

Aus der Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression und Regulation des Hypoxie-  
induzierbaren Faktors HIF-2 $\alpha$  in verschiedenen  
Organen der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Charlotte Karin Scholze  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. PD Dr. med. M. Wiesener  
2. Prof. Dr. C. Bauer  
3. Prof. Dr. med. A. Kurtz

Datum der Promotion: 20.06.2005

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF)	2
1.2	Regulation von HIF	4
1.3	HIF-1 und HIF-2 <i>in vivo</i>	6
1.4	HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Knockouts	7
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
3.1	Tiere	10
3.2	Tierexperimente	10
3.3	Antikörper	10
3.3.1	Antikörpercharakterisierung	11
3.4	Zellkultur und Proteinextraktion kultivierter Zellen	11
3.5	Protein-Nachweis von HIF-2 $\alpha$ im Immunoblot und in der Immunhistochemie	12
3.5.1	Proteinextraktion	12
3.5.2	Proteinquantifizierung	12
3.5.3	Immunoblotanalyse	12
3.5.4	Immunhistochemie	13
3.6	RNA Analyse von HIF-2 $\alpha$ und HIF-induzierbarer Gene im RNase Protection Assay	14
3.6.1	Extraktion der RNA	14
3.6.2	Quantifizierung der RNA-Extrakte	15
3.6.3	Herstellung der radioaktiven Sonden	15
3.6.4	RNase Protection Assay	16
3.6.5	Auswertung der Signale im RNase Protection Assay	18

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>19</b>
4.1	Antikörpercharakterisierung	19
4.2	Hypoxische Induktion von HIF-2 $\alpha$ in Ratten	20
4.3	Zelluläre Lokalisation der HIF-2 $\alpha$ -Induktion durch Immunhistochemie	25
4.4	Expression und Modulation der HIF-2 $\alpha$ mRNA	32
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>36</b>
5.1	Expression und Modulation der HIF-2 $\alpha$ mRNA	36
5.2	Zusammenhang zwischen der Sauerstoffspannung und der Proteininduktion	37
5.3	Vergleich der Ergebnisse für HIF-2 $\alpha$ mit HIF-1 $\alpha$	39
5.4	Ausblick	41
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>58</b>

## 1 Einleitung

Die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Sauerstoff-Homöostase ist entscheidend für das Überleben aller Säugetiere und der meisten Nicht-Säugetiere, da molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) im Rahmen der aeroben Energiegewinnung zum Erhalt der zellulären Struktur und Funktion notwendig ist. Multizelluläre Organismen besitzen ein komplexes System für die zuverlässige Regulation von Sauerstoffverfügbarkeit und -verbrauch. Die Adaptationsmechanismen beinhalten Veränderungen in der  $O_2$ -Aufnahme aus der Umgebung (Respiration), den  $O_2$ -Transport im Körper (Zirkulation) und die Anpassung der alternativen Wege der Energieproduktion (anaerober Stoffwechsel).

Die Zellen des menschlichen Körpers können die  $O_2$ -Konzentration messen und haben die Fähigkeit zur Reaktion auf akut oder chronisch reduzierte  $O_2$ -Verfügbarkeit (Hypoxie). Wie auch in anderen physiologischen Systemen beruhen die Adaptationsmechanismen für unmittelbare Änderungen der  $O_2$ -Konzentration auf Modifikationen bereits existierender Proteine (z.B. Änderungen der Leitfähigkeit von Ionenkanälen), wohingegen anhaltende Prozesse durch Veränderungen in der Gen-Expression und Proteinsynthese beeinflusst werden.

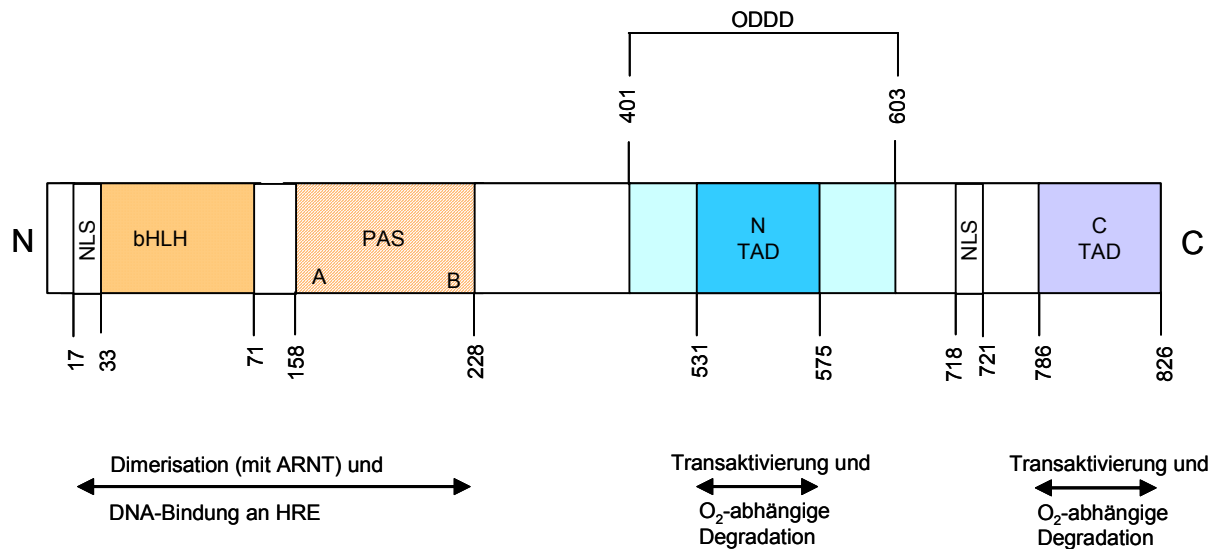
Einerseits spielt Hypoxie im Zusammenhang mit physiologischen Anpassungsreaktionen an ein verändertes Sauerstoffangebot eine Rolle (z.B. Polyzythämie in veränderter Höhenlage). Zum anderen gehen häufige Erkrankungen wie Koronare Herzerkrankung, pulmonale Hypertonie sowie cerebrale und periphere arterielle Verschlusskrankheiten in unterschiedlichem Ausmaß mit Gewebshypoxie einher. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die der Gewebsreaktion auf reduzierte Sauerstoffspannung zugrunde liegen, könnte helfen, therapeutische Ansätze zu entwickeln, um die hypoxisch bedingten Gewebsschäden zu verringern bzw. zu verhindern.

## 1.1 Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF)

Untersuchungen am hämatopoietischen Wachstumsfaktor Erythropoietin (EPO) haben zu Erkenntnissen über ein weitreichendes System der Genregulation durch O<sub>2</sub> geführt, welches von der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors – dem Hypoxie-induzierbaren-Faktor (HIF) – abhängig ist (Semenza und Wang, 1992; Wang und Semenza, 1995).

Zu Beginn der neunziger Jahre wurde eine regulative DNA-Region, die „Enhancer“-Sequenz am 3'-Ende des EPO-Gens, identifiziert. Innerhalb dieses Elementes liegt das „hypoxia responsive element“ (HRE), welches für die unter Hypoxie gesteigerte Genexpression verantwortlich ist. Für die Aktivierung des HRE ist die Bindung des spezifischen Transkriptionsfaktors HIF notwendig (Beck et al., 1991; Pugh et al., 1991; Semenza et al., 1991). Spätere HIF-1-Affinitätsaufreinigungen von nukleären Zellextrakten haben zur Definition eines DNA-bindenden heterodimeren Proteins geführt, welches sich aus einer 120 kDa  $\alpha$ - und einer 91-94 kDa  $\beta$ -Untereinheit (auch „aryl hydrocarbon nuclear translocator“ (ARNT)) zusammensetzt (Wang und Semenza, 1995). Die beiden Untereinheiten zeigen einen ähnlichen Aufbau in ihren N-terminalen Domänen: eine basic helix-loop-helix (bHLH)- und eine PER-ARNT-SIM (PAS)-Domäne (Wang et al., 1995) (Abb.1). Diese bHLH-PAS-Domäne ist entscheidend für die Vermittlung der Dimerisation und für die DNA-Bindung der Proteine. Die C-terminalen Sequenzen sind an der Transaktivierung und Regulation der Proteine beteiligt.

Im folgenden zeigte sich, dass HIF nicht nur bei der Regulation von EPO eine entscheidende Rolle spielt, sondern Teil des komplexen und weitreichenden Systems der hypoxischen Adaptation ist (Maxwell et al., 1993b; Wang und Semenza, 1993). HIF ist maßgeblich an der hypoxischen Regulation zahlreicher Gene beteiligt, die z.B. für anaeroben Energiestoffwechsel (Glukosetransporter 1, glykolytische Enzyme), Eisenstoffwechsel (Transferrin, Coeruloplasmin), Gefäßwachstum („vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „platelet derived growth factor“ (PDGF)), Regulation der Vasomotorik („nitric oxide“ (NO)-Synthetase, Hämoxigenase 1, Endothelin-1 und Adrenomedullin) und Gewebstoffwechsel (Kollagen Prolyl-4-hydroxylase  $\alpha$ ) verantwortlich sind (Wenger, 2002). Aufgrund dieser vielfältigen Wirkungen stellt HIF einen ubiquitär vorkommenden Schlüsselregulator für die Adaptation an reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit dar.



**Abb. 1:** Struktureller Aufbau der HIF $\alpha$ -Untereinheit am Beispiel von HIF-1 $\alpha$  (826 Aminosäuren), modifiziert nach Semenza 1999.

Die amino(N)-terminale Sequenz von HIF $\alpha$ , die in ihrem Aufbau der der HIF $\beta$ -Untereinheit sehr ähnlich ist, zeigt eine basic-helix-loop-helix (bHLH)- und eine PER-ARNT-SIM (PAS)-Domäne. Diese sind für die Dimerisation und die DNA-Bindung verantwortlich. Die Carboxy(C)-terminale Region der HIF $\alpha$ -Untereinheit besteht aus einer N- und C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD), sowie einer „oxygen depending degradation domain“ (ODDD). Die Positionen der Domänen sind mit der ersten und letzten Aminosäure gekennzeichnet. TAD und ODDD sind für die Transaktivierung und die O<sub>2</sub>-abhängige Degradation zuständig. Darüber hinaus existieren zwei „nuclear localization signals“ (NLS).

HIF-1 $\alpha$  ist spezifisch für das HIF-1-Heterodimer, wohingegen HIF-1 $\beta$  neben seiner Funktion als Komponente von HIF-1 auch als Dimerisationspartner anderer bHLH-PAS-Proteine, wie z.B. vom Aryl-Hydrokarbon-Rezeptor (Hoffman et al., 1991), HIF-2 $\alpha$  (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997) und HIF-3 $\alpha$  (Gu et al., 1998) dient.

Seit der initialen Beschreibung von HIF-1 $\alpha$  1995 wurde eine Familie homologer bHLH-PAS-Proteine (u.a. HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ) in Säugetieren beschrieben (Crews und Fan, 1999). Die Aminosäuresequenzen von wichtigen funktionellen Domänen von HIF-1 $\alpha$  (bHLH, PAS, Prolin-Serin-Threonin-reiche Protein-Stabilisierungs-Domänen und Transaktivierungsdomänen (N-TAD, C-TAD)) (Abb.1) zeigen eine hohe Übereinstimmung mit HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  (Ema et al., 1997; O'Rourke et al., 1999; Tian et al., 1997).

HIF-1 $\alpha$ - und HIF-1 $\beta$ -mRNA wird in den meisten, wenn nicht allen humanen- und Nagetiergeweben exprimiert (Wenger et al., 1996; Wiener et al., 1996). Für HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  wurde zunächst eine stärker restriktive Expression angenommen, die für HIF-2 $\alpha$  z.B. in sich entwickelndem Gefäßendothel, in der fetalen Lunge und in Katecholamin-

produzierenden Zellen beschrieben wurde (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997), was zur Bezeichnung „endothelial PAS protein-1“ (EPAS-1) führte. Wiesener et al. konnten 1998 eine weit verbreitete Expression von HIF-2 $\alpha$  in humanen, maligne transformierten Zellkulturlinien und eine sehr ähnliche Regulation zu der von HIF-1 $\alpha$  zeigen (Wiesener et al., 1998).

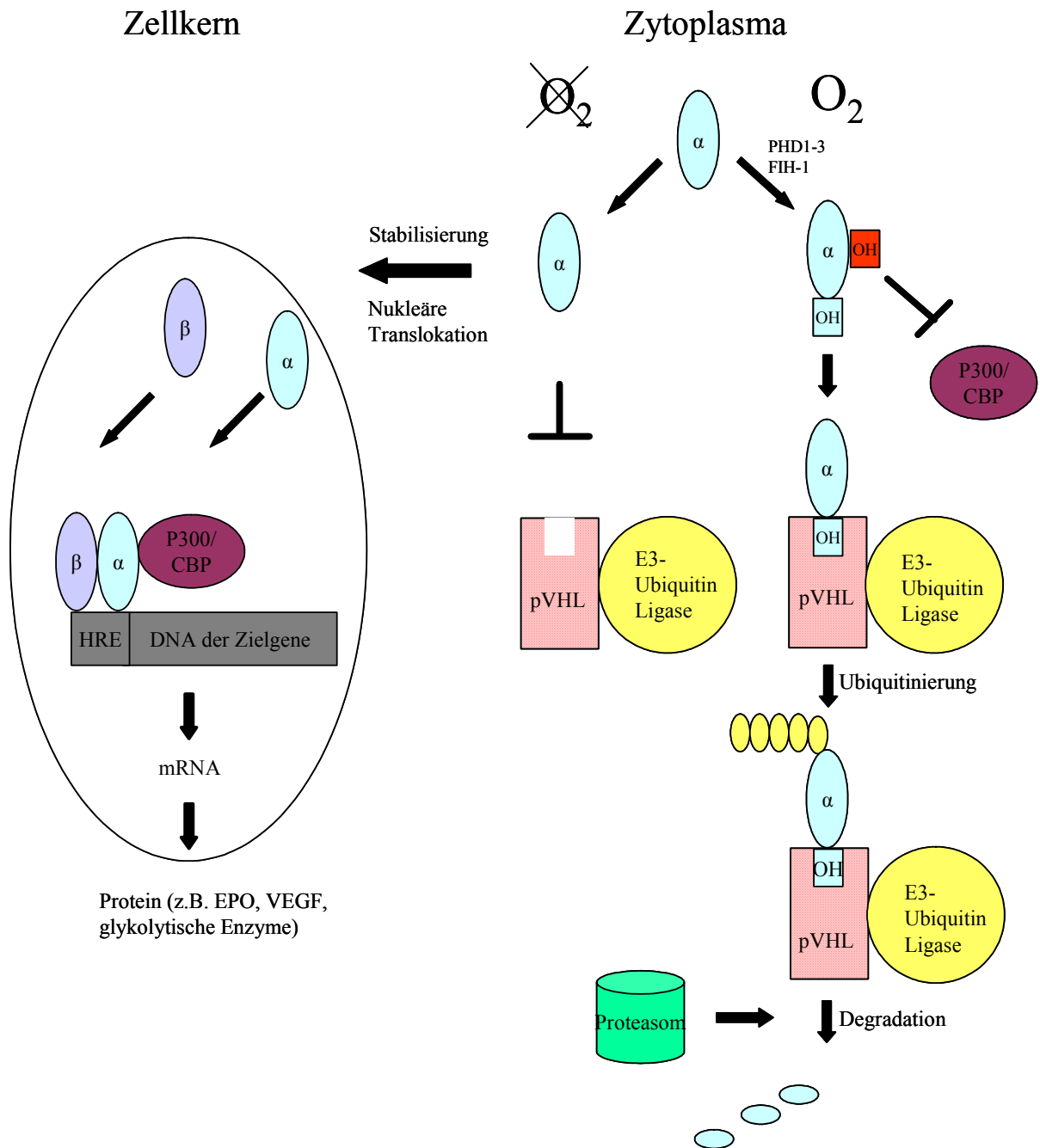
## 1.2 Regulation von HIF

Erkenntnisse zur Regulation der HIF $\alpha$ -Untereinheit von HIF-1 und HIF-2 wurden durch *in vitro* Untersuchungen gewonnen. Es handelt sich dabei hauptsächlich um posttranslationale Modifikationen. Während HIF $\beta$  konstitutiv und abundant präsent ist (Huang et al., 1996), ist die Expression und Aktivität der HIF $\alpha$ -Untereinheit für die Regulation der transkriptionellen Aktivität von HIF entscheidend (Jiang et al., 1996).

Unter normoxischen Bedingungen wird das HIF $\alpha$  Protein schnell degradiert. Zunächst kommt es zur O<sub>2</sub>-abhängigen enzymatischen Hydroxylierung zweier Prolinreste (Pro402 und Pro564 bei HIF-1 $\alpha$ ) innerhalb einer wichtigen funktionellen Domäne von HIF $\alpha$ , der „oxygen-depending-degradation-domain“ (ODDD). Die Reaktion wird durch verschiedene Isoformen von Prolyl-4-Hydroxylasen katalysiert (Bruick und McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Masson et al., 2001). Durch diese Modifikation kann die Bindung zwischen dem von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL), einem Tumor-Supressor-Genprodukt, und HIF $\alpha$  erfolgen (Maxwell et al., 1999). pVHL ist die Erkennungskomponente einer E3-Ubiquitin-Ligase. Die Interaktion führt zur Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation von HIF $\alpha$  (Cockman et al., 2000; Kallio et al., 1999; Ohh et al., 2000; Tanimoto et al., 2000) (Abb.2).

Darüber hinaus wird auch die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne der HIF $\alpha$ -Untereinheit O<sub>2</sub>-abhängig hydroxyliert. Allerdings handelt es sich hierbei um eine Modifikation von Asparaginresten (Asn803 bei HIF-1 $\alpha$ , Asn851 bei HIF-2 $\alpha$ ) durch den „factor inhibiting HIF-1“ (FIH-1) (Hewitson et al., 2002; Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b; Mahon et al., 2001). Unter normoxischen Bedingungen wird dadurch eine Interaktion mit dem transkriptionellen Kofaktor p300/CBP verhindert und infolgedessen die Transaktivierung von Zielgenen gestört.

Während die Prolylhydroxylierung zu einer Regulation der Stabilität von HIF $\alpha$  führt, ist die Asparagylhydroxylierung für die Regulation der transkriptionellen Aktivität von HIF $\alpha$  verantwortlich (Lando et al., 2002b).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Regulation der HIF $\alpha$ -Untereinheit.

In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff  $O_2$  (Normoxie) werden definierte Prolin- und Asparaginreste der HIF $\alpha$ -Untereinheit durch Prolinhydroxylasen (PHD1-3) und eine Asparagylhydroxylase (FIH-1) hydroxyliert. Die Prolinhydroxylierung befähigt die E3-Ubiquitin-Ligase, deren Erkennungskomponente das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) ist, zur Bindung an HIF $\alpha$ , wodurch nach Ubiquitinierung eine proteasomale Degradation ermöglicht wird. Die Hydroxylierung des Asparagylrestes verhindert die Bindung des transkriptionellen Kofaktors p300/CBP und inhibiert dadurch die Transaktivierung. In Abwesenheit von Sauerstoff (Hypoxie) unterbleibt die Hydroxylierungsreaktion. Die HIF $\alpha$ -Untereinheit wird stabilisiert, akkumuliert und wird in den Zellkern transloziert. HIF $\alpha$  dimerisiert mit HIF $\beta$  und bindet anschließend unter Mitwirkung des transkriptionellen Kofaktors p300/CBP an das HRE der Zielgene.

Isolierte Zellen mit fehlendem pVHL weisen aufgrund der dadurch eingeschränkten HIF $\alpha$ -Degradation (Maxwell et al., 1999) eine stabil hohe Expression verschiedener Hypoxie-induzierbarer Gene unabhängig von der perizellulären O<sub>2</sub>-Konzentration auf (Gnarra et al., 1996; Iliopoulos et al., 1996). *In vivo* zeigen die Tumoren des von-Hippel-Lindau-Syndroms, bei denen die pVHL-Funktion fehlt, eine verstärkte Vaskularisierung (z.B.: retinale Angiome, cerebelläre und spinale Hämangioblastome). Als Ursache hierfür wird die gesteigerte Expression des HIF-Zielgens VEGF und anderer angiopoietischer Gene angenommen (Kaelin, 2003).

