

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann

Einfluss intrazellulärer Kinasen auf die Aktivierung
des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1
durch Insulin, Interleukin-1 β und Hypoxie

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Daniel Philipp Stiehl
geboren in Göttingen

Lübeck 2003

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
(Institut für Physiologie, Uni Lübeck)

2. Berichterstatter: PD Dr. rer. Nat. Frank Petersen
(Forschungszentrum Borstel)

3. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Max Gassmann
(Universität Zürich)

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2004

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.11.2004

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

*Meinem Großvater Alfred,
der mein Interesse an den Naturwissenschaften
geweckt hat.*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungen	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Sauerstoff-Homöostase in Säugetierzellen	1
1.1.1 Energiestoffwechsel eukaryontischer Zellen	2
1.1.2 Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1)	3
1.1.2.1 Funktion der HIF-1-Prolyl-Hydroxylasen	4
1.1.2.2 Hypoxische Transaktivierung von HIF-1	5
1.1.3 O ₂ -regulierte Genexpression: HIF-1-Zielgene	8
1.2 HIF-1: Nicht nur ein Regulator der O ₂ -abhängigen Genexpression	10
1.2.1 Normoxische Induktoren von HIF-1	10
1.2.2 Vom extrazellulären Stimulus zur zellulären Antwort: intrazelluläre Signaltransduktionsnetze	12
1.2.2.1 Der PI 3-K-/Akt-/mTOR-Pfad	12
1.2.2.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen: Raf/MEK/Erk	14
1.3 Zielsetzung der vorliegenden Studien	15
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Zellkultur	18
2.1.1 Zellkulturversuche	18
2.2 Kernextraktion	18
2.3 Proteinbestimmung nach Bradford	19
2.4 Western Blot	19
2.5 HIF-1-EMSA	20
2.6 Messung von sekretiertem VEGF und EPO	21
2.6.1 VEGF-ELISA	22
2.6.2 EPO-ELISA	22
2.7 Zytotoxizitätstest mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid)	22
2.8 Reportergenuntersuchungen	23
2.9 Transiente Transfektion mit Expressionsplasmiden für konstitutiv aktive und inaktive Formen von PI 3-K und Akt	24
2.9.1 Plasmidkonstruktion von pcDNA3.1-p85ΔiSH2	26
2.9.2 Zellkultur und transiente Transfektion	26
2.9.3 Reportergenexperimente mit Dualer Luziferase (DLA)	26
2.9.4 Western Blot Analyse aus transient transfizierten Zellkulturen	27
2.10 p42/44 MAPK <i>in vitro</i> Phosphorylierungsstudien von HIF-1α- Fusionsproteinen	28
2.10.1 GST-Fusionsprotein Expression und Aufreinigung	28
2.10.2 <i>In vitro</i> p42/44 MAPK Phosphorylierungsstudien	28

2.11	Statistische Auswertung	29
3	ERGEBNISSE.....	30
3.1	Insulin induziert HIF-1 α auch unter normoxischen Kulturbedingungen	30
3.2	Die Induktion von HIF-1 α durch Insulin wird durch die PI 3-Kinase vermittelt	32
3.2.1	Zytotoxizitätstest für LY294002, PD098059 und U0126	32
3.2.2	LY294002 antagonisiert die Insulin-vermittelte HIF-1 α -Aktivierung.....	33
3.3	IL-1 β , ein weiterer Stimulator normoxischer HIF-Aktivität	36
3.3.1	Die normoxische Induktion von HIF-1 α durch IL-1 β beruht auf PI 3-Kinase-Vermittlung	36
3.4	Insulin und IL-1 β steigern die transkriptionelle Aktivität in HRG1-Zellen unter normoxischen Kulturbedingungen.....	38
3.5	LY294002 reguliert die Akkumulation von Hypoxie-induziertem HIF-1 α	39
3.5.1	LY294002 inhibiert die transkriptionelle Aktivität in hypoxischen HRG1-Zellen.....	40
3.5.2	Effekte der Kinase-Inhibitoren LY294002 und PD098059 auf die Hypoxie-vermittelte Produktion von EPO und VEGF	41
3.6	<i>In vitro</i> Expression konstitutiv aktiver Formen von PI 3-K und Akt.....	43
3.6.1	Die konstitutive Aktivierung des PI 3-K-/Akt-Signalweges steigert die Transkription eines HIF-1-regulierten Reporter gens	45
3.7	MAPKs beeinflussen die hypoxische Aktivierung eines HIF-1-regulierten Reporter gens	46
3.7.1	HIF-1 α ist direktes Substrat der p42/44 MAPK	47
4	DISKUSSION.....	49
4.1	Normoxische Aktivatoren von HIF-1 erweitern das Spektrum des Transkriptionsfaktors	49
4.2	Kontrolliert ein genereller Mechanismus die normoxische Aktivierung von HIF-1 durch extrazelluläre Mediatoren?	50
4.2.1	PI 3-K und HIF-1	52
4.3	Hypoxisch induziertes HIF-1: Ist die PI 3-K an der Stabilisierung beteiligt?.....	54
4.4	Reguliert die PI 3-K die Expression von EPO?	56
4.5	Von Akt zu HIF-1 α : Suche nach Verknüpfungen	57
4.6	MAPKs steigern die transkriptionelle Aktivität von HIF-1	59
4.7	HIF-1 α ist ein Phosphoprotein.....	61
4.8	Die transkriptionelle Aktivierung von HIF-1 durch MAPK ist unabhängig von der direkten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors	62
4.9	HIF-1. Ein proliferativer Faktor auch <i>in vivo</i> ?	64
4.9.1	Wachstumsfaktoren, Onkogene und HIF: „Meilensteine“ der Tumorentstehung.....	66
5	ZUSAMMENFASSUNG	68

6	LITERATURVERZEICHNIS	71
7	ANHANG	81
7.1	Materialien	81
7.1.1	Chemikalien	81
7.1.2	Puffer und Lösungen	83
7.1.3	Zellkultur-Medien	88
7.2	Firmen.....	89
7.3	Abbildungsverzeichnis	90
7.4	Tabellen	90
7.5	Danksagungen.....	91
7.6	Lebenslauf	92
7.7	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	94

Abkürzungen

Akt *zelluläres Homologon des viralen Onkogens v-akt*; auch PKB

ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)

AS **Aminosäure**

Asn **Asparagin**

ATP **Adenosin**triphosphat

Bad *Protein, Agonist der Apoptose*

bHLH (**b**asic **h**elix-**l**oop-**h**elix, *Protein DNS-Bindungsdomäne*)

c.p.m. (gezählte) Impulse pro Minute (**c**ounts **p**er **m**inute)

CBP CREB-bindendes Protein (**C**REB **b**inding **p**rotein)

cDNS komplementäre **DNS** (complementary DNA)

Ci **Curie**

CMV Zytomegalie-Virus (**C**ytomegalo **V**irus)

CoCl₂ Kobaltchlorid

CPX **Ciclopirox**

CREB (**c**AMP-**r**esponsive **e**lement-**b**inding protein)

C-TAD **C**arboxy-terminale **T**ransaktivierungs-**D**omäne

DFX **Desferrioxamin**

DNS **D**esoxyribonukleinsäure

DTT **D**ithiothreitol

EDTA **E**thyl**d**iamin-**t**etraacetat

EGF epidermaler Wachstumsfaktor (**e**pidermal **g**rowth **f**actor)

eIF4E **e**ukaryontischer **T**ranslations-**I**nitiations-**F**aktor **4E**

ELISA enzymgekoppelter Immunoassay (**e**nzyme-linked immunosorbent **a**ssay)

EMSA Gel Shift Experiment (**e**lectromobility **s**hift **a**ssay)

EPO **E**rythropoietin

Erk (**e**xtracellular signal-**r**egulated protein **k**inase); auch MAPK

FGF Fibroblasten-Wachstumsfaktor (**f**ibroblast **g**rowth **f**actor)

F_{iO₂} inspiratorische O₂-Konzentration

FKHR (**F**orkhead in **r**habdomyosarcoma); *Transkriptionsfaktor*

Flt-1 *VEGF-Rezeptor 1*

FRAP (**F**orkhead binding protein 12-**r**apamycin-**a**ssociated **p**rotein); auch mTOR

g *Erdbeschleunigung*

GLUT1/3 **G**lukosetransporter **1/3**

GSK-3 Glykogen-Synthase Kinase-3 (**g**lycogen **s**ynthase **k**inase-3)

GST **G**lutathion-**S**-Transferase

HA Hämagglutinin aus *Haemophilus influenza*

HBS HIF-Bindungsstelle (**H**IF **b**inding **s**ite)

HGF Hepatozyten-Wachstumsfaktor (**h**epatocyte **g**rowth **f**actor)

HIF Hypoxie-induzierbarer Faktor (**h**ypoxia-inducible **f**actor)

HPH..... **HIF Prolyl-Hydroxylase**

HPO..... (**horseradish peroxidase**)

HRE..... **Hypoxie-responsibles Element** (hypoxia responsive element)

IGF..... Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (**insulin-like growth factor**)

IgG..... **Immunglobulin G**

IL-1 β **Interleukin-1 β**

iNOS..... **induzierbare NO-Synthase**

IPTG **Isopropyl-D-Thiogalaktosid**

IRS..... Insulin-Rezeptorsubstrat (**insulin receptor substrate**)

JNK..... (**Jun N-terminal kinase**)

kDa **Kilodalton**

LY LY294002, *Inhibitor der PI 3-K*

MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase (**mitogen-activated protein kinase**)

MAPKK..... MAPK-Kinase

MAPKKK..... MAPKK-Kinase

MBP..... **Myelin-Bindungsprotein**

MEK..... (**MAPK/Erk-activating kinase**)

mRNS..... Boten-**Ribonukleinsäure** (RNS; **messenger ribonucleic acid**)

mTOR..... (**mammalian target of rapamycin**; auch FRAP)

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl **Tetrazoliumbromid**

NF- κ B (**nuclear factor- κ B**), *Transkriptionsfaktor*

N-TAD..... *Amino-terminale Transaktivierungs-Domäne*

O₂..... molekularer Sauerstoff

ODD..... **O₂-abhängige Degradierungs-Domäne** (O₂-depending degradation domain, ODD)

³²P..... Phosphor 32 (*radioaktives Isotop*)

p300..... Histon Acetyl-Transferase, *transkriptioneller Koaktivator*

p70^{S6K} *Serin/Threonin Kinase, Regulator der Translation*

PAG **Polyacrylamid-Gel**

PAS **Per/ARNT/Sim**; *Proteininteraktionsdomäne*

PBS phosphatgepufferte Kochsalzlösung (**phosphate-buffered saline**)

PD..... PD098059, *Inhibitor der MEK1*

PDGF..... (**platelet derived growth factor**)

PDK (**phosphatidyl-dependent protein kinase**)

PH..... (**pleckstrin homology domain**)

PHD..... Prolyl-Hydroxylase (**prolyl hydroxylase domain containing**), auch HPH

PI 3-K..... Phosphatidylinositol 3-Kinase (**phosphatidylinositol 3-kinase**)

PI Phosphatidylinositol (**phosphatidylinositol**)

PKB Proteinkinase B (**protein kinase B**, auch Akt)

PMSF..... **Phenylmethylsulfonylfluorid**

PTEN (**phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten**)

PVDF **Polyvinylidifluorid**

ABKÜRZUNGEN

pVHL.....	von H ippel- L indau Tumorsuppressor- P rotein
Raf.....	<i>Proto-Onkogen Serin/Threonin Protein Kinase</i>
SAPK.....	S tress-aktivierte P roteinkinase (stress-activated protein kinase)
SDS.....	Natrium-Dodecylsulfat (s odium d odecyl s ulfate)
SH2.....	(S rc- h omology 2)
Shc.....	(S H2-containing collagen-related protein)
Sos.....	(s on of s evenless)
TfHBS.....	HBS enthaltendes <i>Oligonukleotid aus dem humanen Transferrin-Enhancer</i>
TGF- β	(transforming g rowth factor- β)
TNF- α	(tumor n ecrosis factor- α)
U0.....	U0126, <i>Inhibitor der MEK1/2</i>
UV.....	ultraviolett ($\lambda=100-400$ nm)
VEGF.....	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (v ascular e ndothelial g rowth factor)

1 Einleitung

1.1 Sauerstoff-Homöostase in Säugetierzellen

Sauerstoff (O_2) ist für die meisten heutigen Lebewesen von fundamentaler Bedeutung. Vor mehr als 2,5 Milliarden Jahren ist die Konzentration an molekularem O_2 in der Erdatmosphäre bis zu dem heutigen Gehalt von 21% beständig angestiegen. Es wird angenommen, dass mit der weitläufigen Ausbreitung Photosynthese betreibender, Kohlendioxid verstoffwechselnder Organismen eine dauerhafte Anreicherung der Atmosphäre mit O_2 stattgefunden hat. Ausschlaggebend für die Stabilisierung des molekularen O_2 in der Erdatmosphäre muss der Entzug von Kohlenstoff aus dem atmosphärischen Kreislauf gewesen sein: Die Zunahme des O_2 übertraf schließlich die Beseitigung durch reduzierende Stoffe. Dominierten die frühe Erdatmosphäre reduzierende Gase wie Methan und Kohlendioxid, so entstand ab diesem Zeitpunkt eine zunehmend oxidierende, O_2 -dominierte Atmosphäre. Die veränderten atmosphärischen Bedingungen haben zur Entwicklung von Lebewesen geführt, die den Hauptanteil ihrer Stoffwechselenergie aus dem positiven Reduktionspotential des O_2 schöpfen¹.

Die Entstehung mehrzelliger Lebewesen stellte dabei die Organismen vor das Problem, jeder Einzelzelle im Verband gleichsam den lebensnotwendigen Anteil an molekularem O_2 zur Verfügung zu stellen. Bestimmend für die Größe des gesamten Organismus war somit die Diffusionsstrecke des O_2 in tiefere Zellschichten. Höhere Lebensformen haben zu diesem Zweck komplexe Versorgungssysteme ausgebildet. Atmungsorgane wie Kiemen oder Lunge, Gefäßsysteme, zelluläre Bestandteile des Bluts und ein aktiver Kreislauf mit dem zentralen Pumpsystem des Herzens dienen der bestmöglichen Versorgung des Gewebes mit O_2 und bieten gleichzeitig die Möglichkeit, durch eine Anpassung der „Förderleistung“ dem wechselnden Bedarf an O_2 in den peripheren Organen Genüge zu leisten. Eine unzureichende O_2 -Versorgung beeinträchtigt den Metabolismus der Zelle und führt zu schweren Schädigungen, die im Untergang ganzer Zellverbände gipfeln können.

¹ Einen Überblick über die Erdgeschichte sowie Theorien zur Entstehung des Lebens auf der Erde gibt J. E. Lovelock in „*Gaia: Die Erde ist ein Lebewesen*“ (Lovelock, 1996).

Entsprechend haben Fehlbildungen und Funktionseinschränkungen der am O₂-Transport beteiligten Systeme einen großen Anteil an der Pathophysiologie von menschlichen Krankheiten. Vorgeburtliche Entwicklungsstörungen, hypoxische Erkrankungen wie die Ischämie von Organen, Anämie, aber auch die Tumorbio- logie sind eng mit Störungen im O₂-Metabolismus verknüpft.

Studien zur Ursache dieser Krankheiten haben zu einem tieferen Einblick in die Mechanismen der physiologischen wie pathophysiologischen Regulation des zellulären O₂-Metabolismus geführt, der in den folgenden Abschnitten näher ausgeführt werden soll.

1.1.1 Energiestoffwechsel eukaryontischer Zellen

Eine grundlegende Voraussetzung für die Existenz biologischen Lebens ist die Abgrenzung „zellulärer Reaktionsräume“ von der Umwelt. Ein wichtiges Charakteristikum von lebenden Zellen ist hierbei die Fähigkeit, die systemischen Milieubedingungen durch Selbstregulation in einem begrenzten Bereich zu stabilisieren. An diesem auch als *Homöostase* bezeichneten Prozess sind in jeder eukaryontischen Zelle zahlreiche aktive – und somit energieverbrauchende – Stoffwechselprozesse beteiligt.

Als „zelluläre Brennstoffe“ werden hierzu energiereiche Verbindungen aus Nukleotid-Polyphosphaten (Mono-, Di- und Triphosphat) metabolisiert. Die Polyphosphatreste dieser Nukleotidverbindungen sind durch Phosphosäureanhydrid-Bindungen kovalent verknüpft. Diese relativ labilen Verbindungen können hydrolytisch in einer Reaktion mit stark exergonem Charakter gespalten werden. In entsprechenden Reaktionen freiwerdende Hydrolyse-Energie-Äquivalente stehen ubiquitär als „Antrieb“ für energieverbrauchende Prozesse des Zellstoffwechsels zur Verfügung.

Als vital notwendige Bedingung ist damit auch die Synthese solcher energie- speichernder Verbindungen durch die Zelle selbst verknüpft, wobei Adenosin- Triphosphat (ATP) den wichtigsten derartigen Metaboliten darstellt.

Der weitaus effizienteste Weg zur Bildung von ATP in der Zelle ist der Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung, welcher an der inneren Mitochondrien-Membran stattfindet. Triebkraft für die stark endergone Bildungs- reaktion von ATP durch die *ATP-Synthase* ist ein Protonengradient, der durch Serienschaltung von vier gekoppelten Redoxvorgängen an der inneren

Mitochondrienmembran erzeugt wird. Als finaler Akzeptor dieser „Redoxkette“ dient molekularer O_2 , der zu Wasser reduziert wird, weshalb die Abfolge der vier Redoxvorgänge in Kopplung mit der ATP-Synthese auch als Atmungskette bezeichnet wird. In eukaryontischen Zellen ist die Bildung von ATP durch oxidative Phosphorylierung nur unter *aeroben* Bedingungen, d. h. nur in Gegenwart von O_2 möglich. Um die Energieversorgung der Zellen auch bei sinkender O_2 -Verfügbarkeit sicherzustellen, kann in fast allen Organismen und Geweben ein kataboler Stoffwechselweg im Zytoplasma, die Glykolyse, zur *anaeroben* ATP-Produktion aktiviert werden. Die „Energieausbeute“ dieser Reaktion beträgt in Abwesenheit von O_2 jedoch nur rund 5% der ATP-Menge, die unter *aeroben* Verhältnissen durch weitere Metabolisierung der Glykolyseprodukte und schlussendlich oxidativer Phosphorylierung der Metabolite gebildet wird.

Folglich ist eine sensible „Rezeption“ des verfügbaren molekularen O_2 im Intrazellulärraum durch die Zelle notwendig, um die schnellstmögliche Adaptation an O_2 -Mangelzustände durch Steigerung der *anaeroben* Glykolyserate, wie auch von Stoffwechselfvorgängen zur effizienteren Ausnutzung des vorhandenen O_2 -Gehalts der Umgebung, zu gewährleisten.

1.1.2 Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1)

In eukaryontischen Zellen existiert zu diesem Zweck ein hoch konservierter O_2 -abhängiger Regulationsmechanismus. Semenza und Wang haben 1992 erstmalig einen nukleären Faktor in der humanen Hepatoma-Zell-Linie Hep3B nachgewiesen, der an der hypoxischen Transkriptionsregulation des Erythropoietin-Gens maßgeblich beteiligt ist (Semenza und Wang, 1992). Die Induzierbarkeit dieses Transkriptionsfaktors unter erniedrigten O_2 -Konzentrationen war namensgebend für das seither als Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 beschriebene, zelluläre Protein.

Die molekulare Struktur von HIF-1 ist heute weitgehend aufgeklärt: HIF-1 existiert *in vitro* und *in vivo* als heterodimerer Komplex aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β . Beide Untereinheiten zählen zu der Subfamilie der „basic helix-loop-helix (bHLH) Per-ARNT-Sim (PAS)“ Proteine, der eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren angehören (Wang *et al.*, 1995a). Die bHLH-Domäne beider Untereinheiten vermag spezifische DNS-Regionen zu binden und beinhaltet gleichzeitig Abschnitte zur Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren, während die PAS-

Domäne ausschließlich für die Interaktion der beiden Untereinheiten entscheidend ist (Jiang *et al.*, 1996). HIF-1 β ist identisch mit der als „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ (ARNT) beschriebenen Untereinheit des Dioxin-/Aryl Hydrocarbon-Rezeptors (Hoffman *et al.*, 1991).

Die α - und β -Untereinheiten von HIF-1 werden konstitutiv exprimiert. Während HIF-1 β ubiquitär im Zellkern nachweisbar ist, unterliegt die α -Untereinheit einer streng O₂-abhängigen, posttranslationalen Regulation: Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 α unverzüglich in einem Ubiquitin-vermittelten Prozess dem zellulären Abbausystem der Proteasomen zugeführt (Salceda und Caro, 1997; Huang *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1999; Sutter *et al.*, 2000). Die ständige Verfügbarkeit von HIF-1 α bildet somit die Grundlage einer unvermittelten zellulären Adaptation an sinkende O₂-Konzentrationen. Durch Beeinflussung der Stabilität des Transkriptionsfaktors direkt durch die Messgröße O₂ können zelluläre Anpassungsvorgänge schnellstmöglich eingeleitet werden.

1.1.2.1 Funktion der HIF-1-Prolyl-Hydroxylasen

Untersuchungen zur kurzen Halbwertszeit von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen konnten einen rund 200 Aminosäuren (AS) umfassenden Abschnitt in der Proteinsequenz identifizieren, der maßgeblich am O₂-vermittelten Abbau des Proteins beteiligt ist. Dieser *Carboxy*-terminal der PAS Domäne lokalisierte Bereich wurde daher als „O₂-abhängige Degradations-Domäne“ („*oxygen-dependent degradation domain*“, ODD) bezeichnet (Huang *et al.*, 1998). Auf der Suche nach der Natur eines molekularen „O₂-Sensors“ gelang Anfang 2001 vier unabhängigen Forschergruppen der Nachweis einer neuartigen Gruppe HIF-modifizierender, O₂-abhängiger Prolyl-Hydroxylasen („*prolyl hydroxylase domain-containing proteins*“, PHDs; auch bezeichnet als „*HIF prolyl hydroxylases*“, HPHs). In Abhängigkeit des Kosubstrats 2-Oxoglutarat sowie molekularem O₂ und Fe²⁺-Ionen hydroxylieren die PHDs die ODD an den Prolinresten 402 und 564 (Bruick und McKnight, 2001; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001). Dieser Vorgang ermöglicht die Bindung des Tumorsuppressor-Proteins von Hippel-Lindau (pVHL), so dass sich ein Komplex aus HIF-1 α , pVHL und weiteren Kofaktoren formiert (Maxwell *et al.*, 1999; Cockman *et al.*, 2000; Kamura *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 2000; Tanimoto *et al.*, 2000).

Biochemische Studien haben gezeigt, dass pVHL in diesem Komplex als Erkennungselement einer E3 Ubiquitin Protein-Ligase fungiert und so die Ubiquitinierung von HIF-1 α , ein Prozess, der Proteine für den proteasomalen Abbau markiert, einleitet (Iwai *et al.*, 1999; Lisztwan *et al.*, 1999). Sinkt der O₂-Gehalt des zellulären Milieus unter eine kritische Schwelle² (im Folgenden als *Hypoxie* benannt), wird HIF-1 α stabilisiert und akkumuliert im Zellkern. Dieser Wechsel der zellulären Kompartimente – vom Zytoplasma in den Zellkern – wird als Translokation bezeichnet. Es ist anzunehmen, dass molekularer O₂ als limitierender Kofaktor der PHDs deren Aktivität unmittelbar reguliert. Niedrige O₂-Konzentrationen führen entsprechend zu einer zunehmenden Insuffizienz der Hydroxylierung von HIF-1 α durch die PHDs. Die Interaktion mit pVHL bleibt aus, wodurch der Degradationsprozess von HIF-1 α durchbrochen und folglich eine Stabilisierung des Proteins erreicht wird.

Der Mechanismus der Translokation von HIF-1 α in den Zellkern ist bislang weitgehend ungeklärt und die Bedeutung des hypoxischen Stimulus für diesen Vorgang wird kontrovers diskutiert: Während Hofer *et al.* anhand eines *in vitro* Zellmodells bei artifizieller Überexpression der α -Untereinheit eine Akkumulation von HIF-1 α im Nukleus unter normoxischen Bedingungen nachwies, beschrieben Kallio *et al.* die Translokation als hypoxisch reguliert (Kallio *et al.*, 1998; Hofer *et al.*, 2001).

1.1.2.2 Hypoxische Transaktivierung von HIF-1

Im Zellkern dimerisiert HIF-1 α mit der β -Untereinheit. Durch Rekrutierung weiterer Koaktivatoren kommt es zur Bildung des aktiven HIF-1-Transkriptionsfaktor-Komplexes. Dieser bindet an eine spezifische DNS-Sequenz im Promotor- bzw. Enhancer-Bereich von hypoxisch aktivierbaren Zielgenen und initiiert auf diese Weise die Genexpression (siehe 1.1.3). Die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 wird im Wesentlichen durch zwei voneinander unabhängige Vorgänge moduliert. Voraussetzung für die Akkumulation im Zellkern – und somit am „Wirkort“ des Transkriptionsfaktors – ist die im vorangehenden Abschnitt beschriebene Stabili-

² Die zeitliche und räumliche Aktivierung von HIF-1 α in Abhängigkeit von verschiedenen inspiratorischen O₂-Konzentrationen (F_{iO₂}) ist organspezifisch. Während in Leber- und Nierengewebe von Mäusen eine deutliche Stabilisierung von HIF-1 α erst bei einem F_{iO₂} von 6% nachweisbar war, akkumulierte das Protein in Gewebeproben des ZNS bereits bei einer Senkung des F_{iO₂} auf 18% (Stroka *et al.*, 2001).

sierung von HIF-1 α durch eine Insuffizienz des HIF-1-hydroxylierenden Systems. Eine Vielzahl von Untersuchungen konnte jedoch zeigen, dass die alleinige Stabilisierung der α -Untereinheit nicht hinreichend ist, eine der hypoxischen Induktion vergleichbare Zielgen-Aktivierung zu erreichen. So wurde durch pharmakologische Blockade des proteasomalen Abbauweges wie auch in pVHL-defizienten Zellmodellen und bei artifizieller Überexpression von HIF-1 α ein dramatisch gesteigerter Proteingehalt des Transkriptionsfaktors beobachtet, während die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 weitgehend unbeeinflusst blieb (Salceda und Caro, 1997; Maxwell *et al.*, 1999; Hofer *et al.*, 2001). Mutationsstudien von HIF-1 α konnten zwei für die Transaktivierung von Zielgenen verantwortliche Proteinabschnitte charakterisieren: Diese im *Carboxy*-terminalen Abschnitt der HIF-1 α -Untereinheit lokalisierten Bereiche wurden als „*Amino-terminale*–“ (*N-TAD*, AS 531-575) bzw. „*Carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne*“ (*C-TAD*, AS 786-826) bezeichnet (Jiang *et al.*, 1997b). Während die Aktivität der N-TAD aufgrund einer Überlappung mit der ODD weitgehend aus der Stabilisierung des Proteins resultiert, ist die C-TAD eigenständig durch hypoxische Stimulation induzierbar (Pugh *et al.*, 1997).

Jüngste Studien haben eine den PHDs verwandte *Asparaginyl-Hydroxylase* („*factor-inhibiting HIF*“, FIH) identifiziert, die einen konservierten, innerhalb der C-TAD gelegenen Asparaginyl-Rest (Asn 803) O₂-abhängig hydroxyliert. Unter normoxischen Bedingungen wird so die Rekrutierung weiterer, zur suffizienten Transkription von Genen notwendiger Kofaktoren wie p300/CBP verhindert und die Aktivierung der Promotor-Abschnitte blockiert. Die *Abbildung 1* gibt eine schematische Übersicht zur Regulation von HIF-1.

