

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Nephrologie und internistische Intensivmedizin
Charité, Campus Virchow Klinikum
Medizinische Fakultät der Humboldt Universität Berlin
(Direktor: Professor Dr. med. U. Frei)

**Mechanismen und Konsequenzen
sauerstoffabhängiger Genregulation**

kumulative

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Experimentelle Nephrologie

an der
Charité
Medizinische Fakultät
der
Humboldt Universität Berlin

vorgelegt von
Dr. med. Michael S. Wiesener

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. J. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Haller, Hannover
2. Prof. Dr. med. A. Kurtz, Regensburg

eingereicht im Januar 2003

öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 23.10.2003

für Antje,
Lena, Niklas und Tristan

Inhaltsverzeichnis:

Seite:

1. Einleitung:

1.1.	Bedeutung des Sauerstoffs	1
1.2.	Erythropoietin als Modell hypoxisch regulierter Genexpression	2
1.3.	Identifikation von „Hypoxia-inducible Factor 1“ (HIF-1)	3
1.4.	Weitreichende Bedeutung von HIF	4
1.5.	Struktur und Regulation von HIF	6
1.6.	Zusammenfassung der Ausgangsbefunde und offene Fragen	8

2. Kurze Darstellung eigener Originalarbeiten

in chronologischer Reihenfolge

2.1.	J Biol Chem 1998;273(14):8360-8	10
2.2.	Blood 1998;92(7):2260-8	10
2.3.	Nature 1999; 399(6733):271-5	11
2.4.	Mol Med. 2001;7(10):685-97	12
2.5.	Cancer Res. 2001;61(13):5215-22	12
2.6.	Blood. 2002;99(10):3562-5.	13
2.7.	Blood. 2002;100(8):3008-16	14
2.8.	Cancer Res. 2002;62(13):3803-11	14
2.9.	J Am Soc Nephrol 2002; 13(7):1974-6	15
2.10.	FASEB J. 2003;17(2):271-3	16

3.	Diskussion	
	3.1. Sauerstoffabhängige Regulation von HIFα	
	3.1.1. Das VHL Syndrom	17
	3.1.2. Die Bedeutung von VHL für die Degradation von HIF	18
	3.1.3. Molekulare Grundlagen der Interaktion zw. VHL und HIF	20
	3.2. Funktionelle Bedeutung unterschiedlicher HIFα Isoformen	
	3.2.1. HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α	22
	3.2.2. Generierung und Charakterisierung HIF α defizienter Zellen	23
	3.2.3. HIF α defiziente Tiere („Knockouts“)	26
	3.2.4. Vergleich der Expression von HIF-1 α und HIF-2 α	27
	3.2.4.1. Experimente in Zelllinien	27
	3.2.4.2. Expression von HIF-1 α und HIF-2 α <i>in vivo</i>	29
	3.3. Expression von HIF unter pathophysiologischen Bedingungen	
	3.3.1. Ischämische und entzündliche Erkrankungen	33
	3.3.2. Tumorerkrankungen	35
	3.3.2.1. Solide Tumoren	37
	3.3.2.2. VHL assoziierte Tumoren	37
	3.4. Perspektiven therapeutischer Beeinflussung des HIF Systems	
	3.4.1. Überexpression von HIF bei ischämischen Erkrankungen	42
	3.4.2. Blockade von HIF in Tumoren	44
4.	Zusammenfassung	47
5.	Literaturverzeichnis	52
6.	Versuchsgenehmigungen	64
7.	Danksagungen	65
8.	Anlage: Eidesstattliche Versicherung; Originalarbeiten	67

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung des Sauerstoffs

Die ständige Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff (O_2) ist *eine conditio sine qua non* für die meisten mehrzelligen Lebewesen. Erstes Leben in Form biogener, organosedimentärer Strukturen entstand vor ca. 3,8 Millionen Jahren. Es existierte lediglich von der oxidativen Kraft des Sulfates vulkanischem Ursprungs. Die biologische Nutzbarkeit von Licht war die Grundvoraussetzung für die Entwicklung zu heutigen Lebensformen. Dieses geschah vor etwa 3.5 Millionen Jahren mit dem Entstehen einer zunächst anoxygenischen Photosynthese. Kurze Zeit darauf entwickelte sich die oxygenische Photosynthese, unter anderem mit der Evolution von Cyanobakterien. Die dadurch erreichte Umsetzbarkeit von atmosphärischem Kohlendioxid unter Oxidation von Chlorophyll und der Abgabe von O_2 ermöglichte die Anreicherung der Biosphäre mit Sauerstoff. Erste Hinweise für eukaryotes Leben, welches einen strikt aeroben Stoffwechsel aufweist, datieren 2,7 Millionen Jahre zurück. Vor etwa 1,5 - 2 Millionen Jahren erreichte die Biosphäre einen mit heute vergleichbaren O_2 -Gehalt, der die Evolution komplexer Lebensformen überhaupt erst ermöglichte (Übersicht in ^{1,2}).

Die Fähigkeit von Sauerstoff, Elektronen aufzunehmen, macht es zu einem idealen Partner in Redoxreaktionen, die organische Substanzen abbauen und dadurch metabolische Energie generieren. Alle höheren Organismen nutzen die oxidative Phosphorylierung zur Bildung lebensnotwendiger Energiebausteine. O_2 ist unabdingbar für den intermediären Stoffwechsel der mitochondrialen Atmungskette, die das essentielle Energiesubstrat Adenosintriphosphat (ATP) generiert. O_2 dient dabei als terminaler Elektronakzeptor in einer Kaskade von Reaktionen, die Glukose zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert und dabei 32 Mol ATP pro Mol Glukose generiert. In Situationen mit kritisch gesenktem O_2 -Angebot (Hypoxie) muß die sehr viel weniger ergiebigere anaerobe Glykolyse genutzt werden (2 Mol ATP / Mol Glukose), was für den Gesamtorganismus für die Aufrechterhaltung

der Homöostase nicht ausreicht (Übersicht in Bunn und Poyton 1995³). Aufgrund der zentralen Bedeutung von Sauerstoff mußte die Evolution zu höheren Organismen komplexe Systeme entwickeln, die die kontinuierliche Aufnahme und Distribution von O₂ in jede Zelle des Körpers sicherstellen. Gleichzeitig wurden Strategien entwickelt, die in Situationen kritisch gesenkter Sauerstoff-Spannung eine Adaptation des Gesamtorganismus und zellulärer Strukturen ermöglicht. In diesem Sinne spielen die Luftwege und die Lunge mit ihrer enormen Oberfläche eine wichtige Rolle bei der Aufnahme des atmosphärischen O₂. Dieser bindet dann an spezialisierte zell-gebundene Moleküle (Hämoglobin) und wird in einem dichten Netzwerk des Blutkreislaufes, welches selbst einer fein abgestimmten Tonusregulation unterliegt, an das periphere Gewebe transportiert. Wie wir heute wissen, sind alle Elemente dieses Prozesses direkt durch O₂ selbst reguliert. Ein sauerstoffabhängiges transkriptionelles System steuert die Expression zahlreicher Gene, die diese und eine Vielzahl anderer Vorgänge beeinflussen.

1.2. Erythropoietin als Modell hypoxisch regulierter Genexpression

Erythropoietin (EPO) stellt ein ideales Modellsystem zur Untersuchung sauerstoffabhängiger Regulation dar. Dieses Hormon spielt eine klar definierte, wichtige physiologische Rolle und hat einen hohen Grad an biologischer Spezifität. Weiterhin zeigt es einen ausgesprochen hohen Grad an hypoxischer Induktion, was die Untersuchung zugrunde liegender Mechanismen erleichtert hat. EPO ist ein ca. 30 kDa großes Glykoprotein, dessen Produktion unter Sauerstoffmangel bis zu 1000-fach gesteigert werden kann. Es bindet an spezifische Rezeptoren der erythroiden Vorläuferzellen, verhindert die Apoptose dieser Zellen und ermöglicht dadurch die Differenzierung und Proliferation zu reifen Erythrozyten. Eine Steigerung des Erythrozytenvolumens geht mit einer verbesserten O₂-Transportkapazität einher und schließt somit einen physiologischen Regelkreis (Übersicht in Jelkmann und Hellwig-Burgel 2001⁴ und Fisher 2003⁵).

Ein entscheidender Durchbruch zur Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen gelang mit der Identifikation von Zell-Linien, die EPO

induzieren konnten, den Hepatom-Zellen Hep3B und HepG2⁶. In diesen Zellen zeigte EPO ein ähnliches Regulations-Verhalten wie es bereits von *in vivo* Experimenten bekannt war. Eine starke Induktion konnte unter Hypoxie gesehen werden. Weiterhin ließ es sich mit Eisenchelatoren sowie mit verschiedenen Metallen, wie z.B. Cobalt, induzieren. Diese Bedingungen wurden daher auch als "chemische Hypoxie" bezeichnet. In der Zellkultur führte die Zugabe von Kohlenmonoxid zu einer Hemmung der EPO-Induktion unter Hypoxie. Zusammengenommen führten diese Daten zu der lange Zeit favorisierten Theorie, dass es sich bei dem O₂-Sensor um ein Ferroprotein, genauer ein Häm-Protein handelt⁷. Es vergingen mehr als 10 Jahre, bis der wahre Sauerstoff-Sensing Mechanismus sowie die ihm zugrunde liegenden Strukturen aufgeklärt werden konnten. Sehr viel früher allerdings konnte der EPO regulierende Transkriptionsfaktor identifiziert werden.

1.3. Identifikation von Hypoxia-inducible Factor 1

Die hypoxische Induktion von EPO beruht in erster Linie auf einer gesteigerten Transkriptionsrate, was sowohl in der Niere *in vivo*⁸ als auch in Hep3B Zellen gezeigt werden konnte⁹. Hypoxisch regulierte Expression eines 4 kb humanen EPO Gens in der Leber transgener Mäuse zeigte, daß wesentliche Elemente dieser Regulation *cis*-aktivierend in diesem Bereich liegen mussten¹⁰. Deletionsstudien der nicht-kodierenden Bereiche des EPO-Gens identifizierten eine kleine Region, 120 Basenpaare 3' des Poly-A Endes, flankiert von den Restriktionsenzymstellen Apa I und Pvu II, die für die hypoxische Induzierbarkeit verantwortlich war. Wurde dieser Bereich aus einem Transgen herausgeschnitten, so zeigte sich keinerlei Induktion mehr unter Hypoxie. Wurde er jedoch 5' der kodierenden Region wieder hineinkloniert, so zeigte das Transgen wieder seine ursprüngliche sauerstoffabhängige Regulation. Die Charakteristika eines typischen Enhancer-Elementes waren somit erfüllt¹¹⁻¹³. Semenza und Kollegen verwendeten ein Oktanukleotid dieses Enhancers (5'-TACGTGCT-3') und beschrieben die hypoxie-abhängige Bindung nukleärer Proteine daran¹⁴. Sie prägten den Begriff "Hypoxia-inducible Factor 1" (HIF-1). Anhand von

Proteinextrakten von mit Cobalt induzierten Hep3B Zellen, gelang ihnen über eine Affinitätsaufreinigung bindender Proteine am EPO 3' Enhancer die Klonierung von HIF-1^{15,16}. In der Folge konnte die HIF-1 bindende DNA-Region weiter eingegrenzt werden auf die Nukleotide 5'-R-CGTG-3'. Diese Konsensus-Sequenz bezeichnet man heute als Hypoxia Responsive Element (HRE).

1.4. *Weitreichende Bedeutung von HIF*

Die Identifikation der regulativen DNA Abschnitte ermöglichte die Untersuchung ihrer Aktivität auch in anderen Zellen, die kein EPO exprimieren. Überraschenderweise konnte eine hypoxische Transaktivierung dabei in allen bisher untersuchten Zellkulturen nachgewiesen werden^{17,18}. Diese Erkenntnis ließ vermuten, daß es sich bei HIF nicht nur um einen bedeutsamen Transkriptionsfaktor für EPO, sondern vielmehr um einen übergreifenden Mechanismus zur hypoxischen Adaptation handelt. Tatsächlich sind bis heute Dutzende verschiedener Gene identifiziert, die alle durch HIF hypoxisch beeinflusst werden und dabei mindestens ein HRE in ihrem Gen aufweisen (Tab. 1). Man geht heute davon aus, daß HIF über seine Zielgene überwiegend protektiv auf die es exprimierenden Zellen wirkt, indem es einerseits den Sauerstoffverbrauch senkt (z.B. gesteigerte anaerobe Glykolyse), andererseits aber die Sauerstoffzufuhr steigert (z.B. Erythropoiese, Vasodilatation). Weiterhin werden schädliche Einflüsse der Hypoxie gemindert (z.B. pH-Regulation - Carboanhydrasen) und protektive Mechanismen gegen die Reoxygenierung (z.B. Radikalfänger - Häm Oxygenase 1) aktiviert. Zu den von HIF beeinflussten Prozessen zählen neben der Erythropoiese unter anderem die Angiogenese (z.B. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) und die Regulation des Gefäßtonus (NO-Synthase, Endothelin-1, Adrenomedulin), der Glukose Transport (Glucose Transporter 1 und 3, GLUT) und die Glykolyse (die überwiegende Anzahl der glykolytischen Enzyme), sowie eine heterogene Gruppe von Genen, die auf Signal-Transduktion und Entscheidungen des Zellüberlebens Einfluß nehmen (Übersicht in Wenger 2002¹⁹). Darunter befinden sich allerdings

HIF Zielgene**Erythropoiese und Eisentransport**

Erythropoietin
 Transferrin
 Transferrin Rezeptor
 Ceruloplasmin

Glukose Transport und Glykolyse

Glucose Transporter 1+ 3
 Hexokinase 1 + 2
 LDH-A
 PGK 1
 Aldolase A + C
 Phosphofruktokinase L
 Pyruvat Kinase M
 Enlase 1
 Triose Phosphat Isomerase
 GAPDH

Zellwachstum -und Überleben

p21
 NIP3
 NIX
 "Insulin-like growth factor 2"
 IGFBP 1-3

Angiogenese

VEGF
 VEGF Rezeptor FLT-1
 "Plasminogen activator inhibitor 1"
 TGF β 3
 Leptin (und Wundheilung)
 Endoglin

Kontrolle des Vasotonus

Nitrit Oxid Synthase 2
 Endothelin 1
 α_{1B} -Adrenoceptor
 Adrenomedullin
 Heme Oxygenase 1

Andere

"Carbonic anhydrase" 9 (pH Regulation)
 Adenylat Kinase 3 (Nucleinsäure Stoffwechsel)
 Prolyl-4-hydroxylase α 1 (Matrix Metabolismus)
 p35srj (HIF "feedback" Regulation)
 "Intestinal trefoil factor" (Barriere Funktion)
 Atriales Natriuretisches Peptid (Wasser
 Homöostase)
 Ecto-5'-Nucleotidase (intestinale Permeabilität)

Tab. 1: Spektrum der von HIF beeinflussten Zielgene. Aufgeführt sind nur diejenigen HIF-abhängigen Gene, die experimentell eindeutig nachgewiesen werden konnten.

ebenfalls Gene, die den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Die Reichweite dieser Auswirkung ist derzeit unzureichend definiert. Eine Apoptose erheblich geschädigter Zellen ist jedoch für den Gesamterhalt und die Funktion eines Gewebsverbandes biologisch sinnvoll.

Aufgrund der wesentlichen Rolle in der hypoxischen Adaptation wird HIF häufig als "master regulator" bezeichnet. In dieser Funktion ist es wahrscheinlich für eine Vielzahl an pathophysiologischen Vorgängen und multiplen Erkrankungen relevant (Übersicht in Semenza 2001²⁰). Zu diesen zählen die klinisch überaus wichtigen Gebiete der Perfusionsstörungen (z.B. Myokardinfarkt und apoplektischer Insult), sowie das Tumorwachstum. Es besteht die Hoffnung, dieses System klinisch nutzbar zu machen. Auf

zahlreichen Gebieten wird daher momentan intensiv versucht, die HIF-Aktivität in beide Richtungen zu modulieren²¹.

1.5. *Struktur und Regulation von HIF*

Transkriptionell aktives HIF ist ein Dimer bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Beide Untereinheiten gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, mit ähnlicher Primärstruktur, den „basic helix loop helix“ (bHLH) PAS Proteinen, benannt nach den ersten identifizierten Mitgliedern dieser Familie: Per, ARNT und Sim. Die N-terminale bHLH und PAS Region dieser Transkriptionsfaktoren ist für die Dimerisierung mit dem jeweiligen Bindungspartner und für die DNA-Bindung der Zielgene verantwortlich. Die weiter C-terminal gelegenen Abschnitte bestimmen die jeweilig individuelle Funktion der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren. Als Wang und Semenza 1995 HIF klonierten, stellten sie fest, daß die β -Untereinheit bereits bekannt und zuvor als „aryl hydrocarbon nuclear translocator“ (ARNT) bezeichnet wurde. ARNT stellt den Dimerisationspartner auch anderer bHLH-PAS Proteine dar, zeigt also eine vielseitige Funktion. Am besten charakterisiert war die Metabolisierung polyaromatischer Hydrocarbone, die durch Dimerisierung mit dem Aryl Hydrocarbon Receptor erreicht wird³. Es zeigte sich, daß HIF-1 β selbst nicht O₂-abhängig reguliert wird, sondern unter allen untersuchten Bedingungen abundant und konstitutiv vorliegt. Die HIF-1 α Untereinheit hingegen war ein zuvor nicht identifiziertes Protein, welches eine strikte O₂-Abhängigkeit zeigt und somit diejenige Untereinheit darstellt, die für die Regulation des Komplexes entscheidend ist. Dabei wird HIF nicht durch die Expression seiner mRNA reguliert. Die meisten Arbeitsgruppen fanden keine Änderung der mRNA Expression unter Hypoxie, sondern stellten einen posttranskriptionellen Mechanismus fest. HIF-1 α hat in der Normoxie eine ausgesprochen kurze Halbwertszeit von nur wenigen Minuten. Mit zunehmender Hypoxie wird es stabilisiert und akkumuliert im Zellkern²². In äquilibrierten Suspensionskulturen zeigte HIF-1 α die höchste Induktion bei O₂-Spannungen um 0.5% und nach etwa 4 Stunden²³. Arbeiten

aus neuerer Zeit konnten zeigen, dass HIF bereits in den ersten Minuten nach Einsetzen der Hypoxie induziert wird²⁴. In weiterführenden Arbeiten wurde die Ubiquitinierung und nachfolgende Destruktion über das Proteasom als der entscheidende regulative Mechanismus identifiziert²⁵⁻²⁷. Die von der Regulation des EPO Genes bekannten Stimuli Cobalt und Eisenchelation, führten ebenso zu einer Stabilisierung von HIF-1 α , wie die Hypoxie. Damit konnten die ursprünglichen Daten der EPO Regulation eindeutig auf einen einheitlichen O₂-Sensing Mechanismus zurückgeführt werden. Die genaue Funktionsweise dieses Apparates blieb jedoch zunächst weiter verborgen. Wertvolle Aufschlüsse ließen sich aus der Analyse funktioneller Domänen von HIF-1 α ziehen. Neben der bHLH-PAS Domäne (s.o.) wurden zwei "nuclear localisation signals" (NLS) gefunden, die für den Transport in den Zellkern notwendig sind^{28,29} (Abb. 1). Wichtiger noch war die Identifizierung zweier Transaktivierungs-Domänen (TAD), die jeweils eine sauerstoffabhängige Aktivität zeigen und unabhängig voneinander diese Funktion ausüben können. Dabei zeigt die N-terminale TAD eine Überlappung mit einer sogenannten "oxygen dependent degradation domain" (ODDD), die die O₂-abhängige Instabilität des Proteins herbeiführt^{25,30-32} (Abb. 1).