Obwohl die Regulation von HIF $\alpha$  im wesentlichen durch die O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit erfolgt, wird diskutiert, ob andere Faktoren wie z.B. Glukose (Brusselmans et al., 2001), NO (Sandau et al., 2001), Insulin und „Insulin-like-growth-factor“ (IGF1, IGF2) (Feldser et al., 1999; Zelzer et al., 1998) die HIF-Expression und –Funktion modulieren können.

### 1.3 HIF-1 und HIF-2 *in vivo*

Für das Verständnis der funktionellen Bedeutung des HIF-Systems sind neben den bisher gewonnenen Erkenntnissen zur HIF-Regulation *in vitro* auch Studien zur Expression *in vivo* notwendig.

Untersuchungen von HIF-1 $\alpha$  an Gehirnen von Ratten konnten erstmalig zeigen, dass es bei Tieren, die Ischämie oder Hypoxie ausgesetzt wurden, zu einer Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins kam (Bergeron et al., 1999). Diese Daten konnten auch für andere Organe (Niere, Herz, Leber, Milz, Skelettmuskel, nicht aber für die Lunge) bestätigt werden (Stroka et al., 2001). Dabei wurde eine HIF-1 $\alpha$ -Expression schon unter Standardbedingungen festgestellt, was für eine physiologische Rolle von HIF-1 in der Gewebshomöostase sprechen könnte. Zum anderen konnte eine deutliche Induktion von HIF-1 unter hypoxischen Bedingungen und eine selektive Expression in charakteristischen Zellen nachgewiesen werden. Bei Tieren, die chronischer Hypoxie über 3 Wochen hinweg ausgesetzt waren, kam es nach einer zunächst verstärkten Expression von HIF-1 $\alpha$  mit einem Maximum zwischen 6 Stunden (h) und 4 Tagen, zu einer stetigen Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Konzentration, die nach 21 Tagen den Ausgangspunkt wieder erreicht hatte. Die Autoren spekulierten, dass es sich um eine Kompensation der Gewebshypoxie durch zerebrale Gefäßumgestaltung und metabolische Anpassungen handeln könnte (Chavez et al., 2000).

Nach der Präkonditionierung von neonatalen Ratten mittels Hypoxie bzw. einer Behandlung mit Desferrioxamin (DFO) oder Kobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>), beides Induktoren von HIF-1 $\alpha$ , zeigte

sich eine schnellere Adaptation an die nachfolgende zerebrale Ischämie (Bergeron et al., 2000). Diese erhöhte Ischämietoleranz wurde als eine Folge der Stabilisierung von HIF und der Aktivierung seiner Zielgene durch die Präkonditionierung gewertet.

Systematische Untersuchungen zur Expression von HIF-2 $\alpha$  in gesunden Organen liegen bisher nicht vor. HIF-2 $\alpha$  wurde als Vermittler der Wachstumsförderung solider Tumoren diskutiert (Krieg et al., 2000; Talks et al., 2000), da eine positive Korrelation zwischen der Tumorprogression und -vaskularisierung gezeigt werden konnte (Leek et al., 2002; Onita et al., 2002). Giatromanolaki et al. beschrieben 2001 HIF-2 $\alpha$  als einen unabhängigen prognostischen Indikator, wobei die Prognose bei einer hohen HIF-2 $\alpha$ -Tumorexpression unabhängig vom Grad der Vaskularisierung schlecht war. Eine solche Korrelation konnte für HIF-1 $\alpha$  in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (Giatromanolaki et al., 2001). Makrophagen scheinen eine ausgeprägte Fähigkeit zur HIF-2 $\alpha$ -Expression sowohl in Tumoren (Leek et al., 2002; Onita et al., 2002; Talks et al., 2000) als auch in gesundem Knochenmark (Talks et al., 2000) zu haben. Dies könnte zusätzlich zu einer verstärkten Angiogenese beitragen, da Tumor-assoziierte Makrophagen eine Tendenz zur Bildung angiogener Zytokine (z.B.: VEGF, Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) haben. Insgesamt ist die Expression von HIF-2 $\alpha$  in Tumoren nicht auf vaskuläre Zellen beschränkt, sondern schließt auch Tumor-Parenchymzellen und Gewebemakrophagen ein (Krieg et al., 2000; Leek et al., 2002; Onita et al., 2002; Talks et al., 2000).

Kürzlich untersuchten Rosenberger et al. die Expression und Regulation sowohl von HIF-1 $\alpha$  als auch von HIF-2 $\alpha$  in der Niere von Ratten, wo der Sauerstoffgradient besonders steil verläuft. Unter systemischer Hypoxie zeigten beide  $\alpha$ -Untereinheiten ein charakteristisches, aber voneinander verschiedenes Verteilungsmuster der zellulären Expression, was einen wichtigen funktionellen Unterschied beider Untereinheiten andeutet. Während HIF-1 $\alpha$  vorwiegend in tubulären Zellen durch Hypoxie stabilisiert wurde, war eine Induktion von HIF-2 $\alpha$  in peritubulären interstitiellen und endothelialen Zellen erkennbar (Rosenberger et al., 2002).

#### **1.4 HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Knockouts**

Durch das Ausschalten von Komponenten des HIF-Systems (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$ ) bei Mäusen (Knockout-Mäuse) kam es zu komplexen, überwiegend letalen Entwicklungsstörungen – entweder noch während der Gestationszeit oder unmittelbar nach der Geburt. Es zeigte sich dabei jeweils u.a. eine gestörte Entwicklung des Gefäßsystems. Erst

kürzlich gelang es Scortegagna et al. erstmalig, HIF-2 $\alpha$ -Knockout-Mäuse zu generieren, die lebensfähig waren (Scortegagna et al., 2003).

Homozygote HIF-1 $\alpha$ -Knockout-Embryonen (HIF-1 $\alpha^{-/-}$ ) starben nach etwa der Hälfte der Tragzeit und zeigten cerebro- und kardiovaskuläre Malformationen sowie offene Neuralrohrdefekte (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998). Heterozygote Mäuse (HIF-1 $\alpha^{+/-}$ ) entwickelten sich normal, besaßen aber geringere physiologische Anpassungsmöglichkeiten auf chronische Hypoxie, wie z.B. eine verzögerte Entwicklung von Polyzythämie, rechtsventrikulärer Hypertrophie, pulmonaler Hypertonie und pulmonalen Gefäßumwandlungen (Shimoda et al., 2001; Yu et al., 1999). Die reduzierte ventilatorische Adaptationsmöglichkeit auf chronische Hypoxie scheint im Zusammenhang mit einem Verlust der Aktivität der Pressorezeptoren in der Karotis zu stehen (Kline et al., 2002).

Knockout-Studien für HIF-2 $\alpha$  ließen erkennen, dass diese Isoform eine entscheidende Bedeutung in der embryonalen Entwicklung, besonders in der Gefäßumwandlung (Peng et al., 2000) und der Regulation der Katecholamin-Homöostase (Tian et al., 1998) besitzt. Bei homozygoter Inaktivierung von HIF-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha^{-/-}$ ) starben die Feten im Laufe der Gestation oder kurz nach der Geburt (Compennolle et al., 2002; Peng et al., 2000; Tian et al., 1998). HIF-2 $\alpha$  scheint v.a. an der Angiogenese beteiligt zu sein und zeigt dabei offenbar eine stärkere Neigung zur Transaktivierung des VEGF-Gens als HIF-1 $\alpha$  (Akeno et al., 2001; Ema et al., 1997; Maemura et al., 1999; Tian et al., 1997; Wiesener et al., 1998; Xia et al., 2001). Scortegagna et al. generierten 2003 erstmals lebensfähige HIF-2 $\alpha^{-/-}$ -Mäuse, die pathologische Organveränderungen wie z.B. kardiale Hypertrophie, Hepatosteatose und Retinopathie aufwiesen. Des weiteren zeigten diese Tiere biochemische Veränderungen (Hypoglykämie und Laktatazidose), sowie eingeschränkte Antwortmöglichkeiten auf erhöhten oxidativen Stress (Scortegagna et al., 2003).

Mäuse mit heterozygoter Inaktivierung von HIF-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha^{+/-}$ ) sind gegen pulmonale Hypertonie und rechtsventrikuläre Hypertrophie geschützt, was eine kritische Rolle für HIF-2 $\alpha$  in Hypoxie-induzierten pulmonalen Gefäßumwandlungen annehmen lassen kann (Brusselmans et al., 2003).

Insgesamt wird deutlich, dass die Funktionen, die beide Isoformen von HIF $\alpha$  in der embryonalen Entwicklung haben, keinesfalls redundant sind, sondern dass beide eine klar definierte Bedeutung haben, was v.a. in der Letalitätsrate der homozygoten Knockout-Mäuse und im unterschiedlichen Phänotyp der Heterozygoten zum Ausdruck kommt.

## 2 Problemstellung

Der Transkriptionsfaktor HIF stellt einen entscheidenden Regulator für die zelluläre Adaptation an Hypoxie dar. Dies lässt vermuten, dass HIF eine wesentliche Rolle u.a. beim Wachstum von Tumoren sowie bei Anämie und Gewebischämie zukommt. Erkenntnisse über die Expression der beiden Isoformen der Familie der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Organen des lebenden Organismus sind potentiell von Bedeutung im Hinblick auf die Entwicklung therapeutischer Möglichkeiten zur Behandlung dieser Erkrankungen.

Es liegen umfassende Daten zur *in vivo* Expression von HIF-1 $\alpha$  vor. Die Untersuchungen zu HIF-2 $\alpha$  konzentrierten sich jedoch bislang auf die Niere und Tumoren.

Nach den bisherigen *in vitro* Erkenntnissen über HIF-2 $\alpha$  muss davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um einen entscheidenden Faktor in der Regulation der Hypoxieadaptation handelt, dessen Funktion nicht zu der von HIF-1 $\alpha$  redundant ist. Die hier vorliegende Arbeit ist eine erste umfassende Darstellung und systematische Analyse der HIF-2 $\alpha$ -Expression in der Ratte mittels Immunoblot und Immunhistochemie. Im Speziellen soll die Frage beantwortet werden, ob die Fähigkeit, HIF-2 $\alpha$  zu stabilisieren, weit gestreut oder auf einzelne Gewebe beschränkt ist und ob die Expression von HIF-2 $\alpha$  auf Stromazellen, insbesondere endotheliale Zellen, begrenzt ist. Ein weiterer Aspekt der Analyse soll den Umfang der mRNA-Expression in verschiedenen Organen und eine eventuelle Korrelation zwischen dieser und der HIF-2 $\alpha$  Proteinkonzentration klären.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Tiere**

Die Arbeit wurde von der Senatsverwaltung für Gesundheit in Berlin unter der Versuchsgenehmigungsnummer 0093/99 bewilligt.

Für die Experimente wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Winkelmann, Borchon) mit einem Gewicht zwischen 200g und 280g (n=3 für jeden Zeitpunkt und jedes Experiment) verwendet.

#### **3.2 Tierexperimente**

Die Versuche wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. J.-S. Jürgensen durchgeführt.

Die Tiere wurden in einer luftdichten Plexiglaskabine mit Zu- und Ableitung den Gasen ausgesetzt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Anreicherung der Atemluft mit Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) zu verhindern, wurden CO<sub>2</sub>-Absorptionskugeln in die Kabine eingebracht, die das abgeatmete CO<sub>2</sub> absorbierten. In anschließend durchgeführten Blutgasanalysen zeigte sich weder eine Hyperkapnie noch eine Azidose. Für die Induktion einer normobaren Hypoxie wurden die Tiere 1-12h einem Gas, welches 8% O<sub>2</sub> bei einem Stickstoffgehalt (N<sub>2</sub>) von 92% enthielt, ausgesetzt. Um eine funktionelle Anämie zu induzieren, wurden die Tiere unter normaler Raumluft, der 0,1% Kohlenmonoxid (CO) beigefügt wurde, für 1-12h gehalten.

#### **3.3 Antikörper**

Für die Arbeiten wurde zum einen ein aus immunisierten Hasen gewonnener Antikörper – ein Fusionsprotein, bestehend aus Gluthation-S-Transferase, fusioniert mit dem HIF-2 $\alpha$ -Maus-Peptid (Aminosäuren 337-439) - verwendet. Diese Region zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem HIF-2 $\alpha$  der Ratte, ist aber von der Aminosäuresequenz für HIF-1 $\alpha$  verschieden. Zwei Antikörper – PM8 und PM9 – standen zur Verfügung. Das für den Immunoblot hergestellte PM9-Serum wurde in affinitätsaufgereinigter Form angewendet.

Zum anderen wurde ein kommerziell erhältlicher Antikörper, ab-199 (NOVUS Biologicals, Littleton, USA), eingesetzt. Die Herstellung dieses Antikörpers erfolgt mittels des Maus-HIF-2 $\alpha$ -Immunogens (Aminosäuren 632-646) und repräsentiert damit eine vom PM9-Antikörper verschiedene Erkennungsregion, was die Spezifität der Resultate, die mit PM9 erreicht wurden, bekräftigt.

### 3.3.1 Antikörpercharakterisierung

Um die Antikörper zu charakterisieren und die individuellen Immunoblots zu standardisieren wurde ein Retikulozytenlysats (TNT<sup>®</sup> T7 Promega, Madison, USA) mit der vollständigen cDNA von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  programmiert (*in vitro* transkribiertes und translatiertes Retikulozytenlysats (IVTT)). Die Ratten-Endothel-Zelllinie RBE4 (zur Verfügung gestellt durch Hugo Marti), die beide HIF $\alpha$ -Isoformen exprimiert, konnte als Positivkontrolle für eine Signalinduktion durch Hypoxie (1% O<sub>2</sub>, 4h) genutzt werden.

### 3.4 Zellkultur und Proteinextraktion kultivierter Zellen

Für die Kultivierung der Ratten-Endothel-Zelllinie RBE4 wurden Kollagen-beschichtete (Collagen Typ1, Sigma Chemical Co.-Aldrich, Deisenhofen, 0,2 mg/ml) Zellkulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden nach dem Auftauen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM (1x) High Glucose, PAA Laboratories, Linz, Österreich) unter Zusatz von 1% L-Glutamin (100x, PAA Laboratories), 1% Penicillin/Streptomycin, 10% fetalem Kälberserum (beides Biochrom KG, Berlin), 300  $\mu$ g/ml G418-Sulfate (CalBioch) und 5 ng/ml „basic Fibroblast growth factor“ (bFGF) (Sigma Chemical Co.) bis zur Konfluenz kultiviert. Das Splitten der Zellen erfolgte mittels Trypsinierung. Nachdem die Zellen zunächst mit Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem „Phosphate buffered saline“ (PBS, 100mM NaCl, 4,5mM KCl, 7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen wurden, erfolgte deren Ablösung durch Trypsinzugabe (0,05%, PAA Laboratories). Die anschließende Inaktivierung der Peptidase Trypsin, notwendig, um die Vitalität der Zellen zu erhalten, erfolgte mit vollständig supplementiertem DMEM-Medium. Die Zellen wurden hypoxisch stimuliert (1% O<sub>2</sub>, 4h) (NuAire<sup>™</sup> IR Autoflow, CO<sub>2</sub>-Water-Jacketed Incubator, Zapf Instruments, Sarstedt) und anschließend erfolgte die Proteinextraktion schnellstmöglich auf Eis, da die Halbwertszeit von HIF $\alpha$  bei etwa 5 Minuten (min) liegt. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen in 10ml PBS vom Boden der Gewebekulturflasche mittels eines Schabers gelöst und anschließend zentrifugiert (4°C, 5min, 3000 U/min). Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann in Extraktionspuffer (7M Urea, 10% Glycerol, 10mM Tris-HCL (pH 6,8), 1% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), 5mM Dithiothreitol (DTT), 0,5mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) mit je 1mg/l Aprotinin, Pepstatin, und Leupeptin; alle Chemikalien von Sigma Chemical Co.) elektrisch homogenisiert (IKA Ultra-Turrax T8 Homogenisator, Janke & Kunkel, Staufen).

### **3.5 Protein-Nachweis von HIF-2 $\alpha$ im Immunoblot und in der Immunhistochemie**

#### **3.5.1 Proteinextraktion**

Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation wurden die Organe entnommen und schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff asserviert. Das Darmlumen wurde mit eiskaltem PBS durchspült, gelehrt und sektioniert. Das Duodenum konnte schnellstmöglich und verlässlich eingefroren werden. Für die Protein- und RNA-Extraktion des Gehirns wurde der Kortex genutzt.

Alle Schritte der Extraktion erfolgten auf Eis und mit gekühlten Puffern, um eine Degradation der Proteine zu minimieren.

Die fraktionierten und abgewogenen Gewebstücke (ca. 0,05g) wurden in 25-facher Volumenmenge Extraktionspuffer homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei zunächst 4°C, 4min, 3000 U/min (Eppendorf Zentrifuge 5403) und dann nochmals bei 4°C, 30min, 13000 U/min. (Biofuge fresco, Heraeus Instruments), wobei jeweils der Überstand abgenommen wurde.

#### **3.5.2 Proteinquantifizierung**

Die Quantifizierung der Extrakte erfolgte mit Hilfe des BioRad DC Protein Assay (Bio-Rad, München) nach Anweisungen des Herstellers. Die Absorption wurde photometrisch bei 630nm gemessen. Anschließend wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **3.5.3 Immunoblotanalyse**

Für jede Probe wurden 50 $\mu$ g des Gesamtproteins eingesetzt. Nach Denaturierung der Proteinextrakte (70°C, 10min) erfolgte deren Auftrennung in einem SDS/6% Polyacrylamidgel in Elektrophoresepuffer (25mM Tris-Base, 200mM Glycin, 0,1% SDS) bei 12mA pro Gel über ca. 2,5h. Um die Position der Banden dem Molekulargewicht des Proteins (HIF-2 $\alpha$ : ca. 110 kDa) zuordnen zu können, wurde ein Proteinmarker (Rainbow<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mitgeführt. Über Nacht wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon P Membran, Millipore, Bedford, USA) in Puffer (10mmol L-Tris, 100mmol L-Glycin, 10% Methanol (Merck, Darmstadt), 0,05% SDS) bei 20 Volt transferiert.

Die Membranen wurden anschließend mit PBS, 5% fettarmer Trockenmilch, 0,1% Tween20

(Sigma Chemical Co.) für 2h geblockt, um unspezifische Bindungen zu minimieren.

HIF-2 $\alpha$  konnte durch Nutzung des aufgereinigten Antikörpers PM9 (Konzentration 1:500) oder des kommerziellen Antikörpers ab-199 (1:1000, NOVUS Biologicals) und anschließender Inkubation mit dem „horseradish-peroxidase“- (HRP)-konjugierten Schwein-anti-Hase-Immunglobulin (1:2000, DAKO, Ely, GB) nachgewiesen werden. Zwischen den Inkubationen wurden die Membranen 5-mal in Puffer (PBS, 0,1 % Tween20) für jeweils etwa 5min gewaschen. Es folgte die Chemiluminiszenz (Super-Signal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce, Rockfort, USA) zur Signaldetektion. Für die Filmentwicklung wurde der Kodak X-OMAT<sup>TM</sup>-Film verwendet. Abschließend wurden die Membranen mit Coomassie-Blau (Sigma Chemical Co.) gefärbt, um eine äquivalente Proteinbeladung und regelrechten -transfer zu prüfen. Die Menge von HIF-2 $\alpha$  wurde semiquantitativ im Vergleich zu den hypoxischen RBE4-Extrakten bzw. zu den IVTT bestimmt.

#### **3.5.4 Immunhistochemie**

Die Durchführung der Immunhistochemie erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Dr. C. Rosenberger.

Die Immunhistochemie dient der Darstellung von Zell- und Gewebespezifischen Antigenen (Proteinen) durch *in situ* Markierung und Visualisierung dieser mit Hilfe von Antikörpern.