Neben der in verschiedensten Organismen und Geweben exprimierten Form von HIF-1 α/β ist die Familie der O₂-abhängigen Transkriptionsfaktoren um zwei weitere Mitglieder angewachsen. Die Subtypen HIF-2 α/β und HIF-3 α/β zeigen in Bezug auf ihre hypoxische Induzierbarkeit, Proteinstabilisierung, Dimerisierungsverhalten und DNS-Bindungsvermögen starke Ähnlichkeit mit der bereits beschriebenen HIF-1-Unterform. Interessanterweise ist die Verbreitung von HIF-2 und HIF-3 im Gegensatz zum ubiquitär exprimierten HIF-1 wesentlich gewebespezifischer, was eine Beteiligung der Isoformen an organspezifischen Regulationsprozessen vermuten lässt.

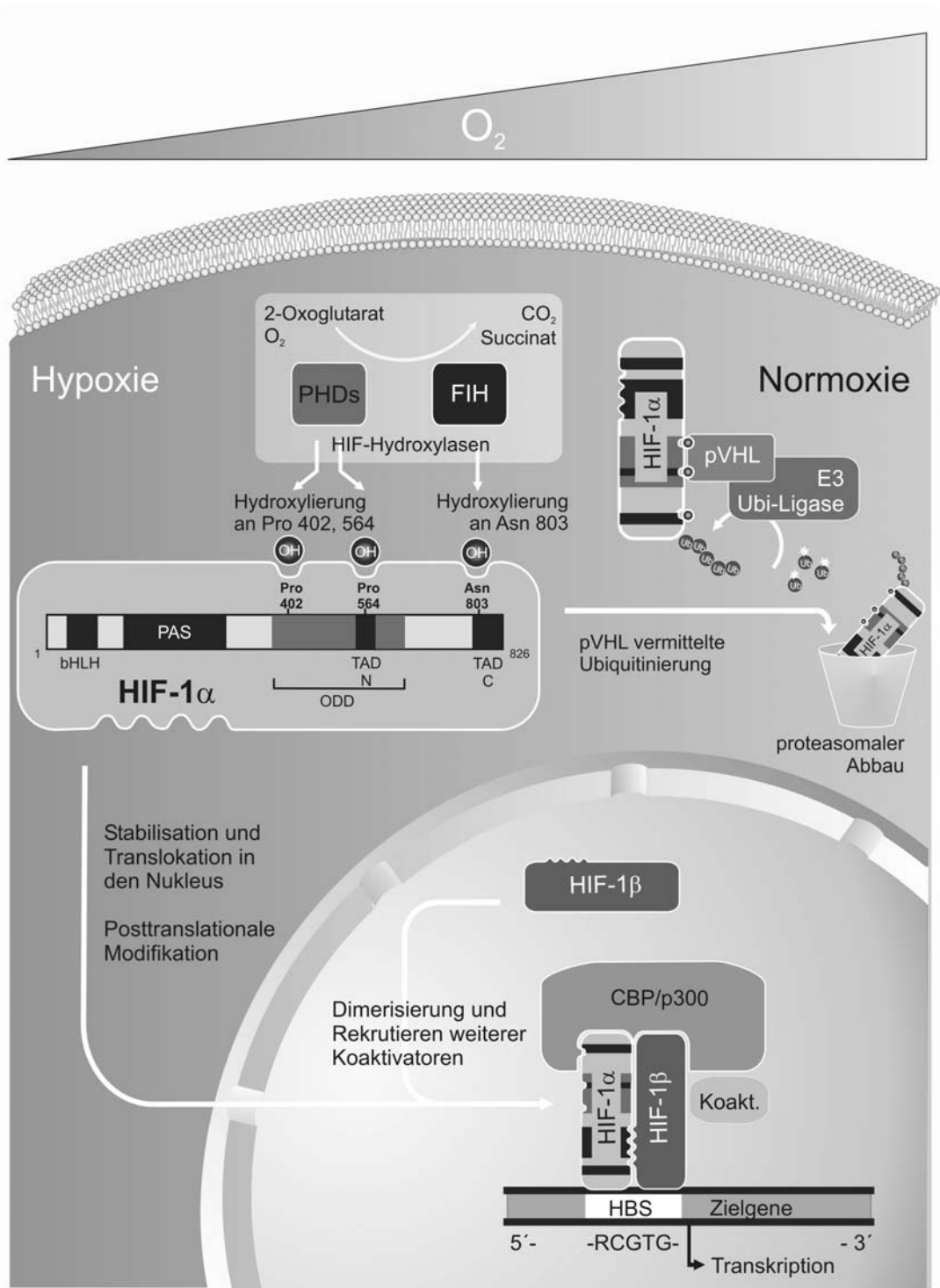


Abbildung 1: Hypoxische Stabilisierung von HIF-1 α

Bei sinkenden O_2 -Konzentrationen wird die regulatorische α -Untereinheit vor Hydroxylierung durch die PHDs und konsekutivem proteasomalem Abbau geschützt und somit stabilisiert. Im Nucleus der Zelle bindet der dimere HIF-1-Komplex unter Rekrutierung weiterer Kofaktoren an spezifische HIF-Bindungsstellen (HBS) und reguliert die Transkription von Zielgenen.

Abkürzungen: E3 Ubi-Ligase, E3 Ubiquitin Protein-Ligase; CBP/p300, CREB Bindungsprotein; Koakt., transkriptionelle Koaktivatoren, Ub, Ubiquitin. Erläuterungen zu den übrigen Abkürzungen finden sich in Abschnitt 1.1.2ff.

Weitere Einzelheiten zur O₂-Rezeption und HIF-Regulation können den Übersichtsartikeln von Semenza und Wenger entnommen werden (Semenza, 2000, 2001; Wenger, 2002). Einen ausführlichen Einblick in die Geschichte und Funktion der eukaryontischen „O₂-Rezeptoren“ geben Lando *et al.* (Lando *et al.*, 2003).

1.1.3 O₂-regulierte Genexpression: HIF-1-Zielgene

Die O₂-abhängige Regulation bestimmter Genprodukte war schon lange vor der Charakterisierung der HIFs Kern intensiver Forschung. Zelluläre Wachstumshormone und Zytokine wie das die Bildung von Erythrozyten stimulierende Erythropoietin (EPO) oder der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF), der die Entstehung neuer Blutgefäße fördert, zeigen eine ausgeprägte Expressionssteigerung unter O₂-armen Bedingungen.

Mit der Entdeckung der HIFs als O₂-regulierte Transkriptionsfaktoren begann die Identifizierung einer indessen stattlichen Liste von hypoxisch induzierbaren HIF-1-Zielgenen. Allen gemein ist dabei die Existenz mindestens einer Pentanukleotid-Sequenz der Basenfolge 5'-A/(G)CGTG-3' im Promotor- bzw. Enhancer-Abschnitt des entsprechenden Zielgens, die als HIF-Bindungsstelle (HBS) identifiziert wurde (Wang und Semenza, 1993a). Beide Untereinheiten des aktiven HIF-1-Komplexes haben Kontakt zur HBS, die wahlweise auch in Form mehrerer Duplikate vorkommt, deren Gesamtheit als Hypoxie-responsible Element (HRE) bezeichnet wird (Wang und Semenza, 1995). Es bleibt anzumerken, dass die Induktion von HIF-1-Zielgenen zwar in hohem Maße von der Bindung des HIF-1-Komplexes abhängig ist, gleichwohl aber eine bislang unbekannt Zahl modulatorisch wirkender Koaktivatoren existiert, die für eine vollständige Genexpression notwendig sind.

HIF-1-Zielgene lassen sich in verschiedene Gruppen mit funktionellen Gemeinsamkeiten einordnen. So ist ein Teil der Hypoxie-induzierten Genprodukte für einen effizienteren O₂-Transport im Organismus, also eine mittelfristige Kompensation mangelnder O₂-Versorgung, verantwortlich: Wichtige Faktoren der Neubildung von Erythrozyten³ wie das oben genannte EPO, aber auch Transferrin

³ Die Entwicklung von reifen Erythrozyten aus pluripotenten Stammzellen des roten Knochenmarks geschieht in einem Differenzierungsprozess, der als *Erythropoiese* bezeichnet wird.

als Eisentransportprotein sowie der für die Eisenaufnahme verantwortliche Transferrinrezeptor werden HIF-1-abhängig exprimiert (Wang und Semenza, 1993a; Rolfs *et al.*, 1997; Tacchini *et al.*, 1999).

Eine zweite Gruppe bilden Mediatoren zur Vaskularisierung O₂-minderperfundierter Gewebsareale. Angiogenetisch wirksam sind VEGF und der VEGF Rezeptor Flt-1 (Levy *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Gerber *et al.*, 1997). Hypoxisch erhöhte Konzentrationen von vor allem parakrin wirkendem VEGF führen zum Aussprossen neuer Gefäßäste aus vorhandenen Gefäßstrukturen (Angiogenese). Es erscheint sinnvoll, dass eine gleichzeitige Expressionssteigerung des zugehörigen VEGF-Rezeptors an der hypoxischen Zielzelle diese Wirkung verstärkt und so gewissermaßen den „Ort“ der Minderversorgung lokalisiert.

Von den oben erwähnten Faktoren abzugrenzen ist eine weitere Gruppe von HIF-1-Zielgenen, die im Sinne einer „Sofortreaktion“ Schutz vor hypoxisch verursachten Gewebsschädigungen bieten soll. So wird die Expression von zellulären Faktoren mit Einfluss auf den Gefäßtonus wie die induzierbare NO-Synthase (iNOS), das vasoaktive Endothelin-1 oder der α_{1B} -Adrenorezeptor ebenfalls durch HIF-1 vermittelt. Eine besondere Anpassungsreaktion markiert auch die Umstellung des Energiemetabolismus der Zelle hin zu einer O₂-unabhängigen Energieproduktion (siehe 1.1.1). Funktionelle HIF-1-Bindungsstellen konnten für eine Vielzahl an der Glykolyse beteiligter Enzyme nachgewiesen werden. *In vitro* Experimente an einer HIF-1 α -defizienten embryonalen Stammzell-Line der Maus ergaben, dass sämtliche Enzyme der Glykolyse in diesen Zellen verringert exprimiert wurden (Iyer *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998). Membranproteine wie die Glukose-Transporter GLUT1 und GLUT3 gehören ebenfalls zu den HIF-1-Zielgenen. Diese ermöglichen die verstärkte Aufnahme von Glukose, dem Ausgangsmetaboliten der Glykolyse, in die Zelle. Die hypoxische Aktivierung von HIF-1 ist folglich ein bedeutsamer Schritt für die Anpassung des Zellstoffwechsels an *anaerobe* Bedingungen: Die HIF-vermittelte Steigerung der Glykolyserate vermag zumindest intermediär den Kollaps der oxidativen Phosphorylierung und die daraus resultierende ATP-Unterproduktion bei O₂-Mangel zu kompensieren.

Eine vollständige Liste der gegenwärtig bekannten HIF-1-Zielgene mit Quellenangaben findet sich in Referenz 116 (Wenger, 2002).

1.2 HIF-1: Nicht nur ein Regulator der O₂-abhängigen Genexpression

1.2.1 Normoxische Induktoren von HIF-1

Neben der hypoxischen Stimulation haben jüngere Studien eine Aktivierung von HIF-1 auch unter normoxischen Bedingungen beschrieben. Eine wachsende Gruppe verschiedener Mitogene, Wachstumsfaktoren und Zytokine ebenso wie unphysiologische Substanzen sind in der Lage, die zelluläre Akkumulation von HIF-1 α und die Expression von HIF-1-Zielgenen in Gegenwart von O₂ zu stimulieren.

Anorganische Verbindungen wie Kobaltchlorid (CoCl₂), mit geringerem Wirkungsgrad auch Nickel- und Mangansalze, gehören zu den frühesten Vertretern dieser „Hypoxie-imitierenden“ Stimuli (Goldberg *et al.*, 1988). Epstein *et al.* demonstrieren anhand von *in vitro* Enzymstudien, dass CoCl₂ hochgradig die Aktivität der PHDs (siehe 1.1.2.1) inhibiert (Epstein *et al.*, 2001). Ein ähnlicher Wirkmechanismus gilt für die Eisen-Chelatkomplexbildner Desferrioxamin (DFX) und Ciclopirox (CPX), die ebenfalls in der Lage sind, HIF-1 α zu stabilisieren (Wang und Semenza, 1993b; Wanner *et al.*, 2000). Eisen (II)-Ionen sind ein essentieller Kofaktor der PHDs. Die Komplexierung von Fe²⁺ wie auch die Gegenwart der oben erwähnten, nicht O₂-bindenden Kationen wie Co²⁺ führen zur Inhibition der PHDs und bewirken so die Stabilisierung von HIF-1 α infolge direkter Hemmung des Degradationspfades (Epstein *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Verschiedene Genprodukte wie GLUT1 und GLUT3, VEGF und EPO werden sowohl durch Hypoxie, als auch durch die Proteinhormone Insulin und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren („insulin-like growth factors“, IGFs) induziert (Russo *et al.*, 1994; Taha *et al.*, 1995; Goad *et al.*, 1996; Warren *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 1997; Akagi *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999; Yamagishi *et al.*, 1999; Bermont *et al.*, 2000; Miele *et al.*, 2000; Bermont *et al.*, 2001). Der Gruppe Zelzer *et al.* gelang 1998 erstmalig der Nachweis, dass die Insulin- und IGF-1-vermittelte Expression dieser Gene unmittelbar den Transkriptionsfaktor HIF-1 involviert (Zelzer *et al.*, 1998). Aus dem eigenen Labor stammt die Entdeckung, dass auch Interleukin-1 β und TNF- α zu den normoxischen HIF-Aktivatoren gehören (Hellwig-Bürgel *et al.*, 1999). Weiterführende Studien haben eine Vielzahl physiologischer Peptid-Mediatoren mit HIF-1-aktivierender Funktion in spezifischen Zellkulturmodellen ermittelt. Eine Zusammenstellung ist in *Tabelle 1* wiedergegeben.

Normoxischer Stimulus	Zell-Linie	Referenzen
<u>Wachstumsfaktoren</u>		
Insulin	HepG2 (humane Hepatomazellen)	Zelzer <i>et al.</i> (1998). Stiehl <i>et al.</i> (2002).
	T47D (humanes duktales Mammakarzinom)	
	L8 (Myoblasten, Maus)	
	MEF (embryonale Fibroblasten, Maus)	Feldser <i>et al.</i> (1999).
	HEK293t (humane embryonale Nierenzellen)	
	DU145; PC-3 (humanes Prostatakarzinom)	Jiang <i>et al.</i> (2001).
	U2-OS (humanes Osteosarkom)	
IGF-1	ACHN (humanes Nierenkarzinom)	
	HepG2	Zelzer <i>et al.</i> (1998).
IGF-2	MEF	Feldser <i>et al.</i> (1999).
	HEK293t	
FGF-2	HEK293t	
	VSMC, (glatte Gefäßmuskulatur, Ratte)	Richard <i>et al.</i> (2000).
EGF	HEK293t	Feldser <i>et al.</i> (1999).
	DU145, TSU, PC-3 (humanes Prostatakarzinom)	Zhong <i>et al.</i> (2000); Jiang <i>et al.</i> (2001).
	HepG2	Tacchini <i>et al.</i> (2001).
PDGF	VSMC, (Ratte)	Richard <i>et al.</i> (2000).
TGF- β	HT-1080 (Fibrosarkom)	Shih <i>et al.</i> (2001).
<u>Zytokine</u>		
Interleukin-1 β	HepG2	Hellwig-Bürgel <i>et al.</i> (1999). Stiehl <i>et al.</i> (2002).
	PTEC (humane Epithelzellen des proximalen Nierentubulus)	El Awad <i>et al.</i> (2000).
	HGF/HSF (humane gingivale/synoviale Fibroblasten)	Thornton <i>et al.</i> (2000).
TNF- α	HepG2	Hellwig-Bürgel <i>et al.</i> (1999).
	fetale Alveolarepithelzellen Typ II (Ratte)	Haddard <i>et al.</i> (2001).
<u>Andere</u>		
Angiotensin II	VSMC, (Ratte)	Richard <i>et al.</i> (2000).
Thrombin	humane VSMC	Görlach <i>et al.</i> (2001).
Heregulin	MCF-7 (humanes Mammakarzinom)	Laughner <i>et al.</i> (2000).

Tabelle 1: Physiologische Stimuli einer normoxischen HIF-1-Aktivierung

Aufgeführt sind ausschließlich peptidische Mediatoren mit erwiesener HIF-1-Aktivierung. Die Bezeichnung der Zell-Linien ist jeweils bei erstmaliger Erwähnung erläutert.

1.2.2 Vom extrazellulären Stimulus zur zellulären Antwort: intrazelluläre Signaltransduktionsnetze

Die Aktivität von zellulären Stoffwechselmechanismen wird in hohem Maße durch Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsreaktionen von Steuerproteinen bestimmt. In diesem als *Interkonversion* bezeichneten Prozess sind Phosphatübertragende Enzyme die regulierenden Elemente. Dabei übertragen *Proteinkinasen* Phosphatreste auf ein Substrat, während *Phosphatasen* die Dephosphorylierung beschleunigen. Alle in *Tabelle 1* aufgeführten Mediatoren vermitteln ihre spezifische Wirkung an der Zielzelle *via* Interaktion mit membranständigen Rezeptoren. Dabei aktiviert die Bindung einer Substanz an den zugehörigen Rezeptor verschiedene intrazelluläre Signalwege. An der Signalvermittlung von Wachstumsfaktoren sind insbesondere zwei Klassen intrazellulärer Kinase-Kaskaden beteiligt: der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K)/Akt- Pfad und die Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK).

1.2.2.1 Der PI 3-K-/Akt-/mTOR-Pfad

Eine den trophischen Umweltbedingungen angepasste Steuerung von Stoffwechsel- und Wachstumsprozessen auf zellulärer Ebene ist in vielzelligen Organismen von essentieller Bedeutung. Wachstumsfaktoren dienen hierbei als zelluläres „Kommunikationsmedium“ und signalisieren den Einzelzellen eine den Wachstumsansprüchen genügende Umgebung. Der anhaltende Entzug solcher Wachstumsstimuli leitet den als Apoptose bezeichneten, programmierten Zelltod der Einzelzelle ein.

PI 3-K und Akt wirken in diesem Prozess wachstumsfördernd, indem proapoptische Signalvermittler inhibiert werden. Die PI 3-K ist ein heterodimeres, aus einer regulatorischen 85 kDa- (p85) und der katalytisch aktiven 110 kDa- (p110) Untereinheit bestehendes Enzym. Die p85-Untereinheit bindet unter Vermittlung verschiedener Adapterproteine wie z.B. den Insulin-Rezeptor-substraten (IRS) an die intrazellulären Domänen aktivierter Membranrezeptoren. Dadurch gelangt die katalytische Untereinheit in unmittelbarer räumlicher Nähe zu ihrem Substrat, den in der Zellmembran lokalisierten Phosphatidylinositol-derivaten. Die PI 3-K katalysiert die Phosphorylierung von PI 4-Phosphat und PI 4,5-Bisphosphat zu PI 3,4-Bisphosphat und PI 3,4,5-Triphosphat. Die in D3-

Position phosphorylierten Membranlipide fungieren ihrerseits als allosterische Aktivatoren der Membran-assoziierten PI-abhängigen Kinase 1 („phosphatidyl-dependent kinase 1“, PDK). Gleichzeitig dienen sie als Kopplungsstelle für die Serin-/Threonin-Kinase Akt, die auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet wird. Akt wird durch die PDKs zweifach an Serinrest 473 und Threoninrest 308 phosphoryliert und erhält so katalytische Aktivität.

Die antiapoptotische Funktion Akts resultiert aus der Inhibition verschiedener proapoptotischer Faktoren wie Caspasen, Bad-Kinasen und den „*forkhead transcription factors*“ (FKHRs). Außerdem reguliert Akt die Proteinbiosynthese *via* Rapamycin-sensitiven Faktor mTOR („mammalian target of Rapamycin“, auch FRAP) und p70^{S6}-Kinase. Ein weiteres Akt-Substrat ist die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3), die Insulin-abhängig die Glykogensynthese steuert.

Der PI 3-K-/Akt-Signalweg wird durch die Phosphatase PTEN („*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*“) negativ reguliert, indem PTEN D3-phosphorylierte Inositolderivate dephosphoryliert (siehe *Abbildung 2*). PI 3-K, Akt und PTEN sind zelluläre Proto-Onkogene und in einer Vielzahl von Tumoren genetisch verändert⁴.

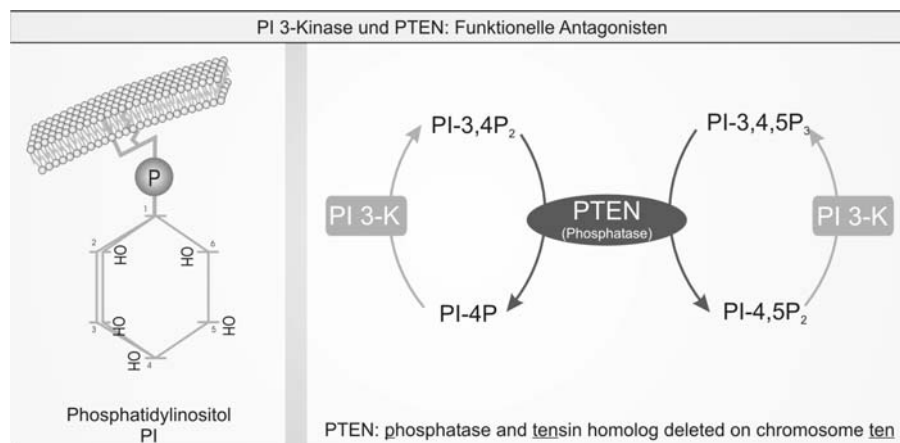


Abbildung 2: PI 3-Kinase und PTEN: Funktionelle Antagonisten

Schematische Darstellung des Membranlipids Phosphatidylinositol (PI; links). PI 3-K und PTEN regulieren antagonistisch die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von PI (rechts).

⁴ Ein aktueller Übersichtsartikel des PI 3-K-Signalwegs ist in Referenz 16 zu finden (Cantley, 2002).

1.2.2.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen: Raf/MEK/Erk

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) sind in eine große Zahl zellulärer Vorgänge involviert. Anhand ihrer extrazellulären Stimuli lassen sich zwei unterschiedliche Signalkaskaden der MAPKs abgrenzen: Wachstumsfaktoren und Mitogene (exogene, die Zellteilung induzierende Substanzen) vermitteln ihre zellulären Wirkungen wie Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung vornehmlich über den Raf-/MEK-/Erk-Pfad durch Modifikation der Genexpression.

Eine zweite Gruppe von MAPKs wird als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPKs) bezeichnet, die durch extrazelluläre Stressoren wie UV-Strahlung und Elektrolytverschiebungen, aber auch durch proentzündlichen Zytokinen aktiviert werden. Sie regulieren die zelluläre Antwort in Entzündungsprozessen, steuern ebenfalls die Zellproliferation und sind an der Regulation der Apoptose beteiligt. Beiden Signalwegen gemein ist ein dreistufiger Aufbau von hierarchisch organisierten Serin-/Threonin-Proteinkinasen, die als Signaleinheiten fungieren. Phosphorylierung einer Signaleinheit löst konsequent die Phosphorylierung und Aktivierung der nachgeschalteten Kinase aus. Dabei werden MAPKs (wie Erk1/2) von MAPK-Kinasen (MAPKK oder MEK) und diese wiederum von MAPKK-Kinasen (z.B. Raf) aktiviert. Aktivierte MAPKs translozieren in den Zellkern und kommunizieren dort mit Transkriptionsfaktoren und anderen Regulatoren der Genexpression⁵.

PI 3-K- und MAPKs-Signaltransduktionswege wurden der besseren Übersicht halber unabhängig voneinander beschrieben. In der Zelle bestehen jedoch multiple Verknüpfungen zwischen den beteiligten Proteinkinasen. Die Vorstellung von linearen Abfolgen in der Signalübermittlung entspricht kaum den tatsächlichen *in vivo*-Bedingungen – die Anforderungen an ein fein regulierbares Signalsystem wären unter solch einseitiger Kontrolle gewiss nicht zu erfüllen. Vielmehr wird bei der Signalvermittlung zwischen Zytoplasma und nukleären Prozessen ein Netzwerk von Regulationssystemen aktiviert: Nur so ist es zu erklären, dass die unterschiedlichsten Stimuli ihre spezifische zelluläre Reaktion unter Beteiligung identischer, intrazellulärer Signaleinheiten auslösen.

⁵ Die Regulation sowie physiologische Funktionen von MAPK fasst Referenz 77 zusammen (Pearson *et al.*, 2001).

Dennoch ist die Untergliederung dieses Netzwerkes in funktionell ähnliche Anteile sinnvoll, bietet sie doch gegenwärtig die einzige Möglichkeit, Einblick in die komplizierten, vielfach noch unbekanntesten Steuerprozesse der Zellbiologie zu erhalten.

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Studien

Die interessante Beobachtung, dass sowohl Insulin als auch Interleukin-1 β unter normoxischen Bedingungen in der Lage sind, HIF-1 α zu stabilisieren, warf die Frage nach den molekularen Mechanismen dieses Prozesses auf (Zelzer *et al.*, 1998; Feldser *et al.*, 1999; Hellwig-Bürgel *et al.*, 1999). Die Insulin-vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalwege ist in zahlreichen Studien untersucht und beschrieben worden: PI 3-Kinase und MAPKs sind Signalvermittler zwischen extrazellulärem Stimulus und der nukleären Genexpression (siehe 1.2.2). Die *Abbildung 3* gibt eine schematisierte Übersicht der intrazellulären Vorgänge der Insulinwirkung am Zielorgan. Zielmoleküle von pharmakologischen Substanzen mit inhibitorischer Wirkung auf die Signalwege sind ebenfalls dargestellt. Auch IL-1 β aktiviert unter anderem diese zwei Signalkaskaden (Reddy *et al.*, 1997). Die Gemeinsamkeiten der intrazellulären Signaltransduktion beider Stimuli waren Grund zur Annahme, dass PI 3-K und MAPKs in die normoxische Aktivierung von HIF-1 durch Insulin und IL-1 β involviert sind und möglicherweise auch die hypoxische Genexpression *via* HIF-1 modulieren.

Die nachfolgend vorgestellten Experimente dienten der Untersuchung der Relevanz beider Signalwege in Bezug auf die normoxische wie hypoxische Aktivierung von HIF-1. Die Versuche wurden anhand von *in vitro* Zellkulturstudien mit der humanen Hepatoma-Zell-Linie HepG2 durchgeführt, die als etabliertes Modell für die O₂-abhängige Genexpression gilt (Goldberg *et al.*, 1987). Es wurden die Effekte spezifischer Inhibitoren der PI 3-K (LY294002; LY) und MEK1/2 (PD098059; PD bzw. U0126; U0) auf die Insulin-, IL-1 β - und hypoxisch induzierte HIF-1 α -Akkumulation, das DNS-Bindungsverhalten von HIF-1 und die Aktivierung der HIF-1-Zielgene VEGF und EPO untersucht. In weiterführenden Experimenten wurde der Einfluss einer Überexpression von konstitutiv aktiven und inaktiven Formen der PI 3-K und Akt auf ein Hypoxie-induzierbares Reporter-genkonstrukt geprüft. *In vitro* Phosphorylierungsstudien untersuchten eine direkte Interaktion von MAPKs und HIF-1 α .