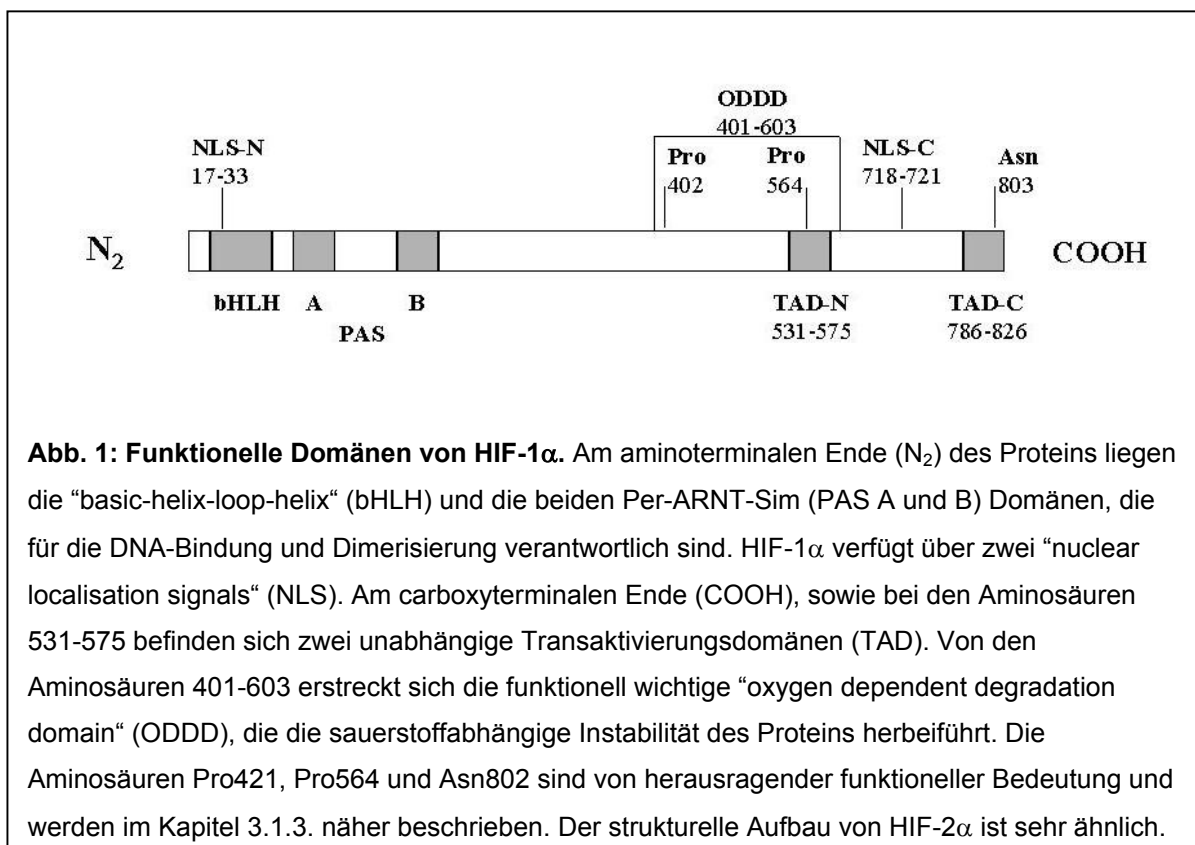


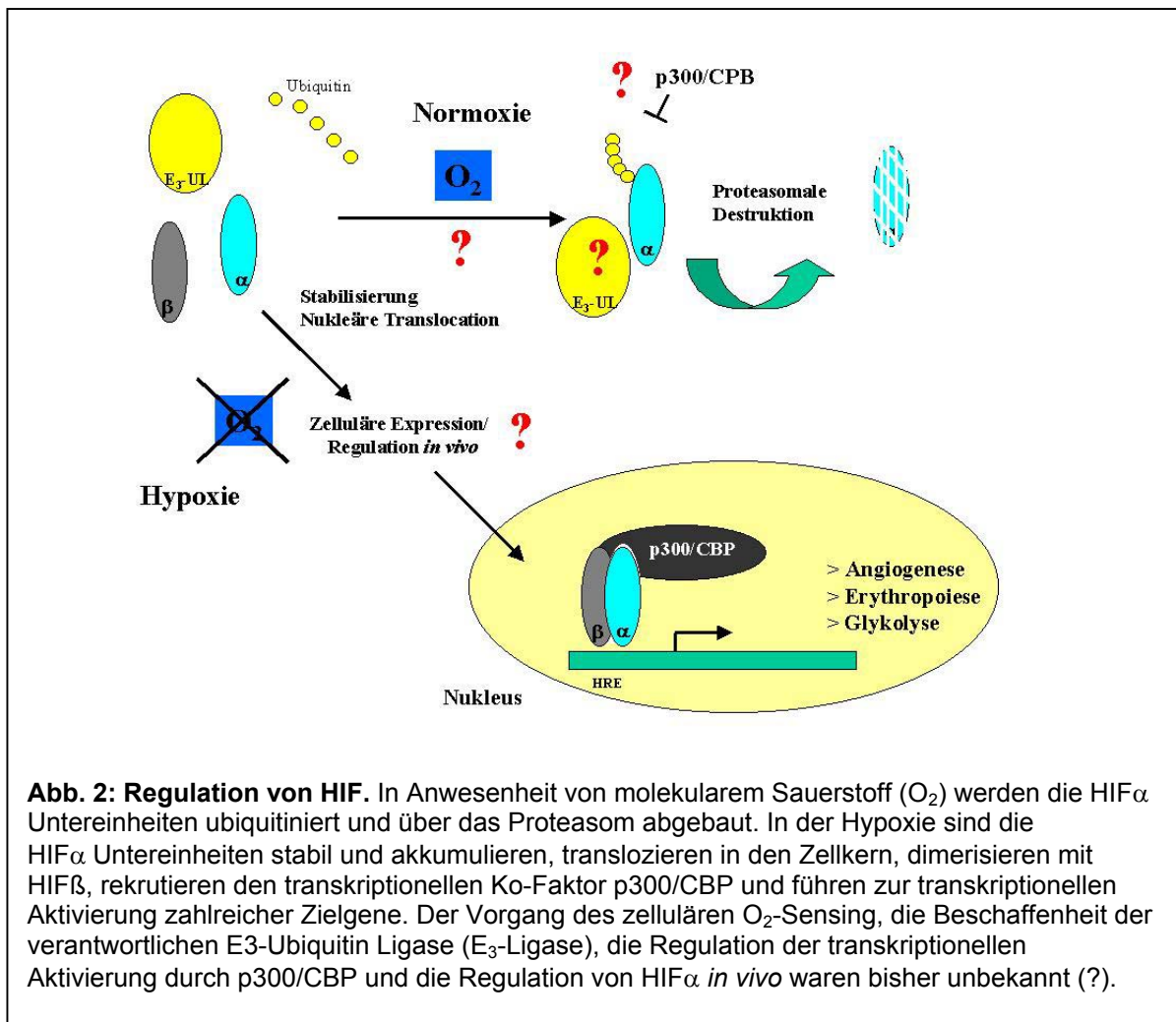
Abb. 1: Funktionelle Domänen von HIF-1 α . Am aminoterminalen Ende (N₂) des Proteins liegen die "basic-helix-loop-helix" (bHLH) und die beiden Per-ARNT-Sim (PAS A und B) Domänen, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung verantwortlich sind. HIF-1 α verfügt über zwei "nuclear localisation signals" (NLS). Am carboxyterminalen Ende (COOH), sowie bei den Aminosäuren 531-575 befinden sich zwei unabhängige Transaktivierungsdomänen (TAD). Von den Aminosäuren 401-603 erstreckt sich die funktionell wichtige "oxygen dependent degradation domain" (ODDD), die die sauerstoffabhängige Instabilität des Proteins herbeiführt. Die Aminosäuren Pro421, Pro564 und Asn802 sind von herausragender funktioneller Bedeutung und werden im Kapitel 3.1.3. näher beschrieben. Der strukturelle Aufbau von HIF-2 α ist sehr ähnlich.

1.6. Zusammenfassung der Ausgangsbefunde und offene Fragen

Über die detaillierte Untersuchung der regulativen Mechanismen des EPO Gens konnte der Transkriptionsfaktor HIF mit übergeordneter Bedeutung für die hypoxische Adaptation identifiziert werden. HIF ist ein Heterodimer zweier bHLH-PAS-Proteine, einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit und einer sauerstoffabhängigen, regulativen α -Untereinheit. Letztere zeigt ein inverses Expressionsmuster zur perizellulären O_2 -Konzentration. Unter normoxischen Bedingungen ist HIF α instabil und wird über das Ubiquitin-Proteasom-System mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten degradiert. Erst unter Hypoxie wird HIF α stabilisiert und ist transkriptionell aktiv. Es konnten bisher drei α -Untereinheiten identifiziert werden: HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α . Die Bedeutung dieser drei HIF α Isoformen war bisher unbekannt.

Die oben zusammengefassten Daten sind auf dem Kenntnisstand des Beginns meiner eigenen Arbeiten (ca. 1998). Die Abbildung 2 stellt diese Zusammenhänge schematisch dar und zeigt wichtige noch ausstehende Fragestellungen. In meinen eigenen Arbeiten habe ich mich insbesondere mit vier Fragen beschäftigt:

1. Wie wird die sauerstoffabhängige Regulation der α -Untereinheiten erreicht?
2. Welche Bedeutung haben die unterschiedlichen HIF α Isoformen
3. Welche Bedeutung spielt HIF in der Physiologie und Pathophysiologie?
4. Welche Bedeutung hat HIF in der Progression solider Tumoren?



Im folgenden werden eigene Originalarbeiten zu diesem Thema zusammenfassend dargestellt. In der anschließenden Diskussion werden die wichtigen neuen Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen in Zusammenhang mit den eigenen Ergebnissen diskutiert.

2. KURZE DARSTELLUNG EIGENER ORIGINALARBEITEN

in chronologischer Reihenfolge

2.1. *“Selection and analysis of a mutant cell line defective in the HIF-1 α subunit. Characterisation of HIF-1 α -dependent and –independent hypoxia-inducible gene expression.”*

Zur Klärung zellulärer, von spezifischer Genregulation abhängiger Prozesse eignen sich am besten vergleichende genetische Experimente mit Zell-Linien, die sich einzig in der Funktionsweise des zu untersuchenden Systems unterscheiden. Durch Mutagenese und anschließende Selektion von stabil mit Selektionsmarkern transfizierten Zellen ist es uns gelungen, Zellklone zu isolieren, in denen HIF-1 α inaktiviert ist. Im Vergleich mit der wild-typ Zelle konnten wertvolle Informationen über den Einfluß von HIF auf zelluläre Funktionen, sowie das Spektrum der Zielgene gezogen werden.

(Wood SM, Wiesener MS, Yeates KM, Okada N, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ. *J Biol Chem* 1998;273(14):8360-8)

2.2. *“Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterisation and comparison with HIF-1 α .”*

1997 wurde von vier unabhängigen Arbeitsgruppen eine zweite HIF α Untereinheit, mit großer Sequenzübereinstimmung zu HIF-1 α identifiziert. Aus diesen Arbeiten ging keine Information über die Funktion und Regulation dieser zweiten Untereinheit hervor. Deshalb generierten wir monoklonale Antikörper gegen beide HIF α Untereinheiten und untersuchten die Expression und Regulation in Zell-Linien unterschiedlichen Ursprungs. Anders als aus den initialen Berichten mitgeteilt wurde, konnte in allen Zell-Linien eine sauerstoffabhängige Induktion von HIF-2 α gezeigt werden. Unter verschiedensten experimentellen Bedingungen zeigten beide HIF α Untereinheiten ein nahezu gleichartiges Regulationsverhalten, so dass ein

identischer Sauerstoffsensoren und Signaltransduktionsweg angenommen werden konnte.

(Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. *Blood* 1998;92(7):2260-8)

2.3. *“The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.”*

Einige Hinweise aus der Literatur deuteten indirekt auf einen Einfluß des Tumor Suppressor Gens „von Hippel Lindau“ (VHL) auf die Regulation von HIF hin. Aus diesem Grunde untersuchten wir renale Karinomzell-Linien, die auf beiden Allelen eine Inaktivierung von VHL zeigen. Es zeigte sich ein erheblicher Einfluß des VHL-Status auf die Regulation von HIF α Untereinheiten. VHL negative Zellen zeigten eine sauerstoffunabhängige, maximale Stabilisierung von HIF α mit entsprechend aktivierten Zielgenen. Rekonstituierung dieser Zellen mit VHL hob dieses Phänomen wieder auf und stellte die Sauerstoffabhängigkeit der Expression wieder her. Wir konnten weiterhin zeigen, daß pVHL maßgeblich für die Destruktion von HIF α verantwortlich ist und das dafür pVHL und HIF eine direkte Bindung eingehen. Diese Bindung ist streng sauerstoffabhängig und ließ sich durch Agentien wie Cobalt oder Eisenchelatoren inhibieren. Diese Bindungscharakteristika erfüllten daher weitgehend die Kriterien, die dem vermuteten Sauerstoffsensoren entsprachen. Mit der Identifikation von pVHL als funktionell unabdingbarem Teil der regulierten Destruktion von HIF α , gelang ein entscheidender Durchbruch, der zur späteren Aufklärung des Sauerstoff-Sensoren Mechanismus führte.

(Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. *Nature* 1999 May 20; 399(6733):203-4)

2.4. *“The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages – a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS).”*

Das ARDS geht mit einem hohen Grad an Inflammation des pulmonalen Gewebes einher. Als mögliche Ursache für die Inflammation wurde eine deutlich erhöhte Sekretion von dem potenten neutrophilen Chemokin Interleukin-8 (IL-8) identifiziert, dessen Ursprung wahrscheinlich pulmonale Makrophagen sind³³. Diese Befunde konnten wir in einem anderen Patientenkollektiv, bei traumatisch bedingtem ARDS, bestätigen. Die klinischen Daten deuteten auf initiale Hypoxie als Ursache von erhöhter IL-8 Sekretion und nachfolgender Entwicklung des ARDS hin. In Zellkulturexperimenten mit humanen Makrophagen konnte bestätigt werden, daß Hypoxie zu einer Induktion von IL-8 führt. Diese Induktion schien aber nicht von HIF abhängig zu sein, und ist vermutlich nicht der einzige Aktivierungsmechanismus. Andere Faktoren, wie Re-Oxygenierung, Barotrauma und andere pro-inflammatorische Stimuli könnten für die Aktivierung von IL-8 verantwortlich sein.

(Hirani N, Antonicelli F, Strieter RM, Wiesener MS, Ratcliffe PJ, Haslett C, Donnelly SC. *Mol Med*. 2001 Oct;7(10):685-97)

2.5. *“Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of HIF-1 α in clear cell renal carcinomas.”*

Die häufigste Manifestation VHL assoziierter Tumoren stellen sporadische klarzellige Nierenzellkarzinome dar. Diese gehen mit einer erworbenen Inaktivierung beider Allele des VHL Gens einher. Wie in 2.3. ausgeführt zeigen Zell-Linien, die von solchen Tumoren generiert wurden, eine Stabilisierung von HIF α Untereinheiten mit entsprechender Transaktivierung der Zielgene. Um zu überprüfen, ob dieses auch auf das Tumorgewebe zutrifft, haben wir Nierenzellkarzinome gesammelt und untersucht. In einem breiten Spektrum nicht-renaler humaner Tumoren konnte lediglich eine fokale Aktivierung von HIF in Regionen herabgesetzter Sauerstoffspannung gesehen werden. In den klarzelligen Tumoren hingegen konnte eine starke, in der

Immunhistochemie homogene Expression von HIF-1 α in nahezu allen Tumorzellen beobachtet werden. Ebenso zeigten die Zielgene VEGF und GLUT1 eine sehr hohe Expression, die mit der Expression von HIF-1 α korrelierte. Die VHL Mutationsanalyse bestätigte die genetische Ursache der HIF Überexpression. Die außerordentlich starke Expression von HIF-1 α in den Nierenzellkarzinomen erklärt möglicherweise ihren Phänotyp: schnelles Wachstum, frühe Metastasierung und starke Vaskularisierung. Aufgrund dessen eignet sich diese Gruppe von Tumoren wahrscheinlich in besonderer Weise für eine Tumorthherapie durch Inaktivierung von HIF.

(Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jürgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Löning SA, Frei U, Maher ER, Gröne HJ, Eckardt KU. *Cancer Res.* 2001 Jul 1;61(13):5215-22)

2.6. *“Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel Lindau gene in a renal cell carcinoma”.*

Eine Besonderheit renaler Karzinome ist die mögliche Assoziation mit paraneoplastischer Polyzythämie. Der molekulare Mechanismus dieses Phänomens ist bislang nicht geklärt worden. Wir hatten die Gelegenheit, einen Patienten mit einer schwerwiegenden Polyzythämie mit einem Hb von 22 g/dl zu untersuchen. Die Polyzythämie führte zu einem thrombotischen Myokardinfarkt als Erstmanifestation eines bis dahin unbekanntes Nierenzellkarzinoms. Nach Nephrektomie untersuchten wir das Gewebe und fanden eine massiv erhöhte Expression von EPO mRNA, sowie aller übrigen HIF Zielgene und von HIF-1 α und -2 α Untereinheiten. Die Mutationsanalyse des Tumormaterials zeigte eine Punktmutation mit dem Effekt eines Aminosäureaustausches (Leu163Pro) des VHL Gens. *In vitro* Mutagenese und nachfolgende Bindungsstudien demonstrierten den Verlust der Bindung zwischen pVHL und den HIF α Untereinheiten in Folge dieser Mutation. Daraus ergibt sich das Unvermögen HIF α zu ubiquitinieren und damit zu zerstören. Auf diesem Wege konnte eine Kausalkette von einer Punktmutation des VHL Gens bis zum Myokardinfarkt geschlossen werden.

(Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, Jürgensen JS, Rosenberger C, Morgan NV, Maher ER, Frei U, Eckardt KU. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3562-5)

2.7. *“Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis.”*

Neutrophile Granulozyten sind ein wichtiges Instrument des Immunsystems, zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen. Starke Aktivierung dieser Zellen kann jedoch auch zu der Freisetzung von histotoxischen Granula, Sauerstoffradikalen und Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren führen und somit eine erhebliche Gewebsschädigung nach sich ziehen. Durch die Fähigkeit der Neutrophilen zu einer spontanen Apoptose mit nachfolgender Abräumung durch Makrophagen werden diese negativen Auswirkungen eingedämmt. Anders als bei den meisten anderen Zellen führt Hypoxie bei den neutrophilen Granulozyten zu einer deutlichen Hemmung der Apoptose³⁴. Wir konnten zeigen, daß diese Inhibition mit sehr großer Wahrscheinlichkeit von HIF abhängig ist und somit eine neue Funktion dieses Systems identifizieren.

