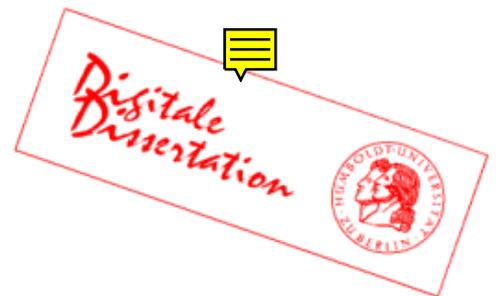


Aus der Abteilung für Pneumologie des Universitätsklinikums Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin
Direktor PD. Dr. Ch. Witt
und
der Abteilung für Pulmologie des Allgemeinen Krankenhauses
der Universität Wien
Direktor Prof. Dr. L.-H. Block



DISSERTATION

PDF-Version

Regulation der endothelialen NO-Synthase unter Hypoxie und proinflammatorischer Stimulation in pulmonal-arteriellen Endothelzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité, der Humboldt-Universität zu
Berlin

von Herrn Steffen Borrmann geb. am 27. 09. 1970 in Görlitz

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

- Gutachter: 1. Prof. Dr. Wauer, Charité, Kinderklinik
2. Prof. Dr. Kühn, Humboldt-Universität, Fachbereich Biochemie
3. PD Dr. Schneider-Mergener, Charite, Immunologie

eingereicht: Februar, 1998

Datum der Promotion: 9. Oktober 1998

Inhalt:

Einführung 3

- Pulmonale Hypertension: Pathogenese und Ätiologie 3*
- NO - ein physiologischer Mediator und Effektor des Endothels 5*
- Endotheliale versus induzierbare NO Synthase 6*
- Endotheliale NO-Synthase - Vermittler der basalen Gefäßdilatation 6*
- Regulation der eNOS 7*
- Kritische Balance der Zytokine und Wachstumsfaktoren. 9*

Hypothese 10

Material und Methoden 11

- Zellisolation und Zellkultur 11*
- Charakterisierung der Zellen 12*
- Vitalitätstest der Zellen 14*
- Proteinextraktion 14*
- RNA-Extraktion 14*
- cDNA-Sonden 15*
- mRNA-Analyse 16*
- Proteinanalyse 17*

Ergebnisse 19

- Hypoxie-induzierte, zeitabhängige Abnahme der eNOS mRNA und des eNOS Proteins 19*
- IL-1 β und LPS verringern die Expression der eNOS mRNA und des eNOS Proteins zeitabhängig 19*
- Proinflammatorische Mediatoren verstärken die Unterdrückung der Expression der eNOS mRNA und des eNOS Proteins unter Hypoxie 19*
- Hypoxie, IL-1 β und TNF stimulieren die Expression von Endothelin-1 mRNA 19*
- IL-1 β und TNF α induzieren IL-8 mRNA allein und synergistisch mit Hypoxie 19*
- Keine iNOS nachweisbar 20*

Diskussion 25

Zusammenfassung 29

Abstract 31

Einführung

Pulmonale Hypertension: Pathogenese und Ätiologie

Die Ursachen der pulmonalen Hypertonie gliedern sich in primäre, d. h. vererbte oder idiopathische, und in sekundäre, d. h. erworbene Formen. Das Verständnis der Physiologie der pulmonalen arteriellen Gefäße und ihrer pathophysiologischen Veränderungen ist essentiell für die Annäherung an eine Diagnose und Therapie dieser Erkrankung.

Unter physiologischen Bedingungen ist das pulmonal-arterielle Gefäßbett eine Hochfluß-, Niederdruck- und Niederwiderstandstrombahn. Dieses ermöglicht dem rechten Ventrikel ein hohes Herzzeitvolumen selbst unter Belastungsbedingungen zu gewährleisten. So sind z. B. bei körperlicher Anstrengung die pulmonaren Gefäße befähigt, sich zu dilatieren und zuvor geschlossene Gefäße können zusätzlich rekrutiert werden, sodaß trotz großer Steigerungen im pulmonalen Blutfluß der arterielle Druck im kleinen Kreislauf nur minimal steigt.

Entscheidend für alle hypertensiven Zustände im kleinen Kreislauf ist eine Abnahme des Gesamtquerschnittes des pulmonal-arteriellen Gefäßbettes. Initial manifestiert sich diese Störung nur in einem Verlust der Rekrutierbarkeit und Dilatation der kleinen Widerstandsgefäße. Unter Ruhebedingungen wird sich daher der Pulmonaldruck kaum erhöhen, aber unter Belastung ist eine Druck- und Widerstandsteigerung die Folge.

Wenn der Gesamtquerschnitt des pulmonal-arteriellen Gefäßsystems weiter abnimmt, kann sich der Hochdruck im kleinen Kreislauf fixieren. Durch den Anstieg des „afterloads“ kommt es zu einer konzentrischen Hypertrophie des rechten Ventrikels, um den erhöhten Widerstand im Lungenkreislauf zu überwinden.

Die Fähigkeit der hypertrophierten rechten Kammer ein adäquates Herzzeitvolumen angesichts des erhöhten „afterloads“ aufrecht zu erhalten, bestimmt den Verlauf und die Prognose aller chronischen Formen der pulmonalen Hypertension. Bei einer gering ausgeprägten Hypertension ist das Schlagvolumen adäquat an einen erhöhten Bedarf angepaßt und die resultierenden Symptome minimal. Ein Druckanstieg im kleinen Kreislauf führt in eine Situation, in welcher der hypertrophierte, dilatierte rechte Ventrikel selbst unter Ruhebedingungen nicht in der Lage ist, das Schlagvolumen den erhöhten Bedarf anzupassen. Das morphologische und funktionelle Korrelat wird mit „Cor pulmonale“ bezeichnet. Diese Patienten entwickeln Belastungssymptome wie Dyspnoe und Müdigkeit. Ein akutes Rechtsherzversagen tritt ein, wenn der „afterload“ eine kritische Grenze überschreitet.

Die Reduktion des Gesamtquerschnittes der Pulmonalarterien ist ein Resultat verschiedener Prozesse: Vasokonstriktion, Obstruktion und/oder Obliteration. Die zellbiologischen Veränderungen der pulmonalen Gefäße und des umgebenen Bindegewebes - plexiforme Läsionen der Intima, Mediahypertrophie und interstitielle Fibrose, besonders der Arterien mit weniger als 100 µm im Durchmesser - sind die Endpunkte aller Formen chronischer pulmonaler Hypertonie (Heath, 1993 und Pietra, 1989). Sie weisen gleiche pathohistologische Muster auf, wie sie unter Ischämie und Inflammation

mation zu beobachten sind.

Das Endothel, an der Schnittstelle zwischen zirkulierendem Blut und glatten Gefäßmuskelzellen gelegen, spielt die Schlüsselrolle bei der Regulation der Gefäßfunktionen. Das Endothel ist das grösste endokrine Organ. Zu dessen Funktionen gehören die Erhaltung des physiologischen Gefäßtonus (Furchgott, 1980), die Kontrolle des Gerinnungssystems (Radomski, 1993) und des Wachstums sowie die Kontraktilität der glatten Muskelzellen (Peiró, 1995 und Kourembanas, 1990 und Kourembanas, 1991), Mechanismen, deren Fehlregulierung als auslösende Faktoren pulmonaler Hypertonie betrachtet werden.

Da das pulmonale Gefäßbett am nächsten zur Atmosphäre liegt, ist es einzigartig befähigt auf wechselnde Sauerstoffkonzentrationen zu antworten. Während akute Hypoxie durch Reflexgesteuerte Vasokonstriktion zu einem schnellem Anstieg des Widerstandes im kleinen Kreislauf führt, ist eine verlängerte, chronische Hypoxie von einem Prozess begleitet, der als „vascular remodeling“ bezeichnet wird. Hypoxie verursacht in Rattenmodellen pulmonale Hypertonie (Rabinovitch, 1979). Chronische Hypoxie ist eine Ursache der bei pulmonaler Hypertonie zu beobachtenden interstitiellen Fibrose durch die Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine bzw. den gesteigerten Abbau elastischer Fasern (Stenmark, 1994). Die hypoxische Kontraktion der pulmonalen Arterien ist endothelabhängig bzw. eine Hypoxie unterdrückt die cholinerge Relaxation des Endothels (Demiryurek, 1993).

Eine chronische Entzündungsreaktion und die resultierende Zirkulation bakterieller Lipopolysaccharide (LPS von *Pseudomonas aeruginosa*) und proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) sind von einer Erhöhung des pulmonalen Druckes gefolgt, wie in Rattenversuchen gezeigt wurde (Graham, 1990). Das ARDS (acute/adult respiratory distress syndrome) ist durch eine neutrophile Invasion des Lungengewebes gekennzeichnet und wird von einer pulmonalen Hypertonie begleitet (Steinberg, 1994). Entzündungsmediatoren demonstrierten eine Verschlechterung dieser Situation (Terashima, 1994).

NO - ein physiologischer Mediator und Effektor des Endothels

Die Bedeutung des Endothels als Quelle einer instabilen Substanz, die die Vasorelaxation von isolierten Aortenringen nach Stimulierung mit Acetylcholin vermittelt, wurde 1980 erstmals beschrieben (Furchgott, 1980) und führte 1987 zur Identifikation von Stickstoffmonoxid (NO) als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF; Palmer, 1987). Neben der direkten Relaxation der glatten Gefäßmuskeln (Ignarro, 1991) limitiert NO die Proliferation dieser Zellen (Garg, 1989). NO inhibiert die Entzündungs-induzierte Aktivierung der Endothelzellen und reduziert die Expression von Adhisionsmolekülen für Lymphozyten und Monozyten (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) und für neutrophile Granulozyten (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) (De Caterina, 1995). NO senkt die Aggregationsneigung und die Adhesion der Plättchen (Radomski, 1990 und Radomski, 1993, Sneddon, 1988), und verhindert die Chemotaxis von Monozyten (Bath, 1991).

NO interagiert mit seinen Zielen durch kovalente Modifizierungen von [FeS]_n- und Thiolgruppenhaltigen Proteinen und durch Redoxreaktionen mit Radikalen (Stamler, 1994). Die Aktivierung des Enzyms Guanylatzyklase, die viele der Zielzellantworten (Vasodilatation, Hemmung der Plättchenaggregation und Wachstumsinhibierung) durch den „second messenger“ cGMP (cyclic guanosine monophosphate) vermittelt, erfolgt durch Wechselwirkung mit der Hämgruppe (Stamler, 1994 und Clementi, 1995). Obwohl NO ein extrem kurzlebiges Molekül ($t_{1/2} \approx 25$ ms) ist, wirkt es sowohl autokrin als auch parakrin (Lancaster, 1994) und bildet zusammen mit cGMP ein universelles Signaltransduktionssystem.

Neben den Gefäß-protectiven Funktionen ist das Radikal NO zytotoxisch im Rahmen der Immunantwort (Karupiah, 1993). Entscheidend, ob NO protektiv oder toxisch wirkt, sind die Konzentration des NO und der Redoxstatus der Zelle. Gesteuert wird die Produktion des NO durch verschiedene Signale bzw. -transduktionssysteme, deren Wege konvergieren, daß heißt, sie nutzen das NO als ubiquitären chemischen Botenstoff. Dieses erklärt die gegensätzlichen Wirkungen des NO.

Endotheliale versus induzierbare NO Synthase

Katalysator der NO-Produktion ist die NO-Synthase. Zwei Isoformen sind im Endothel identifiziert worden: die endotheliale und die induzierbare NO-Synthase (eNOS/iNOS; Nathan, 1994). Beide Formen weisen verschiedene Kinetik, Regulation und Verteilung im Gewebe auf. Während die eNOS als konstitutiv exprimiertes Enzym beschrieben ist (s. u.), wird die iNOS bei einer Infektion oder Entzündungsreaktion, das heißt, im Rahmen der Zellimmunität induziert. Die Umsatzrate v_{max} der eNOS ist um ein Vielfaches geringer als die der iNOS, die eine „high-output“-Kinetik aufweist (Nathan, 1992). Die iNOS kann durch proinflammatorische Stimulation (z. B. Interleukin-1 β) in Endothelzellen stimuliert werden (Kanno, 1994). Die Aktivität der iNOS ist Ca^{2+} -unabhängig und bleibt über Tage erhalten (Nathan, 1994). Die dabei erreichte intrazelluläre NO-Konzentration ist zytotoxisch (Stenger, 1994). Zelltod und Gewebsschädigung sind die Folge.

Endotheliale NO-Synthase - Vermittler der basalen Gefäßdilatation

Janssens, 1992) isolierten eine cDNA, die für die menschliche endotheliale NO-Synthase (eNOS) kodiert, Ca^{2+} -abhängig ist und konstitutiv (s. u.) in Endothelzellen exprimiert wird. Das eNOS-Gen spannt sich über 21kb genomische DNA, kodiert eine mRNA mit 26 Exons und 4052 Nukleotiden.

Die Charakterisierung der proximalen 5'-Promoterregion zeigte, daß der eNOS-Promoter keine TATA-Box in ausreichender Entfernung für den Initiationskomplex (Robinson, 1994) enthält, aber Elemente besitzt, die mit einem konstitutiv exprimierten Gen übereinstimmen (SP1- und GATA-Motive) (Marsden, 1993). Huang, 1995 unterbrachen das eNOS-Gen der Maus und fanden bei den homozygoten „knockout“-Mäusen lebensfähige Tiere, bei denen kein NO nachweisbar war und die eine Hypertonie entwickelten. Die Autoren schlossen daraus auf die Vermittlung der basalen Vasodilatation durch die eNOS.

