorstufe des ebenfalls veränderten TCA-Zyklus sichtbar. Eine Veränderung der Genexpression im Bereich der ATP-Synthese ist ebenfalls nachweisbar (Abbildung 3-4).

Es ist folglich evident, dass eine Inkubation von Endothelzellen unter Hypoxie zu einer differentiellen Genexpression in den biologischen Prozessen Angiogenese und Bioenergetik führt. Der Hypoxie induzierbare Faktor HIF fungiert bei einer Vielzahl von Prozessen der Adaptation an Hypoxie als Hauptregulator [22, 47]. So konnte in humanen Zellen gezeigt werden, dass als Antwort auf Hypoxie über 100 Gene in einer HIF-1 abhängigen Reaktion mit direkter Bindung von HIF-1 an das Gen reguliert werden [22]. Ebenso ist HIF-2 als DNA-Bindungspartner in mehr als 100 Genloci unter Hypoxie nachgewiesen wurden [76]. Für die in dieser Arbeit verwendeten HMEC-1 Zellen ist der Nachweis von HIF-1 α und HIF-2 α im Gesamtzellextrakt erfolgreich. Darüber hinaus liegen sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α im Nukleus der Zelle vor und können somit als Transkriptionsfaktor wirken (siehe Abbildung 3-5).

4.3. Hypoxie und die Expression von Genen der Glykolyse und Angiogenese

Das Vorliegen von HIF-1 α und HIF-2 α im Zellkern und damit verbunden das potentielle Wirken als Transkriptionsfaktor HIF-1 und HIF-2 löst die Transkription von Hypoxie-regulierten Genen in einer HIF-abhängigen Weise aus [76]. Aus diesem Grund wurden die als durch den Faktor HIF reguliert beschriebenen Gene *HIF1A* und *HIF2A* als Zielgene von HIF-1 und HIF-2 selbst, die Gene *PGK*, *GAPDH*, *LDHA* und *GLUT1* als Vertreter der Gene der Glykolyse und des Glucosetransports und die Gene *VEGFA* und *IL8* als Vertreter der Gene von proangiogenen Faktoren untersucht [24, 38, 47, 64]. In der Literatur wird diskutiert, dass die Rolle der Faktoren HIF-1 und HIF-2 als Transkriptionsfaktor von der Dauer der Hypoxie abhängig sein könnte [20]. Da eine Veränderung der Stärke des Einflusses von HIF-1 und HIF-2 auf die Genexpression um den Zeitraum einer 24h andauernden Hypoxie angenommen wird (siehe Abbildung 1-10), erstreckte sich die hier durchgeführte orientierende Kinetik über einen Zeitraum von 3h bis 44h unter Hypoxie [20]. Innerhalb der Kinetik wird sichtbar, dass sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α einer Regulation auf Proteinebene unterliegen, da die Expression der Gene *HIF1A* und *HIF2A* über den Zeitraum der Kinetik Schwankungen unterliegt und keine Induktion der Genexpression unter Hypoxie nachweisbar ist (Kapitel 3.1.5.1). Die Betrachtung der Genexpressionskinetik einiger Gene der Glykolyse und des Glucosetransportes zeigt im zeitlichen Verlauf für nahezu jeden Zeitpunkt eine Induktion der Genexpression unter Hypoxie (Kapitel 3.1.5.2). Die höchsten Genexpressionswerte werden innerhalb der ersten 20h hypoxischer Inkubation gemessen (*PGK* bei 20h, *GAPDH* bei 9h, *LDHA* bei 20h, *GLUT1* bei 6h). Diese Beobachtung deckt sich mit der Hypothese, dass initial nach Auftreten der Hypoxie eine Hochregulation der Glykolyse – möglicherweise vornehmlich durch HIF-1 gesteuert – stattfindet, um den Energiehaushalt der Zelle aufrechtzuerhalten [20]. Die Genexpression proangiogener Faktoren wie VEGF und IL-8 zeigt in der Kinetik nur zum Zeitpunkt von 20h tendenziell eine Induktion unter Hypoxie, wobei aber zu diesem Zeitpunkt die Stärke der Genexpression insgesamt im Vergleich zum Zeitpunkt nach 6h Inkubation schon wieder stark verringert ist (Kapitel 3.1.5.3). Zumindest im Fall der *IL8* Genexpression kann die mangelnde hypoxische Induktion erklärt werden, da z.B. Loboda beschreibt, dass HIF-1 als Inhibitor und HIF-2 als Promotor der *IL8* Expression wirkt [32]. Geht man davon

aus, dass wie beschrieben zu einem Zeitpunkt von 24h HIF-1 und HIF-2 gleich stark in der Zelle vorliegen, so ist keine Induktion von *IL8* unter Hypoxie zu erwarten [20].

Da im Falle der Gene der Glykolyse die deutlichste hypoxische Induktion zu einem Zeitpunkt von 20h nachweisbar war und die oben beschriebenen Daten des 2D-Angiogenese Assays ebenfalls zu einem Zeitpunkt von 20h hypoxischer Inkubation erhoben wurden, stellt der Probenzeitpunkt von 20h den idealen Messzeitpunkt dar. Der Messzeitpunkt von 20h hypoxischer Inkubation ermöglicht darüberhinaus einen direkten Vergleich der funktionellen Wirkung einer Hypoxie auf die Genexpression und Zytokinsekretion sowie die Angiogenese zu diesem Zeitpunkt. Aus diesem Grund wurde die Genexpression der Gene *HIF1A*, *HIF2A* (*EPAS1*), *PGK*, *GAPDH*, *LDHA*, *GLUT1*, *VEGFA* und *IL8* mit Blick auf die hypoxische Induktion nach 20h nicht nur orientierend (n=3) wie in der Kinetik sondern detailliert (n≥9) untersucht. Die Genexpression von *HIF1A* ist unter Normoxie numerisch höher als unter Hypoxie, und bei der Genexpression von *HIF2A* ist es genau umgekehrt (Abbildung 3-9). Durch diese Beobachtung könnte man annehmen, dass bereits zum Zeitpunkt von 20h hypoxischer Inkubation der Wechsel der Hauptrolle bei der Adaptation an Hypoxie von HIF-1 auf HIF-2 stattgefunden hat [20]. Diese Annahme kann aber mit Blick auf die Proteinmengen von HIF-1 α und HIF-2 α nicht weiter bekräftigt werden, da die Proteinmengen unter Hypoxie nahezu gleich groß sind (Abbildung 3-5). Für die Genexpression von *PGK*, *LDHA* und *GLUT1* ließ sich eine signifikante Induktion unter Hypoxie nachweisen, was einhergehend mit der Literatur auf ein Umschalten der Bioenergetik von einer oxidativen Phosphorylierung auf die anaerobe Glykolyse schließen lässt. So wird mehr Glucose in die Zellen transportiert, die Glykolyse unter anderem durch das Enzym Phosphoglycerat-Kinase angetrieben und das entstehende Pyruvat mittels Laktat-Dehydrogenase zu Laktat reduziert [19-20, 47]. Für die Expression von *GAPDH* kann in diesem Zusammenhang eine numerische Erhöhung der Expression um den Faktor 1,7 ermittelt werden (Abbildung 3-10). Sowohl im Fall von *VEGFA* als auch *IL8* ließ sich keine hypoxische Induktion der Genexpression nachweisen (Abbildung 3-11). Im Falle von IL-8 könnte dies wie oben bereits angeführt auf die gegenspieligen Einflüsse von HIF-1 und HIF-2 auf die IL-8 Expression hindeuten [32]. Für die Expression des Gens *VEGFA* wäre eine deutliche Induktion unter Hypoxie zu erwarten gewesen [24, 75]. Dieser Nachweis gelang in dieser Arbeit aufgrund hoher Schwankungen in

der Expression des Gens nicht, verdeutlicht aber, dass der Fokus neben der Genexpression auf die Ausschüttung von Zytokinen gelegt werden sollte.

4.4. Modulation der Angiogenese durch Zytokinsekretion unter Hypoxie

Aus ähnlichen Gründen wie oben bei der Bestimmung der Genexpression unter Hypoxie beschrieben, wurde für die Ausschüttung von Zytokinen unter Hypoxie ebenfalls eine orientierende Kinetik durchgeführt (n=3). Darüber hinaus ermöglicht die Datenerfassung mittels Kinetik eine Aussage, ob ein Zytokin sich im Laufe der Inkubation im Überstand ansammelt oder ob es von den Zellen wieder aufgenommen wird. Mit der Methode des Multiplex Suspension Arrays konnte im Zellkulturüberstand von HMEC-1 Zellen über den zeitlichen Verlauf der Inkubation eine Ansammlung der Faktoren IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1 und VEGF nachgewiesen werden (Abbildung 3-12). Einzig der Faktor FGF basic lag im zeitlichen Verlauf vermindert im Überstand vor. Es konnte für einige der Faktoren auch eine verstärkte Sekretion unter Hypoxie (IL-10, IL-12, IL-13, VEGF) nachgewiesen werden. Die Faktoren IL-6, IL-8, MCP-1 und FGF basic lagen hingegen unter Hypoxie eher vermindert im Überstand vor. Ein genauer Vergleich der Konzentration der sekretierten Faktoren unter Normoxie und Hypoxie wurde zum Zeitpunkt von 20h durchgeführt (n≥23), da zu diesem Zeitpunkt wie bereits diskutiert die Angiogenese der Zellen abläuft und die Faktoren HIF-1 und HIF-2 in vergleichbarer Menge vorliegen. Der Faktor IL-6 wird von Endothelzellen sekretiert und sammelt sich während der Inkubation von HMEC-1 Zellen im Überstand an (Abbildung 3-13). Der Vergleich von Normoxie und Hypoxie zeigt, dass es Faktoren gibt, deren Sekretion unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck stattfindet. Zu diesen Faktoren zählen neben IL-6 auch IL-8, IL-10 und IL-13. IL-6 und IL-8 kann eine das Immunsystem aktivierende Rolle zugeordnet werden. Die Sekretion von IL-6 kann z.B. der Aktivierung von Immunzellen durch Endothelzellen in einem inflammatorischen Milieu dienen [77]. Eine vergleichbare Rolle wie IL-6 spielt in entzündlichen Prozessen das Zytokin IL-8, welches der Rekrutierung von Immunzellen dient [78], aber auch als proangiogener Faktor beschrieben wird [79]. Anfangs verwunderte die nicht ermittelbare Induktion des proangiogenen Faktors IL-8 unter Hypoxie [80], um später anhand der entgegengesetzten Effekte von HIF-1 und HIF-2 auf die IL-8 Expression erklärt zu werden [32, 64]. Der Faktor IL-10 hat hingegen eine eher immunsupprimierende Funktion [81]. Zusammenfassend sekretieren HMEC-1 Zellen sowohl proinflammatorische als auch