(Mecklenburgh KI, Walmsley SR, Cowburn AS, Wiesener MS, Reed BJ, Upton PD, Deighton J, Greening AP, Chilvers ER. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):3008-16)

2.8. *“Identification of cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene by expression array analysis and investigation of cyclin D1 genotype as a modifier in von Hippel-Lindau disease.”*

Das VHL Gen übt neben der Tumor Suppression und der Regulation von HIF α noch weitere Funktionen aus. Zu diesen zählen die Inhibition der transkriptionellen Elongation und die extrazelluläre Ablagerung von Fibronectin. Am besten definiert sind dabei bisher die Prozesse, die zur Destruktion von HIF α Untereinheiten führen. Mit der Gen Array Analyse

besteht die Möglichkeit einer Screening-Untersuchung, die potentiell neue Kandidaten-Gene von VHL finden kann. Von vorrangigem Interesse sind dabei Gene, die die Tumorgenese bei VHL Verlust erklären. Mit einem Gen Array, auf dem gleichzeitig annähernd 600 Tumor-assoziierte Gene untersucht werden können, konnten wir sechs neue Gene identifizieren, die durch VHL invers reguliert werden. Diese Gene zeigten keine Modulation ihrer Expression durch Hypoxie und sind somit vermutlich nicht von HIF abhängig. Das auf den ersten Blick interessanteste Gen dieser Gruppe ist Cyclin D1, ein Schlüsselprotein für die Zell-Zyklus-Regulation. Die Identifikation dieser Gene könnte einen wesentlichen Fortschritt in der Klärung der tumorsuppressiven Wirkung von VHL bedeuten.

(Zatyka M, da Silva NF, Clifford SC, Morris MR, Wiesener MS, Eckardt KU, Houlston RS, Richards FM, Latif F, Maher ER. *Cancer Res.* 2002 Jul 1;62(13):3803-11)

2.9. “Expression of HIF-1 α and HIF-2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys”.

Die Niere zeigt bereits unter physiologischen Bedingungen ein sehr heterogenes Sauerstoffprofil, mit bestimmten Regionen, die eine ausgesprochen niedrige O₂-Spannung aufweisen. Aus diesem Grunde führten wir eine detaillierte Untersuchung zur Aktivierung von HIF α in der Niere durch. Überraschenderweise zeigte die Niere unter Kontrollbedingungen keinerlei Signal für HIF-1 α oder -2 α , auch nicht in der Papille. Unter Hypoxie kam es zu einer starken Akkumulation, jedoch nur in spezifischen Zellpopulationen. Die parenchymatösen und interstitiellen Zellen unterschieden sich streng in ihrem Expressionsmuster für die jeweilige HIF α Untereinheit. Totale Ischämie, sowie lokaler Infarkt führten ebenso zu einer Aktivierung von HIF.

Interessanterweise scheinen die peritubulären renalen Fibroblasten, die für die EPO Produktion verantwortlich sind, lediglich HIF-2 α zu aktivieren, so daß die Erythropoiese vermutlich von der Aktivierung von HIF-2 α abhängig ist.

(Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Bachmann S, Eckardt KU. *J Am Soc Nephrol*

2002 Jul; 13(7):1874-6)

2.10. *“Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs.”*

Stroka et al. ³⁵ publizierten kürzlich eine umfassende Arbeit zu der HIF-1 α Regulation in verschiedenen Organen von Mäusen. Vergleichbare Daten zu HIF-2 α existierten nicht, so daß wir eine systematische Analyse der Expression in verschiedenen Organen durchführten. Es zeigte sich eine Aktivierung von HIF-2 α unter Hypoxie in allen untersuchten Organen, mit einer streng zellspezifischen Expression. In den verschiedenen Organen wechselte die Expression der HIF α Isoformen von parenchymatösen zu interstitiellen Zellen. In allen Organen jedoch zeigten die Endothelzellen eine starke Aktivierung von HIF-2 α . Der überwiegende Anteil an Zellen vermochte nur eine von beiden HIF α Untereinheiten zu aktivieren, so daß offenbar nur ein geringer Grad an Redundanz zwischen den beiden Systemen vorliegt. (Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. *FASEB J.* 2003 Feb;17(2):271-3)

3. DISKUSSION

3.1. Sauerstoffabhängige Regulation von HIF

3.1.1. Das VHL Syndrom

Seit der Identifikation von HIF-1 ist die Suche nach den zugrunde liegenden, regulativen Mechanismen, insbesondere des O₂-Sensors und seiner Funktionsweise, intensiv betrieben worden. Um die Funktionsweise eines Systems verstehen zu lernen, werden häufig „Knockout“-Experimente für entsprechende Gene herangezogen. Eine weitere mögliche Strategie ist die Untersuchung natürlich vorkommender Mutationen. Mit dem von Hippel-Lindau (VHL) Gen eröffnete sich die Möglichkeit dazu.

Eugen von Hippel beschrieb 1904 erstmals die seltene Erkrankung der retinalen Angiomatose als Krankheitsentität³⁶. 1927 erkannte Arvid Lindau die Assoziation dieser retinalen Angiomatose mit zerebralen Hämangiomen, Nierenzellkarzinomen und Zysten des Pankreas. Er beschrieb das gemeinsame Vorkommen dieser Tumoren, ohne jedoch eine familiäre Häufung zu erkennen³⁷. Diese Erkrankung zeigt einen autosomal rezessiven Erbgang und wurde nach ihren Erstbeschreibern „von Hippel-Lindau“ (VHL)-Syndrom benannt. 1993 wurde das VHL Gen am kurzen Arm des Chromosoms 3p identifiziert³⁸. Es stellt ein klassisches Tumor Suppressor Gen dar, das den Regeln nach Knudson folgt³⁹: erst bei Inaktivierung beider Allele kommt es zur Ausbildung charakteristischer Tumoren.

Wiederherstellung des VHL-Status in solchen Tumorzellen führt zum Verlust der Tumorbildung, wenn sie in Nacktmäuse implantiert werden⁴⁰⁻⁴². Das VHL Gen allein ist also von vorrangiger Bedeutung für das Wachstum dieser Tumorzellverbände.

Ist ein Allel des VHL Gens in der Keimzellbahn inaktiviert, so liegt das familiäre VHL-Syndrom vor. Bei einem „second hit“ des zweiten Allels in prädisponierten Zellen, kommt es zu dem Auftreten des typischen Tumorsyndroms, einer Kombination von Nierenzellkarzinomen, Phäochromozytomen, Hämangioblastomen und retinalen Angiomen. Das

familiäre VHL Syndrom ist selten, zeigt bei den Betroffenen jedoch eine hohe Penetranz und Letalität^{43,44}. Epidemiologisch bedeutsamer sind die sporadisch auftretenden Tumoren des VHL-Kreises, das klarzellige Nierenzellkarzinom (NZK) und die Hämangioblastome. Bei letzteren findet man bei etwa 50% der Fälle eine Inaktivierung des VHL Gens. Bei den NZK kommt dieses in der weitaus überwiegenden Zahl der Fälle vor⁴³.

Zu dem charakteristischem Phänotyp aller VHL-assoziierten Tumoren gehört eine außerordentlich starke Vaskularisierung. Anhand von Experimenten mit Zell-Linien VHL defizienter NZK stellte man eine Überexpression von VEGF, aber auch der ebenfalls hypoxisch regulierten Gene GLUT1 und PDGF B fest^{41,45}. Diese Gene zeigten eine konstitutive Überexpression, deren Abundanz sich durch zusätzliche hypoxische Inkubation nicht weiter steigern ließ. Durch stabile Transfektion der Zellen mit wild-typ VHL konnte eine niedrige Basalexpression dieser Gene, sowie eine Induzierbarkeit durch Hypoxie wieder hergestellt werden. VHL stellt also einen negativen Regulator dieser Gene dar. Man nahm zunächst an, daß es sich um ein mRNA-Stabilitätsphänomen handelt. Die Überexpression der angiopoietischen Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF B wurde als Ursache des stark vaskularisierten Phänotyps dieser Tumoren diskutiert.

3.1.2. Die Bedeutung von VHL für die Degradation von HIF

Zusätzlich zu der konstitutiven, VHL-abhängigen Überexpression der hypoxisch regulierten Gene, gab es einen weiteren, klinischen Hinweis auf die Interaktion von VHL mit HIF. Die Tumoren des VHL-Kreises, insbesondere die NZK, gehen gehäuft mit einer paraneoplastischen Polyzythämie einher⁴⁶. In zahlreichen Fällen konnten deutlich erhöhte Serum-EPO Konzentrationen festgestellt werden, als Hinweis darauf, daß auch EPO als weiteres HIF Zielgen in Zusammenhang mit VHL Mutationen aktiviert werden kann. Aufgrund dieser Beobachtungen entschlossen wir uns, nach möglichen Einflüssen des VHL-Gens auf die Regulation von HIF zu suchen (s. Kap. 2.3.). Zu diesem Zweck untersuchten wir zunächst in zwei verschiedenen NZK-Zell-Linien mit VHL-Defizienz (RCC4 und 786-0) zahlreiche andere HIF-

abhängige Gene. Bei allen zeigte sich eine konstitutive Überexpression der mRNA Abundanz ohne weitere Induktion durch Hypoxie. Erst Rekonstituierung eines normalen VHL-Status durch stabile Transfektion mit wild-typ VHL führte zu einer Suppression der Expression und der Wiederherstellung einer Induzierbarkeit durch Hypoxie. Der deutliche Einfluß des VHL Status einer Zelle auf die Expression aller untersuchten HIF-abhängigen Gene deutete auf eine direkte Beteiligung an der Regulation von HIF hin. Tatsächlich zeigten die Ergebnisse von HIF-Reporter Assays, sowie die DNA-Bindungsaktivität von HIF gleichartige Ergebnisse. Diese beiden Techniken wiesen auf die VHL-Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivität von HIF hin. Der direkte Nachweis der Proteine HIF-1 α und HIF-2 α in diesen Zellen bestätigte schließlich diesen Befund. Das VHL-Protein (pVHL) führt also zur sauerstoffabhängigen Destruktion von HIF α Untereinheiten. In seiner Abwesenheit sind diese stabil und voll transkriptionell aktiv.

Wir konnten weiterhin zeigen, daß die HIF α Untereinheiten eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit pVHL eingehen. Dieses konnte in Immunopräzipitationsassays aber auch in dem DNA-Bindungskomplex nachgewiesen werden. Eine ganz wesentliche Beobachtung war, daß die Interaktion nur in Anwesenheit von Sauerstoff stattfand. Durch proteasomale Inhibitoren akkumulieren die HIF α Untereinheiten trotz Anwesenheit von Sauerstoff, da sie nicht destruiert werden können. In diesem Zustand konnten also Proteininteraktionen von HIF α untersucht werden. Andere Bedingungen, die HIF α stabilisieren, sind Zugabe von Eisenchelatoren und Cobalt.

Interessanterweise fand sich unter diesen Bedingungen keine Interaktion zwischen HIF α und pVHL. Die Bindung ist also nicht nur O₂- sondern auch eisenabhängig und zeigt daher Charakteristika die dem vermuteten O₂-Sensor entsprechen. Wir konnten ferner zeigen, daß die Interaktion mit pVHL an der ODD-Domäne stattfindet, demjenigen Abschnitt also, der die Stabilität und somit die Funktion von HIF maßgeblich bestimmt.

Bereits frühzeitig wurde vermutet, daß pVHL an der Degradation von bestimmten Proteinen beteiligt ist. pVHL wurde als Teil eines Multiproteinkomplexes identifiziert, der die Proteine Cul2, Elongin B und C einschließt. Dieser Proteinkomplex zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem zuvor

bekanntem SCF-Komplex (Skp1/Cdc53/F-box Protein) von Hefe Zellen^{47,48}. Dieser Komplex markiert bestimmte Proteine durch Ubiquitinierung für die nachfolgende proteasomale Degradation. Skp1 zeigt dabei Strukturähnlichkeit mit Elongin C und Cdc53 mit Cul2. pVHL hingegen ähnelt dem F-box Protein, welches das Zielprotein direkt bindet und ubiquitiniert. Elongin B zeigt eine Strukturähnlichkeit zu Ubiquitin Molekülen. Rbx1 (oder auch ROC1) ist ein weiteres Protein in dem Komplex, welches ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym rekrutieren kann (E2)⁴⁹. Zusammen stellt dieser Proteinkomplex eine E3-Ubiquitin Ligase dar, deren Zielproteine jedoch bisher nicht bekannt waren. Mit den HIF α Untereinheiten konnten wir nun erstmals ein solches Target identifizieren (s. Kap. 2.3.). Kurze Zeit nach dem Erscheinen dieser Publikation wurde von mehreren Gruppen der Nachweis erbracht, daß pVHL, als Teil der E3-Ligase, direkt für die Ubiquitinierung von HIF α verantwortlich ist⁵⁰⁻⁵³.

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, einen ganz wesentlichen Aspekt der O₂-abhängigen Regulation von HIF zu klären. Die Identifikation von pVHL als entscheidender Faktor für die Destruktion der HIF α Untereinheiten ebnete den Weg für die Suche nach dem O₂-Sensor.

3.1.3. Molekulare Grundlagen der Interaktion zwischen pVHL und HIF

Mittlerweile konnte die Kristallstruktur des pVHL / Elongin B und C Komplexes aufgeklärt werden⁵⁴. Es zeigte sich, daß pVHL über zwei funktionelle Domänen verfügt, eine α - und eine β -Domäne. Die α -Domäne bindet Elongin C und dieses seinerseits Cul2 und Elongin B. Die β -Domäne von pVHL bindet direkt die ODD-Domäne der HIF α Untereinheiten⁵². Beide Domänen des pVHL stellen Regionen dar, in denen sich Mutationsereignisse des VHL-Syndroms häufen, sogenannte „hotspots“⁵⁴, was die große funktionelle Bedeutung widerspiegelt.

Die Bindungskinetik zwischen pVHL und HIF α deutete die Beteiligung eines sauerstoff- und eisenabhängigen Proteins an. Arbeiten in einer „Hypoxie-Workbench“, in denen auch die Extraktion der Proteine unter Hypoxie

stattfinden konnte, zeigten, daß die Bindung zwischen pVHL und HIF α nur in Anwesenheit von O₂ zustande kommt. Die Interaktion von rekombinantem HIF α mit pVHL war außerdem von der vorherigen Inkubation mit eukaryotem Zellextrakt abhängig. Ferner zeigte sich eine Temperatur-Abhängigkeit und Hitze-Inaktivierung der Bindungsreaktion. Diese Befunde sprachen für eine enzymatische Modifikation des/der Bindungspartner. Auch von anderen Systemen, die durch das Proteasom reguliert werden, ist bekannt, daß die Bindung der E3-Ligase in der Regel eine Stimulus-abhängige Modifikation des Targets voraussetzt⁵⁵. Die Kombination von Mutationsanalyse und Massenspektroskopie zeigte, daß die kritische Modifikation von HIF α eine Hydroxylierung von einem Prolinrest (P564 in humanem HIF-1 α) ist^{56,57}. Kurze Zeit darauf wurde ein zweites Prolin als alternative Hydroxylierungs- und Bindungsstelle zu pVHL (P402 in humanem HIF-1 α , siehe auch Abb. 1 in der Einleitung) identifiziert⁵⁸. Die kristallographische Untersuchung von HIF α -Polypeptiden mit pVHL zeigte eine spezialisierte Bindungstasche auf der Oberfläche der β -Domäne des pVHL für HIF-Hydroxyprolin. Ein definiertes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen hält dabei das Hydroxyprolin in der Bindungstasche, welche ohne hydroxyliertes Prolin nicht zustande kommt^{59,60}.

Die Hydroxylierung der beiden HIF-Prolinreste erwies sich als streng eisen- und sauerstoffabhängig; die entsprechende Hydroxylase erfüllte also elementare Kriterien des vermuteten Sauerstoff-Sensors. Diese konnten als Prolylhydroxylasen (PHD) identifiziert werden, welche bisher vier Isoformen umfassen⁶¹⁻⁶³. Die PHDs gehören zu einer Familie von 2-Oxoglutarat und eisen-abhängigen Enzymen, die molekularen Sauerstoff als Substrat benötigen. Das aktive Zentrum dieser Enzyme beinhaltet ein Eisenatom. Darin wird ein Atom des O₂ an das Prolin von HIF gebunden, das zweite reagiert mit 2-Oxoglutarat zu Succinat und CO₂. Die grundlegenden Mechanismen des Sauerstoff-Sensing konnten somit identifiziert werden, und sie ließen sich ontogenetisch bis in *C. elegans* und *Drosophila*-Fliegen zurückverfolgen^{61,64}.

Nicht nur die Stabilisierung, sondern auch die transkriptionelle Aktivität der HIF α Untereinheiten wird durch die Sauerstoff-Spannung über eine

Hydroxylierungsreaktion reguliert. Die HIF Transaktivierung ist von der Bindung der C-terminalen TAD an einen transkriptionellen Ko-Faktor, CBP/p300, abhängig⁶⁵. Diese Bindung wird durch die Hydroxylierung eines spezifischen Asparaginrestes (Asn 803 des humanen HIF-1 α) reguliert⁶⁶. In Anwesenheit von O₂ wird Asn 803 hydroxyliert, wodurch die Bindung an CBP/p300 blockiert und somit die transkriptionelle Aktivität unterdrückt wird. Die Asparaginyl Hydroxylase wurde kürzlich identifiziert und nach ihrer Erstbeschreibung "Factor Inhibiting HIF" (FIH-1) benannt⁶⁷⁻⁶⁹. FIH-1 gehört ebenfalls zu der Familie der 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen, deren dreidimensionale Struktur vor kurzem geklärt werden konnte^{68,70,71}. Sowohl die PHDs als auch FIH-1 stellen nach heutigem Kenntnisstand die intrazellulären Sauerstoff-Sensoren dar, die zumindestens *in vitro* über einen weiten Bereich von physiologischen Sauerstoff-Spannungen arbeiten. Es wird von größtem Interesse sein, die gewebs- und zellspezifische Expression und Regulation der verschiedenen PHDs und FIH-1, sowie deren Hydroxylierungsaktivität in Bezug auf die verschiedenen HIF α Untereinheiten zu untersuchen. Möglicherweise werden durch diese Eigenschaften weitere Ebenen differentieller Regulation erreicht.

3.2. Funktionelle Bedeutung unterschiedlicher HIF α Isoformen

3.2.1. HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist HIF ein Heterodimer, bestehend aus zwei Untereinheiten, einer konstitutiven HIF β / ARNT Untereinheit und einer O₂-abhängigen α -Untereinheit. Anhand von DNA Bindungsstudien an den regulativen Abschnitten des EPO Gens wurde zunächst HIF-1 α identifiziert. 1997 wurde von vier unabhängigen Arbeitsgruppen die Existenz einer weiteren HIF α Untereinheit beschrieben⁷²⁻⁷⁵. Auffällig war eine sehr hohe Sequenz-Übereinstimmung mit HIF-1 α , die Fähigkeit ebenso mit ARNT zu dimerisieren, sowie eine vergleichbare Struktur der funktionellen Domänen⁷⁶. In Reporter-Assay Studien wurden weiterhin Hinweise für eine hypoxische

Aktivierung des Proteins gewonnen. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurde diese neue α -Untereinheit HIF-2 α genannt, das daraus entstehende Dimer mit ARNT, HIF-2. Bereits in diesen ersten Arbeiten wurde eine hohe Expression insbesondere in endothelialen Zellen beschrieben, sowie eine im Vergleich zu HIF-1 α höhere Affinität zu den Genen der Angiogenese festgestellt^{72,73}. Es wurde daher vermutet, daß HIF-2 α möglicherweise für die Adaptation der Gefäße bedeutender ist und der Faktor deshalb initial auch „endothelial PAS domain protein 1“ genannt (EPAS-1⁷²). Regulation und Funktion von HIF-2 α , sowie die funktionelle Abgrenzung dieser beiden scheinbar unabhängigen HIF α Untereinheiten blieben zunächst unbekannt.