Um die schnelle und präzise Fixierung sicherzustellen, wurden die Organe *in situ* perfusionsfixiert. Die Tiere wurden schnellstmöglich aus der Inkubationskammer entfernt und mit intraperitoneal injiziertem Pentobarbital (Sanofi, Hannover) in einer Dosis von 0,05 g/kg Körpergewicht anästhetisiert. Nach medianer Laparotomie wurde ein Polyethylenschlauch in die infrarenale Aorta eingeführt und die untere Vena cava eingeschnitten. Die Perfusion wurde mit 330 mosmol/l Saccharose in PBS für 10 Sekunden bei einem konstanten Druck von 240mmHg, gefolgt von frisch hergestelltem 3%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS (pH 7,4) bei 240mmHg für 1,5min und 100mmHg für 3,5min und dann erneut mit Saccharose-PBS für die Beendigung der Fixation, durchgeführt. Danach wurden die Organe in 330 mosmol/l Saccharose in PBS mit 0,02% Natriumazid überführt und 1-3 Tage später in Paraffin eingebettet. Die Proben wurden mit dem Mikrotom in 4 $\mu$ m dicke Schnitte geteilt, auf Objektträger aufgebracht, entwacht, in einer Reihe von Ethanol-Waschschritten rehydriert und vor der Bearbeitung in destilliertes Wasser eingebracht. Die Objektträger wurden zur verbesserten Anheftung der Schnitte mit 3-aminopropyl-tri-ethoxysilan beschichtet. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 90 Sekunden in einer „target-retrieval-solution“ (TRST-Lösung, CSA-DAKO, Hamburg) im Überdrucktopf gekocht. Im folgenden

wurden die Schnitte zur Absättigung des gewebeeigenen Biotins und der Peroxidase mit Avidin, Biotin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für jeweils 20min vorbehandelt. Die danach aufgebrauchten Antikörperseren von PM8 und PM9 zur Identifikation von HIF-2 $\alpha$  wurden beide in einer Konzentration von 1:10000 (1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C) verwendet. Nach anschließendem sorgfältigen Waschen in TBST-Puffer (50mM Tris-HCL, 300mM NaCl, 0,1% Tween20, pH 7,6), folgte die Inkubation mit einem biotinylierten sekundären anti-Hase-Antikörper (15min, Raumtemperatur). Im folgenden wurde ein Amplifikationssystem (CSA-DAKO), basierend auf einer Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Reaktion verwendet. Unter Zugabe von Diaminbenzidin (DAB) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte die Entwicklung, welche im Mikroskop verfolgt werden konnte bis zwar das in den Kernen enthaltene HIF, nicht jedoch der Hintergrund gefärbt waren, wobei die Proben immer parallel zu ihren normoxischen Kontrollen behandelt wurden. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Spülung in destilliertem Wasser gestoppt.

Alle Inkubationen fanden in einer befeuchteten Kammer statt. Zwischen den Inkubationen wurden die Schnitte 2-4mal in TBST-Puffer gewaschen. Die Proben der hypoxischen Tiere wurden prinzipiell mit Proben normoxischer Tiere als Kontrolle verglichen. Andere Kontrollreaktionen wie z.B. das Auslassen des ersten Antikörpers und die Nutzung der präimmunisierten Seren der immunisierten Hasen, produzierten kein Signal bei vergleichbaren Inkubationszeiten. Schließlich wurden die Schnitte mit Richardson's Lösung gegengefärbt und die Signale konnten mit Interferenzkontrast (Leica DMRB Mikroskop, Bensheim) analysiert und digital aufgezeichnet werden (Visitron, Puchheim, Deutschland, Metavue<sup>®</sup>). Die Identifikation der neuronalen Zellen wurde mittels eines speziellen Maus-anti-Neuronaler-Kern-Antikörper (NeuN, Chemicon, Hofheim) in einer Konzentration von 1:200 durchgeführt. Die Astrozytenfärbung erfolgte mittels des anti-„glial fibrillary acidic protein“-Antikörpers (GFAP, CSA-DAKO) in einer Konzentration von 1:500.

### **3.6 RNA Analyse von HIF-2 $\alpha$ und HIF-induzierbarer Gene im RNase Protection Assay**

#### **3.6.1 Extraktion der RNA**

Die RNA-Extraktion des gefrorenen Gewebes erfolgte mit RNAzol B (Biogenesis, Poole, GB) nach Anweisung des Herstellers. Nach Zerkleinerung und Abwiegen wurden die Gewebstücke in einem 10fachen Volumenanteil RNAzol B aufgenommen und für 30 Sekunden elektrisch homogenisiert (IKA Ultra-Turrax T8, Staufen). Anschließend wurde ein

Zehntel Volumenanteil Chloroform hinzugegeben und gründlich vermischt. Nach 5min Inkubation auf Eis wurden die Proben für weitere 15min bei 4°C und 13000 U/min zentrifugiert, im Anschluss die obere wässrige Schicht mit der gelösten RNA abgenommen und die äquivalente Menge Isopropanol für die Präzipitation zugefügt. Nach gründlichem Mischen verblieben die Proben für mindestens 1h bei 4°C, um die Nukleinsäuren zu fällen. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 15min, 13000 U/min) wurde der Überstand abgenommen und verworfen, das Pellet nochmals mit 70% Ethanol unter Zentrifugation gewaschen. Das weitgehend trockene RNA-Pellet wurde, je nach Größe, in 50µl bis 100µl Hybridisationspuffer (80% Formamid, 40mM Pipes pH 6,4, 400mM Natriumchlorid und 1mM EDTA) aufgenommen und über 10min bei 95°C erhitzt, um in Lösung gebracht zu werden.

### **3.6.2 Quantifizierung der RNA-Extrakte**

Zur Bestimmung der Konzentration des RNA-Gehaltes wurde die RNA 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und der Gehalt photometrisch bestimmt. Die Absorption wurde bei 260nm und 280nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Der Quotient  $A_{260}:A_{280}$  dient zur Beurteilung möglicher Proteinkontamination der extrahierten RNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die RNA-Konzentration wurde anhand der Absorption bei 260nm bestimmt.

### **3.6.3 Herstellung der radioaktiven Sonden**

Die eine definierte Sequenz der Gene HIF-2 $\alpha$ , GLUT1, EPO und U6 „small nuclear“ RNA (U6sn) tragenden Plasmide für die Versuche lagen dem nephrologischen Forschungslabor vor. Anhand dieser kann ein „antisense“-Strang definierter Genabschnitte komplementär zur mRNA dieser Gene hergestellt werden. Die integrierten Genabschnitte der verschiedenen Gene haben unterschiedliche Längen von 298 Basenpaaren für HIF-2 $\alpha$  (Accession Nr.: AJ277828, geschütztes Fragment Nukleotid: 1654-1951), 136 Basenpaare für GLUT1 (Accession Nr.: K03195, geschütztes Fragment Nukleotid: 1063-1198), 151 Basenpaare für EPO (Accession Nr.: X02157, geschütztes Fragment Nukleotid: 358-508) und 107 Basenpaare für die U6sn (Accession Nr.: X01366, geschütztes Fragment Nukleotid: 1-107). Letztere ist ein in der Evolution konserviertes Haushaltsgen und diente als interne Kontrolle jeder einzelnen Probe.

Für die radioaktive Markierung der Gensonden wurden der Transkriptionsansatz in einem finalen Volumen von 20µl (1x Transkriptionspuffer, 10mM DTT, je 0,5M CTP, ATP und

UTP, 20 Einheiten Human Placenta RNase Inhibitor (alle Roche, Mannheim), 4µl P<sup>32</sup>-GTP (Amersham Pharmacia Biotech), 1µg des als Matritze dienenden Plasmids und entweder 20 Einheiten SP6- oder, für die U6sn, T7 Polymerase (Boehringer, Ingelheim) zur Generierung von RNA-Strängen für 90min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Um danach die DNA zu eliminieren, wurden 20 Einheiten DNase I (Roche) dazugegeben und für weitere 30min inkubiert. Diese Reaktion wurde dann durch Zugabe eines 4-fachen Volumens an Säulenpuffer (100µM TRIS pH 7,5, 50nM EDTA, 0,0005% SDS) zum Stillstand gebracht und das Gemisch zur Aufreinigung durch G-50 Sephadex Säulen (Roche) filtriert, um nicht inkorporierte Nukleotide zu entfernen.

Aus dem durch die Säule aufgereinigten Volumen wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe einer 2,5-fachen Menge absoluten Ethanol und 1/10 Volumenanteil 3M Natriumazetat pH 5,5, Gefrieren auf Trockeneis und nach Auftauen bei -20°C und anschließender Zentrifugation (4°C, 15min, 15000 U/min) gefällt. Die Präzipitate wurden dann in Hybridisationspuffer (80% Formamid, 40mM Pipes pH 6,4, 400mM NaCl und 1mM EDTA) aufgenommen und durch zehnmütiges Erhitzen auf 95°C und wiederholtes Vermischen in Lösung gebracht. Nach Abkühlung wurde die Radioaktivität der Sonden in einem Szintillationszähler (Wallac, Boston, USA) gemessen.

#### **3.6.4 RNase Protection Assay**

Zunächst findet bei diesem Verfahren die Hybridisierung der RNA-Extrakte mit den radioaktiven Sonden statt. Für die Hybridisierung mit der HIF-2α- und GLUT1-Sonde wurden 30µg totale RNA eingesetzt, für EPO 50µg. Die RNA-Menge der zu untersuchenden Zielgene wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 50µl mit Hybridisationspuffer vermengt und anschließend aus diesem Ansatz als interne Kontrolle 1µg RNA für die Hybridisierung mit der U6sn-Sonde entnommen, die wiederum in Hybridisationspuffer aufgenommen wurde. Zur Kontrolle des RNase-Verdaus wurde für jede radioaktiv markierte RNA-Sonde ein Ansatz ohne RNA mitgeführt und im weiteren Verfahren identisch mit den anderen Proben behandelt.

Anschließend wurde die Sonde in einem mindestens 20-fachen Überschuss hinzugegeben. Damit war gewährleistet, dass alle zu detektierenden Genabschnitte von den Sonden gebunden werden können.

Um die RNA vollständig zu denaturieren, wurde der Hybridisationsansatz für 15min bei 95°C erhitzt. Nun folgte die Inkubation im Wasserbad für 16h bei 60°C für HIF-2α, 58°C für die Zielgene und 55°C für die U6sn RNA. Die verschiedenen Temperaturoptima ergeben sich aus

der unterschiedlichen Länge und dem differierenden Guanin(G)/Cytosin(C)-Gehalt der Sonden. Anschließend war davon auszugehen, dass die Mehrzahl der zu analysierenden Genabschnitte an die markierten Sonden gebunden als RNA-Doppelstrang vorlag. Um überschüssige Sonde sowie restliche einzelsträngige mRNA zu verdauen, wurde RNase A (40µg/ml) und T1 (2µg/ml) (Roche) in 350µl RNase-Puffer (10mM Tris-Cl pH 7,5, 5mM EDTA, 300mM NaCl) hinzugegeben, vermischt und für 30min bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde jeder Probe 50µg Proteinase K (Ansatz in 50µl RNase-Puffer / 1% SDS) (Sigma Chemical Co.) für die Inaktivierung der Proteine zugegeben und für weitere 30min bei 37°C inkubiert.

Ein Zehntel des Kontrollansatzes wurde aus der Probe mit der U6sn RNA entnommen und zu dem äquivalenten Ansatz des Zielgens gegeben, was der internen Kontrolle diente.

Die anschließende Aufreinigung erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion, das in zu dem Ansatz äquivalenten Mengen hinzugegeben wurde. Nach dem Mischen und Zentrifugieren (4°C, 15min, 13000 U/min) bildeten sich 3 Phasen aus. Unten die organische Phase mit Phenol/Chloroform; in der Interphase befanden sich eventuell verbliebene Proteine und in der wässrigen Phase die RNA. Diese wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen (Eppendorf, Hamburg) überführt. Im Anschluss daran wurde die RNA durch Zugabe eines 2,5-fachen Volumenanteils von absolutem Ethanol und 40µg tRNA (Roche) und Gefrieren auf Trockeneis gefällt. Die Proben wurden dann bei -20°C aufgetaut und die RNA durch Zentrifugieren (4°C, 15min, 13000 U/min) pelletiert. Jedes Pellet wurde in 5µl gefärbtem Ladepuffer (80% Formamid, 1x TBE, <0,1% Bromphenolblau und <0,1% Xylene Cyanol) aufgenommen, auf 95°C erhitzt und zwischenzeitlich vermischt, damit sich die RNA löste und als Einzelstrang vorlag. Anschließend wurde das 8%ige Polyacrylamidgel (Kit der Firma Sequagel, National Diagnostics Inc. Hessele Hull, GB) beladen. In die erste Bahn wurde ein radioaktiver Marker (pBR322 DNA-Mspl Digest, New England Biolabs, Frankfurt) gegeben, um später die Position der Banden zuordnen zu können. In die letzte Bahn wurde die Negativkontrolle (ohne RNA) gegeben, was der Überprüfung der einzelnen Schritte, wie z.B. dem RNase-Verdau diente. Die Elektrophorese erfolgte bei 55 Watt über ca. 2h.

Danach wurde das Gel auf ein Filterpapier aufgetragen und über 2h bei 80°C im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde über Nacht bei -80°C auf einem Röntgenfilm (Kodak X-OMT™) exponiert, auf dem die Signale als geschwärzten Banden detektiert werden konnten.

### **3.6.5 Auswertung der Signale im RNase Protection Assay**

Eine genaue Quantifizierung der Signalbanden erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fujix, BAS 2000, Fuji, Japan).

Die radioaktiven Signale stellen sich als unterschiedlich intense Banden dar. Die Banden wurden nach Signalintensität mit Hilfe des Programms TINA 2.0 (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet und das Signal von der Hintergrundaktivität abgezogen. Dasselbe geschah mit den Banden der kürzeren U6sn RNA jeder Bahn. Im Folgenden wurde der Quotient aus der Radioaktivitätsmenge der Probe und der jeweiligen Kontrolle gebildet um etwaige Fehlerquellen wie unsauberes Pipettieren oder ungenaue Beladung des Gels bei der quantitativen Auswertung der Banden ausschließen zu können. Nun wurde die Ratio der Signale zweier zu vergleichender Proben untereinander gebildet und die Steigerung der Signalaktivität als x-fache Induktion angegeben.

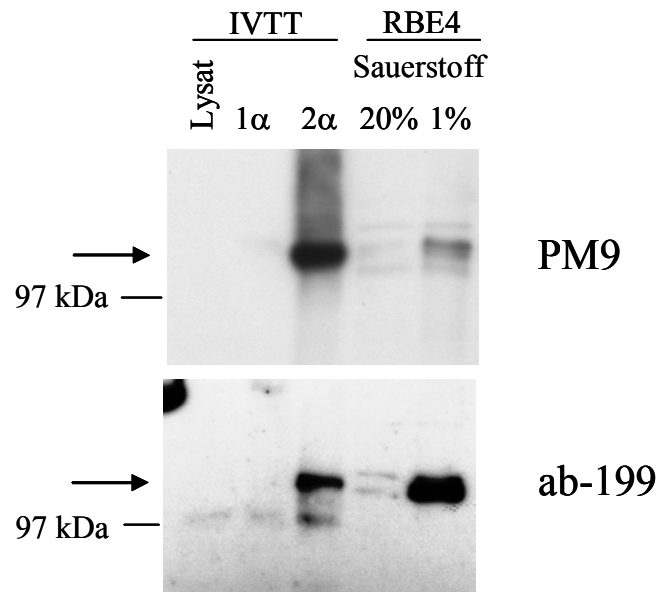
## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der HIF-2 $\alpha$ -Isoform der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Organen von Ratten unter Standardbedingungen und zwei verschiedenen Stimuli untersucht. An die Untersuchung der Proteininduktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Immunoblot schloss sich die Analyse der zellulären Lokalisation der HIF-2 $\alpha$ -Induktion durch die Immunhistochemie an. Um eine Regulation der HIF-2 $\alpha$ -Induktion auf RNA-Ebene beurteilen zu können, wurden außerdem RNase Protection Assays durchgeführt.

### 4.1 Antikörpercharakterisierung

Die mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Antikörpers gegen HIF-2 $\alpha$  (ab-199, NOVUS) erzielten Ergebnisse im Immunoblot waren zufriedenstellend. Jedoch zeigte die Immunhistochemie damit kein interpretierbares Ergebnis. Aus diesem Grund wurden die systematischen Untersuchungen mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen HIF-2 $\alpha$ , PM9, durchgeführt. Dieser Antikörper wurde zu einem frühern Zeitpunkt aus der Immunisierung von Hasen gewonnen und stand dem nephrologischen Forschungslabor zur Verfügung.

Um die Antikörper zu charakterisieren, wurden *in vitro* transkribierte und translatierte Retikulozytenlysate (IVTT), die mit Maus-HIF-1 $\alpha$  oder -HIF-2 $\alpha$  programmiert waren, sowie Zellextrakte von Ratten-Hirn-Endothelzellen (RBE4), welche normoxischen (21% O<sub>2</sub>, 4h) oder hypoxischen (1% O<sub>2</sub>, 4h) Bedingungen ausgesetzt waren, im Immunoblot miteinander verglichen. Das Ergebnis dieser Gegenüberstellung zeigt die Abb. 3 für die Antikörper PM9 und ab-199. Beide Antikörper erkannten Maus- und Ratten-HIF-2 $\alpha$  bei einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa, ohne dass eine Kreuzreaktion mit HIF-1 $\alpha$  erkennbar war. Die Zellextrakte zeigten einen Signalanstieg nach Inkubation mit 1% O<sub>2</sub>.



**Abb. 3:** Charakterisierung der Antikörper.

Immunoblots für HIF-2 $\alpha$  mit zwei unabhängigen Antikörpern - PM9 (oberer Abbildungsteil) und ab-199 (unterer Abbildungsteil). *In vitro* transkribiertes und translatiertes Retikulozytenlysats (IVTT), programmiert mit vollständiger cDNA von Maus-HIF-1 $\alpha$ , Maus-HIF-2 $\alpha$  oder unprogrammiertes Lysat, wurde zur Bestimmung der Spezifität der Antikörper genutzt. 2  $\mu$ l des entsprechenden Lysats wurden geladen. Die Ratten-Hirn-Endothelzellen (RBE4) wurden entweder in Normoxie (21% O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) für 4h kultiviert. Die Pfeile zeigen die Position des HIF-2 $\alpha$ -Proteins bei ca. 110 kDa an. Beide Antikörper detektieren sowohl Maus- als auch Ratten-HIF-2 $\alpha$  ohne Kreuzreaktion mit HIF-1 $\alpha$ . Die Position der Molekulargewichtsmarker ist entsprechend gekennzeichnet (97 kDa). 4-stündige Hypoxie führt zu einer sichtbaren Induktion von HIF-2 $\alpha$  in RBE4-Zellen.

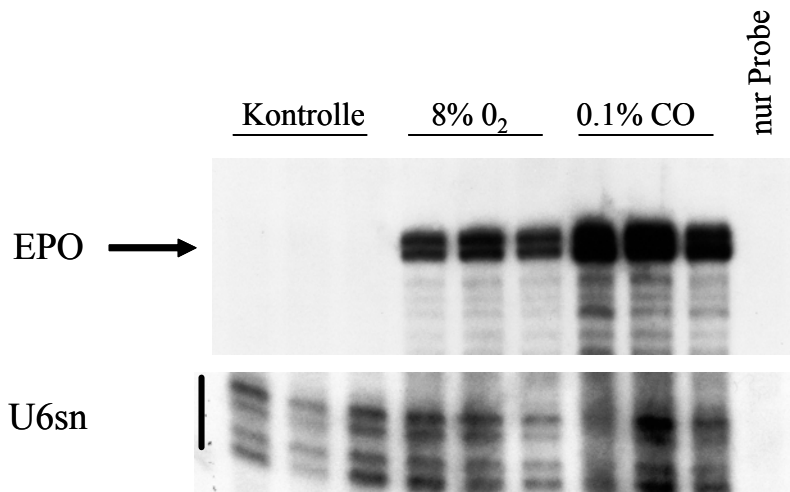
## 4.2 Hypoxische Induktion von HIF-2 $\alpha$ in Ratten

Die Induktion von Erythropoietin, EPO, eines der bisher am umfassendsten untersuchten HIF-abhängigen Zielgene, konnte durch Exposition der Tiere gegenüber normobarer Hypoxie (8% O<sub>2</sub>) oder gegenüber Kohlenmonoxid (0,1% CO) reproduziert werden (Eckardt et al., 1992). Wurde CO in einer Konzentration von 0,1% eingesetzt, so konnten nach 2-3h ca. 50% der Sauerstofftransportkapazität des Hämoglobins durch die um ein Vielfaches höhere Affinität des CO zum Hämoglobin blockiert werden. Folge dessen war eine starke Abnahme der O<sub>2</sub>-Transportkapazität mit Gewebshypoxie. Die aus der arteriellen Blutgasanalyse gewonnenen Daten, sind in Tab. 1 aufgeführt.