Substrat der eNOS ist die Aminosäure L-Arginin, die zu L-Zitrullin und NO reduziert wird. Die Reaktion erfordert molekularen Sauerstoff und reduzierende Äquivalente in Form von NADPH als Kosubstrate (Marletta, 1994). Die Aktivität der eNOS ist streng durch den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel kontrolliert. Agonist-hervorgerufene Erhöhung der Konzentration von intrazellulärem Ca^{2+} steuert die Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex an die eNOS und erzeugt eine Konformationsänderung, die das Enzym in seine aktive Form überführt (Nathan, 1994a). Dieser Effekt ist transient (Minuten). Die eNOS ist charakterisiert durch eine „low-output“-Kinetik, wie es für

Homöostasemechanismen mit einer Moment-zu-Moment Anpassung (Blutdruckregulation) typisch ist (Nathan, 1992).

Das Molekulargewicht des Monomers der humanen endothelialen NO-Synthase beträgt ≈ 133 kDa bei der Proteinauftrennung in SDS-Polyacrylamid-Gel (Marletta, 1994). Im nativen Zustand ist die eNOS ein Homodimer (Marletta, 1994).

Regulation der eNOS

Die Kontrolle der eNOS ist auf transkriptioneller, posttranskriptioneller und posttranslativem Ebene beschrieben worden. Dieses widerspricht der gebräuchlichen Definition eines „konstitutiv“ exprimierten Gens, weshalb ich die endotheliale „konstitutive“ NO Synthase (ecNOS) immer kurz als endotheliale (eNOS) bezeichnen werde. Dieses genügt den Anforderungen an eine eindeutige Nomenklatur, da die eNOS ausschließlich im Endothel nachgewiesen wurde.

Die Daten über die Regulation der endothelialen NO-Synthase durch eine Erniedrigung des physiologischen Sauerstoffpartialdruckes (P_aO_2), eine Situation, die bei pulmonaler Hypertonie vorherrscht, sind widersprüchlich. Während eine Abnahme der eNOS mRNA-Transkription unter Hypoxie in Endothelzellkulturen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) beobachtet werden konnte (McQuillan, 1994), wurde bei In-vivo-Versuchen in Ratten unter verlängerter Hypoxie zwar ein Abfall der NO-Produktion, aber eine Steigerung der eNOS-Expression gezeigt (Shaul, 1995). Liao, 1995) berichten, daß eine Senkung des O_2 von 20% auf 3% zu einer Verkürzung der eNOS mRNA-Halbwertszeit von 46 auf 24h in bovinen Endothelzellen führt (BPAEC, bovine pulmonary artery endothelial cells).

Proinflammatorische Mediatoren wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor Necrosis Factor α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ) haben die Fähigkeit der Verminderung der eNOS in AOEC (human aortic endothelial cells) bzw. LPS in einem Rattenmodell gezeigt (MacNaul, 1993 und Liu, 1996), hingegen aber wurde eine absolute Aktivitätssteigerung, gemessen als Konversion von [^{14}C]L-Arginin zu [^{14}C]L-Zitrullin, unter Stimulierung mit TNF α und IFN γ beschrieben, obwohl die „steady state“-Konzentration der eNOS mRNA um 94% fiel (Rosenkranz-Weiss, 1994). Für diesen Effekt wurde eine gesteigerte Konzentration von Tetrahydrobiopterin (BH $_4$), einem der Kofaktoren der eNOS, verantwortlich gemacht (Rosenkranz-Weiss, 1995).

Die eNOS ist im unphosphorylierten Zustand in der Zytoplasmamembran lokalisiert und unterliegt so offenbar neben der transkriptionellen „shear stress“-induzierten Transkriptionssteigerung einer direkten „shear stress“-Regulation (Pohl, 1991 und Uematsu, 1995). Eine Agonist-stimulierte Phosphorylierung kann eine Translokation in das Zytoplasma hervorrufen (Michel, 1993). Die physiologische Bedeutung dieser Regulation ist unklar. In den Experimenten wurden die Proteine aus diesem Grund als „whole cell extracts“ präpariert.

Ein wichtiger Punkt betrifft ebenfalls die in proliferierenden Zellkulturen beobachtete Steigerung sowohl der eNOS mRNA als auch des Proteins (Arnal, 1994), weshalb die Versuche ausschließlich mit Kontakt-inhibierten, konfluenten HPAEC-Kulturen durchgeführt wurden .

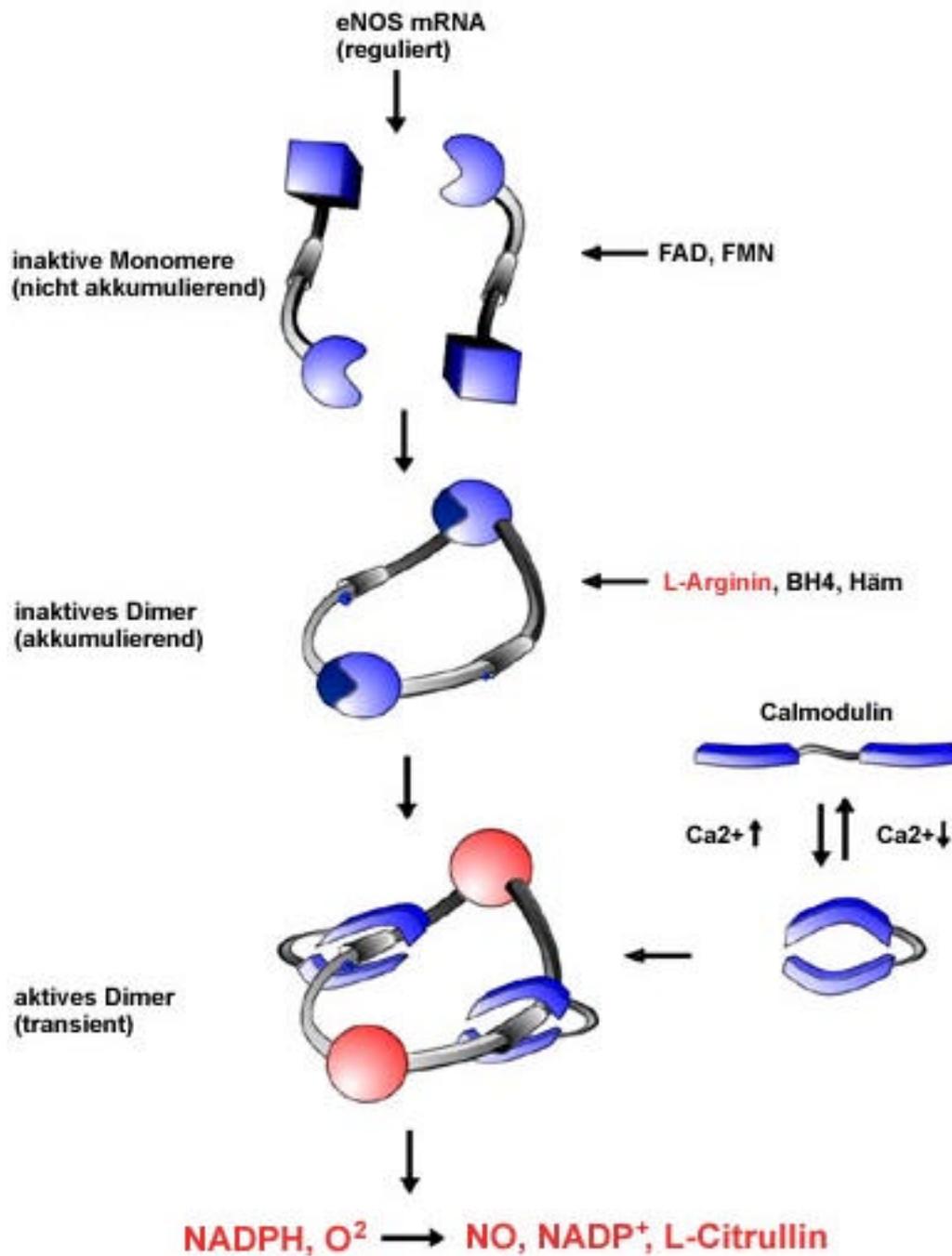


Abbildung 1 Vereinfachtes Modell der allosterischen Regulation der endothelialen konstitutiven NO Synthase. Die Bindung der Kofaktoren FAD (Flavinadenindinucleotid) und FMN (Flavinmononucleotid) überführt die inaktiven NOS Monomere in ein inaktives Dimer, an den als weitere prosthetische Gruppen Häm und Tetrahydrobiopterin (BH₄) und das Substrat L-Arginin binden. Ausgelöst durch die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels ändert der gebundene Ca²⁺/Calmodulinkomplex die Konformation des inaktiven Dimers hin zu seiner katalytisch aktiven Form. Dieser Prozess dauert nur Minuten.

Kritische Balance der Zytokine und Wachstumsfaktoren.

Die verantwortlichen zellulären Mechanismen der Hypoxie-induzierten vaskulären Veränderungen sind komplex und die Wechselwirkungen zwischen den Zellen ähneln den klassischen embryonalen Gewebeinteraktionen. Diese reziproken Wirkungen werden Rezeptor-vermittelt durch intrazelluläre „Programme“ (Signaltransduktion) für die Genexpression geregelt und betreffen wie in der Embryonalentwicklung Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren und chemische Botenstoffe, zum Beispiel NO (Kourembanas, 1994).

O'Brien, 1984 zeigte, daß der Überstand von kultivierten Endothelzellen eine Substanz enthält, die pulmonale Arterienringe kontrahiert. Nachfolgend konnte Endothelin-1 (ET-1) als ein Peptid mit 21 Aminosäuren identifiziert werden. Endothelin-1 ist der potenteste derzeit bekannte Vasokonstriktor (Yanagisawa, 1988) und ist, neben des mitogenen Effektes auf die glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC), als Stimulator der perivaskulärer Zellproliferation beschrieben worden (Schiffers, 1994). Hypoxie stimuliert die Transkription der ET-1 mRNA in HUVEC (Kourembanas, 1991). Bedeutend für die Interaktionen unter hypoxischen Bedingungen ist, daß NO die Expression von ET-1 in HUVEC (via cGMP) vermindern kann (Kourembanas, 1993). IL-1 β induziert die Sekretion von ET-1 in humanen Endothelzellkulturen (Yoshizumi, 1990).

Interleukin-8 (IL-8) ist gleich dem Endothelin-1 ein bedeutendes Mitogen für die VSMC und wirkt darüber hinaus in diesen Zellen chemotaktisch (Yue, 1994) und wird von Endothelzellen nach Stimulierung mit verschiedenen Zytokinen bzw. unter Hypoxie produziert (Karakurum, 1994). Die potentielle pathologische Signifikanz von IL-8 unter hypoxischen Konditionen wird durch den protektiven Effekt von Antikörpern gegen IL-8 in einem Ischämiemodell der Lunge deutlich (Sekido, 1993).

Hypothese

In Anbetracht der aufgeführten Beweise für eine entscheidende Rolle der endothelialen konstitutiven NO-Synthase im pulmonal-arteriellen System möchte ich zeigen, daß Hypoxie in humanen pulmonalen Endothelzellen zu einer Abnahme der eNOS mRNA und des eNOS Proteins führt und das proinflammatorische Stimuli wie IL-1 β , TNF α und LPS eine zusätzliche Repression bewirken.

Weiter werden unter diesen Bedingungen die Expression der iNOS und die Expression von Endothelin-1 und IL-8 aufgrund ihrer Bedeutung für die pathologischen Gefäßveränderungen in der pulmonalen Hypertonie untersucht. Als Grundlage der Experimente wird die etablierte Methode der Kultur humaner pulmonal-arterieller Endothelzellen benutzt.

Material und Methoden

Zellisolation und Zellkultur

Menschliche pulmonale arterielle Endothelzellen (HPAEC) wurden von ca. 1-2cm langen Segmenten der intrapulmonalen Aufzweigungen der Arteria pulmonalis isoliert. Die Arterien entstammen Patienten, die im Rahmen der Entfernung eines Bronchialkarzinoms einer Lob- oder Pneumektomie unterzogen wurden. Die Operationen fanden in der Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie am Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien statt. Die Entnahme eines Gewebestückes ist durch die Ethikkommission der Universität Wien bestätigt worden.

Alle Arbeitsschritte mit der Endothelzellkultur wurden ausschließlich mit sterilen Materialien und in einer Sterilbank mit laminalem Luftzug ausgeführt. Sofort im Anschluß an die Präparation der Arterie wurde diese in 0,5%iger Kollagenase-Lösung (Kollagenase Typ IV von *Clostridium histolyticum*, Sigma) für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Endothelzellen wurden mit einem „cell scraper“ gelöst und die Gewebestücke entfernt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 U/min und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Zellen mit Endothelzellmedium (s. u.) resuspendiert und in eine mit 1%iger Gelatine beschichtete 25 cm²-

Primärgewebekulturflasche (Falcon, Becton Dickinson, Bedford, MA) überführt. Nach der lichtmikroskopischen Kontrolle des Anwachsens der Zellen nach durchschnittlich 2 Wochen (neben Endothelzellen auch glatte Muskelzellen und Fibroblasten) konnten die Endothelzellen mittels der „magnetic beads isolation method“ (Jackson, 1990) von den kontaminierenden Zellen separiert werden. Nach der Ablösung der Zellen mit 0,5%iger Trypsinlösung (Clonetics, San Diego, CA), Zentrifugation s. o., Absaugens des Überstandes und Resuspension der Zellen in 200µl HBSS (Hanks' balanced salt solution, Sigma) mit 5% FCS (GIBCO BRL, Paisley, UK) wurden die nachfolgenden Schritte in einem Eppendorfröhrchen durchgeführt. Die Zellsuspension wurde mit 50µl der Stocklösung der mit Lektin-beschichteten „magnetic Beads“ (5 µg Lektin/10⁷ beads, Stockkonzentration: 5x10⁸ beads/ml) für 10 min auf Eis inkubiert (Lektin von *Ulex Europaeus* UEA I, Sigma und DYNABEADS M-450 von DYNAL, Oslo, Norwegen). Da nur die Endothelzellen einen Rezeptor für Lektin besitzen, ist es möglich durch nachfolgende Waschschriffe (HBSS mit 5% FCS) in einer Magnetkammer diese zu isolieren. Die an die „beads“ gebundenen Endothelzellen wurden mit Endothelzellmedium in Suspension gebracht und in einer mit 1%iger Gelatine beschichtete 25 cm²-

Primärgewebekulturflasche kultiviert ([Abb.2](#)). Die „Beads“ lösen sich bei den folgenden Passagen von den Zellen.