Inzwischen wurde auch eine dritte α -Untereinheit, HIF-3 α , identifiziert⁷⁷. Diese zeigt jedoch keine sauerstoffabhängige Regulation⁷⁸. Bis heute ist die Bedeutung von HIF-3 α weitestgehend unbekannt. Eine alternative Splicevariante von HIF-3 α , dem die DNA-Bindungs- und Transaktivierungsdomäne fehlt, wurde kürzlich als ein natürlicher Inhibitor von HIF identifiziert. Diese wurde “inhibitory PAS protein” (IPAS) benannt⁷⁹.

3.2.2. Generierung und Charakterisierung von HIF α defizienten Zellen

Um die Funktion von HIF-1 α näher zu charakterisieren, beabsichtigten wir zunächst, HIF-1 α in einer Zell-Linie durch chemische Mutagenese zu inaktivieren (s. Kap. 2.1.). Diese Versuche wurden in CHO-Zellen durchgeführt, die HIF-1 α , nicht aber HIF-2 α exprimieren. Ein wesentliches Problem bestand in der anschließenden Selektion. Da die HIF-1 Aktivierung zu keiner bekannten Selektionsmöglichkeit führt, wurden die Zellen zunächst stabil mit Oberflächenmarkern (E-selectin und CD2) transfiziert. Diese wurden zuvor mit einem potenten HRE versehen, so daß sie hypoxisch aktivierbar waren. Nach chemischer Mutagenese konnten Zellen selektiert werden, die die transfizierten Oberflächenmarker nicht mehr hypoxisch aktivieren konnten. Dieses wurde immunoselektiv, durch Zugabe von spezifischen Antikörpern gegen CD2 und E-selectin und anschließendes Aussähen auf mit sekundären

Antikörpern beschichteten Kulturschalen durchgeführt (sogenanntes "Panning"). Zellen, die die Möglichkeit zur hypoxischen Aktivierung der Markergene verloren hatten, konnten nicht haften und wurden für die nächste Runde des "Panning" verwendet. Auf diese Weise wurden jeweils 10 Selektionsrunden für die Marker im Wechsel durchgeführt. Durch FACS-Analyse und HIF-Reporter-Assay Studien konnten diese Selektionsergebnisse bestätigt werden. Insgesamt konnten neun Zellklone mit einer über die Zeit stabilen Reduktion der HIF-Aktivierung isoliert werden, von denen einer eine vollständige Inaktivierung zeigte. Diese Zell-Linie wurde Ka 13 genannt und intensiv untersucht.

Die Inaktivierung von Ka 13 konnte durch Re-Transfektion mit HIF-1 α , aber nicht HIF-1 β / ARNT aufgehoben werden. Diese Befunde sprachen für einen Defekt von HIF-1 α selbst und nicht für eine Inaktivierung des O₂-Sensing oder Transaktivierungsapparates. Dieses konnte in Northern Blots, RNase Protection Assays, sowie Immunoblots für HIF-1 α bestätigt werden. Mit dieser Zell-Linie bestand erstmalig die Möglichkeit, funktionelle Auswirkungen von HIF-1 α auf zelluläre Funktionen und Zielgenaktivierung zu untersuchen. Zahlreiche andere Gruppen verwendeten diese generierten Zell-Linien in der Folgezeit. So wurde mit ihnen unter anderem die Apoptose auf HIF-Abhängigkeit untersucht⁸⁰ und es wurden wichtige neue Zielgene gefunden⁸¹. Ka 13 zeigte in unseren Untersuchungen keinen Unterschied des Zellzyklus- und Proliferationsverhaltens, weder unter Normoxie noch unter Hypoxie im Vergleich zu der wild-typ Zelle. Dieses ist ein Hinweis darauf, daß HIF-1 α nicht an diesen Prozessen beteiligt ist. Verschiedene Gene wurden in den Zell-Linien untersucht. Wie erwartet wurde GLUT 1 in der wild-typ Zelle deutlich durch Hypoxie induziert. In Ka 13 jedoch kam es zu keinerlei Induktion; ein deutliches HIF-1 α abhängiges Muster. Das gleiche Regulationsverhalten zeigte das wichtige glykolytische Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), ein hiermit neu identifiziertes HIF-abhängiges Zielgen. Glucose-regulated Protein 78 (GRP78) und Hämoxygenase (HO-1) auf der anderen Seite zeigten ebenfalls eine deutliche Induktion unter Hypoxie, jedoch gleichermaßen auch in der Ka 13 Zelle. HO-1 wurde 1997 als ein HIF-Target identifiziert⁸². In ähnlichen Versuchen mit

ARNT wild-typ und "knockout" Zellen konnte dabei eine Aufhebung der Induktion in ARNT defizienten Zellen festgestellt werden. Anhand der Daten aus Ka 13 läßt sich nun jedoch feststellen, daß es sich zumindestens in unserem System nicht um eine HIF-1 α abhängige Regulation handelt. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, daß die hypoxische Regulation von HO-1 durch HIF-2 α vermittelt wird. Da CHO Zellen kein HIF-2 α exprimieren und HIF-3 α wie oben erwähnt, nicht sauerstoffabhängig reguliert wird ist die hypoxische Induktion von HO-1 und GRP78 in den CHO-Zellen offensichtlich nicht von den bekannten HIF α Isoformen abhängig. Entweder es gibt eine weitere, bisher noch unbekannte HIF α Untereinheit, oder ein unabhängiges System führt zu der sauerstoffabhängigen Induktion dieser Gene.

Inzwischen sind von anderen Arbeitsgruppen „Knockout“-Experimente in Mäusen für HIF-1 und -2 α durchgeführt worden (siehe unten, 3.2.3.). Prinzipiell sind die Stammzellen dieser Experimente auch für zelluläre Experimente geeignet. Aufgrund der ungleich schwierigeren Kulturbedingungen von Stammzellen, eignen sich jedoch CHO-Zellen weitaus besser. Dennoch konnten Experimente mit HIF-1 α defizienten Stammzellen vergleichbare Ergebnisse für eine Reihe von Zielgenen zeigen^{83,84}. Anhand solcher Versuche mit HIF α defizienten Stammzellen konnten weiterhin interessante Befunde für die Induktion der Apoptose erhoben werden. Die hypoxisch vermittelte Apoptose stellte sich als eine Funktion von HIF-1 α heraus⁸⁰. Die durch Glukosedepriuation induzierte Apoptose wurde als eine Funktion von HIF-2 α definiert⁸⁵. Diese Arbeiten weisen auf einen wichtigen funktionellen Unterschied der beiden HIF α Isoformen hin. Eine interessante Frage ist die der Signaltransduktion bei der HIF-2 α Aktivierung durch Glukosedepriuation.

3.2.3. *HIF α* defiziente Tiere („Knockouts“)

Wichtige funktionelle Daten über die Bedeutung von HIF α für die physiologische Entwicklung konnten aus den „Knockout“ Experimenten gewonnen werden. Die Inaktivierung von HIF-1 α führte zu einem Absterben der Föten um den Tag 11 der Entwicklung. Die Tiere zeigten unter anderem erhebliche Abnormalitäten der Vaskulogenese, sowie der Entwicklung des zentralen Nervensystems^{83,84}. Die Ergebnisse der HIF-2 α Experimente waren uneinheitlicher. Zwei Gruppen berichteten ebenfalls über einen letalen Ausgang in der Embryogenese mit erheblichen Abnormalitäten der Gefäße⁸⁶, bzw. schweren kardialen Funktionsstörungen aufgrund mangelnder Katecholaminsynthese⁸⁷. In einem anderem genetischen Hintergrund erreichten etwa die Hälfte der HIF-2 α „knockout“ Tiere das Geburtsalter mit auffälligem Minderwuchs und starben kurze Zeit darauf, offenbar an akutem Lungenversagen⁸⁸. Da die Entwicklung der homozygot inaktivierten Tiere letal verläuft, können diese Tiere nicht für funktionelle Studien verwendet werden. Die heterozygoten Tiere beider HIF Isoformen zeigten jedoch unter Standardbedingungen keinen auffälligen Phänotyp. Anhand dieser Tiere konnte demonstriert werden, daß HIF-1 α unter chronischer Hypoxie vermutlich beteiligt ist an der Entwicklung einer Polyzythämie, rechtsventrikulärer Hypertrophie, pulmonaler Hypertonie⁸⁹, der Aufrechterhaltung elektrophysiologischer Membranpotentiale von Myozyten⁹⁰ und neuronalen Aktivitäten des Carotissinus, sowie der Anpassung des Atemantriebs an die chronische Hypoxie⁹¹.

Eine weitere mögliche Strategie der HIF α Inaktivierung ist das zell-spezifische Targeting eines Gesamtorganismus. Anhand solcher Experimente konnte bereits eine Rolle von HIF-1 α für das Wachstum und Überleben von Chondrozyten⁹², sowie für die Reifung und Funktion von B-Lymphozyten⁹³ definiert werden. Entfernung des HRE vom VEGF Gen transgener Mäuse führte zu einer schwerwiegenden neuromuskulären Erkrankung⁹⁴.

Diese Befunde belegen, daß HIF in einer Vielzahl von pathophysiologisch relevanten Prozessen maßgeblich beteiligt ist. In Kenntnis der großen Anzahl HIF-abhängiger Zielgene (s. Tab. 1) und der weitläufigen Expression von HIF

ist anzunehmen, daß zahlreiche weitere Funktionen von HIF in Zukunft erkannt werden.

3.2.4. Vergleich der Expression und Regulation von HIF-1 α und HIF-2 α

Die Identifikation der zweiten O₂-abhängigen HIF α Untereinheit führte unmittelbar zu der wichtigen Frage, ob es sich um funktionell redundante oder unabhängige Systeme handelt. Aus diesem Grunde haben wir einen Schwerpunkt unserer Arbeiten an dieser Fragestellung ausgerichtet.

3.2.4.1. Experimente in Zelllinien

Um die Expression und Regulation beider HIF α Untereinheiten vergleichend untersuchen zu können, generierten wir spezifische monoklonale Antikörper sowie RNA-Sonden gegen beide Untereinheiten. In verschiedenen maligne transformierten Zelllinien untersuchten wir dann die Regulation von HIF-1 α und HIF-2 α auf Protein- und RNA-Ebene (s. Kap. 2.2.). Entgegen der ursprünglichen Vermutung, daß es sich bei HIF-2 α um ein endothelspezifisches Gen handelt ("Endothelial PAS protein-1", EPAS-1⁷²), konnten wir in den von uns untersuchten Zellen eine weit verbreitete RNA-Expression finden. Vergleichende Untersuchungen der zwei verschiedenen HIF α Proteine zeigten eine gleichartige Regulation, mit nur geringen Unterschieden. Beide Proteine waren zwar unter normoxischen Bedingungen nicht oder nur unwesentlich nachweisbar. HIF-2 α konnte jedoch in der Normoxie bei einigen Zellen eher nachgewiesen werden. Unter graduell zunehmender Hypoxie kam es frühzeitiger zu einer Akkumulation von HIF-2 α , bereits bei Sauerstoffkonzentrationen von etwa 5%, wohingegen ein deutlicher Anstieg der HIF-1 α Abundanz erst bei 1% O₂ gesehen wurde. Abgesehen von diesen geringen Unterschieden zeigten beide HIF α Untereinheiten eine ähnlich deutliche Induktion unter Hypoxie mit einer vergleichbaren Zeitkinetik und Halbwertszeit der Proteine, sowie eine

Stabilisierung durch proteasomale Inhibitoren. Weiterhin konnte bei beiden eine Induktion durch Eisenchelation, sowie Zugabe von Cobalt beobachtet werden. Die Expression beider Proteine war redoxabhängig und zeigte eine Sensitivität gegenüber Inhibitoren von Flavoprotein Oxidoreduktasen. Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß beide HIF α Untereinheiten durch einen einheitlichen O₂-Sensor und Transduktionsmechanismen reguliert werden. Eine vergleichende Analyse der funktionellen Domänen zeigte ebenfalls einen sehr ähnlichen Strukturaufbau der beiden Proteine, mit großer Sequenzübereinstimmung im Bereich funktionell wichtiger Domänen ⁷⁶.

Bei den vielen Ähnlichkeiten drängt sich daher die Frage auf, welche Bedeutung die unterschiedlichen HIF α Untereinheiten haben und ob es funktionelle Unterschiede gibt. Bereits die „Knockout“-Arbeiten (siehe 3.2.3.) zeigten, daß es sich nicht um (ausschließlich) redundante Systeme handelt. Die Inaktivierung einer Untereinheit allein reicht aus, um schwerwiegende Veränderungen in der sich entwickelnden Maus zu erzeugen. Interessanterweise wurde in den verschiedenen „Knockout“-Experimenten ein unterschiedlicher Phänotyp beschrieben. Die erhaltene Funktion der jeweils anderen α -Untereinheit kann also offensichtlich den Defekt nicht kompensieren. Experimente mit den Stammzellen der „Knockout“-Tiere zeigten, daß defiziente Zellen für HIF-1 α die Fähigkeit für die hypoxische Induktion von Glukose Transportern und glykolytischen Enzymen verlieren, obwohl HIF-2 α in diesen Zellen ebenfalls exprimiert wird ⁸³. VEGF wird in seiner Induzierbarkeit lediglich abgeschwächt, so daß hier möglicherweise HIF-2 α anteilig kompensieren kann. Diese Daten deuten an, daß sich die beiden HIF α Untereinheiten möglicherweise in dem Spektrum der durch sie aktivierbaren Zielgene unterscheiden. Bereits zwei der ursprünglichen „Cloning“-Manuskripte deuteten eine größere Affinität von HIF-2 α (verglichen mit HIF-1 α) an dem Promoter von VEGF an ^{72,73}. Mit der Zell-Linie Ka 13 (siehe oben) stand ein geeignetes Instrument zur Verfügung, um die Einflüsse der α -Untereinheiten auf die Transaktivierung verschiedener Zielgene unabhängig voneinander zu untersuchen. Da Ka 13 weder HIF-1 α noch HIF-2 α exprimiert, konnten durch Ko-Transfektion eines zu untersuchenden

Reporter-Gens mit der entsprechenden HIF α Untereinheit funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden. In Bestätigung der genannten Daten zeigte sich eine deutlich stärkere Transaktivierung des VEGF-Reporters durch HIF-2 α , als durch HIF-1 α . Auf der anderen Seite zeigte ein Laktat-Dehydrogenase-Reporter eine stärkere Transaktivierung durch HIF-1 α , so daß möglicherweise die Glykolyse tatsächlich von dieser HIF α Untereinheit dominiert wird. HIF-2 α hingegen scheint möglicherweise für die hypoxische Adaptation der Gefäße eine größere Rolle zu spielen. Zahlreiche andere Gruppen konnten einen stärkeren Effekt von HIF-2 α auf den VEGF Promoter bestätigen^{72,73,95,96}. Dennoch konnten wir eine weitläufige Expression in allen von uns untersuchten Zell-Linien feststellen, so daß die Frage nach der genauen Funktion hier zunächst unbeantwortet blieb. Aufgrund der sehr artifiziellen Situation der Zellkultur, insbesondere der Reporter-Assays, waren Kenntnisse über die Expression und Regulation der HIF α Isoformen *in vivo* zwingend erforderlich.

3.2.4.2. Expression von HIF-1 α und HIF-2 α *in vivo*

Für das Gesamtverständnis des HIF-Systems ist es von vorrangiger Bedeutung zu wissen, welche Organe und Zellen die HIF α Untereinheiten aktivieren können. Aus diesem Grunde etablierten wir die Immunhistochemie an Geweben von Ratten für beide HIF α Untereinheiten. Dies erwies sich aus technischen Gründen als schwierig. Erwartungsgemäß stellte die Degradation der α -Untereinheiten ein Problem dar. Wie viele andere Transkriptionsfaktoren zeigte auch HIF eine eher niedrige Abundanz, so daß die Sensitivität des Assays sehr hoch sein mußte. Durch Stimulation der Tiere mit Kohlenmonoxid, welches mit hoher Affinität an Hämoglobin bindet und dadurch nach Beendigung der Versuche anhielt, konnte das Problem der Degradation erheblich vermindert werden. Durch Antigen Demaskierung unter hohen Temperaturen und hohem Druck, sowie hocheffizienter Amplifikation an perfusionsfixierten Geweben, konnte schließlich eine gute Qualität der Immunhistochemie erreicht werden.

In der Zellkultur ist die O₂-Versorgung der Zellen von mehreren Faktoren abhängig. Die perizelluläre O₂-Konzentration variiert in Abhängigkeit von Angebot (O₂-Luftkonzentration und Mediumdicke) und Verbrauch (Stoffwechsel und Zelldichte). Unter Raumluft konnten in konfluenten HepG2 Kulturen mit Mikroelektrodenmessungen O₂-Spannungen perizellulär von deutlich weniger als 1% gemessen werden⁹⁷. Dennoch kann durch Reduktion der atmosphärischen O₂-Konzentration regelhaft eine deutliche Stimulation der HIF-Aktivität in allen Zellen festgestellt werden. Durch gleichförmige Aussaat der Zellen ist die perizelluläre O₂-Spannung *in vitro* verhältnismäßig gleichförmig. *In vivo* liegt demgegenüber eine ausgesprochen heterogene Situation der O₂-Spannung in verschiedenen Geweben vor, die von zahlreichen Faktoren abhängig ist. Zum Teil werden in einigen Geweben physiologischerweise O₂-Konzentrationen erreicht, die unter Zellkulturbedingungen bereits zu einer kräftigen Induktion von HIF führen. Es ist daher denkbar, daß es in solchen Regionen bereits unter Basalbedingungen zu einer Expression von HIF kommt. Die Niere ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Die O₂-Profile sind in der Niere ausgesprochen heterogen. Einerseits erhält die Niere auf ihr Gewicht bezogen eine sehr hohe Blutversorgung. Andererseits ist die regionale O₂-Versorgung durch Shunt-Diffusion und hohen Verbrauch deutlich eingeschränkt. Somit werden insbesondere im Nierenmark Regionen angetroffen, in denen unter Normalbedingungen nur ein Sauerstoffpartialdruck von < 10 Torr herrscht⁹⁸. Dieser Befund läßt die Niere als physiologisch sinnvollen Ort für die Regulation der Erythropoiese (EPO-Synthese) erscheinen, könnte allerdings auch die hohe Anfälligkeit der Niere für einen Funktionsverlust unter Hypoxie erklären. Aufgrund dieser komplexen Situation führten wir zunächst eine detaillierte Untersuchung der HIF α Expression in der Niere durch (s. Kap. 2.9.). Überraschenderweise konnte unter Basalbedingungen keinerlei Signal für HIF-1 α oder HIF-2 α gesehen werden, auch nicht in der Medulla. Erst unter systemischer Hypoxie mit 8% O₂, aber insbesondere mit 0,1% Kohlenmonoxid, zeigte sich ein deutliches Signal für die HIF α Untereinheiten. HIF-1 α zeigte dabei ein regional betontes Muster,

beginnend im inneren Kortex und zur Papille progredient zunehmend. Die HIF-1 α Expression spiegelt daher das erwartete O₂-Gefälle in der Niere wieder. HIF-2 α hingegen zeigte ein verbreitetes Expressionsmuster, ohne offensichtlichen quantitativen Unterschied zwischen Kortex und Nierenmark. In den *in vitro* Untersuchungen schien HIF-2 α bereits bei höheren O₂-Spannungen induziert zu werden als HIF-1 α . Die weit verteilte Expression von HIF-2 α in der Niere könnte diese Beobachtung bestätigen, da also offensichtlich die höhere O₂-Konzentration im Kortex bereits ausreicht, um HIF-2 α zu stabilisieren.