antiinflammatorische Zytokine unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck. Hypoxie zeigt aber bei der Sekretion der Faktoren IL-12, MCP-1, FGF basic, MIF und VEGF einen Einfluss auf die ermittelbare Konzentration im Zellkulturüberstand (Abbildung 3-13). Unter Hypoxie erhöht im Überstand nachweisbar sind die Faktoren IL-12, MIF und VEGF, welche allesamt direkt oder indirekt einen Einfluss auf die Angiogenese von Endothelzellen ausüben können. So ist der Faktor MIF z.B. in T Zellen als HIF-reguliert beschrieben worden und reguliert auch in der umgekehrten Weise die Stabilität von HIF [82-83]. Eine Stabilisierung von HIF resultiert in der vermehrten Sekretion des proangiogenen Faktors VEGF und löst die Angiogenese von Endothelzellen aus [14-15]. Als Regulator der induzierten Angiogenese kann die vermehrte Ausschüttung des Interleukins 12 betrachtet werden, welches indirekt vermittelt eine Hemmung der Angiogenese bewirkt [84]. Der Faktor MCP-1 und auch der Faktor FGF basic sind unter Hypoxie vermindert im Überstand von Endothelzellen nachweisbar. Beiden Faktoren wird eine proangiogene Wirkung zugeschrieben [85-86]. Betrachtet man das Repertoire der ausgeschleusten Faktoren in ihrer Summe, so sekretieren HMEC-1 Zellen immunmodulatorische Faktoren unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck. Eine Änderung des Sauerstoffpartialdruckes in Form einer Hypoxie führt zudem zur Sekretion von proangiogenen und antiangiogenen Faktoren, was die Regulation des angiogenen Prozesses widerspiegelt. Auffällig sind die sehr hohen Mengen nachgewiesenen VEGFs und MIFs im Überstand der Zellen, welche zum Einen auf eine starke hypoxische Induktion der Angiogenese mittels VEGF und zum Anderen auf eine Stabilisierung des Faktors MIF durch HIF schließen lässt.

Die Induktion der Angiogenese der Endothelzellen dient dem Zweck der Revaskularisierung von hypoxischen Gewebe und der Wiederherstellung der Sauerstoffhomöostase der hypoxischen Zellen, welche zur Aufrechterhaltung einer funktionierenden Bioenergetik notwendig ist (siehe Kapitel 1.2). In dieser Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass eine Absenkung des Sauerstoffpartialdruckes in Form von Hypoxie zu einer Induktion der für die Glykolyse relevanten Gene führt (Abbildung 3-10). Trotz der Induktion der Glykolyse ist die Zelle aber unter Hypoxie nicht in der Lage, ihre ADP/ATP Ratio konstant zu halten. Wie Abbildung 3-14 zeigt, steht der Zelle unter Hypoxie im Vergleich zur ADP-Menge eine geringere Menge an ATP zur Verfügung. Die Zelle ist demzufolge bioenergetisch restringiert, aber noch zur Ausführung von Angiogenese und zur Zytokinsekretion fähig.

Zusammenfassend kann für HMEC-1 Zellen festgehalten werden, dass sie unter Hypoxie eine differentielle Genexpression aufweisen, welche im Detail unter anderem durch die Änderung der Expression bioenergetisch relevanter und die Angiogenese fördernder Faktoren zustandekommt und in der Summe zu einer vermehrten Angiogenese führt. Als bekannte Hauptregulatoren unter hypoxischen Bedingungen konnten sowohl HIF-1 als auch HIF-2 nachgewiesen werden. Die Abbildung 4-1 gibt die Erkenntnisse zur Wirkung von Hypoxie auf HMEC-1 Zellen in Form von Bioenergetik und Angiogenese vereinfacht wieder.

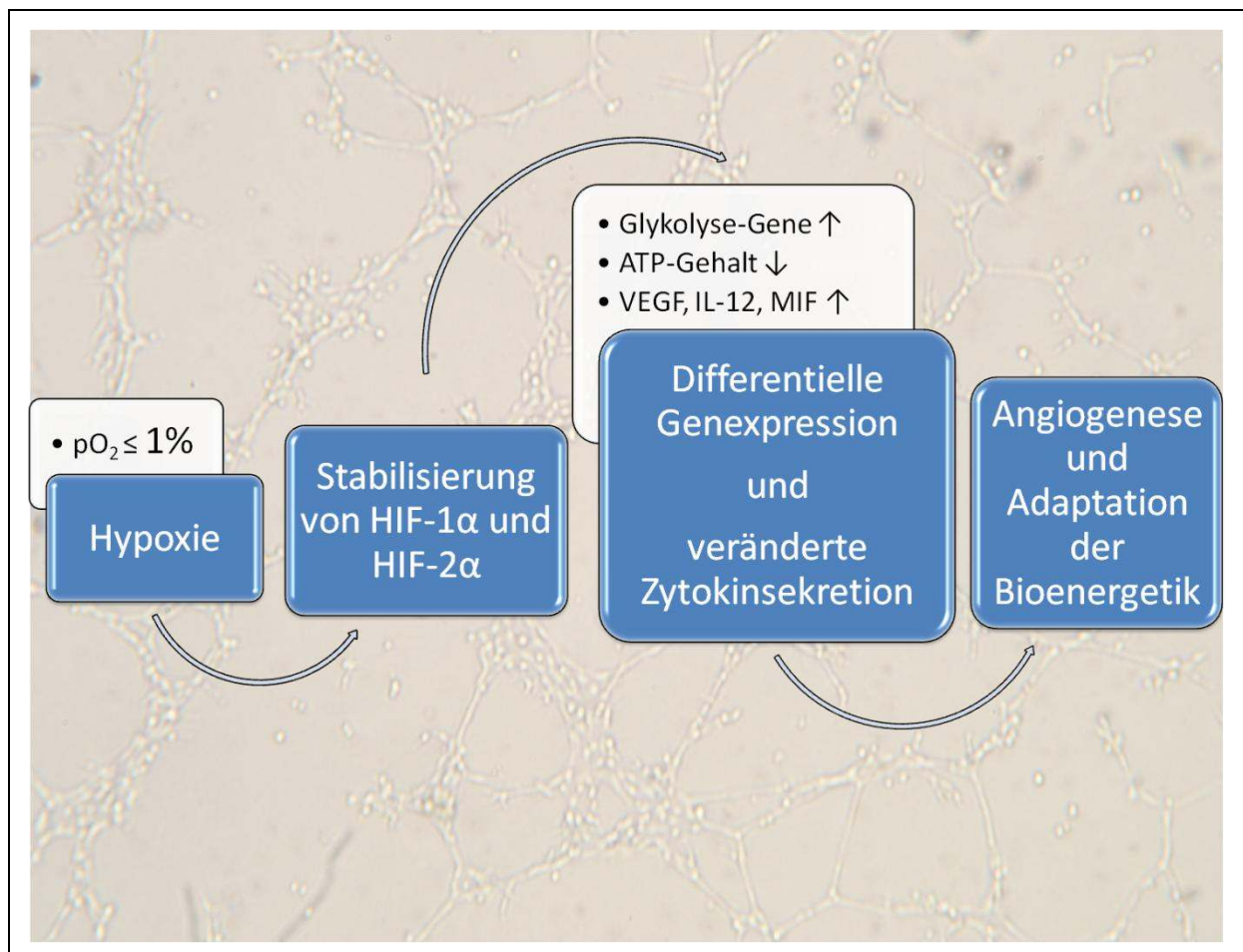


Abbildung 4-1 Wirkung von Hypoxie auf Endothelzellen.

Die Inkubation von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie führt zur Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α . Damit einhergehend findet eine verstärkte Transkription von Genen der Glykolyse statt, der ATP-Gehalt sinkt und Angiogenese modulierende Zytokine werden vermehrt ausgeschüttet. Daraus resultierend verstärken HMEC-1 Zellen die Angiogenese und adaptieren ihre Bioenergetik.

Mit Fokus auf mögliche Therapieansätze für Erkrankungen mit hypoxischem Erscheinungsbild ist es nun interessant zu unterscheiden, welche der oben beschriebenen

Effekte einer Hypoxie auf Endothelzellen diskret durch HIF-1 oder HIF-2 oder aber durch beide Faktoren gleichermaßen reguliert werden.

4.5. Die Verwendung der Knockdown-Technologie zur Klärung der Rolle von HIF-1 α und HIF-2 α

Zur Klärung des Einflusses von HIF-1 und HIF-2 auf die Funktionalität von Endothelzellen wurde mittels einer lentiviralen Transduktion ein shRNA basiertes Knockdown-System in HMEC-1 Zellen eingebracht. Zu diesem Zweck wurden drei shRNA-Konstrukte verwendet, welche entweder keine mRNA Zielsequenz in HMEC-1 Zellen (engl. scrambled shRNA – scr) oder jeweils eine Zielsequenz mit HIF-1 α bzw. HIF-2 α mRNA als Ziel besitzen. Durch die Erzeugung einer HMEC-1 Zelllinie mit scr shRNA stand für die durchgeführten Experimente eine Kontroll-Zelllinie zur Verfügung. Die Transduktion von HMEC-1 Zellen funktionierte gut und ermöglichte eine Anreicherung der shRNA-Konstrukt tragenden Zellen auf über 80% der Gesamtzellzahl, sodass die in den weiteren Experimenten erzielten Ergebnisse auf den Knockdown des Faktors HIF-1 α bzw. HIF-2 α zurückführbar waren (Abbildung 3-15). Zudem wurde ein „off-target“-Effekt der verwendeten shRNAs spezifisch für HIF-1 α bzw. HIF-2 α ausgeschlossen, indem neben dem Nachweis des funktionierenden Knockdowns auf Proteinebene für z.B. den Faktor HIF-1 α die Präsenz der anderen Isoform HIF-2 α (Abbildung 3-16) und umgekehrt (Abbildung 3-17) bestätigt wurde. Bei der Durchführung eines shRNA vermittelten Knockdowns von HIF-1 α und HIF-2 α sollte mechanismusbedingt durch das Anpassen der shRNA Sequenz an die mRNA des Zielgens auch eine Reduktion der jeweiligen mRNA Menge von *HIF1A* bzw. *HIF2A* nachweisbar sein. Im Falle der Transkriptmenge von *HIF2A* trifft dies auch zu, wobei eine Verminderung der mRNA Menge unter Normoxie um 58% und unter Hypoxie um 65% nachweisbar ist (Abbildung 3-18). Für die Transkriptmenge von *HIF1A* ist keine Verminderung in den entsprechenden Knockdownzellen nachweisbar, was auf einen Knockdown von HIF-1 α mittels der Inhibition der Translation der *HIF1A* mRNA schließen lässt (Abbildung 3-18). Sowohl der Knockdown von HIF-2 α mittels mRNA-Bindung und Degradation als auch der Knockdown von HIF-1 α mittels Translationsinhibition sind mechanistisch in der Literatur beschrieben [87] und führen gleichermaßen zur erwünschten Verminderung der jeweiligen Proteinmenge.