**Tab. 1:** Exemplarische Bestimmung der CO-Hb-Werte von Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten der Stimulation mit Kohlenmonoxid (1-4h) mittels Blutgasanalyse. Es wurde ein repräsentativer Mittelwert aus der CO-Hb-Bestimmung ausgewählt, der die Größenordnung der Werte verdeutlichen soll.

Zeit (in h)	CO-Hb- Wert (in %)
1	30,2
2	45,6
3	58
4	61,2

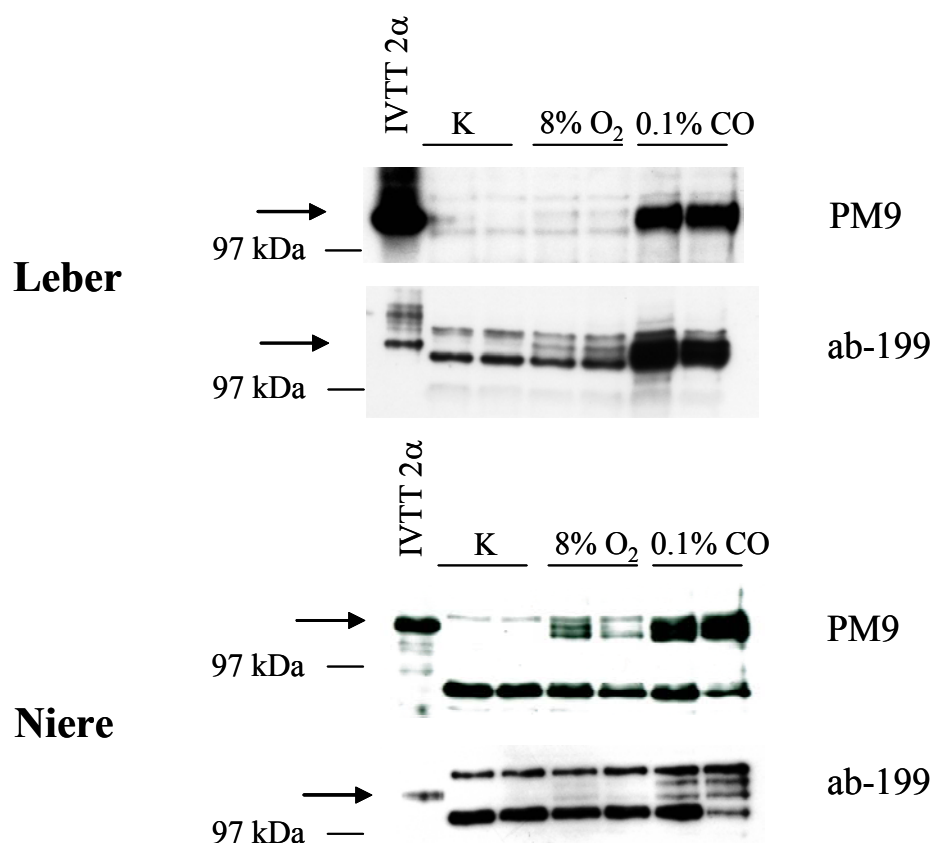
Dieses verlässliche Protokoll für die Induktion von Gewebshypoxie *in vivo* wurde auch für die in dieser Arbeit zu analysierende Fragestellung genutzt, da die Induktion von EPO auf eine HIF-Aktivierung schließen lässt. Wie erwartet, führten beide Bedingungen zu einem deutlichen Anstieg der EPO-mRNA in Nierenextrakten nach 6-stündiger Exposition, wobei sich allerdings CO als der stärkere und konsistentere Stimulus erwies (Abb. 4).



**Abb. 4:** EPO Induktion *in vivo*

RNAse Protection Assay von Nierenextrakten, analysiert für EPO-mRNA. Drei unabhängige Tiere wurden für jede der folgenden Bedingungen analysiert: Kontrolle, normobare Hypoxie (8% O<sub>2</sub>), funktionelle Anämie durch Kohlenmonoxid (0,1% CO). Die U6 „small nuclear“ RNA (U6sn) wurde als interne Kontrolle genutzt. „Nur Probe“ zeigt die Bahn, in der allein die radioaktiv markierte Sonde verarbeitet und geladen wurde, um eine Kontrolle für den vollständigen RNAse-Verdau zu haben.

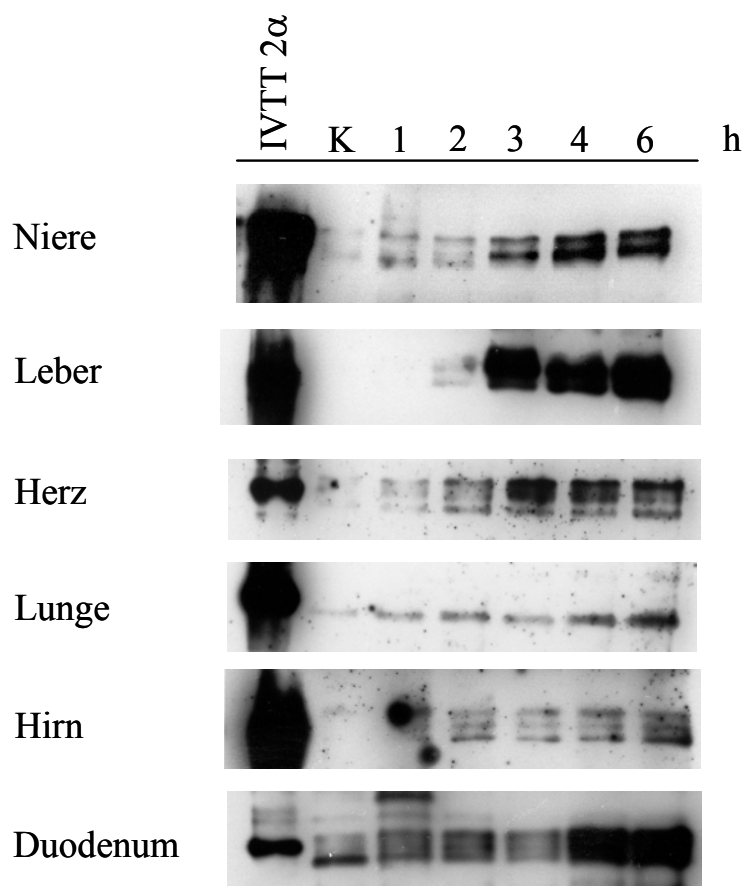
Leber- und Nieren-Proteinextrakte, die vom selben Tier gewonnen wurden, zeigten im Immunoblot eine kaum messbare Expression von HIF-2 $\alpha$  unter Standardbedingungen. Die Exposition der Tiere gegenüber 8% O<sub>2</sub> führte zu einem moderaten und variierenden Anstieg der HIF-2 $\alpha$ -Konzentration. Die Intensität des Signals schien vom Zeitintervall zwischen der Entfernung der Tiere aus der hypoxischen Kammer und dem Einfrieren der Gewebe in flüssigem Stickstoff abhängig zu sein, was möglicherweise einen Hinweis auf den Beginn der Degradation von HIF durch Reoxygenierung gibt. Im Gegensatz dazu führte die CO-Exposition zu einer deutlichen Induktion von HIF-2 $\alpha$ , die nur wenige Variationen zwischen den einzelnen Experimenten aufwies (Abb. 5). Durch die, verglichen mit Sauerstoff, um ein vielfaches gesteigerte Affinität des CO zum Hämoglobin, bleibt die hypoxische Stimulation mittels CO vermutlich für einige Zeit bestehen wenn die Tiere in Raumluft zurückkehren. Aufgrund dieser stabileren Bedingungen wurde daher für die weitere Analyse der HIF-2 $\alpha$ -Expression als Stimulus generell CO verwandt.



**Abb. 5:** HIF-2 $\alpha$  Induktion *in vivo*

Immunoblots an Gewebsextrakten für HIF-2 $\alpha$  mit zwei unabhängigen Antikörpern, PM9 und ab-199. Nutzung von 50  $\mu$ g des Gewebsextraktes von Niere und Leber. Jeweils 2 unabhängige Tiere wurden 8% O<sub>2</sub>, 0,1% CO oder Umgebungsluft (Kontrolle (K)) für 6h ausgesetzt. Als Standard dienten 2 $\mu$ l des IVTT-2 $\alpha$ , der auf jedes Gel zum besseren Vergleich der Proteinmengen aufgetragen wurde. Die Position des Molekulargewichtsmarkers bei 97 kDa ist eingezeichnet. Die Pfeile markieren die Position von HIF-2 $\alpha$  bei ungefähr 110 kDa.

Da es beim Immunoblotting der Gewebsextrakte mit dem Antikörper ab-199 zur Ausbildung kreuzreaktiver Banden kam, welche die Bande des spezifischen Signals einrahmten, wurden die Immunoblots generell mit dem Antikörper PM9 durchgeführt, wobei ab-199 weiterhin zur Bestätigung der Daten diente. Ähnlich wie zuvor bereits für Leber und Niere dargestellt, zeigten auch die Proteinextrakte von Hirn, Herz, Lunge und Duodenum nur eine geringe oder nicht nachweisbare HIF-2 $\alpha$ -Expression unter Standardbedingungen. Eine CO-Exposition über verschiedene Zeiträume (1-6h) ließ eine zeitabhängige Induktion von HIF-2 $\alpha$  in allen betrachteten Organen mit Ausnahme der Lunge (Abb. 6), wo die HIF-2 $\alpha$  Proteinexpression nur sehr schwach anstieg, erkennen.

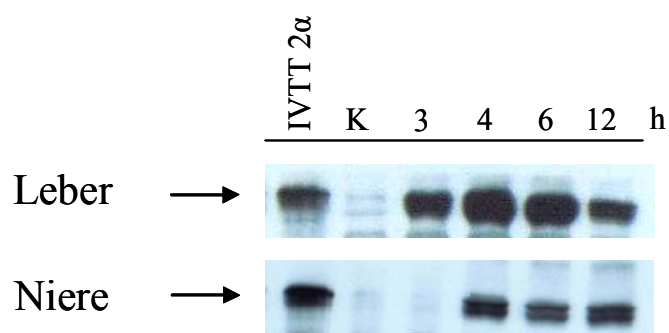


**Abb. 6:** Zeitkinetiken der HIF-2 $\alpha$ -Induktion in verschiedenen Organen.

Immunoblots für HIF-2 $\alpha$  von Gewebsextrakten zahlreicher Organe von Tieren, die CO über verschieden lange Zeiträume ausgesetzt waren. Als Standard diente 2 $\mu$ l des IVTT-2 $\alpha$ , welcher auf jedes Gel geladen wurde, um anschließend die Intensität der Signale vergleichen zu können.

Fast alle Organe zeigten eine Antwort auf den CO-Stimulus innerhalb der ersten Stunde und wiesen eine kontinuierliche Steigerung der Expression bis zu einem Zeitpunkt von 6h CO-Stimulus auf. In der Leber setzte die HIF-2 $\alpha$ -Antwort verzögert erst nach 3h ein, zeigte dann aber einen rapiden Anstieg, der die Induktion in anderen Organen zu übersteigen schien.

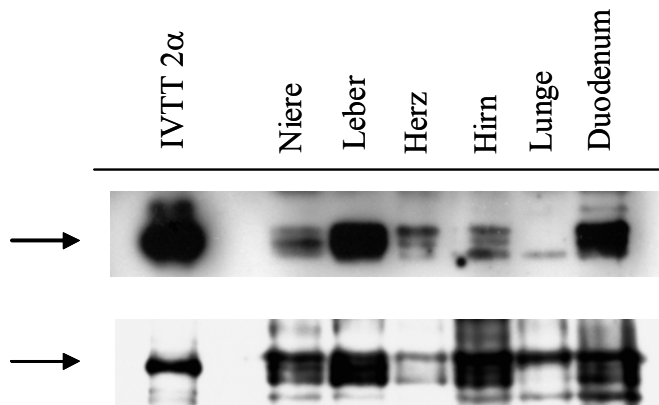
Bei der Exposition der Tiere gegenüber 12h CO konnte ein Rückgang der HIF-2 $\alpha$ -Konzentration im Vergleich zum Induktionsgrad, der nach 6h nachweisbar war, festgestellt werden. Exemplarisch zeigt dies Abb. 7 für die Leber. Eine Ausnahme bei dieser Beobachtung bildete die Niere, in der die HIF-Expression nach 6h und 12h in etwa gleich war. Nach 12stündiger Expositionsdauer zu entweder normobarer Hypoxie oder CO, erschienen die Tiere stark beeinträchtigt. Sekundäreffekte wie z.B. Hypotension oder Hypoventilation konnten nicht ausgeschlossen werden, so dass dieser Zeitpunkt nicht in die systematische Evaluation aufgenommen wurde.



**Abb. 7:** Zeitkinetiken der HIF-2 $\alpha$ -Induktion durch CO bis zu 12h

Exemplarische Immunoblots für HIF-2 $\alpha$  von Gewebsextrakten aus Niere und Leber von Tieren, die über verschieden lange Zeiträume (einschließlich 12h) einer Kohlenmonoxid-Exposition (0,1%) ausgesetzt waren. Zum Vergleich der Signale wurde als Standard 2 $\mu$ l des IVTT-2 $\alpha$  eingesetzt. Wie in den meisten anderen Organen wird in der Leber nach progressivem Anstieg der HIF-2 $\alpha$ -Menge bis zu 6-stündiger CO-Exposition ein Rückgang der HIF-2 $\alpha$ -Induktion bei 12 Stunden beobachtet. In der Niere blieb die HIF-2 $\alpha$ -Menge auch bei 12h CO-Exposition auf dem gleichen Niveau wie nach 6h.

Abb. 8 zeigt die Expression von HIF-2 $\alpha$  in allen Organen zweier Ratten, die für 6h CO ausgesetzt wurden, wodurch ein direkter Vergleich der Proteinmenge in den verschiedenen Organen möglich war. Die durchweg stärkste Induktion von HIF-2 $\alpha$  war in der Leber zu erkennen, gefolgt von Niere und Duodenum, Gehirn, Herz und Lunge.



**Abb. 8:** Immunoblots von HIF-2 $\alpha$  von allen Organen zweier Tiere.

Die Tiere wurden 6h 0,1% CO ausgesetzt. Diese Immunoblots dienen dem direkten Vergleich der Proteinmenge zahlreicher Organe innerhalb desselben Organismus. Zum Vergleich wurde als Standard 2 $\mu$ l IVTT-2 $\alpha$  verwendet. Der Pfeil markiert die Position von HIF-2 $\alpha$  bei ca. 110 kDa.

### 4.3 Zelluläre Lokalisation der HIF-2 $\alpha$ -Induktion durch Immunhistochemie

Um die HIF-2 $\alpha$ -Expression in bestimmten Zellen lokalisieren zu können, wurden perfusionsfixierte Gewebe immunhistochemisch untersucht. Sowohl PM8 als auch PM9 erbrachten ein übereinstimmendes Ergebnis in der Immunhistochemie. Jedoch hatte PM9 eine höhere Sensitivität und Spezifität, so dass die Arbeiten mit PM9 durchgeführt wurden.

Unter den gewählten Bedingungen zeigten die Gewebe von Kontrolltieren keine zelluläre Expression von HIF-2 $\alpha$ . Beim Vergleich der unterschiedlichen Mechanismen der Hypoxieinduktion (8% O<sub>2</sub> und 0,1% CO), ließ die Immunhistochemie im Gegensatz zum Immunoblot keine Unterschiede bezüglich der Intensität und Stabilität der Induktion von HIF-2 $\alpha$  erkennen. Beide Bedingungen führten zu einer ausgeprägten Akkumulation von HIF-2 $\alpha$  in allen untersuchten Geweben (Abb. 9,10,11,12). Das Signal beschränkte sich hierbei nahezu ausschließlich auf den Zellkern.

Das Verhältnis von interstitiellen- zu parenchymatösen Zellen, die positiv für HIF-2 $\alpha$  waren, unterschied sich beträchtlich zwischen den einzelnen Organen. In der Niere konnte HIF-2 $\alpha$  sowohl im Interstitium der Medulla und des Kortex als auch in glomerulären Zellen nachgewiesen werden (Abb. 9A). Im renalen tubulären System war keine Immunreaktion

erkennbar. Im Unterschied dazu konnte in der Leber ein starkes Signal in den Hepatozyten gesehen werden, wohingegen die interstitiellen Zellen nur gelegentlich ein positives Signal zeigten. Die Anzahl der Hepatozytenkerne, in denen HIF-2 $\alpha$  nachweisbar war, nahm von der Peripherie zum Zentrum der Leberlobuli zu. In unmittelbarer Umgebung der Zentralvene war praktisch jeder Zellkern positiv, allerdings konnte nur ein geringes oder kein Signal rund um die Glisson'sche Trias gefunden werden (Abb. 9B). Das Duodenum ließ Signale für HIF-2 $\alpha$  in praktisch allen epithelialen Zellen, die das intestinale Lumen begrenzen, aber auch in einigen interstitiellen, wahrscheinlich endothelialen Zellen, erkennen (Abb. 9C). Die Mehrzahl der Stromazellen der Villi sowie der Zellen in der Submukosa und der intestinalen Wand waren negativ. Im Pankreas war die Kernakkumulation von HIF-2 $\alpha$  ausschließlich in interstitiellen Zellen nachweisbar, von denen einige eindeutig kapilläre endotheliale Zellen waren (Abb. 9D). Im Herzen war der Anteil positiver Zellkerne in den Myozyten und den interstitiellen Zellen in etwa gleich. Einige der positiven interstitiellen Zellen konnten sicher als endotheliale Zellen identifiziert werden.