Die Zellen wurden im subkonfluenten Zustand durch Ablösung mit 0,5%iger Trypsinlösung (max. Inkubationszeit 5 min), Zentrifugation (s. o.) und nach erfolgter Resuspension in Endothelzellmedium im Flächenverhältnis von 1:3 passagiert. Die Zellkultur wurde nach der ersten Passage in mit 1%iger Gelatine beschichteten 75 cm²-Gewebekulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Bedford, MA) geführt. Die optimale Zellproliferation wurde mit angereichertem Endothelzellbasalmedium (Promo Cell, Heidelberg) erzielt und folgende Endkonzentration enthielt: 50 µg/ml ECGS (endothelial cell growth supplement, Becton Dickinson, Bedford, MA), 5 Einheiten/ml Heparin (Sigma), 60

ng/ml Streptomycin, 100 ng/ml Penicillin, 50 ng/ml Amphotericin B und 20% fötales Kälberserum (alles GIBCO BRL, Paisley, UK) enthielt. Die Kultur erfolgte in Brutschränken (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C, 99%iger H₂O-Sättigung und 5% CO₂.

Zusätzlich wurde eine Zelllinie mit "single-donor" HPAEC geführt. Die Zellen wurden von der Firma Clonetics (San Diego, CA) gekauft und nach den gleichen Prinzipien behandelt wie beschrieben. Für die RNA- und Proteinpräparation wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und zwischen den Passagen 5-8 verwendet.

Für die Experimente wurden die Zellen entweder zur Kontrolle nur mit Endothelzellbasalmedium oder mit der Zugabe von rekombinanten menschlichen IL-1 β (2,5 ng/ml, Endogen, Cambridge, MA) und TNF α (2,5 ng/ml, R&D Systems, Abingdon, UK) sowie LPS von *Pseudomonas aeruginosa* (10 ng/ml, Sigma) inkubiert. Die Versuche wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Die Hypoxie wurde mit einem Sauerstoffgehalt von 3% erreicht.

Charakterisierung der Zellen

Die Zelllinien wurden mit der Indirekten Immunfluoreszenz mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen den humanen endothelialen Faktor VIII (Anti-von Willebrand-Faktor, Boehringer Mannheim) auf Spezifität und Reinheit der Kultur getestet. Es handelt sich dabei um eine Standardprozedur zur Identifizierung von Endothelzellen (Wagner, 1984). Die Visualisierung erfolgte mit einem zweiten Antikörper gegen Maus-IgG (Boehringer Mannheim), der mit Fluorescein konjugiert ist. Die Charakterisierung der Zellen wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Nach der Subkultivierung der Zellen in "chamber slides" (Nunc, Roskilde, Dänemark), Waschen mit PBS, Fixation mit Methanol (-20°C) wurden die Zellen erst mit der Anti-von Willebrand Faktor Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:10) und nach Wegwaschens der Lösung mittels PBS mit der Anti-Maus-IgG Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:10) für je 30 min bei 37°C inkubiert. Die Erfolgskontrolle wurde unter einem Fluoreszenzlichtmikroskop (Olympus, Japan) durchgeführt.

Die für die Versuche verwendeten Zelllinien waren für Faktor VIII-Färbung uniform positiv.

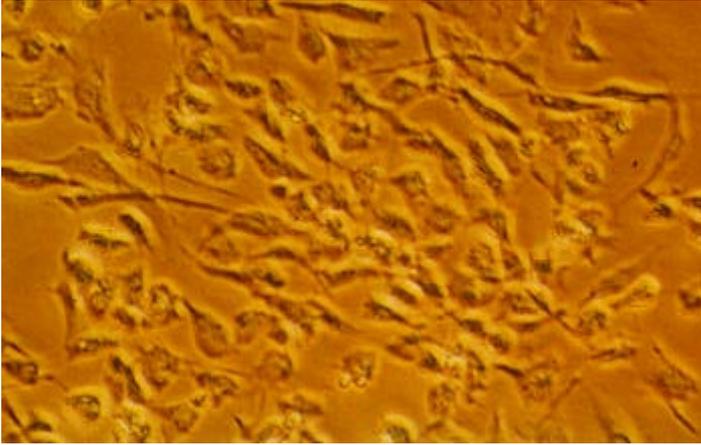


Abbildung 2 Pulmonal-arterielle Endothelzellen in konfluenter Kultur. Aufsicht mit 20facher Vergrößerung im Phasenkontrastlicht.

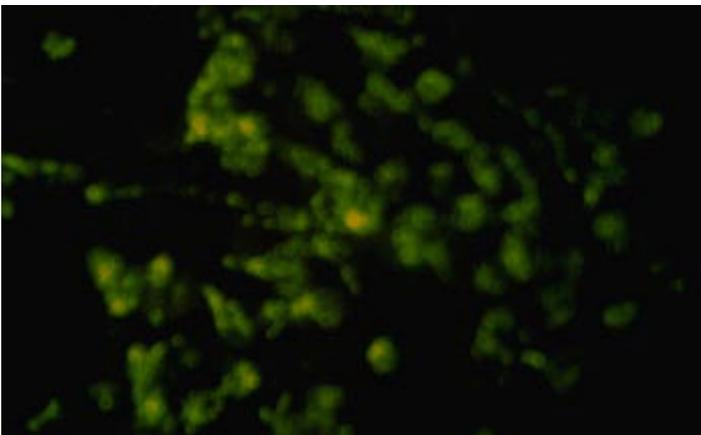


Abbildung 3 Charakterisierung der Endothelzellkultur mittels indirekter Immunfluoreszenz (Anti-von Willebrand-Faktor). Gleicher Ausschnitt wie [Abb. 2](#).

Vitalitätstest der Zellen

Um die Lebensfähigkeit der Zellen unter den Versuchsbedingungen zu untersuchen, wurde eine Testreihe mit Trypanblaufärbung vorgenommen. Trypanblau penetriert während des 5minütigen Versuchs nur abgestorbene Zellen, deren Anfärbung unter einem Lichtmikroskop beobachtbar ist. Für die Versuche wurden die Zellen in 6-Loch-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde zur Vermeidung einer Interferenz des Trypanblaus mit dem Serum abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit einer 0,5%igen Trypanblau-PBS-Lösung inkubiert und das Färbeverhalten unter dem Lichtmikroskop (Olympus, Japan) ausgewertet. Zusätzlich wurde die Zellmorphologie abgeschätzt und über ein Videosystem aufgezeichnet (CUE, Galai Production, Israel).

Unter allen Bedingungen konnte keine morphologische Veränderung des typischen „Kopfsteinpflaster“-Muster festgestellt werden. Die Zellen ließen sich nicht mit Trypanblau anfärben.

Proteinextraktion

Die Proteinextraktion wurde nach der Gefrierschockmethode durchgeführt. Nach dem Waschen mit kalten PBS (phosphate-buffered saline) wurden die Zellen vom Boden abgekratzt, zentrifugiert (1600 U/min, 6 min, RT), der Überstand verworfen, das Zellpellet in einem Proteaseinhibitionsbuffer (Volumenverhältnis Pellet/Puffer ca. 1/1-1,5) resuspendiert und auf Eis gegeben. Der Puffer enthält 20 mM Hepes, 0,4 M NaCl, 25% Glycerol, 1 mM EDTA, 0,5 mM NaF, 0,5 mM DTT, sowie 1 mM PMSF, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Aprotin, 10 µg/ml Trypsininhibitor und 2 µg/ml Benzamidchlorid (Sigma), die direkt vor der Verwendung pipettiert wurden. Die Zellsuspension wurde zweimal in flüssigen Stickstoff (-147°C) zum Aufbrechen der Zellen Schock-gefroren, anschließend jeweils aufgetaut und danach auf Eis inkubiert (20 min). Nach der Zentrifugation (15.000 rpm, 15 min, 4°C) der aufgebrochenen Zellen und Aliquotierung der Überstände konnten die Proteinextrakte bis zur Verwendung bei -70°C gelagert werden.

RNA-Extraktion

Der RNA-Gesamtgehalt der Zellen wurde folgend der Guanidiniumthiozyanat-Phenol-Chloroform-Methode (Chomczynski, 1987) extrahiert. Zuerst wurden die Zellen mit Solution D lysiert und anschließend mittels eines cell scrapers gesammelt und in ein Eppendorfröhrchen zur kompletten Lysis transferiert. In der folgenden Reihenfolge wurden 2 M Acetat-Chlorid (pH 4), H₂O-gesättigtes Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 49:1) zugegeben. Nach jedem Pipettierschritt wurde die Lösung kurz gemischt und anschließend für 15 min auf Eis gegeben. Nach der Zentrifugation für 20 min bei 10.000 rpm und 4°C wurde die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und über Nacht (Mindestendauer 1 h) mit Isopropanol (100%) bei -70°C präzipitiert. Es schloß sich eine Zentrifugation für 20 min bei 10.000 rpm und 4°C an, der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde in Solution D resuspendiert, bevor die RNA ein weiteres Mal mit Isopropanol bei -20°C für mindestens 1 h präzipitiert wurde. Anschließend an die Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm und 4°C folgten zwei Waschschr

mit 75%igen Ethanol und intermediären, bzw. abschließenden Zentrifugieren für 5 min bei 10.000 rpm und 4°C. Zum Abschluß wurde das RNA-Pellet für die Dauer von 10 min in einem Vakuumexsikkator getrocknet und in TE (10mM Tris, 5mM EDTA, pH 7,4) für 15 min bei 55°C inkubiert. Ein RNase-Inhibitor (20 Einheiten/Probe, Boehringer Mannheim) wurde vor der Lagerung bei -20°C hinzugegeben.

cDNA-Sonden

Das pHuNOSendo PM21-Plasmid mit dem 2,18 kb eNOS cDNA-Fragment wurde freundlicherweise von P.A. Marsden (Department of Molecular and Medical Genetics, University of Toronto, Ontario) zur Verfügung gestellt. Durch ein Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI (Boehringer Mannheim) wurde das cDNA-Fragment herausgeschnitten. Von M. Yanagisawa stammte (Howard Hughes Medical Institute, University of Texas) das pHET91-Plasmid, aus dem mit EcoRI ein ein 0,85 kb cDNA-Fragment für die Detektion von ET-1 mRNA geschnitten wurde. Ein IL-8 289 kb cDNA-Fragment wurde mittels der reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) aus den RNA-Extrakten der Endothelzellen hergestellt. Die spezifischen Primer mit folgenden Sequenzen, 5'Primer: 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3' und 3'Primer: 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC-3', wurden von Clontech (Palo Alto, CA) gekauft. Die 258 kb iNOS cDNA wurde mit gekauften Primern (Clontech) ebenfalls mittels RT-PCR amplifiziert. Der 5'Primer hatte die Sequenz: 5'-CGGTGCTGTATTTCTTACGAGGCGAAGAAGG-3' und der 3'Primer: 5'-GGTGCTGCTTGTTAGGAGGTCAAGTAAAGGGC-3'. Als interner Standard diente eine GAPDH cDNA zur Detektion der konstitutiv exprimierten GAPDHmRNA (Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase).

Die cDNA-Fragmente wurden mit [α^{32} P]dCTP durch „random priming“ zu einer spezifischen Aktivität von $1,6 \times 10^9$ dpm/ μ g markiert. Das Procedere wurde in einer Radioaktivität-abschirmenden Kammer (Beta work tank, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) durchgeführt. Es wurde ein kommerzieller Kit (Random Primed DNA Labeling Kit, Boehringer Mannheim) verwendet und das Protokoll folgte den Empfehlungen des Herstellers. Die Methode basiert auf der Hybridisierung eines Hexanukleotid-Mix aller Basensequenzkombinationen zu der zu markierenden cDNA (Feinberg, 1984). Der komplementäre Strang wird von den 3'Enden der hybridisierten Hexanukleotide mit dem Klenow-Fragmentes der DNA Polymerase I (labeling grade) von *E. coli* synthetisiert. Die im Reaktionsmix enthaltenen [α^{32} P]dCTP-Nukleotide werden in den neuen Strang inkorporiert. Die cDNA wird zusammen mit dem Hexanukleotidmix durch Erhitzen auf 100°C denaturiert und das „annealing“ der Primer beim Abkühlen auf Eis wird auf diesem Wege erleichtert. Der Reaktionsansatz enthielt in der Endkonzentration je 0,075 mM dATP, dGTP und dTTP, 1x Hexanukleotid-Mix, 50 μ Ci [α^{32} P]dCTP, 2 Einheiten Klenow-Enzym, die cDNA und wurde für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz kurz auf 70°C erwärmt, um das Klenow-Enzym (Exonukleaseaktivität) zu inaktivieren. Die überschüssigen dNTP wurden mittels einer Gelsäule (Sephadex G50 Spin Column, Pharmacia) von der cDNA separiert. Vor der Hybridisierung wurde die cDNA durch Erhitzen auf 100°C denaturiert.

mRNA-Analyse

Die Analyse der mRNA-Expression wurde durch die Größen-abhängige Fraktionierung mittels einer Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese, anschließendem Transfer auf eine Nylonmembran und Hybridisierung mit den ³²P-radiomarkierten cDNA-Sonden durchgeführt („northern blotting“). Um Kontaminationen mit den ubiquitären RNAsen zu vermeiden, wurden nur RNase-freie, sterile Glasswaren und Pipettenspitzen sowie Diethylpyrocarbonat (DEPC) -behandeltes Wasser für die Lösungsherstellung verwendet.