Interessanterweise zeigten die beiden HIF α Isoformen eine strikte zellspezifische Expression, die nicht überlappte: HIF-1 α wird von den epithelialen Tubuluszellen, HIF-2 α von interstitiellen Zellen exprimiert. Durch Experimente mit anderen Stimuli (totale Ischämie, regionaler Infarkt oder peritoneale Gabe von Cobalt) konnte in nahezu allen Zelltypen der Niere die eine oder andere Isoform induziert werden. Die beschriebene Trennung der zellspezifischen Expression der beiden α -Untereinheiten blieb dabei erhalten, d.h. kein Zelltyp vermochte beide Isoformen zu exprimieren. Wie diese differente Expression *in vivo* erreicht wird, ist bislang unklar. Über eine *in situ* Hybridisierung möchten wir in weiterführenden Arbeiten untersuchen, ob die differente Proteinexpression auf die mRNA Expression der beiden Isoformen zurückzuführen ist.

Die differentielle zelluläre Expression der HIF α Isoformen hat höchstwahrscheinlich funktionelle Auswirkungen der beiden Systeme. Unterschiedliche Funktionen der verschiedenen Zellen, sowie ein andersartiges Spektrum von exprimierten HIF-Zielgenen werden die Auswirkungen einer HIF-1 α oder HIF-2 α Stimulation bestimmen. In detaillierten histologischen Untersuchungen konnten wir zeigen, daß die peritubulären kortikalen Fibroblasten, die für die EPO Produktion verantwortlich sind^{99,100}, lediglich HIF-2 α induzieren können. HIF-2 α und nicht wie ursprünglich angenommen HIF-1 α ist daher vermutlich für die Erythropoiese im adulten Organismus verantwortlich. Daß lediglich HIF-1 α als bindende α -Untereinheit in Hep3B Zellen nachgewiesen werden konnte¹⁵, liegt möglicherweise an den gewählten experimentellen

Bindungsverhältnissen. Es konnte inzwischen gezeigt werden, daß HIF-2 α nur im reduzierten Milieu an einen HRE, so auch den EPO Enhancer binden kann ¹⁰¹. Die redoxabhängige DNA-Bindung der HIF α Isoformen könnte eine weitere Ebene der differentiellen Regulation darstellen.

Im akuten, ischämisch/hypoxischen Nierenversagen kommt es insbesondere zu einer tubulären Nekrose des S3 Segmentes des proximalen Tubulus. Dieses Segment zeigt in unseren Experimenten unter systemischer Hypoxie keine Induktion von HIF α , was möglicherweise einen Erklärungsansatz für die hohe Hypoxie-Anfälligkeit dieser Region darstellt. Erst mit intraperitoneal injiziertem Cobalt ließ sich HIF-1 α in diesen Zellen induzieren. Diese Beispiele spiegeln die Bedeutung der genauen Kenntnisse der zellulären Expression dieser Systeme wieder. Anhand der erhobenen Daten ließe sich spekulieren, daß durch spezifische Modulation der HIF α Isoformen HIF-2 α bei der Erythropoese und HIF-1 α bei dem akuten hypoxischen Nierenversagen ein geeignetes Ziel darstellen.

Im Verlauf unserer Untersuchungen wurde von einer anderen Arbeitsgruppe eine umfassende Arbeit über die HIF-1 α Expression in zahlreichen Organen von Mäusen publiziert ³⁵. Sie zeigten eine weitreichende, jedoch ebenfalls zellspezifische Expression von HIF-1 α in allen Organen. Bemerkenswerterweise wurden Signale auch unter Basalbedingungen beobachtet. Stroka et al. beschrieben jedoch ebenfalls eine deutliche Induktion unter Hypoxie. Aufgrund dieser detaillierten Publikation zu HIF-1 α konzentrierten wir unsere Arbeiten auf HIF-2 α , führten die histologischen Arbeiten jedoch vergleichend mit HIF-1 α durch (s. Kap. 2.10.). Wie bereits in der Niere sahen wir in keinem anderen Organ eine Expression von HIF α unter Basalbedingungen. Jedes der untersuchten Organe konnte aber unter Hypoxie HIF aktivieren. Ebenfalls wie in der Niere fand sich dabei ein zellspezifisches Muster der Expression, mit einer strikten Trennung zwischen Zellen die HIF-1 α oder HIF-2 α aktivieren können. Die Verteilung der Expression von HIF-1 α oder HIF-2 α auf parenchymatöse und nichtparenchymatöse (interstitielle) Zellen, war in den unterschiedlichen

Organen allerdings uneinheitlich. In der Leber fand sich HIF-2 α in den perivenösen Hepatozyten, HIF-1 α hingegen wurde nur in interstitiellen Zellen beobachtet. Die Lunge und der Darm zeigten eine starke Induzierbarkeit nur von HIF-2 α in Alveozyten, bzw. dem Darmepithel. Im Gehirn konnte HIF-1 α in den neuronalen Zellen, HIF-2 α jedoch nur in Gliazellen beobachtet werden. Die einzige Ausnahme dieser Regel stellen Kardiomyozyten dar. In diesen konnte ein kräftiges Signal für beide HIF α Isoformen, häufig in denselben Zellen gefunden werden.

HIF-2 α zeigte in allen Organen eine kräftige Aktivierung in Endothelzellen. Diese Beobachtung bestätigt die frühzeitig geäußerte Vermutung, daß HIF-2 α für die hypoxische Adaptation des Gefäßsystems eine dominante Rolle zu spielen scheint. Einzig die kardialen Endothelzellen vermochten auch HIF-1 α kräftig zu aktivieren, was die besondere Bedeutung dieses Organs und der hypoxischen Adaptation durch HIF zusätzlich unterstreicht.

Zusammenfassend kann nach den Beobachtungen *in vivo* also keinesfalls von redundanten Systemen gesprochen werden. Viel mehr handelt es sich offenbar um ein komplementäres System mit alternativer Nutzung in verschiedenen Zelltypen. Der letale Ausgang der „Knockout“-Experimente könnte durch diesen Befund erklärt werden. HIF ist offenbar für die embryonale Entwicklung notwendig. Da von fast allen (zumindest adulten) Zellen nur eine Isoform aktiviert werden kann, kommt es bei der Inaktivierung dieser α -Isoform offensichtlich zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Funktion der Zellen.

3.3. Expression von HIF unter pathophysiologischen Bedingungen

3.3.1. Ischämische und entzündliche Erkrankungen

Die bisher beschriebenen Modelle der isolierten systemischen Hypoxie oder der funktionelle Anämie an gesundem Gewebe spielen klinisch eine eher untergeordnete Rolle. Klinisch relevanter sind die komplexeren Störungen der

Ischämie. Unter anderem kommt es dabei zusätzlich zu einer Reduktion der zellulären O_2 -Versorgung zu einer Akkumulation von Metaboliten, Abfall des pH und Inflammation des Gewebes. Für die Einschätzung der pathophysiologischen Bedeutung von HIF ist daher von Interesse zu wissen, in wie weit auch unter diesen komplexen Bedingungen eine Aktivierung von $HIF\alpha$ zu sehen ist.

In Herzinfarkten ¹⁰², sowie Modellen der Ischämie an der Retina ¹⁰³ und dem Gehirn ¹⁰⁴ konnte bereits eine Aktivierung von $HIF-1\alpha$ im perinekrotischen Areal demonstriert werden. In eigenen Untersuchungen konnten wir dieses im Herzen und der Niere von Ratten bestätigen. Im Myokardinfarkt sahen wir eine periinfarzielle Aktivierung beider α -Isoformen bis zu 4 Wochen nach dem Ereignis. Interessanterweise sahen wir eine Aktivierung von $HIF-2\alpha$ im gesamten Myokard jenseits des Infarktareals, so daß diese Isoform möglicherweise an dem Remodeling des gesamten Ventrikels beteiligt ist. (Jürgensen et al., Manuskript eingereicht bei „Cardiovascular Research“). In der Niere kam es zu einer deutlichen Aktivierung von $HIF-1\alpha$ und zahlreicher Zielgene im perinekrotischen Areal. Die $HIF-1\alpha$ Expression wies eine Ko-Lokalisation mit Proliferations- und Endothelzellmarkern auf, was einen Einfluß auf die Reparaturvorgänge andeutet. $HIF-2\alpha$ zeigte in der regionalen Ischämie der Niere nur eine vergleichbar schwache Aktivierung (Rosenberger et al., Manuskript eingereicht bei „Kidney International“).

Es ist anzunehmen das der Netto-Effekt dieser Aktivierung unter anderem über die Adaptation des Metabolismus und Stimulation der Angiogenese zu einer Eingrenzung des Infarktareals und Förderung von Reparaturmechanismen führt. Dementsprechend konnte in mehreren Arbeiten ein positiver Effekt von HIF-Überfunktion unter peripherer oder myokardialer Ischämie gezeigt werden ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Weniger offensichtlich als bei der Ischämie, bei der immer auch ein Abfall des Sauerstoffpartialdruckes auftritt, ist die Beteiligung von HIF in entzündlichen Geweben. Das akute Lungenversagen (ARDS) geht mit einem hohen Grad an Inflammation des pulmonalen Gewebes einher. Es konnte gezeigt werden,

daß HIF bei der Produktion von alveolärem Surfactant beteiligt ist und dadurch die Entstehung eines ARDS beim Neugeborenen verhindern kann⁸⁸. Beim manifesten ARDS wird die Inflammation wesentlich durch gesteigerte Freisetzung von Interleukin 8 (IL-8) vermittelt³³. Wir konnten zeigen, daß die Induktion von IL-8 maßgeblich durch Hypoxie vermittelt wird (s. Kap. 2.4.). In Zellkulturexperimenten ließ sich jedoch kein Nachweis für die Beteiligung von HIF an dieser Induktion führen. HIF scheint daher über die Surfactant-Synthese günstig in die Pathogenese einzugreifen. Für eine Beteiligung an der Inflammation des Lungenparenchyms liegen derzeit keine Daten vor.

Ein wichtiges Element gewebständiger Immunabwehr, insbesondere bei bakteriellen Infektionen, ist die Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Diese Aktivierung muß in engen Grenzen gehalten werden, da durch Freisetzung von histotoxischen Substanzen, Sauerstoffradikalen und pro-inflammatorischen Mediatoren eine Gewebsschädigung verursacht werden kann. Die Eindämmung dieser Prozesse geschieht in erster Linie durch Apoptose der Neutrophilen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Hypoxie diese Apoptose hemmt³⁴. Wir konnten demonstrieren, daß dieser Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit unter dem Einfluß von HIF steht und damit eine weitere Funktion dieses Systems darstellt (s. Kap. 2.7.). Die genaue Bedeutung dieses Effektes von HIF bleibt zunächst unklar. Es ist jedoch anzunehmen, daß dadurch eine ausgesprochen starke Aktivierung der Neutrophilen in hypoxischen Geweben vermittelt wird, die möglicherweise in Gewebsschädigungen münden kann.

Die aufgeführten Arbeiten definieren potentielle klinische Zusammenhänge, in denen durch Modulation von HIF möglicherweise ein therapeutischer Nutzen gezogen werden kann.

3.3.2. Tumorerkrankungen

Das unkontrollierte Wachstum von Tumorzellverbänden ist eine Herausforderung an die lokale Nährstoff- und Sauerstoffversorgung. Jegliche

Tumormasse, die über die normale kapilläre Diffusionsstrecke hinausgeht (wenige Kubik-Millimeter), ist daher abhängig von mannigfaltigen Adaptationsmechanismen wie der metabolischen Anpassung, der Angiogenese und der Regulation des pH-Wertes. Bereits 1926 erkannte Warburg, daß Tumorzellen einen veränderten Stoffwechsel, insbesondere eine deutlich gesteigerte Glykolyse aufweisen¹⁰⁸. Dieser Zustand wurde daher als "Warburg Effekt" bezeichnet. 1971 stellte Folkman die heute allgemein akzeptierte Hypothese auf, daß jegliches Tumorstadium oberhalb von wenigen Kubik-Millimetern unabdingbar von der Angiogenese abhängig ist und sich daraus therapeutische Optionen ableiten lassen¹⁰⁹.

In soliden Tumoren treten immer Regionen auf, die schwerst hypoxisch sind¹¹⁰. Die Tumorphoxie ist nicht nur von Bedeutung für das Wachstum des Tumors, sondern auch für therapeutische Gesichtspunkte, da sich gezeigt hat, daß die hypoxischen Regionen eines Tumors häufig gegen therapeutische Maßnahmen resistent sind¹¹¹. Es ist naheliegend zu spekulieren, daß dieses ein Effekt der HIF-Aktivierung in solchen Tumorzellen darstellt. Da es einen Zusammenhang von HIF-Aktivierung und Tumorstadium gibt, wurde frühzeitig vermutet¹¹²⁻¹¹⁴. In vergleichenden Maus-Xenograph Experimenten mit HIF kompetenten und defizienten Zellen konnte dafür der erste experimentelle Nachweis erbracht werden. Die HIF defizienten Tumoren zeigten eine deutlich reduzierte Expression von HIF Zielgenen sowie eine verringerte Kapillarisation, woraus ein signifikant langsames Tumorstadium resultierte^{83,115}. Eine weitere Arbeit kam hinsichtlich des Größenwachstums der experimentellen Tumoren jedoch zu einem gegenteiligen Effekt und führte dieses auf eine gesteigerte, HIF-induzierte Apoptose zurück⁸⁰. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse sind bisher ungeklärt. Die überwiegende Anzahl von Publikationen in der Folge beschrieb jedoch ebenfalls einen begünstigenden Einfluß von HIF auf das Tumorstadium¹¹⁶.

3.3.2.1. Solide Tumoren

Tumorzellverbände solider Karzinome sind heterogene Gewebe. Abhängig von den lokalen Gegebenheiten, insbesondere dem Grad der Vaskularisierung und dem lokalen O₂-Verbrauch, kommt es zu einem Nebeneinander von gut oxygenierten Gewebe und schwerst hypoxischen Arealen, bis hin zu nekrotischen Anteilen. Der Sauerstoffpartialdruck des Tumorgewebes ist daher ausgesprochen wechselhaft¹¹⁰. Übertragen auf eine etwaige HIF-Aktivierung müßte sich dieses in einem fokalen Muster der HIF-Expression ausdrücken. Immunhistologische Arbeiten für HIF-1 α und HIF-2 α an klinischen Materialien konnten dieses erstmals an einer Vielzahl verschiedener humaner Tumoren nachweisen^{117,118}. Seitdem sind von zahlreichen verschiedenen Arbeitsgruppen gleichartige Publikationen erschienen. Teilweise konnte in diesen Arbeiten eine Korrelation der HIF α Expression zu der Kapillarisation des Tumorgewebes und sogar der Prognose der Erkrankung hergestellt werden (Übersicht in Acker und Plate 2002¹¹⁴).

3.3.2.2. VHL assoziierte Tumoren

VHL assoziierte Tumoren werden durch die Inaktivierung beider Allele des Tumor-Suppressors verursacht. Wie bereits beschrieben führt dieses zu einer maximalen, O₂-unabhängigen Aktivierung von HIF in Zellkulturen (3.1.2.), die von renalen Karzinomen abstammen. In wieweit diese Befunde an Zell-Linien für die Biologie humaner Tumoren relevant sind war bislang unklar. Da die Inaktivierung von VHL in allen Tumorzellen zu finden ist, müßte in VHL assoziierten Tumoren eine Aktivierung von HIF in jeder Tumorzelle des gesamten Tumorquerschnittes festzustellen sein. Erste Hinweise für eine Bestätigung dieser Hypothese fanden sich in immunhistochemischen Untersuchungen einzelner Fälle dieser Tumoren^{119,120}. Tumoren von Patienten des VHL-Syndroms sind ausgesprochen selten anzutreffen. Sehr viel häufiger sind die sporadisch auftretende Nierenzellkarzinome und

Hämangioblastome. Bei der großen Mehrzahl der sporadisch auftretenden klarzelligen NZK sowie etwa 50% der sporadischen Hämangioblastome findet sich ebenfalls eine VHL-Inaktivierung⁴³. Wir führten daher in einer großen Zahl von NZK eine systematische Analyse der HIF-1 α Expression, sowie Vertreter seiner Zielgene durch (s. Kap. 2.5.).

Dabei zeigte sich eine deutliche Überexpression von HIF-1 α in der Mehrzahl der klarzelligen NZK, die sich bereits durch das wenig sensitive Immunoblotten nachweisen ließ. Die VHL-Mutationsanalyse von genomischer DNA des Tumorgewebes ergab eine klare Assoziation von Tumoren mit deutlicher HIF-Überexpression und dem Auftreten einer VHL Mutation. Die Immunhistochemie zeigte den erwarteten Befund einer homogenen Aktivierung von HIF-1 α in nahezu jeder Tumorzelle. Die nichtklarzelligen NZK zeigten selten und wenn dann sehr viel schwächer eine Expression von HIF-1 α . Dasselbe Muster stellte sich bei der quantitativen Untersuchung der mRNA Abundanz der Zielgene VEGF und GLUT1 heraus. Interessanterweise zeigte eine Gegenüberstellung quantitativer Daten für HIF-1 α Protein und der mRNA Abundanz der Zielgene eine sehr gute Korrelation. Dieser Befund bestätigt die dominante Rolle von HIF für die transkriptionelle Regulation dieser Gene. Offensichtlich stehen andere regulative Faktoren, wie andere Transkriptionsfaktoren und Einflüsse auf die mRNA Stabilität an Bedeutung deutlich zurück.

Inzwischen konnte eine andere Gruppe unsere Befunde bestätigen und ähnliche Daten auch für HIF-2 α erheben¹²¹. Unter Berücksichtigung der vermuteten wachstumsfördernden Auswirkungen von HIF müßte die maximale Überexpression sich auf das Wachstumsverhalten auswirken. Der lange beschriebene, charakteristische Phänotyp VHL assoziierter Tumoren, mit ausgesprochen starker Vaskularisierung und aggressivem Wachstumsverhalten könnte also in der HIF-Überexpression seine Erklärung finden.