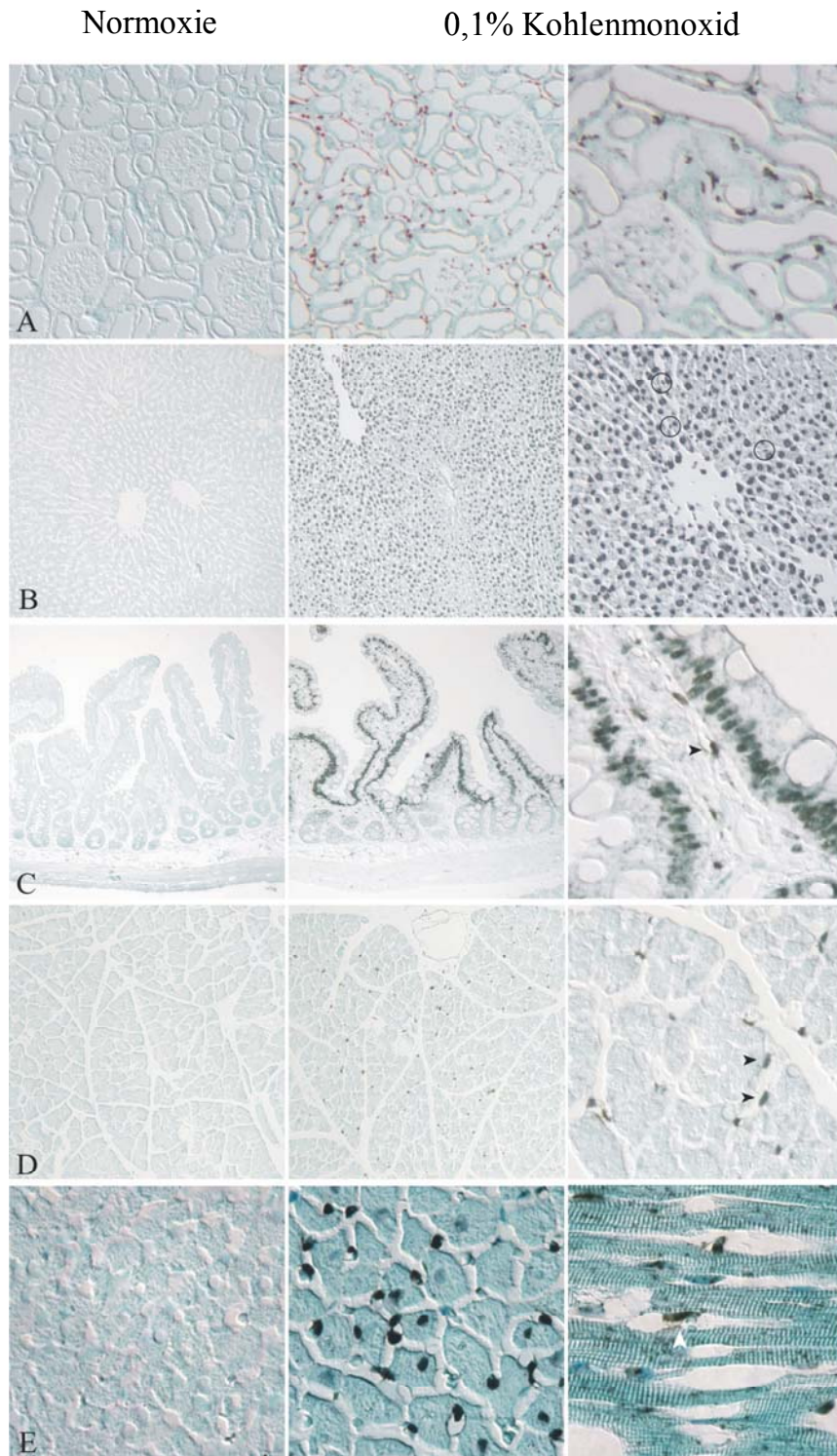
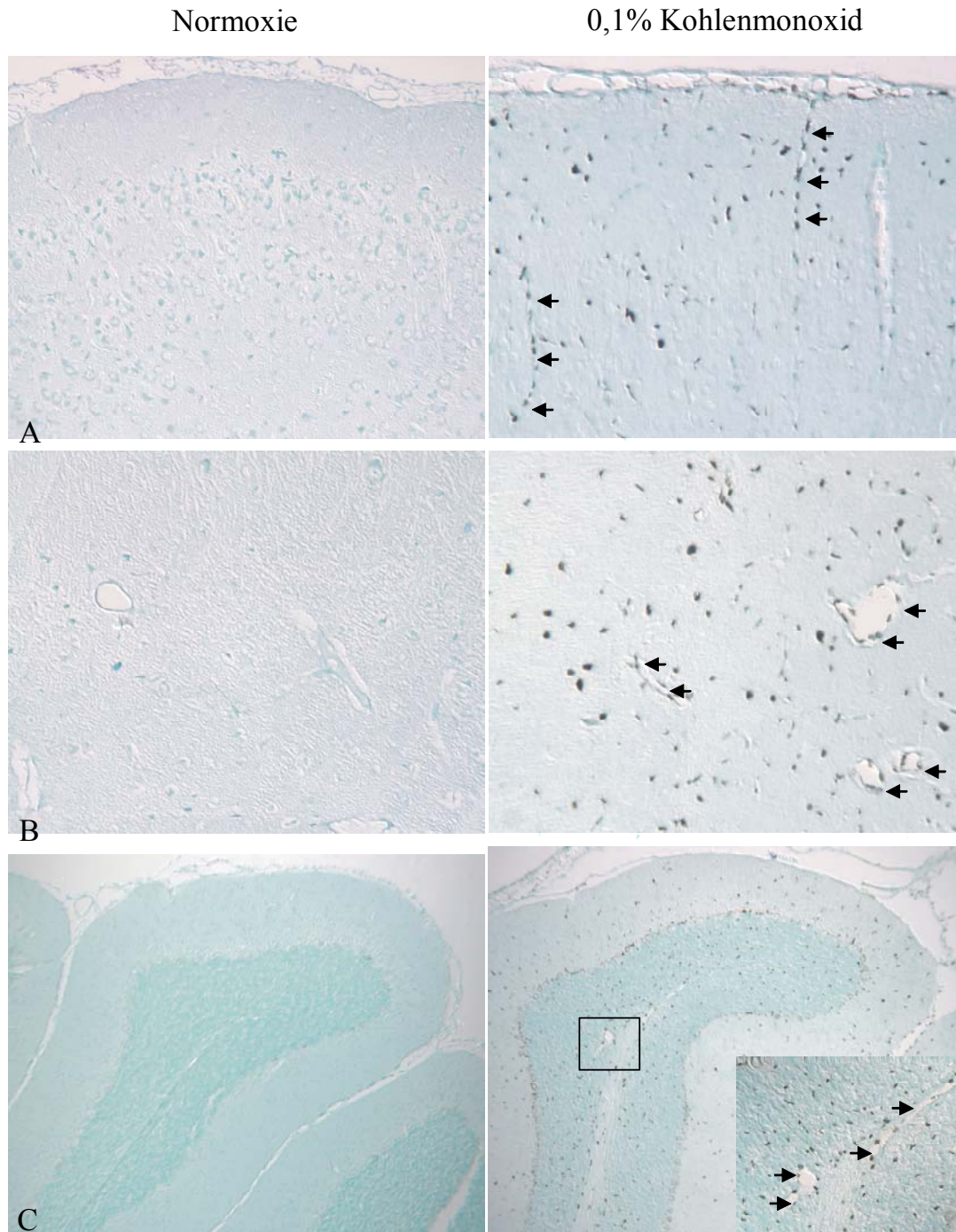


Abb. 9: Zelluläre Lokalisation von HIF-2 $\alpha$

---

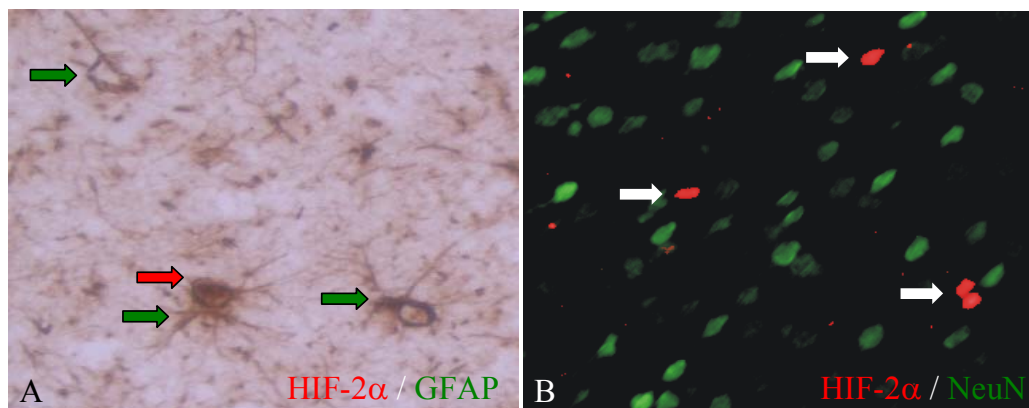
Immunhistochemie für HIF-2 $\alpha$  in zahlreichen Organen unter normoxische Kontrollbedingungen (linke Spalte) bzw. 6h 0,1%ige CO-Exposition in zwei verschiedenen Vergrößerungen (rechte Spalten). Die Abbildungen der linken und mittleren Spalte sind in 200facher Vergrößerung (**E**: 800fach), die Abbildungen der rechten Spalte sind in 500facher Vergrößerung dargestellt (**C** und **E**: 1000fach). Unter Kontrollbedingungen konnte kein Signal nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss von 0,1% CO zeigte sich eine klare nukleäre Akkumulation von HIF-2 $\alpha$  in jedem Organ, wenn auch in einer begrenzten Anzahl unterschiedlicher Zellpopulationen. **A**. Niere, **B**. Leber, **C**. Duodenum, **D**. Pankreas, **E**. Herz. Die Kreise in Abbildung **B** weisen auf positive Kerne interstitieller Zellen der Leber hin, die Pfeile in Abbildung **C**, **D**, **E** markieren positive Kerne kapillärer, endothelialer Zellen.

Sowohl der Kortex des Gehirns, als auch die Hippokampusregion und das Cerebellum zeigten ein klares Signal endothelialer Zellen und Gliazellen (Abb. 10A,B,C), was durch die spezielle Anfärbung mit Antikörpern gegen den Astrozytenmarker GFAP gezeigt werden konnte (Abb. 11A). Es gab keine Ko-Lokalisation zwischen der zellulären Expression von HIF-2 $\alpha$  und dem spezifischen neuronalen Marker NeuN in irgendeinem Teil des Gehirns (Abb. 11B), so dass HIF-2 $\alpha$  vermutlich nicht in den Neuronen exprimiert werden kann.



**Abb. 10:** Lokalisation von HIF-2 $\alpha$  im Hirn.

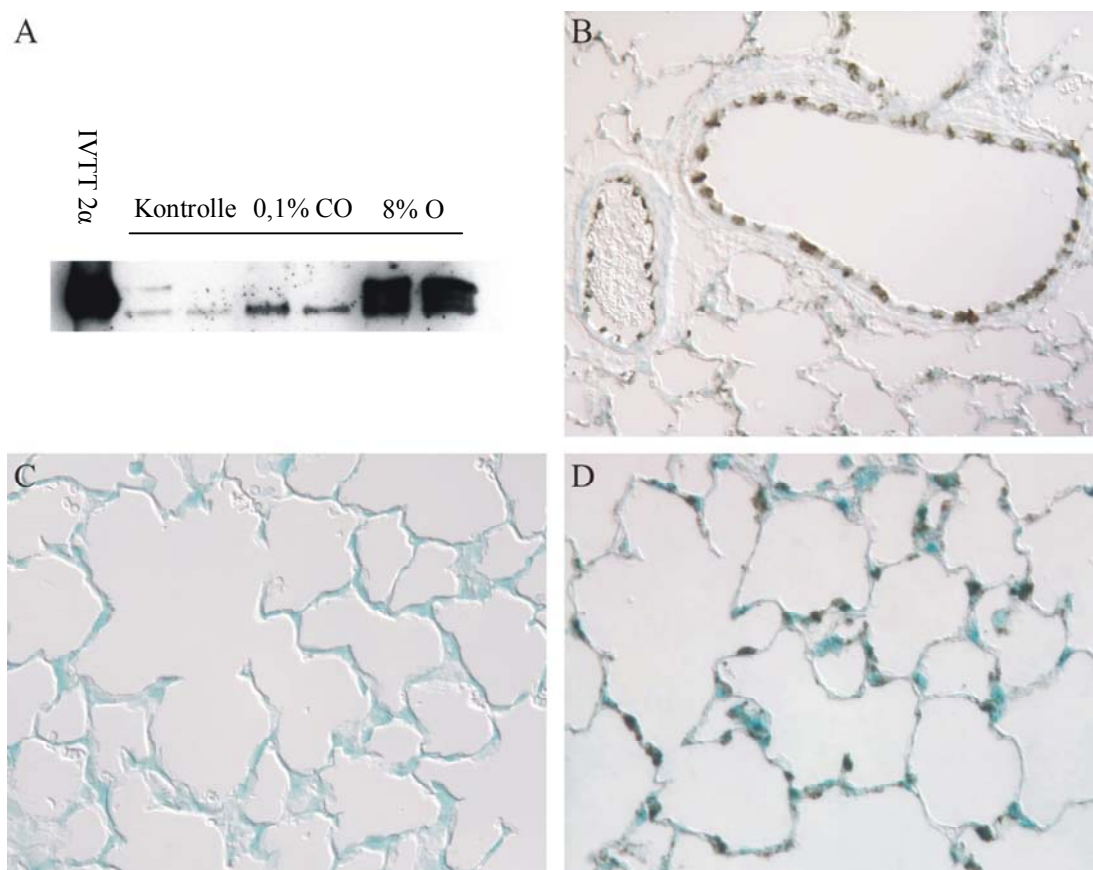
Immunhistochemie für HIF-2 $\alpha$  von Kontroll- bzw. mit 0,1% CO behandelten Ratten von verschiedenen Anteilen des Hirns. **A.** Kortex (100fache Vergrößerung), **B.** Hippokampus (100fache Vergrößerung), **C.** Cerebellum (50fache Vergrößerung). Die linke Spalte zeigt normoxische Kontrollen, die rechte Spalte zeigt die Gewebe nach 6h 0,1%iger CO-Stimulation. Die Vergrößerung innerhalb der Abbildung **C** ist 400fach. HIF-2 $\alpha$  konnte nach Stimulation mit 0,1% CO in allen untersuchten Hirnanteilen in endothelialen Zellkernen, worauf die kleinen Pfeile hindeuten, und Gliazellen nachgewiesen werden.



**Abb. 11:** HIF-2 $\alpha$ -Expression in spezifischen Zellen des Hirns

**A.** Ein Teil der Astrozyten in allen Regionen des Gehirns zeigte eine Ko-Lokalisierung von HIF-2 $\alpha$  und dem spezifischen anti-GFAP-Antikörper. Die grünen Pfeile markieren GFAP-positives Zytoplasma von Astrozyten und der rote Pfeil markiert HIF-2 $\alpha$ -positive Kerne. **B.** Es gibt keine HIF-2 $\alpha$ -Expression in neuronalen Zellen, belegt durch eine fehlende Überlappung mit dem spezifischen neuronalen Marker NeuN (die weißen Pfeile markieren HIF-2 $\alpha$ -positive Kerne).

Die Lunge war das einzige Organ, bei dem in der Immunhistochemie ein entscheidender Unterschied zwischen der Exposition gegenüber CO und normobarer Hypoxie zu erkennen war. Anders als in allen anderen Organen, war die Induktion von HIF-2 $\alpha$  in der Lunge bei Tieren, die CO ausgesetzt waren, schwach (Abb. 6), wohingegen eine Exposition gegenüber 8% O<sub>2</sub> einen starken Anstieg in der Proteinmenge erzeugte (Abb. 12A). Die Immunhistochemie von Tieren, die 8% O<sub>2</sub> ausgesetzt waren, zeigte ein starkes Kernsignal in den Pneumozyten Typ II, wohingegen ein nur schwaches Signal dieser Zellen in Antwort auf den CO-Stimulus beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu war in den endothelialen Zellen der Pulmonalarterien ein starkes Kernsignal als Antwort auf beide Stimuli nachweisbar (Abb. 12B).



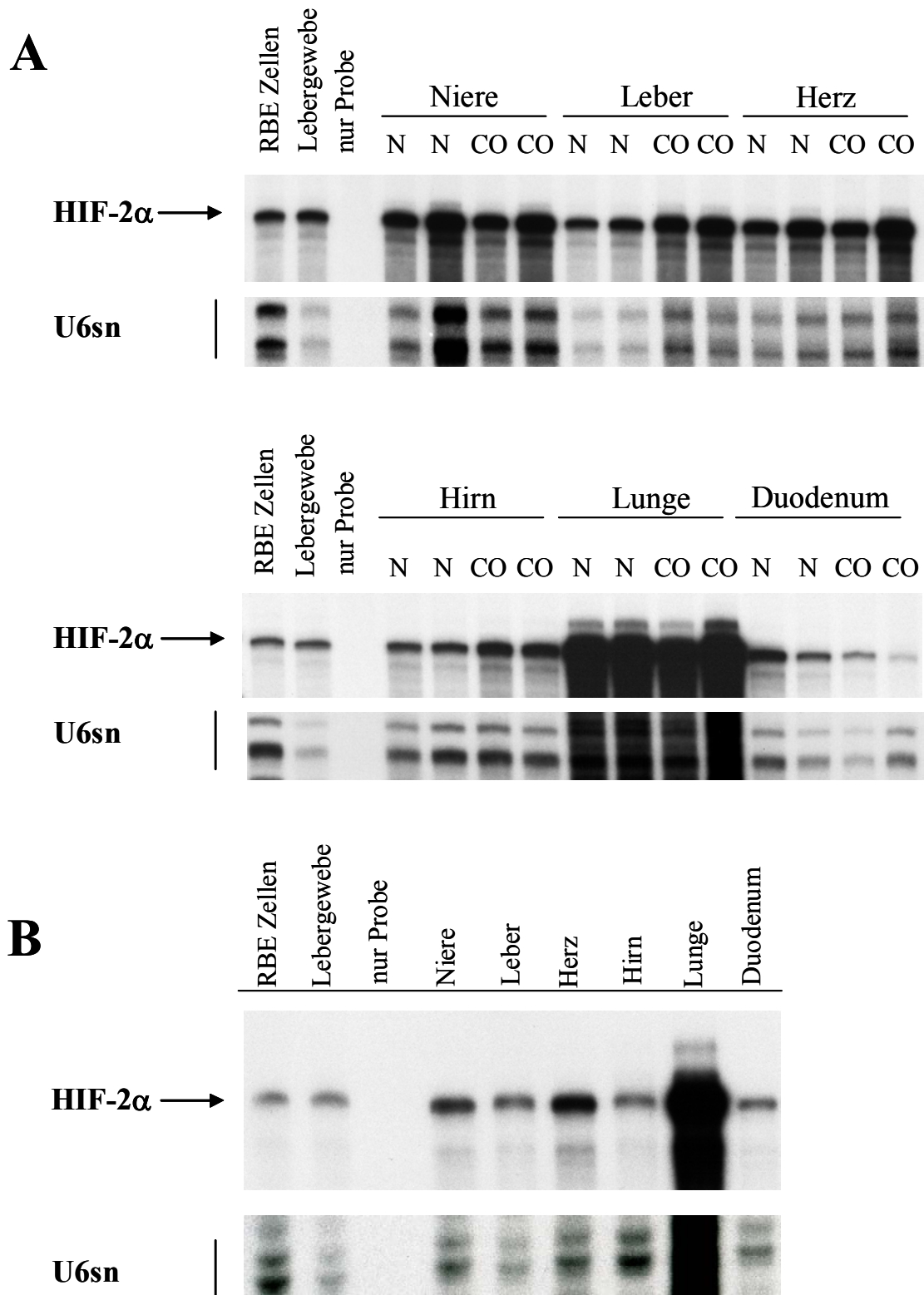
**Abb. 12:** Expression von HIF-2 $\alpha$  in der Lunge

**A.** Immunoblot der Lungenextrakte unter Kontrollbedingungen, 0,1% CO und 8% O<sub>2</sub> für 6h. Als Standard wurden 2 $\mu$ l IVTT-2 $\alpha$  eingesetzt. Im Gegensatz zu allen anderen Organen ist normobare Hypoxie der stärkere Stimulus für eine HIF-2 $\alpha$ -Akkumulation in der Lunge, wohingegen 0,1% CO nur zu einer sehr schwachen Proteininduktion führt. **B-D.** Immunhistochemie der Lunge für 8% O<sub>2</sub> (**D**) oder 0,1% CO (**B**), verglichen mit Kontrollbedingungen (**C**). Unter Kontrollbedingungen war kein Signal nachweisbar, allerdings konnte eine starke nukleäre Akkumulation von HIF-2 $\alpha$  in den endothelialen Zellen der pulmonalen Arterien unter beiden Stimulationsbedingungen (8% O<sub>2</sub> und 0,1% CO) nachgewiesen werden. Unter 0,1% CO war fast kein parenchymales Signal detektierbar, unter 8%iger Hypoxie zeigten die Pneumozyten Typ II eine starke nukleäre Akkumulation.

#### 4.4 Expression und Modulation der HIF-2 $\alpha$ mRNA

Um zu ermitteln, ob die starke Proteininduktion zumindest teilweise durch einen Anstieg der mRNA-Konzentration zustande kam, wurde ein RNase Protection Assay von Ratten, die mit 0,1% CO für 6h behandelt wurden, und Kontrolltieren durchgeführt.

Abb. 13A zeigt repräsentative Ergebnisse für die mRNA-Menge von HIF-2 $\alpha$  in verschiedenen Geweben unter Standard- und Stimulationsbedingungen. Abb. 13B illustriert die mRNA-Konzentration für die unterschiedlichen Gewebe eines einzelnen Tieres zum direkten Vergleich. In Übereinstimmung mit bisherigen Ergebnissen, konnten die größten Mengen an HIF-2 $\alpha$  mRNA in der Lunge (Flamme; Fröhlich; von Reutern; Kappel; Damert und Risau, 1997) nachgewiesen werden, gefolgt von Herz, Leber, Niere, Gehirn und Duodenum (Tab. 2). Die Exposition der Tiere gegenüber 0,1% CO führte zu keiner signifikanten und reproduzierbaren Änderung der mRNA-Menge in Niere, Herz, Gehirn, Lunge und Duodenum. Nur die Leber zeigte einen moderaten, 2,5 fachen Anstieg der HIF-2 $\alpha$  mRNA-Menge.