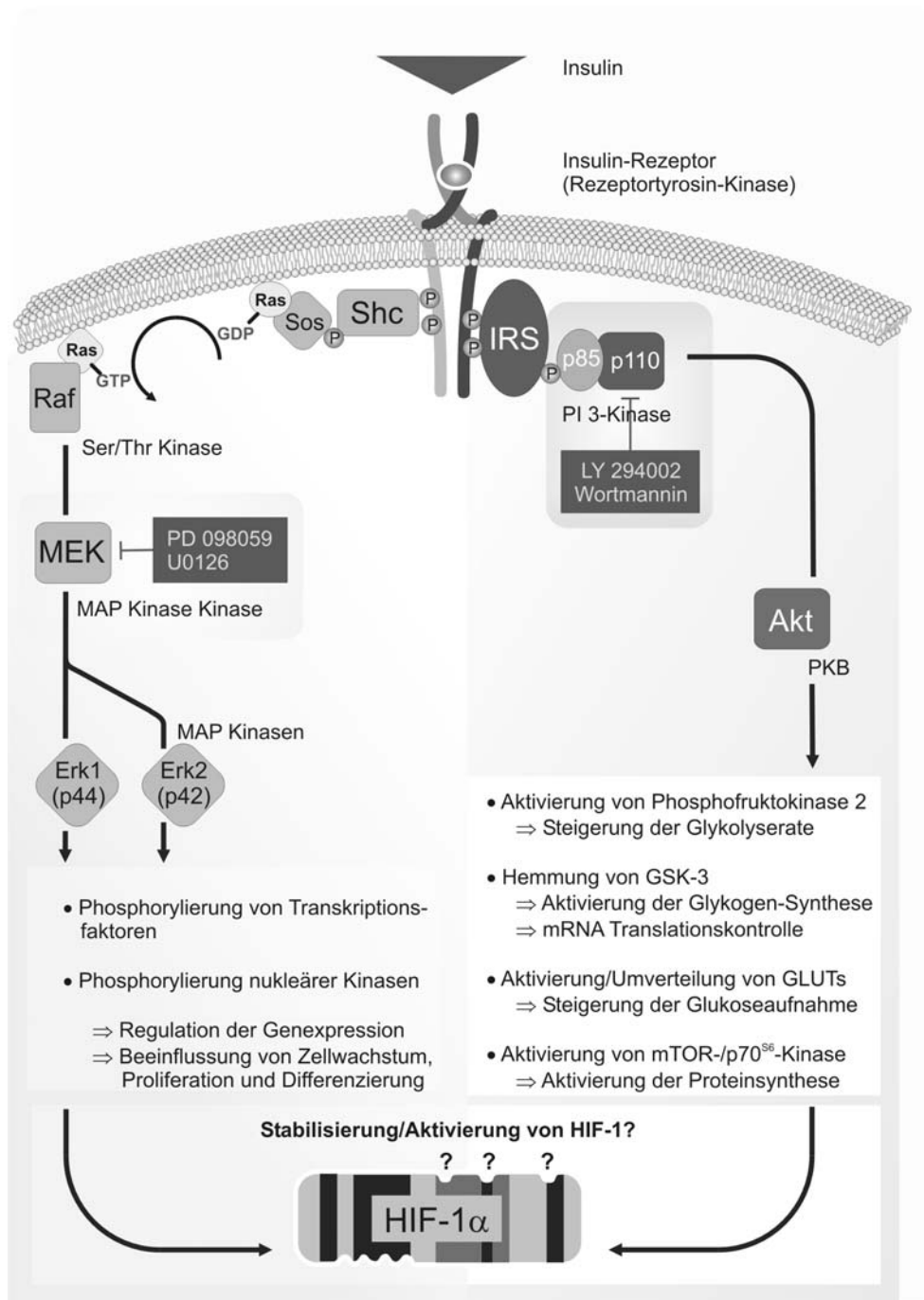


Abbildung 3: Zelluläre und metabolische Insulin-Effekte

Die Insulinwirkung am Zielorgan wird auf zellulärer Ebene durch die Bindung von Insulin an die zugehörigen Membranrezeptoren ausgelöst. Aktivierte Rezeptoren phosphorylieren und aktivieren ihrerseits verschiedene intrazelluläre Kinasen, die in zwei übergeordnete Signalkaskaden eingeteilt werden: MAPKs und PI 3-K/Akt. Beide Signalwege kontrollieren nukleäre Regulatoren der Genexpression (z.B. Transkriptionsfaktoren) und des Zellstoffwechsels.

Unter anderem wird auch der Transkriptionsfaktor HIF-1 durch Insulin induziert. Wie Insulin ist HIF-1 an der Regulation der Glykolyse und Glukoseaufnahme in die Zelle beteiligt (siehe auch 1.3). Aufgrund dieser funktionellen Übereinstimmung untersuchen die folgenden Experimente die Beteiligung von MAPKs bzw. PI 3-K an der Insulin-abhängigen HIF-1-Induktion. Die Angriffspunkte spezifischer Inhibitoren von Schlüsselenzymen der jeweiligen Signalwege sind ebenfalls dargestellt. Erläuterungen der Signalkaskaden sowie Abkürzungen werden in Abschnitt 1.2.2 beschrieben.

Bei Aufnahme der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Studie im Februar 2000 war die molekulare Natur eines postulierten „O₂-Sensors“, wie er kürzlich in Form der HIF-Hydroxylasen (siehe 1.1.2.1) beschrieben wurde, nicht bekannt. Auch nach diesen grundlegenden Entdeckungen bleiben Fragen insbesondere zu den Mechanismen der normoxischen Aktivierung von HIF-1 unbeantwortet. Die hier beschriebenen Experimente weisen auf eine Mittlerrolle der PI 3-Kinase in der Stabilisierung von HIF-1 α hin, während der MAPK-Signalweg offenbar an der Regulierung der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 beteiligt ist. Während diese Studie in Arbeit war, wurden Untersuchungen drei weiterer Arbeitsgruppen publiziert, die eine Beteiligung des PI 3-K-/Akt-/mTOR-Pfads an der Regulation von HIF-1 postulieren (Zhong *et al.*, 2000; Zundel *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001a). Die hier vorgestellten Befunde bestätigen und ergänzen diese Ergebnisse.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die nachfolgenden Versuche wurden an der humanen Hepatoma-Zell-Linie HepG2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) durchgeführt. HepG2-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland) mit einem Zusatz von 10% (vol./vol.) fötalem Kälberserum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,2% Penicillin/Streptomycin unter einer luftbefeuchteten Atmosphäre aus 5% CO₂ und 95% Luft bei 37°C kultiviert.

2.1.1 Zellkulturversuche

Für die Versuche wurden die Zellen auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 145 mm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und bis zu einer Plattenkonfluenz von 25-50% (ca. 48 h) kultiviert. 16 bis 20 h vor der Versuchsinkubation wurden die Zellkulturen serumfrei in reinem RPMI Medium gehalten und anschließend mit (1) Insulin (0,02-2000 mU/ml; Hoechst Marion Roussel, Frankfurt, Deutschland) oder (2) Interleukin-1 β (0,3-10 ng/ml; Ciba Geigy, Basel, Schweiz) stimuliert und für 4 h inkubiert.

Zur Studie von Hypoxieeffekten wurden entsprechend vorbehandelte Zellkulturen (siehe oben) in einem Inkubator (Heraeus, Hanau, Deutschland) mit einer Atmosphäre aus 3% O₂, 5% CO₂ und 92% N₂ für die Versuchsdauer begast.

Für Versuche mit dem PI 3-Kinase-Inhibitor LY294002 (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) wurden die Zellkulturen vor der Stimulation durch Insulin, IL-1 β bzw. Hypoxie 10 min präinkubiert, bei Einsatz der MAPK-Kinase-Inhibitoren PD098059 (MEK1-spezifisch; Calbiochem) entsprechend für 60 min bzw. U0126 (MEK1/2-spezifisch; Promega, Heidelberg, Deutschland) für 10 min.

2.2 Kernextraktion

HepG2-Zellkulturen mit einer Plattenkonfluenz von 25-50% wurden mit eiskalter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung („phosphate-buffered saline“ (PBS), 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄ und 1,4 mM KH₂PO₄; pH ~7,4) gewaschen,

in 6 ml PBS aufgenommen und bei $800\times g$ für 6 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellsedimente in 3 ml eiskaltem Puffer A (10 mM Tris, pH 7,8; 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl sowie $2\ \mu\text{g/ml}$ Aprotinin; $10\ \mu\text{g/ml}$ Leupeptin; $20\ \mu\text{g/ml}$ Pepstatin; 1 mM Na_3VO_4 ; 0,5 mM Benzamidin; 2 mM Levamisol; 10 mM β -Glycerophosphat; 0,5 mM Dithiothreitol (DTT) und 0,4 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zur Proteinase-Inhibition) gewaschen, in 1 ml Puffer A resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die vollständige Zell-Lyse wurde anhand eines Trypanblau-gefärbten Präparates überprüft, die freien Zellkerne mit $3500\times g$ für 6 min abzentrifugiert und in 90-120 μl eiskaltem Puffer C (20 mM Tris, pH 7,8; 1,5 mM MgCl_2 ; 420 mM KCl; 20% Glycerin; Proteinase-Inhibitoren wie in Puffer A) aufgenommen. Unter regelmäßigem Aufwirbeln des Bodensatzes wurden die Probenröhrchen für weitere 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit $13.000\times g$ bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80°C tiefgefroren und gelagert.

2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Kernextrakte wurde anhand der Bradford-Methode unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard photometrisch bestimmt (Bradford, 1976). Dazu wurden in Doppelbestimmung jeweils 2 μl Kernextrakt mit 33 μl 0,9% NaCl nach Zugabe von 200 μl Bradford-Reagenz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Photometer für Mikrotiterplatten (SLT Rainbow, SLT LAB Instruments GmbH, Crailsheim, Deutschland) bestimmt.

2.4 Western Blot

Zum Nachweis von HIF- 1α -Protein im Zellkern wurden Kernextrakte aus HepG2-Zellen im Western Blot-Verfahren analysiert. Die Proteinkonzentration der Kernextrakte wurde wie oben beschrieben bestimmt und 15-25 μg nukleäres Protein in SDS-Polyacrylamidgel (7,5%) massenabhängig aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine zur Immobilisation elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Roth, Karlsruhe, Deutschland) übertragen, wobei der Transfer anhand einer Proteinfärbung mit Ponceau S (2%) überprüft wurde. Die Membranen wurden über Nacht

mit 5% Trockenmilch in PBS (Biorad, München, Deutschland) bei 4°C geblockt und dann mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes HIF-1 α (Maus-anti HIF-1 α , BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland) 1:1000 verdünnt in PBS für 2 h inkubiert. Die spezifische Bindung wurde unter Verwendung eines „horseradish“-Peroxidase (HPO; *engl.* Meerrettich) gekoppelten sekundären Antikörpers (1:2000; anti-Maus IgG HPO-gekoppelt, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) mit dem „enhanced chemiluminescence substrate“ (ECL[®], Amersham, Freiburg, Deutschland) photooptisch nachgewiesen. Der eingesetzte monoklonale anti-human-HIF-1 α -Antikörper identifiziert unter diesen Bedingungen mindestens zwei in der Molekülmasse variierende HIF-1 α -Unterformen von ca. 104 kDa bis 116 kDa.

2.5 HIF-1-EMSA

Zur Darstellung der funktionellen Aktivität von DNS-bindenden Proteinen wurden Kernextrakte in „electromobility shift assays“ (EMSAs) analysiert. Im Gegensatz zum Western Blot-Verfahren, welches mit stark denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen (PAG) durchgeführt wird und somit ausschließlich Aussagen über den totalen Gehalt des untersuchten Protein erlaubt, werden bei EMSA-Experimenten Gele unter nativen Pufferbedingungen verwendet. Die vor dem Gellauf durchgeführte Bindungsreaktion von Proteinextrakten mit spezifischen, doppelsträngigen DNS-Oligonukleotiden erlaubt somit die Bindung der nativ in ihrer Struktur erhaltenen Proteine an spezifische DNS-Abschnitte. Die Auftrennung im Gel erfolgt anschließend in Abhängigkeit von der Masse und Größe der durch die Bindung entstandenen Protein-DNS-Komplexe und führt zu einem charakteristischen Bandenmuster. Hierzu wurden spezifische DNS-Oligonukleotide für Gel Shift Experimente synthetisiert (MWG, Ebersberg, Deutschland). Die 33 bp langen Sequenzen korrespondieren mit der Enhancer-Sequenz des humanen Transferrings (TfHBS) und enthalten zwei HIF-1-Bindungsstellen.

TfHBS (<i>sense</i>):	5'-TTCCTGCACGTACACACAAAGCGCACGTATTTTC- 3'
TfHBS (<i>antisense</i>):	5'-GAAATACGTGCGCTTTGTGTGTACGTGCAGGAA- 3'

Tabelle 2: Nukleotidsequenzen der synthetischen TfHBS-Oligonukleotide für Gel Shift Analysen

Die Sequenzen der Nukleotide sind in *Tabelle 2* angegeben. 2 pmol des einzelsträngigen Oligonukleotides wurden mit 10 pmol [γ - 32 P]-Adenosintriphosphat (ATP; New England Nuclear, Köln, Deutschland) markiert und mit dem entsprechenden Gegenstrang hybridisiert. Freie Nukleotide wurden säulenchromatographisch abgetrennt und die Markierungseffizienz bestimmt. Die Bindungsreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μ l durchgeführt, bestehend aus 5 μ g nukleärem Proteinextrakt in einer Pufferlösung aus 50 mM KCl, 10 mM Tris, pH 7,7; 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 5% Glycerin, 0,03% Nonidet P-40 und 500 ng Lachstestis-DNS. Anschließend wurden die Proben mit dem markierten, doppelsträngigen Oligonukleotid (10.000 c.p.m. pro Probe) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Bei Konkurrenzexperimenten wurde vor der Zugabe des markierten Oligonukleotides die 250-fache molare Menge des (1) identischen, unmarkierten Oligonukleotids oder (2) eines unspezifischen, unmarkierten Nukleotides (NF- κ B-Sequenz) zugesetzt. Supershift Experimente in der Gegenwart von anti-HIF-1 α -Antikörper (BD Transduction Laboratories) wurden mit jeweils 10 μ l Antikörper, die 30 min vor dem Gellauf den Probenlösungen zugefügt wurden, durchgeführt.

Die einzelnen Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur in einem nichtdenaturierenden 5% Polyacrylamidgel (Polyacrylamid: Bisacrylamid 37,5:1; Roth) elektrophoretisch aufgetrennt, vakuumgetrocknet und im Phospho-Imaging-Verfahren (BAS 1000, Fuji, Düsseldorf, Deutschland) analysiert.

2.6 Messung von sekretiertem VEGF und EPO

Die Konzentration von sekretiertem (1) VEGF₁₆₅ (Quantikine; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) und (2) EPO (medac Diagnostika, Wedel, Deutschland) im Medium-Überstand von Zellkulturen wurde mit kommerziell erhältlichen enzymgekoppelten Immunoassays („enzyme-linked immunosorbent assay“, ELISA) bestimmt. HepG2-Zellen wurden in 24-er Platten 48 h kultiviert und anschließend mit entsprechenden Konzentrationen von Insulin bzw. IL-1 β für 6 h oder 24 h stimuliert. Die Behandlung mit Inhibitorsubstanzen erfolgte wie unter 2.1f beschrieben. Der Zellkultur-Überstand wurde bei 13.000 \times g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und die Proteinkonzentration des sekretierten VEGF bzw. EPO direkt bestimmt.

2.6.1 VEGF-ELISA

Der VEGF-ELISA der Firma R&D Systems ist nach einem „Sandwich“-Prinzip aufgebaut: Der an der festen Phase adhärierte, monoklonale Antikörper ist gegen humanes VEGF₁₆₅ gerichtet. Immobilisiertes VEGF-Protein aus den Zellkulturüberständen wird mit einem zweiten, polyklonalen anti-VEGF Antikörper, der zusätzlich mit einer „horseradish“-Peroxidase gekoppelt ist, in einer kolorimetrischen Reaktion nachgewiesen. In früheren Studien wurde für dieses ELISA-System eine Intra- und Interversuchsvarianz mit Variationskoeffizienten von 5 bzw. 7,5% bestimmt. Die Empfindlichkeit des Testverfahrens liegt bei einer unteren Bestimmungsgrenze von 9 pg/ml.

2.6.2 EPO-ELISA

Wie der oben beschriebene VEGF-ELISA ist auch der EPO-ELISA der Firma medac Diagnostika zweistufig aufgebaut. Als fixierter Antikörper wird ein monoklonaler anti-EPO Mausantikörper verwendet. Der lösliche, zweite Antikörper ist ebenfalls ein monoklonaler anti-EPO Mausantikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist.

2.7 Zytotoxizitätstest mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid)

Um den Einfluss der verwendeten Kinase-Inhibitoren auf die Zellvitalität und die potentielle Zytotoxizität der Substanzen zu bestimmen, wurden MTT-Tests durchgeführt. Das Prinzip dieser kolorimetrischen Methode zur Messung der Vitalität und Proliferation von Zellkulturen basiert auf der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes MTT durch intrazelluläre Dehydrogenasen. Das nur in vitalen Zellen gebildete Formazansalz hat ein charakteristisches Absorptionsspektrum von 480-660 nm mit einem relativen Absorptionsmaximum bei 570 nm. Dieser Test erfasst ausschließlich lebende Zellen und erlaubt somit eine Aussage über die Zytotoxizität der untersuchten Substanzen (Mosmann, 1983).

Zur Durchführung des MTT-Tests wurden 2×10^4 Zellen pro Vertiefung auf 96-er Platten ausgesät und für 48 h im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die

Zellen für 6 h serumfrei mit den entsprechenden Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen in jeweils 8 Replikaten inkubiert. Zur Messung der Zellvitalität wurde nachfolgend das Medium abgesaugt, durch 100 µl frisches Medium ersetzt und 25 µl MTT-Lösung zugegeben. Die Zellkulturen wurden für weitere 2 h im Brutschrank inkubiert und anschließend durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer über Nacht im Brutschrank lysiert und die Extinktion bei 570 nm bestimmt. Alle Messwerte wurden um den Betrag des Leerwertes von zellfreiem Medium korrigiert und der Mittelwert der unbehandelten Kontrollgruppe als Bezugswert (100% Vitalität) zur Abschätzung der Zytotoxizität der Testsubstanzen definiert.

2.8 Reporteragenuntersuchungen

Die HRG1-Zell-Linie¹ entstand durch stabile Transfektion von HepG2-Zellen mit einem Hypoxie-responsiblen Reporteragen-Konstrukt (Stiehl *et al.*, 2002). Das zugrunde liegende Reporteragen-Plasmid pH3SVL enthält drei HIF-responsible Elemente (HREs), deren Sequenz dem humanen Transferrin-Gen entnommen wurde. Da jedes HRE zwei HIF-1-Bindungsstellen (HBS) besitzt, liegen auf dem Plasmid folglich insgesamt sechs HBS vor. Zusätzlich enthält das Reporteragenkonstrukt cDNS des Luziferasegens aus *Photinus pyralis* unter der Kontrolle eines SV 40 Promotors (Abb.4; Wanner *et al.*, 2000).

4×10^4 Zellen/Kulturschale wurden auf 24-er Zellkulturplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät und 48 h inkubiert. Nach 24-stündiger hypoxischer (3% O₂) Stimulation und entsprechender Präinkubation mit den oben genannten Kinase-Inhibitoren wurden die Zellen mit „passive lysis buffer“ (PLB[®]; Promega/Boehringer Ingelheim, Heidelberg, Deutschland) lysiert und die Luziferase-Aktivität der Proben den Herstellerangaben entsprechend (Promega[®] Technical Bulletin No. 281) unter Benutzung eines Microlumat[®] LB96P Luminometers (EG&G Berthold, Bad Wildbach, Deutschland) bestimmt. Um etwaige Unterschiede in der Extrakt-Präparation auszugleichen, wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben nach der Bradford-Methode bestimmt und dementsprechend die absolute Luziferase-Aktivität je Probe auf die totale Proteinkonzentration im Lysat

¹ Die stabil transfizierte Zell-Linie HRG1 wurde freundlicherweise von Roland H. Wenger (Institut für Physiologie, Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt.

normiert. Zusätzlich wurden die Kulturen vor der Lyse sorgfältig mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen, um abgestorbene Zellen sowie sekretierte und aus dem Nährmedium entstammende Proteine bestmöglich zu entfernen. Die Darstellung der relativen Luziferase-Aktivität beinhaltet folglich auch eine Korrektur unterschiedlicher Zellzahlen im Probelysat.



Abbildung 4: Schema des pH3SVL Reporter-Gen-Konstrukts

Das hypoxisch induzierbare Reporter-Gen *pH3SVL* enthält drei Hypoxie-responsible Elemente (HREs) aus dem humanen Transferrin-Promotor. Abkürzungen: SV 40, SV 40 Promotor; firefly-LUC, Luziferase-Gen aus *Photinus pyralis* (Abb. nach Wanner *et al.*, 2000).

2.9 Transiente Transfektion mit Expressionsplasmiden für konstitutiv aktive und inaktive Formen von PI 3-K und Akt

Die Expressionsplasmide für konstitutiv aktive Formen von PI 3-K und Akt basieren auf dem eukaryontischen Expressionsplasmid pcDNA3 (Invitrogen life technologies, Karlsruhe, Deutschland), welches erlaubt, unter Expressionskontrolle eines CMV-Promotors beliebige kodierende DNS (cDNS)-Abschnitte in Säugetierzellen zu exprimieren². Durch Einfügen eines Myristylierungssignals³ in 5'-Position vor die für PI 3-K und Akt kodierenden Genabschnitte erhalten die beiden Kinasen dominant positive Aktivität. Auch in Abwesenheit von der regulatorischen p85 Untereinheit und entsprechenden Adapterproteinen wie z.B. den IRS liegt die myristylierte Form der PI 3-K Membran-assoziiert vor und gelangt somit in unmittelbarer räumlicher Nähe zu ihrem Substrat, den Phosphatidylinositolderivaten. In entsprechender Weise wird auch die konstitutive Aktivierung der Akt-Kinase

² Die Expressionsvektoren für konstitutiv aktive Formen von PI 3-K und Akt wurden freundlicherweise von Prof. Masa Aoki (The Scripps Research Institut, La Jolla/CA, USA), zur Verfügung gestellt.

³ Die posttranslationale Acylierung von Proteinen mit der Fettsäure Tetradeconoat (Myristylierung) wurde ursprünglich als Besonderheit von retroviral kodierten Proteinen beschrieben (Henderson *et al.*, 1983). Aoki *et al.* konnten nachweisen, dass die Fusion von zellulären Formen von PI 3-K und Akt mit einem viralen Myristylierungssignal die konstitutive Aktivierung der Kinasen bewirkte (Aoki *et al.*, 1998; Aoki *et al.*, 2000).

erreicht: Wie bereits beschrieben, führt die Myristylierung des Proteins zur Anlagerung an die innere Zellmembran. Dieser Vorgang ist unabhängig von D3-phosphorylierten Inositolphosphaten, welche unter *in vivo* Bedingungen als molekularer Adapter für die Membrananlagerung von Akt fungieren. Somit gelangt Akt in die Nähe der Membran-assoziierten PDKs, welche die Kinase an Thr308 und Ser473 phosphorylieren und dadurch aktivieren (siehe 1.2.2.1). Die cDNS für eine dominant negative Form der PI 3-K ($p85\alpha\Delta478-513$) wurde ebenfalls freundlicherweise von M. Aoki zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt beruht auf der regulatorischen p85-Untereinheit der PI 3-K, besitzt jedoch eine Deletion (AS 478-513) im Bereich der Inter-SH2 Domäne, die für eine Dimerisierung mit der katalytischen p110-Untereinheit von essentieller Bedeutung ist. Die Expression des mutierten Proteins resultiert in einer signifikanten Reduktion der PI 3-K Aktivität, da $p85\alpha\Delta478-513$ kompetitiv zur Wildtyp-Form an aktivierte Adapterproteine wie IRS bindet, jedoch die Assoziation mit p110 und folglich die Phosphorylierung von Inositolderivaten ausbleibt (Dhand *et al.*, 1994). Eine schematische Darstellung der Plasmidkonstrukte gibt die *Abbildung 5* wieder.

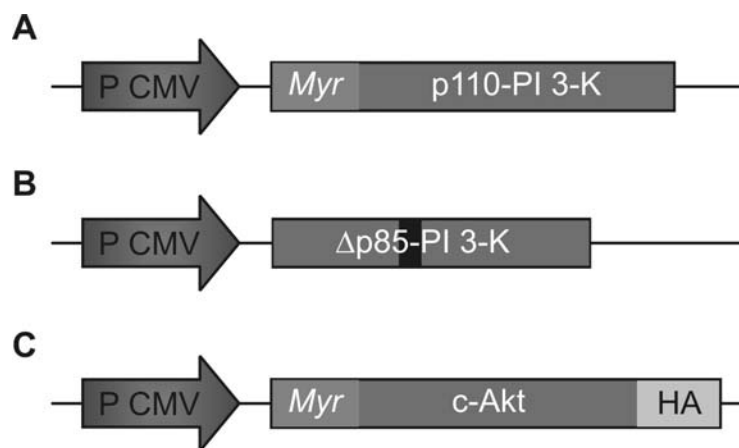


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren *pcDNA3-Myr-PI 3-K*; *pcDNA3.1-p85ΔiSH2* und *pcDNA3-Myr-Akt*

Alle Konstrukte (A-C) stehen unter Kontrolle eines CMV-Promotors (P CMV) des eukaryontischen Expressionsvektors *pcDNA3*. A: Expressionsvektor *pcDNA3-Myr-PI 3-K*. Myristylierte (Myr), konstitutiv aktive Form der PI 3-K in *pcDNA3*. B: Expressionsvektor *pcDNA3.1-p85ΔiSH2*. Dominant negative Form der regulatorischen p85 Untereinheit der PI 3-K. Durch Deletion einer inter-SH2-Domäne (AS 478-513) erlangt das exprimierte Protein dominant negative Eigenschaft. C: Expressionsvektor *pcDNA3-Myr-Akt*. Myristylierte, konstitutiv aktive Form der zellulären Akt-Kinase (c-Akt) in *pcDNA3* mit Markierungssequenz aus dem Hämagglutinin (HA)-Gen von *Haemophilus influenzae*.

2.9.1 Plasmidkonstruktion von pcDNA3.1-p85 Δ iSH2

NotI, *Bam*HI verdaute p85 α Δ 478-513 cDNA wurde in den mit *NotI*, *Bam*HI linearisierten, eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1- (Invitrogen) subkloniert. Elektrokompente Bakterien (*Escherichia coli* DH5 α) wurden mittels Elektroporation mit rekombinanter DNA transformiert. Anhand von Restriktionsanalysen wurde ein p85 Δ iSH2-positiver Klon isoliert und das entsprechende Plasmid mit pcDNA3.1-p85 Δ iSH2 bezeichnet. Die funktionelle Aktivität des Plasmids wurde durch Analyse des Phosphorylierungsstatus der PI 3-K-abhängig aktivierten Kinase Akt geprüft.

2.9.2 Zellkultur und transiente Transfektion

HepG2-Zellkulturen wurden am Tag vor der Transfektion subkultiviert, um ein Zellwachstum in der exponentiellen Phase sicherzustellen. Zur Transfektion wurden 50-80% konfluente Zellkulturen in Suspension gebracht, mit serumfreiem RPMI 1640 Kulturmedium gewaschen und auf eine Zellzahl von $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Bis zu 50 μ g Plasmid-DNS wurden in 50 μ l sterilisiertem TE-Puffer (pH 8) gelöst, für 15 min bei 68°C im Wasserbad sterilisiert und anschließend mit 400 μ l Zellsuspension in eine Elektroporationskuvette überführt. Die Transfektion wurde im Elektroporationsverfahren unter Verwendung eines GenePulsers® (Biorad) in einem für HepG2-Zellen optimierten Protokoll in Anlehnung an die Empfehlungen des Herstellers durchgeführt und die Zellen den Erfordernissen der nachfolgenden Experimente entsprechend weiterbehandelt (siehe unten).