Die Standardisierung der mRNA-Proben erfolgte durch eine photometrische Messung der Extrakte bei 260 und 280 nm (UV-Spektrometer, LKB Biochrom 4060, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm wurde für die Kontrolle eventueller Proteinkontaminationen in den mRNA-Extrakten ausgewertet und sollte in dem Bereich von 1,7 bis 2 liegen. Die Qualität der RNA wurde durch den Lauf eines Probegels unter nicht-denaturierenden Konditionen (1% Agarose, 0,08 µg/ml Ethidiumbromid) mit Aliquots der Proben (1 µl) getestet.

Die Separation der mRNA durch die Gelelektrophorese wurde durch denaturierende Bedingungen erreicht, um die Bildung sekundärer Strukturen durch intramolekulare Basenpaarungen zu verhindern. Denaturierung wird durch die Addition von Formaldehyd zu den RNA-Extrakten und dem Laufgel erreicht. Alle Schritte bis zum Starten des Gels, wenn nicht anders erwähnt, wurden auf Eis ausgeführt. Nach der Anpassung der Probenvolumina mit H₂O an gleiche RNA-Mengen entsprechend den Extinktionsmessungen wurden die Proben mit einem denaturierenden Samplepuffer (2,2 M Formaldehyd, 1x MOPS [3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, 50% Formamid, 0,08 µg/ml Ethidiumbromid) für 15 min bei 55°C inkubiert und mit einem „loading buffer“ (0,05% Bromphenolblau und Glycerol 10%) versetzt. Das Laufgel enthielt 1% Agarose, 2,2 M Formaldehyd (7%) und 1x MOPS. Als Laufpuffer wurde ein 1x MOPS-Puffer verwendet. Nach dem Laden mit gleichen Mengen an RNA (10 µg) lief das Gel mit 5 V/cm bis das Bromphenolblau ca. 2/3 von der Länge migriert war (Gelapparatur von Bio-Rad, Wide Mini Sub Cell, Hercules, CA). Die RNA-Banden (18 S und 28 S) wurden anschließend unter einem UV-Transilluminator visualisiert, nach gleicher Beladung des Gels beurteilt und fotografiert (Polaroid MP 4⁺, Cambridge, MA).

Vor dem „blotting“ der aufgetrennten RNA wurde das Gel gewaschen (H₂O), um einen Effizienzverlust durch eine Interferenz des Formaldehyds mit der Membran vorzubeugen. Der Transfer wurde in einer Vacuumblot-Apparatur (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) vorgenommen. Das Prozedere entsprach den Empfehlungen des Herstellers. Durch das Anlegen eines Vacuums von 55 mbar wird die RNA aus dem Gel auf die Membran gesogen. Um die Transfereffektivität zu verbessern (partielle RNA-Hydrolyse- und Spaltung), wird das Gel (unter Vacuum) jeweils 5 min mit H₂O, 50 mM NaOH und 1,5 M NaCl inkubiert. Nach der Equilibrierung mit 0,1 M Tris-Cl⁻ (pH7,4) für 5 min wurde die RNA mit 20x SSC-Puffer (saline-sodium citrate) auf eine Nylonmembran (Hybond N oder N⁺, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) transferiert (2 h), im Anschluß mit 2x SSC gespült und 10 min bei 70°C getrocknet. Die folgende UV-Bestrahlung (254 nm) der Membran in einem UV-Transilluminator (GS Gene Linker, Bio-Rad, Hercules, CA) führt zu einer kovalenten Bindung der

RNA an die Nylonmembran („UV cross linking“) und ermöglicht das „reprobing“ der Membran. Die Transfereffektivität wurde unter UV-Licht beurteilt (18 S und 28 S Banden) und fotografiert (Polaroid MP 4⁺).

Die Membran wurde mit 150 µg/ml denaturierter (100°C) salmon sperm DNA und 150 µg/ml yeast tRNA in der Hybridisierungslösung (50% Formamid, 6x SSC, 5x Denhardt, 0,5% SDS) prähybridisiert, d. h. gegen unspezifische Bindungen geblockt. Die Prozedur wurde mindestens 4 h in einem rotierenden Hybridisierungssofen (Mini Oven MK II, Hybaid, Teddington, UK) bei 42°C durchgeführt. Anschließend folgte die Inkubation mit den ³²P-radiomarkierten cDNA-Sonden (2,5 ng/ml in Hybridisierungspuffer) über mindestens 16 h bei 42°C im Hybridisierungssofen. Das Waschen mit 2x SSC/0,1 % SDS (sodium dodecyl sulfate) für 15 min bei RT und 0,2x SSC/0,1 SDS für 10 min bei 60 °C entfernt die nicht gebundenen cDNA-Sonden.

Zur Analyse der Hybridisierung wurde ein PhosphorImager (Molecular Dynamics, Krefeld) verwendet. Das Prinzip der Detektion ist die indirekte Autoradiographie, da ³²P ein zu starker β-Strahler für die direkte Exposition ist. Die Membran wurde in einer Autoradiographiekassette exponiert, dessen Schirm anschließend von einem Laser abgetastet und das Ergebnis mit der ImageQuant-Software (Molecular Dynamics) ausgewertet. Zusätzlich wurde ein Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) belichtet. Als internen Standard der Messungen wurde die Expression des glykolytischen Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) gemessen. Für die Tabellenauswertung wurden die relativen Mengenangaben der mRNA jeweils zu der zusätzlich bestimmten GAPDH mRNA-Menge des gleichen Films normalisiert und als Relativwert angegeben.

Proteinanalyse

Die Proteine wurden durch die eindimensionale, kontinuierliche SDS/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) aufgetrennt. Pro Probe/Schacht wurden gleiche Mengen Protein (100 µg) aufgetrennt. Danach erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und die Immunodetektion durch einen primären spezifischen Antikörper und über die an den sekundären Antikörper gekoppelte, Peroxidase katalysierte Chemilumineszenz („western blotting“).

Eine gleiche Beladung bei der Größenfraktionierung der Proteine durch die Gelelektrophorese wurde mittels der Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford, 1976 der einzelnen Proben sichergestellt. Dazu wurde ein kommerzieller Kit (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad, Hercules, CA) verwendet. Die Extinktionsmessung fand mit einem automatischen UV-Spektrometer statt (LKB Biochrom 4060, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Der Angleich der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte durch entsprechende Verdünnung mit H₂O. Die Proteine wurden mit einem 3x Tris-Glycin-Puffer (pH 6,8) im Volumenverhältnis von 1:3 (Puffer/Proteinlösung) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Dem Puffer wurde zuvor reduzierendes β-Mercaptoethanol zugesetzt. Alle Schritte bis zum Laden des Gels wurden auf Eis ausgeführt.

Als Trenngel wurde eine geringe Acrylamidkonzentration von 8% („light separating gel“) gewählt, um

die Auftrennung bzw. Auflösung zu verbessern (Molekulargewicht des eNOS-Monomers 133 kDa). Ein 1x Tris-Glycin-Puffer (pH 7,2) wurde als Elektrodenlösung verwendet. Die Protokolle zur Herstellung der Puffer und des Trenn- sowie Sammelgels sind andernorts beschrieben (Ausubel, 1994). Die Proteinlösungen wurden „tauchend“ in die Gelschächte pipettiert. Zur Identifizierung der Banden wurde jedes Gel mit einem Molekulargewichtsmarker (Rainbow, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) geladen und um ein gleichmäßiges Wandern der Proteinfront („blue juice“) zu gewährleisten, wurden in die seitlichen, nicht mit Protein beladenen Schächte gleiche Volumina 3x Tris-Glycin-Puffer (pH 6,8) gegeben. Das Gel lief mit einer Spannung von 100 V über ca. 1 h (Elektrophoreseapparatur von Hoefer, Serie P 600, San Francisco, CA).

Anschließend an die Kalibrierung des Gels in einem Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20% Methanol, pH 8,3) für 30 min wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-ECL, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) geblottet. Die Prozedur dauerte 1 h mit einem „semi dry blotter“ (Trans-Blot SD, Bio-Rad, Hercules, CA).

Die Effektivität des Transfers wurde durch eine transiente Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S beurteilt und photographisch festgehalten (Polaroid MP 4⁺, Cambridge, MA). Die Färbung wird bei den folgenden Waschschrinen vollständig entfernt und eine Interferenz mit den Antikörperbindungen ist auszuschließen.

Die Immunodetektion des eNOS Proteins erfolgte in zwei Schritten mit einem primären spezifischen Antikörper gegen das C-terminale Ende des eNOS-Monomers von der Maus (Anti-eNOS, Transduction Laboratories, Lexington, KY) und einem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen das Maus-IgG Fc-Fragment (Anti-Maus, Boehringer Mannheim). Die unspezifischen Bindungsstellen wurden zuvor durch dreimaliges Waschen für je 15 min mit einer „blocking solution“ (5% Magermilchtrockenpulver in PBS, pH 7,5) geblockt. Die Membran wurde mit einer 1:2500-Verdünnung des Anti-eNOS in blocking solution bei 4°C über Nacht inkubiert. Der nicht gebundene Anti-eNOS wurde anschließend mit PBS-Tween (0,1% Tween, pH 7,5) gewegewaschen. Der Anti-Maus wurde in PBS verdünnt (1:2500) und die Membran wurde bei RT für 1 h mit der Lösung inkubiert. Das Procedere wurde durch das Auswaschen des sekundären Antikörpers mit PBS abgeschlossen.

Die gebundenen sekundären Antikörper wurden mittels der enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) detektiert. Das Protokoll folgte den Empfehlungen des Herstellers. Kurz, die Peroxidase/Wasserstoffperoxid (H₂O₂) katalysierte Oxidation des Luminols unter alkalischen Bedingungen führt durch den folgenden Verfall des oxidierten, angeregten Zustand des Luminols zur Emission von Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 428 nm. Nach einminütiger Inkubationszeit wurde ein Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL) belichtet. Die Exposition des Films dauerte zwischen 5 bis 30 min und wurde in einer Dunkelkammer vorgenommen. Die Densitometrie wurde mit der ImageQuant-Software (Molecular Dynamics) ausgeführt.

Ergebnisse

Hypoxie-induzierte, zeitabhängige Abnahme der eNOS mRNA und des eNOS Proteins

Unter hypoxischen Bedingungen verringert sich die Menge der eNOS mRNA und des eNOS Proteins gegenüber normoxischen Konditionen, wie im „northern“ und „western blotting“ nachgewiesen wurde. Diese Verringerung konnte nach 24, 48 und 96 h für die mRNA und nachgewiesen werden. Die Kinetik der eNOS Protein-Expression unter Hypoxie zeigte eine Abnahme der Proteinmenge nach 24 h und verstärkt nach 96 h, während eine transiente Induktion gemessen nach 48 h nachgewiesen wurde (Abbildungen 4-7).

IL-1 β und LPS verringern die Expression der eNOS mRNA und des eNOS Proteins zeitabhängig

Interleukin-1 β und Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* verringern die Menge an eNOS mRNA und eNOS Protein. Die Verringerung konnte mittels „northern“ und „western blotting“ nach 24, 48 und 96 h nachgewiesen werden. Interleukin-1 β war potenter als LPS und induzierte bereits nach 24 h eine deutliche Abnahme, die sich nach 48 h verstärkte und nach 96 h zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Expression des eNOS Proteins führte (Abbildungen 4-7).

Proinflammatorische Mediatoren verstärken die Unterdrückung der Expression der eNOS mRNA und des eNOS Proteins unter Hypoxie

Die Analyse der eNOS mRNA mittels mRNA- und Proteinanalyse zeigte, daß der Hypoxie-induzierte Abfall der eNOS mRNA durch die zusätzliche proinflammatorische Stimulation (Interleukin-1 β und Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa*) nach 24 und 48 h weiter verstärkt wird und diese zu einem nahezu kompletten Verschwinden des eNOS Proteins nach 96 h führen. Dieser Effekt war unter IL-1 β stärker als unter LPS (Abbildungen 4-7).

Hypoxie, IL-1 β und TNF stimulieren die Expression von Endothelin-1 mRNA

Hypoxie induziert die Expression der Endothelin-1 mRNA nach 48 h. Interleukin-1 β und Tumor Necrosis Factor α induzieren die Expression der Endothelin-1 mRNA, gemessen durch „northern blotting“, wobei Interleukin-1 β nach 24 h die größte Induktion zeigte, die bereits nach 48 h deutlich abgeschwächt war. Tumor Necrosis Factor α zeigte erst nach 48 h eine Induktion, die aber weniger ausgeprägt war als die von Interleukin-1 β nach 24 h. Hypoxie und TNF α wirken synergistisch bei der Steigerung der ET-1 mRNA. Nach 24 h war die Expression der Endothelin-1 mRNA unter Hypoxie und dem proinflammatorischen Mediator TNF α höher als unter den beiden Bedingungen allein (Abbildungen 8 und 9).

IL-1 β und TNF α induzieren IL-8 mRNA allein und synergistisch mit Hypoxie

Interleukin-1 β und Tumor Necrosis Factor α induzieren die Expression von Interleukin-8 mRNA.

Dieser Effekt wird durch Hypoxie noch verstärkt und war in der Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ am stärksten (Abbildung 8).

Keine iNOS nachweisbar

Unter Normalbedingungen sowie unter Hypoxie und proinflammatorischer Stimulation ist keine iNOS mRNA in pulmonal-arteriellen Endothelzellen nachweisbar. Die Hybridisierung der „northern blots“ mit der iNOS cDNA-Sonde zeigte ein negatives Ergebnis (keine Abbildung).