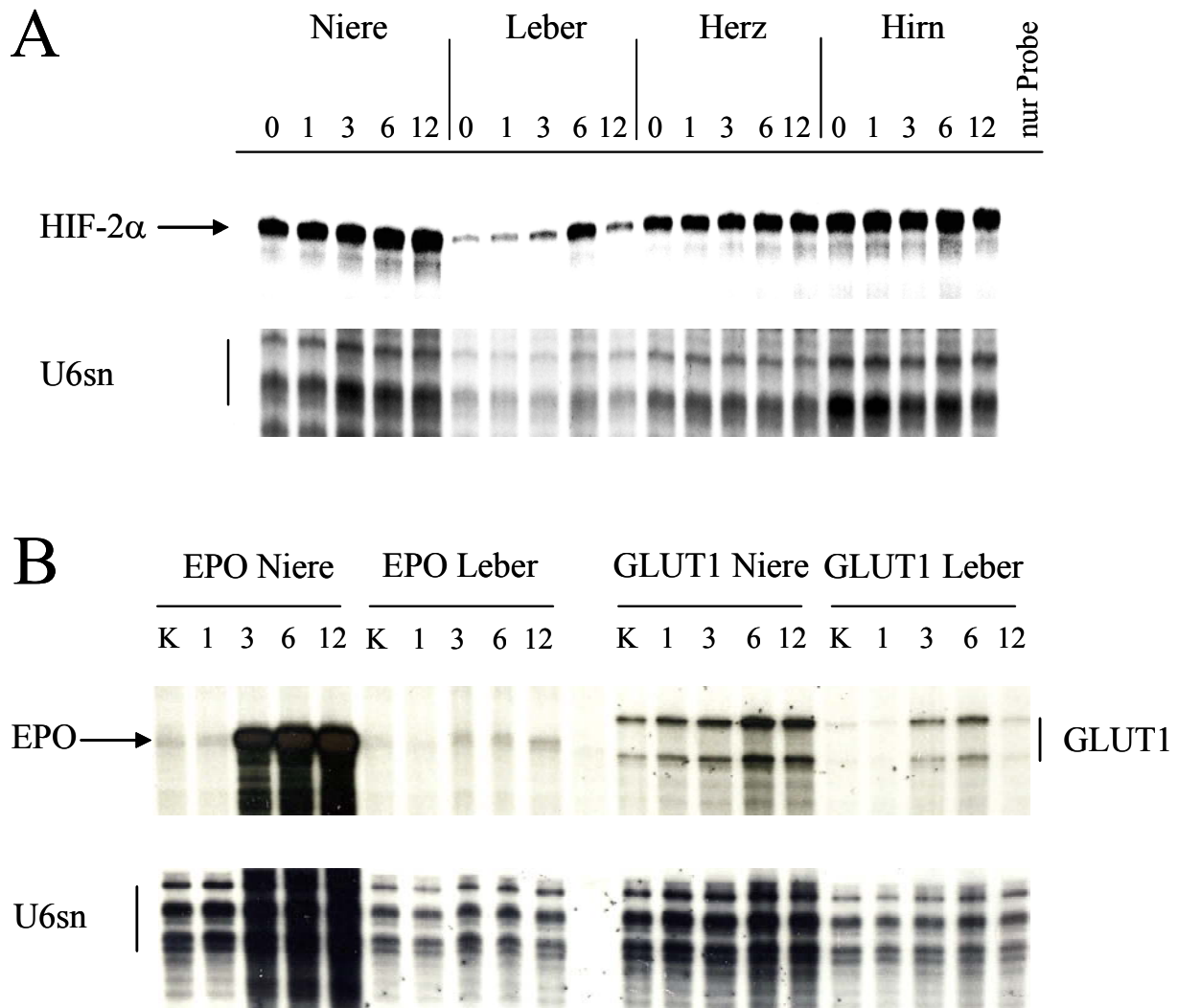


**Abb. 13:** Expression und Modulation der HIF-2 $\alpha$  mRNA in verschiedenen Organen. **A.** RNase Protection Assay für HIF-2 $\alpha$  mRNA und U6sn RNA (interne Kontrolle). Die RNA-Proben stammen von Tieren, die unter normoxischen Standardbedingungen (N) oder 6h unter 0,1% CO (CO) gehalten wurden. Die mRNA von RBE4-Zellen und von der Leber wurde auf jedes Gel geladen, um Vergleichbarkeit und Quantifizierung zu gewährleisten. „Nur Probe“ zeigt die Bahn, in der allein die radioaktiv markierte Sonde verarbeitet und geladen wurde, um eine Kontrolle für den vollständigen RNase-Verdau zu haben. **B.** RNase Protection Assay für HIF-2 $\alpha$  von allen Organen eines Tieres für den direkten Vergleich der mRNA-Menge in den verschiedenen Organen.

**Tab. 2:** mRNA-Expression von HIF-2 $\alpha$  in unterschiedlichen Organen. Expression und Modulation der HIF-2 $\alpha$  mRNA-Menge in verschiedenen Organen von Ratten unter normoxischen Standardbedingungen und nach 6h Stimulation mit 0,1% CO. Die gezeigten Werte für die Expression unter Normoxie sind selbst festgelegte Einheiten, bezogen auf das Organ mit der geringsten Expression (Duodenum) als 10. Das Verhältnis der mRNA-Menge nach Stimulation zu Standardbedingungen ist als x-fache Änderung angegeben. Alle individuellen Werte wurden zur internen Kontrolle, U6sn, ins Verhältnis gesetzt.

	Expression unter Normoxie	x-fache Änderung bei 0,1% CO
Niere	17,4	1,3
Leber	27,7	2,5
Herz	33,8	1,4
Lunge	132,8	1,5
Hirn	10,4	1,9
Duodenum	10	0,8

Um diesen Befund noch eindeutiger zu demonstrieren, zeigt die Abb. 14A eine Zeitkinetik für die mRNA-Expression von HIF-2 $\alpha$  in verschiedenen Organen über insgesamt 12h. Auch hieraus wurde deutlich, dass die Regulation der HIF-Expression nicht auf der mRNA-Ebene stattfand, da hier mit Ausnahme der Leber keine Modulation über den untersuchten Zeitraum hinweg erkennbar war. Im Gegensatz dazu zeigten die Zielgene von HIF, EPO und GLUT1, eine Zunahme in der mRNA-Konzentration über den beobachteten Zeitraum (Abb. 14B). Entsprechend der maßgeblichen Produktion von EPO in der Niere, ist auch die EPO-mRNA-Menge in der Niere im Vergleich zur Leber wesentlich höher.



**Abb. 14:** **A.** RNase Protection Assay für HIF-2 $\alpha$  mRNA **B.** RNase Protection Assay für EPO- und GLUT1-mRNA

**A.** Die RNA-Proben stammen von Tieren, die über unterschiedlich lange Zeiträume (1-12h) unter 0,1% CO gehalten wurden. Es wurden verschiedene Organe der Tiere vergleichend analysiert, wobei die Kontrolle (K) als Bezugspunkt diente. Außer für die Leber ist keine Modulation der HIF-2 $\alpha$ -mRNA über den untersuchten Zeitraum hinweg erkennbar. **B.** Die RNA-Proben der gleichen Tiere (1-12h Exposition gegenüber 0,1% CO) wurden auf die mRNA der HIF-Zielgene EPO (linker Abbildungsteil) und GLUT1 (rechter Abbildungsteil) untersucht. Es wurden Niere und Leber vergleichend mit der Kontrolle (K) analysiert. Es zeigte sich eine Zunahme in der mRNA-Konzentration über den beobachteten Zeitraum in der Niere für beide Zielgene.

## 5 Diskussion

Das zentrale Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt die Induktion der HIF-2 $\alpha$ -Isoform der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktorfamilie in spezifischen Zellen verschiedener Organe unter den Bedingungen reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit. Diese Beobachtungen konnten unter zwei unterschiedlichen Formen der Gewebshypoxie gemacht werden: normobare Hypoxie (8% O<sub>2</sub>) und Exposition gegenüber Kohlenmonoxid (0,1% CO), welches nicht die arterielle Sauerstoffspannung beeinflusst, aber die Sauerstofftransportkapazität des Blutes reduziert.

Trotz der weit verbreiteten Induktion von HIF-2 $\alpha$  in allen untersuchten Geweben variieren sowohl deren Umfang als auch die entsprechenden Zellpopulationen, in denen HIF-2 $\alpha$  nachgewiesen werden konnte, in hohem Maße zwischen den einzelnen Organen. *In vitro* Daten zeigen, dass die Regulation der HIF $\alpha$ -Untereinheit in erster Linie durch Änderungen in der Proteinstabilität erfolgt.

### 5.1 Expression und Modulation der HIF-2 $\alpha$ mRNA

Kontrovers ist bisher die Frage nach der Regulation der HIF-Expression auf der Ebene der mRNA diskutiert worden. Ein Großteil der Arbeitsgruppen stimmt inzwischen darin überein, dass HIF $\alpha$  auf der mRNA-Ebene *in vitro* nur unwesentlich durch eine veränderte O<sub>2</sub>-Konzentration beeinflusst wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Induktion von HIF-2 $\alpha$  Protein *in vivo* in keinem ersichtlichen Zusammenhang mit Veränderungen in der HIF-2 $\alpha$  mRNA-Expression steht. Zu der gleichen Erkenntnis kommen auch Stroka et al., 2001 für ihre Untersuchungen an HIF-1 $\alpha$  in der Maus. Jedoch gibt es *in vivo* Studien anderer Gruppen für HIF-1 $\alpha$ , die unter ischämischen Bedingungen eine Steigerung der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression zeigen (Bergeron et al., 1999; Jin et al., 2000; Ozaki et al., 1999). Bergeron et al. konnten erst nach ca. 8h permanenter fokaler Ischämie eine signifikante Induktion der HIF-1 $\alpha$  mRNA-Expression nachweisen (Bergeron et al., 1999). Eine mögliche Erklärung bieten Untersuchungen am HIF-Promotor. Zwei potentielle HIF-1 $\alpha$ -Bindungsstellen wurden im Promotor des HIF-1 $\alpha$ -Gens identifiziert (Wenger et al., 1998). Es wurde angenommen, dass diese Regionen nicht funktionell sind, da die HIF-1 $\alpha$  mRNA-Konzentration in Zelllinien *in vitro* und in Mäusen *in vivo* durch Hypoxie nicht hochreguliert wurde. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass die Bindung von HIF-1 an seinen eigenen Promotor nur Teil eines funktionellen DNA-Komplexes ist, der in

Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren, die bei prolongierter Ischämie begleitend hinzutreten, für eine Hochregulation der HIF-1 $\alpha$  mRNA notwendig wäre.

Einen geringen Anstieg der HIF-2 $\alpha$  mRNA konnte die vorliegende Arbeit nur für die Leber zeigen, wobei allerdings auch hier dieser Anstieg erst nach 6h nachgewiesen wurde, als die Proteinakkumulation bereits ihren Höchststand erreicht hatte. Daraus lässt sich schließen, dass zwischen der maximalen Proteinkonzentration und der maximalen mRNA-Menge unter hypoxischer Stimulation keine relevante Beziehung besteht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine HIF-2 $\alpha$  mRNA-Induktion zu späteren Zeitpunkten, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, auftritt. Die Bedeutung der Gesamtmenge der HIF-2 $\alpha$  mRNA in bestimmten Geweben für die Fähigkeit zur HIF-2 $\alpha$  Proteininduktion bleibt daher zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

Darüber hinaus ist der Zusammenhang zwischen der mRNA- und der Proteinkonzentration bzgl. der einzelnen Organe recht unterschiedlich. Die Lunge ist das Organ mit der höchsten HIF-2 $\alpha$  mRNA-Expression und zeigt gleichzeitig ein hohes Potential für die Proteininduktion bei entsprechender hypoxischer Stimulation (8% O<sub>2</sub>). In anderen Organen ist der Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteinmenge weniger deutlich. Das Duodenum zeigt die geringste Expression an HIF-2 $\alpha$  mRNA, trotzdem aber die dritthöchste Proteininduktion.

Die Frage nach der Regulation der HIF-Expression auf der Ebene der mRNA *in vivo* kann daher derzeit nicht abschließend beantwortet werden. Die Daten deuten aber bislang darauf hin, dass die physiologisch relevante Regulation der HIF $\alpha$ -Untereinheit *in vivo* bei Hypoxie hauptsächlich posttranslational stattfindet.

## **5.2 Zusammenhang zwischen der Sauerstoffspannung und der Proteininduktion**

In früheren Arbeiten zeigte sich, dass die Sauerstoffspannung einen direkten Einfluss auf die HIF Proteinregulation besitzt. Auch in dieser Arbeit konnte ein deutlicher Hinweis auf die Assoziation zwischen der HIF-2 $\alpha$  Proteininduktion und dem Sauerstoffgradienten im Gewebe in einigen Organen erbracht werden.

In der Leber ist eine klare zonale Verteilung von HIF-2 $\alpha$  mit einem Signalanstieg zur Zentralvene hin nachzuweisen, was mit der Reduktion der Sauerstoffspannung von der Peripherie zum Zentrum des Leberlappens und mit dem Expressionsprofil von EPO in anämischen Mäusen (Koury et al., 1991) in Einklang steht. Dieser Gradient wird durch die Blutversorgung des Organs, welche durch die in der Glisson'schen Trias verlaufende Arteria hepatica erfolgt, bedingt.

Den auffälligsten Hinweis für diesen Einfluss des Sauerstoffverteilungsmusters liefern die Arbeiten an der Lunge. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Organen, war CO kein adäquater Stimulus für die Stabilisierung von HIF-2 $\alpha$  im Lungenparenchym, wohingegen die Exposition gegenüber einer Atmosphäre mit reduzierter Sauerstoffkonzentration (8% O<sub>2</sub>) zu einer starken Induktion von HIF-2 $\alpha$  in Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) führte. Da alveoläre Zellen in erster Linie durch die inspirierte Luft und nicht durch den Bluttransport mit Sauerstoff versorgt werden, war nicht zu erwarten, dass 0,1% CO die Oxygenierung dieser Zellen beeinflusst. Ein ähnlicher Unterschied zwischen der Stimulation mit CO und der Exposition gegenüber einer reduzierten Sauerstoffumgebungskonzentration wurde kürzlich für die Expression des Adrenomedullingens in der Lunge beschrieben (Hofbauer et al., 2000), welches als HIF-abhängiges Zielgen bekannt ist (Garayoa et al., 2000). Im Gegensatz zu den Pneumozyten zeigten endotheliale Zellen der pulmonalen Arterien eine HIF-Induktion durch beide Arten der Stimulation, was vermutlich an der Reduktion des Sauerstoffgehalts des Pulmonalarterienblutes unter beiden Bedingungen lag.

Wie Compornolle et al. 2002 zeigen konnten, spielt HIF-2 $\alpha$  in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor für VEGF eine kritische Rolle bei der Konversionskontrolle von Glykogen zu Surfactant in der Entwicklung der Lunge fetaler Ratten. VEGF stimuliert diese Konversion und reguliert damit die fetale Lungenreifung. Die Produktion des Surfactant-Faktors, der die Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenze herabsetzt und dadurch den alveolären Kollaps verhindert, findet in Alveolarepithelzellen Typ II statt. In Anbetracht dieser wichtigen Funktion mag auch der zelluläre Lokisationsnachweis von HIF-2 $\alpha$  in Alveolarepithelzellen Typ II, der sowohl in der vorliegenden Arbeit, als auch durch Compornolle et al. gezeigt werden konnte, nicht überraschen und die Funktion als Modulator der VEGF-Expression unterstreichen (Compornolle et al., 2002).

Beim Vergleich des Ausmaßes der HIF-2 $\alpha$ -Aktivierung in verschiedenen Organen gab es einen auffälligen Befund. Die Gewebssauerstoffspannung in der Niere ist selbst unter normoxischen Bedingungen niedriger als in anderen Organen unter den hier verwendeten Bedingungen der systemischen Hypoxie. Allerdings konnte keine basale Expression von HIF-2 $\alpha$  beobachtet werden – auch nicht in der Nierenpapille, wo die Sauerstoffspannung normalerweise bei ca. 10 mmHg liegt (Lubbers und Baumgartl, 1997). Es ist daher zum einen zu vermuten, dass nicht alle Zellen das HIF-2 $\alpha$ -Protein *in vivo* exprimieren. Des Weiteren ist anzunehmen, dass die HIF-Aktivierung *in vivo* nicht in allen Zellen gleichbleibend mit einer

spezifischen Sauerstoffspannung verbunden ist. Die zelluläre Sauerstoffmessung und -antwort in den verschiedenen Zellen und Geweben hat vermutlich eine unterschiedliche Sensitivität und könnte sich an die lokale Sauerstoffspannung anpassen.

### 5.3 Vergleich der Ergebnisse für HIF-2 $\alpha$ mit HIF-1 $\alpha$

Die HIF-2 $\alpha$  Proteinkonzentration nach 12h hypoxischer Exposition war, verglichen mit jener, die nach 6h erreicht wurde, geringer, was adaptive Prozesse vermuten lässt. Ähnliche Beobachtungen wurden bei einer Studie über die HIF-1 $\alpha$ -Expression *in vivo* (Stroka et al., 2001) und über die Expression von HIF-Zielgenen, wie z.B. EPO (Eckardt et al., 1990) gemacht. Da diese Beobachtungen auch an isolierten Zellen *in vitro* (Wiesener et al., 1998) gemacht wurden, können allein die Veränderungen in der lokalen Sauerstoffbereitstellung nicht der Grund für diese Vorgänge sein. Zwei der drei identifizierten Prolylhydroxylasen, die für die Hydroxylierung der Prolinreste von HIF unter Standardbedingungen verantwortlich sind, werden durch Hypoxie und HIF selbst induziert (D'Angelo et al., 2003; Epstein et al., 2001; Metzzen et al., 2003). Dies könnte die Basis für eine negative Rückkopplungsregulation darstellen und das beobachtete Absinken der HIF-Expression nach mehr als 6h erklären.

Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit Daten zur Regulation von HIF-1 $\alpha$  in Mäusen (Stroka et al., 2001), so werden signifikante Gemeinsamkeiten in der Expression der beiden  $\alpha$ -Isoformen der HIF-Transkriptionsfaktorfamilie, aber auch eine Anzahl wichtiger Unterschiede offenbar.

Zum einen beobachteten Stroka et al. in der Immunhistochemie, nicht aber im Immunoblot, eine HIF-1 $\alpha$ -Expression bereits unter normoxischen Standardbedingungen in Hirn, Niere, Leber und Herz, was im Gegensatz zu den Ergebnissen für HIF-2 $\alpha$  steht. Diese Beobachtung könnte eine mögliche physiologische Rolle von HIF-1 $\alpha$  in der Gewebshomöostase zeigen. Allerdings steht dieser Befund im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Arbeiten, die in menschlichen Geweben mit Ausnahme des Knochenmarks keine basale HIF Protein-Expression nachweisen konnten (Talks et al., 2000).

Zum anderen war die HIF-1 $\alpha$ -Induktion in Niere und Leber nur von vorübergehender Dauer mit einem Maximum nach 1-2h und verschwand nach einer Zeitspanne von 3h wieder, wohingegen die HIF-2 $\alpha$ -Induktion für mehr als 6h in allen untersuchten Organen nachzuweisen war. Im wesentlichen unterscheiden sich beide Arbeiten durch die Bedingungen der hypoxischen Stimulation (6% O<sub>2</sub> und 0,1% CO). Die exemplarisch

bestimmten CO-Hb-Werte zeigten, dass es einer ca. 3h umfassenden Adaptationszeit bedurfte, bis das Blut der Tiere bis zu ca. 50% mit CO aufgesättigt war und damit ein adäquater hypoxischer Stimulus für die Induktion von HIF bestand (Tab. 1). Nach dieser Zeit konnte man von einer ausreichenden funktionellen Anämie ausgehen. Im Gegensatz dazu führte die Anwendung systemischer Hypoxie (6% O<sub>2</sub>) unmittelbar zu einer verringerten O<sub>2</sub>-Versorgung des Gewebes, was die Unterschiede in der Kinetik der beiden Arbeiten erklären könnte.