2.9.3 Reporterexperimente mit Dualer Luziferase (DLA)

HepG2-Zellen wurden nach der oben beschriebenen Methode mit 30 μ g pcDNA3-*myr*PI 3-K bzw. pcDNA3-*myr*Akt und 3 μ g des Hypoxie-responsiblen Reporterplasmids pH3SVL, sowie 0,6 μ g eines Expressionsplasmids für *Renilla* Luziferase (pRLSV40; Promega) kotransfiziert. Kontrollkulturen erhielten eine entsprechende Menge des reinen Expressionsvektors (30 μ g pcDNA3). Die *Renilla* Luziferase wird kontinuierlich und stimulusunabhängig in Säugetierzellen exprimiert, weswegen sie als Parameter für die Transfektionseffizienz genutzt werden kann. 5×10^6 Zellen wurden nach der Transfektion auf 6-er Kulturplatten verteilt und für

24 h kultiviert. Nichtadhärente Zellen wurden anschließend abgesaugt und die Kulturen in frischem Medium für weitere 24 h unter normoxischen und hypoxischen (3% O₂) Kulturbedingungen inkubiert. Zell-Lyse und Messung der Luziferase-Aktivität wurden mit dem „Dual Luciferase Kit“ (Promega) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Alle Messwerte für „firefly“-Luziferase wurden auf die *Renilla*-Luziferase Expression derselben Probe normiert, um Unterschiede in der Transfektionseffizienz und Extraktpräparation auszugleichen.

2.9.4 Western Blot Analyse aus transient transfizierten Zellkulturen

Um die Expression der konstitutiv aktiven und inaktiven Formen von PI 3-K und Akt in transfizierten HepG2-Zellen nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. $2,5 \times 10^6$ mit dem jeweiligen Expressionsplasmid (20 µg Plasmid-DNS) transfizierte HepG2-Zellen wurden nach Elektroporation (siehe 2.9) auf konventionelle Zellkulturschalen (100 mm Durchmesser) ausgesät und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 24 h mit frischem Medium unter normoxischen oder hypoxischen (3% O₂) Kulturbedingungen inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden unter Verwendung eines hyperosmolaren, aktiv lysierenden Puffers (10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 400 mM NaCl; 0,1% NP-40; unmittelbar vor Gebrauch versetzt mit 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM Na₃VO₄; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin A) hergestellt und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mittels der Bradford-Methode bestimmt (siehe 2.3).

Zur Detektion von HIF-1 α (BD Transduction Laboratories), phospho-S473-Akt und Akt (beide New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) wurden 80 µg Gesamtprotein in einem 5- (HIF-1 α) bzw. 7,5-prozentigen (alle anderen Proteine) SDS-PAG elektrophoretisch aufgetrennt. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte wie in Abschnitt 2.4 beschrieben.

2.10 p42/44 MAPK *in vitro* Phosphorylierungsstudien von HIF-1 α -Fusionsproteinen

2.10.1 GST-Fusionsprotein Expression und Aufreinigung

Zur Expression rekombinanter Proteine optimierte, kompetente Bakterienkulturen (*Escherichia coli* BL21; Stratagene®, CA, USA) wurden mit Expressionsvektoren für Glutathion-S-Transferase-(GST-) markierte Fusionsproteine den Herstellerangaben entsprechend transformiert (pGST® Expressionssysteme, Amersham). Die eingesetzten Vektoren⁴ kodierten für HIF-1 α Proteinmutationen verschiedener Abschnitte des *Carboxy*-terminalen Bereiches des Transkriptionsfaktors. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von Isopropyl-D-Thiogalaktosid (IPTG; Gesamtkonzentration 0,1 mM) induziert und die Bakterienkulturen weitere 6 h unter Belüftung bei 32°C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen zentrifugiert und die Bakteriensedimente unter Verwendung eines aktiven Lysepuffers (NETN Puffer; 0,5% NP-40; unmittelbar vor Gebrauch versetzt mit PMSF ad 2 mM und 1 Tbl. Proteasen-Inhibitor-Mix; Sigma) aufgeschlossen. Das Lysat wurde in einer Mikrozentrifuge bei 13.000×g für 5 min von bakteriellem Zelldebris gereinigt und der Überstand mit 1 ml Glutathion-Agarose Kügelchen versetzt und unter kontinuierlichem Mischen 45 min bei 4°C inkubiert. Die präzipitierten Fusionsproteine wurden schließlich in drei aufeinander folgenden Waschgängen mit Lysepuffer von Verunreinigungen befreit und in 500 μ l aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.10.2 *In vitro* p42/44 MAPK Phosphorylierungsstudien

In vitro p42/44 MAPK Phosphorylierungsstudien wurden in Anlehnung an Pei mit leichter Modifikation durchgeführt (Pei, 2000). Rund 1 μ g aufgereinigte GST-Fusionsproteine, sowie reines GST und Myelin-Bindungsprotein (MBP; Sigma) wurden mit MAPK Puffer (25 mM Hepes; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; pH 7,5) äquilibriert und für 20 min mit aktivierter, rekombinanter MAPK (BioMol GmbH, Hamburg, Deutschland) in Gegenwart von 5 μ Ci [γ -³²P]-ATP (Amersham) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zufügen von zweifach konzentriertem Laemmli Probenpuffer (Biorad) zu gleichen Volumenanteilen

⁴ konstruiert von Dr. N. Sang, Cardeza Foundation, PA, USA

gestoppt und anschließend die Proben 3 min bei 95°C denaturiert und in einem kontinuierlichen Gradienten-PAG (4-20%; Biorad) massenspezifisch aufgetrennt. Die Gele wurden zur Prüfung der geladenen Proteinmengen nach der Coomassie-Färbemethode gefärbt, dokumentiert und nachfolgend vakuumgetrocknet und autoradiographiert.

2.11 Statistische Auswertung

Falls nicht gesondert vermerkt, wurde zur Darstellung der Daten in den Abbildungen für alle Versuche der arithmetische Mittelwert \pm der einfachen Standardabweichung (SD) aus Einzelmesswerten gebildet. Der Stichprobenumfang der Versuche ist der jeweiligen Legende zu den Abbildungen zu entnehmen. Unterschiede zwischen Mittelwerten von drei oder mehr Versuchsgruppen wurden anhand des „einfachen ANOVA“ (ordinary measures of analysis of variance) und anschließenden *post hoc* Testverfahren auf Signifikanz geprüft: Der Vergleich von Mittelwerten mit einer Kontrollgruppe erfolgte anhand der Prozedur nach Dunnett. Zum Vergleich von Mittelwerten aller Stichproben untereinander wurde die Prozedur nach Tukey und Kramer angewandt. Konnte die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ verworfen werden, so wurde der Unterschied als statistisch signifikant bezeichnet. Im Folgenden sind die Signifikanzschwellen mit Sternchen (*) markiert, wobei für * $p < 0,05$ sowie ** $p < 0,01$ gilt.

Die statistische Auswertung erfolgte auf den Berechnungsgrundlagen des Programmes *GraphPad Prism 3.0* (GraphPad Software, SanDiego, CA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Insulin induziert HIF-1 α auch unter normoxischen Kulturbedingungen

Die vierstündige Exposition von HepG2-Zellkulturen unter einer O₂-armen Atmosphäre mit einem konstanten O₂-Gehalt von 3% führte erwartungsgemäß zur rapiden Akkumulation von HIF-1 α -Protein im Zellkern (*Abb. 6A, Hypoxie*). Entsprechend zeigten normoxisch inkubierte HepG2-Zellen nur einen geringen Gehalt des Proteins (*Abb 6A, Normoxie*). Die Zugabe von humanem Insulin in Konzentrationen von 0,02- 2000 mU/ml zum Versuchsmedium serumfrei vorinkubierter HepG2-Kulturen bewirkte eine dosisabhängige Steigerung des HIF-1 α -Proteingehalts in Kernen normoxischer Zellen, wie im Western Blot nachgewiesen werden konnte (*Abb. 6A*).

Um die funktionelle Aktivität der Insulin-induzierten HIF-1 α -Akkumulation zu untersuchen, wurden dieselben Kernextrakte zusätzlich in Gel Shift Experimenten analysiert. Parallel zu den Ergebnissen aus der Western Blot Analyse induzierten steigende Konzentrationen von Insulin eine dosisabhängige Zunahme der Bildung von HIF-1-TfHBS-Komplexen in der artifiziellen Bindungsreaktion mit entsprechenden Kernextrakten (*Abb. 6B, als „HIF-1“ gekennzeichnet*). Zusätzlich wurden Kontrollen aus rein normoxischen und hypoxischen Proben untersucht. Die Selektivität der Bindungsreaktion für HIF-1 konnte in Kompetitionsexperimenten mit spezifischen (TfHBS), sowie unspezifischen (NF- κ B) unmarkierten Oligonukleotiden nachgewiesen werden. So unterdrückte die Zugabe von unmarkierten TfHBS-Oligonukleotiden in 250-fachem Überschuss wirkungsvoll die Komplexbildung von HIF-1 aus hypoxischen Kernextrakten mit der radioaktiv markierten Sonde (*Abb 6B, H. komp. TfHBS*). Entsprechende Konzentrationen unmarkierter Oligonukleotide ohne HBS (NF- κ B-Sequenzen) hatten hingegen nur einen geringfügigen Einfluss auf die Bildung von HIF-1-TfHBS-Komplexen (*Abb 6B, H. komp. NF- κ B*). Darüber hinaus ließ sich eine veränderte Migration des spezifischen HIF-1-TfHBS-Komplexes im Polyacrylamidgel durch Zugabe von monoklonalem anti-HIF-1 α -Antikörper zu der Bindungsreaktion darstellen („Supershift“).

Als weiteres Verfahren wurde die Produktion von immunoreaktivem VEGF und EPO in Insulin-behandelten HepG2-Zellen im ELISA Verfahren untersucht. Im

Einklang mit den oben beschriebenen Beobachtungen bewirkte eine 6-stündige Stimulation mit steigenden Konzentrationen an Insulin (0,02-200 mU/ml) einen proportionalen Anstieg der Produktion von VEGF durch HepG2-Zellkulturen (Abb. 6C). Der VEGF-Proteingehalt in den einzelnen Zellkulturen ist auf die Menge an zellulärem Gesamtprotein im Lysat der jeweiligen Kultur bezogen. Im Gegensatz hierzu führte die Insulinstimulation zu keiner nennenswerten Änderung der Produktion von EPO (Daten nicht gezeigt).

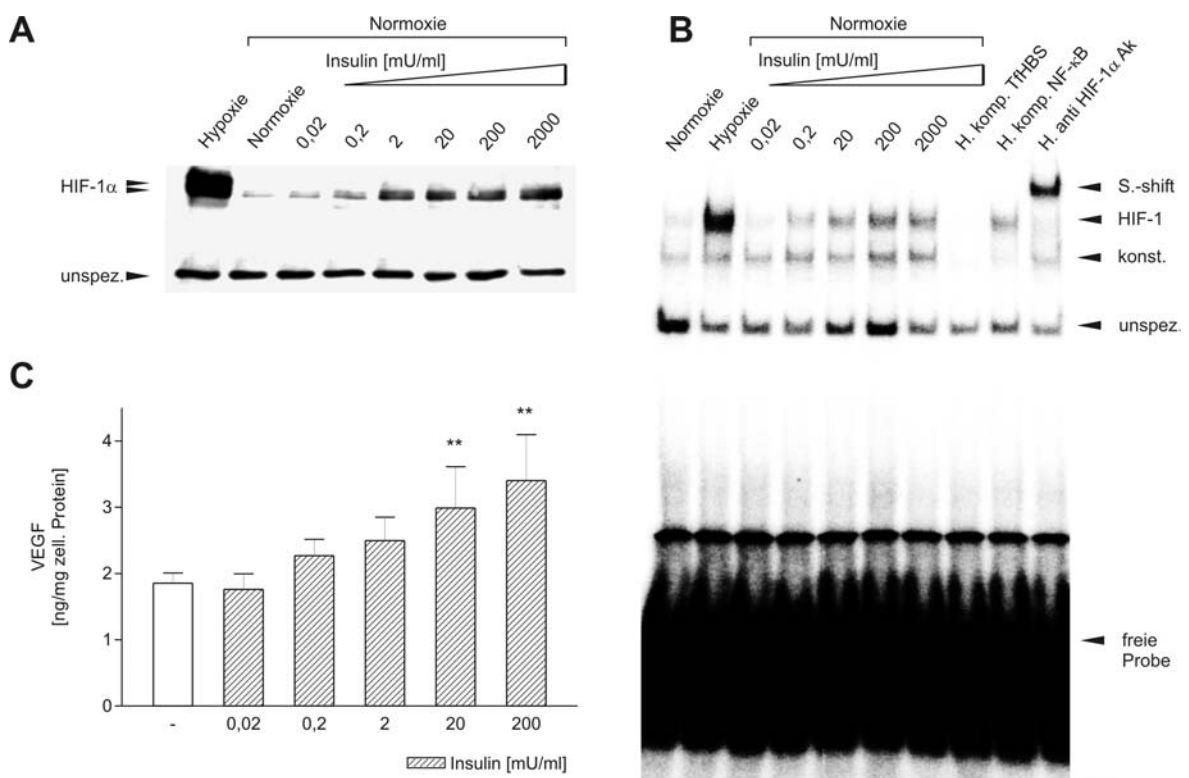


Abbildung 6: Insulin induziert die Akkumulation von HIF-1 α in normoxisch kultivierten HepG2-Zellen

A: Nachweis von HIF-1 α -Protein in hypoxischen (3% O₂) und Insulin-stimulierten, 4 h normoxisch inkubierten HepG2-Zellkulturen durch Western Blot Analyse. 20 μ g nukleäres Gesamtprotein wurden in einer 7,5% SDS-PAGE massenspezifisch aufgetrennt und auf HIF-1 α -Protein untersucht. Die untere Bande (~55 kDa) wird durch unspezifische Bindung des sekundären anti-Maus-Antikörpers verursacht und korreliert mit der Ladungsmenge der jeweiligen Proben.

B: Gel Shift Analyse aus identisch behandelten Zellen (siehe Abb. A). Zur Identifikation der spezifischen HIF-1 α -Bindung wurden Kompetitionsreaktionen in Bindungsreaktionen mit hypoxischen Extrakten und unmarkiertem TfhBS-Oligonukleotid (H. komp. TfhBS) oder einer unspezifischen Sequenz (H. komp. NF- κ B) in 250-fachem Überschuss durchgeführt. Außerdem ließ sich durch die Zugabe von anti-HIF-1 α -Antikörper ein „Supershift“ des spezifischen HIF-1-TfhBS-Komplexes nachweisen.

C: Auswirkung einer 6-stündigen Insulinstimulation (0,02 mU–200 mU/ml) auf die Produktion von immunoreaktivem VEGF durch normoxisch inkubierte HepG2-Zellkulturen

Abkürzungen: H., Hypoxie; S.-shift, „Supershift“; konst., konstante Bande; unspez., unspezifische Bande

3.2 Die Induktion von HIF-1 α durch Insulin wird durch die PI 3-Kinase vermittelt

PI 3-K und MEK sind frühe Vermittler der intrazellulären Signalwege von Insulin-Effekten auf Zellkulturen. Für beide Enzymfamilien sind pharmakologische Inhibitor-substanzen beschrieben worden. LY294002 ist ein spezifischer Inhibitor des PI 3-K Signalweges (Vlahos *et al.*, 1994). PD098059 und U0126 inhibieren die MAPK-Kaskade auf der Stufe von MEK1/2, wobei U0126 beide Isoformen der MEKs inhibiert, während PD098059 präselektiv die MEK1 blockiert (Alessi *et al.*, 1995; Favata *et al.*, 1998). Auf der Grundlage der unter 3.1 beschriebenen Befunde ist im Folgenden der Einfluss von PI 3-K und MAPKs auf die Akkumulation von HIF-1 α in Insulin- bzw. Zytokin-stimulierten HepG2-Zellen untersucht worden.

3.2.1 Zytotoxizitätstest für LY294002, PD098059 und U0126

Um den Einfluss der verwendeten Inhibitorsubstanzen auf die Zellvitalität und somit die potentielle Zytotoxizität der Substanzen zu bestimmen, wurden MTT-Tests unter Berücksichtigung der jeweiligen Inkubationsdauer in den verschiedenen Analyseverfahren durchgeführt. Der PI 3-K-Inhibitor LY294002 hatte in keiner der eingesetzten Konzentrationen (10–100 μ M) einen signifikant zytotoxischen Effekt auf HepG2-Zellkulturen (*Abb. 7A und B*). Im deutlichen Gegensatz dazu waren die beiden Inhibitoren der MEK1/2 in höheren Konzentrationen zytotoxisch. Die Substanz PD098059 verringerte die Bildung von Formazansalz unter 6-stündiger Inkubation bei einer Wirkstoffkonzentration von 100 μ M signifikant um $11\pm 9\%$ ($n=8$). Bei 24-stündiger Inkubationszeit verringerten Konzentrationen von 40 μ M und 100 μ M die Zellvitalität signifikant um $14\pm 3\%$ ($n=8$) bzw. $16\pm 5\%$ ($n=8$; *Abb. 7C und D*). U0126 minderte die Formazanbildung signifikant ab einer Konzentration von 3 μ M um $10\pm 3\%$ ($n=8$) während 6-stündiger Inkubation und bei 1 μ M um $9\pm 4\%$ ($n=8$) nach 24-stündiger Inkubation (*Abb. 7E und F*).

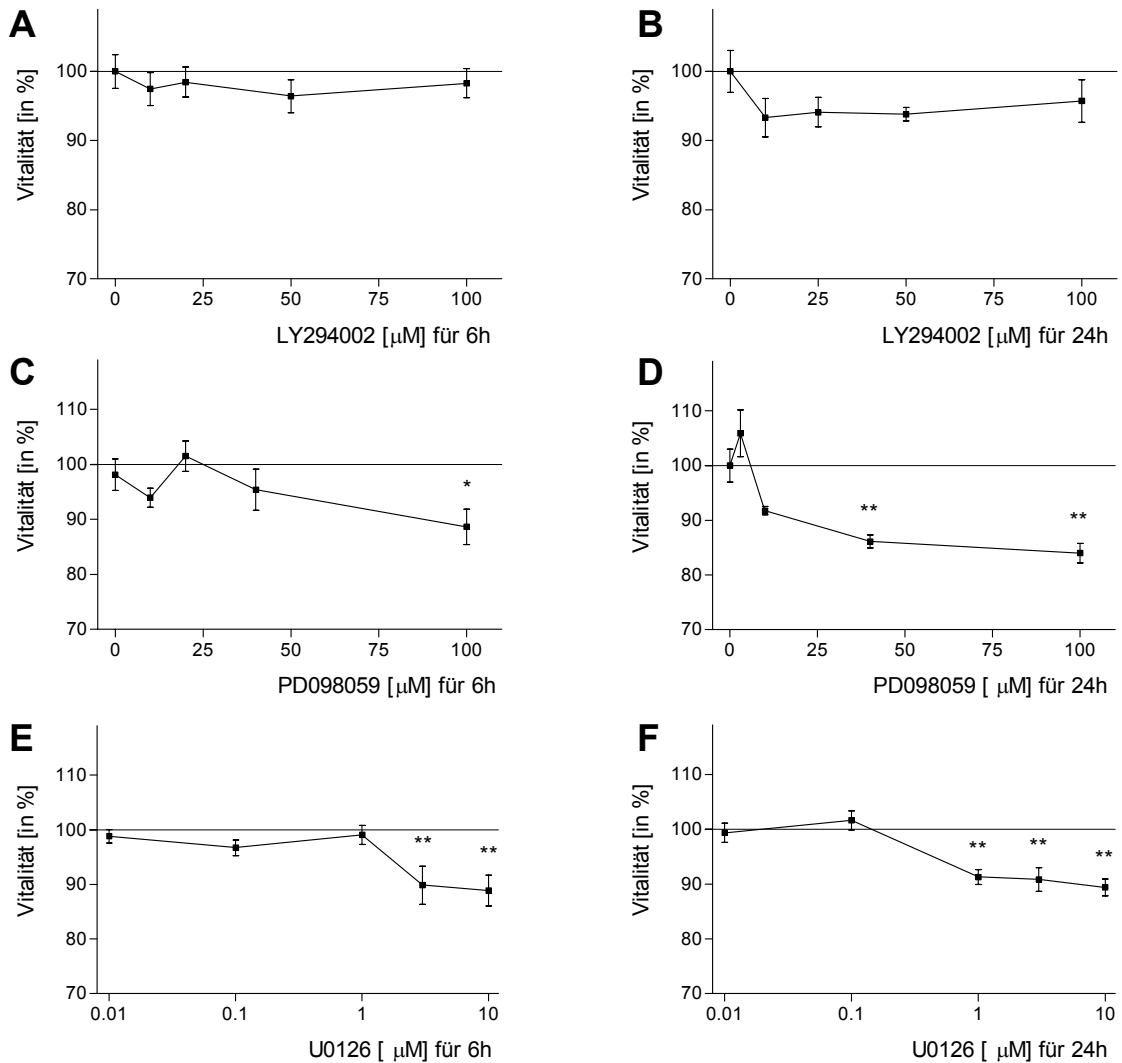


Abbildung 7: Zytotoxizität der Inhibitorsubstanzen LY294002, PD098059 und U0126

Vitalität von HepG2-Zellkulturen (MTT-Test) nach 6- (A,C,E) bzw. 24-stündiger (B,D,F) Inkubation mit Kinase-Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen. Bei 6-stündigen Versuchen wurden die Zellen serumfrei inkubiert, die 24-stündige Inkubation geschah in Gegenwart von FCS. (Mittelwerte \pm Standardfehler[SE]; $n \geq 8$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Prozedur nach Dunnett).

3.2.2 LY294002 antagonisiert die Insulin-vermittelte HIF-1 α -Aktivierung

Normoxische HepG2-Zellkulturen wurden vor der Stimulation durch Insulin mit den Kinase-Inhibitoren LY294002 und PD098059 für 10 min bzw. 60 min vorinkubiert und die Substanzen während der 4-stündigen Inkubationsperiode in dem Versuchsmedium in den angegebenen Konzentrationen belassen. Die Western Blot

Analyse aus entsprechenden Kernextrakten zeigte eine deutliche, dosisabhängige Reduktion von HIF-1 α -Protein im Zellkern von LY294002 behandelten Kulturen, während PD098059 nur geringfügige Auswirkungen auf den HIF-1 α -Proteingehalt zeigte (Abb. 8).

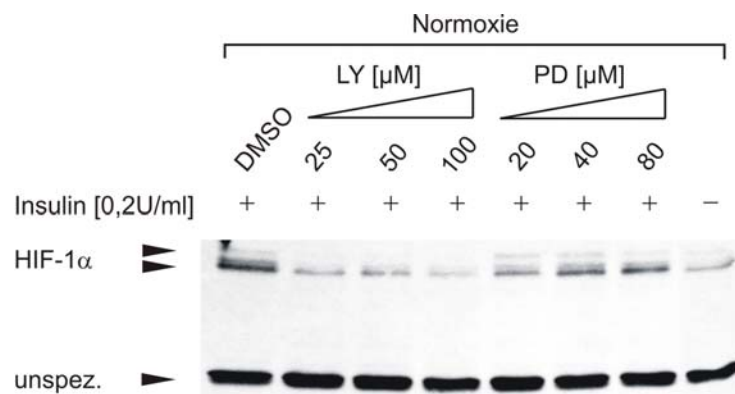


Abbildung 8: LY294002 inhibiert die Insulin-induzierte Akkumulation von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen

Western Blot Analyse aus Kernextrakten von Insulin-stimulierten Zellen in Gegenwart von LY294002 oder PD098059 bzw. ausschließlich dem Lösungsmittel (DMSO). Serumverarmte HepG2-Kulturen wurden 10 min vor Stimulation mit Insulin mit LY294002 bzw. 60 min mit PD098059 vorinkubiert. Zusätzlich ist eine normoxische Kontrolle ohne Insulin abgebildet.

Die weiterführenden Untersuchungen der Einflussnahme von PI 3-K und MAPKs in der beschriebenen Insulin-vermittelten Akkumulation von HIF-1 α schlossen die Analyse von zwei gut charakterisierten Zielgenen des Transkriptionsfaktors ein. Wie bereits unter 3.1 beschrieben, führte die Stimulation von normoxischen HepG2-Zellen mit 0,2 U/ml Insulin (Abb. 9A und B, schraffierte Balken) zu einem signifikanten Anstieg der VEGF-Produktion im Vergleich zu unstimulierten Kontrollkulturen („C“, weiße Balken). Auf die Produktion von EPO hatte die Insulinstimulation hingegen keine Auswirkung. In Gegenwart des Inhibitors LY294002 (50 μ M) wurde die EPO-Produktion jedoch vollständig blockiert und sank unter die Nachweisgrenze (<1,0 mU/mg) des verwendeten EPO-ELISAs, während der VEGF-Gehalt in identisch behandelten HepG2-Kulturen nicht nennenswert beeinflusst wurde (Abb. 9A und B). Im Gegensatz zu den differenzierten Auswirkungen von LY294002 führte die Inkubation mit PD098059 (40 μ M) zu einer

signifikanten Senkung sowohl des VEGF-, wie auch des EPO-Proteingehalts in Zellkulturüberständen: Unter Inkubation mit 40 μ M PD098059 verringerte sich die Produktion von VEGF um 36% auf 1,6 ng/mg (\pm 0,3; Mittelwert \pm SD) im direkten Vergleich zu Insulin-behandelten Kulturen ohne Inhibitorzusatz (2,5 ng/mg; \pm 0,1). Die Produktion von immunreaktivem EPO sank in Gegenwart von 40 μ M PD098059 um 55% auf 5,4 mU/mg (\pm 2,0). Unter Insulinstimulation ohne Inhibitor betrug die Produktion von EPO 10,8 mU/mg (\pm 2,8; *Abb. 9A und B*).

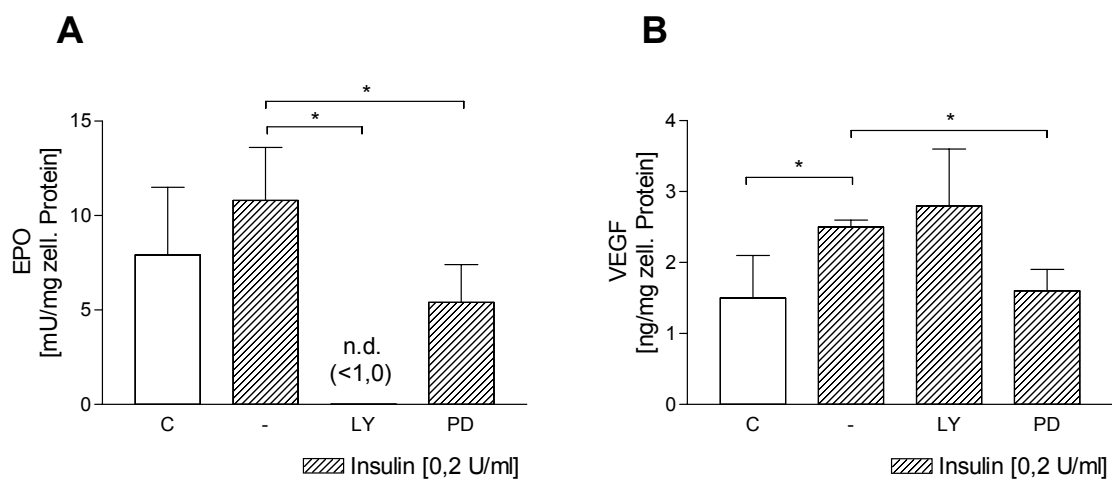


Abbildung 9: Einfluss von LY294002 und PD098059 auf die Produktion von VEGF und EPO in Insulin-stimulierten, normoxischen HepG2-Zellkulturen

6 h-Produktionsrate von EPO und VEGF in Insulin-behandelten Kulturen unter Einfluss von LY294002 (LY; 50 μ M) oder PD098059 (PD; 40 μ M) bzw. reinem Kulturmedium („C“). Die EPO- und VEGF-Produktion wurde als Maß für die Zelldichte der Parallelkulturen auf die zelluläre Gesamtproteinkonzentration bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Sternchen (*) markieren signifikante Differenzen ($p < 0,05$; Prozedur nach Tukey und Kramer).