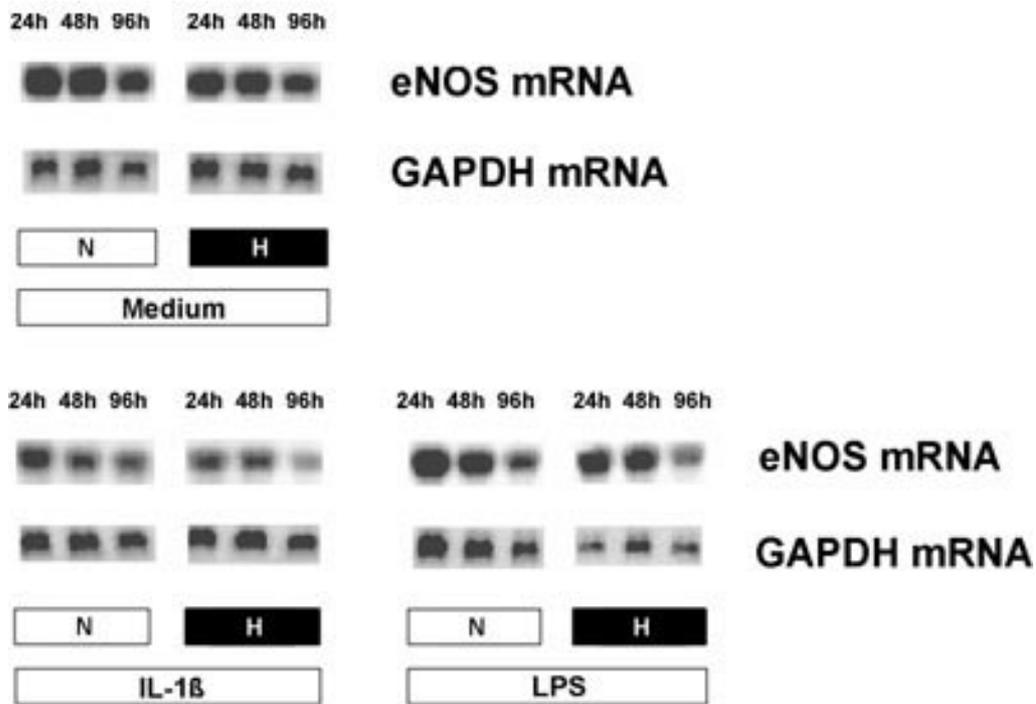


Abbildung 4

Analyse der eNOS mRNA Expression in HPAEC mittels „northern blotting“ unter Normoxie (N) oder Hypoxie (H) allein (Medium) bzw. den zusätzlichen proinflammatorischen Stimuli Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Lipopolysaccharid (LPS) von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Analyse der GAPDH mRNA Expression diente als interner Standard. Zeitpunkte der Messungen waren 24, 48 und 96 Stunden. Die Extraktion und die Analyse der mRNA erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben.

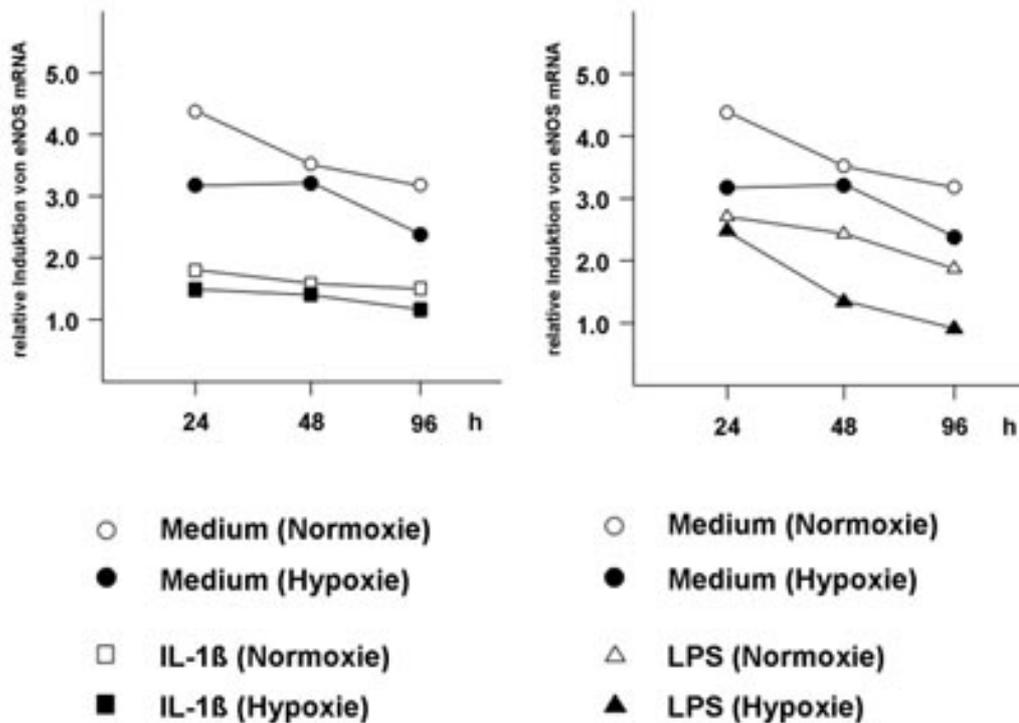


Abbildung 5 Auswertung der relativen Induktion der eNOS mRNA mittels Densitometrie der Banden im „northern blot“ und Normalisierung zu GAPDH.

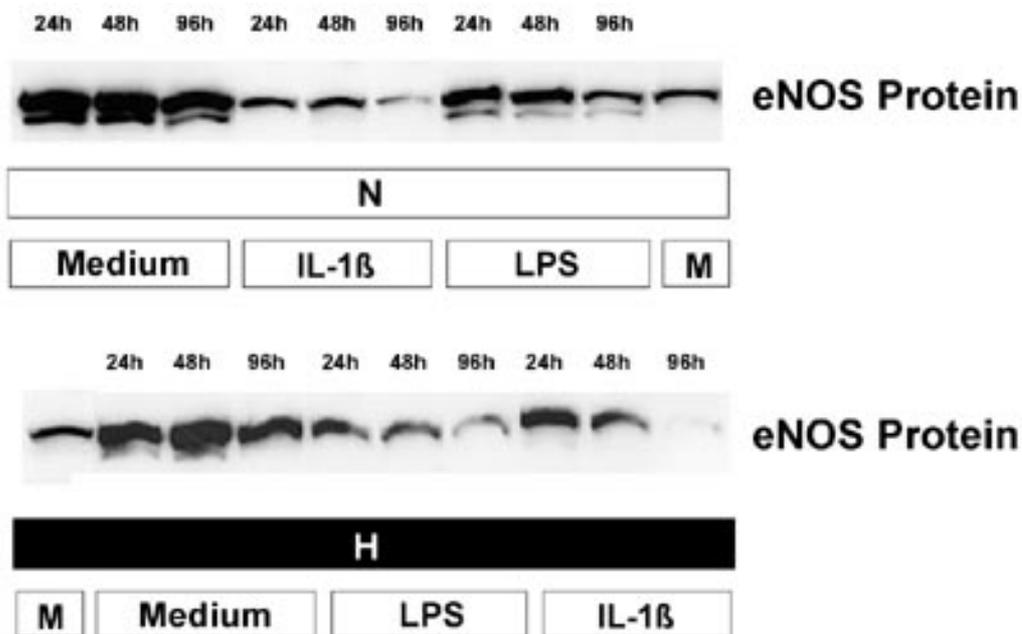


Abbildung 6 Analyse der eNOS Protein Expression in HPAEC mittels western blotting. Die Zellen waren entweder unstimuliert oder stimuliert mit Interleukin-1β (IL-1β) oder Lipopolysaccharid (LPS) von *Pseudomonas aeruginosa* jeweils in Kombination mit Normoxie (N) oder Hypoxie (H). Zeitpunkte der Messungen waren 24, 48 und 96 Stunden. Der eNOS Marker ist mit „M“ gekennzeichnet. Die Extraktion und die Analyse des Proteins erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben.

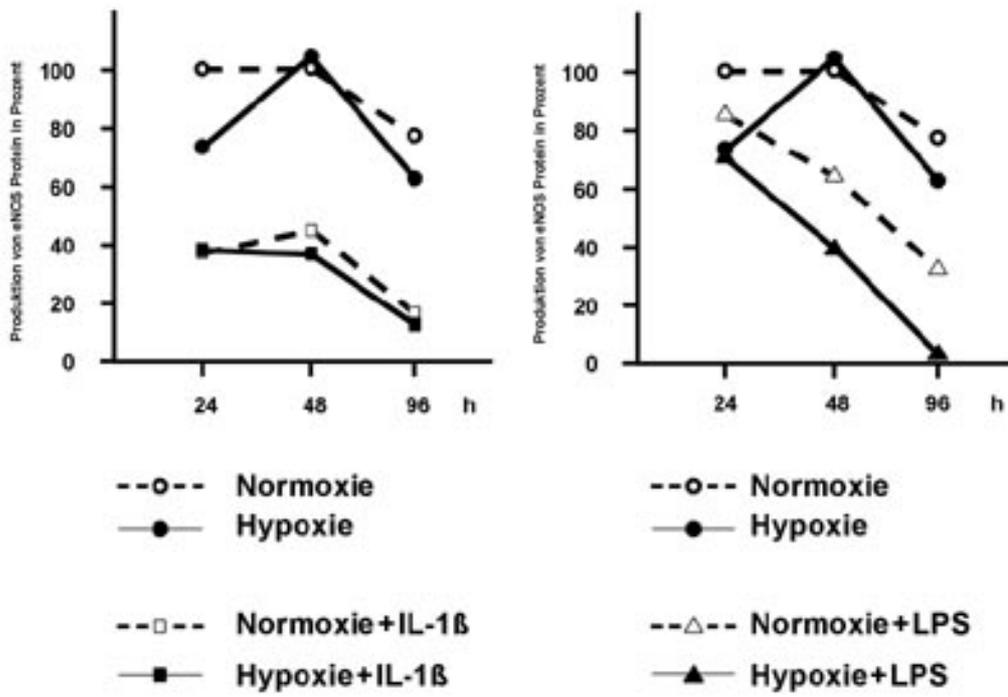


Abbildung 7

Densitrometrische Auswertung der eNOS Proteinanalyse.

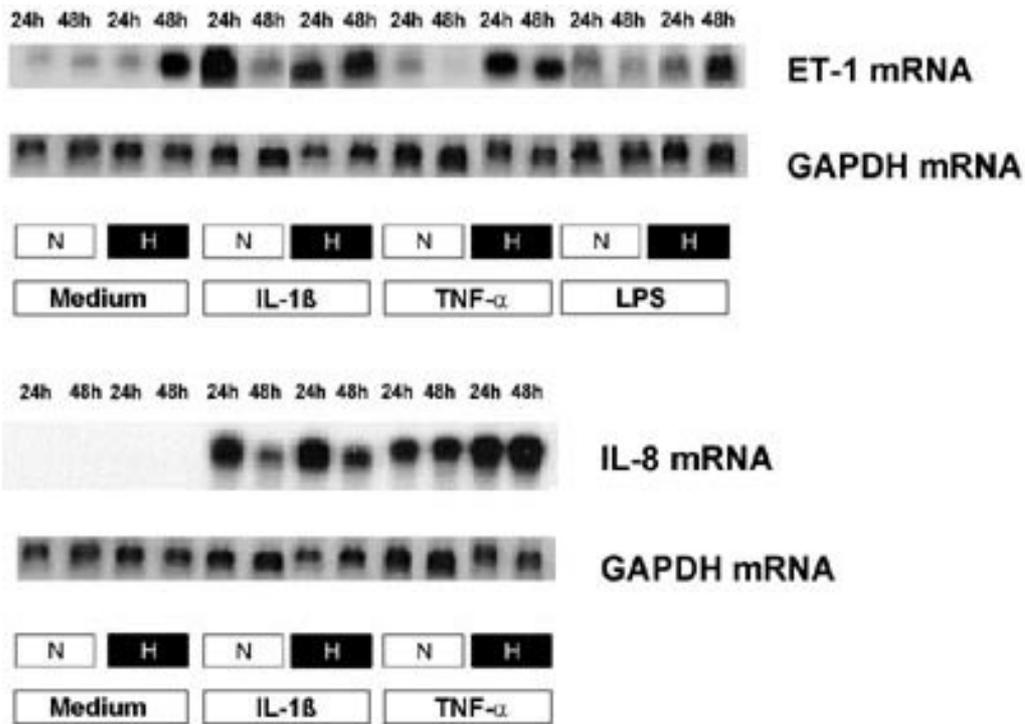


Abbildung 8

Analyse der Endothelin-1 (ET-1) und Interleukin-8 (IL-8) mRNA Expression in HPAEC mittels „northern blotting“. Die Zellen wurden unter Normoxie (N) oder Hypoxie (H) mit Interleukin-1 β (IL-1 β), Lipopolysaccharid (LPS) von *Pseudomonas aeruginosa* oder Tumor Necrosis Factor α (TNF α) stimuliert. Normoxie und Hypoxie ohne Stimulierung bilden die Ausgangsbedingungen (Medium). Als interne Kontrolle ist die GAPDH mRNA Analyse gezeigt.