Eine zentrale Frage bei den VHL assoziierten Tumoren ist, ob HIF und VHL lediglich in einem kausalen Zusammenhang stehen, oder ob beide Faktoren eigenständige Einflüsse auf die Tumorgenese und / oder das

Wachstumsverhalten von Tumoren haben. Durch eine vergleichende Gen-Array Analyse aus einer Gruppe von 600 Tumor-assoziierten Genen mit VHL-defizienten und rekonstituierten Zellen, konnten wir sechs neue Gene identifizieren, die offensichtlich einer Regulation durch VHL unterliegen (s. Kap. 2.8.). Das auf den ersten Blick interessanteste Gen dieser Gruppe ist das Cyclin D1, das eine inverse Beziehung zu dem VHL-Status der Zelle zeigt. Anhand unseres Tumormaterials ließ sich zeigen, daß in den VHL-defizienten Zellen eine massive Überexpression von Cyclin D1 vorliegt. Dieses Gen ist maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, indem es den Übergang von der G1- zu der S-Phase steuert. Die Regulation der Expression von Cyclin D1 durch pVHL könnte daher einen Mechanismus darstellen, über den die Tumor-Suppression erreicht wird. HIF selbst scheint in die Regulation von Cyclin D1 nicht einzugreifen, da in unseren Arbeiten keinerlei Regulation durch Hypoxie zu erkennen war. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls keinen Effekt von HIF auf Cyclin D1 feststellen¹²².

Während zahlreiche Hinweise für die Rolle von HIF im Rahmen der Tumorprogression vorliegen, ist die Bedeutung von HIF für die Tumorentstehung weiterhin unklar. HIF α Protein konnte kürzlich bei Patienten mit dem VHL-Syndrom schon in den frühesten Läsionen, zum Teil einzelnen Zellen inmitten des gesunden Nierengewebes nachgewiesen werden¹²³. Dieses macht eine frühe Beteiligung von HIF prinzipiell möglich. Zwei weitere Arbeiten konnten anhand von experimentellen Tumoren zeigen, daß HIF einen dominierenden Einfluß auf das Wachstumsverhalten hat. Für die Tumorentwicklung in diesen Experimenten schien die Expression von HIF wichtiger zu sein als der VHL Status der Zellen^{124,125}. Dabei schien HIF-2 α eine bedeutendere Rolle zu spielen als HIF-1 α , was einen weiteren wichtigen funktionellen Unterschied der beiden Systeme andeutet. Eine kürzlich publizierte Arbeit mit VHL -/- Stammzellen konnte zeigen, daß ein VHL „Knockout“ zwar auch in diesen Zellen zu einer maximalen Aktivierung von HIF führt, die daraus gebildeten Tumoren jedoch überraschenderweise eine geringere Tumorigenität als die wild-typ Zellen aufweisen¹²⁶. Die Rolle von

VHL (und HIF) in nicht renalen Tumoren ist daher bisher nur unzureichend charakterisiert.

Ein interessantes, wenn auch seltenes klinisches Phänomen ist das der paraneoplastischen Polyzythämie. In den meisten Fällen wird dieses vermutlich durch eine Überproduktion von EPO durch den Tumor verursacht. Prinzipiell kann dieses Phänomen bei vielen verschiedenen Tumoren auftreten. Am häufigsten ist es jedoch bei den VHL assoziierten Tumoren, insbesondere den NZK zu beobachten⁴⁶. Bei den NZK wird die Häufigkeit einer Polyzythämie mit 1 – 5% angegeben und ist somit im Vergleich zu anderen Tumoren ein weitaus häufigeres Ereignis^{127,128}. In allen beschriebenen Fällen bildete sich die Polyzythämie nach vollständiger chirurgischer Entfernung des Tumors zurück. Die EPO-Sekretion geht also offensichtlich von dem Tumorgewebe aus. In der Vergangenheit konnten zwei Arbeiten an Einzelpräparaten solcher Tumoren EPO mRNA bzw. das Protein direkt in den Tumorzellen nachweisen^{129,130}. Mehreren Gruppen gelang es, Tumorzellen solcher polyzythämer Patienten in die Kultur zu bringen¹³¹⁻¹³³, Nackmäusen zu injizieren und dadurch diese wiederum polyzythämisch zu machen¹³³⁻¹³⁵. Diese Arbeiten zeigen zweifelsfrei, daß die Tumorzellen selbst die Quelle der EPO-Sekretion sind. Wir untersuchten die molekularen Grundlagen dieser Zusammenhänge in einem Patienten, der sich initial mit einem akuten Myokardinfarkt vorstellte (s. Kap. 2.6.). Die Coronarangiographie zeigte keinerlei Hinweis auf arteriosklerotische Veränderungen, sondern einen thrombotischen Verschuß. Als Ursache der Coronarthrombose wurde eine Polyzythämie mit einem Hb von 22 g/dl festgestellt. Die Abdomensonographie zeigte einen großen Nierentumor, der sich postoperativ als klarzelliges NZK herausstellte. Die Analyse des Tumormaterials zeigte eine massiv erhöhte Expression der mRNA für EPO, sowie zahlreicher weiterer HIF-Zielgene. Sowohl im Immunoblot, als auch in der Immunhistochemie ließen sich HIF-1 α und HIF-2 α in hoher Konzentration nachweisen. Die Mutationsanalyse der genomischen DNA aus dem Tumor zeigte eine Punktmutation im VHL Gen mit dem Effekt eines Aminosäureaustausches (Leu163Pro). Die *in vitro* Expression dieses

mutierten pVHL zeigte in Immunopräzipitaten kein Bindungsverhalten mit HIF α . Dieser Befund zeigt, daß die Punktmutation dazu führt, daß das mutierte pVHL die Fähigkeit verliert, HIF zu binden und damit zu destruieren. Interessanterweise liegt die Mutation nicht in der HIF bindenden β -Domäne, sondern in der α -Domäne, die die Bindung zu dem Elongin-Cul2-Komplex herstellt⁵⁴. Es ist daher anzunehmen, daß die Mutation die Tertiärstruktur des gesamten Proteins verändert, und so die Bindung an HIF α beeinträchtigt. Anhand dieser klinischen Einzelbeobachtung konnte somit erstmals die Relevanz dieser komplexen molekularen Zusammenhänge aufgezeigt werden.

Ungeklärt ist nach wie vor die Frage, welcher Mechanismus in den Tumorzellen die EPO-Sekretion ermöglicht. Klarzellige NZK stammen von den proximalen renalen Tubulusepithelien ab, die normalerweise zur EPO-Produktion nicht im Stande sind. In einer Sammlung von bisher 70 NZK fanden wir eine EPO Expression in etwa 35% der Fälle. Diese Zahl ist deutlich höher als die Häufigkeit des klinischen Syndroms der Polyzythämie (Wiesener et al., in Vorbereitung). Die Gründe für das Ausbleiben einer Polyzythämie bei gleichzeitig gesteigerter Genexpression von EPO könnte in einem Eisenmangel, systemischer Inflammation oder Infiltration des Knochenmarkes liegen. Diese Bedingungen liegen häufig bei einer malignen Erkrankung vor und mindern die Funktion, bzw. die Aktivierung von EPO⁴.

Kürzlich konnte die Ursache der familiären Cuvash Polyzythämie, sowie zahlreicher anderer kongenitaler Polyzythämien gefunden werden. In allen Fällen fand sich eine Mutation des VHL Genes, ohne das ein Malignom vorgelegen hat^{136,137}. Dieser Befund, sowie die auffällige Häufung von VHL assoziierten Tumoren mit dem klinischen Syndrom der Polyzythämie weisen auf eine Rolle von pVHL für die zellspezifische Expression des EPO Gens hin. In künftigen Arbeiten möchten wir versuchen, die Grundlagen dieser Regulation zu finden.

3.4. Perspektiven therapeutischer Beeinflussung

Die Vielzahl der von HIF beeinflussten Zielgene und pathophysiologischen Vorgänge und die zugleich sehr spezifische physiologische Induktion machen es zu einem attraktiven Kandidaten für eine therapeutische Modulation. Dies gilt insbesondere deshalb, weil es sich bei HIF nicht um einen speziellen Effektor mit singulärer Auswirkung handelt, sondern um eine zentrale Schaltstelle einer koordinierten Genexpression. Nach den bisherigen Erkenntnissen geht man von einer überwiegend protektiven Funktion von HIF auf diejenigen Zellen, die es exprimieren aus. Demzufolge müsste eine Stabilisierung von HIF in der Ischämie, bzw. eine Blockade von HIF in Tumorzellen klinisch sinnvoll sein.

Die mannigfaltigen Auswirkungen von HIF geben allerdings Anlaß zu der Sorge, daß ein signifikantes Spektrum an unerwünschten Nebenwirkungen durch die Manipulation entsteht. Aus diesem Grund sollte der gewählte Ansatz der Modulation so spezifisch wie möglich sein und die Applikation gegebenenfalls lokal erfolgen.

3.4.1. *Überexpression von HIF bei ischämischen Erkrankungen*

In Situationen kritisch reduzierter Perfusion und damit verbundener Reduktion des O₂-Angebotes ist das Überleben der Zellen unmittelbar von zahlreichen Anpassungsvorgängen abhängig. So müssen die betroffenen Zellen kurzfristig ihren Energiebedarf über die anaerobe Glykolyse decken, die einen erhöhten Substratbedarf nach sich zieht. Infolge dessen muß der Glukosetransport stimuliert werden. Für die Reparatur des geschädigten Gewebes ist mittelfristig Angiogenese notwendig. Alle diese Prozesse sind wesentlich durch HIF reguliert, dessen Expression über die endogene Expression hinaus vermutlich sinnvoll ist.

Eine theoretische Sorge bei Überexpression von HIF ist die Begünstigung existierender oder gar die Entstehung neuer Tumoren (siehe Kapitel 3.3.2.). Diese ernstzunehmende potentielle Auswirkung bedarf gründlicher weiterer

Untersuchungen. Weiterhin stellt sich die Frage, ob durch eine Überexpression von HIF allein, prinzipiell ein entsprechender Effekt erreicht werden kann. Erste experimentelle Hinweise dafür konnten in transgenen Mäusen mit einer HIF-Überexpression in der Epidermis erbracht werden. Im Gegensatz zu vergleichbaren Arbeiten, in denen VEGF alleine überexprimiert wurde, führte die Überexpression von HIF-1 α zu einer deutlich gesteigerten Vaskularisierung der Epidermis, mit einem dichten Netzwerk von geordneten und dichten Kapillaren¹³⁸. Diese Daten geben einen deutlichen ersten Hinweis auf die Nützlichkeit und die biologische Relevanz einer HIF-Überexpression.

Aufgrund der Erkenntnisse über das Sauerstoff-Sensing aus jüngster Zeit (siehe Kapitel 3.1.3.) erscheint momentan der Ansatz kleinmolekulare Substanzen zu entwickeln, die im aktiven Zentrum der PHDs oder des FIH-1 ihre Wirkung entfalten, am vielversprechendsten. Durch Inhibition der Hydroxylierung an den spezifischen Prolinresten könnte HIF α stabilisiert werden. Die Blockade der Hydroxylierung des Asparaginrestes in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne müßte eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität zur Folge haben. Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur dieser Enzyme wird möglicherweise bei der Entwicklung kleinmolekularer Inhibitoren behilflich sein. Weiterhin wird sie möglicherweise die Entwicklung Isoenzym-spezifischer Substanzen zulassen.

In eigenen Untersuchungen mit PHD Inhibitoren erwiesen sich einige dieser Substanzen effektiv bei der Induktion von HIF in der Zellkultur sowie in einem *in vivo* Angiogenesemodell (Warnecke et al., FASEB J *in press*). Eine weitere Publikation konnte kürzlich die Stabilisierung von HIF durch PHD-Inhibitoren in der Zellkultur demonstrieren¹³⁹. Weiterhin konnte vor kurzem gezeigt werden, daß die Anwendung einer solchen Substanz in einem Modell eines Myokardinfarktes die linksventrikuläre Funktion verbessert¹⁴⁰.

Weitere Strategien in Diskussion sind die Applikation von spezifischen Peptiden der pVHL Bindungsregion von HIF α , die ebenfalls in angewandten

Modellen der Angiogenese Effektivität zeigen konnten¹⁴¹. Anhand eines anderen Peptides, PR39, wurde in einem Myokardinfarkt Modell eine Stabilisierung von HIF, sowie eine gesteigerte Angiogenese erreicht¹⁰⁷. Wir versuchen in Zusammenarbeit mit dem RNA Netzwerk Berlin, spezifische Aptamere gegen HIF α zu generieren, die sich gegen die pVHL Bindungsstelle richten. Wenn es gelänge dadurch pVHL von der Bindung zu verdrängen, so müßte eine Stabilisierung von HIF α erreicht werden können.

Zusammenfassend sind zahlreiche Strategien der Stabilisierung von HIF bisher in experimenteller Erprobung. Definitive Daten über eine therapeutische Nutzbarkeit liegen jedoch noch nicht vor.

3.4.2. Blockade von HIF in Tumoren

Jegliches Gewebewachstum hängt von der Fähigkeit ab, Energie und Sauerstoff für das expandierende Gewebe bereitzustellen. Dieses trifft zum Beispiel für die Embryogenese und die Wundheilung zu. In besonderem Maße aber ist das außerordentlich schnelle Wachstum von Tumoren von der Ausbildung einer Gefäßversorgung und Adaptation des Glukosestoffwechsels abhängig^{114,142}. HIF scheint bei diesen Anpassungsvorgängen des Tumorgewebes eine wesentliche Rolle zu spielen und übt daher vermutlich einen prognostisch ungünstigen Einfluß aus. Aus diesem Grund werden Inhibitoren der HIF-Funktion als eine mögliche therapeutische Strategie diskutiert.

In den Nierenzellkarzinomen konnten wir eine maximale HIF-Aktivierung in nahezu jeder Tumorzelle finden. Sie unterscheiden sich darin wesentlich von anderen Karzinomen, die lediglich eine regional betonte Aktivierung der HIF α Isoformen aufweisen. Es ist davon auszugehen, daß die homogene Überexpression von HIF in den Nierenzellkarzinomen biologisch relevant ist. Wir haben daher postuliert, daß ein therapeutischer Ansatz, der sich gegen die HIF-Funktion richtet, in den VHL assoziierten Karzinomen am vielversprechendsten sein könnte

Den ersten Hinweis für eine Effektivität der HIF Blockade auf das Tumorwachstum konnte durch Peptide, die sich gegen die HIF-Bindungsstelle an dem transkriptionellen Ko-Faktor p300/CBP richten, erbracht werden. Durch diese Peptide konnte die transkriptionelle Aktivität von HIF maßgeblich gesenkt werden. In Xenograph Tumor-Modellen wurde dadurch ein deutlich reduziertes Tumorwachstum erreicht ¹⁴³.

Andere Strategien, die momentan diskutiert werden, sind die Nutzung spezifischer siRNA Moleküle und die Überexpression dominant negativer Mutationen. Für den letzteren Ansatz konnte die Effektivität für HIF-2 α in vitro bereits demonstriert werden ¹⁴⁴. Ein Screen von ca. 2000 kleinmolekularer Substanzen des „National Cancer Institutes“ (U.S.A.) zeigte kürzlich vier Kandidaten, die die HIF-Transaktivierung deutlich herabsetzten ¹⁴⁵. Der genaue Mechanismus dieser Hemmung ist bisher unbekannt; die Substanzen werden jedoch bereits auf ihre Effektivität in Tumor-Modellen hin untersucht.

Die Problematik eines pharmakologischen Ansatzes zur HIF-Blockade in Tumoren ist sicherlich die spezifische Applikation. Eine lokale Gabe von Substanzen selektiv im Tumorgewebe ist technisch schwierig. Makrophagen migrieren durch Tumorgewebe in Richtung hypoxischer Regionen. Es wurde daher bereits diskutiert, gentechnisch manipulierte Makrophagen mit hypoxisch aktivierbaren histotoxischen Substanzen einzusetzen ¹⁴⁶.

Die Folgen einer systemischen HIF-Blockade sind derzeit noch nicht absehbar. Ob HIF auch unter physiologischen Bedingungen im gesunden Gewebe eine Rolle spielt, ist unklar. In unseren Untersuchungen war unter normalen Bedingungen keinerlei Expression der HIF α Isoformen festzustellen. Unter dem Einfluß von molekularem Sauerstoff könnte dieses jedoch durch Degradation bedingt sein. Ferner könnte eine systemische Blockade von HIF bei Tumor-Patienten mit gleichzeitig bestehenden chronischen Ischämien (z.B. peripher arterielle Verschlusskrankheit), die möglicherweise in diesen Regionen eine kontinuierliche HIF-Aktivierung aufweisen, erhebliche Nebenwirkungen nach sich ziehen. Potentielle

Strategien zur HIF-Blockade müssen daher intensiv auf solche unerwünschten Folgen untersucht werden.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die ständige Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff (O_2) ist ein elementarer Bestandteil jeglicher multizellulärer Lebensformen. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase sind diese auf die Bildung des Energiesubstrates ATP durch oxidative Phosphorylierung angewiesen. Die mitochondriale Atmungskette benötigt dafür zwingend O_2 als terminalen Elektronakzeptor. Bei einer inadäquaten O_2 -Versorgung (Hypoxie) kann durch die deutlich weniger ergiebigere anaerobe Glykolyse ein alternativer Weg genutzt werden. Für den Energiehaushalt eines Gesamtorganismus reicht dieses jedoch nicht aus. Aus diesem Grunde mußten höhere Organismen während der Evolution komplexe Systeme entwickeln, die die Aufnahme und Verteilung von O_2 in jede Zelle sicherstellen, sowie eine Adaptation in Phasen der Hypoxie erlauben. Wie wir heute wissen, werden diese mannigfaltigen Prozesse zu einem großen Teil transkriptionell und direkt durch die Verfügbarkeit von O_2 selbst reguliert.

Anhand der Regulation des Erythropoietin Gens konnte 1995 der Transkriptionsfaktor "Hypoxia-inducible Factor-1" (HIF-1) identifiziert werden. Dieser stellte sich in der Folge als entscheidender Regulator der hypoxischen Adaptation heraus. Unter anderem werden Prozesse wie die Erythropoese, die Angiogenese, die Modulation des Gefäßtonus, des Glukosetransportes und der Glykolyse wesentlich durch HIF reguliert.

HIF ist ein Heterodimer bestehend aus zwei Untereinheiten; einer konstitutiven β - und einer regulativen α -Untereinheit. Letztere zeigt ein inverses Expressionsmuster zur perizellulären O_2 -Konzentration. Unter normoxischen Bedingungen ist HIF α instabil und wird über das Ubiquitin-Proteasom-System mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten degradiert. Erst unter Hypoxie wird HIF α stabilisiert und ist transkriptionell aktiv.

Es konnten bisher zwei funktionell relevante O_2 -abhängige α -Untereinheiten identifiziert werden: HIF-1 α und HIF-2 α . Die Bedeutung dieser beiden Systeme, der unterliegenden Regulationsmechanismen sowie die Relevanz

dieses Systems *in vivo* waren weitgehend ungeklärt und sind wesentlicher Teil der hier zusammengefaßten Arbeiten.