Des Weiteren war, zumindest in der Niere und der Leber, eine stärkere Hypoxie (6% O<sub>2</sub>) für die Induktion von HIF-1 $\alpha$  als für die von HIF-2 $\alpha$  notwendig, was sich mit früheren Beobachtungen in Zellkulturen deckt. Dies lässt vermuten, dass HIF-2 $\alpha$  bereits bei einer höheren Sauerstoffkonzentration induziert wird (Wiesener et al., 1998).

Ferner schien die Lunge eine interessante Ausnahme im Vergleich zu allen anderen untersuchten Organen darzustellen. HIF-1 $\alpha$  war sogar unter 6% O<sub>2</sub> nicht detektierbar. Dies könnte bedeuten, dass entweder eine eventuell vorhandene HIF-1 $\alpha$ -Expression in der Lunge unterhalb des im Immunoblot messbaren Bereiches liegt oder dass in der Lunge keine HIF-1 $\alpha$ -Expression vorhanden ist. Allerdings konnten Yu et al. 1998 unter extremeren Stimulationsbedingungen von 0% O<sub>2</sub> HIF-1 $\alpha$  in bronchialem und alveolärem Epithel, sowie in vaskulärem Endothel von isolierten Frettchen-Lungen nachweisen (Yu et al., 1998). Demgegenüber wurde in den vorliegenden Experimenten an der Ratte bereits bei 8% O<sub>2</sub> eine ausgesprochen starke Induktion von HIF-2 $\alpha$  gesehen.

Darüber hinaus zeigte der Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Stroka et al., 2001, dass in Organen, die beide HIF $\alpha$ -Isoformen exprimieren, die Überlappung der zellulären Expression variabel war. Hepatozyten, Kardiomyozyten und myokardiale Endothelzellen schienen mit einer Hochregulation von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  auf Hypoxie zu reagieren, wohingegen in Niere und Hirn beide Isoformen in gut definierten, aber unterschiedlichen Zellpopulationen induziert wurden. In diesen beiden Organen war HIF-2 $\alpha$  begrenzt auf nicht-parenchymatöse Zellen, z.B. glomeruläre-, peritubuläre endotheliale Zellen und Fibroblasten in der Niere sowie endotheliale Zellen und Gliazellen im Hirn. Im Gegensatz dazu wurde HIF-1 $\alpha$  in renalen Tubuli und neuronalen Zellen exprimiert.

Während Stroka et al., 2001 eine reguläre zytoplasmatische Lokalisation für HIF-1 $\alpha$  zusätzlich zur nukleären Akkumulation beobachteten, konnte die HIF-2 $\alpha$  Expression nur in den Zellkernen und nur unter hypoxischer Stimulation nachgewiesen werden, was einen Hinweis auf Unterschiede in der Kinetik der nukleären Translokation geben könnte.

Ein weiterer Hinweis auf die differenzierte Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  ergab sich aus dem Vergleich der vorliegenden Arbeit zu Resultaten von Chavez et al.. Darin konnte eine Ko-Lokalisation von HIF-1 $\alpha$  mit NeuN und GFAP nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass Neuronen (Marker: NeuN) und Astrozyten (Marker: GFAP) HIF-1 $\alpha$  exprimieren (Chavez et al., 2000). Auch für HIF-2 $\alpha$  wurden in der vorliegenden Arbeit diese Färbungen berücksichtigt, wobei sich nur eine Ko-Lokalisation mit GFAP zeigte, Astrozyten also als die Zellen der HIF-2 $\alpha$ -Expression angesehen werden konnten. Die HIF-2 $\alpha$ -Expression in neuronalen Zellen konnte nicht gezeigt werden. Allerdings ist bis zum bisherigen Zeitpunkt die Funktion, die diese unterschiedliche zelluläre Verteilung der beiden HIF $\alpha$ -Isoformen impliziert, nicht geklärt.

Obwohl einige dieser Unterschiede aus den verschiedenen experimentellen Bedingungen, wie z.B. der untersuchten Spezies, deren Geschlecht und der Spezifität und Sensitivität der Arbeitsmethoden und -materialien, resultieren könnten, zeigten die Ergebnisse der organspezifischen Expression von HIF-2 $\alpha$ , dass die Redundanz in der Induktion und damit der Funktion von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  gering ist. Es ist anzunehmen, dass beide Isoformen komplementäre Funktionen in der koordinierten transkriptionellen Antwort auf Hypoxie haben. Unter *in vitro* Bedingungen sind beide Isoformen in der Lage, an das HRE der Zielgene zu binden. Im Gegensatz zu HIF-1 $\alpha$  wird allerdings die DNA-Bindung von HIF-2 $\alpha$  zusätzlich durch einen Redoxmechanismus kontrolliert (Lando et al., 2000). Dadurch könnten unterschiedliche Funktionen erzielt werden, selbst in Zellen, die beide HIF-Isoformen aktivieren können.

#### **5.4 Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde die organspezifische Expression des Hypoxie-induzierbaren Faktors-2 $\alpha$  im lebenden Organismus untersucht. Erkenntnisse über das Verteilungsmuster der Hypoxie-induzierbaren Faktoren *in vivo* stellen einen wichtigen Schritt zum grundlegenden Verständnis dieses Systems dar. Möglicherweise können mit diesen Grundlagen Ziele zur therapeutischen Intervention definiert und danach entsprechende Therapeutika entwickelt werden. Denkbar wäre hier unter anderem die Stabilisierung von HIF bei Erkrankungen, die mit einer Gewebeschämie einhergehen. Auf diese Weise kann eine stärkere Hochregulation der HIF-Zielgene erreicht werden. Es gibt bereits erste Hinweise, dass durch Präkonditionierung mit dem HIF-Zielgen EPO potentiell gewebsschutzende Effekte erzielt

werden können (Cai et al., 2003).

Ein wesentlicher Befund der vorliegenden Arbeit ist die differente, zellspezifische Expression der HIF $\alpha$ -Isoformen. Es ist nahe liegend, dass der Organismus über diese definierte Expression unterschiedliche biologische Funktionen ausüben kann. Neuere Daten aus unserem Labor, aber auch anderer Arbeitsgruppen, belegen zudem eine Zielgen-spezifische Transaktivierung durch die beiden verschiedenen HIF $\alpha$ -Isoformen *in vitro* (Warnecke et al., 2004). *In vivo* Experimente mit homozygoten Knockouts der beiden HIF $\alpha$ -Isoformen hatten zu unterschiedlichen, meist bereits in der Embryonalphase letalen Phänotypen geführt (Compernelle et al., 2002 et al., 1998; Peng et al., 2000; Ryan et al., 1998; Tian et al., 1998). Erst kürzlich wurde ein Überleben von HIF-2 $\alpha$ -Knockouts mit entsprechenden pathologischen Organveränderungen erstmals gezeigt (Scortegagna et al., 2003). Dies belegt, dass HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in ihrer Funktion nicht redundant sind. Es steht zu hoffen, dass die detailliertere Kenntnis der Komplexität dieser Regulationssysteme für gezielte Interaktions-Strategien genutzt werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zusammen mit weiteren Daten unserer Arbeitsgruppe, dass die renalen peritubulären Zellen lediglich HIF-2 $\alpha$  nicht aber HIF-1 $\alpha$  exprimieren (Rosenberger et al., 2002). Diese Zellen sind maßgeblich für die Produktion von Erythropoietin verantwortlich (Bachmann et al., 1993; Maxwell et al., 1993). Bereits aus diesen Daten kann also vermutet werden, dass die Regulation der Erythropoiese bei Ratten entscheidend von der Aktivierung von HIF-2 $\alpha$  abhängig ist. Dieser Befund konnte in der Zellkultur durch „Knockdown“-Experimente bestätigt werden (Warnecke et al., 2004). Wenn also die Modulation von HIF als eine denkbare Strategie zur Anämie-Therapie erfolgreich sein soll, so müssen Wege gefunden werden, spezifisch HIF-2 $\alpha$  in diesen Zellen zu aktivieren. Unerwünschte Auswirkungen der Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  könnten dadurch umgangen werden.

Die Hemmung der destruierenden Prolylhydroxylasen (PHD) bietet eine Möglichkeit, die HIF-Isoformen in Normoxie zu stabilisieren. Sogar eine selektive Beeinflussung ist denkbar, da Appelhoff et al. die unterschiedlichen Affinitäten der PHDs zu den HIF-Isoformen nachgewiesen hat (Appelhoff et al., 2004). Von unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PHDs durch pharmakologische Intervention zur Induktion von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und deren Zielgenen *in vitro* und *in vivo* führt. Die Stabilisierung von HIF in diesem pharmakologischen Ansatz führt zur Neubildung intakter Gefäße in dem „Ratten-Schwamm-Modell“ (Warnecke et al., 2003). Vergleichbare Ergebnisse konnten Willam et al.

beschreiben, die HIF $\alpha$  mit synthetischen Peptiden der ODDD (Region der Hydroxylierung der Prolylreste) in Zellkulturen und Tierversuchen stabilisierten (Willam et al., 2002). In einem transgenen Ansatz untersuchten Elson et al. die Auswirkung einer HIF-Überexpression auf die Gefäßneubildung. Hier wurden transgene Mäuse mit einem unter Normoxie stabil-aktiven HIF-1 $\alpha$  in der Epidermis generiert. Phänotypisch zeigten diese Tiere eine Hypervaskularisierung aus intakten Gefäßen und hatten keine Ödeme oder Entzündungen, wie dies bei VEGF-transgenen Mäusen der Fall war (Elson et al., 2001). Die alleinige Überexpression des HIF-Zielgens VEGF führt nur zur Ausbildung unreifer, ungeordneter und durchlässiger Gefäße (Baumgartner et al., 1998; Flamme et al., 1995; Lee et al., 2000). Offensichtlich kann die Aktivierung von HIF die Bildung intakter Gefäße induzieren. Möglicherweise ist daher die Beeinflussung von HIF als übergeordneter Transkriptionsfaktor ein geeigneterer Ansatzpunkt zur therapeutischen Intervention als die Modulation einzelner Zielgene.

Aufgrund der breiten Bedeutung von HIF ist allerdings das potentielle Spektrum der unerwünschten Nebenwirkungen bei einer Modulation dieses Systems nicht zu unterschätzen. Im Rahmen der Tumorbiologie spielt HIF wahrscheinlich eine große Rolle, nicht nur für das Tumorstadium, sondern möglicherweise auch für die Tumorentstehung (Acker und Plate, 2002). Diese Überlegungen führten zu Bemühungen, HIF bei Tumorerkrankungen zu blockieren. Bei der Zielsetzung, HIF bei ischämischen oder hypoxischen Erkrankungen zu aktivieren, müssen diese wichtigen Auswirkungen daher bedacht werden. Der Einsatz von PHD-Inhibitoren birgt zudem die Gefahr der Beeinträchtigung des Kollagen-Stoffwechsels. Wünschenswert ist daher die Entwicklung lokal applizierbarer und zeitlich begrenzter Strategien.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Erkenntnisse über den Hypoxie-induzierbaren Faktor HIF-2 $\alpha$ , die bisher im wesentlichen in Zellkultur-Untersuchungen gewonnen wurden, durch Untersuchungen über seine Verteilung in den verschiedenen Organen eines lebenden Organismus ergänzt und Daten zum Expressionsmuster gewonnen. Der Nachweis von HIF-2 $\alpha$  unter entsprechenden Stimulationsbedingungen (Hypoxie) gelang u.a. in Gehirn, Herz und Darm. Dies zeigt, dass in diesen Organen eine adaptive Antwort auf Gewebshypoxie durch das HIF-System vermittelt wird. Durch pharmakologische Beeinflussung, die zu einer frühzeitigeren oder länger anhaltenden, bzw. stärkeren Aktivierung des HIF-Systems führt, könnte eine neuartige Therapieform entwickelt werden. Sollte es gelingen, solche Pharmaka

am Ort der Schädigung zu applizieren bzw. den Transport dorthin zu gewährleisten, so könnte man über eine Induktion von Gefäßbildung ischämische Bezirke vor dem drohenden Zelluntergang bewahren.

## 6 Zusammenfassung

Sauerstoffmangel spielt in der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen mit großer klinischer Relevanz wie z.B. Herzinfarkte und Schlaganfälle eine zentrale Rolle. Eine Anpassung an Hypoxie wird durch die Familie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) vermittelt. Als Transkriptionsfaktoren sind HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  entscheidende Regulatoren von Genen, die durch niedrige O<sub>2</sub>-Spannung aktiviert werden und Anpassungen wie z.B. Angiogenese (VEGF) und Umstellung auf anaeroben Energiemetabolismus (glykolytische Enzyme) bewirken. HIF ist ein Heterodimer, bestehend aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit. Während die  $\beta$ -Untereinheit konstitutiv präsent ist, repräsentiert die  $\alpha$ -Untereinheit die O<sub>2</sub>-regulierte Komponente von HIF, welche unter normoxischen Bedingungen proteasomal degradiert wird. Unter hypoxischen Bedingungen werden beide Faktoren in Zelllinien stabilisiert. Das gleiche gilt für HIF-1 $\alpha$  *in vivo*. Bisher waren die Organe und Zellen der Expression von HIF-2 $\alpha$  im lebenden Organismus unbekannt. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich daher auf die Charakterisierung der HIF-2 $\alpha$ -Expression *in vivo*. Unter normoxischen Kontrollbedingungen war HIF-2 $\alpha$  nicht nachweisbar. Es zeigte sich jedoch nach Stimulation mit 0,1 % CO (funktionelle Anämie) eine Induktion von HIF-2 $\alpha$  in allen untersuchten Organen einschließlich Hirn, Leber, Lunge, Darm, Herz und Niere. Sowohl der zeitliche Verlauf des Anstiegs (1-6 Stunden) als auch die Intensität der Induktion variierten in den einzelnen Organen, was durch Immunoblotting nachgewiesen werden konnte. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, in welchen Zellen der verschiedenen Gewebe eine nukleäre Akkumulation von HIF-2 $\alpha$  erfolgte. In Niere und Hirn erfolgte eine Induktion in nicht-parenchymatösen Zellen, in Leber und Darm hingegen fand sich eine vorwiegende Expression in parenchymatösen Zellen. Eine gleiche Verteilung zwischen den beiden verschiedenen Zelltypen fand sich im Herz. Durch Untersuchungen der mRNA mittels RNA Protection Assay konnte bestätigt werden, dass die Regulation von HIF-2 $\alpha$  posttranslational erfolgt, da keine Hochregulation der mRNA festgestellt werden konnte. Die Daten zeigen, dass HIF-2 $\alpha$  eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Antwort auf verminderte O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit *in vivo* spielt und dass seine Rolle zu der von HIF-1 $\alpha$  verschieden ist.

## 7 Literaturverzeichnis

- Acker, T. und Plate, K.H. (2002): A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology, *J Mol Med* (Band 80), Nr. 9, Seite 562-575. URL: PM:12226738
- Akeno, N.; Czyzyk-Krzeska, M.F.; Gross, T.S. und Clemens, T.L. (2001): Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia-inducible factor-2alpha, *Endocrinology* (Band 142), Nr. 2, Seite 959-962. URL: PM:11159870
- Appelhoff, R. J.; Tian, Y. M.; Raval, R. R.; Turley, H.; Harris, A. L.; Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J. und Gleadle, J. M. (2004): Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 37, Seite 38458-65.
- Bachmann, S.; Le Hir, M. und Eckardt, K.-U. (1993): Colocalization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (Band 41), Seite 335-341.
- Baumgartner, I.; Pieczek, A.; Manor, O.; Blair, R.; Kearney, M.; Walsh, K. und Isner, J.M. (1998): Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia 12, *Circulation* (Band 97), Nr. 12, Seite 1114-1123. URL: PM:9537336
- Beck, I.; Ramirez, S.; Weinmann, R. und Caro, J. (1991): Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene, *J Biol Chem* (Band 266), Nr. 24, Seite 15563-15566. URL: PM:1874713
- Bergeron, M.; Gidday, J.M.; Yu, A.Y.; Semenza, G.L.; Ferriero, D.M. und Sharp, F.R. (2000): Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain, *Ann Neurol* (Band 48), Nr. 3, Seite 285-296. URL: PM:10976634
- Bergeron, M.; Yu, A.Y.; Solway, K.E.; Semenza, G.L. und Sharp, F.R. (1999): Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain, *Eur J Neurosci* (Band 11), Nr. 12, Seite 4159-4170. URL: PM:10594641
- Bruick, R.K. und McKnight, S.L. (2001): A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF, *Science* (Band 294), Nr. 5545, Seite 1337-1340. URL: PM:11598268
- Brusselmans, K.; Bono, F.; Maxwell, P.; Dor, Y.; Dewerchin, M.; Collen, D.; Herbert, J.M. und Carmeliet, P. (2001): Hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 42, Seite 39192-39196. URL: PM:11546756

- Brusselmans, K.; Compornolle, V.; Tjwa, M.; Wiesener, M. S.; Maxwell, P. H.; Collen, D. und Carmeliet, P. (2003): Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia, *J Clin Invest* (Band 111), Nr. 10, Seite 1519-27.
- Cai, Z.; Manalo, D. J.; Wei, G.; Rodriguez, E. R.; Fox-Talbot, K.; Lu, H.; Zweier, J. L. und Semenza, G. L. (2003): Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury, *Circulation* (Band 108), Nr. 1, Seite 79-85.
- Chavez, J.C.; Agani, F.; Pichiule, P. und LaManna, J.C. (2000): Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the brain of rats during chronic hypoxia, *J Appl Physiol* (Band 89), Nr. 5, Seite 1937-1942. URL: PM:11053346
- Cockman, M.E.; Masson, N.; Mole, D.R.; Jaakola, P.; Chang, G.W.; Clifford, S.C.; Maher, E.R.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. und Maxwell, P.H.. (2000): Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, *Journal of Biological Chemistry* (Band 275), Seite 25733-25741.
- Compornolle, V.; Brusselmans, K.; Acker, T.; Hoet, P.; Tjwa, M.; Beck, H.; Plaisance, S.; Dor, Y.; Keshet, E.; Lupu, F.; Nemery, B.; Dewerchin, M.; Van Veldhoven, P.; Plate, K.; Moons, L.; Collen, D. und Carmeliet, P. (2002): Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice, *Nat Med* (Band 8), Nr. 7, Seite 702-710. URL: PM:12053176
- Crews, S.T. und Fan, C.M. (1999): Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins, *Curr Opin Genet Dev* (Band 9), Nr. 5, Seite 580-587. URL: PM:10508688
- D'Angelo, G.; Duplan, E.; Boyer, N.; Vigne, P. und Frelin, C. (2003): Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 40, Seite 38183-7.
- Eckardt, K.U.; Dittmer, J.; Neumann, R.; Bauer, C. und Kurtz, A. (1990): Decline of erythropoietin formation at continuous hypoxia is not due to feedback inhibition, *Am J Physiol* (Band 258), Nr. 5 Pt 2, Seite F1432-F1437. URL: PM:2337157
- Eckardt, K.U.; Ratcliffe, P.J.; Tan, C.C.; Bauer, C. und Kurtz, A. (1992): Age-dependent expression of the erythropoietin gene in rat liver and kidneys, *J Clin Invest* (Band 89), Seite 753-760.
- Elson, D.A.; Thurston, G.; Huang, L.E.; Ginzinger, D.G.; McDonald, D.M.; Johnson, R.S. und Arbeit, J.M. (2001): Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha, *Genes Dev* (Band 15), Nr. 19, Seite 2520-2532. URL: PM:11581158

- Ema, M.; Taya, S.; Yokotani, N.; Sogawa, K.; Matsuda, Y. und Fujii-Kuriyama, Y. (1997): A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development, *Proc Natl Acad Sci USA* (Band 94), Nr. 9, Seite 4273-4278. URL: PM:9113979
- Epstein, A.C.; Gleadle, J.M.; McNeill, L.A.; Hewitson, K.S.; O'Rourke, J.; Mole, D.R.; Mukherji, M.; Metzen, E.; Wilson, M.I.; Dhanda, A.; Tian, Y.M.; Masson, N.; Hamilton, D.L.; Jaakkola, P.; Barstead, R.; Hodgkin, J.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W.; Schofield, C.J. und Ratcliffe, P.J. (2001): C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation, *Cell* (Band 107), Nr. 1, Seite 43-54. URL: PM:11595184
- Feldser, D.; Agani, F.; Iyer, N.V.; Pak, B.; Ferreira, G. und Semenza, G.L. (1999): Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha and insulin-like growth factor 2, *Cancer Res* (Band 59), Seite 3915-3918.
- Flamme, I.; Fröhlich, T.; von Reutern, M.; Kappel, A.; Damert, A. und Risau, W. (1997): HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels, *Mechan Develop* (Band 63), Seite 51-60.
- Flamme, I.; von Reutern, M.; Drexler, H.C.; Syed-Ali, S. und Risau, W. (1995): Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation, *Dev Biol* (Band 171), Nr. 2, Seite 399-414. URL: PM:7556923
- Garayoa, M.; Martinez, A.; Lee, S.; Pio, R.; An, W.G.; Neckers, L.; Trepel, J.; Montuenga, L.M.; Ryan, H.; Johnson, R.; Gassmann, M. und Cuttitta, F. (2000): Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis, *Mol Endocrinol* (Band 14), Nr. 6, Seite 848-862. URL: PM:10847587
- Giatromanolaki, A.; Koukourakis, M.I.; Sivridis, E.; Turley, H.; Talks, K.; Pezzella, F.; Gatter, K.C. und Harris, A.L. (2001): Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival, *Br J Cancer* (Band 85), Nr. 6, Seite 881-890. URL: PM:11556841
- Gnarra, J.R.; Zhou, S.; Merrill, M.J.; Wagner, J.R.; Krumm, A.; Papavassiliou, E.; Oldfield, E.H.; Klausner, R.D. und Linehan, W.M. (1996): Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Band 93), Seite 10589-10594.