4.6. Der Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α hat einen negativen Einfluss auf die Angiogenese

Durch die erfolgreiche Herstellung von HIF-1 α und HIF-2 α Knockdownzelllinien konnte im Folgenden der Einfluss der beiden Faktoren auf die Funktionalität von HMEC-1 Endothelzellen untersucht werden. Zuerst wurde die Fähigkeit der Zellen untersucht, Angiogenese auf Matrigel™ unter Normoxie und Hypoxie einzuleiten. Die lentivirale Behandlung der Zellen mit dem Einbringen eines Knockdownkonstrukts führt nicht zu einer Verminderung des angiogenen Potentials in scr Kontrollzellen. So zeigen scr Kontrollzellen unter Normoxie eine geringe Angiogenese, welche unter Hypoxie signifikant gesteigert wird (Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20). Eine solche signifikante Steigerung der Angiogenese unter Hypoxie ist sowohl in HIF-1 α als auch HIF-2 α Knockdownzellen nicht nachweisbar. Die starke Verminderung von HIF-1 α bzw. HIF-2 α in den Knockdownzellen unter Hypoxie führt demzufolge zu einer reduzierten Fähigkeit der Induktion der Angiogenese durch Hypoxie in HMEC-1 Endothelzellen und konnte speziell für den Faktor HIF-2 α in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden.

4.7. Der Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α verändert die differentielle Genexpression unter Hypoxie

Für HMEC-1 Zellen konnte wie oben beschrieben gezeigt werden, dass es unter Hypoxie zu einer differentiellen Genexpression in den biologischen Prozessen Angiogenese und Bioenergetik kommt. Darüber hinaus konnte das Vorhandensein von HIF-1 und HIF-2 als Hauptregulatoren unter Hypoxie nachgewiesen werden. Führt man eine lentivirale Behandlung mit Einbringen eines Knockdownkonstrukts in HMEC-1 Zellen durch, so geht das Merkmal einer differentiellen Genexpression unter Hypoxie nicht verloren, wird aber abgeschwächt. Dies wird im Vergleich der Anzahl der regulierten Gene der Bioenergetik und Angiogenese von HMEC-1 Endothelzellen (Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4) mit scr Kontrollzellen (Abbildung 3-21 und Abbildung 3-22) deutlich. Zusätzlich zu der differentiellen Genexpression unter Hypoxie konnte nachgewiesen werden, dass ein Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α unter Hypoxie zu einer veränderten Genexpression im Vergleich zu Kontrollzellen führt (Abbildung 3-21 und Abbildung 3-22). Dies erhärtet die Hypothese, dass ein Großteil der unter Hypoxie differentiell exprimierten Gene durch den Faktor HIF-1 oder HIF-2 reguliert werden und dies einen Einfluss auf die Fähigkeit zur

Angiogenese von HMEC-1 Endothelzellen hat. Darüber hinaus gibt es auch Gene, die durch keinen der beiden Faktoren unter Hypoxie reguliert werden und trotzdem eine Regulation unter Hypoxie aufweisen. Für solche Gene kommen andere Transkriptionsfaktoren als Regulatoren unter Hypoxie in Frage, zu denen z.B., wie von Fangradt und Hahne kürzlich gezeigt, NF κ B gezählt werden kann [88]. Diese Faktoren stehen aber nicht im weiteren Mittelpunkt dieser Arbeit.

4.8. Die Bioenergetik von HMEC-1 Zellen wird durch HIF-1 und HIF-2 reguliert

Da der Prozess der Angiogenese in einem direkten Zusammenhang mit der Bioenergetik der Zellen steht, wurden die Knockdownzelllinien auf die Expression einiger typischer Gene der Glykolyse hin untersucht. Für die Gene *PGK*, *GAPDH* und *LDHA* konnte sowohl in Kontrollzellen als auch Knockdownzellen eine signifikante Induktion der Genexpression unter Hypoxie nachgewiesen werden (Abbildung 3-23). Ein Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α resultierte dementsprechend nicht in einem Verlust der Induktion der genannten Gene der Glykolyse und lässt auf einen überlappenden Einfluss oder gemeinsame HREs von HIF-1 und HIF-2 im Promotorbereich dieser Gene schließen. Für das codierende Gen *GLUT1* des Glucosetransporters konnte eine signifikant verminderte Expression in HIF-2 α Knockdownzellen ermittelt werden, sodass dieses Gen sehr wahrscheinlich hauptsächlich durch HIF-2 reguliert wird. Dies kann trotz Erhöhung der Expression der Gene der Bioenergetik *PGK*, *GAPDH* und *LDHA* unter Hypoxie zu einer verminderten Glucoseaufnahme der Zellen führen und durch eine Art „Begrenzer“-Funktion einen negativen Einfluss auf die Energiegewinnung der Zelle unter Hypoxie haben. So wurde z.B. für T Zellen gezeigt, dass ein Mangel an Glucose – in diesem Fall durch fehlende Supplementierung des Mediums – unter Hypoxie zu einer signifikanten Verminderung des ATP-Spiegels trotz aktiver Glykolyse-Enzyme führt [89]. Im Endeffekt kann neben anderen Faktoren die so mögliche Restriktion der Bioenergetik in Form verminderter Glucoseaufnahme zu der ermittelten Verminderung der Angiogenese in HMEC-1 Zellen mit HIF-2 α Knockdown führen. Der Aspekt einer Verminderung des ATP-Spiegels durch verminderte Glucoseaufnahme von HIF-2 α Knockdownzellen lässt sich allerdings nicht in der ADP/ATP Ratio der Zellen wiederfinden (Abbildung 3-26). Die Ermittlung der ADP/ATP Ratio ist aber auch auf die Widerspiegelung des Energieturnovers limitiert. So lässt sie keine Aussage zum Gesamtenergiegehalt der Zelle in Form von ATP zu. Nichtsdestotrotz weist eine

erhöhte ADP/ATP Ratio auf eine Verringerung des ATP-Spiegels in der Zelle hin. In HMEC-1 Endothelzellen führt eine Inkubation unter Hypoxie zu einer erhöhten ADP/ATP Ratio, allerdings zeigen die HIF-2 α Knockdownzellen keine verminderte ADP/ATP Ratio im Vergleich zu scr Kontrollzellen. Zellen mit HIF-1 α Knockdown hingegen haben im Vergleich zu HIF-2 α Knockdownzellen signifikant mehr ADP pro ATP, was für eine Restriktion der Bioenergetik spricht. Diese könnte noch einmal mit Blick auf die Gene der Glykolyse von einer verminderten GAPDH Aktivität herrühren (Abbildung 3-23). Es lässt sich zwar keine signifikante Verminderung des *GAPDH* Transkripts in HIF-1 α Knockdownzellen nachweisen, allerdings liegt die Expressionsstärke bei nur 46% von der der Kontrollzellen. Das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) überführt innerhalb der Glykolyse Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat [19]. Es ist möglich, dass die verminderte Expression dieses Enzyms als Engpass innerhalb des Prozesses der Glykolyse wirkt und die anaerobe Glykolyse als Energiequelle unter Hypoxie verlangsamt. Im Ergebnis könnte dies zu verminderten ATP-Spiegeln in HIF-1 α Knockdownzellen führen und die verminderte Induktion der Angiogenese unter Hypoxie erklären. Neben den bioenergetischen Einflüssen auf die Angiogenese ist diese hauptsächlich von der Ausschüttung proangiogener Faktoren wie z.B. VEGF abhängig, welche eine gerichtete Angiogenese von Endothelzellen auslösen [14-16].

4.9. HIF-2 moduliert vorrangig die Angiogenese

Bei Betrachtung der Genexpression der proangiogenen Faktoren VEGF und IL8 können diese ebenso wie die zuvor diskutierte Restriktion der Bioenergetik für die im 2D-Angiogenese Assay beobachtete Verminderung der Angiogenese in den Knockdownzelllinien verantwortlich sein. So ist für HMEC-1 Zellen mit Knockdown von HIF-2 α eine signifikante Verminderung des mRNA Transkripts von *VEGFA* und *IL8* unter Hypoxie nachweisbar (Abbildung 3-24). HIF-1 α Knockdownzellen zeigen keine signifikant verminderten Transkriptmengen von *VEGFA* und *IL8*, wobei aber die Expressionsstärke von *VEGFA* bei 44% von der der Kontrollzellen und die Expressionsstärke von *IL8* bei 65% von der der Kontrollzellen unter Hypoxie liegt. VEGF stellt den Schlüsselfaktor bei der Förderung der Angiogenese dar [14-16]. Eine Verminderung des Faktors VEGF steht dabei bereits seit einiger Zeit im Fokus von antiangiogenen Therapien z.B. bei der Bekämpfung von Tumoren. Dabei kann sowohl VEGF an sich als auch der VEGF Rezeptor im Mittelpunkt des