Durch die Herstellung spezifischer Antikörper gegen jede HIF α Isoform ist es uns gelungen, die Expression und Regulation dieser beiden Faktoren vergleichend zu untersuchen. In Zellkulturen zeigte sich ein sehr ähnliches Regulationsmuster hinsichtlich der O₂-abhängigen Degradation, bzw. dem Induktionsverhalten unter Hypoxie, sowie der chemisch/pharmakologischen Modulation. Wir folgerten daraus, daß beide Isoformen offenbar über den gleichen O₂-Sensing- und Transduktionsapparat reguliert werden. Aufgrund der Ähnlichkeit der Systeme stellte sich zunehmend die Frage, welche Bedeutung diesen beiden unabhängigen HIF α Isoformen zuzumessen ist. An Geweben von gesunden Ratten konnten wir eine systematische Analyse der Expression und Regulation der beiden HIF α Untereinheiten in mehreren Organen durchführen. In normoxischen Geweben war HIF α nicht nachweisbar, selbst nicht im Nierenmark, das physiologischerweise O₂-Spannungen aufweist, die *in vitro* bereits zu einer deutlichen HIF-Induktion führen. Erst unter systemischer Hypoxie konnten deutliche Signale für beide Isoformen gesehen werden. Der interessanteste Befund dieser Arbeiten ist, daß beide HIF α Isoformen nur von spezifischen Zellpopulationen exprimiert werden. Dabei zeigte sich das Muster der Expression bezogen auf parenchymatöse oder interstitielle Zellen in den verschiedenen Organen unterschiedlich. Lediglich die endothelialen Zellen zeigten in jedem Organ eine starke Expression von HIF-2 α . Diese Untereinheit scheint damit für die hypoxische Adaptation des Gefäßsystems eine dominante Rolle zu spielen. Das Herz war das einzige Organ in dem wir eine überlappende Expression beider Isoformen fanden. Sowohl in den Kardiomyozyten, als auch in den endothelialen Zellen konnten wir beide HIF α Untereinheiten detektieren. *In vivo* lassen sich also klare Unterschiede im Expressionsmuster der beiden Systeme feststellen. Über die unterschiedlichen zellulären Funktionen und different exprimierten Zielgene werden diese Unterschiede funktionell relevant sein. Das Induktionsverhalten in verschiedenen Organen bei recht unterschiedlicher O₂-Spannung macht deutlich, daß *in vivo* die Regulation keinem Absolutwert folgt, sondern intrinsische Faktoren der Zellen ebenfalls

eine Rolle spielen. Die genaue Beschreibung der zellulären Lokalisation von den HIF α Untereinheiten ist Voraussetzung für eine gezielte Modulation des Systems. Dieses könnte unter anderem in Regionen der Ischämie von klinischem Vorteil sein.

Für die Erkennung regulativer Mechanismen eignen sich häufig Untersuchungen an Systemen, die für bestimmte Faktoren inaktiviert sind. Prinzipiell kann man dieses an experimentell herbeigeführten, aber auch an klinisch bekannten Mutationen durchführen. Der ersten Strategie folgend, führten wir in CHO-Zellen eine erfolgreiche Mutagenese für HIF-1 α durch. Durch Vergleich mit der wild-typ Zelle, sowie Re-Transfektion mit HIF-1 α oder HIF-2 α stehen damit nun wertvolle experimentelle Werkzeuge zur Verfügung, um HIF-abhängige zelluläre Vorgänge und Ziel-Gene zu untersuchen. Indirekte Hinweise für die Beteiligung an der HIF-Regulation einer klinisch bekannten Mutation lagen für das von Hippel-Lindau (VHL) Gen vor. VHL ist ein Tumor-Suppressor Gen, welches bei Mutation in der Keimzellbahn zu einer familiären Präkanzerose, dem VHL Syndrom, führt. Bei Inaktivierung des zweiten Allels kommt es zu dem Auftreten charakteristischer, stark vaskularisierter Tumoren. Auch die Mehrzahl sporadisch auftretender klarzelliger Nierenzellkarzinome geht mit einer VHL-Inaktivierung einher. Durch Arbeiten mit renalen Karzinom-Zellen konnten wir VHL als entscheidenden regulativen Faktor für die HIF-Degradation identifizieren. Wir beobachteten eine O₂- und eisen-abhängige, direkte Bindung von VHL and HIF α . Die Degradation von HIF war unmittelbar von dieser Bindung abhängig. VHL ist also der bindende Teil einer E3-Ubiquitin Ligase, die die Ubiquitinierung und damit O₂-abhängige Destruktion einleitet. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend ist es vor kurzem gelungen, den zellulären O₂-Sensor zu identifizieren. 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen führen in Anwesenheit von O₂ eine Hydroxylierung charakteristischer Prolinreste von HIF α durch. Diese Reaktion findet in einem eisenhaltigen aktiven Zentrum, nur in der Anwesenheit von O₂ statt und ist die Voraussetzung für die Bindung an VHL. Durch diese Arbeiten wurde also ein ganz wesentlicher Beitrag für die Erkennung O₂-abhängiger Regulationsmechanismen geleistet.

Es wird vermutet, daß HIF eine bedeutsame Rolle bei dem Wachstum maligner Tumoren spielt. Das überschießende Wachstum proliferierender Tumorzellen führt zu Regionen mit erheblichem O₂- und Nährstoffdefizit. Daher ist das Wachstum von Tumorgewebe abhängig von Adaptationsmechanismen des Stoffwechsels und der Angiogenese. Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten eine regionale Aktivierung von HIF α in verschiedenen Tumoren feststellen und dieses teilweise mit einer schlechteren klinischen Prognose korrelieren. Die Aktivierung von HIF in Tumoren geschieht wahrscheinlich durch eine Senkung der Gewebsspannung für O₂ und ist daher regional betont. Wir konnten an Hand von Untersuchungen an Nierenzellkarzinomen zeigen, daß es im Unterschied dazu in VHL assoziierten Tumoren, in Folge genetischer Inaktivierung von VHL in jeder Tumorzelle zu einer homogenen, starken Aktivierung von HIF α kommt. Darüber hinaus zeigte sich eine klare Assoziation zwischen der Expression von HIF-1 α und entsprechender Zielgene wie Glukose-1 Transporter und VEGF. Diese Befunde könnten den charakteristischen, hypervaskularisierten Phänotyp der VHL assoziierten Tumoren erklären. Derzeit wird vielfach versucht, durch Inhibition von HIF eine neue Strategie zur Tumorthherapie zu entwickeln. Aufgrund der vorliegenden Daten müßte dieser Ansatz in VHL assoziierten Tumoren am aussichtsreichsten sein. Anhand eines klinischen Falles konnten wir erstmals die oben aufgeführten molekularen Zusammenhänge an einem Patienten aufzeigen. Dieser Patient stellte sich mit einem akuten Myokardinfarkt vor, der durch eine schwere EPO-induzierte Polyzythämie bedingt war. Als Ursache der Polyzythämie fand sich ein klarzelliges Nierenzellkarzinom, welches HIF und seine Zielgene maximal überexprimierte. Die Mutationsanalyse der Tumor-DNA zeigte eine Punktmutation für VHL, die dazu führt, daß pVHL *in vitro* die Bindung an HIF α und damit die Fähigkeit zur Destruktion von HIF α verliert.

Zusammenfassend konnten durch die beschriebenen Arbeiten wesentliche Aspekte der Regulation und der biologischen Relevanz von HIF, sowohl in gesunden Geweben, als auch in Tumoren, dargestellt werden. In der

Abbildung 3 ist abschließend das Modell der HIF-Regulation nach heutiger Vorstellung gezeigt.

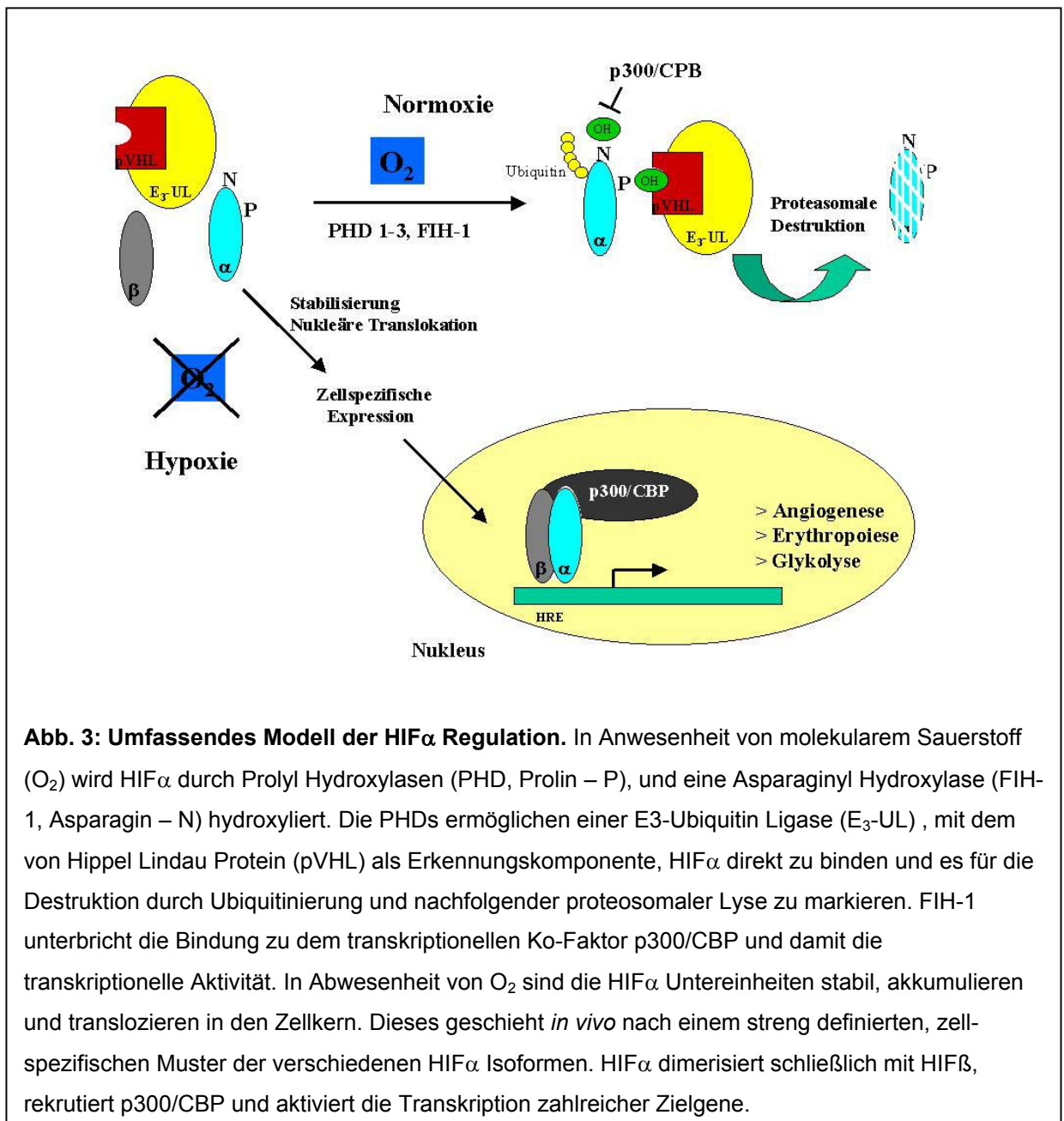


Abb. 3: Umfassendes Modell der HIF α Regulation. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (O₂) wird HIF α durch Prolyl Hydroxylasen (PHD, Prolin – P), und eine Asparaginy Hydroxylase (FIH-1, Asparagin – N) hydroxyliert. Die PHDs ermöglichen einer E3-Ubiquitin Ligase (E₃-UL), mit dem von Hippel Lindau Protein (pVHL) als Erkennungskomponente, HIF α direkt zu binden und es für die Destruktion durch Ubiquitinierung und nachfolgender proteosomaler Lyse zu markieren. FIH-1 unterbricht die Bindung zu dem transkriptionellen Ko-Faktor p300/CBP und damit die transkriptionelle Aktivität. In Abwesenheit von O₂ sind die HIF α Untereinheiten stabil, akkumulieren und translozieren in den Zellkern. Dieses geschieht *in vivo* nach einem streng definierten, zellspezifischen Muster der verschiedenen HIF α Isoformen. HIF α dimerisiert schließlich mit HIF β , rekrutiert p300/CBP und aktiviert die Transkription zahlreicher Zielgene.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Graham, J. B., Dudley, R., Aguilar, N. M., and Gans, C. Implications of the late Palaeozoic oxygen pulse for physiology and evolution. *Nature*, 375: 117-120, 1995.
- 2 Nisbet, E. G. and Sleep, N. H. The habitat and nature of early life. *Nature*, 409: 1083-1091, 2001.
- 3 Bunn, H. F. and Poyton, R. O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*, 76: 839-885, 1996.
- 4 Jelkmann, W. and Hellwig-Burgel, T. Biology of erythropoietin. *Adv.Exp.Med Biol.*, 502: 169-187, 2001.
- 5 Fisher, J. W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp.Biol.Med* (Maywood.), 228: 1-14, 2003.
- 6 Goldberg, M. A., Glass, G. A., Cunningham, J. M., and Bunn, H. F. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 7972-7976, 1987.
- 7 Goldberg, M. A., Dunning, S. P., and Bunn, H. F. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, 242: 1412-1415, 1988.
- 8 Schuster, S. J., Badiavas, E. V., Costa-Giomi, P., Weinmann, R., Erslev, A. J., and Caro, J. Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood*, 73: 13-16, 1989.
- 9 Goldberg, M. A., Gaut, C. C., and Bunn, H. F. Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events. *Blood*, 77: 271-277, 1991.
- 10 Semenza, G. L., Traystman, M. D., Gearhart, J. D., and Antonarakis, S. E. Polycythemia in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 86: 2301-2305, 1989.
- 11 Beck, I., Ramirez, S., Weinmann, R., and Caro, J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J.Biol.Chem.*, 266: 15563-15566, 1991.
- 12 Semenza, G. L., Nejfelt, M. K., Chi, S. M., and Antonarakis, S. E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 88: 5680-5684, 1991.

- 13 Pugh, C. W., Tan, C. C., Jones, R. W., and Ratcliffe, P. J. Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *88*: 10553-10557, 1991.
- 14 Semenza, G. L. and Wang, G. L. 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.*, *12*: 5447-5454, 1992.
- 15 Wang, G. L. and Semenza, G. L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, *270*: 1230-1237, 1995.
- 16 Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *92*: 5510-5514, 1995.
- 17 Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *90*: 2423-2427, 1993.
- 18 Wang, G. L. and Semenza, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*, *90*: 4304-4308, 1993.
- 19 Wenger, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.*, *16*: 1151-1162, 2002.
- 20 Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr.Res.*, *49*: 614-617, 2001.
- 21 Bradbury, J. Breathing hard to keep up with HIF-1. *Lancet*, *358*: 1704, 2001.
- 22 Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., and Bunn, H. F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J.Biol.Chem.*, *271*: 32253-32259, 1996.
- 23 Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C., and Marti, H. H. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am.J.Physiol*, *271*: C1172-C1180, 1996.
- 24 Jewell, U. R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R. H., and Gassmann, M. Induction of HIF-1a in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.*, 2001.
- 25 Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, *95*: 7987-7992, 1998.
- 26 Salceda, S. and Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J Biol Chem*, *272*: 22642-22647, 1997.

- 27 Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 274: 6519-6525, 1999.
- 28 Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.*, 17: 6573-6586, 1998.
- 29 Luo, J. C. and Shibuya, M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene*, 20: 1435-1444, 2001.
- 30 Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J.Biol.Chem.*, 272: 11205-11214, 1997.
- 31 Srinivas, V., Zhang, L. P., Zhu, X. H., and Caro, J. Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 260: 557-561, 1999.
- 32 Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., and Fujii-Kuriyama, Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.*, 18: 1905-1914, 1999.
- 33 Donnelly, S. C., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Walz, A., Robertson, C. R., Carter, D. C., Grant, I. S., Pollok, A. J., and Haslett, C. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*, 341: 643-647, 1993.
- 34 Hannah, S., Mecklenburgh, K., Rahman, I., Bellingan, G. J., Greening, A., Haslett, C., and Chilvers, E. R. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett.*, 372: 233-237, 1995.
- 35 Stroka, D. M., Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R. H., Neil, D. A., Bauer, C., Gassmann, M., and Candinas, D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.*, 15: 2445-2453, 2001.
- 36 v.Hippel, E. Über eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut. *Graefes Arch.Ophthalmol.*, 59: 83-106, 1904.
- 37 Lindau, A. Zur Frage der Angiomatosis Retinae und ihrer Hirnkomplikationen. *Acta Ophthalmol.*, 4: 193-226, 1927.
- 38 Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., and . Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 260: 1317-1320, 1993.
- 39 Knudson, A. G. Antioncogenes and human cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90: 10914-10921, 1993.
- 40 Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., and Kaelin, W. G., Jr. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat.Med.*, 1: 822-826, 1995.

- 41 Gnarr, J. R., Zhou, S., Merrill, M. J., Wagner, J. R., Krumm, A., Papavassiliou, E., Oldfield, E. H., Klausner, R. D., and Linehan, W. M. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 10589-10594, 1996.
- 42 Schoenfeld, A., Davidowitz, E. J., and Burk, R. D. A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95: 8817-8822, 1998.
- 43 Maher, E. R. and Kaelin, W. G. Jr. von Hippel-Lindau disease. *Medicine*, 76: 381-391, 1997.
- 44 Pugh, C. W. and Ratcliffe, P. J. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF- 1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin.Cancer Biol.*, 13: 83-89, 2003.
- 45 Iliopoulos, O., Levy, A. P., Jiang, C., Kaelin, W. G. Jr., and Goldberg, M. A. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 10595-10599, 1996.
- 46 Prchal, J. T. Pathogenetic mechanisms of polycythemia vera and congenital polycythemic disorders. *Semin.Hematol.*, 38: 10-20, 2001.
- 47 Kaelin, W. G. and Maher, E. R. The VHL tumour-suppressor gene paradigm. *Trends Genet.*, 14: 423-426, 1998.
- 48 Kaelin, W. G., Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat.Rev.Cancer*, 2: 673-682, 2002.
- 49 Kamura, T., Koepp, D. M., Conrad, M. N., Skowyra, D., Moreland, R. J., Iliopoulos, O., Lane, W. S., Kaelin, W. G., Jr., Elledge, S. J., Conaway, R. C., Harper, J. W., and Conaway, J. W. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science*, 284: 657-661, 1999.
- 50 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., and Maxwell, P. H. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, 275: 25733-25741, 2000.
- 51 Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., and Poellinger, L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.*, 19: 4298-4309, 2000.
- 52 Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V., and Kaelin, W. G. Jr. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*, 2: 423-427, 2000.
- 53 Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel- Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97: 10430-10435, 2000.