3.3 IL-1 β , ein weiterer Stimulator normoxischer HIF-Aktivität

Das Zytokin Interleukin-1 β wurde in verschiedenen aktuellen Studien als weiterer potenter Effektor einer normoxischen HIF-1 α -Aktivierung beschrieben (Hellwig-Bürgel *et al.*, 1999; El Awad *et al.*, 2000; Thornton *et al.*, 2000). Wie auch Insulin bindet IL-1 β an spezifische Rezeptoren (IL-1R), die auf der Oberfläche von Zielzellen exprimiert werden. Die Zytokin–Rezeptor Interaktion aktiviert eine Vielfalt von komplexen, intrazellulären Signalkaskaden, unter anderem auch den PI 3-K-/Akt-/mTOR-Signalweg (Reddy *et al.*, 1997). Diese Gemeinsamkeit von Insulin und IL-1 β , sowohl im Bezug auf die Aktivierung von HIF-1 unter normoxischen Bedingungen als auch unter dem Aspekt gemeinsamer intrazellulärer Signalstrukturen, waren Anlass zur Studie von IL-1 β -Effekten auf die HIF-1 α -Stabilisierung unter Normoxie.

3.3.1 Die normoxische Induktion von HIF-1 α durch IL-1 β beruht auf PI 3-Kinase-Vermittlung

Die Stimulation von normoxischen HepG2-Zellen mit IL-1 β (0,5-10 ng/ml) führte zu einer deutlichen Zunahme von HIF-1 α -Protein in der Western Blot Analyse im Vergleich zu normoxischen Kontrollkulturen (Abb. 10). Ebenso war eine gesteigerte Bildung des HIF-1-TfHBS-Komplexes im Gel Shift Experiment nachweisbar (vergleiche Proben „Normoxie“ versus „DMSO“; Abb. 11B).

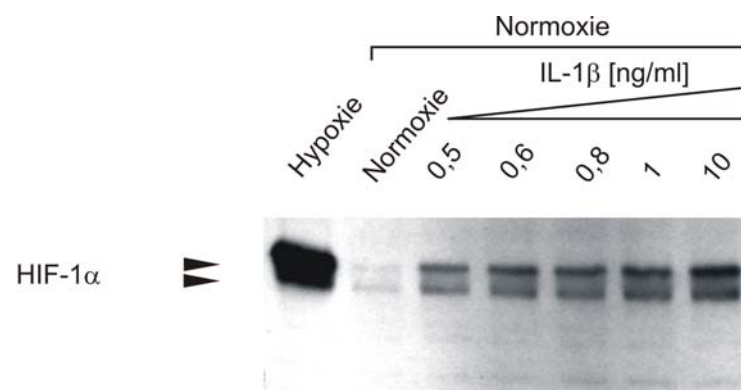


Abbildung 10: IL-1 β induziert HIF-1 α in normoxischen HepG2-Kulturen

Western Blot Analyse von Kernextrakten normoxisch inkubierter HepG2-Kulturen. Die Zellen wurden für 4h mit IL-1 β (0,5-10 ng/ml) stimuliert. Eine normoxische Probe ohne IL-1 β sowie eine hypoxische Kontrolle sind ebenfalls abgebildet.

In Gegenwart der Inhibitorsubstanz LY294002 wurde dieser Effekt vollständig unterdrückt, wie auch eine Abnahme von DNS-bindungsfähigem HIF-1 zu beobachten war (Abb. 11A und B). Ähnlich den Effekten in Insulin-stimulierten Zellkulturen zeigte die Anwendung von MEK1/2 Inhibitoren keinen Einfluss auf die HIF-1 α -Antwort IL-1 β -stimulierter Zellen (Abb. 11A, B und C). Lediglich Wirkstoffkonzentrationen, die im MTT-Test nachweislich zytotoxische Effekte erzeugten, verringerten merklich den HIF-1 α -Gehalt mit entsprechenden Auswirkungen in der Gel Shift Analyse. Bei Kombination der beiden Inhibitorsubstanzen (LY 50 μ M; PD 40 μ M) wurde die Bildung des HIF-1-DNA-Komplexes vollständig unterdrückt (Abb. 11B, LY+PD).

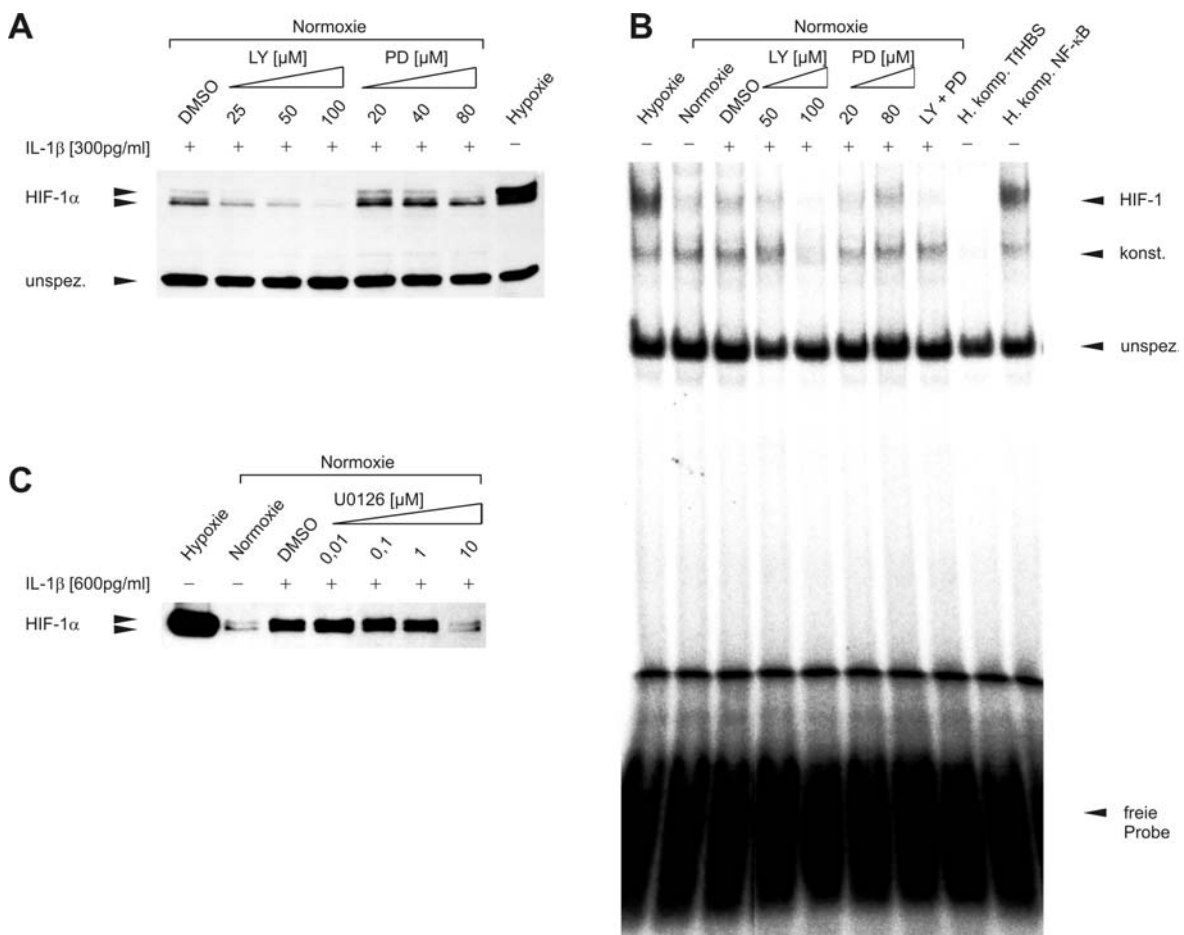


Abbildung 11: LY294002 inhibiert die IL-1 β -induzierte normoxische Akkumulation von HIF-1 α

A: Western Blot Analyse aus Kernextrakten von IL-1 β -stimulierten HepG2 (Inkubationsdauer 4 h) in Gegenwart von LY294002 oder PD098059 bzw. ohne Inhibitoren (DMSO). Zusätzlich ist eine hypoxische Kontrolle ohne IL-1 β abgebildet. B: Gel Shift Analyse von identischen Extrakten wie unter A. beschrieben (Abkürzungen wie in Abb. 6B). C: Western Blot Analyse von Kernextrakten von IL-1 β -stimulierten HepG2 (Inkubationsdauer 4 h) in Gegenwart von U0126 bzw. ohne Inhibitor (DMSO). Zusätzlich sind hypoxische und normoxische Kontrollen ohne IL-1 β abgebildet.

3.4 Insulin und IL-1 β steigern die transkriptionelle Aktivität in HRG1-Zellen unter normoxischen Kulturbedingungen

Die bislang vorgestellten Daten zur Insulin- und IL-1 β -Stimulation konnten die normoxische Akkumulation von HIF-1 α , eine gesteigerte Bildung des HIF-1-TfHBS-Komplexes, sowie die Induktion von bekannten HIF-1-Zielgenen nachweisen. Um den Einfluss von Insulin und IL-1 β auf die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 zu untersuchen, wurden Reporter-Gen-Experimente mit der Hypoxie-responsiblen Zelllinie HRG1 durchgeführt. Im Vergleich zur Analyse von HIF-1-Zielgenen bietet diese artifizielle Methode die Möglichkeit, den Einfluss eines definierten Transkriptionsfaktor-Komplexes auf die Aktivierung eines abhängigen Promotorabschnittes zu studieren. Das in HRG1-Zellen stabil exprimierte Reporter-Gen-Plasmid pH3SVL besitzt sechs HBS und ist folglich hochgradig HIF-1-abhängig reguliert (siehe 2.8).

Die 24-stündige Stimulation von serumfrei vorinkubierten HRG1-Zellkulturen mit 200 mU/ml Insulin bewirkte eine 1,9-fache ($\pm 0,5$; $p < 0,05$; Mittelwerte aus $n = 4$, \pm SD) Induktion der relativen Luziferase-Aktivität im Vergleich zu unstimulierten Kontrollkulturen (Abb. 12). Im Einklang mit diesen Ergebnissen führte die Stimulation durch 300 pg/ml IL-1 β zu einer 2,2-fachen ($\pm 0,6$; $p < 0,05$) Steigerung der relativen Luziferase-Aktivität.

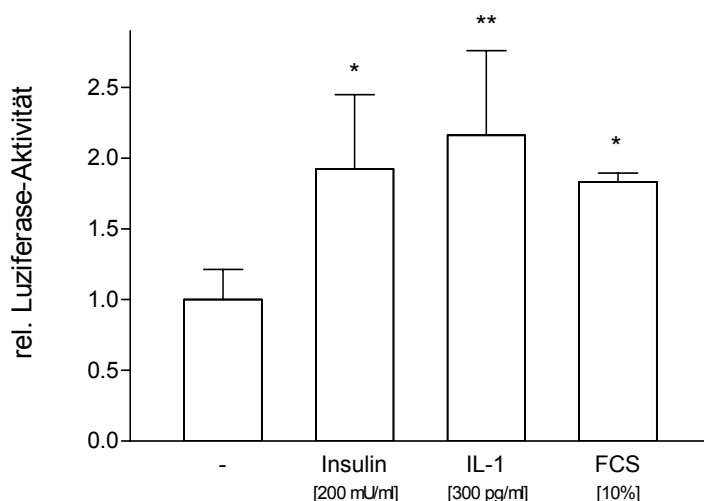


Abbildung 12: Insulin und IL-1 β steigern die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 in normoxisch kultivierten HRG1-Zellen

HRG1-Zellen mit stabil transfiziertem pH3SVL-Reporter-Gen wurden 20 h serumfrei präinkubiert und anschließend unter normoxischen Bedingungen für 24 h kultiviert und für die Versuchsdauer mit Insulin bzw. IL-1 β oder FCS in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nachfolgend wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus jeweils 4 Parallelkulturen. Alle Werte wurden auf die unbehandelte Kontrolle (-) normiert, die als 1 definiert wurde. Sternchen (*) markieren signifikante Differenzen der verschiedenen Behandlungen versus Kontrollbedingungen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Prozedur nach Dunnett).

Interessanterweise war bei Reexposition mit 10% FCS unter der Versuchsdauer der zuvor für 20 h serumverarmten Zellkulturen ebenfalls eine signifikante Luziferase-Aktivitätssteigerung um den Faktor 1,8 ($\pm 0,06$; $p \leq 0,01$) nachweisbar.

3.5 LY294002 reguliert die Akkumulation von Hypoxie-induziertem HIF-1 α

Die Hinweise auf eine Beteiligung der PI 3-K an der intrazellulären Signalvermittlung der beobachteten Insulin- und Zytokin-induzierten Akkumulation von HIF-1 α -Protein unter normoxischen Kulturbedingungen warfen die Frage auf, ob die PI 3-K-Kaskade generell an der Stabilisierung der O₂-sensiblen HIF-1 α -Untereinheit beteiligt ist. In weiteren Experimenten wurde daher der Einfluss der PI 3-K- und MAPK-Signalwege auf die hypoxische Stabilisierung von HIF-1 α untersucht.

Wie bereits beschrieben, führte eine 4-stündige Inkubation von HepG2-Zellen unter hypoxischen Kulturbedingungen (3% O₂) zum deutlichen Nachweis von HIF-1 α in der Western Blot Analyse (*Abb. 13A*). Die Gegenwart von 0,5% DMSO, welches als Lösungsmittel für die Inhibitorsubstanzen fungierte, zeigte keinen Einfluss auf die hypoxische Antwort der Zellen. Die Zugabe von LY294002 verringerte bereits bei einer Konzentration von 25 μ M die hypoxische Akkumulation von HIF-1 α . Mit zunehmender Dosis ließ sich die inhibitorische Wirkung von LY294002 verstärken und führte bei einer Konzentration von 100 μ M zur vollkommenen Blockade der hypoxischen Induktion (*Abb. 13A*). Dieser Effekt bestätigte sich in der Gel Shift Analyse von korrespondierenden Kernextrakten: In Korrelation zu dem abfallenden HIF-1 α -Proteingehalt unter LY294002-Behandlung verringerte sich auch die Bildung von HIF-1-TfHBS-Komplexen in der artifiziellen Bindungsreaktion bis zur Nachweisgrenze bei 100 μ M LY294002 (*Abb. 13B*).

Ähnlich der Wirkung in Insulin- oder Zytokin-stimulierten Zellkulturen (siehe 3.2.2 und 3.3.1) hatte der Einsatz von PD098059 einen weitaus geringeren Einfluss auf die hypoxische HIF-1 α -Akkumulation und das DNS-Bindungsverhalten des HIF-1-Komplexes. Festzustellen war eine stärkere Abschwächung der hochmolekularen Form von HIF-1 α im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle (DMSO) in der Western Blot Analyse, während die niedermolekulare Form weitgehend unbeeinträchtigt blieb (*Abb. 13A*). Die Bindung des HIF-1-Komplexes an spezifische DNS-

Bindungsstellen wurde durch PD098059 allenfalls geringfügig beeinflusst und zeigte keinerlei Dosisabhängigkeit, wenngleich die Auswirkungen der Substanz PD098059 aufgrund der nachgewiesenen Zytotoxizität in höheren Konzentrationen kritisch zu betrachten sind (*Abb. 13B*).

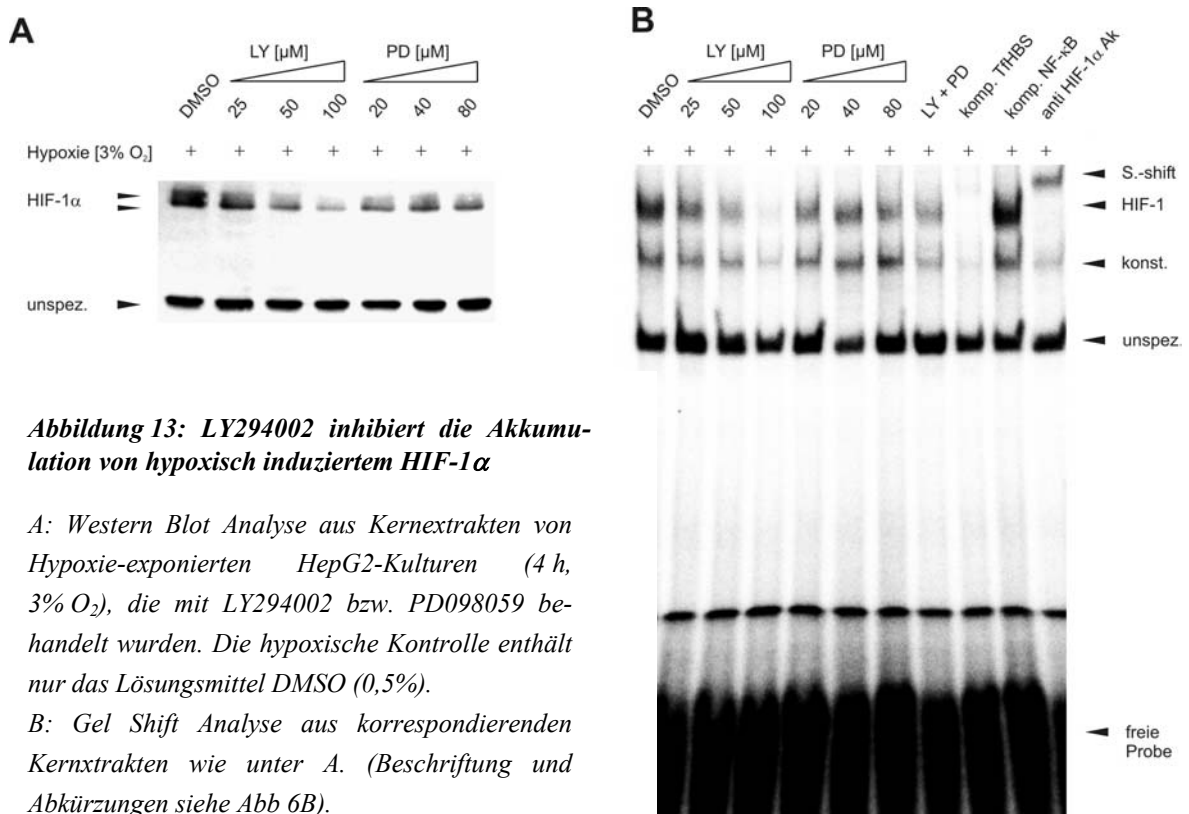


Abbildung 13: LY294002 inhibiert die Akkumulation von hypoxisch induziertem HIF-1 α

A: Western Blot Analyse aus Kernextrakten von Hypoxie-exponierten HepG2-Kulturen (4 h, 3% O₂), die mit LY294002 bzw. PD098059 behandelt wurden. Die hypoxische Kontrolle enthält nur das Lösungsmittel DMSO (0,5%).

B: Gel Shift Analyse aus korrespondierenden Kernextrakten wie unter A. (Beschriftung und Abkürzungen siehe Abb 6B).

3.5.1 LY294002 inhibiert die transkriptionelle Aktivität in hypoxischen HRG1-Zellen

Zusätzlich wurden Reporter-Experimente mit der Hypoxie-responsiblen Zelllinie HRG1 durchgeführt, um den Einfluss der Kinase-Inhibitoren auf die transkriptionelle Aktivität von hypoxisch induziertem HIF-1 zu untersuchen. Die 24-stündige Inkubation von HRG1-Zellkulturen unter hypoxischen Kulturbedingungen (*Abb. 14; H, schwarze Balken*) bewirkte eine ca. 18-fache Induktion der relativen Luziferase-Aktivität im Vergleich zu identisch behandelten normoxischen Kontrollkulturen

(Abb. 14; N, weißer Balken). Unter Wirken von LY294002 war die relative Luziferase-Aktivität hypoxischer Zellen auf 75% der hypoxischen Kontrollen bei 10 μM bzw. auf 25% bei 100 μM reduziert (Abb. 14).

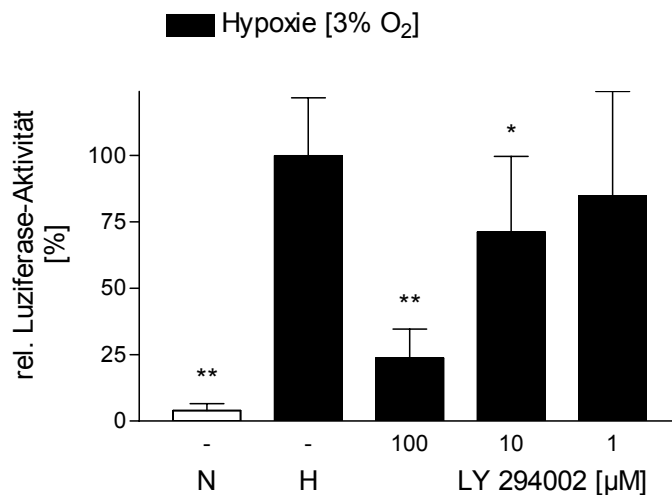


Abbildung 14: LY294002 inhibiert die Luziferase-Aktivität in hypoxisch kultivierten HRG1-Zellen

HRG1-Zellen mit stabil transfiziertem pH3SVL-Reporter gen wurden unter normoxischen (N; weißer Balken) und hypoxischen (H; schwarze Balken) Bedingungen für 24 h kultiviert und mit dem Kinase-Inhibitor LY294002 in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt.

Alle Werte wurden auf die hypoxische (H) Luziferase-Aktivität normiert, die als 100% definiert wurde. Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus $n=3$ unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 4 Parallelkulturen. Sternchen (*) markieren signifikante Differenzen versus die hypoxische Kontrolle (H; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; Prozedur nach Dunnett).

3.5.2 Effekte der Kinase-Inhibitoren LY294002 und PD098059 auf die Hypoxie-vermittelte Produktion von EPO und VEGF

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Kinase-Inhibitoren auf den Hypoxie-induzierten Anstieg von EPO sowie VEGF in HepG2-Zellen untersucht. In hypoxischen Kontrollkulturen („C“, Abb. 15) betrug die Produktion von EPO nach 24-stündiger Inkubation 86 mU/mg zellulärem Gesamtprotein (± 26) und die VEGF-Produktion 39,0 ng/mg zellulärem Protein ($\pm 2,0$). Wirkkonzentrationen des Inhibitors LY294002 von 50 μM blockierten fast vollständig die Produktion an EPO (3,0 mU/mg; ± 4), während bei gleicher Konzentration die VEGF-Bildung in geringerem Maße, jedoch signifikant auf 31,6 ng/mg Gesamtprotein ($\pm 1,6$) sank. Die

Behandlung der Zellkulturen mit 40 μ M PD098059 blieb ohne Auswirkung auf die 24 h-Produktionsrate von EPO (102 mU/mg; \pm 15), führte aber zu einer signifikanten Reduktion von VEGF auf 58% (22,8 ng/mg; \pm 0,5) des Proteingehaltes der unbehandelten Kontrollkulturen („C“; Abb. 15A und B).

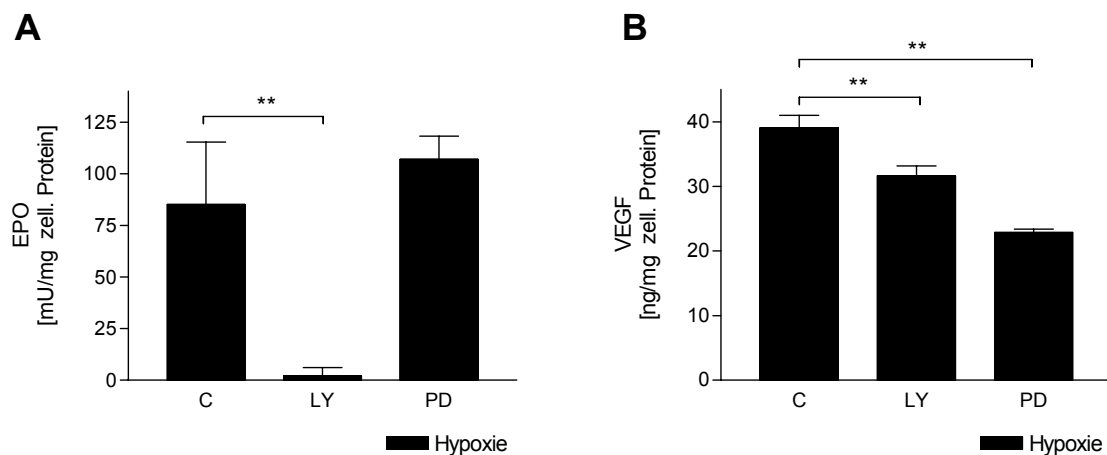


Abbildung 15: Einfluss der Kinase-Inhibitoren auf die hypoxisch gesteigerte Produktion von EPO und VEGF durch HepG2-Zellen

24 h-Produktionsrate von EPO und VEGF unter Einfluss von LY294002 (LY; 50 μ M) oder PD098059 (PD; 40 μ M) bzw. ohne Inhibitoren („C“). Die EPO- und VEGF-Produktion wurde auf die zelluläre Gesamtproteinkonzentration, als Maß für die Zelldichte der Parallelkulturen, bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Sternchen (*) markieren signifikante Differenzen (** $p < 0,01$; Prozedur nach Tukey und Kramer).

3.6 *In vitro* Expression konstitutiv aktiver Formen von PI 3-K und Akt

Die vorausgehend geschilderten Beobachtungen weisen auf eine wichtige Mittlerrolle der PI 3-Kinase in der Regulation von Stabilisierung wie auch der Aktivierung von HIF-1 hin. Unabhängig von der Wahl des induzierenden Stimulus ließen sich unter Blockade der PI 3-K mit der als spezifisch geltenden pharmakologischen Inhibitorsubstanz LY294002 die Akkumulation von HIF-1 α im Zellkern, die gesteigerte Bildung des HIF-1-TfHBS-Komplexes, HIF-1-Reporter-gen-Aktivierung wie auch die Expression des HIF-1-regulierten EPO-Gens aufheben bzw. dosisabhängig abschwächen. Um die Spezifität von LY294002 sowie den postulierten Zusammenhang von PI 3-K-Inhibition und Beeinträchtigung der HIF-1-Aktivierung im vorgestellten Zellkulturmodell zu untersuchen, wurden konstitutiv aktive und inaktive Formen von PI3-K und Akt transient in HepG2-Zellen exprimiert. Die Funktion der verschiedenen rekombinanten Formen beider Kinasen wurde bereits in Abschnitt 2.9 erläutert.

Erwartungsgemäß ließ sich eine basale Aktivierung von Akt in normoxisch kultivierten HepG2-Zellen nachweisen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert waren (pcDNA3; *Abb. 16A*). Es ist erwähnenswert, dass alle Versuche in Gegenwart von 10% FCS durchgeführt wurden, um den durch die Transfektion verursachten zellulären "Stress" zu minimieren. Dieser Umstand erklärt, dass auch unter Kontrollbedingungen eine Aktivierung von Akt in der Western Blot Analyse darstellbar war. Die konstitutive Expression der dominant aktiven PI 3-K (*myrPI 3-K*) für 24 h führte zu einer deutlichen Aktivierung von Akt, wie anhand der Akkumulation von phosphoryliertem Akt (p-Akt) in der Western Blot Analyse nachgewiesen werden konnte (siehe *Abb. 16A*). Im direkten Vergleich war der p-Akt Gehalt in Kontrollkulturen, die mit dem reinen Expressionsplasmid (pcDNA3) transfiziert wurden, merklich geringer. Die Gegenwart von 50 μ M LY294002 während der 24-stündigen Versuchsdauer blockierte die Phosphorylierung von Akt unter Kontrollbedingungen vollständig und reduzierte den Gehalt an p-Akt in *myrPI 3-K* transfizierten Zellen unter das Niveau der unbehandelten Kontrollkulturen. Hingegen bewirkte die transiente Expression von dominant positivem Akt (*myrAkt*) eine drastische Kumulation von phosphoryliertem Akt (p-Akt), wie auch der Gesamtgehalt an Akt (Akt; *Abb. 16A und B, untere Banden*) merklich gesteigert war.