therapeutischen Ansatzes stehen. Der gegen VEGF gerichtete monoklonale Antikörper Bevacizumab ist z.B. von der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA (engl. food and drug administration – FDA) für die Behandlung einer Vielzahl von Tumorerkrankungen zugelassen, zu denen Kolonkarzinome, Lungenkarzinome, Brustkarzinome, Nierenzellkarzinome und Glioblastome gehören [90]. Allerdings führt eine anti-VEGF Therapie auch zu ungewünschten Nebenwirkungen wie einem erhöhtem Blutdruck [91], einem erhöhten Herzinfarkt- und Schlaganfall-Risiko [92] und Problemen bei der Wundheilung [93]. Da zudem VEGF zwar einen Hauptregulator der Angiogenese darstellt, aber nicht alleinstehend für diese verantwortlich ist, stehen weitere die Angiogenese modulierende Faktoren im Fokus dieser Arbeit. So kann für HIF-2 α Knockdownzellen eine signifikante Verminderung der VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Abbildung 3-25). Aber auch der proangiogene Faktor IL-8 wird durch einen Knockdown von HIF-2 α vermindert sekretiert, während ein Knockdown von HIF-1 α keinen Einfluss auf die Konzentration im Überstand hat (Abbildung 3-25). Am Beispiel von IL-8 werden die gegensätzlichen Einflüsse von HIF-1 und HIF-2 deutlich. So wurde bereits von Florczyk mittels einer Überexpression von HIF-1 α und HIF-2 α gezeigt, dass HIF-1 zu einer Verminderung der messbaren IL-8 Expression führt und HIF-2 eine Erhöhung der IL-8 Expression verursacht [64]. In dieser Arbeit konnten diese Daten erstmals in einem neuen Ansatz mittels Knockdown der beiden Faktoren bestätigt werden. Ein Knockdown von HIF-2 α führt dabei im Umkehrschluss zu den Daten von Florczyk zu einer Verminderung des messbaren IL-8 im Zellkulturüberstand. Ebenfalls als HIF-2 reguliert kann in dieser Arbeit erstmals der Faktor IL-12 nachgewiesen werden. Ein Knockdown von HIF-2 α führt dabei zu signifikant verminderten Konzentrationen von IL-12 unter Hypoxie. Dies hebt den stärkeren Einfluss von HIF-2 α gegenüber HIF-1 α bei der Regulation proangiogener (VEGF, IL-8) aber auch antiangiogener Faktoren (IL-12) hervor. Für HMEC-1 Endothelzellen wurden in dieser Arbeit desweiteren die Faktoren MIF und MCP-1 als Hypoxie-reguliert nachgewiesen (Abbildung 3-13). Für diese Faktoren kann kein negativer Einfluss auf die sekretierte Menge bei einem Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α nachgewiesen werden. Vielmehr verursacht im Falle von MIF ein Knockdown von HIF-1 α einer verstärkte MIF-Sekretion, wobei diese Ergebnisse im Kontrast zu Daten aus T Zellen stehen, bei denen ein Knockdown von HIF-1 zu einer verminderten MIF Menge führte [83]. Im Falle von MCP-1 scheint durch einen

Knockdown von HIF-2 α die durch Hypoxie vermittelte Verminderung der MCP-1 Sekretion aufgehoben zu werden. MCP-1 scheint also in Endothelzellen unter Kontrolle des Faktors HIF-2 zu stehen.

Zusammenfassend stehen die hier in HMEC-1 Endothelzellen identifizierten Hypoxie-regulierten Faktoren VEGF, MIF und MCP-1 und IL-12 bis auf MIF vornehmlich unter Regulation durch HIF-2. Der Faktor MIF wird eher durch HIF-1 reguliert. Das Zytokin IL-8 konnte in HMEC-1 Zellen nicht als Hypoxie-reguliert identifiziert werden. Allerdings zeigt ein Knockdown von HIF-2 α deutlich den Einfluss der beiden HIF-Isoformen. Liegen beide HIF-Isoformen in gleichem Maße vor, so heben sich induzierende und supprimierende Wirkung unter Hypoxie auf und IL-8 liegt unverändert im Überstand vor. Bei Fehlen einer der beiden Isoformen wird IL-8 entweder stärker induziert (bei Knockdown von HIF-1 α) oder stärker supprimiert (bei Knockdown von HIF-2 α).

4.10. HIF-1 und HIF-2 - Team oder Konkurrenten?

Die Analyse der Genexpression und Zytokinsekretion gibt zwar Hinweise auf eine Regulation der Angiogenese durch HIF-1 und HIF-2 mittels verschiedener Mechanismen, in denen HIF-1 scheinbar eher die Bioenergetik und HIF-2 eher die Angiogenese an sich moduliert. Sie gibt aber keinen umfassenden Überblick, ob diese Beobachtungen generalisiert werden können und HIF-1 der „Bioenergetik“-Faktor und HIF-2 der „Angiogenese“-Faktor unter Hypoxie ist. Eine solche Aussage kann aber mittels Microarray-Experiment getroffen werden, in dem das gesamte Transkriptom zum Einen auf eine Regulation durch Hypoxie und zum Anderen auf den Einfluss von HIF-1 und HIF-2 auf das Transkriptom hin untersucht und in biologische Prozesse eingeordnet wird.

Die Analyse der der Bioenergetik zuzuordnenden Prozesse zeigt, dass der Großteil der mittels Microarray identifizierten unter Hypoxie differentiell exprimierten Gene sowohl von HIF-1 als auch von HIF-2 gleichermaßen beeinflusst werden. Diese Gruppe der Gene stellt einen Anteil von 80% der regulierten Gene dar. Diskret durch HIF-1 reguliert sind 20% der identifizierten unter Hypoxie regulierten Gene (Abbildung 3-27). Es wird aber ähnlich wie bei der Untersuchung der Genexpression mittels realtime PCR deutlich, dass es keinen Prozess gibt, der allein durch HIF-1 oder HIF-2 reguliert wird. So gibt es aber trotzdem immer wieder einzelne Gene innerhalb der Prozesse, die nur durch einen der beiden Faktoren reguliert zu

sein scheinen und die daher einen limitierenden Faktor bei dem Versuch der Bereitstellung von Energie darstellen könnten. Innerhalb des Bereichs der für die Angiogenese relevanten Prozesse werden ähnlich wie bei der Bioenergetik 74% der unter Hypoxie differentiell exprimierten Gene sowohl von HIF-1 als auch HIF-2 gesteuert (Abbildung 3-28). Des Weiteren werden 14% diskret durch HIF-1 und 12% diskret durch HIF-2 reguliert. Speziell für den VEGF Signalweg, den Endothelin Signalweg und den Prozess der Angiogenese an sich wird aber neben den überlappend durch HIF-1 und HIF-2 regulierten Genen deutlich, dass HIF-2 eine wichtige regulatorische Funktion in der Angiogenese erfüllt. Vereinfacht kann man den Einfluss von HIF-1 und HIF-2 auf die Adaptation von HMEC-1 Endothelzellen unter Hypoxie im Bereich Bioenergetik und Angiogenese wie in Abbildung 4-2 dargestellt zusammenfassen. HIF-1 und HIF-2 regulieren gemeinsam eine Vielzahl von Genen und nur zu einem geringen Anteil als Faktor allein ein einzelnes Gen.

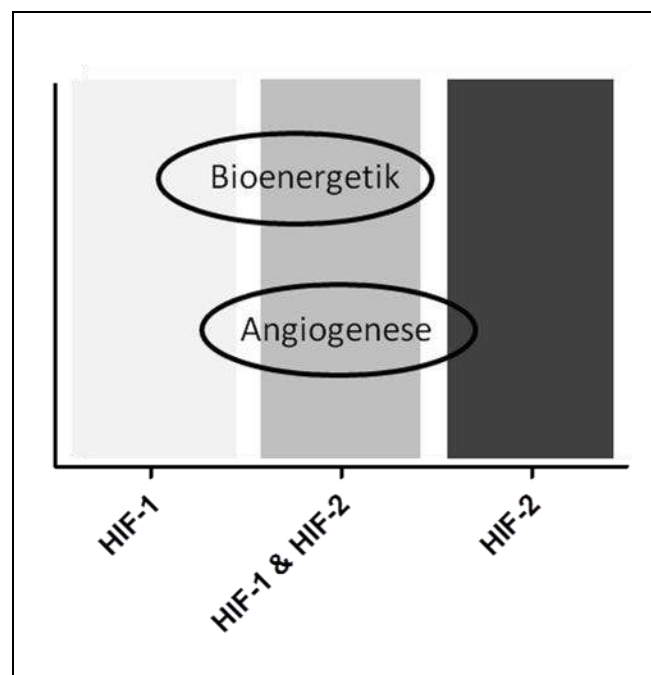


Abbildung 4-2 Die Regulation von Genen der Bioenergetik und Angiogenese durch HIF-1, HIF-2 oder überlappend durch HIF-1 und HIF-2.

Die Regulation von Genen, die bioenergetischen Prozessen bzw. der Angiogenese von HMEC-1 Endothelzellen zuzuordnen sind, erfolgt zu einem Großteil durch die Faktoren HIF-1 und HIF-2 gemeinsam. Innerhalb der Bioenergetik wird ein Teil der Gene distinkt durch HIF-1 reguliert. In angiogenen Prozessen regulieren sowohl HIF-1 als auch HIF-2 distinkt ca. ein Viertel der beteiligten Gene unter Hypoxie.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Genregulation durch HIF-1 und HIF-2 decken sich mit bereits publizierten Daten [76, 94], heben sich aber durch den funktionellen

Nachweis einer gestörten Angiogenese bei Knockdown von HIF-1 α bzw. HIF-2 α sowie durch die Identifikation von in ihrer Expression von HIF-1 oder HIF-2 abhängigen Gene ab. So konnte Mole mittels der CHIP-on-ChIP Methode für HIF-1 546 und für HIF-2 143 genomische Sequenzen identifizieren, an denen der jeweilige Faktor bindet [76]. Allerdings ist der Nachweis des möglichen Bindens von HIF-1 oder HIF-2 an bestimmten Genloci nicht gleichzusetzen mit einer funktionellen Bestätigung des Wirkens von HIF-1 oder HIF-2 als Transkriptionsfaktor, welches ein Knockdown von HIF-1 α oder HIF-2 α aber ermöglicht. Nichtsdestotrotz konnte Mole ebenfalls bestätigen, dass z.B. im Bereich Glykolyse 2 Genloci eine Bindung von HIF-1 und HIF-2 aufweisen und 8 Genloci ausschließlich HIF-1 binden [76]. Für Prozesse der Angiogenese konnte er nachweisen, dass ein Genlocus durch HIF-1, ein Genlocus durch HIF-1 und HIF-2 und 2 Genloci nur durch HIF-2 erkannt und gebunden werden. Ähnliche Ergebnisse für den Einfluss von HIF-1 bzw. HIF-2 auf die Bioenergetik konnte Schödel mittels der ChIP-seq Methode zeigen [94]. So bindet HIF-1 im Vergleich zu HIF-2 vermehrt an Genloci, welche innerhalb der Glykolyse, des Fructose-Mannose-Metabolismus und des Pentose-Phosphat-Weges eine Rolle spielen, was ebenfalls die größere Bedeutung von HIF-1 in der Bioenergetik bekräftigt. So stehen die bisher vermuteten Einflüsse und Bindungsstellen von HIF-1 und HIF-2 [76, 94] zu einem Großteil im Einklang mit den hier erhobenen Daten. Darüber hinaus ist es aber von Bedeutung, den Einfluss von HIF-1 und HIF-2 auf die Genexpression und damit verbunden die Adaptation der Zellen an Hypoxie nicht als starres System zu betrachten. Wie bereits in der Einleitung im Kapitel 1.4.3.1 und 1.5.2 beschrieben, ist die Regulation und Stabilisierung von HIF-1 und HIF-2 nicht nur vom vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck, sondern auch von einer zeitlichen Komponente abhängig [20]. Eine langanhaltende Hypoxie führt zu einer Favorisierung der Stabilisation von HIF-2 gegenüber HIF-1 [20]. Durch die Identifikation der hohen Anzahl gemeinsam durch HIF-1 und HIF-2 regulierter Gene in dieser Arbeit stellt sich die Frage, ob bei einer langanhaltenden Hypoxie nicht eine Verschiebung von einer gemeinsamen Genregulation durch HIF-1 und HIF-2 hin zu einer Genregulation durch HIF-2 stattfindet. Dieser Aspekt sollte in zukünftigen Arbeiten mit Hinblick auf mögliche therapeutische Ansätze näher untersucht werden. So wäre es vorstellbar, dass eine gezielte Modulation des Faktors HIF-2 bei Erkrankungen mit chronisch hypoxischem Erscheinungsbild eine wirksamere Methode darstellt als die heutzutage verwendeten Methoden der Regulation