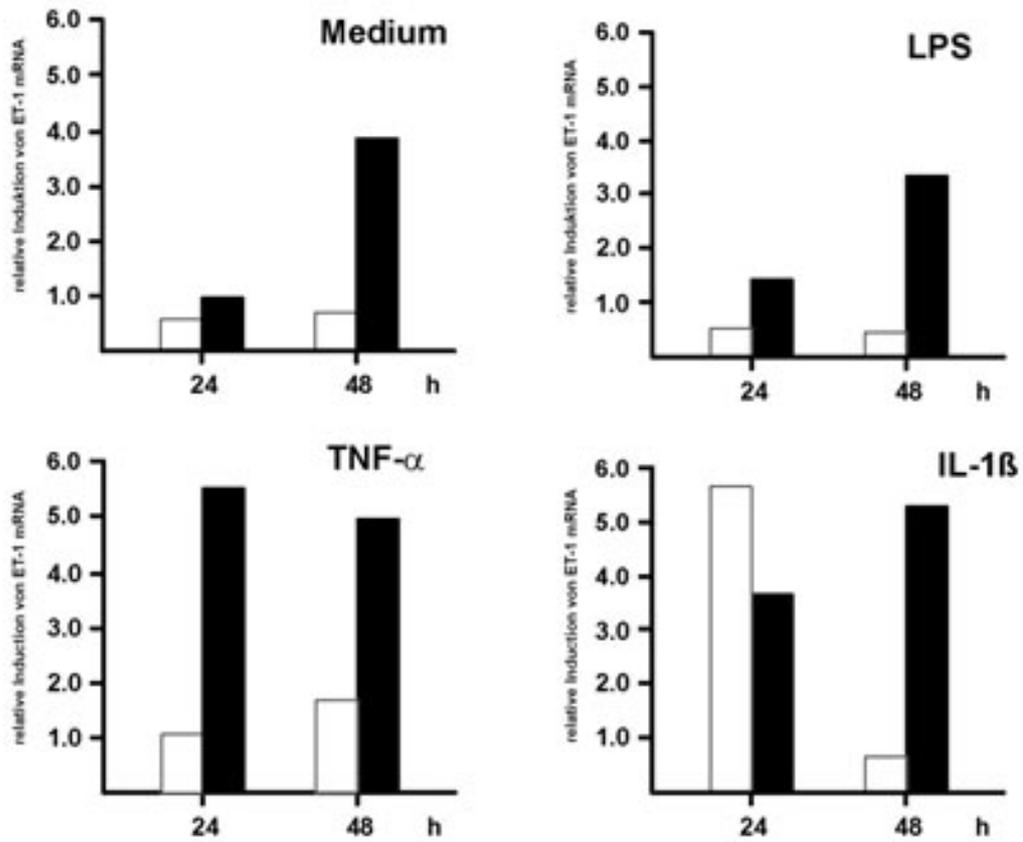


Abbildung 9

Densitometrische Auswertung der ET-1 mRNA Expression in HPAEC normalisiert zu GAPDH unstimuliert sowie unter Stimulation mit LPS, TNF α und IL-1 β . Normoxische Bedingungen werden durch weiße, hypoxische durch schwarze Balken angezeigt.

Diskussion

Die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie ist spekulativ. Wachsende Beweise deuten auf eine Schlüsselrolle des NO bei der Aufrechterhaltung des physiologischen Perfusions-/Ventilationsverhältnisses. Das vaskuläre und bronchiale NO stammt neben dem vom Endothel produzierten von der Ca^{2+} -unabhängigen, induzierbaren NO-Synthase (iNOS) im Bronchialepithelium (Guo, 1995) und von der Ca^{2+} -abhängigen, neuronalen Isoform der NO-Synthase (nNOS) aus den efferenten Nervenendigungen im Lungengewebe (Schmidt, 1994). Mehrere Studien haben gezeigt, daß endotheliales NO entscheidend für die Aufrechterhaltung eines niedrigen Druckes im pulmonalen Kreislauf verantwortlich ist (Dinh-Xuan, 1991). Pulmonale Hypertonie ist mit einer verringerten Expression der endothelialen NO-Synthase assoziiert (Giaid, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde evaluiert, ob Bedingungen, die bei pulmonaler Hypertonie auftreten, eine Abnahme der endothelialen NO-Synthase in menschlichen pulmonalen Endothelzellen hervorrufen können und ob diese Faktoren sich gegenseitig in der Wirkung verstärken.

Die Daten zeigen klar, daß proinflammatorische Mediatoren, Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor α und Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa*, eine Verringerung der eNOS mRNA und des eNOS Protein Expression hervorrufen und diesen Effekt unter Hypoxie steigern. Unter den gleichen Bedingungen wurde eine Induktion von vasokonstriktiven und proliferationssteigernden Mediatoren - Endothelin-1 und Interleukin-8 - nachgewiesen. Daß heißt, unter Hypoxie und proinflammatorischer Stimulierung kommt es zu einer reziproken Regulation entscheidender Mediatoren der Gefäßwand im pulmonalen System und zu einer Verschiebung der physiologischen Balance zugunsten der Vasopressoren und Wachstumsstimulatoren. Dieses pathologische Gleichgewicht scheint auf transkriptioneller Ebene fixiert zu sein. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Effekt zeitabhängig ist und nach 96 Stunden (bzw. 48 Stunden bei ET-1 und IL-8) sein Maximum erreicht.

Spekulativ bleibt, ob die Suppression des Vasodilators NO und die Induktion der Vasokonstriktoren ET-1 und IL-8 einen neuen „steady state“ darstellt oder ob es sich um eine transiente Störung der Genregulation handelt mit der Möglichkeit einer Gegensteuerung bzw. der Induktion antagonistischer Transkriptionsfaktoren. Berichte über die Induktion der endothelialen NO-Synthase nach verlängerter Hypoxie in der Rattenlunge (Shaul, 1995) sind für das menschliche pulmonale System nur begrenzt übertragbar, wobei festzuhalten ist, daß durch die Untersuchung einer Endothelzell-Monokultur in vitro möglicherweise beeinflussende Wechselwirkungen in vivo ausgeschlossen bleiben.

Durch die Experimente ungeklärt ist die Frage, ob es sich bei dem Abfall der eNOS mRNA um eine transkriptionelle und/oder posttranskriptionelle Kontrolle der Expression handelt und ob die de novo-Synthese eines Transkriptionsfaktors beteiligt ist. Versuche mit Actinomycin D und Cycloheximid wurden nicht durchgeführt. Phelan, 1996) zeigten, daß in Anwesenheit von Actinomycin D keine Suppression der eNOS Transkripte erfolgte und schlossen daher auf eine notwendige Induktion eines reprimierenden Transkriptionsfaktoren unter Hypoxie. Für die $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Reprimierung wurde

vorgeschlagen, daß sie zumindest zum Teil durch die posttranskriptionelle Destabilisierung der eNOS mRNA zu erklären ist (Yoshizumi, 1993), wobei die Verhinderung dieses Effekts durch Cycloheximid die Beteiligung einer Proteininduktion nahelegt (Yoshizumi, 1993). Offen ist, welche Mechanismen die Detektion des Sauerstoffdrucks und die anschließende Signaltransduktion (Transkriptionskontrolle) bei der Herunterregulation der eNOS mRNA steuern. Eine Analyse der 5'-gelegenen Region des bovinen eNOS Gens zeigte u. a. ein „tumor necrosis factor responsive element“ (Venema, 1994).

Die als internen Standard zur mRNA-Quantifizierung gemessene Expression der mRNA des glykolytischen Enzyms Glycerinaldehyde-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) war unter allen Versuchsbedingungen konstant. Eine Induktion durch Hypoxie, wie von Graven, 1994 beschrieben, konnte nicht beobachtet werden und die Berechnung der mRNA-Menge konnte somit verifiziert werden.

Ein Vergleich der Kinetik der Regulation der eNOS mRNA mit der des Proteins unter Hypoxie legt nahe, daß die Reprimierung des Proteins stärker als die der mRNA-Transkription ist. Ein möglicher Mechanismus könnte eine posttranslationelle Destabilisierung des Proteins sein, die auch die beobachtete „Induktion“ unter Hypoxie nach 48 h als intermittierende „Stabilisierung“ erklären würde. Erwähnt werden muß in diesem Zusammenhang, daß die Sensitivität bzw. die Quantifizierung der Proteinmenge mit der Methode des „western blotting“ eingeschränkt ist.

Wahrscheinlich ist die katalytische Funktion der NO-Synthase ein weiteres Angriffsziel der hypoxischen Steuerung der NO-Bildung, die die physiologische Relevanz der Kontrolle bestimmt. Von den drei Kosubstraten der eNOS (L-Arginin, NADPH und O₂) ist für L-Arginin die Möglichkeit des Substratmangels durch Hemmung der Biosynthese aus L-Zitrullin unter Hypoxie beschrieben worden (Su, 1995). In den Experimenten konnte diese Möglichkeit ausgeschlossen werden, da das Endothelzellbasalmedium L-Arginin enthält. Obwohl naheliegend, ist die Sauerstoffkonzentration unter der 3%igen Hypoxie nicht Reaktionsgeschwindigkeit-limitierend. Im hypoxischen Medium liegt die Sauerstoffkonzentration ca. bei 36 µmol und der k_m-Wert von O₂ für die eNOS wird mit ca. 7,7 µmol angegeben (Rengasamy, 1996). Für pathophysiologische Bedingungen, die eine niedrigere Sauerstoffkonzentration im Gewebe involvieren, ist eine Abschwächung der NO-Produktion aber möglich. Ausgleichend könnte das Potential zur Endprodukthemmung wirken (Ausschluß der negativen Rückkopplung durch NO unter Hypoxie) (Ravichandran, 1995). In den Versuchen korrelierten die aus den Überständen der Zellkulturen bestimmten NO₂/NO₃-Konzentrationen (Metaboliten des NO) mit der Kinetik der Proteinregulation (Daten nicht gezeigt). (Dem liegt die Annahme zugrunde, dass es sich bei dem gemessenen NO ausschließlich um von der eNOS produziertes NO handelt, da keine iNOS mRNA in den HPAEC detektierbar war.)

Betonen möchte ich die funktionelle Eigenheit der pulmonal-arteriellen Endothelzellen. Es gibt große phänotypische Differenzen zwischen Endothelzellen, die von verschiedenen Spezies, Geweben oder Organen isoliert werden. So ist in mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Herz (CMEC) von Ratten keine eNOS nachweisbar (Balligand, 1995). Bedeutung gewinnt obige Feststellung bei der differenzierten Expression von eNOS versus iNOS (inducible NOS). In Endothelzellen von Ratten stimu-

liert IL-1 β die Produktion von NO₂/NO₃ (Kanno, 1994). Die Analyse mittels „northern blotting“ zeigte die Induktion von iNOS mRNA (Kanno, 1994). Menschliche Endothelzellen aus der Aorta (AOEC) hingegen besitzen unter IL-1 β Stimulation keine detektierbare iNOS Aktivität (MacNaul, 1993), die eNOS mRNA wurde unter den gleichen Bedingungen reprimiert. Bovine Endothelzellen aus der Aorta (BAEC), über 24 h einer 1%igen (!) Hypoxie ausgesetzt, demonstrierten mehr als eine Verdopplung sowohl der eNOS mRNA wie des Proteins (Arnet, 1996), ein Hypoxie-stimulierter Effekt, der das erste Mal gezeigt wurde. Actinomycin D verhinderte diese Wirkung und Zellen, transfektiert mit einem Luciferase Reporter Plasmid, steigerten linear die Expression der Luciferase unter Hypoxie. Das fügt einen weiteren Punkt auch zu der oben diskutierten Frage der Kontrolle der eNOS mRNA Transkription hinzu. Die Hybridisierung der „northern blots“ mit der iNOS cDNA Sonde ergab keine detektierbaren iNOS Transkripts in HPAEC unter den beschriebenen Bedingungen (Daten nicht gezeigt), das heißt, das die iNOS entweder in diesen Zellen nicht exprimiert wird oder die Stimulation mit den verwendeten Konzentrationen von IL-1 β , TNF α und LPS zu gering war. Die Daten scheinen die Theorie zu unterstützen, wonach die iNOS für die Blutdruckregulation im pulmonal-arteriellen System nicht entscheidend ist.

Die unter Hypoxie und Inflammation unterdrückte NO-Freisetzung aus den Endothelzellen verhindert die von NO verursachte Dilatation der glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMC) durch die fehlende Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und folgendem niedrigen cGMP Spiegel in den VSMC ([Abb. 8](#)). Möglich ist, daß dieser Effekt durch folgende Gegensteuerungsmöglichkeiten abgeschwächt werden kann. (1) IL-1 β stimuliert in den VSMC die iNOS Expression und erhöht daher den intrazellulären NO und in der Folge den cGMP Spiegel (Spink, 1995). (2) Hypoxie induziert in den VSMC das Hämoxigenase-1 (HO-1) Gen (Morita, 1995). Die HO-1 katalysiert die Bildung von Kohlenmonoxid (CO), welches ebenfalls die Guanylatzyklase stimuliert. (3) Die hypoxische Regulation von ET-1 in den Endothelzellen steht unter negativer Kontrolle des in den VSMC gebildeten CO (Morita, 1995).

In den kultivierten pulmonal-arteriellen Endothelzellen konnte keine cGMP-Aktivität gemessen mit einem RIA (radio immuno assay) unter Ruhebedingungen und unter Stimulation mit einem Ca²⁺-Ionophor (A 23187) oder einem NO-Donor (Na²⁺-Nitroprussid) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die physiologische Relevanz ist unklar, könnte aber in Hinblick auf das oben gesagte bzw. das in der [Abbildung 10](#) vorgeschlagene Modell der parakrinen Wirkungsweise des endothelialen NO (keine iNOS!) bedeutsam sein.