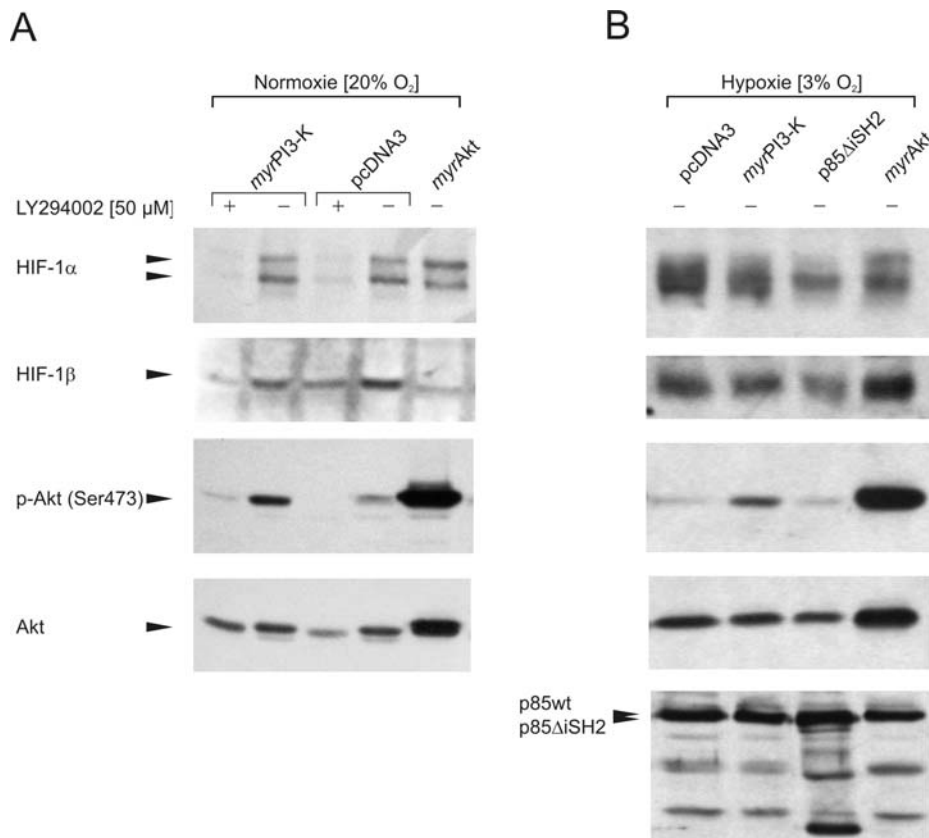


Abbildung 16: Einfluss konstitutiv aktiver sowie inaktiver Formen von PI 3-K und Akt auf den normoxischen und hypoxischen HIF-1α-Proteingehalt

Western Blot Analyse von transient transformierten HepG2-Zellkulturen. Konstitutiv aktive Formen von PI 3-K (*myrPI3-K*) und Akt (*myrAkt*) wurden für 24 h unter normoxischen (21% O₂) wie hypoxischen (3% O₂) Kulturbedingungen exprimiert. Ebenso wurden hypoxische Kulturen mit der dominant negativen Form der PI 3-K (*p85ΔiSH2*) transfiziert. Kontrollzellen erhielten identische DNS-Mengen des reinen Expressionsplasmids (*pcDNA3*). Parallelkulturen jeder Transfektion wurden für die Dauer des normoxischen Experiments mit 50 μM LY294002 behandelt.

Der monoklonale Antikörper p-Akt (Ser473) erkennt ausschließlich phosphoryliertes Akt, während die untere Abbildung den Gesamt-Akt-Gehalt der Proben wiedergibt. Die Expression von *p85ΔiSH2* wurde durch polyklonales Immuglobulin in der Western Blot Analyse nachgewiesen, welches auch den Wildtyp der Kinasen-Untereinheit erkennt (*p85wt*). Aufgrund der Deletion von 36 AS migriert die *ΔiSH2*-Form der Kinase geringfügig schneller als *p85wt*. Die HIF-1α/β-Expression identischer Blotting-Membranen ist ebenfalls dargestellt.

Parallel zur Analyse der funktionellen Aktivität der eingesetzten Expressionskonstrukte wurden die Auswirkungen der Überexpression dominant positiver Kinaseformen auf den HIF-1α/β-Gehalt in HepG2-Zellen untersucht. Die konstitutive Aktivierung des PI 3-K-/Akt-Signalweges durch *myrPI 3-K*- bzw. *myrAkt*-Überexpression hatte unter den vorliegenden Transfektionsbedingungen keinen Einfluss auf die Akkumulation von HIF-1α unter normoxischen

Bedingungen (*Abb. 16A, obere Banden*). Auch unter hypoxischer Stimulation war im Vergleich zu hypoxischen Kontrollkulturen (pcDNA3) keine zusätzliche Anreicherung von HIF-1 α -Protein durch Aktivierung des PI 3-K-/Akt-Pfades nachweisbar (*Abb. 16B, obere Banden*).

Wie in den vorangehend beschriebenen Experimenten war LY294002 (50 μ M) auch in transient transformierten Zellkulturen ein potenter Inhibitor der HIF-1 α -Akkumulation. Unter normoxischen Kulturbedingungen wurde bei PI 3-K-Inhibition der HIF-1 α -Proteingehalt unter die Nachweisbarkeitsgrenze der Western Blot Analyse reduziert (*Abb. 16A*). Ebenso verringerte die gesteigerte Expression einer dominant negativen Form der PI 3-K (p85 Δ iSH2) den HIF-1 α -Proteingehalt in hypoxischen HepG2-Zellen (*Abb. 16B, obere Banden*). Interessanterweise zeigte die Detektion von HIF-1 β in der Western Analyse identischer Blotting-Membranen ebenfalls eine deutliche Signalabschwächung unter Einfluss des PI 3-K-Inhibitors.

3.6.1 Die konstitutive Aktivierung des PI 3-K-/Akt-Signalweges steigert die Transkription eines HIF-1-regulierten Reportergens

Abschließend wurde der Einfluss dominant positiver Kinaseformen von PI 3-K auf die transkriptionelle Aktivität des HIF-1-Komplexes anhand von Reporterstudien untersucht. Hierzu wurden HepG2-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden, einem Hypoxie-responsiblen Reporter, sowie *Renilla*-Luziferase transient kotransfiziert und die Luziferase-Aktivität der Zell-Lysate nach 24-stündiger Inkubation bestimmt. Die Expression von *myr*PI 3-K unter normoxischen Bedingungen führte zu einer 1,9-fachen ($\pm 0,07$; Mittelwert aus 3 Parallelkulturen; \pm SD) Steigerung der relativen Luziferase-Aktivität. Dieser Effekt ließ sich durch Inkubation mit 50 μ M LY294002 vollständig aufheben (0,61; $\pm 0,07$; *Abb. 17A*).

In gleicher Weise wurden hypoxisch stimulierte Zellkulturen untersucht. Die Inkubation bei 3% O₂ führte zu einer 11-fachen Induktion des HIF-1-regulierten Reportergens (*Abb. 17B*). Hingegen hatte die Expression von *myr*PI 3-K keinen relevanten Einfluss auf die hypoxische Aktivität des Reportergens. Eine

gleichzeitige Blockade der PI 3-K mit LY294002 reduzierte jedoch die Transkription des Reportergens auf rund 50% des hypoxischen Kontrollwertes.

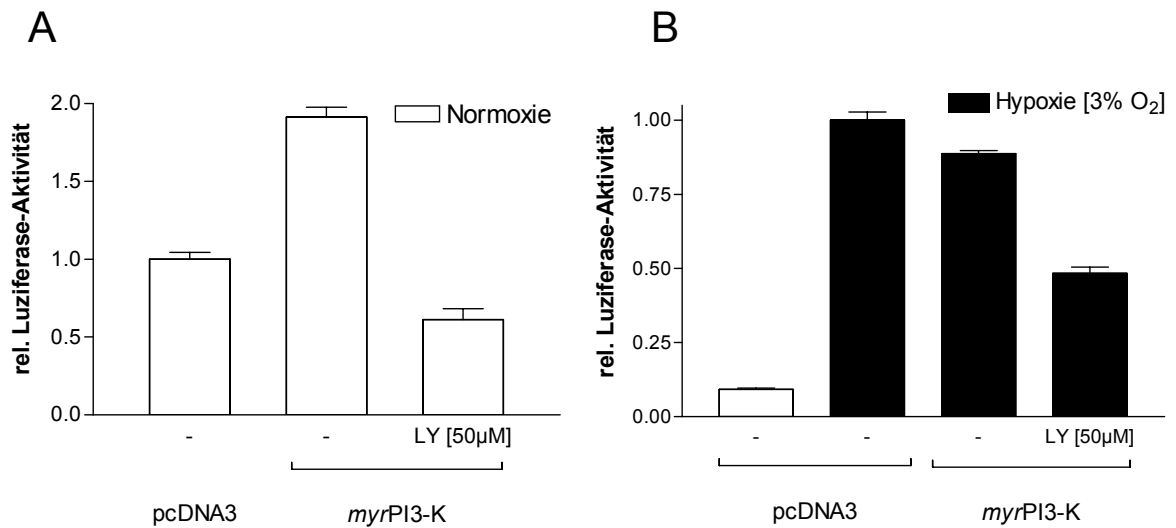


Abbildung 17: Einfluss von dominant-positiver PI 3-K auf die transkriptionelle Aktivität von HIF-1

HepG2-Zellen wurden mit pRL-SV40, pH3SVL und entweder myrPI 3-K oder dem reinen Expressionsvektor (pcDNA3) transient kotransfiziert. Zellkulturen wurden unter normoxischen (A, weiße Balken) und hypoxischen Bedingungen (B, schwarze Balken) für 24 h kultiviert bzw. mit dem Kinase-Inhibitor LY294002 in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die relative Luciferase-Aktivität der Zell-Lysate wurde anhand des Dualen Luciferaseassays bestimmt.

Alle Messwerte entsprechen dem Verhältnis von „firefly“/Renilla Luciferase-Aktivität der einzelnen Proben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Mittelwerten + SD aus 3 Parallelkulturen. 2 weitere unabhängige Experimente zeigten ähnliche Ergebnisse.

3.7 MAPKs beeinflussen die hypoxische Aktivierung eines HIF-1-regulierten Reportergens

In deutlichem Kontrast zu den geringfügigen Auswirkungen der MEK1/2-Inhibitoren auf den Gehalt an hypoxisch induziertem HIF-1 α sowie die Bildung von HIF-1-DNS-Komplexen, zeigten Reporter-Gen-Analysen von hypoxischen HRG1 unter Inkubation mit U0126 eine signifikante Abnahme der relativen Luciferase-Aktivität. Wirkkonzentrationen von 0,01 μ M und 0,1 μ M reduzierten die relative Luciferase-Aktivität auf 73% der hypoxischen Kontrollkulturen ohne Inhibitor (Abb. 18B). Konzentrationen des Inhibitors von bis zu 0,1 μ M hatten im 24-stündigen MTT-Test keinerlei zytotoxische Wirkung auf die Zellkulturen. Die deutliche

Abnahme der relativen Luziferase-Aktivität hypoxischer HRG1-Zellen in Gegenwart von U0126 mit Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ korreliert mit einer Zunahme der Zytotoxizität der Substanz in entsprechenden Konzentrationen (siehe auch 3.2.1).

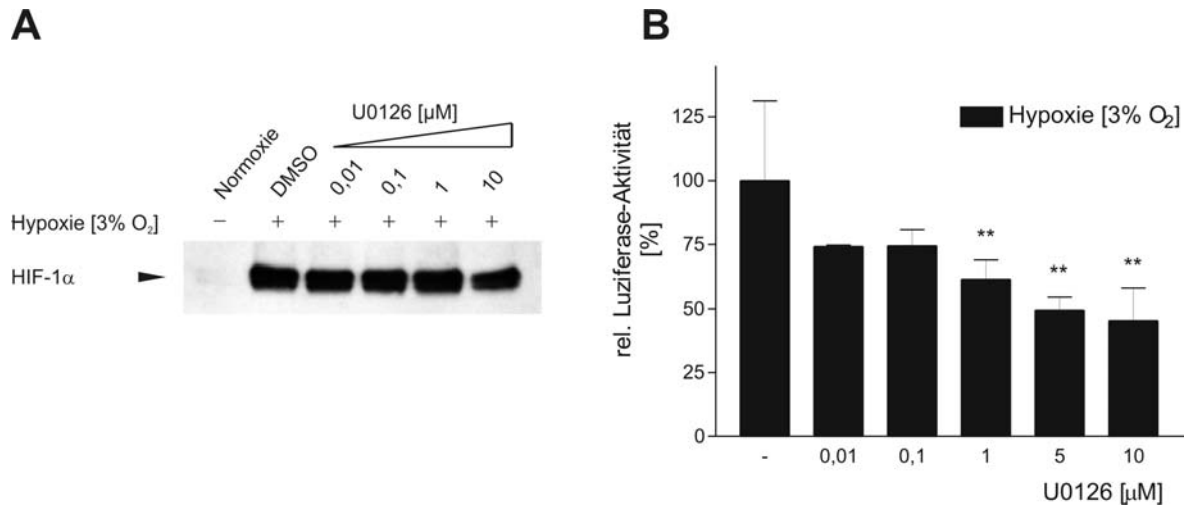


Abbildung 18: U0126 inhibiert die Luziferase-Aktivität in hypoxisch kultivierten HRG1-Zellen, nicht aber die HIF-1 α -Akkumulation im Zellkern

A: Western Blot Analyse aus Kernextrakten hypoxischer HepG2-Zellkulturen in Gegenwart von U0126 oder ohne Inhibitor (DMSO). Zusätzlich ist eine normoxische Kontrolle abgebildet. B: Reporteragen-Analyse von hypoxischen HRG1-Zellkulturen, in den angegebenen Konzentrationen mit U0126 behandelt oder ohne Inhibitor. Kulturbedingungen und Normierung entsprechen den Angaben unter Abb. 12.

Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Parallelkulturen. Sternchen () markieren signifikante Differenzen versus die hypoxische Kontrolle (** $p < 0,05$; Prozedur nach Dunnett).*

3.7.1 HIF-1 α ist direktes Substrat der p42/44 MAPK

Die hier beschriebene deutliche Abnahme der Expression eines HIF-1-abhängigen Reportergens unter Inhibition des MAPK-Signalweges bei gleichzeitig unverändertem zellulären Gehalt an HIF-1 α waren Anlass zur Studie der unmittelbaren Interaktion von MAPK und HIF-1 α . Die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 wird durch zwei Transaktivierungsdomänen im C-terminalen Abschnitt der HIF-1 α Untereinheit vermittelt, die als „N-terminale Transaktivierungsdomäne“ (N-TAD, AS 531-575) bzw. „C-terminale Transaktivierungsdomäne“ (C-TAD, AS 757-826) bezeichnet werden (siehe auch 1.1.2.2).

GST-Fusionsproteine der isolierten N-TAD oder C-TAD, sowie ein Proteinkonstrukt, welches beide TADs beinhaltet (AS 531-826), wurden als potentielle Substrate bei *in vitro* p42/44 MAPK Phosphorylierungsstudien eingesetzt. Als Positivkontrolle des Systems diente gereinigtes Myelin-Bindungsprotein (MBP), das in früheren Publikationen als gutes Substrat der p42/44 MAPK beschrieben wurde (Pei, 2000).

Während aufgereinigtes GST-Protein unter den *in vitro* Versuchsbedingungen nicht durch p42/44 MAPK phosphoryliert wurde, fungierten sowohl H.530-652 wie auch H.530-826 als gute Substrate der MAPK und wurden unmittelbar phosphoryliert. Im Gegensatz hierzu blieb das der HIF-1 α -C-TAD entsprechende Proteinkonstrukt (H.757-826) durch die aktivierte p42/44 MAPK unmodifiziert (Abb. 19B).

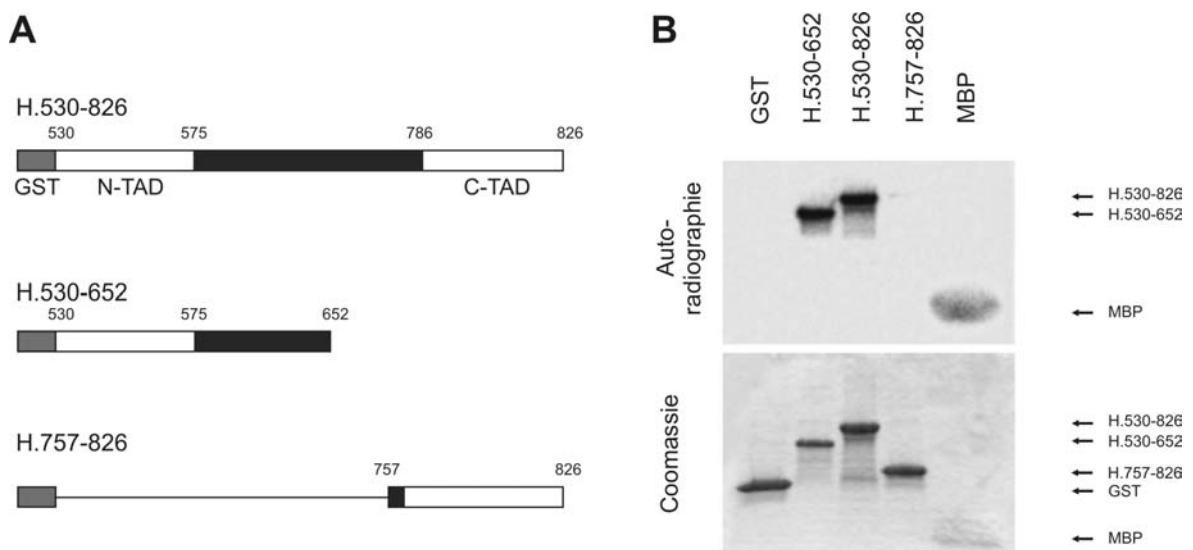


Abbildung 19: In vitro MAPK Phosphorylierungsstudien von HIF-1 α

A: Schematische Übersicht der chimären Fusionsproteine von HIF-1 α . Abkürzungen: GST, Glutathion-S-Transferase Markierung; N-TAD, N-terminale Transaktivierungsdomäne; C-TAD, C-terminale Transaktivierungsdomäne. Die Zahlen oberhalb der Schemata bezeichnen die begrenzenden Aminosäuren der einzelnen Abschnitte.

B: HIF-1 α -Fusionsproteine wurden *in vitro* mit aktivierter p42/44 MAPK und [γ - 32 P]-ATP inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE massenabhängig aufgetrennt und der Phosphorylierungsstatus autoradiographisch ausgewertet (obere Abbildung). Die untere Abbildung stellt die eingesetzten Proteinmengen der jeweiligen Proben nach Coomassie-Färbung dar. GST und MBP fungierten als Negativ- bzw. Positivkontrollen.

4 Diskussion

4.1 Normoxische Aktivatoren von HIF-1 erweitern das Spektrum des Transkriptionsfaktors

Die herausragende Bedeutung der HIFs liegt zweifelsohne in der direkten Rezeption des zellulären O₂-Gehaltes und einer konsequenten Steuerung von vitalen Anpassungsvorgängen, die der Einzelzelle erlauben, auch widrigen Wachstumsbedingungen unbeschadet zu trotzen. Die Nutzung aller stoffwechselmechanistischen Ressourcen folgt hierbei einem hierarchischen Prinzip, in dem die Wahrung der zellulären Integrität hohe Priorität besitzt: Die energetische Effizienz metabolischer Prozesse ist daher der Reichhaltigkeit der Umweltbedingungen untergeordnet. Das Spektrum dieses O₂-abhängigen, HIF-regulierten zellulären Anpassungsprogramms umfasst neben der „Existenzsicherung“ der Einzelzelle aber auch Vorgänge, die eine Leistungssteigerung der aktiven Versorgungssysteme des Gesamtorganismus bewirken und somit längerfristig zu einer Normalisierung des Zellstoffwechsels beitragen (siehe hierzu auch Abschnitte 1.1.1 und 1.1.2 ff). Die bedarfsorientierte Bildung neuer Gefäße ist hierbei ein wichtiger Bestandteil der suffizienten Nährstoff- und Substratversorgung und wird maßgeblich durch den angiogenetischen Wachstumsfaktor VEGF reguliert. Gewebshypoxie stellt wohl den bestuntersuchten Stimulus zur Ausschüttung von VEGF dar und die molekulare Verknüpfung zu den O₂-rezeptierenden HIFs konnte frühzeitig experimentell nachgewiesen werden (Levy *et al.*, 1995; Forsythe *et al.*, 1996).

Neben der hypoxischen Regulation wurde interessanterweise in verschiedensten Geweben auch eine Zytokin- und Wachstumsfaktor-induzierte Expression von VEGF beschrieben. Unter Stimulation mit IL-1 α/β zeigten Synovial-Fibroblasten rheumatisch arthritischer Patienten eine gesteigerte VEGF-Sekretion, was die Autoren eine wichtige Beteiligung des Zytokins an der entzündungsvermittelten Angiogenese vermuten ließ (Ben-Av *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1997; Paleolog *et al.*, 1998). Frühere Befunde aus dem eigenen Institut bestätigten diesen Effekt an proximalen Tubulusepithelzellen der Niere und wiesen eine direkte Aktivierung von HIF-1 durch IL-1 β nach (Hellwig-Bürgel *et al.*, 1999; El Awad *et al.*, 2000).

Eine ähnliche Wirkung auf die Expression von VEGF wurde auch in Insulin-stimulierten bzw. mit dem Homolog IGF-1 behandelten Zellkulturen beobachtet. Yamagishi *et al.* beschrieben einen autokrinen Mechanismus der Gefäßproliferation *via* VEGF in Insulin-behandelten mikrovaskulären Endothelzellen (Yamagishi *et al.*, 1999). In vergleichbaren Studien an endometrialen Adenokarzinomzellen induzierten sowohl Insulin als auch IGF-1 die VEGF Sekretion und wirkten stabilisierend auf die transkribierte mRNA (Bermont *et al.*, 2000; Bermont *et al.*, 2001). Weitere Studien zeigten, dass auch Insulin und IGF-1 als potente Aktivatoren von HIF-1 fungieren und die normoxisch induzierte VEGF Sekretion der transkriptionellen Aktivität HIFs bedarf (Zelzer *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur hypoxischen Regulation der VEGF-Expression ist der Mechanismus dieser normoxischen, Wachstumsfaktor-vermittelten Aktivierung von HIF-1 und konsekutiven Produktion von VEGF weitgehend ungeklärt.

4.2 Kontrolliert ein genereller Mechanismus die normoxische Aktivierung von HIF-1 durch extrazelluläre Mediatoren?

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass sowohl Insulin als auch IL-1 β unter normoxischen Bedingungen die nukleäre Akkumulation der regulatorischen Untereinheit von HIF-1 induzieren. Beide Stimuli vermittelten diese Wirkung in dem von uns verwandten Zellmodell, der humanen Hepatoma-Zell-Linie HepG2, in dosisabhängiger Weise. Insulin- bzw. IL-1 β -induziertes HIF-1 war auch unter normoxischen Kulturbedingungen in der Lage, an HIF-1-spezifische DNS-Oligonukleotide zu binden, wie anhand von EMSA Untersuchungen nachgewiesen werden konnte. Ob die verstärkte Bildung von HIF-1-DNS-Komplexen allein in der Akkumulation von HIF-1 α in Zellkernen von Insulin- oder IL-1 β -stimulierten Zellen begründet ist, oder aber durch die Stimuli zusätzlich das DNS-Bindungsverhalten des HIF-1-Komplexes verstärkt wird, lässt sich anhand dieser Experimente nicht differenzieren.

In einer Serie von funktionellen Untersuchungen konnte hier demonstriert werden, dass Wachstumsfaktor-induziertes, normoxisches HIF-1 auch transkriptionell aktiv ist: Die VEGF-Sekretion von Insulin-behandelten HepG2-Kulturen stieg proportional zur zuvor beobachteten Akkumulation von HIF-1 α -Protein an. In einer früheren Publikation konnte gezeigt werden, dass Insulin den Gehalt an VEGF

mRNS in embryonalen Fibroblasten sowie Endothelzellen aus der chorio-allantoiden Membran vom Huhn steigerte (Jiang *et al.*, 2000). Die hier vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass der von Jiang *et al.* beobachtete Anstieg von VEGF mRNS, wie auch die Ergebnisse der einführend beschriebenen Studien, direkte Folge einer Insulin-vermittelten HIF-1-Aktivierung sind. Interessanterweise blieb die Sekretion von EPO während der 6-stündigen Stimulation durch Insulin unbeeinflusst. Die fehlende Induzierbarkeit von EPO durch Insulin in den hier eingesetzten Konzentrationen entspricht den Ergebnissen früherer Studien an HepG2-Zellen (Scholz *et al.*, 1992). Ein aktiver HIF-1-Komplex in Leber-Zell-Linien scheint notwendig, jedoch keinesfalls hinreichend für die suffiziente Induktion des Transkriptionsprozesses des EPO-Gens unter normoxischen Bedingungen zu sein. Diese Vermutung wird zusätzlich gestützt durch Beobachtungen von Hellwig *et al.*, die von einer O₂-abhängigen, differenzierten Aktivierbarkeit von Teilen des EPO-Enhancers durch IL-1 β berichteten (Hellwig-Bürgel *et al.*, 1999). Die Autoren konnten in IL-1 β -stimulierten, normoxischen HepG2 bei Verwendung eines Luziferasekonstruktes unter Transkriptionskontrolle von drei HREs aus dem EPO-Enhancer in 5'-Position eines SV 40 Promotors keinerlei Steigerung der Reporter-gen-Aktivität verzeichnen. Das identische Konstrukt war jedoch durch hypoxische Kulturbedingungen dreifach induzierbar, und die zusätzliche Behandlung mit IL-1 β steigerte die Reporter-gen-Aktivität um weitere 30%.

Die im Rahmen der vorliegenden Studie beschriebenen Reporter-gen-Untersuchungen zur Induktion von HIF-1 durch normoxische Aktivatoren wurden an HRG1-Zellen, die ein stabil transfiziertes Reporterkonstrukt mit Anteilen aus dem Transferrinpromotor exprimieren, durchgeführt (siehe auch 2.8). In diesen Experimenten waren sowohl Insulin als auch IL-1 β in der Lage, unter normoxischen Kulturbedingungen ein HIF-1-reguliertes Reporter-gen zu aktivieren. Es ist erwähnenswert, dass der Grad der normoxischen Aktivierung vergleichsweise zu den hypoxischen Induktionswerten geringer ausgeprägt war. Unter Berücksichtigung der in dieser Studie erzielten Resultate und den vorangehend beschriebenen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ist anzunehmen, dass die Expression gemeinsamer Zielgene durch Hypoxie, Insulin und IL-1 β maßgeblich auf einer unterschiedlich ausgeprägten Aktivierung des „Hauptregulators“ HIF-1 beruht. Offensichtlich werden aber zusätzlich stimullusspezifische Kofaktoren

induziert oder aktiviert, die der Promotorsequenz der einzelnen Zielgene entsprechend mit HIF-1 kooperieren und den Grad der Genexpression beeinflussen. Bemerkenswerterweise führte auch die Stimulation von serumverarmten Zellkulturen mit FCS zu einer signifikanten Aktivierung des HIF-1-responsiblen Reportergens in HRG1. Im Ausmaß war dieser Serum-induzierte Effekt vergleichbar zu den beiden oben beschriebenen Stimuli. Diese Beobachtung bestätigt die von Richard *et al.* sowie Zhong *et al.* vorgestellten Ergebnisse der Induzierbarkeit von HIF-1 α durch FCS in serumverarmten Gefäßmuskulaturzellen ("*vascular smooth muscle cells*"; VSMC) bzw. verschiedenen Zell-Linien aus humanen Prostatakarzinomen (Richard *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000). Die Vermutung liegt nahe, dass Bestandteile des FCS, welches neben Insulin auch eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren enthält, einen Einfluss auf die normoxische Aktivierung von HIF-1 ausüben. Mit Blick auf die wachsende Gruppe von Peptidmediatoren, die in unterschiedlichsten Geweben den normoxischen Gehalt an HIF-1 α stimulieren (siehe auch *Tabelle 1*) wird wahrscheinlicher, dass ein grundlegender Regulationsmechanismus bzw. eine „gemeinsame Endstrecke“ die Signalwirkung der Substanzen mit HIF-1 α verknüpft.