proangiogener Faktoren wie z.B. VEGF. Ein weiterer Vorteil der Modulation von HIF-2 wäre, dass im Gegensatz zu einer alleinigen anti-VEGF Therapie gleichzeitig auch weitere die Angiogenese steuernde und in dieser Arbeit identifizierte Faktoren wie IL-6, IL-8, IL-12 und MCP-1 erfasst werden würden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die essentielle Rolle von HIF-1 und HIF-2 für die Angiogenese von HMEC-1 Endothelzellen unter Hypoxie nachgewiesen. Dabei steuern sowohl HIF-1 als auch HIF-2 in weit überlappenden Bereichen die Expression von Genen der Bioenergetik und Angiogenese und üben durch die damit verbundene Kontrolle der Sekretion Angiogenese modulierender Faktoren einen Haupteinfluss auf die Adaptation der Zellen an Hypoxie aus. Der Faktor HIF-1 spielt bei der Regulation der Bioenergetik eine dem Faktor HIF-2 übergeordnete Rolle, während HIF-2 diesen Part in der Angiogenese übernimmt. Der Einfluss der beiden Faktoren ist aber von der Dauer der Hypoxie abhängig, weswegen in Anbetracht der neuen Erkenntnisse dieser Arbeit in Zukunft die Modulation der Wirkung des Faktors HIF-2 im Vordergrund therapeutischer Ansätze zur Behandlung chronischer Erkrankungen mit hypoxischen Erscheinungsbild stehen könnte.

5. Referenzen

1. Carmeliet P: **Angiogenesis in life, disease and medicine.** *Nature* 2005, **438**:932-936.
2. Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P: **Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism.** *Dev Cell* 2009, **16**:167-179.
3. Sitkovsky M, Lukashev D: **Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**:712-721.
4. Ward JP: **Oxygen sensors in context.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1777**:1-14.
5. Tsai AG, Johnson PC, Intaglietta M: **Oxygen gradients in the microcirculation.** *Physiol Rev* 2003, **83**:933-963.
6. Tsai AG, Johnson PC, Intaglietta M: **Is the distribution of tissue pO(2) homogeneous?** *Antioxid Redox Signal* 2007, **9**:979-984.
7. Gnaiger E: **Oxygen conformance of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology.** *Adv Exp Med Biol* 2003, **543**:39-55.
8. Carmeliet P, Jain RK: **Angiogenesis in cancer and other diseases.** *Nature* 2000, **407**:249-257.
9. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J: **Endothelial cells and VEGF in vascular development.** *Nature* 2005, **438**:937-945.
10. Adair TH, Montani JP: 2010.
11. Schmidt A, Brixius K, Bloch W: **Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis.** *Circ Res* 2007, **101**:125-136.
12. Carmeliet P, Collen D: **Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease.** *J Pathol* 2000, **190**:387-405.
13. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT: **Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis.** *Genes Dev* 2002, **16**:2684-2698.
14. Gerhardt H: **VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting.** *Organogenesis* 2008, **4**:241-246.
15. Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M: **Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way.** *Nat Rev Clin Oncol* 2009, **6**:315-326.
16. Horowitz A, Simons M: **Branching morphogenesis.** *Circ Res* 2008, **103**:784-795.
17. van Hinsbergh VW, Koolwijk P: **Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead.** *Cardiovasc Res* 2008, **78**:203-212.
18. Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K: **The lamellipodium: where motility begins.** *Trends Cell Biol* 2002, **12**:112-120.
19. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemistry*. 7th edn. New York: W.H. Freeman; 2012.
20. Koh MY, Powis G: **Passing the baton: the HIF switch.** *Trends Biochem Sci* 2012, **37**:364-372.
21. Covello KL, Simon MC: **HIFs, hypoxia, and vascular development.** *Curr Top Dev Biol* 2004, **62**:37-54.
22. Semenza GL: **Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine.** *Cell* 2012, **148**:399-408.
23. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ: **Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway.** *Mol Cell* 2008, **30**:393-402.
24. Gaber T, Dziurla R, Tripmacher R, Burmester GR, Buttgerit F: **Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O2! See what HIF can do!** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:971-980.
25. Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W: **Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions.** *J Interferon Cytokine Res* 2005, **25**:297-310.

26. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: **Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:5510-5514.
27. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, et al: **Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation.** *Science* 2001, **292**:468-472.
28. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG: **Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:423-427.
29. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: **Activation of the HIF pathway in cancer.** *Curr Opin Genet Dev* 2001, **11**:293-299.
30. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL: **FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity.** *Genes Dev* 2001, **15**:2675-2686.
31. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J: **Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases.** *J Biol Chem* 2004, **279**:9899-9904.
32. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J: **HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other?** *Vascul Pharmacol* 2012, **56**:245-251.
33. Liu YV, Semenza GL: **RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 α degradation vs. stabilization.** *Cell Cycle* 2007, **6**:656-659.
34. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL: **RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O₂-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α .** *Mol Cell* 2007, **25**:207-217.
35. Koh MY, Darnay BG, Powis G: **Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1 α , leading to its oxygen-independent degradation.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**:7081-7095.
36. Luo W, Zhong J, Chang R, Hu H, Pandey A, Semenza GL: **Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α but Not HIF-2 α .** *J Biol Chem* 2010, **285**:3651-3663.
37. Dioum EM, Chen R, Alexander MS, Zhang Q, Hogg RT, Gerard RD, Garcia JA: **Regulation of hypoxia-inducible factor 2 α signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1.** *Science* 2009, **324**:1289-1293.
38. Keith B, Johnson RS, Simon MC: **HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression.** *Nat Rev Cancer* 2012, **12**:9-22.
39. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B, Epstein JA, Moores SL, Erickson-Miller CL, Haase VH: **Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia.** *Blood* 2010, **116**:3039-3048.
40. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU: **Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells.** *FASEB J* 2004, **18**:1462-1464.
41. Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M, Shelton JM, Richardson JA, Moe O, Garcia JA: **HIF-2 α regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner.** *Blood* 2005, **105**:3133-3140.
42. Simons M: **Angiogenesis: where do we stand now?** *Circulation* 2005, **111**:1556-1566.
43. Firestein GS: **Evolving concepts of rheumatoid arthritis.** *Nature* 2003, **423**:356-361.
44. Paleolog EM: **Angiogenesis in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res* 2002, **4 Suppl 3**:S81-90.

45. Szekanecz Z, Besenyei T, Paragh G, Koch AE: **Angiogenesis in rheumatoid arthritis.** *Autoimmunity* 2009, **42**:563-573.
46. Folkman J: **What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?** *J Natl Cancer Inst* 1990, **82**:4-6.
47. Semenza GL: **Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis.** *Curr Opin Genet Dev* 1998, **8**:588-594.
48. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: **Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:4604-4613.
49. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: **VEGF receptor signalling - in control of vascular function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:359-371.
50. Jensen RL, Ragel BT, Whang K, Gillespie D: **Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas.** *J Neurooncol* 2006, **78**:233-247.
51. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E: **Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis.** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**:309-314.
52. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ: **Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:8104-8109.
53. Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS: **Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis.** *Cancer Cell* 2004, **6**:485-495.
54. Otrrock ZK, Hatoum HA, Awada AH, Ishak RS, Shamseddine AI: **Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: structure, regulation and clinical perspectives.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2009, **70**:93-102.
55. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW: **Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases.** *Cancer Res* 1999, **59**:5830-5835.
56. Franovic A, Holterman CE, Payette J, Lee S: **Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:21306-21311.
57. Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ: **Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:5675-5686.
58. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ: **HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line.** *J Invest Dermatol* 1992, **99**:683-690.
59. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: **Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:1-13.
60. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.** *Nat Protoc* 2009, **4**:44-57.
61. Mi H, Lazareva-Ulitsky B, Loo R, Kejariwal A, Vandergriff J, Rabkin S, Guo N, Muruganujan A, Doremieux O, Campbell MJ, et al: **The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:D284-288.
62. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A: **PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function.** *Genome Res* 2003, **13**:2129-2141.