Stewart, 1991) maßen in der Arteria pulmonalis von Patienten mit pulmonaler Hypertonie erhöhte Endothelin-1 Plasmaspiegel und stellten die Frage, ob ET-1 Marker oder Mediator der pulmonalel Hypertonie sei. Die vorliegenden Daten stützen die Theorie, wonach die Induktion von vasopressiven und -modulierenden Genen wie ET-1 und IL-8, auslösbar durch eine in vivo Situation simulierenden Bedingungen (Hypoxie und Entzündung), ursächlich am Pathomechanismus des „vascular remodeling“ - des fehlregulierten Wachstums - beteiligt sind (s. a. Giaid, 1995). Weitere Gefäß-modulierende, angiogenetische und durch Hypoxie in Endothelzellen stimulierbare Faktoren sind gut

charakterisiert worden, vor allem der vascular endothelial growth factor (VEGF; Shweiki, 1992).

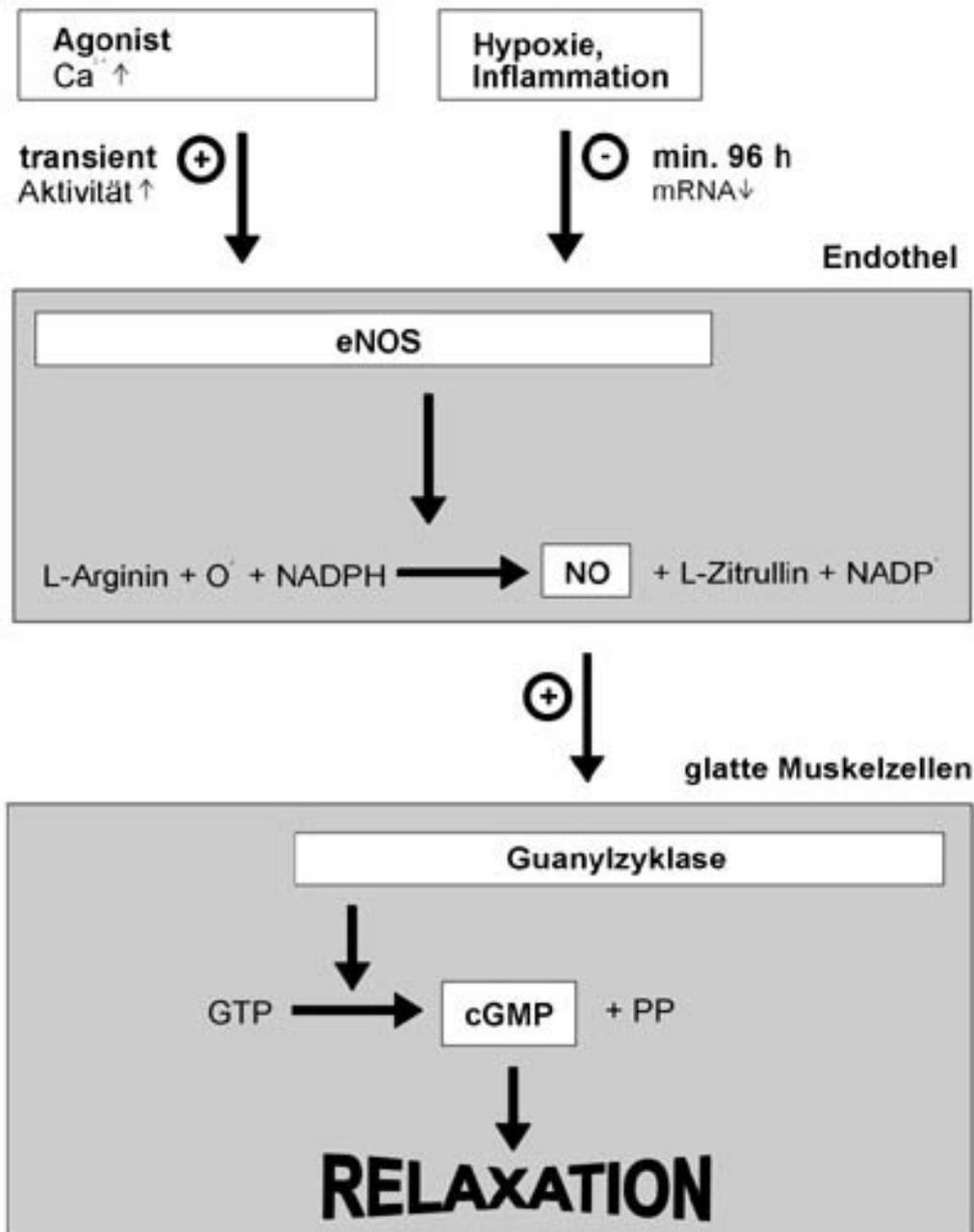


Abbildung 10

Vereinfachtes Flussdiagramm der Kontrolle der endothelialen NO Synthase bzw. der (parakrinen) Regulation der Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen durch NO. Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin oder mechanische Stimuli wie „shear stress“ induzieren die NO Synthase durch eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Eine Steigerung der NO Konzentration in der Endothelzelle ist die Folge. Das NO diffundiert in die umliegenden glatten Muskelzellen und stimuliert dort die zytoplasmatische Guanylatzyklase. Der erhöhte cGMP Spiegel in den Muskelzellen ist für deren Relaxation verantwortlich. Eine verminderte Expression der eNOS mRNA unter Hypoxie und durch proinflammatorische Stimuli verhindert die Dilatation des Gefäßes.

Zusammenfassung

Die Lage des Endothels zwischen dem Blutkompartiment und den reagierenden glatten Gefäßmuskelzellen prädisponiert zu einer interaktiven Rolle in der Regulation des Blutdruckes und -flusses. Wachsende Beweise zeigen eine Schlüsselstellung des für den endothelium-derived relaxing factor (EDRF) verantwortlich gemachte Stickstoffmonoxid (NO) in dem Prozess des Aufrechterhalten einer niedrigen Gefäßspannung und Blutdruckes. Das katalysierende Enzym ist die endotheliale NO-Synthase.

Chronische Hypoxie und inflammatorische Stimulation wurden als Bedingungen beschrieben, die zu einer pulmonalen Hypertonie und einer Gefäßhypertrophie (vascular remodeling) der Arteriolen führen.

Ich habe die Frage untersucht, ob die endotheliale NO-Synthase (eNOS) einer Kontrolle durch diese Faktoren unterliegt.

Dazu wurde eine Kultur von humanen pulmonal-arteriellen Endothelzellen etabliert und deren Verhalten unter den oben beschriebenen Bedingungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen getestet. Zu verschiedenen Zeiten (nach 24, 48 bzw. 96 Stunden) wurden jeweils die Gesamt-RNA und -Proteinmenge aus den Zellen isoliert und die eNOS-mRNA und die eNOS-Aktivität spezifisch mittels northern und western blotting semiquantitativ bestimmt. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von vasokonstriktiven bzw. -proliferativen Mediatoren (Endothelin-1 und Interleukin-8) mit spezifischen northern blotting beobachtet.

Die Versuche zeigten einen Abfall der eNOS-Aktivität und eine Expression von potenten Vasokonstriktoren und Wachstumsfaktoren unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen und Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren (IL-1 β , LPS und TNF α). Die Ergebnisse schlagen weiter vor, dass die Regulation der eNOS-Aktivität auf transkriptioneller Ebene besteht, da die eNOS-mRNA bis auf nicht mehr detektierbare Mengen reduziert wird. Die Effekte werden durch gemeinsame Stimulation mit Hypoxie und proinflammatorischen Mediatoren verstärkt.

Die Bedeutung einer wirkungsvollen Therapie der pulmonalen Hypertonie ist groß. Die inhalative NO-Substitutionstherapie findet bereits Anwendung im intensivmedizinischen Bereich zur Therapie des „acute respiratory distress syndrom“ (ARDS; Weitzberg, 1993), in der Neonatologie zur Therapie der „persistent pulmonary hypertension of the newborn“ (PPHN; Roberts, 1992) und in der Pulmologie zur Senkung einer bestehenden pulmonalen Hypertonie (Pebke-Zaba, 1991).

Ein therapeutischer Ansatz, der auch durch diese Arbeit vorgeschlagen wird, stellt eine pharmakologische Manipulation dar, die das gestörte Gleichgewicht der Genregulation wiederherstellen kann. Potentielle Wirkstoffe sind körpereigene Hormone bzw. deren Derivate (Estrogenderivate), die ein Aufrechterhalten der Basisexpression der eNOS bewirken. Antagonisten der vasokonstriktorischen Mediatoren können einen helfenden Effekt besitzen.

Eine offene Frage ist ebenfalls: Bestehen Mutationen der eNOS, die zu der Ausbildung einer pulmo-

nalen Hypertonie prädisponieren? Wenn das der Fall ist, und eine Diagnose dieses Defektes bei Risikopatienten möglich ist, könnte durch eine früh begonnene Therapie mit einem pharmakologischen Aktivator der eNOS der Entwicklung einer fixierten Hypertonie entgegengewirkt werden.

Abstract

Regulation of the endothelial nitric oxide synthase under hypoxia and proinflammatory stimulation in human pulmonary artery endothelial cells

Endothelium-derived relaxing factor is thought to produce and maintain vascular relaxation. Nitric oxide accounts for the biological activity of EDRF and is produced by the endothelial nitric oxide synthase. Chronic hypoxia and proinflammatory stimulators such as LPS (Lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*) and $\text{IL-1}\beta$ (Interleukin-1 β) have been shown to produce pulmonary hypertension and to induce vascular remodeling of small pulmonary arteries in animal models (Rabinovitch, 1979 and Graham, 1990). The purpose of this study was to characterize the influence of these factors on the regulation of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC). To address this question I established a culture of HPAEC and exposed the cell lines to hypoxia (3% O_2), $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ and LPS either alone or to hypoxia in combination with $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ or LPS. The mRNA and whole protein were extracted to the following time points: 24, 48 and 96 hours after begin of exposition. The eNOS mRNA and protein expression were analyzed using northern and western blotting techniques. Additionally, monitoring of the mRNA expression of the vasoconstrictive and vasoproliferative mediators endothelin-1 (ET-1) and interleukin-8 (IL-8) were performed using northern blotting. The presented data show that hypoxia and proinflammatory stimulators as well as the combination of both induce a downregulation of the eNOS protein. The parallel downregulation of the eNOS mRNA strongly suggests that this regulation takes place at the transcriptional level. The same stimuli upregulate the ET-1 and IL-8 mRNA.

These findings indicate that the reciprocal regulation of vasodilators and vasoconstrictors contribute to the pathomechanisms involved in the development of pulmonary hypertension.

Abkürzungen

Tabelle 1

cDNA	coding DNA (einzelsträngige kodierende DNA)
cGMP	cyclic guanosine monophosphate (zyklisches Guanosinmonophosphat)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
eNOS	endothelial nitric oxide synthase (endotheliale NO Synthase)
ET-1	Endothelin-1
GAPDH	Glyzeraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
HPAEC	human pulmonary artery endothelial cells (menschliche pulmonal-arterielle Endothelzellen)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells (menschliche Nabelschnur Endothelzellen)
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-8	Interleukin-8
iNOS	inducible nitric oxide synthase (induzierbare NO Synthase)
INF γ	Interferon- γ
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NADPH	nicotine adenine dinucleotide hydrogen (reduzierender Kofaktor)
NADP ⁺	nicotine adenine dinucleotide (oxidiertes Kofaktor)

NO	nitric oxide (Stickoxid)
NOS	nitric oxide synthase (NO Synthase)
nNOS	neuronal nitric oxide synthase (neuronale NO Synthase)
TNF α	tumor necrosis factor α
VSMC	vascular smooth muscle cells (glatte Gefäßmuskelzellen)

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die dazu beigetragen haben, daß diese Arbeit entstehen konnte, vor allem bei:

Meinen Eltern, die mir viel Vertrauen entgegenbrachten und mich immer in meinen Vorhaben bestärkt haben,

Herrn **Prof. Dr. Lutz-Henning Block** für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung meiner Begeisterung für die Molekularbiologie,

Herrn **Prof. Dr. Christian Witt** für die verständnisvolle Unterstützung meiner Arbeit,

Schaker Zakeri, als Freund und geduldigem Tutor verdanke ich ihm besonders viel,

Herrn **Dr. Rolf Ziesche**, der mir einprägsam die pathologischen und klinischen Zusammenhänge erklärte und mein Interesse schärfte,

Hildegard Meier, Gudrun Meinhardt und Elisabeth Hofbauer für ihre großartige Hilfe, Unterstützung und für die gute Stimmung, die sie verbreitet haben,

Martin Knöffler, der mit seinem Wissen und Können meine Arbeit stimuliert hat.