- 54 Stebbins, C. E., Kaelin, W. G., and Pavletich, N. P. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*, 284: 455-461, 1999.
- 55 Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K., and Reimann, J. D. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.*, 10: 429-439, 2000.
- 56 Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A. A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science*, 292: 468-472, 2001.
- 57 Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin Jr, W. G. HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science*, 292: 464-468, 2001.
- 58 Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.*, 20: 5197-5206, 2001.
- 59 Hon, W. C., Wilson, M. I., Harlos, K., Claridge, T. D., Schofield, C. J., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., Stuart, D. I., and Jones, E. Y. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature*, 417: 975-978, 2002.
- 60 Min, J. H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W. G., Jr., and Pavletich, N. P. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*, 296: 1886-1889, 2002.
- 61 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., and Ratcliffe, P. J. C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. *Cell*, 107: 43-54, 2001.
- 62 Bruick, R. K. and McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 294: 1337-1340, 2001.
- 63 Oehme, F., Ellinghaus, P., Kolkhof, P., Smith, T., Ramakrishnan, S., Hutter, J., Schramm, M., and Flamme, I. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 296: 343, 2002.
- 64 Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D. M., Gleadle, J. M., Bocca, S. N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P. J., and Wappner, P. Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein similar. *Mol.Cell Biol.*, 22 : 6842-6853, 2002.
- 65 Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F., and Livingston, D. M. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93: 12969-12973, 1996.

- 66 Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., and Whitelaw, M. L. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch
1. *Science*, 295: 858-861, 2002.
- 67 Mahon, P. C., Hirota, K., and Semenza, G. L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.*, 15: 2675-2686, 2001.
- 68 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., and Schofield, C. J. Hypoxia-inducible Factor (HIF) Asparagine Hydroxylase Is Identical to Factor Inhibiting HIF (FIH) and Is Related to the Cupin Structural Family. *J.Biol.Chem.*, 277: 26351-26355, 2002.
- 69 Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., and Bruick, R. K. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.*, 16: 1466-1471, 2002.
- 70 Lee, C., Kim, S. J., Jeong, D. G., Lee, S. M., and Ryu, S. E. Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and VHL. *J Biol.Chem.*, 2002.
- 71 Dann, C. E., III, Bruick, R. K., and Deisenhofer, J. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99: 15351-15356, 2002.
- 72 Tian, H., McKnight, S. L., and Russell, D. W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & Development*, 11: 72-82, 1997.
- 73 Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. 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.U.S.A*, 94: 4273-4278, 1997.
- 74 Hogenesch, J. B., Chan, W. K., Jackiw, V. H., Brown, R. C., Gu, Y.-Z., Pray-Grant, M., Perdew, G. H., and Bradfield, C. A. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem*, 272: 8581-8593, 1997.
- 75 Flamme, I., Fröhlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A., and Risau, W. 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*, 63: 51-60, 1997.
- 76 O'Rourke, J. F., Tian, Y. M., Ratcliffe, P. J., and Pugh, C. W. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J.Biol.Chem.*, 274: 2060-2071, 1999.
- 77 Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., and Bradfield, C. A. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr.*, 7: 205-213, 1998.

- 78 Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., and Imura, N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 α . *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 287: 808-813, 2001.
- 79 Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., and Poellinger, L. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414: 550-554, 2001.
- 80 Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.-M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neemann, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., and Keshet, E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation, and tumor angiogenesis. *Nature*, 394: 435-439, 1998.
- 81 Sowter, H. M., Ratcliffe, P. J., Watson, P., Greenberg, A. H., and Harris, A. L. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.*, 61: 6669-6673, 2001.
- 82 Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L., and Choi, A. M. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J.Biol.Chem.*, 272: 5375-5381, 1997.
- 83 Ryan, H. E., Lo, J., and Johnson, R. S. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*, 17: 3005-3015, 1998.
- 84 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., and Semenza, G. L. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.*, 12: 149-162, 1998.
- 85 Brusselmans, K., Bono, F., Maxwell, P., Dor, Y., Dewerchin, M., Collen, D., Herbert, J. M., and Carmeliet, P. Hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J.Biol.Chem.*, 276: 39192-39196, 2001.
- 86 Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L., and Fong, G. H. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 α plays an important role in vascular remodeling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97: 8386-8391, 2000.
- 87 Tian, H., Hammer, R. E., Matsumoto, A. M., Russell, D. W., and McKnight, S. L. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.*, 12: 3320-3324, 1998.
- 88 Compennolle, 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., and Carmeliet, P. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat.Med*, 8: 702-710, 2002.
- 89 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., and Semenza, G. L. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α . *J.Clin.Invest*, 103: 691-696, 1999.

- 90 Shimoda, L. A., Manalo, D. J., Sham, J. S., Semenza, G. L., and Sylvester, J. T. Partial HIF-1 α deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 281: L202-L208, 2001.
- 91 Kline, D. D., Peng, Y. J., Manalo, D. J., Semenza, G. L., and Prabhakar, N. R. Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α . *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99: 821-826, 2002.
- 92 Schipani, E., Ryan, H. E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., and Johnson, R. S. Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.*, 15: 2865-2876, 2001.
- 93 Kojima, H., Gu, H., Nomura, S., Caldwell, C. C., Kobata, T., Carmeliet, P., Semenza, G. L., and Sitkovsky, M. V. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 α -deficient chimeric mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99: 2170-2174, 2002.
- 94 Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., Theilmeier, G., Dewerchin, M., Laudénbach, V., Vermylen, P., Raat, H., Acker, T., Vlemingckx, V., Van Den, B. L., Cashman, N., Fujisawa, H., Drost, M. R., Sciote, R., Bruyningckx, F., Hicklin, D. J., Ince, C., Gressens, P., Lupu, F., Plate, K. H., Robberecht, W., Herbert, J. M., Collen, D., and Carmeliet, P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat.Genet.*, 28: 131-138, 2001.
- 95 Xia, G., Kageyama, Y., Hayashi, T., Kawakami, S., Yoshida, M., and Kihara, K. 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*, 91: 1429-1436, 2001.
- 96 Akeno, N., Czyzyk-Krzeska, M. F., Gross, T. S., and Clemens, T. L. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia-inducible factor-2 α . *Endocrinology*, 142: 959-962, 2001.
- 97 Metzén, E., Wolff, M., Fandrey, J., and Jelkmann, W. Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. *Respir.Physiol*, 100: 101-106, 1995.
- 98 Lubbers, D. W. and Baumgartl, H. Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO₂ distribution in the living tissue. *Kidney Int.*, 51: 372-380, 1997.
- 99 Bachmann, S., Le Hir, M., and Eckardt, K.-U. Colocalization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem*, 41: 335-341, 1993.
- 100 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., and Ratcliffe, P. J. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int*, 44: 1149-1162, 1993.
- 101 Lando, D., Pongratz, I., Poellinger, L., and Whitelaw, M. L. A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α and the HIF-like factor. *J.Biol.Chem.*, 275: 4618-4627, 2000.

- 102 Lee, S. H., Wolf, P. L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S. W., and Thistlethwaite, P. A. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N.Engl.J.Med.*, 342: 626-633, 2000.
- 103 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., and Campochiaro, P. A. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 40: 182-189, 1999.
- 104 Bergeron, M., Gidday, J. M., Yu, A. Y., Semenza, G. L., Ferriero, D. M., and Sharp, F. R. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann.Neurol.*, 48: 285-296, 2000.
- 105 Vincent, K. A., Shyu, K. G., Luo, Y., Magner, M., Tio, R. A., Jiang, C., Goldberg, M. A., Akita, G. Y., Gregory, R. J., and Isner, J. M. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation*, 102: 2255-2261, 2000.
- 106 Shyu, K. G., Wang, M. T., Wang, B. W., Chang, C. C., Leu, J. G., Kuan, P., and Chang, H. Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1alpha/VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc.Res.*, 54: 576-583, 2002.
- 107 Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C., Sato, K., Tsai, J., Aird, W., Rosenberg, R. D., Hampton, T. G., Sellke, F., Carmeliet, P., and Simons, M. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat.Med.*, 6: 49-55, 2000.
- 108 Warburg, O. Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin: Springer, 1926.
- 109 Folkman, J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285: 1182-1186, 1971.
- 110 Vaupel, P., Kallinowski, F., and Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*, 49: 6449-6465, 1989.
- 111 Brown, J. M. and Giaccia, A. J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*, 58: 1408-1416, 1998.
- 112 Hanahan, D. and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86 : 353-364, 1996.
- 113 Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 11: 293-299, 2001.
- 114 Acker, T. and Plate, K. H. A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol.Med*, 80: 562-575, 2002.
- 115 Maxwell, P. H., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Nicholls, L. G., Harris, A. L., Stratford, I. J., Hankinson, O., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 8104-8109, 1997.

- 116 Ryan, H. E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J. M., and Johnson, R. S. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.*, *60*: 4010-4015, 2000.
- 117 Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L., and Simons, J. W. Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 alpha in Common Human Cancers and their metastases. *Cancer Res.*, *59*: 5830-5835, 1999.
- 118 Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Harris, A. L. 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.*, *157*: 411-421, 2000.
- 119 Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I., and Plate, K. H. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene*, *19*: 5435-5443, 2000.
- 120 Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J. M., Laughner, E., Simons, J. W., and Semenza, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in brain tumors. *Cancer*, *88*: 2006-2018, 2000.
- 121 Turner, K. J., Moore, J. W., Jones, A., Taylor, C. F., Cuthbert-Heavens, D., Han, C., Leek, R. D., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., Cranston, D., and Harris, A. L. Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: relationship to angiogenesis and to the von Hippel-Lindau gene mutation. *Cancer Res*, *62*: 2957-2961, 2002.
- 122 Bindra, R. S., Vasselli, J. R., Stearman, R., Linehan, W. M., and Klausner, R. D. VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells. *Cancer Res*, *62*: 3014-3019, 2002.
- 123 Mandriota, S. J., Turner, K. J., Davies, D. R., Murray, P. G., Morgan, N. V., Sowter, H. M., Wykoff, C. C., Maher, E. R., Harris, A. L., Ratcliffe, P. J., and Maxwell, P. H. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell*, *1*: 459-468, 2002.
- 124 Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M., and Kaelin, W. G., Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell*, *1*: 237-246, 2002.
- 125 Maranchie, J. K., Vasselli, J. R., Riss, J., Bonifacino, J. S., Linehan, W. M., and Klausner, R. D. The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell*, *1*: 247-255, 2002.
- 126 Mack, F. A., Rathmell, W. K., Arsham, A. M., Gnarra, J., Keith, B., and Simon, M. C. Loss of pVHL is sufficient to cause HIF dysregulation in primary cells but does not promote tumor growth. *Cancer Cell*, *3*: 75-88, 2003.
- 127 Motzer, R. J., Bander, N. H., and Nanus, D. M. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, *335*: 865-873, 1996.

- 128 Karumanchi, S. A., Merchan, J., and Sukhatme, V. P. Renal cancer: molecular mechanisms and newer therapeutic options. *Curr. Opin. Nephrol Hypertens.*, *11*: 37-42, 2002.
- 129 Da Silva, J. L., Lacombe, C., Bruneval, P., Casadevall, N., Leporrier, M., Camilleri, J. P., Bariety, J., Tambourin, P., and Varet, B. Tumor cells are the site of erythropoietin synthesis in human renal cancers associated with polycythemia. *Blood*, *75*: 577-582, 1990.
- 130 Noguchi, Y., Goto, T., Yufu, Y., Uike, N., Hasegawa, Y., Fukuda, T., Jimi, A., and Funakoshi, A. Gene expression of erythropoietin in renal cell carcinoma. *Intern. Med.*, *38*: 991-994, 1999.
- 131 Sytkowski, A. J., Richie, J. P., and Bicknell, K. A. New human renal carcinoma cell line established from a patient with erythrocytosis. *Cancer Res.*, *43*: 1415-1419, 1983.
- 132 Hagiwara, M., Chen, I. L., McGonigle, R., Beckman, B., Kasten, F. H., and Fisher, J. W. Erythropoietin production in a primary culture of human renal carcinoma cells maintained in nude mice. *Blood*, *63*: 828-835, 1984.
- 133 Okabe, T., Urabe, A., Kato, T., Chiba, S., and Takaku, F. Production of erythropoietin-like activity by human renal and hepatic carcinomas in cell culture. *Cancer*, *55*: 1918-1923, 1985.
- 134 Toyama, K., Fujiyama, N., Suzuki, H., Chen, T. P., Tamaoki, N., and Ueyama, Y. Erythropoietin levels in the course of a patient with erythropoietin-producing renal cell carcinoma and transplantation of this tumor in nude mice. *Blood*, *54*: 245-253, 1979.
- 135 Shouval, D., Anton, M., Galun, E., and Sherwood, J. B. Erythropoietin-induced polycythemia in athymic mice following transplantation of a human renal carcinoma cell line. *Cancer Res.*, *48*: 3430-3434, 1988.
- 136 Ang, S. O., Chen, H., Hirota, K., Gordeuk, V. R., Jelinek, J., Guan, Y., Liu, E., Sergueeva, A. I., Miasnikova, G. Y., Mole, D., Maxwell, P. H., Stockton, D. W., Semenza, G. L., and Prchal, J. T. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat. Genet.*, 2002.
- 137 Pastore, Y. D., Jelinek, J., Ang, S., Guan, Y., Liu, E., Jedlickova, K., Krishnamurti, L., and Prchal, J. T. Mutations in the VHL Gene in Sporadic Apparently Congenital Polycythemia. *Blood*, 2002.
- 138 Elson, D. A., Thurston, G., Huang, L. E., Ginzinger, D. G., McDonald, D. M., Johnson, R. S., and Arbeit, J. M. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev.*, *15*: 2520-2532, 2001.
- 139 Ivan, M., Haberberger, T., Gervasi, D. C., Michelson, K. S., Gunzler, V., Kondo, K., Yang, H., Sorokina, I., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Kaelin, W. G., Jr. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002.
- 140 Nwogu, J. I., Geenen, D., Bean, M., Brenner, M. C., Huang, X., and Buttrick, P. M. Inhibition of collagen synthesis with prolyl 4-hydroxylase inhibitor improves left ventricular

- function and alters the pattern of left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Circulation*, 104: 2216-2221, 2001.
- 141 Willam, C., Masson, N., Tian, Y. M., Mahmood, S. A., Wilson, M. I., Bicknell, R., Eckardt, K. U., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., and Pugh, C. W. Peptide blockade of HIF α degradation modulates cellular metabolism and angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99: 10423-10428, 2002.
- 142 Maxwell, P. H. Oxygen homeostasis and cancer: insights from a rare disease. *Clin.Med*, 2: 356-362, 2002.
- 143 Kung, A. L., Wang, S., Klco, J. M., Kaelin, W. G., and Livingston, D. M. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat.Med.*, 6: 1335-1340, 2000.
- 144 Maemura, K., Hsieh, C. M., Jain, M. K., Fukumoto, S., Layne, M. D., Liu, Y., Kourembanas, S., Yet, S. F., Perrella, M. A., and Lee, M. E. Generation of a dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain. *J.Biol.Chem.*, 274: 31565-31570, 1999.
- 145 Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Scudiero, D. A., Selby, M., Sausville, E. A., Shoemaker, R. H., and Melillo, G. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res*, 62: 4316-4324, 2002.
- 146 Dachs, G. U., Patterson, A. V., Firth, J. D., Ratcliffe, P. J., Townsend, K. M., Stratford, I. J., and Harris, A. L. Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat.Med.*, 3: 515-520, 1997.

6. VERSUCHSGENEHMIGUNGEN

Für die gentechnischen Untersuchungen (S1) lag die Genehmigung 358/00 der lokalen Behörden vor (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin).

Für die Tierversuche lagen die Genehmigungen der lokalen Behörden 0093/99 und 0224/02 vor (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin).

Für die Untersuchung der klinischen Präparate lag die Genehmigung der Ethik-Kommission des Klinikums der Charité vom 13.03.2000 vor.

7. DANKSAGUNGEN

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Frei, Direktor der Medizinischen Klinik m.S. Nephrologie und internistische Intensivmedizin am Virchow Klinikum der Charité, für seine stets großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Tätigkeiten und die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen.

Herrn Professor Dr. Eckardt, Oberarzt der Medizinischen Klinik m.S. Nephrologie und internistische Intensivmedizin des Virchow Klinikums der Charité und Leiter der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe, in der ich seit 1995 tätig bin, gilt mein ganz besonderer Dank für die stets freundschaftliche, inspirative und kooperative Zusammenarbeit. Der Verlauf meiner klinischen und wissenschaftlichen Laufbahn wurde von ihm wesentlich geprägt.

Den Herren Professor Ratcliffe, Dept. Nephrology der University of Oxford, und Professor Maxwell, Dept. Nephrology des Hammersmith Hospital in London, bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet. Während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit in Oxford, aber auch nach meiner Rückkehr nach Berlin waren sie stets außerordentlich anregende und freundschaftliche Kooperationspartner. Nach Ablauf meiner Auslands-Förderung durch die DFG erhielt ich durch Ihr Mitwirken ein Stipendium der medizinischen Fakultät in Oxford (Barnes Fund).

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitgliedern, Doktorandinnen und Doktoranden beider Arbeitsgruppen in Oxford und Berlin. Die in dieser Schrift aufgeführten Arbeiten sind das Ergebnis gemeinschaftlicher Arbeiten gewesen, die in stets freundschaftlicher und kooperativer Atmosphäre durchgeführt werden konnten.

Herrn Professor Dr. Frömmel, Prodekan für Forschung der Charité, danke ich für die Bereitstellung und Ermöglichung der individuellen Nutzung eines Forschungsstipendiums der Fakultät. Dieses ermöglichte mir die sinnvolle Verbindung klinischer Ausbildung mit wissenschaftlicher Tätigkeit.

Bedanken möchte ich mich schließlich bei der großzügigen Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Durchführung der wissenschaftlichen Untersuchungen.

8. ANLAGE:**EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG;**

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftliche Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

Datum: 06.03.2003

Michael Wiesener

Unterschrift

ORIGINALARBEITEN

“Selection and analysis of a mutant cell line defective in the HIF-1 α subunit. Characterisation of HIF-1 α -dependent and –independent hypoxia-inducible gene expression.”

Wood SM, Wiesener MS, Yeates KM, Okada N, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ. *J Biol Chem* 1998;273(14):8360-8

“Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterisation and comparison with HIF-1 α .”

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. *Blood* 1998;92(7):2260-8

“The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.”

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. *Nature* 1999 May 20; 399(6733):271-5

“The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages – a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS).”

Hirani N, Antonicelli F, Strieter RM, Wiesener MS, Ratcliffe PJ, Haslett C, Donnelly SC. *Mol Med*. 2001 Oct;7(10):685-97

“Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of HIF-1 α in clear cell renal carcinomas.”

Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jürgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Löning SA, Frei U, Maher ER, Gröne HJ, Eckardt KU. *Cancer Res*. 2001 Jul 1;61(13):5215-22

“Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel Lindau gene in a renal cell carcinoma”.

Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, Jürgensen JS, Rosenberger C, Morgan NV, Maher ER, Frei U, Eckardt KU. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3562-5

“Identification of cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene by expression array analysis and investigation of cyclin D1 genotype as a modifier in von Hippel-Lindau disease.”

Zatyka M, da Silva NF, Clifford SC, Morris MR, Wiesener MS, Eckardt KU, Houlston RS, Richards FM, Latif F, Maher ER. *Cancer Res*. 2002 Jul 1;62(13):3803-11

“Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis.”

Mecklenburgh KI, Walmsley SR, Cowburn AS, Wiesener MS, Reed BJ, Upton PD, Deighton J, Greening AP, Chilvers ER. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):3008-16

“Expression of HIF-1 α and HIF-2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys”.

Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Bachmann S, Eckardt KU. *J Am Soc Nephrol* 2002 Jul; 13(7):1874-6

“Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs.”

Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. *FASEB J*. 2003 Feb;17(2):271-3