63. Pavlidis P, Noble WS: **Matrix2png: a utility for visualizing matrix data.** *Bioinformatics* 2003, **19**:295-296.
64. Florczyk U, Czauderna S, Stachurska A, Tertil M, Nowak W, Kozakowska M, Poellinger L, Jozkowicz A, Loboda A, Dulak J: **Opposite effects of HIF-1alpha and HIF-2alpha on the regulation of IL-8 expression in endothelial cells.** *Free Radic Biol Med* 2011, **51**:1882-1892.
65. Kokkonen H, Soderstrom I, Rocklov J, Hallmans G, Lejon K, Rantapaa Dahlqvist S: **Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**:383-391.
66. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD: **Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**:1855-1862.
67. Rodriguez-Pascual F, Busnadiego O, Lagares D, Lamas S: **Role of endothelin in the cardiovascular system.** *Pharmacol Res* 2011, **63**:463-472.
68. van der Meel R, Symons MH, Kudernatsch R, Kok RJ, Schiffelers RM, Storm G, Gallagher WM, Byrne AT: **The VEGF/Rho GTPase signalling pathway: a promising target for anti-angiogenic/anti-invasion therapy.** *Drug Discov Today* 2011, **16**:219-228.
69. De Luca A, Carotenuto A, Rachiglio A, Gallo M, Maiello MR, Aldinucci D, Pinto A, Normanno N: **The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment.** *J Cell Physiol* 2008, **214**:559-567.
70. Kozniewska E, Romaniuk K: **Vasopressin in vascular regulation and water homeostasis in the brain.** *J Physiol Pharmacol* 2008, **59 Suppl 8**:109-116.
71. Kwaan HC, McMahon B: **The role of plasminogen-plasmin system in cancer.** *Cancer Treat Res* 2009, **148**:43-66.
72. Xia Y, Lu RN, Li J: **Angiogenic factors in chronic lymphocytic leukemia.** *Leuk Res* 2012, **36**:1211-1217.
73. Kubota Y: **Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy.** *Keio J Med* 2012, **61**:47-56.
74. Gori B, Ricciardi S, Fulvi A, Del Signore E, de Marinis F: **New oral multitargeted antiangiogenics in non-small-cell lung cancer treatment.** *Future Oncol* 2012, **8**:559-573.
75. Rapisarda A, Melillo G: **Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy.** *Adv Cancer Res* 2012, **114**:237-267.
76. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, Ratcliffe PJ: **Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts.** *J Biol Chem* 2009, **284**:16767-16775.
77. Ferrero MC, Bregante J, Delpino MV, Barrionuevo P, Fossati CA, Giambartolomei GH, Baldi PC: **Proinflammatory response of human endothelial cells to Brucella infection.** *Microbes Infect* 2011, **13**:852-861.
78. Baggiolini M, Clark-Lewis I: **Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine.** *FEBS Lett* 1992, **307**:97-101.
79. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK: **IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis.** *J Immunol* 2003, **170**:3369-3376.
80. Loboda A, Jazwa A, Jozkowicz A, Molema G, Dulak J: **Angiogenic transcriptome of human microvascular endothelial cells: Effect of hypoxia, modulation by atorvastatin.** *Vascul Pharmacol* 2006, **44**:206-214.
81. Grutz G: **New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression.** *J Leukoc Biol* 2005, **77**:3-15.
82. Bifulco C, McDaniel K, Leng L, Bucala R: **Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor.** *Curr Pharm Des* 2008, **14**:3790-3801.

83. Gaber T, Schellmann S, Erekul KB, Fangradt M, Tykwinska K, Hahne M, Maschmeyer P, Wagegg M, Stahn C, Kolar P, et al: **Macrophage migration inhibitory factor counterregulates dexamethasone-mediated suppression of hypoxia-inducible factor-1 alpha function and differentially influences human CD4+ T cell proliferation under hypoxia.** *J Immunol* 2011, **186**:764-774.
84. Airoidi I, Ribatti D: **Regulation of angiostatic chemokines driven by IL-12 and IL-27 in human tumors.** *J Leukoc Biol* 2011, **90**:875-882.
85. Liakouli V, Cipriani P, Marrelli A, Alvaro S, Ruscitti P, Giacomelli R: **Angiogenic cytokines and growth factors in systemic sclerosis.** *Autoimmun Rev* 2011, **10**:590-594.
86. Ornitz DM, Itoh N: **Fibroblast growth factors.** *Genome Biol* 2001, **2**:REVIEWS3005.
87. Gu S, Kay MA: **How do miRNAs mediate translational repression?** *Silence* 2010, **1**:11.
88. Fangradt M, Hahne M, Gaber T, Strehl C, Rauch R, Hoff P, Lohning M, Burmester GR, Buttgerit F: **Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia.** *Arthritis Res Ther* 2012, **14**:R181.
89. Dziurla R, Gaber T, Fangradt M, Hahne M, Tripmacher R, Kolar P, Spies CM, Burmester GR, Buttgerit F: **Effects of hypoxia and/or lack of glucose on cellular energy metabolism and cytokine production in stimulated human CD4+ T lymphocytes.** *Immunol Lett* 2010, **131**:97-105.
90. Meadows KL, Hurwitz HI: **Anti-VEGF Therapies in the Clinic.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, **2**.
91. Bono P, Elfving H, Utriainen T, Osterlund P, Saarto T, Alanko T, Joensuu H: **Hypertension and clinical benefit of bevacizumab in the treatment of advanced renal cell carcinoma.** *Ann Oncol* 2009, **20**:393-394.
92. Scappaticci FA, Skillings JR, Holden SN, Gerber HP, Miller K, Kabbinavar F, Bergsland E, Ngai J, Holmgren E, Wang J, Hurwitz H: **Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab.** *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**:1232-1239.
93. Scappaticci FA, Fehrenbacher L, Cartwright T, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Kabbinavar F, Novotny W, Sarkar S, Hurwitz H: **Surgical wound healing complications in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab.** *J Surg Oncol* 2005, **91**:173-180.
94. Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR: **High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq.** *Blood* 2011, **117**:e207-217.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

6.1.1. Vorkommende Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
2D	zweidimensional
ACT	Actin
APC	Allophycocyanin
ARNT	Aryl hydrocarbon nuclear translocator
ATCC	American Type Culture Collection
ADM	Adrenomedullin
ADP	Adenosindiphosphat
ALDA	Aldehyddehydrogenase
AMP	Adenosinmonophosphat
ANG	Angiopoietin
ARHGAP9	engl. Rho GTPase-activating protein 9
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCL	engl. B-cell CLL/lymphoma
bHLH/PAS	helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CBP	engl. cAMP-response-element-binding protein-binding protein
CCL	engl. chemokine (C-C motif) ligand
CCR	engl. chemokine (C-C motif) receptor
CD	engl. cluster of differentiation
CDC	engl. - Center for disease control
cDNA	engl. complementary DNA
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
CHIP	engl. carboxy terminus of HSP70-interacting protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase
CREB	cAMP-response-element-binding protein
C _T	Schwellwertzyklus – engl. threshold cycle
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) receptor
Cy	Cyanin
CYT	Cytochrom

Abkürzung	Beschreibung
DLL	engl. delta-like
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure – engl. desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
DC	Dendritische Zelle – engl. dendritic cell
DUSP	engl. dual specificity phosphatase
dsDNA	engl. double-stranded DNA
EBM	engl. endothelial basal medium
EC	Endothelzelle – engl. endothelial cell
ECM	extrazelluläre Matrix – engl. extracellular matrix
EDN	Endothelin
EDNR	Endothelin-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1A	engl. eukariotic translation elongation factor 1 alpha
EGF	engl. endothelial growth factor
engl.	englisch
EPAS1	engl. endothelial PAS domain
EPC	endotheliale Vorläuferzelle – engl. endothelial progenitor cell
EPO	Erythropoietin
FACS	engl. Fluorescence Activated Cell Sorting
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid
FDA	engl. food and drug administration
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
FGF	engl. fibroblast growth factor
FIH	HIF inhibierender Faktor – engl. factor inhibiting HIF
FKS	Fötales Kälberserum
FOX	engl. forkhead box
FRZB	engl. frizzled
FSC	Vorwärtsstreulicht – engl. forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	engl. green fluorescent protein
GLUT	Glucosetransporter (auch SLC2A)
G-CSF	engl. granulocyte colony-stimulating-factor
GM-CSF	engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor
GRB	engl. growth factor receptor bound protein
GTP	Guanosintriphosphat
HAF	engl. hypoxia-associated factor
HEK	engl. human embryonic kidney
HGF	engl. hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor – engl. hypoxia inducible factor
HK	Hexokinase
HMEC-1	humane mikrovaskuläre Endothelzellen – engl. human microvascular
HPC	engl. hematopoietic progenitor cell

Abkürzung	Beschreibung
HRE	engl. hypoxia responsive element
HSP	Hitze Schock Protein - engl. heat shock protein
HRP	Meerrettich-Peroxidase – engl. horseradish peroxidase
Hyp	Hypoxie
ICAM	engl. intercellular adhesion molecule
ID	engl. identity
IFN	Interferon
IFP	engl. interstitial fluid pressure
IGF	engl. insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IP	Immunprotein
IPAS	engl. inhibitory PAS domain
JAK	Januskinase
JAM	engl. junctional adhesion molecules
k.A.	keine Angabe
kd	knockdown
KGF	engl. keratinocyte growth factor
LB	Lysogeny Broth
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LIF	engl. leukemia inhibitory factor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
max	maximal
MCP	engl. monocyte chemoattractant protein
ME	Mercaptoethanol
MHC	major histocompatibility complex
MIF	engl. macrophage migration inhibitory factor
min	minimal
MIP	engl. macrophage inflammatory protein
MMP	engl. matrix metalloproteinase
MYH2	engl. myosin heavy chain IIa
MYLK	engl. Myosin-light-chain-kinase
N ₂	molekularer Stickstoff
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid
Nox	Normoxie
n.m.	nicht messbar
NOTCH	Eigename
O ₂	molekularer Sauerstoff
ODD	sauerstoffabhängige Degradationsdomäne – engl. oxygen dependent
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
OXT	Oxytocin
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PAF	engl. platelet-activating factor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

Abkürzung	Beschreibung
PAI	engl. plasminogen activator inhibitor
PAM	engl. peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
PANTHER	engl. protein analysis through evolutionary relationships
PAS	PER/ARNT/SIM
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	engl. platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PECAM	engl. platelet/endothelial cell adhesion molecule
PFK	Phosphofruktokinase
PGK	Phosphoglyceratkinase
pH	latein. potentia Hydrogenii
PHD	prolyl-hydroxylase domain-containing enzyme
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLD	Phospholipase D
pLL	Plasmid LentiLox
PMA	phorbol myristate acetate
PNK	Polynukleotidkinase
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPP2R2B	engl. protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pVHL	von-Hippel-Lindau Genprodukt
RA	Rheumatoide Arthritis
RACK1	engl. receptor for activated protein kinase C1
RANTES	engl. regulated and normal T cell expressed and secreted
RIN	engl. RNA integrity number
RLE	relative Längeneinheit
RNA	Ribonukleinsäure – engl. ribonucleic acid
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure – engl. ribosomal ribonucleic acid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies – engl. reactive oxygen species
RT	Reverse Transkriptase
SAP	engl. Shrimp alkaline phosphatase
scr	engl. scrambled
SDF	engl. stromal derived factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	small hairpin RNA
SIRT1	Sirtuin 1
SLC2A	engl. solute carrier family 2 member (auch GLUT)
SMC	glatte Muskelzelle – engl. smooth muscle cell
SPRY	engl. sprouty
SSC	Seitwärtsstreulicht – engl. sideward scatter
TAD	Transaktivierungsdomäne – engl. transactivation domain

Abkürzung	Beschreibung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trikarbonsäure(zyklus) – engl. tricarboxylic acid (cycle)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	engl. transforming growth factor-beta
Tie	engl. TEK tyrosine kinase
TIMP	engl. tissue inhibitor of metalloproteinases
TM	engl. trademark
TNF- α	engl. tumor necrosis factor α
TRIS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TUBB	Beta-Tubulin
UV	Ultraviolett
VCAM	engl. vascular cell-adhesion molecule
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor
VEGFR	engl. vascular endothelial growth factor receptor
WNT	engl. wingless INT-1
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