4.2.1 PI 3-K und HIF-1

Die Aktivierung der intrazellulären Signalvermittler PI 3-K und MAPK erfolgt frühzeitig nach der Bindung von Insulin bzw. IL-1 β an den jeweilig spezifischen Membranrezeptortyp. Frühere Studien zeigten eine direkte Beteiligung beider Signalkaskaden an der Effektor-vermittelten Regulation der zellulären Genexpression (siehe 1.2.2.1). Die Verwendung von selektiv wirkenden Inhibitor-substanzen rezeptornaher Komponenten beider Signalwege ermöglichte es, exemplarisch die Beteiligung von PI 3-K und MAPK an der normoxischen wie auch hypoxischen Aktivierung von HIF-1 zu untersuchen.

Tatsächlich unterdrückte die pharmakologische Blockade der PI 3-K die normoxische Aktivierung von HIF-1 unabhängig von den in dieser Arbeit eingesetzten Stimuli vollständig. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass LY294002 eine dosisabhängige Reduktion der regulatorischen α -Untereinheit HIFs bewirkte und zu einer verminderten Bildung des transkriptionell aktiven HIF-1-Komplexes

führte. Es ist bemerkenswert, dass der bei Einsatz von 100 μ M LY294002 bestimmte Gehalt an HIF-1 α reproduzierbar unterhalb der in normoxischen Kulturen nachweisbaren, basalen Proteinexpression des Transkriptionsfaktors lag. In Experimenten unter Verwendung genetisch modifizierter Kinasesubtypen von PI 3-K und der nachfolgend wirkenden Kinase Akt konnten die pharmakologischen Anhaltspunkte für eine Mittlerrolle der PI 3-K in der normoxischen Aktivierung HIFs weiter untermauert werden. Kotransfektion von konstitutiv aktiver PI 3-K induzierte ein HIF-1-reguliertes Reporterogen in vergleichbarem Maße wie die zuvor beobachtete Aktivierung des identischen Reportergens durch Insulin und IL-1 β . In Gegenwart von LY294002 ließ sich dieser Effekt vollständig unterdrücken. Zwar war die unter Normoxie im Western Blot beobachtete Akkumulation von HIF-1 α durch konstitutive Aktivierung von PI 3-K und Akt nicht weiter induzierbar – es zeigte sich jedoch eine deutliche Abnahme des HIF-1 α -Gehaltes in Gegenwart von LY294002 bei gleichsinnig reduzierter Aktivität von Akt. Der Gehalt an HIF-1 α war unter normoxischen Kontrollbedingungen in unserem Versuchssystem ungewöhnlich hoch und korrelierte mit einer deutlichen Aktivierung von Akt, was eine mögliche Erklärung für die fehlende zusätzliche Stimulation des HIF-1 α -Gehaltes durch die konstitutiven Kinasen ist. Die hier geschilderten Beobachtungen stehen im Einklang mit anderen Studien. In humanen Prostatakarzinomzellen (DU145, PC-3) aktivierte dominant positives Akt wie auch eine funktionell inaktive PTEN-Mutation ebenfalls ein HIF-induzierbares Reporterogen unter normoxischen Kulturbedingungen, während die Überexpression von dominant negativer PI 3-K bzw. PTEN vom Wildtyp inhibitorisch wirkten (Zhong *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001a). Eine kürzlich erschienene Arbeit bestätigte diesen Effekt an menschlichen Pigmentepithelzellen der Retina (ARPE-19) (Treins *et al.*, 2002).

Unerwartet war die entsprechend dem Aktivierungsstatus von Akt modulierte Expression der sonst als konstitutiv beschriebenen β -Untereinheit HIFs. Dieser Befund korrespondiert jedoch mit Untersuchungen an menschlichen Prostatakarzinom-Zell-Linien (Zhong *et al.*, 2001). Eine weitere Studie demonstrierte, dass in hepatischem Gewebe die Expression von HIF-1 β kongruent zum Gehalt der α -Untereinheit reguliert ist und somit möglicherweise weniger der Phosphorylierungsstatus von Akt, sondern die Akkumulation von HIF-1 α entscheidenden Einfluss auf die HIF-1 β Expression ausübt (Stroka *et al.*, 2001).

4.3 Hypoxisch induziertes HIF-1: Ist die PI 3-K an der Stabilisierung beteiligt?

Bereits in frühen Studien nach der Klonierung von HIF-1 mehrten sich Anhaltspunkte, dass Phosphorylierungsreaktionen einen regulierenden Einfluss auf die hypoxisch aktivierbaren, intrazellulären Signalwege ausüben könnten. So beeinträchtigten relativ unspezifische Hemmstoffe von Serin-/Threonin-Kinasen bzw. -Phosphatasen die Proteinsynthese wie auch das DNS-Bindungsverhalten von HIF-1 α/β (Wang *et al.*, 1995b). Die Autorengruppe um Semenza demonstrierte weiter, dass Genistein, ein Inhibitor von Tyrosinkinasen, die hypoxische Expression von HIF-1 α/β vollständig blockierte. Eine Vielzahl der membran-gebundenen Rezeptoren vermitteln die extrazelluläre Stimulation durch ihre Liganden über intrinsische Tyrosinkinaseaktivität der zytoplasmatischen Rezeptordomänen. Die Beobachtungen von Wang *et al.* boten somit erstmalig Anhaltspunkte für eine fundamentale Rolle von extrazellulären Mediatoren auch in der Regulation des hypoxischen Anpassungsprogramms. Dennoch blieb die Aussagekraft dieser Befunde aufgrund der geringen Spezifität der eingesetzten Hemmstoffe schwer fassbar.

Die Hinweise auf eine regulatorische Funktion zellulärer Kinasen bezüglich der HIF-1-Aktivierung wurden durch Studien, die von einer Modulation der HIF-1-vermittelten Genexpression durch Onkogene und Tumorsuppressoren berichteten, weiter verdichtet: So bewirkte die Transfektion von Zellkulturen mit dem viralen Onkogen *v-Ha-ras* eine merkliche Steigerung des Gehaltes an HIF-1 α -Protein in einem PI 3-K-abhängigen Mechanismus und induzierte HIF-1-Zielgene unter normoxischen wie auch hypoxischen Kulturbedingungen (Grugel *et al.*, 1995; Arbiser *et al.*, 1997; Mazure *et al.*, 1997). In ähnlicher Weise verstärkte auch die Expression von *v-src* die Akkumulation von HIF-1 α ungeachtet des zellulären O₂-Gehaltes (Jiang *et al.*, 1997a). Eine weitere Arbeit berichtete von gesteigerter Aktivierung der HIF-1-regulierten Gentranskription in Glioblastom-Zellen, die eine Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN aufwiesen (Mazure *et al.*, 1997). Alle hier genannten Kinasen und Phosphatasen steht in unmittelbarer Verbindung mit dem intrazellulären Signaltransduktions-Netzwerk und aktivieren bzw. hemmen unter anderem Einheiten der PI 3-K- und MAPK-Kaskaden.

In dieser Arbeit durchgeführte Experimente zeigten, dass unter pharmakologischer Blockade der PI 3-K auch die hypoxische Akkumulation von HIF-1 α dramatisch

reduziert war. In dosisabhängiger Manier blockierte LY294002 des Weiteren die Bildung des HIF-1-spezifischen DNS-Komplexes in EMSA Untersuchungen und unterdrückte wirkungsvoll die Aktivierung des Hypoxie-regulierten Reportergens in HRG1-Zellen. Kontrovers blieben dagegen die Resultate aus Experimenten mit einer aktivierten Form der PI 3-K. Transiente Koexpression von *myrPI 3-K* mit pH3SVL zeigte keinerlei Steigerung der Reporteraktivität unter hypoxischen Kulturbedingungen, während die zusätzliche Behandlung mit LY294002 die in HRG1-Zellen beobachtete Reporterrepression bestätigte. Interessanterweise zeigte die Western Blot Analyse transient transformierter HepG2 unter hypoxischen Kontrollbedingungen mit nur geringfügiger Aktivierung von Akt eine ebenso deutliche Akkumulation von HIF-1 α wie Kulturen, die *myrPI 3-K* exprimierten und einen entsprechend hohen Gehalt an phosphoryliertem Akt aufwiesen. Zwei zeitgleich veröffentlichte Studien schlossen aufgrund ähnlicher Beobachtungen eine Beteiligung von PI 3-K und Akt an der hypoxischen Aktivierung HIFs aus (Alvarez-Tejado *et al.*, 2002; Arsham *et al.*, 2002). Die experimentellen Untersuchungen beider Arbeiten basieren jedoch ausschließlich auf der Verwendung von dominant positiven Konstrukten von PI 3-K und Akt, die in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen keinen Einfluss auf die hypoxische HIF-1-Regulation zeigten. Die in dieser Arbeit durchgeführte forcierte Expression einer dominant negativen Form der PI 3-K bewirkte jedoch eine deutliche Abnahme der HIF-1 α -Akkumulation in hypoxischen HepG2-Kulturen. Zahlreiche Untersuchungen mit dominant negativen Formen des PI 3-K/AKT-Pfades bestätigten ebenfalls den HIF-inhibitorischen Effekt von LY294002 auf molekularer Ebene (Mazure *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001a; Laughner *et al.*, 2001). Es erscheint vorstellbar, dass die in Gegenwart von Serum basale Aktivierung des PI 3-K-Signalweges bereits vollständig das Regulationsintervall der Rezeptor- bzw. Kinasen-vermittelten HIF-1 α -Expression ausschöpft. Unter serumhaltigen Kulturbedingungen wäre folglich auch bei Überexpression von PI 3-K und Akt keine weitere Steigerung des Gehalts an HIF-1 α zu erreichen.

Wie bereits beschrieben, wurden die hier vorgestellten Expressionsexperimente aufgrund der Transfektionstechnik in Gegenwart von Serum durchgeführt, während die Induktion von HIF-1 α durch Insulin unter serumverarmten Kulturbedingungen beobachtet wurde. Soweit den Angaben der oben genannten

Arbeiten von Alvarez-Tejado *et al.* bzw. Arsham *et al.* zu entnehmen ist, wurden auch diese Studien in Gegenwart von Serum durchgeführt. Interessanterweise demonstrierten Treins *et al.* eine durch dominant positives Akt induzierte, deutliche Akkumulation von HIF-1 α -Protein in ARPE-19-Zellen, die vor dem Beobachtungsintervall unter serumverarmten Bedingungen kultiviert worden waren (Treins *et al.*, 2002). Die hier diskutierten Befunde sind aufgrund unterschiedlicher experimenteller Bedingungen folglich nicht zwangsläufig widersprüchlich. Die überzeugenden Daten unter Expression von dominant negativen Formen von PI 3-K und Akt machen eine Beteiligung der Kinasen auch an der Regulation von hypoxisch induziertem HIF-1 α wahrscheinlich, wenngleich ihr Einfluss den Vorgang der O₂-Rezeption nicht oder nur untergeordnet zu beeinträchtigen scheint.

4.4 Reguliert die PI 3-K die Expression von EPO?

Mit Blick auf die Expression des HIF-1-Zielgens EPO zeigte die Inhibitorsubstanz LY294002 einen bemerkenswerten Effekt: Die vorliegende Studie demonstrierte erstmalig, dass in Gegenwart von LY294002 sowohl die basale Produktion von EPO unter normoxischer Kultivierung wie auch die hypoxische Induzierbarkeit des Zytokins vollständig blockiert wurde. Interessanterweise hatten identische Konzentrationen des PI 3-K Inhibitors nur geringfügige Auswirkungen auf die zelluläre Produktion von VEGF. Dieser Befund legt nahe, dass neben der erniedrigten Akkumulation von HIF-1 α in Gegenwart von LY294002 weitere essentielle Faktoren der EPO-Genexpression beeinflusst werden. Im Einklang mit dieser Hypothese beschreibt eine neuere Studie auch für die humane Hepatoma-Zell-Linie Hep3B die Repression des EPO-Gens durch LY294002 (Figueroa *et al.*, 2002). Weiterführende Experimente der Autoren wiesen eine PI 3-K-vermittelte Aktivierung der hypoxischen EPO-Expression durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B nach. Schon seit längerem ist bekannt, dass die Aktivität von NF- κ B direkt durch Kinasen des PI 3-K-/Akt-Signalwegs reguliert wird (Ozes *et al.*, 1999; Romashkova und Makarov, 1999). So ist vorstellbar, dass die hier beschriebene Inhibition der EPO-Synthese durch LY294002 die Folge des Zusammenwirkens inhibierender Einflüsse auf HIF-1 α sowie NF- κ B darstellt. Es ist jedoch anzumerken, dass die Rolle von NF- κ B bezüglich der Transkriptionskontrolle des

EPO-Gens gegenwärtig kontrovers diskutiert wird. Während die oben zitierte Autorengruppe um Figueroa einen aktivierenden Einfluss des Transkriptionsfaktors auf die EPO-Synthese postuliert, wurde in Arbeiten aus dem eigenen Institut die Expression von EPO in Abhängigkeit von NF- κ B gehemmt (La Ferla *et al.*, 2002). Obwohl beide Studien in Zell-Linien aus hepatozellulären Tumoren durchgeführt wurden, bleibt zu prüfen, ob es sich bei den gegensätzlichen Daten um zellspezifische Variationen handelt. Es bedarf folglich weiterer Experimente, um die molekularen Mechanismen der EPO-Suppression durch LY294002 aufzuklären.

4.5 Von Akt zu HIF-1 α : Suche nach Verknüpfungen

Die in dieser Studie nachgewiesene, ausgeprägte inhibitorische Wirkung der pharmakologischen Substanz LY294002 auf die normoxische wie hypoxische Induktion von HIF-1 α wirft die Frage des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus dieser Repression auf. Diesbezüglich maßgeblicher Effekt der Substanz scheint die verminderte Akkumulation der α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors zu sein. Der zelluläre Gehalt an HIF-1 α wird nach heutigen Kenntnissen vielfältig reguliert. Die Expression des Proteins ist vor allem von der Transkriptionsrate des HIF-1 α -Gens und der nachfolgenden ribosomalen Translation abhängig. Die unter normoxischen Bedingungen wirkungsvolle Degradationsmaschinerie aus PHDs, pVHL und Ubiquitin-vermittelter Proteolyse reguliert zudem posttranslational die Stabilität der α -Untereinheit. Eine gesteigerte Transkriptions-/Translationsrate von HIF-1 α könnte folglich über die verstärkte Expression des Faktors zu einer Sättigung verschiedener Schritte des Abbausystems führen und konsekutiv den Gehalt an HIF-1 α steigern.

Laughner *et al.* berichteten erstmalig von einer gesteigerten HIF-1 α -Proteinsynthese unter normoxischen Kulturbedingungen in der humanen Mammakarzinom-Zell-Linie MCF-7 (Laughner *et al.*, 2001). Die Autoren identifizierten einen 252 bp umspannenden Abschnitt im 5'-untranslatierten Bereich („5'-*untranslated region*“, 5'-UTR) der HIF-1 α -mRNS, der unter Vermittlung von PI 3-K/Akt/mTOR die Translation der Untereinheit steigerte. Die Arbeit zeigte weiter, dass die normoxisch beobachtete Akkumulation von HIF-1 α durch Stimulation des

PI 3-K-/Akt-/mTOR-Pfades der fortwährenden Proteinsynthese *de novo* bedurfte. Im Gegensatz zu der weitgehend Translations-unabhängigen hypoxischen Stabilisierung postulierten die Autoren einen auf gesteigerter Proteinsynthese beruhenden Mechanismus für die normoxische, PI 3-K-/Akt-/mTOR-vermittelte Induktion von HIF-1 α . Eine ähnliche Studie an humanen Kolonkarzinom-Zellen unterstützt diese These und demonstrierte zusätzlich, dass die durch IGF-1 stimulierbare, normoxische Akkumulation von HIF-1 α weder durch Hemmung der Interaktion mit pVHL verursacht wurde, noch auf einer Inhibition der Ubiquitin-vermittelten Degradation beruhte (Fukuda *et al.*, 2002). In einer elaborierten Studie wiesen Karni *et al.* nach, dass die durch Aktivierung des PI 3-K-/mTOR-Signalweges gesteigerte HIF-1 α -Expression keinesfalls ein HIF-1 α -spezifischer Effekt, sondern das Resultat einer global gesteigerten und cap-regulierten¹ Proteinsynthese infolge der erhöhten Kinasenaktivität ist (Karni *et al.*, 2002). Dennoch ist vorstellbar, dass der empfindlich regulierte, posttranslationale Degradationsmechanismus von HIF-1 α die HIF-1-spezifischen Auswirkungen dieser generellen Synthesesteigerung erheblich triggert. Es ist spekuliert worden, dass die zelluläre Konzentration der PHDs relativ gering ist, um so bei sinkenden O₂-Konzentrationen frühzeitig die vollständige Hydroxylierung der exprimierten HIF-1 α -Proteine zu limitieren. Wie eingangs erläutert, wäre auch infolge einer Steigerung der Syntheserate von HIF-1 α die „Unterwanderung“ des proteasomalen Abbaus im Sinne einer Substratsättigung denkbar, die eine Verschiebung der Genexpression zu HIF-1-regulierten Zielgenen zur Folge hätte. Tatsächlich führte die artifizielle Überexpression von rekombinantem HIF-1 α zur normoxischen Stabilisierung der Untereinheit, was einen derartigen Mechanismus suggeriert (Tanimoto *et al.*, 2000; Hofer *et al.*, 2001). Jüngste Untersuchungen zeigten, dass durch dominant positive Formen von PI 3-K und Akt induziertes HIF-1 α zumindest partiell in der für die Interaktion mit pVHL notwendigen, hydroxylierten Form am Prolinrest 564 vorliegt (Chan *et al.*, 2002). Eine direkte Beeinträchtigung der Aktivität und Suffizienz des PHD-Systems durch die Kinasen scheint somit eher unwahrscheinlich. Auch der zelluläre Gehalt an pVHL gilt als limitierender Faktor der normoxischen HIF-1 α -Regulation. So antagonisierte die Koexpression von

¹ Das 5'-Ende der meisten mRNS liegt in methylierter Form vor, deren spezifische Struktur als „cap“ bezeichnet wird. Cap-Bindungsproteine rekrutieren die zelluläre Translationsmaschinerie zum 5'-Terminus der mRNS und regulieren so deren Expression (zusammengefasst von Raught und Gingras, 1999).

pVHL wirkungsvoll die bei Überexpression von rekombinantem HIF-1 α beobachtete normoxische Stabilisierung der Untereinheit (Tanimoto *et al.*, 2000). Entsprechend sind Wechselwirkungen des PI 3-K-/Akt-/mTOR-Pfades mit Komponenten des Degradationsprozesses denkbar, die in einer gesteigerten Stabilität von HIF-1 α resultieren. Es bleibt anzumerken, dass eine kürzlich erschienene Studie von der direkten Destabilisierung der HIF-1 α -ODD durch Rapamycin, einem pharmakologischen Inhibitor der Kinase mTOR, berichtete (Hudson *et al.*, 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus dieses durch Rapamycin beschleunigten Abbaus der ODD wie auch eine Beteiligung von mTOR an diesem Prozess bleiben jedoch fraglich.

Trotz der Fülle an Untersuchungen zur normoxischen Aktivierung von HIF-1 sind die Antworten auf Fragen nach den ursächlichen molekularen Mechanismen dennoch unvollständig. Die global gesteigerte zelluläre Proteinsynthese eines proliferierenden Phänotyps mag die beobachtete Expressionssteigerung von HIF-1 α durch normoxische Aktivatoren hinreichend begründen. Die ebenfalls notwendigen Vorgänge zur Stabilisierung der α -Untereinheit klärt diese Hypothese jedoch nicht. Methodisch schwer fassbar ist in dieser Hinsicht unter anderem die Frage nach den O₂-Konzentrationen des zellulären Mikromilieus: durch Wachstumsreize induzierte Zellproliferation könnte den zytoplasmatischen „O₂-Vorrat“ nachhaltig reduzieren. Insofern ist nicht ausgeschlossen, dass die vielfach beschriebene normoxische Akkumulation von HIF-1 α das Resultat einer Hypoxie auf mikrozellulärem Niveau darstellt.

4.6 MAPKs steigern die transkriptionelle Aktivität von HIF-1

Parallel zu den bereits beschriebenen Experimenten wurden zusätzlich Studien zur Beteiligung des MAPK-Signalweges an der posttranslationalen Regulation von HIF-1 durchgeführt. Die hier vorgestellten Ergebnisse stützen das Konzept weiterer Arbeiten, demzufolge MAPKs maßgeblich die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 steigern, während die Stabilisierung der α -Untereinheit weitgehend unbeeinflusst bleibt (Salceda *et al.*, 1997; Conrad *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 1999; Minet *et al.*, 2000; Hur *et al.*, 2001; Sodhi *et al.*, 2001). In nicht-toxischen Dosen hatten beide Substanzen keinen Einfluss auf die normoxische Akkumulation von

Insulin- bzw. IL-1 β -induziertem HIF-1 α . Entsprechend blieb auch das DNS-Bindungsverhalten von HIF-1 durch die Inhibitoren unbeeinträchtigt. Es ist jedoch bemerkenswert, dass in Gegenwart von PD098059 der Gehalt an hypoxisch induziertem HIF-1 α erkennbar reduziert war, während U0126 in Konzentrationen <10 μ M bei identischen Versuchen wirkungslos blieb. Zwar wurden für die meisten bislang untersuchten Zelltypen keine Auswirkungen des MAPK-Signalweges auf die Proteinexpression und Stabilität von HIF-1 α beschrieben – in dem hier untersuchten Zellmodell kann eine Beeinflussung der hypoxischen HIF-1 α -Akkumulation durch MAPK nicht ausgeschlossen werden. Von einer diesbezüglich interessanten Verknüpfung des MAPK-Pfades mit Regulatoren der Proteinsynthese berichten Fukuda *et al.* (Fukuda *et al.*, 2002): So steigerte in Kolonkarzinom-Zellen vom Typ HCT116 die forcierte Expression einer konstitutiv aktiven Form der Kinase MEK2 deutlich die Proteinexpression von HIF-1 α . Die Autoren demonstrierten weiter, dass PD098059 in HCT116-Zellen ein wirkungsvoller Inhibitor der Aktivierung von p70^{S6K} und des cap-Bindungsproteins eIF4E ist, die ihrerseits die cap-regulierte Proteinsynthese *de novo* steigern. MAPKs könnten so auf ähnliche Weise wie bereits für die Kinasen der PI 3-K-/Akt-/mTOR-Kaskade postuliert, zu einer Steigerung der Translationsrate von HIF-1 α beitragen (siehe 4.5). Die Übertragbarkeit des hier vorgestellten Netzwerkes zur Regulation der Proteinsynthese auf weitere Zell-Linien bedarf jedoch der jeweiligen zellspezifischen Prüfung.

In Gegenwart des MEK1/2 Inhibitors U0126 konnte indessen die dosisabhängige Hemmung der hypoxischen Aktivierung eines HIF-1-regulierten Reportergens nachgewiesen werden. Die Gruppe um D. Millhorn hatte bereits in einer früheren Publikation von der gesteigerten Expression eines HIF-2/EPAS1-regulierten Reportergens durch konstitutive Aktivierung der Kinase MEK1 berichtet (Conrad *et al.*, 1999). Weiterführende Arbeiten demonstrierten die essentielle Bedeutung einer funktionellen HBS für diesen Effekt, wie Kontrollexperimente mit mutierter HBS nachwiesen (Sodhi *et al.*, 2000). Mit diesen Beobachtungen im Einklang zeigten die hier vorgestellten Untersuchungen eine signifikant reduzierte Expression des HIF-1-Zielgens VEGF in mit PD098059 behandelten Kulturen unter hypoxischen wie normoxischen Inkubationsbedingungen. Weniger eindeutig war hingegen der Effekt von PD098059 auf die Expression von EPO. So war in hypoxischen HepG2-Zellen auch in Gegenwart von PD098059 eine gleich

bleibende Expression von EPO zu beobachten, während die basale Sekretion des Zytokins in normoxischen Zellen nachweislich durch PD098059 inhibiert wurde. Wie bereits vorangehend beschrieben, nimmt eine unbekannte Zahl von Kofaktoren Einfluss auf die Expression von HIF-1-Zielgenen (siehe auch 4.2). Die Hemmung des auf vielfältige Weise in die Regulation von Transkriptionsmodulierenden Faktoren involvierten MAPK-Signalweges stellt folglich einen schwerwiegenden Eingriff in die Balance der nukleären Genexpression dar. Es ist daher wenig überraschend, dass die Repression eines artifiziellen, HIF-1-regulierten, minimalen Promotors durch pharmakologische Blockade von MAPKs nicht uneingeschränkt auf die Regulation der Genexpression von HIF-1-Zielgenen *in vivo* übertragbar ist.

Dennoch muss die Betrachtung der unter Verwendung der pharmakologischen Inhibitoren PD098059 bzw. U0126 gewonnenen Ergebnisse kritisch erfolgen, da beide Substanzen signifikant toxische Effekte in HepG2-Zellen aufwiesen. Bei Einwirkdauern >6 h zeigten Konzentrationen, die zur vollständigen Inhibition der MEK1² notwendig sind, erheblichen Einfluss auf die Vitalität der Versuchskulturen. Diese Beobachtung wird durch eine aktuelle Studie gestützt, der zufolge PD098059 in Konzentrationen von 50 µM zu einer merklich gesteigerten DNS-Fragmentierung führte und die anti-apoptischen Effekte von VEGF und Hypoxie in serumverarmten HepG2-Zellkulturen unterdrückte (Baek *et al.*, 2000). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Konzentrationen der Substanzen, die in MTT-Untersuchungen keine toxischen Effekte zeigten, die Vitalität der Zellkulturen nachhaltig beeinflusst haben.

4.7 HIF-1 α ist ein Phosphoprotein

Die interessante Beobachtung, dass HIF-1 α abweichend von der berechneten Molekülmasse um 104 kDa in SDS-Gelelektrophoresen ein diffuses Auftrennungsmuster im Bereich von 104-116 kDa aufwies, nährte zudem die Annahme, HIF-1 α selbst könne ein direktes Substrat posttranslationaler Phosphorylierung darstellen (Wang *et al.*, 1995a). Auch in den hier vorgestellten Experimenten identifizierte der

² Auf der Basis von Phosphorylierungsstudien der MEK-abhängigen Aktivierung der Kinasen p42/p44 wurden für eine vollständige Blockierung des Signalweges durch PD098059 [PD_{100%}] in HepG2 Zellen Wirkkonzentrationen von 16,5 µM < [PD_{100%}] ≤ 50 µM bestimmt (Alvarez-Tejado *et al.*, 2002).

von uns eingesetzte monoklonale Antikörper unabhängig vom induzierenden Stimulus mindestens zwei molekulare Formen von HIF-1 α mit Massen zwischen ~100-120 kDa. Entgegen diesen endogenen Befunden war *in vitro* transkribiertes und translatiertes (IVTT-) HIF-1 α -Protein aus Retikulozyten-Lysat in einer scharfen Bande mit der vorhergesagten Masse von 104 kDa nachweisbar (Richard *et al.*, 1999). Durch Behandlung von hypoxischen Zellextrakten mit Lambda-Phosphatase ließ sich jedoch auch endogenes HIF-1 α -Protein mit der vorhergesagten Molekülmasse um 104 kDa scharf im Western Blot fokussieren (Richard *et al.*, 1999). Weitere Untersuchungen zeigten, dass sowohl IVTT- wie auch endogenes HIF-1 α durch p42/p44 MAPKs phosphoryliert wurden (Richard *et al.*, 1999). Die Phosphorylierungsprodukte ließen sich im Western Blot Verfahren mit einer identischen Masse wie die hochmolekulare, hypoxische HIF-1 α -Form nachweisen. Es ist anzunehmen, dass der beobachtbare Drift von endogenem HIF-1 α in Western Blot Analysen tatsächlich durch posttranslationale Phosphorylierung verursacht wird und es sich bei der hochmolekularen Form um phosphoryliertes HIF-1 α handelt. Anhand von *in vitro* Phosphorylierungsstudien mit aktivierter MAPK konnte ein die AS 531-826 umspannender Bereich des *Carboxy*-terminalen Abschnitts von HIF-1 α als Substrat der Kinasen identifiziert werden (Sodhi *et al.*, 2001).