- Gu, Y.Z.; Moran, S.M.; Hogenesch, J.B.; Wartman, L. und Bradfield, C.A. (1998): Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha, *Gene Expr* (Band 7), Nr. 3, Seite 205-213. URL: PM:9840812
- Hewitson, K.S.; McNeill, L.A.; Riordan, M.V.; Tian, Y.M.; Bullock, A.N.; Welford, R.W.; Elkins, J.M.; Oldham, N.J.; Bhattacharya, S.; Gleadle, J.M.; Ratcliffe, P.J.; Pugh, C.W. und Schofield, C.J. (2002): Hypoxia-inducible Factor (HIF) Asparagine Hydroxylase Is Identical to Factor Inhibiting HIF (FIH) and Is Related to the Cupin Structural Family, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 29, Seite 26351-26355. URL: PM:12042299
- Hofbauer, K.H.; Jensen, B.L.; Kurtz, A. und Sandner, P. (2000): Tissue hypoxigenation activates the adrenomedullin system in vivo, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (Band 278), Nr. 2, Seite R513-R519. URL: PM:10666155
- Hoffman, E. C.; Reyes, H.; Chu, F. F.; Sander, F.; Conley, L. H.; Brooks, B. A. und Hankinson, O. (1991): Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor, *Science* (Band 252), Nr. 5008, Seite 954-8.
- Hogenesch, J.B.; Chan, W.K.; Jackiw, V.H.; Brown, R.C.; Gu, Y.-Z.; Pray-Grant, M.; Perdew, G.H. und Bradfield, C.A. (1997): Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway, *Journal of Biological Chemistry* (Band 272), Seite 8581-8593.
- Huang, L.E.; Arany, Z.; Livingston, D.M. und Bunn, H.F. (1996): Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 50, Seite 32253-32259. URL: PM:8943284
- Iliopoulos, O.; Levy, A.P.; Jiang, C.; Kaelin, W.G.Jr. und Goldberg, M.A. (1996): Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Band 93), Seite 10595-10599.
- Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M.; Salic, A.; Asara, J.M.; Lane, W.S. und Kaelin Jr, W.G. (2001): HIFalpha Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> Sensing, *Science* (Band 292), Nr. 5516, Seite 464-468. URL: PM:11292862
- Iyer, N.V.; Kotch, L.E.; Agani, F.; Leung, S.W.; Laughner, E.; Wenger, R.H.; Gassmann, M.; Gearhart, J.D.; Lawler, A.M.; Yu, A.Y. und Semenza, G.L. (1998): Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha, *Genes & Development* (Band 12), Nr. 2, Seite 149-162. URL: PM:9436976

- Jaakkola, P.; Mole, D.R.; Tian, Y.M.; Wilson, M.I.; Gielbert, J.; Gaskell, S.J.; Kriegsheim, Av A.; Hebestreit, H.F.; Mukherji, M.; Schofield, C.J.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W. und Ratcliffe, P.J. (2001): Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O<sub>2</sub>-Regulated Prolyl Hydroxylation, *Science* (Band 292), Nr. 5516, Seite 468-472. URL: PM:11292861
- Jiang, B.H.; Rue, E.; Wang, G.L.; Roe, R. und Semenza, G.L. (1996): Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia- inducible factor 1, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 30, Seite 17771-17778. URL: PM:8663540
- Jin, K.L.; Mao, X.O.; Nagayama, T.; Goldsmith, P.C. und Greenberg, D.A. (2000): Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by global ischemia in rat brain, *Neuroscience* (Band 99), Nr. 3, Seite 577-585. URL: PM:11029549
- Kaelin, W. G., Jr. (2003): The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing, *J Am Soc Nephrol* (Band 14), Nr. 11, Seite 2703-11.
- Kallio, P.J.; Wilson, W.J.; O'Brien, S.; Makino, Y. und Poellinger, L. (1999): Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1  $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway, *Journal of Biological Chemistry* (Band 274), Seite 6519-6525.
- Kline, D.D.; Peng, Y.J.; Manalo, D.J.; Semenza, G.L. und Prabhakar, N.R. (2002): Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ , *Proc Natl Acad Sci USA* (Band 99), Nr. 2, Seite 821-826. URL: PM:11792862
- Koury, S.T.; Bondurant, M.C.; Koury, M.J. und Semenza, G.L. (1991): Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization 1, *Blood* (Band 77), Nr. 11, Seite 2497-2503. URL: PM:2039831
- Krieg, M.; Haas, R.; Brauch, H.; Acker, T.; Flamme, I. und Plate, K.H. (2000): Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function, *Oncogene* (Band 19), Nr. 48, Seite 5435-5443. URL: PM:11114720
- Lando, D.; Peet, D.J.; Gorman, J.J.; Whelan, D.A.; Whitelaw, M.L. und Bruick, R.K. (2002a): FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor, *Genes & Development* (Band 16), Nr. 12, Seite 1466-1471. URL: PM:12080085
- Lando, D.; Peet, D.J.; Whelan, D.A.; Gorman, J.J. und Whitelaw, M.L. (2002b): Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch 1, *Science* (Band 295), Nr. 5556, Seite 858-861. URL: PM:11823643

- Lando, D.; Pongratz, I.; Poellinger, L. und Whitelaw, M.L. (2000): A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha and the HIF-like factor, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 7, Seite 4618-4627. URL: PM:10671489
- Lee, R.J.; Springer, M.L.; Blanco-Bose, W.E.; Shaw, R.; Ursell, P.C. und Blau, H.M. (2000): VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression, *Circulation* (Band 102), Nr. 8, Seite 898-901. URL: PM:10952959
- Leek, R.D.; Talks, K.L.; Pezzella, F.; Turley, H.; Campo, L.; Brown, N.S.; Bicknell, R.; Taylor, M.; Gatter, K.C. und Harris, A.L. (2002): Relation of Hypoxia-inducible Factor-2alpha (HIF-2alpha) Expression in Tumor-infiltrative Macrophages to Tumor Angiogenesis and the Oxidative Thymidine Phosphorylase Pathway in Human Breast Cancer, *Cancer Res* (Band 62), Nr. 5, Seite 1326-1329. URL: PM:11888900
- Lubbers, D.W. und Baumgartl, H. (1997): Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO<sub>2</sub> distribution in the living tissue, *Kidney International* (Band 51), Nr. 2, Seite 372-380. URL: PM:9027709
- Maemura, K.; Hsieh, C.M.; Jain, M.K.; Fukumoto, S.; Layne, M.D.; Liu, Y.; Kourembanas, S.; Yet, S.F.; Perrella, M.A. und Lee, M.E. (1999): Generation of a dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 44, Seite 31565-31570. URL: PM:10531360
- Mahon, P.C.; Hirota, K. und Semenza, G.L. (2001): FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity, *Genes & Development* (Band 15), Nr. 20, Seite 2675-2686. URL: PM:11641274
- Masson, N.; Willam, C.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W. und Ratcliffe, P.J. (2001): Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation, *EMBO J* (Band 20), Nr. 18, Seite 5197-5206. URL: PM:11566883
- Maxwell, P.H.; Osmond, M.K.; Pugh, C.W.; Heryet, A.; Nicholls, L.G.; Tan, C.C.; Doe, B.G.; Ferguson, D.J.P.; Johnson, M.H. und Ratcliffe, P.J. (1993a): Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice, *Kidney International* (Band 44), Seite 1149-1162.
- Maxwell, P.H.; Pugh, C.W. und Ratcliffe, P.J. (1993b): Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Band 90), Seite 2423-2427.
- Maxwell, P.H.; Wiesener, M.S.; Chang, G.-W.; Clifford, S.C.; Vaux, E.C.; Cockman, M.E.; Wykoff, C.C.; Pugh, C.W.; Maher, E.R. und Ratcliffe, P.J. (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature* (Band 399), Seite 271-275.

- Metzen, E.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Stengel, P.; Marxsen, J. H.; Stolze, I.; Klinger, M.; Huang, W. Q.; Wotzlaw, C.; Hellwig-Burgel, T.; Jelkmann, W.; Acker, H. und Fandrey, J. (2003): Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing, *J Cell Sci* (Band 116), Nr. Pt 7, Seite 1319-26.
- O'Rourke, J.F.; Tian, Y.M.; Ratcliffe, P.J. und Pugh, C.W. (1999): Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 4, Seite 2060-2071. URL: PM:9890965
- Ohh, M.; Park, C.W.; Ivan, M.; Hoffman, M.A.; Kim, T.Y.; Huang, L.E.; Pavletich, N.; Chau, V. und Kaelin, W.G.Jr. (2000): Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein, *Nat Cell Biol* (Band 2), Seite 423-427.
- Onita, T.; Ji, P.G.; Xuan, J.W.; Sakai, H.; Kanetake, H.; Maxwell, P.H.; Fong, G.H.; Gabril, M.Y.; Moussa, M. und Chin, J.L. (2002): Hypoxia-induced, perinecrotic expression of endothelial Per-ARNT-Sim domain protein-1/hypoxia-inducible factor-2alpha correlates with tumor progression, vascularization, and focal macrophage infiltration in bladder cancer, *Cancer Res* (Band 8), Nr. 2, Seite 471-480. URL: PM:11839666
- Ozaki, H.; Yu, A.Y.; Della, N.; Ozaki, K.; Luna, J.D.; Yamada, H.; Hackett, S.F.; Okamoto, N.; Zack, D.J.; Semenza, G.L. und Campochiaro, P.A. (1999): Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression, *Invest Ophthalmol Vis Sci* (Band 40), Nr. 1, Seite 182-189. URL: PM:9888442
- Peng, J.; Zhang, L.; Drysdale, L. und Fong, G.H. (2000): The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Band 97), Nr. 15, Seite 8386-8391. URL: PM:10880563
- Pugh, C.W.; Tan, C.C.; Jones, R.W. und Ratcliffe, P.J. (1991): Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Band 88), Nr. 23, Seite 10553-10557. URL: PM:1961720
- Rosenberger, C.; Mandriota, S.; Jurgensen, J.S.; Wiesener, M.S.; Horstrup, J.H.; Frei, U.; Ratcliffe, P.J.; Maxwell, P.H.; Bachmann, S. und Eckardt, K.U. (2002): Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys, *Journal of the American Society of Nephrology* (Band 13), Nr. 7, Seite 1721-1732. URL: PM:12089367
- Ryan, H.E.; Lo, J. und Johnson, R.S. (1998): HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization, *EMBO J* (Band 17), Seite 3005-3015.

- Sandau, K.B.; Fandrey, J. und Brune, B. (2001): Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide, *Blood* (Band 97), Nr. 4, Seite 1009-1015. URL: PM:11159530
- Scortegagna, M.; Ding, K.; Oktay, Y.; Gaur, A.; Thurmond, F.; Yan, L.J.; Marck, B.T.; Matsumoto, A.M.; Shelton, J.M.; Richardson, J.A.; Bennett, M.J. und Garcia, J.A. (2003): Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1(-/-)* mice, *Nat Genet* (Band 35), Seite 331-340 URL: PM:14608355
- Semenza, G.L.; Nejfelt, M.K.; Chi, S.M. und Antonarakis, S.E. (1991): Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene, *Proc Natl Acad Sci USA* (Band 88), Nr. 13, Seite 5680-5684. URL: PM:2062846
- Semenza, G.L. und Wang, G.L. (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol Cell Biol* (Band 12), Nr. 12, Seite 5447-5454. URL: PM:1448077
- Shimoda, L.A.; Manalo, D.J.; Sham, J.S.; Semenza, G.L. und Sylvester, J.T. (2001): Partial HIF-1alpha deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 281), Nr. 1, Seite L202-L208. URL: PM:11404263
- Stroka, D.M.; Burkhardt, T.; Desbaillets, I.; Wenger, R.H.; Neil, D.A.; Bauer, C.; Gassmann, M. und Candinas, D. (2001): HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia, *Faseb J* (Band 15), Nr. 13, Seite 2445-2453. URL: PM:11689469
- Talks, K.L.; Turley, H.; Gatter, K.C.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. und Harris, A.L. (2000): The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2 alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages, *Am J Pathol* (Band 157), Seite 411-421.
- Tanimoto, K.; Makino, Y.; Pereira, T. und Poellinger, L. (2000): Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, *EMBO J* (Band 19), Seite 4298-4309.
- Tian, H.; Hammer, R.E.; Matsumoto, A.M.; Russell, D.W. und McKnight, S.L. (1998): The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development, *Genes & Development* (Band 12), Nr. 21, Seite 3320-3324. URL: PM:9808618
- Tian, H.; McKnight, S.L. und Russell, D.W. (1997): Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells, *Genes & Development* (Band 11), Seite 72-82.

- Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A. und Semenza, G.L. (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Band 92), Nr. 12, Seite 5510-5514. URL: PM:7539918
- Wang, G.L. und Semenza, G.L. (1993): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Band 90), Seite 4304-4308.
- Wang, G.L. und Semenza, G.L. (1995): Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1, *Journal of Biological Chemistry* (Band 270), Nr. 3, Seite 1230-1237.
- Warnecke, C.; Griethe, W.; Weidemann, A.; Jurgensen, J. S.; Willam, C.; Bachmann, S.; Ivashchenko, Y.; Wagner, I.; Frei, U.; Wiesener, M. und Eckardt, K. U. (2003): Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors, *Faseb J* (Band 17), Nr. 9, Seite 1186-8.
- Warnecke, C.; Zaborowska, Z.; Kurreck, J.; Erdmann, V. A.; Frei, U.; Wiesener, M. und Eckardt, K. U. (2004): Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 $\alpha$  target gene in Hep3B and Kelly cells, *Faseb J* (Band 18), Nr. 12, Seite 1462-4.
- Wenger, R.H. (2002): Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression, *Faseb J* (Band 16), Nr. 10, Seite 1151-1162. URL: PM:12153983
- Wenger, R.H.; Rolfs, A.; Marti, H.H.; Guenet, J.L. und Gassmann, M. (1996): Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ , *Biochem Biophys Res Commun* (Band 223), Seite 54-59.
- Wenger, R.H.; Rolfs, A.; Spielmann, P.; Zimmermann, D.R. und Gassmann, M. (1998): Mouse hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is encoded by two different mRNA isoforms: expression from a tissue-specific and a housekeeping-type promoter, *Blood* (Band 91), Nr. 9, Seite 3471-3480. URL: PM:9558407
- Wiener, C.M.; Booth, G. und Semenza, G.L. (1996): In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 225), Nr. 2, Seite 485-488. URL: PM:8753788
- Wiesener, M.S.; Turley, H.; Allen, W.E.; Willam, C.; Eckardt, K.-U.; Talks, K.L.; Wood, S.M.; Gatter, K.C.; Harris, A.L.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. und Maxwell, P.H. (1998): Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , *Blood* (Band 92), Seite 2260-2268.

- Willam, C.; Masson, N.; Tian, Y.M.; Mahmood, S.A.; Wilson, M.I.; Bicknell, R.; Eckardt, K.U.; Maxwell, P.H.; Ratcliffe, P.J. und Pugh, C.W. (2002): Peptide blockade of HIFalpha degradation modulates cellular metabolism and angiogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Band 99), Nr. 16, Seite 10423-10428. URL: PM:12149454
- Xia, G.; Kageyama, Y.; Hayashi, T.; Kawakami, S.; Yoshida, M. und Kihara, K. (2001): Regulation of vascular endothelial growth factor transcription by endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) and possible involvement of EPAS1 in the angiogenesis of renal cell carcinoma, *Cancer* (Band 91), Nr. 8, Seite 1429-1436. URL: PM:11301389
- Yu, A.Y.; Frid, M.G.; Shimoda, L.A.; Wiener, C.M.; Stenmark, K. und Semenza, G.L. (1998): Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung, *Am J Physiol* (Band 275), Nr. 4 Pt 1, Seite L818-L826. URL: PM:9755115
- Yu, A.Y.; Shimoda, L.A.; Iyer, N.V.; Huso, D.L.; Sun, X.; McWilliams, R.; Beaty, T.; Sham, J.S.; Wiener, C.M.; Sylvester, J.T. und Semenza, G.L. (1999): Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha, *J Clin Invest* (Band 103), Nr. 5, Seite 691-696. URL: PM:10074486
- Zelzer, E.; Levy, Y.; Kahana, C.; Shilo, B.Z.; Rubinstein, M. und Cohen, B. (1998): Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia- inducible factor HIF-1alpha/ARNT, *EMBO J* (Band 17), Nr. 17, Seite 5085-5094. URL: PM:9724644

## **8 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst ohne die unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel verfasst wurde. Sie besteht auch nicht anteilig aus Kopien anderer Arbeiten. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht und die Literatur ist vollständig angegeben.

Charlotte Scholze

---

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Charlotte Karin Scholze  
Geburtsdatum: 14.01.1978  
Geburtsort: Berlin  
Nationalität: deutsch  
Eltern: Bernd und Dr. Karin Scholze

### Schulbildung

1984-1990 Juri-Gagarin-Oberschule (Grundschule) in Berlin  
1990-1994 Bühring-Oberschule (Gymnasium) in Berlin  
1994-1995 Auslandsaufenthalt in den USA  
1995-1998 Pestalozzi-Oberschule (Gymnasium) in Berlin  
1998 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulbildung

WS 1998/1999 Immatrikulation an der Humboldt-Universität in Berlin im Studiengang Humanmedizin  
Oktober 2000 Ärztliche Vorprüfung  
August 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Sommersemester 2003 Erasmus-Auslandsstudium in Linköping/Schweden  
März 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Dezember 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## 10 Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation und die fachliche Unterstützung möchte ich Herrn Prof. Dr. Kai-Uwe Eckardt und Herrn PD Dr. Michael Wiesener sehr herzlich danken.

Mein Dank gilt in besonderem Maße Herrn PD Dr. Michael Wiesener für seine hervorragende Betreuung, die zahlreichen wertvollen Hinweise und Anregungen sowohl während der Laborarbeit als auch bei der Zusammenstellung der Ergebnisse, sowie für die Hilfe bei den zahlreichen Fragen, die im Laufe der Zeit auftraten.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Jan-Steffen Jürgensen und Dr. Christian Rosenberger für die sehr umfassende und freundliche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Tierexperimente und der Immunhistochemie. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Dr. Alexander Weidemann für seine zahlreichen Anmerkungen, vielseitigen Hilfestellungen und persönlichen Aufmunterungen, die einen maßgeblichen Beitrag zum Gelingen der Arbeit geliefert haben.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und engagierte Kooperationsbereitschaft gegenüber Fragen.

Meinen Eltern möchte ich sehr herzlich für ihre immerwährende Unterstützung und Motivation sowohl im Verlauf des Studiums als auch bei dieser Dissertation danken.