6.1.2. Vorkommende Einheiten / SI-Einheiten

Abkürzung	Beschreibung
cm ²	Quadratzentimeter
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
K	Kelvin
kPa	Kilo-Pascal
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
n	Anzahl
nm	Nanometer
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
RLE	relative Längeneinheit
rpm	Umdrehungen pro Minute – engl. revolutions per minute
s	Sekunde
S	Svedberg Koeffizient
U	unit
V	Volt
°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Sauerstoffpartialdrücke im menschlichen Körper.....	2
Abbildung 1-2	Herkunft von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen.	3
Abbildung 1-3	Bildung neuer Blutgefäße mittels Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.	5
Abbildung 1-4	Verlauf der Angiogenese mittels Sprossung.	6
Abbildung 1-5	Darstellung der strukturellen Domänen von HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α sowie des Bindungspartners HIF-1 β	13
Abbildung 1-6	Schematische Darstellung der HIF- α Regulation unter Normoxie und Hypoxie.....	15
Abbildung 1-7	Zusammenspiel von Angiogenese und synovialer Hyperplasie in der Rheumatoiden Arthritis.	19
Abbildung 1-8	Der Einfluss von löslichen Faktoren und an der Zelloberfläche von Endothelzellen gebundenen Faktoren auf die Angiogenese.	20
Abbildung 1-9	Strategien zur Unterbindung der Tumor-assoziierten Angiogenese durch Beeinflussung von Endothelzellen und von nicht-endothelialen Zellen.....	23
Abbildung 1-10	Die Rolle von HIF-1 und HIF-2 in der Tumorgenese und der Wechsel des Einflusses von HIF-1 auf HIF-2 mittels des Faktors HAF bei langanhaltender Hypoxie.	24
Abbildung 2-1	Schematische Darstellung der Auswertung eines 2D-Angiogenese Assays.	40
Abbildung 2-2	Nachweis der korrekten Klonierung der HIF-2 α -shRNA mittels <i>Cyclesequencing</i>	47
Abbildung 2-3	Ergebnis einer RNA-Qualitätsbestimmung mittels Bioanalyzer.	48
Abbildung 2-4	Amplifikationskurve und Schmelzkurve einer realtime PCR.	51
Abbildung 2-5	Gel und Elektropherogram der bei Miltenyi Biotec bearbeiteten Total-RNA Proben für den Microarray.	54
Abbildung 3-1	Morphologische Charakterisierung von HMEC-1 Zellen.	61
Abbildung 3-2	Morphologische Charakterisierung von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie.	63
Abbildung 3-3	Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie – Gene der Angiogenese.	64

Abbildung 3-4	Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen unter Hypoxie – Gene der Bioenergetik.	65
Abbildung 3-5	Western Blot Nachweis von HIF-1 α und HIF-2 α auf Proteinebene in HMEC-1 Zellen unter Hypoxie.....	66
Abbildung 3-6	Kinetik zur Expression der Gene <i>HIF1A</i> und <i>HIF2A</i> in HMEC-1 Zellen. ...	67
Abbildung 3-7	Kinetik zur Expression der Gene <i>PGK</i> , <i>GAPDH</i> , <i>LDHA</i> und <i>GLUT1</i> in HMEC-1 Zellen.....	68
Abbildung 3-8	Kinetik zur Expression der Gene <i>VEGFA</i> und <i>IL8</i> in HMEC-1 Zellen.	69
Abbildung 3-9	Die Expression der Gene <i>HIF1A</i> und <i>HIF2A</i> in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.....	71
Abbildung 3-10	Die Expression der Gene <i>PGK</i> , <i>GAPDH</i> , <i>LDHA</i> und <i>GLUT1</i> in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.	72
Abbildung 3-11	Die Expression der Gene <i>VEGFA</i> und <i>IL8</i> in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.....	73
Abbildung 3-12	Kinetik zur Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1, FGF basic und VEGF in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.....	74
Abbildung 3-13	Die Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1, FGF basic, VEGF und MIF in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.	79
Abbildung 3-14	Der zelluläre Energiepool in Form von ATP und ADP in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.....	81
Abbildung 3-15	Nachweis der Aufnahme des Knockdownkonstrukt enthaltenden Plasmids pLL3.7 mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der GFP-Expression.	82
Abbildung 3-16	Western Blot Nachweis des Knockdowns von HIF-1 α und des Vorhandenseins von HIF-2 α auf Proteinebene in HMEC-1 Zellen mit pLL3.7-HIF-1 α -shRNA Konstrukt.	83
Abbildung 3-17	Western Blot Nachweis des Knockdowns von HIF-2 α und des Vorhandenseins von HIF-1 α auf Proteinebene in HMEC-1 Zellen mit pLL3.7-HIF-2 α -shRNA Konstrukt.	84
Abbildung 3-18	Die Expression der Gene <i>HIF1A</i> und <i>HIF2A</i> in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.	85

Abbildung 3-19 Morphologische Charakterisierung der Angiogenese von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.....	87
Abbildung 3-20 Charakterisierung der Angiogenese von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.....	88
Abbildung 3-21 Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Hypoxie – Gene der Angiogenese.	90
Abbildung 3-22 Differentielle Genexpression von HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Hypoxie – Gene der Bioenergetik.....	91
Abbildung 3-23 Die Expression der Gene <i>PGK</i> , <i>GAPDH</i> , <i>LDHA</i> und <i>GLUT1</i> in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.	92
Abbildung 3-24 Die Expression der Gene <i>VEGFA</i> und <i>IL8</i> in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.....	94
Abbildung 3-25 Die Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1, FGF basic, VEGF und MIF in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.....	97
Abbildung 3-26 Der zelluläre Energiepool in Form von ATP und ADP in HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie.....	100
Abbildung 3-27 Microarray-Analyse von HMEC-1 Zellen und HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie – Bereich Bioenergetik.....	104
Abbildung 3-28 Microarray-Analyse von HMEC-1 Zellen und HMEC-1 Zellen mit Knockdownkonstrukt unter Normoxie und Hypoxie – Bereich Angiogenese	107
Abbildung 4-1 Wirkung von Hypoxie auf Endothelzellen.....	117
Abbildung 4-2 Die Regulation von Genen der Bioenergetik und Angiogenese durch HIF-1, HIF-2 oder überlappend durch HIF-1 und HIF-2.	124

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Richtwerte für die Begriffsverwendung “Hypoxie” anhand des Sauerstoffpartialdruckes.	10
Tabelle 1-2	Übersicht HIF-1 und HIF-2 regulierter Gene der Angiogenese und Bioenergetik (nach [38])......	17
Tabelle 1-3	Mediatoren und Inhibitoren der Angiogenese von Endothelzellen.	20
Tabelle 2-1	Übersicht der verwendeten Zelllinien.....	27
Tabelle 2-2	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	27
Tabelle 2-3	Übersicht der in der Zellkultur verwendeten Medien und ihre Zusammensetzung	27
Tabelle 2-4	Übersicht der in der Mikrobiologie verwendeten Medien.....	28
Tabelle 2-5	Übersicht der verwendeten Plasmide und Vektoren.....	28
Tabelle 2-6	Übersicht der verwendeten Vektoren und der enthaltenen shRNA Oligonukleotidsequenzen	28
Tabelle 2-7	Übersicht der verwendeten Antikörper und Antikörperkonjugate	29
Tabelle 2-8	Übersicht der verwendeten synthetischen Oligonukleotide	29
Tabelle 2-9	Übersicht der verwendeten Chemikalien und Enzyme.....	30
Tabelle 2-10	Übersicht der verwendeten Antibiotika.....	32
Tabelle 2-11	Übersicht der verwendeten Molgewichtstandards.....	32
Tabelle 2-12	Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme	32
Tabelle 2-13	Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer sowie deren Zusammensetzung	33
Tabelle 2-14	Übersicht der verwendeten kommerziell erhältlichen Kits und Testsysteme...	33
Tabelle 2-15	Übersicht der verwendeten Geräte	34
Tabelle 2-16	Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	35
Tabelle 2-17	Übersicht der verwendeten Software und Webpages	36
Tabelle 2-18	Übersicht des PCR-Ansatzes zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung.	45
Tabelle 2-19	Übersicht des PCR-Programmes zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung	45
Tabelle 2-20	Übersicht des PCR-Ansatzes zur Sequenzierung des einklonierten Inserts	46
Tabelle 2-21	Übersicht des PCR-Programmes zur Sequenzierung des einklonierten Inserts	46

Tabelle 2-22	Übersicht des SYBR Green realtime PCR-Ansatzes.....	49
Tabelle 2-23	Übersicht des verwendeten Programmes des SYBR Green realtime PCR-Ansatzes.....	50
Tabelle 2-24	Übersicht der Zusammensetzung von SDS-PAGE Sammelgel und Trenngel .	57
Tabelle 3-1	Die Sekretion von löslichen Faktoren in HMEC-1 Zellen unter Normoxie und Hypoxie.	77

7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Buttgerit für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie für seine Unterstützung und Motivation während der Anfertigung der Doktorarbeit.

Dr. Timo Gaber möchte ich für seine Betreuung, die Ausdauer bei wissenschaftlichen Diskussionen und seine ständige Hilfsbereitschaft danken. Zudem ist Timo während meiner Promotionszeit zu einem engen Freund geworden, dessen geteilte Lebenserfahrung ich nicht missen möchte.

Ich danke ebenfalls Frau Dr. Cindy Strehl für die hervorragende Zusammenarbeit vor allem in schwierigeren Zeiten und Manuela Jakstadt für die kompetente und liebevolle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Auch möchte ich allen Kollegen der AG Buttgerit danken, die wie eine kleine Familie immer unterstützend zur Seite stehen und die Arbeitsatmosphäre unglaublich angenehm gestalten. Dabei sollen Paula Hoff, Monique Fangradt, Cam Loan Tran, Mathias Mursell, Roman Rauch und Kerstin Schönbeck unbedingt genannt sein.

Ebenso danke ich den Mitgliedern der AG Riemekasten, im Besonderen Anika Klaus und Reinmar Undeutsch.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich während des Studiums immer unterstützt haben. Ich liebe euch.

Zu allerletzt danke ich der Frau an meiner Seite, die mir Kraft gibt und mich leben lässt. Stefanie Schmidt, ich liebe dich!