Literaturverzeichnis

- Arnal, 1994 Arnal, J.F., Yamin, J., Dockery, S. & Harrison, D.G Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth *Am. J. Physiol.* 267 1994 1381-8
- Arnet, 1996 Arnet, U.A., McMillan, A., Dinerman, J.L., Ballermann, B. & Lowenstein, C.J. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia. 1996 *J. Biol. Chem.* 271 1996 15069-73
- Ausubel, 1994 Ausubel, I. & Frederick, M. *Current protocols in molecular biology* Frederick, M. New York John Wiley & Sons 1994 Unit: 10.2
- Balligand, 1995 Balligand, J.L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W.W., Kobzik, L., Lowenstein, C.J., Lamas, S., Kelly, R.A., Smith, T.W. & Michel, T. Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1beta and IFN-gamma *Am. J. Physiol.* 268 1995 1293-303
- Bath, 1991 Bath, P.M.W., Hassel, D.G., Gladwin, A.-M., Palmer, R.M.J. & Martin, J.F. Nitric oxide and prostacyclin: divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro *Arterioscler. Thromb.* 11 1991 254-60
- Bradford, 1976 Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 72 1976 248-54
- Channick, 1996 Channick, R.N. *Pulmonary Hypertension: Pathogenesis and Etiology* Bordow, R.A. and Moser, K.M. *Manual of Critical Problems in Pulmonary Medicine* Boston Little, Brown and Company 1996 304-8
- Chomczynski, 1987 Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Anal. Biochem.* 162 1987 156-9
- Clementi, 1995 Clementi, E., Sciorati, C., Riccio, M., Miloso, M., Meldolesi, J. & Nistico, G. Nitric oxide action on growth factor-elicited signals. Phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ responses are negatively modulated via a cGMP-dependent protein kinase I pathway *J. Biol. Chem.* 270 1995 22277-82
- De Caterina, 1995 De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.-B., Thannikal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A., Jr., Shin, W.S. & Liao, J.K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation *J. Clin. Invest.* 96 1995 60-8
- Demiryurek, 1993 Demiryurek, A. T., Wadsworth, R.M., Kane, K.A. & Peacock, A.J. The role of endothelium in hypoxic constriction of pulmonary artery rings *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 1993 283-90
- Dinh-Xuan, 1991 Dinh-Xuan, A.T., Higenbottam, T.W., Clelland, C.A. et al. Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease *N. Engl. J. Med.* 324 1991 1539-47

- Feinberg, 1984 Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity *Anal. Biochem.* 137 1984 266-7
- Furchgott, 1980 Furchgott, R.F. und Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle cells by acetylcholine *Nature* 288 1980 373-6
- Garg, 1989 Garg, U.C. & Hasid, A. Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells *J. Clin. Invest.* 83 1989 1774-7
- Giaid, 1995 Giaid, a. & Saleh, D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension *N. Engl. J. Med.* 333 1995 214-21
- Graham, 1990 Graham, L.M., Vasil, A., Voelkel, N.F. & Stenmark, K.R. Decreased pulmonary vaso-reactivity in an animal model of chronic *Pseudomonas pneumonia* *Am. Rev. Respir. Dis.* 142 1990 221-9
- Graven, 1994 Graven, K.K., Troxler, R.F., Kornfeld, H., Panchenko, M.V. & Farber, H.W. Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia *J. Biol. Chem.* 269 1994 24446-53
- Guo, 1995 Guo, F.H., De Raeve, H.R., Rice, T.W., Stuehr, D.J., Thunnissen, F.B. & Erzurum, S.C. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 1995 7809-13
- HAMPL, 1995 Hampl, V., Cornfield, D.N., Cowan, N.J. & Archer, S.L. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells *Eur. Respir. J.* 8 1995 515-22
- Heath, 1993 Heath, D. The pathology of pulmonary hypertension *Eur. Res. Rev.* 3 1993 555-8
- Hirata, 1988 Hirata, Y., Yoshimi, H., Takata, S., Watanabe, T.X., Kumagai, S., Nakajima, K. & Sakakibara, S. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154 1988 868-75
- Huang, 1995 Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A. & Fishman, M.C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase *Nature* 377 1995 239-42
- Jackson, 1990 Jackson, C. J., Garbett, P.K., Nissen, B. & Schrieber, L. Binding of human endothelium to *Ulex europaeus* I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium *J. Cell Sci.* 112 1990 257-262
- Janssens, 1992 Janssens, S. P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B. & Bloch, K. D. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase *J. Biol. Chem.* 267 1992 14519-22

- Kanno, 1994 Kanno, K., Hirata, Y., Imai, T., Iwashina, M. & Marumo, F. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene by interleukin-1 beta in rat vascular endothelial cells *Am. J. Physiol.* 267 1994 2318-24
- Karakurum, 1994 Karakurum, M., Shreeniwas, R., Chen, J., Pinsky, D., Yan, S.D., Anderson, M., Sunouchi, K., Major, J., Hamilton, T., Kuwabara, K. et al. Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells *J. Clin. Invest.* 93 1994 1564-70
- Karupiah, 1993 Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C. & MacMicking, J.D. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase *Science* 261 1993 1445-8
- Kelly, 1995 Kelly, S., Smith, T.W., & Michel, T. Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 beta and IFN-gamma *Am. J. Physiol.* 268 1995 1293-303
- Kourembanas, 1990 Kourembanas, S., Hannan, R.L. & Faller, D.V. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells *J Clin. Invest.* 86 1990 670-4
- Kourembanas, 1991 Kourembanas, S., Marsden, P.A., McQuillan, L.P. & Faller, D.V. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium *J. Clin. Invest.* 88 1991 1054-7
- Kourembanas, 1993 Kourembanas, S., McQuillan, L.P., Leung, G.K. & Faller, D.V. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia *J. Clin. Invest.* 92 1993 99-104
- Kourembanas, 1994 Kourembanas, S. & Bernfield, M. Hypoxia and endothelial-smooth muscle cell interactions in the lung *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11 1994 373-4
- Lancaster, 1994 Lancaster, J.R., Jr. Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 1994 8137-41
- Liao, 1995 Liao, J.K., Zulueta, J.J., Yu, F.-S., Peng, H.-B., Cote, C.G. & Hassoun, P.M. Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen *J. Clin. Invest.* 96 1995 2661-6
- Liu, 1996 Liu, S.F., Adcock, I.M., Old, R.W., Barnes, P.J., & Evans, T.W. Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat *Crit. Care Med.* 24 1996 1219-25
- MacNaul, 1993 MacNaul, K.L. & Hutchinson, N.I. Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 196 1993 1330-4
- Marletta, 1994 Marletta, A.M. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis *Cell* 78 1994 927-30

- Marsden, 1993 Marsden, P.A., Heng, H.H.Q., Scherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, A.V., Shi, X.-M., Tsui, L.-C. & Schappert, K.T. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene *J. Biol. Chem.* 268 1993 17478-88
- McQuillan, 1994 McQuillan, L.P., Leung, G.K., Marsden, P.A., Kostyk, S.K. & Kourembanas, S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional mechanisms *Am. J. Physiol.* 267 1994 1921-7
- Michel, 1993 Michel, T., Li, G.K. & Busconi, L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 1993 6252-6
- Morita, 1995 Morita, T., Perrella, M.A., Lee, M.E. & Kourembanas, S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 1995 1475-9
- Morita, 1995 Morita, T. & Kourembanas, S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide *J. Clin. Invest.* 96 1995 2676-82
- Nathan, 1992 Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells *FASEB J.* 6 1992 3051-64
- Nathan, 1994 Nathan, C. & Xie, Q.-w. Regulation and biosynthesis of nitric oxide *J. Biol. Chem.* 269 1994 13725-8
- Nathan, 1994 Nathan, C. & Xie, Q.-w. Nitric oxide Synthases: Roles, Tolls and Controls *Cell* 78 1994 915-8
- O'Brien, 1984 O'Brien, R.F. & McMurty, I.F. Endothelial cell (EC) supernatants contract bovine pulmonary artery (PA) rings *Am. Rev. Respir. Dis.* 129 1984 337
- Palmer, 1987 Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. und Moncada, S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor *Nature* 327 1987 524-6
- Peiró, 1995 Peiró, C., Redondo, J., Rodríguez-Martínez, A., Angulo, J., Marín, J. & Sánchez-Ferrer, C.F. Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation *Hypertension* 25 1995 748-51
- Pebke-Zaba, 1991 Pebke-Zaba, J., Higgenbottam, T.W., Dinh-Xuan, A.T., Stone, D. & Wallwork, J. Inhaled nitric oxide as a cause of selectiv pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension *Lancet* 338 1991 1173-4
- Phelan, 1996 Phelan, M.W. & Faller, D.V. Hypoxia decreases constitutive nitric oxide synthase transcript and protein in cultured endothelial cells *J. Cell. Physiol.* 167 1996 469-76
- Pietra, 1989 Pietra, G.G., Edwards, W.D., Kay, J.M., Rich, S., Kernis, J., Schloo, B., Ayres, S.M., Bergofsky, E.H., Brundage, B.H. & Detre, K.M. et al. Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National

- Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry *Circulation* 80 1989 1198-206
- Pohl, 1991 Pohl, U., Herlan, K., Huang, a. Bassenge, E. EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries *Am. J. Physiol.* 261 1991 2016-23
- Rabinovitch, 1979 Rabinovitch, M., Gamble, M., Nadas, A.S., Miettinen, O.S. und Reid, L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features *Am. J. Physiol.* 236 1979 818-27
- Radomski, 1990 Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 1990 5193-7
- Radomski, 1993 Radomski, M.W., Vallance, P., Whitley, G., Foxwell, N. & Moncada, S. . Plateled adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide *Cardiovasc. Res.* 27 1993 1380-2
- Ravichandran, 1995 Ravichandran, L.V., Johns, R.A. & Rengasamy, A. . Direct and reversible inhibition of endothelial nitric oxide synthase by nitric oxide *Am. J. Physiol.* 268 1995 2216-23
- Rengasamy, 1996 Rengasamy, A. & Johns, R.A. . Determination for oxygen of nitric oxide synthase isoforms *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276 1996 30-3
- Roberts, 1992 Roberts, J.D., Polaner, D.M., Lang, P. & Zapol. W.M. . Inhaled nitric oxid in persistent pulmonary hypertension of the newborn *Lancet* 340 1992 818-9
- Robinson, 1994 Robinson, L.J., Weremowicz, W., Morton, C.C. & Michel, T. . Effects of candidate autocrine and paracrine mediators on growth responses in isolated rat arteries *Genomics* 19 1994 350-7
- Rosenkranz-Weiss, 1994 Rosenkranz-Weiss, P., Sessa, W.C., Milstien, S., Kaufman, S., Watson, C.A. & Pober, J.S. Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells *J. Clin. Invest.* 93 1994 2236-43
- Schappert, 1993 Schappert, K.T. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene *J. Biol. Chem.* 268 1993 17478-88
- Schiffers, 1994 Schiffers, P.M., Fazzi, G.E., van Ingen Schenau, D. & De Mey, J.G. . Effects of candidate autocrine and paracrine mediators on growth responses in isolated rat arteries *Arterioscler. Thromb.* 14 1994 420-6
- Schmidt, 1994 Schmidt, H.H.H.W. und Walter, U. NO at work. *Cell* 78 1994 919-25
- Sekido, 1993 Sekido, N., Mukaida, N., Harada, A., Nakanishi, I., Watanabe, Y. & Matsushima, K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8 *Nature* 365 1993 654-7
- Shaul, 1995 Shaul, P.W., North, A.J., Brannon, T.S., Ujiie, K., Wells, L.B., Nisen, P.A., Lowenstein,

- P.J., Snyder, S.H. & Star, R.A. Prolonged in vivo hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and type III gene expression in adult rat lung *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13 1995 167-74
- Shweiki, 1992 Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis *Nature* 359 1992 843-5
- Sneddon, 1988 Sneddon, J.M. & Vane, J.R. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 1988 2500-4
- Spink, 1995 Spink, J., Cohen, J. & Evans, T.J. The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B *J. Biol. Chem.* 270 1995 29541-7
- Stamler, 1994 Stamler, J.S. Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide *Cell* 78 1994 931-6
- Steinberg, 1994 Steinberg, K.P., Milberg, J.A., Martin, T.R., Maunder, R.J, Cockrill, B.A. & Hudson, L.D. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150 1994 113-22
- Stenger, 1994 Stenger, S., Thuring, H., Rollinghoff, M. & Bogdan, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major* *J. Exp. Med.* 180 1994 783-93
- Stenmark, 1994 Stenmark, K.R., Durmowicz, A.G., Roby, J.D., Mecham, R.P. & Parks, W.C. Persistence of the fetal pattern of tropoelastin gene expression in severe neonatal bovine pulmonary hypertension *J. Clin. Invest.* 93 1994 1234-42
- Stewart, 1991 Stewart, D.J., Levy, R.D., Cernacek, P. & Langleben, D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann. Int. Med.* 114 1991 464-9
- Su, 1995 Su, Y. & Block, E.R. Hypoxia inhibits L-arginine synthesis from L-citrulline in porcine pulmonary artery endothelial cells *Am. J. Physiol.* 269 1995 581-7
- Terashima, 1994 Terashima, T., Kanazawa, M., Sayama, K., Ishizaka, A., Urano, T., Sakamaki, F., Nakamura, H., Waki, Y., Tasaka, S. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates acute lung injury induced by intratracheal endotoxin in guinea pigs *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149 1994 1295-303
- Uematsu, 1995 Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J.P., Nishida, K., Murphy, T.J., Alexander, R.W., Nerem, R.M. & Harrison, D.G. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress *Am. J. Physiol.* 269 1995 1371-8
- Venema, 1994 Venema, R.C., Nishida, K., Alexander, R.W., Harrison, D.G., Murphy, T.J. Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase *Biochim. Biophys. Acta* 1218 1994 413-20

- Wagner, 1984 Wagner, D.D. & Marder, V.J. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization *J. Cell. Biol.* 99 1984 2123-30
- Weitzberg, 1993 Weitzberg, E., Rudehill, A. & Lundberg, J.M. Nitric oxide inhalation attenuates pulmonary hypertension and improves gas exchanges in endotoxin shock *Eur. J. Pharmacol.* 233 1993 85-94
- Yanagisawa, 1988 Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaka, Y., Goto, K. & Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells *Nature* 332 1988 411-5
- Yoshizumi, 1990 Yoshizumi, M., Kurihara, H., Morita, T., Yamashita, T., Oh-Hashi, Y., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T. & Yazaki, Y. Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166 1990 324-9
- Yoshizumi, 1993 Yoshizumi, M., Perrella, M.A., Burnett, J.C., Jr. & Lee, M.E. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life *Circ. Res.* 73 1993 205-9
- Yue, 1994 Yue, T.L., Wang, X., Sung, C.P., Olson, B., McKenna, P.J., Gu, J.L. & Feuerstein, G.Z. Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells *Circ. Res.* 75 1994 1-7