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor *rerum naturalium* (abgek. Dr. *rer. nat.*) in allen Teilen von mir selbstständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind

Martin Hahne

9. Lebenslauf/Curriculum Vitae

9.1. Persönliche Angaben

Name: Hahne
Vorname: Martin
Geburtsdatum: 22. März 1981
Geburtsort: Berlin, Deutschland
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Akademischer Grad: Diplom-Ingenieur der Medizinischen Biotechnologie

9.2. Schulbildung

1987 – 1991 Besuch der 5. Polytechnischen Oberschule „Wolfgang Langhoff“
1991 – 1993 Besuch der 30. Grundschule in Berlin-Marzahn
1993 – 1997 Besuch des 5. Gymnasium in Berlin-Marzahn
1997 – 1999 Besuch des 8. Gymnasium in Berlin-Marzahn
1999 – 2000 Besuch der Karl-Schiller-Oberschule in Berlin-Marzahn
2000 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife (Note 1,5)

9.3. Universität

10/2001 Studium der Biotechnologie (mit Ziel Diplom-Ingenieur) an der Technischen Universität Berlin
05/2004 Diplom-Vorprüfung in Biotechnologie
12/2008 Prüfung zum Diplom-Ingenieur der Medizinischen Biotechnologie
(bestanden mit „sehr gut“, Note 1,4)

9.4. Grundwehrdienst

07/2000 – 04/2001 Grundwehrdienst im 2. Feldjägerbataillon 900 in Berlin-Tegel

10. Publikationen und Auszeichnungen im Rahmen dieser Arbeit

10.1. Vorträge

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Strehl C, Fangradt M, Jakstadt M, Duda G, Hoff P, Gaber T, Burmester GR, Buttgerit F. Differential regulatory functions of HIF-1 α and HIF-2 α during angiogenesis of human microvascular endothelial cells (HMECs). **EULAR 2012**, Berlin, Germany, 06-09 June 2012. Abstract in Ann Rheum Dis 2012;71(Suppl3):148

Hoff P, Gaber T, **Hahne M**, Strehl C, Schmidt-Bleek K, Unterhauser F, Burmester GR, Schmidmaier G, Duda GN, Perka C, Buttgerit F. CD34+ Hematopoietic Stem Cells accumulate in the initial inflammatory human fracture hematoma. **IOF-ECCEO 2012**, Bordeaux, France, 21-24 March 2012. Abstract in Osteoporos Int 2012;23(Suppl2):S412

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Strehl C, Fangradt M, Jakstadt M, Kasper G, Duda G, Hoff P, Gaber T, Burmester G.R., Buttgerit F. Angiogenic potential of HMECs – analysis of two HIF α isoforms and their overlapping functions. **39. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie**, Munich, Germany, 31 August - 03 September 2011. Abstract in Z Rheumatol 2011;70(Suppl1):26

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Lohanatha F, Jakstadt M, Kasper G, Duda G, Kolar P, Gaber T, Burmester GR, Buttgerit F. Angiogenic potential of HMECs is driven by HIF-2 α overcoming the effects of HIF-1 α . **74. Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology**, Atlanta, USA, 06-11 November 2010. Abstract in Arthritis & Rheumatism 2010;632(10):590

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Lohanatha F, Jakstadt M, Kasper G, Duda G, Kolar P, Gaber T, Burmester G.R., Buttgerit F. Angiogenic potential of HMECs is driven by HIF-2 α overcoming the effects of HIF-1 α . **38. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie**, Hamburg, Germany, 15-18 September 2010. Abstract in Z Rheumatol 2010;69(Suppl1):13

10.2. Poster

Hahne M, Strehl C, Jakstadt M, Hoff P, Gaber T, Burmester G.R., Buttgereit F. The bioenergetic role of HIF-1 and HIF-2 during angiogenesis of human microvascular endothelial cells. **76. Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology**, Washington D.C., USA, 09-14 November 2012. Abstract in *Arthritis & Rheumatism* 2012;64(10)Supplement:S759

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Strehl C, Jakstadt M, Duda G, Hoff P, Gaber T, Burmester GR, Buttgereit F. Angiogenesis of HMECs is impacted by two HIF α isoforms and their distinct functions. **40. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie**, Bochum, Germany, 19-22 September 2012. Abstract in *Z Rheumatol* 2012;71(Suppl2):1-147

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Strehl C, Fangradt M, Jakstadt M, Kasper G, Duda G, Hoff P, Gaber T, Burmester G.R., Buttgereit F. Angiogenic potential of HMECs – analysis of two HIF α isoforms and their overlapping functions. **75. Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology**, Chicago, USA, 04-09 November 2011. Abstract in *Arthritis & Rheumatism* 2011;63(10)Supplement:S10

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Strehl C, Fangradt M, Jakstadt M, Kasper G, Duda G, Hoff P, Gaber T, Burmester G.R., Buttgereit F. Angiogenic potential of HMECs – analysis of two HIF α isoforms and their overlapping functions. **39. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie**, Munich, Germany, 31 August - 03 September 2011. Abstract in *Z Rheumatol* 2011;70(Suppl1):26

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Lohanatha F, Jakstadt M, Kasper G, Duda G, Kolar P, Gaber T, Burmester GR, Buttgereit F. Angiogenic potential of HMECs is driven by HIF-2 α overcoming the effects of HIF-1 α . **38. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie**, Hamburg, Germany, 15-18 September 2010. Abstract in *Z Rheumatol* 2010;69(Suppl1):13

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Lohanatha F, Jakstadt M, Kasper G, Duda G, Kolar P, Gaber T, Burmester GR, Buttgerit F. Angiogenic potential of HMECs is driven by HIF-2 α overcoming the effects of HIF-1 α . **EULAR 2010**, Rome, Italy, 16-19 June 2010. Abstract in *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl3):179

Hahne M, Maschmeyer P, Wagegg M, Schellmann S, Stahn C, Fangradt M, Jakstadt M, Kolar P, Gaber T, Burmester G, Buttgerit F. Hypoxia and coculture conditions alter survival and surface molecules expression of human monocytes and T cells. **37. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie**, Cologne, Germany, 23-26 September 2009. Abstract in *Z Rheumatol* 2009;68(Suppl1): 4-103

10.3. Publierte Artikel

Hahne M, Luetkecosmann S, Tran CL, Mursell M, Strehl C, Burmester GR, Buttgerit F, Gaber T. The impact of HIF-1 α and HIF-2 α on the angiogenic potential of human microvascular endothelial cells (HMEC-1). *Angiogenesis*. Submitted.

Gaber T, Tran CL, Schellmann S, **Hahne M**, Strehl C, Radbruch A, Burmester GR, Buttgerit F, Gaber T. Hypoxia affects the redox state and IL-2 signaling of human CD4⁺ T cells and concomitantly impairs survival and proliferation. *Eur J Immunol*. Under revision.

Hoff P, Gaber T, **Hahne M**, Sentürk U, Rakow A, Strehl C, Fangradt M, Schmidt-Bleek K, Huscher D, Winkler T, Matziolis D, Matziolis G, Badakhshi H, Burmester R, Perka C, Duda GN, Perka C, Buttgerit F. Preoperative irradiation for the prevention of heterotopic ossification induces local inflammation in humans. *Bone*. Resubmitted.

Martinez-Gamboa L, Lesemann K, Kuckelkorn U, Scheffler S, Ghannam K, **Hahne M**, Gaber-Elsner T, Egerer K, Naumann L, Buttgerit F, Dörner T, Kloetzel PM, Burmester GR, Faustman DL, Feist E. Gene expression of catalytic proteasome subunits and resistance towards proteasome inhibition of B lymphocytes from patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. Accepted 2012 Dec 11.

Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, **Hahne M**, Strehl C, Fangradt M, Tran CL, Schönbeck K, Hoff P, Ode A, Perka C, Duda GN, Buttgereit F. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. *PLoS One*. 2012;7(9):e46483. doi: 10.1371/journal.pone.0046483. Epub 2012 Sep 27.

Fangradt M, **Hahne M**, Gaber T, Strehl C, Rauch R, Hoff P, Löhning M, Burmester GR, Buttgereit F. Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia. *Arthritis Res Ther*. 2012 Aug 7;14(4):R181.

Hahne M, Gaber T, Buttgereit F, [Hypoxia is a key factor in the inflammatory milieu of rheumatic diseases]. *Z Rheumatol*. 2012 Jan;71(1):64-7. German.

Strehl C, Gaber T, Löwenberg M, Hommes DW, Verhaar AP, Schellmann S, **Hahne M**, Fangradt M, Wagegg M, Hoff P, Scheffold A, Spies CM, Burmester GR, Buttgereit F. Membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis Rheum*. 2011 Dec;63(12):3779-88

Gaber T, Schellmann S, Erekul KB, Fangradt M, Tykwinska K, **Hahne M**, Maschmeyer P, Wagegg M, Stahn C, Kolar P, Dziurla R, Löhning M, Burmester GR, Buttgereit F. Macrophage Migration Inhibitory Factor Counterregulates Dexamethasone-Mediated Suppression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Function and Differentially Influences Human CD4⁺ T Cell Proliferation under Hypoxia. *J Immunol*. 2011 Jan 15;186(2):764-74

Dziurla R, Gaber T, Fangradt M, **Hahne M**, Tripmacher R, Kolar P, Spies CM, Burmester GR, Buttgereit F. Effects of hypoxia and/or lack of glucose on cellular energy metabolism and cytokine production in stimulated human CD4⁺ T lymphocytes. *Immunol Lett*. 2010 Jun 15;131(1):97-105

Spies CM, Gaber T, **Hahne M**, Naumann L, Tripmacher R, Schellmann S, Stahn C, Burmester GR, Radbruch A, Buttgerit F. Rimexolone inhibits proliferation, cytokine expression and signal transduction of human CD4+ T-cells. Immunol Lett. 2010 Jun 15;131(1):24-32

Gaber T, Häupl T, Sandig G, Tykwinska K, Fangradt M, Tschirschmann M, **Hahne M**, Dziurla R, Erekul K, Lautenbach M, Kolar P, Burmester GR, Buttgerit F. Adaptation of human CD4+ T cells to pathophysiological hypoxia: a transcriptome analysis. J Rheumatol. 2009 Dec;36(12):2655-69

10.4. Auszeichnungen

GSK Travel Stipend (500,-€) für den IOF-ECCEO Kongress in Bordeaux, Frankreich

BSRT Travel Grant für den ACR 2010 in Atlanta, USA

BSRT Travel Grant für den EULAR 2010 in Rom, Italien

BSRT PhD Program Stipend für die Jahre 2010/2011