4.8 Die transkriptionelle Aktivierung von HIF-1 durch MAPK ist unabhängig von der direkten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors

In Zusammenarbeit mit den oben genannten Erstbeschreibern³ der hemmenden Wirkung von PD098059 auf die hypoxisch regulierte Genexpression wurden in dieser Arbeit die molekularen Mechanismen der gesteigerten Aktivierung von HIF-1 durch MAPKs eingehender untersucht. Wir konnten demonstrieren, dass sich die transkriptionelle Aktivität von isolierten Abschnitten beider Transaktivierungsdomänen HIFs unter normoxischen wie auch hypoxischen Kulturbedingungen durch PD098059 inhibieren ließ (Sang *et al.*, 2003). Wie hier gezeigt, war das bakteriell exprimierte Fragment der isolierten C-TAD

³ Prof. J. Caro, Cardeza Foundation for Hematologic Research, Department for Internal Medicine, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania, USA; (Salceda *et al.*, 1997).

überraschenderweise jedoch kein Substrat für aktivierte MAPK *in vitro*, während die N-TAD entsprechend früheren Befunden deutlich durch die Kinase phosphoryliert wurde (siehe 3.7.1). Folglich konnte die von uns und anderen beschriebene Aktivierung zumindest der C-TAD durch MAPK nicht auf einer direkten Wechselwirkung der Kinasen mit HIF-1 α beruhen. Für die transkriptionelle Regulation der Genexpression durch HIF-1 ist die Interaktion der HIF-1 α -C-TAD mit dem Koaktivator p300/CBP von essentieller Bedeutung (Arany *et al.*, 1996; Kallio *et al.*, 1998). Soweit uns bekannt ist, konnten wir erstmalig demonstrieren, dass die C-TAD von p300 durch MAPKs phosphoryliert wird (Sang *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung und Aktivierung des mit p300 hochgradig homologen Faktors CBP durch MAPK wurde bereits in früheren Untersuchungen beschrieben (Janknecht und Nordheim, 1996). Tatsächlich war auch die transkriptionelle Aktivität von p300 sowie eines isolierten Fragments der C-TAD von p300 durch PD098059 dosisabhängig inhibierbar, während der zelluläre Gehalt von p300 unbeeinflusst blieb (Sang *et al.*, 2003). Durch Koexpression einer konstitutiv aktivierten Form von MEK1 konnten wir bestätigen, dass die C-TAD von p300 spezifisch durch MAPK aktiviert wurde. Zusätzlich zeigten Interaktionsstudien, dass PD098059 wirkungsvoll die Bindung von HIF-1 α und p300 *in vitro* und *in vivo* unterdrückte (Sang *et al.*, 2003). Die molekularen Zusammenhänge dieses Befundes sind bislang unbekannt. Aufgrund der hier vorgestellten Daten ist jedoch konstatierbar, dass verschiedene Mechanismen den aktivitätssteigernden Effekt von MAPK auf HIF-1-regulierte Zielgene vermitteln: Während der Einfluss von MAPK auf die Proteinexpression von HIF-1 α ein Zelltyp-spezifisches Phänomen zu sein scheint, wird die weitläufig beschriebene Aktivierung des Transkriptionsfaktors zumindest partiell durch die Wirkung der Kinasen auf den Koaktivator p300 vermittelt. Eine Aktivitätssteigerung der N-TAD von HIF-1 α aufgrund direkter Phosphorylierung des Proteins durch MAPKs können unsere Untersuchungen nicht ausschließen. Des Weiteren könnte die Aktivierung von MAPK zusätzlich die physische Interaktion von HIF-1 α und p300 begünstigen und somit wirkungsvoll die Bildung des aktiven Transkriptionsfaktoren-Komplexes steuern.

4.9 HIF-1. Ein proliferativer Faktor auch *in vivo*?

Ungeachtet der Vielzahl der hier und anderenorts vorgestellten Studien bleibt die physiologische Bedeutung der normoxischen Aktivierung von HIF-1 durch Wachstumsfaktoren dennoch schwer einzuordnen. Es ist gut vorstellbar, dass auch die geringere normoxische Akkumulation der regulatorischen α -Untereinheit durch unterschiedliche Stimuli das zelluläre Expressionsprogramm wirkungsvoll beeinflusst: Wie eingangs beschrieben, benötigt HIF-1 α den essentiellen Dimerisierungspartner HIF-1 β /ARNT, um transkriptionell aktiv zu sein. ARNT interagiert jedoch keinesfalls spezifisch mit HIF-1 α , sondern konnte in verschiedenen Komplexen mit anderen Funktionsproteinen nachgewiesen werden (Crews, 1998). Die normoxische Steigerung der Verfügbarkeit von HIF-1 α durch Stimuli wie z.B. Insulin mag so verstärkt den Dimerisierungspartner ARNT rekrutieren und eine HIF-1-spezifische Genexpression bahnen, während ARNT für konkurrierende Regulationsprozesse limitierend werden könnte.

Die hier demonstrierte, entscheidende Beteiligung des PI 3-K-Signalweges an der normoxischen Regulation von HIF-1 lässt vermuten, dass neben der hypoxischen Adaptation HIF-1 zusätzlich eine wichtige Funktion im Rahmen der zellulären Proliferation ausübt. Feldser *et al.* führen zur Stützung dieser Hypothese verschiedene Studien an (Feldser *et al.*, 1999): So wurden an einer HIF-1 α -defizienten, embryonalen Stammzell-Linie der Maus auch unter normoxischen Kulturbedingungen deutlich reduzierte Proliferationsraten im Vergleich zu Zellen des Wildtyps verzeichnet (Iyer *et al.*, 1998). Des Weiteren zeigten zwei humane Prostatakarzinom-Zell-Linien (PC-3 bzw. LNCaP), besonders unter geringer Zelldichte und folglich starkem Proliferationsreiz, hohe Expressionsraten von HIF-1 α auch unter normoxischer *in vitro* Kultivierung (Zhong *et al.*, 1998). Jiang *et al.* gelang in weiterführenden Studien der Nachweis, dass diese normoxische Akkumulation von HIF-1 α in PC-3-Zellen durch den Verlust des Tumorsuppressors PTEN, einem funktionellen Antagonisten der PI 3-K (siehe 1.2.2.1), verursacht wird. In einem eleganten Experiment zeigten die Autoren, dass durch Retransfektion und Überexpression von PTEN in PC-3 nicht nur die normoxische HIF-1 α -Anreicherung unterdrückt, sondern auch die Induzierbarkeit des Transkriptionsfaktors durch Insulin vollständig unterbunden wurde (Jiang *et al.*, 2001a).

Die Gruppe um Zelzer stellte zu dieser Frage einige interessante evolutionsgeschichtliche Überlegungen an (Zelzer *et al.*, 1998): Es ist durchaus wahrscheinlich, dass HIF-1 in frühen Metazoen überwiegend rein zelluläre Prozesse gesteuert hat und eine Errungenschaft mehrzelliger Organismen darstellte: Während in Hefen keine bHLH/PAS Proteine nachgewiesen werden konnten, finden sich solche bereits in einfachen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila*. Die an Protein-Interaktionen beteiligte PAS-Domäne wird auch in bakteriellen Proteinen exprimiert, konnte allerdings den Autoren zufolge bislang nicht als Bestandteil bakterieller Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Auch Insulinrezeptoren wurden für die oben genannten Organismen beschrieben und lassen eine frühzeitige kommunizierende Regulation der Proliferation von Einzelzellen im Verband bereits primitiver Organismen vermuten. Ein so in die Wachstumsfaktor-vermittelte Steuerung der Genexpression involvierter Transkriptionsfaktor HIF-1 könnte in einem weiteren Entwicklungsschritt für die Anpassung von Energiemetabolismus und Proliferation an O₂-Mangelzustände rekrutiert worden sein (Quellenangaben sind der Originalarbeit von Zelzer *et al.* zu entnehmen⁴). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die Expression der HIF-1 α -destabilisierenden ODD auch in artifiziellen, chimären Proteinen deren unverzüglichen normoxischen Abbau einleitet (Pugh *et al.*, 1997). Entsprechend konnte durch Mutationen bzw. Deletion der ODD HIF-1 α normoxisch stabilisiert werden und war in Abhängigkeit von dem zweiten O₂-regulierten Mechanismus durch FIH auch transkriptionell aktiv (Srinivas *et al.*, 1999; Lando *et al.*, 2002). Es ist anzumerken, dass jüngere Studien auch in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* ein hoch konserviertes System der HIF-1-homologen O₂-Rezeption identifiziert haben (Bacon *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2001b). Ein O₂-unabhängiger Vorläufer von HIF-1 bleibt folglich spekulativ.

⁴ Eine neuere Studie gibt auf der Basis von umfassenden Datenbanken-Recherchen Einblicke in die stammesgeschichtlich Entwicklung von bHLH-PAS Proteinen (Ledent und Vervoort, 2001).

4.9.1 Wachstumsfaktoren, Onkogene und HIF: „Meilensteine“ der Tumorentstehung

Die autologe Stimulation der Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren und Onkogene sowie die Ausprägung eines angiogenetischen Phänotyps gelten als kritische Schritte der Entstehung von zellulären Neoplasien. Die konstitutive Stimulation von intrazellulären Signalwegen durch den Verlust funktioneller Tumorsuppressoren bzw. durch Aktivierung von Proto-Onkogenen führt hierbei zu einer unkontrollierten Proliferation von Zellklonen. So ist die Aktivität von PI 3-K und MAPKs in zahlreichen Tumoren gesteigert und führt in eukaryontischen Zellen zur Entwicklung eines aggressiven Phänotyps (Mansour *et al.*, 1994; Aoki *et al.*, 1998). Häufig ist die Expression HIF-1-regulierter Zielgene in menschlichen Tumoren ebenfalls deutlich gesteigert. Damit verbundene Änderungen im Glukosestoffwechsel und der Vaskularisierung des proliferierenden Tumors werden für eine gesteigerte Invasivität und die Tendenz der Neoplasie zur Metastasierung verantwortlich gemacht. Zusätzlich wird ein breites Spektrum der HIF-1-aktivierenden Substanzen und/oder ihrer Rezeptoren in neoplastischen Prozessen überexprimiert. Die Malignität der Neubildungen korreliert in hohem Maße auch mit der endokrinen Aktivität der Tumorzellen. Eine Zusammenfassung der Rolle von HIF-1 in der Tumorentwicklung findet sich in Referenz 92 (Semenza, 2000). In dieser Hinsicht ist bemerkenswert, dass Vergleichsstudien an HIF-1-defizienten Stammzell-Linien der Maus und dem entsprechenden Wildtyp von einer deutlich geringeren Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen in HIF-1-negativen Tumoren berichten (Unruh *et al.*, 2003). HIF-1 ist somit ein bedeutsamer prognostischer Faktor und gleichzeitig Angriffspunkt für eine suffiziente Tumorthherapie sowie für die Entwicklung neuartiger Therapiestrategien.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten auf eine wichtige Funktion von MAPKs bzw. der PI 3-K-Kaskade an der normoxischen wie hypoxischen Aktivierung von HIF-1 hin. Beide Signalwege stellen neben der hypoxischen Stimulation einen ergänzenden Mechanismus der Induktion von HIF-1 in Tumorzellen dar. Es ist weiterhin unklar, wie das direkte Zusammenspiel von Kinasepfaden und HIF-1 α verknüpft ist. Die Identifikation der molekularen Zusammenhänge dieser alternativen HIF-1-Aktivierung könnte jedoch aussichtsreiche Optionen zur therapeutischen Intervention in Tumoren mit gesteigerter Expression

des Transkriptionsfaktors eröffnen: Dabei sollten weniger die Kinasen selbst potentiell Ziel eines pharmakologischen Eingriffs sein – aufgrund ihrer multiplen Beteiligung an zellulären Steuerprozessen wären unerwünschte Wirkungen kaum auszuschließen. Vielmehr gilt es, potentielle Wechselwirkungen unmittelbar zwischen Kinase-Signalwegen und HIF-1 α zu prüfen, um mögliche Interaktionen direkt und somit spezifisch blockieren zu können.

5 Zusammenfassung

Die zelluläre und systemische Anpassung des Organismus an niedrige O_2 -Konzentrationen erfolgt auf transkriptioneller Ebene durch die Aktivierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs). HIFs sind weit verbreitete und streng konservierte, heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus α - und β -Untereinheiten bestehen. Niedrige zelluläre O_2 -Drücke stabilisieren die α -Untereinheit HIFs und führen so zur suffizienten Expression verschiedener Zielgene. Die Gruppe der HIF-induzierten Gene umfasst unter anderem Faktoren, die Prozesse wie die Erythropoiese, Angiogenese sowie den zellulären Energiestoffwechsel regulieren und so die Anpassung des Organismus an sinkende O_2 -Konzentrationen gewährleisten.

Bestimmte Mediatoren wie z.B. Insulin und $IL-1\beta$ können auch unter normoxischen Bedingungen HIF-1 α induzieren. PI 3-K- und MAPK-Signalwege sind Signalvermittler der zellulären Effekte sowohl von Insulin, als auch von $IL-1\beta$. Die hier vorgestellten Experimente prüfen die Beteiligung dieser Signalstrukturen an der normoxischen Induktion HIFs unter Verwendung von spezifischen Kinase-Inhibitoren. Die pharmakologische Blockade der PI 3-K mit LY294002 führte unter allen Reizbedingungen (Insulin, $IL-1\beta$ und Hypoxie) zu drastisch erniedrigten HIF-1 α -Proteinkonzentrationen und hemmte wirkungsvoll die Aktivität des Transkriptionsfaktors. Ebenso wurde durch LY294002 sowohl die basale wie auch die hypoxisch induzierte Expression von EPO vollständig supprimiert. Im Einklang mit diesen Beobachtungen stimulierte die Koexpression von dominant aktiver PI 3-K die Expression eines HIF-regulierten Reportergens (pH3SVL) in normoxischen HepG2-Kulturen. Die Hemmung des MAPK-Signalwegs durch PD098059 und U0126 hatte in entsprechenden Versuchen nur geringfügige Auswirkungen auf die Akkumulation von HIF-1 α . Dennoch reduzierte PD098059 signifikant die Insulin- bzw. Hypoxie-induzierte Expression von VEGF und hemmte die hypoxische Aktivierung von pH3SVL.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Insulin und $IL-1\beta$ die Verfügbarkeit der α -Untereinheit HIFs unter Beteiligung des PI 3-K-Signalweges erhöhen, während MAPK die transkriptionelle Aktivität des funktionellen HIF-1-Komplexes unabhängig vom zellulären O_2 -Gehalt steigern. Demnach spielen PI 3-K und MAPKs

eine entscheidende Schlüsselrolle in der normoxischen Expression von HIF-1-Zielgenen. Zusätzlich wirken beide Signalwege modulatorisch auf die hypoxische Aktivierung HIFs. Die Aufklärung der Wirkungsmechanismen von PI 3-K und MAPKs auf HIFs bietet daher potentielle Ansätze für HIF-supprimierende Therapiestrategien.

>>Kaum ist ein Prinzip festgelegt und in der DNS-Kette des Genoms mühsam untergebracht worden, so findet sich schon das Antiprinzip, für das wieder neue Kontrollelemente gefunden werden müssen, und das geht so endlos weiter, bis alle vergessen haben, wonach sie eigentlich ausgegangen waren.

Faktoren und Kofaktoren, Kontrollen, Inhibitoren, Initiatoren und vieles mehr; und für jedes wieder ein ganzes System von Enzymen und Faktoren, für die wiederum der Erbapparat verantwortlich sein soll: wahrlich ein tropischer Regenwald, aus dem hie und da die Hilferufe der Suchenden matt erschallen.<<

Erwin Chargaff

6 Literaturverzeichnis

1. **Akagi, Y., Liu, W., Zebrowski, B., Xie, K. und Ellis, L. M.** (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res.* **58**: 4008-14.
2. **Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T. und Saltiel, A. R.** (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**: 27489-94.
3. **Alvarez-Tejado, M., Alfranca, A., Aragonés, J., Vara, A., Landazuri, M. O. und del Peso, L.** (2002). Lack of evidence for the involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factors by low oxygen tension. *J. Biol. Chem.* **277**: 13508-17.
4. **Aoki, M., Batista, O., Bellacosa, A., Tschlis, P. und Vogt, P. K.** (1998). The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 14950-5.
5. **Aoki, M., Schetter, C., Himly, M., Batista, O., Chang, H. W. und Vogt, P. K.** (2000). The catalytic subunit of phosphoinositide 3-kinase: requirements for oncogenicity. *J. Biol. Chem.* **275**: 6267-75.
6. **Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F. und Livingston, D. M.** (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 12969-73.
7. **Arbiser, J. L., Moses, M. A., Fernandez, C. A., Ghiso, N., Cao, Y., Klauber, N., Frank, D., Brownlee, M., Flynn, E., Parangi, S., Byers, H. R. und Folkman, J.** (1997). Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 861-6.
8. **Arsham, A. M., Plas, D. R., Thompson, C. B. und Simon, M. C.** (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 α nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *J. Biol. Chem.* **277**: 15162-70.
9. **Bacon, N. C., Wappner, P., O'Rourke, J. F., Bartlett, S. M., Shilo, B., Pugh, C. W. und Ratcliffe, P. J.** (1998). Regulation of the Drosophila bHLH-PAS protein Sima by hypoxia: functional evidence for homology with mammalian HIF-1 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**: 811-6.
10. **Baek, J. H., Jang, J. E., Kang, C. M., Chung, H. Y., Kim, N. D. und Kim, K. W.** (2000). Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* **19**: 4621-31.
11. **Ben-Av, P., Crofford, L. J., Wilder, R. L. und Hla, T.** (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* **372**: 83-7.
12. **Bermont, L., Lamielle, F., Fauconnet, S., Esumi, H., Weisz, A. und Adessi, G. L.** (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer* **85**: 117-23.

13. **Bermont, L., Lamielle, F., Lorchel, F., Fauconnet, S., Esumi, H., Weisz, A. und Adessi, G. L.** (2001). Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**: 363-8.
14. **Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
15. **Bruick, R. K. und McKnight, S. L.** (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**: 1337-40.
16. **Cantley, L. C.** (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**: 1655-7.
17. **Chan, D. A., Sutphin, P. D., Denko, N. C. und Giaccia, A. J.** (2002). Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 α . *J. Biol. Chem.* **277**: 40112-7.
18. **Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. und Maxwell, P. H.** (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 25733-41.
19. **Conrad, P. W., Freeman, T. L., Beitner-Johnson, D. und Millhorn, D. E.** (1999). EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J. Biol. Chem.* **274**: 33709-13.
20. **Crews, S. T.** (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* **12**: 607-20.
21. **Dhand, R., Hara, K., Hiles, I., Bax, B., Gout, I., Panayotou, G., Fry, M. J., Yonezawa, K., Kasuga, M. und Waterfield, M. D.** (1994). PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions. *EMBO J.* **13**: 511-21.
22. **El Awad, B., Kreft, B., Wolber, E. M., Hellwig-Bürgel, T., Metzen, E., Fandrey, J. und Jelkmann, W.** (2000). Hypoxia and interleukin-1 β stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int.* **58**: 43-50.
23. **Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J. und Ratcliffe, P. J.** (2001). *C. elegans* egl-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**: 43-54.
24. **Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A. und Trzaskos, J. M.** (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **273**: 18623-32.
25. **Feldser, D., Agani, F., Iyer, N. V., Pak, B., Ferreira, G. und Semenza, G. L.** (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* **59**: 3915-8.
26. **Figueroa, Y. G., Chan, A. K., Ibrahim, R., Tang, Y., Burow, M. E., Alam, J., Scandurro, A. B. und Beckman, B. S.** (2002). NF- κ B plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp. Hematol.* **30**: 1419-27.

27. **Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. und Semenza, G. L.** (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4604-13.
28. **Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y. D., Ellis, L. M. und Semenza, G. L.** (2002). Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 38205-11.
29. **Gerber, H. P., Condorelli, F., Park, J. und Ferrara, N.** (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**: 23659-67.
30. **Goad, D. L., Rubin, J., Wang, H., Tashjian, A. H., Jr. und Patterson, C.** (1996). Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **137**: 2262-8.
31. **Görlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V. B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R. P., Kietzmann, T. und Busse, R.** (2001). Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22^{phox}-containing NADPH oxidase. *Circ. Res.* **89**: 47-54.
32. **Goldberg, M. A., Dunning, S. P. und Bunn, H. F.** (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* **242**: 1412-5.
33. **Goldberg, M. A., Glass, G. A., Cunningham, J. M. und Bunn, H. F.** (1987). The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 7972-6.
34. **Grugel, S., Finkenzeller, G., Weindel, K., Barleon, B. und Marme, D.** (1995). Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 25915-9.
35. **Haddad, J. J. und Land, S. C.** (2001). A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- α -dependent regulation of HIF-1 α . *FEBS Lett.* **505**: 269-74.
36. **Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J. und Jelkmann, W.** (1999). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* **94**: 1561-7.
37. **Henderson, L. E., Krutzsch, H. C. und Oroszlan, S.** (1983). Myristyl amino-terminal acylation of murine retrovirus proteins: an unusual post-translational protein modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 339-43.
38. **Hofer, T., Desbaillets, I., Hopfl, G., Gassmann, M. und Wenger, R. H.** (2001). Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 α activation cascade: implications for HIF-1 α gene therapy. *FASEB J.* **15**: 2715-7.
39. **Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A. und Hankinson, O.** (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* **252**: 954-8.
40. **Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. und Bunn, H. F.** (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 7987-92.

41. Hudson, C. C., Liu, M., Chiang, G. G., Otterness, D. M., Loomis, D. C., Kaper, F., Giaccia, A. J. und Abraham, R. T. (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 7004-14.
42. Hur, E., Chang, K. Y., Lee, E., Lee, S. K. und Park, H. (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol. Pharmacol.* **59**: 1216-24.
43. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. und Kaelin, W. G., Jr. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**: 464-8.
44. Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Klausner, R. D. und Pause, A. (1999). Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 12436-41.
45. Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y. und Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* **12**: 149-62.
46. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. und Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**: 468-72.
47. Jackson, J. R., Minton, J. A., Ho, M. L., Wei, N. und Winkler, J. D. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1 β . *J. Rheumatol.* **24**: 1253-9.
48. Janknecht, R. und Nordheim, A. (1996). MAP kinase-dependent transcriptional coactivation by Elk-1 and its cofactor CBP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**: 831-7.
49. Jiang, B. H., Agani, F., Passaniti, A. und Semenza, G. L. (1997a). V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* **57**: 5328-35.
50. Jiang, B. H., Jiang, G., Zheng, J. Z., Lu, Z., Hunter, T. und Vogt, P. K. (2001a). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* **12**: 363-9.
51. Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R. und Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**: 17771-8.
52. Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Aoki, M. und Vogt, P. K. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 1749-53.
53. Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R. und Semenza, G. L. (1997b). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem.* **272**: 19253-60.

54. Jiang, H., Guo, R. und Powell-Coffman, J. A. (2001b). The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 7916-21.
55. Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. und Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J.* **17**: 6573-86.
56. Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y. und Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **274**: 6519-25.
57. Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R. C. und Conaway, J. W. (2000). Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 10430-5.
58. Karni, R., Dor, Y., Keshet, E., Meyuhas, O. und Levitzki, A. (2002). Activated pp60^{c-Src} leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)- 1 α expression under normoxia. *J. Biol. Chem.* **277**: 42919-25.
59. La Ferla, K., Reimann, C., Jelkmann, W. und Hellwig-Bürgel, T. (2002). Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF- κ B. *FASEB J.* **16**: 1811-3.
60. Lando, D., Gorman, J. J., Whitelaw, M. L. und Peet, D. J. (2003). Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur. J. Biochem.* **270**: 781-90.
61. Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L. und Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* **16**: 1466-71.
62. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C. und Semenza, G. L. (2001). Her2^{neu} signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 3995-4004.
63. Ledent, V. und Vervoort, M. (2001). The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res.* **11**: 754-70.
64. Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. und Goldberg, M. A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **270**: 13333-40.
65. Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M. und Krek, W. (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev.* **13**: 1822-33.
66. Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T. und Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* **77**: 638-43.
67. Lovelock, J. E. (1996). GAIA: Die Erde ist ein Lebewesen. Anatomie und Physiologie des Organismus Erde, Wilhelm Heyne Verlag GmbH & Co. KG.

68. **Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G. F. und Ahn, N. G.** (1994). Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**: 966-70.
69. **Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. und Ratcliffe, P. J.** (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* **20**: 5197-206.
70. **Masuda, S., Chikuma, M. und Sasaki, R.** (1997). Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res.* **746**: 63-70.
71. **Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R. und Ratcliffe, P. J.** (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**: 271-5.
72. **Mazure, N. M., Chen, E. Y., Laderoute, K. R. und Giaccia, A. J.** (1997). Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* **90**: 3322-31.
73. **Miele, C., Rochford, J. J., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S. und Van Obberghen, E.** (2000). Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **275**: 21695-702.
74. **Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J. und Michiels, C.** (2000). ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* **468**: 53-8.
75. **Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
76. **Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V. und Kaelin, W. G.** (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* **2**: 423-7.
77. **Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. und Donner, D. B.** (1999). NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**: 82-5.
78. **Paleolog, E. M., Young, S., Stark, A. C., McCloskey, R. V., Feldmann, M. und Maini, R. N.** (1998). Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor α and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **41**: 1258-65.
79. **Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. und Cobb, M. H.** (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**: 153-83.
80. **Pei, L.** (2000). Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function. *J. Biol. Chem.* **275**: 31191-8.
81. **Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M. und Ratcliffe, P. J.** (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1: definition of regulatory domains within the α subunit. *J. Biol. Chem.* **272**: 11205-14.

82. Raught, B. und Gingras, A. C. (1999). eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**: 43-57.
83. Reddy, S. A., Huang, J. H. und Liao, W. S. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NF κ B and AP-1 activation. *J. Biol. Chem.* **272**: 29167-73.
84. Richard, D. E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D. und Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* **274**: 32631-7.
85. Richard, D. E., Berra, E. und Pouyssegur, J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 26765-71.
86. Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M. und Wenger, R. H. (1997). Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* **272**: 20055-62.
87. Romashkova, J. A. und Makarov, S. S. (1999). NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**: 86-90.
88. Russo, D., Damante, G., Foti, D., Costante, G. und Filetti, S. (1994). Different molecular mechanisms are involved in the multihormonal control of glucose transport in FRTL5 rat thyroid cells. *J. Endocrinol. Invest.* **17**: 323-7.
89. Ryan, H. E., Lo, J. und Johnson, R. S. (1998). HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* **17**: 3005-15.
90. Salceda, S., Beck, I., Srinivas, V. und Caro, J. (1997). Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. *Kidney Int.* **51**: 556-9.
91. Salceda, S. und Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* **272**: 22642-7.
92. Sang, N., Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V. und Caro, J. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J. Biol. Chem.* **278**: 14013-9.
93. Scholz, H., Baier, W., Ratcliffe, P., Eckardt, K., Zapf, J., Kurtz, A. und Bauer, C. (1992). Insulin-like growth factors decrease oxygen-regulated erythropoietin production by human hepatoma cells (HepG2). *Am. J. Physiol.* **263**: C474-9.
94. Semenza, G. L. (2000). Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**: 71-103.
95. Semenza, G. L. (2001). HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* **107**: 1-3.
96. Semenza, G. L. und Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5447-54.
97. Shih, S. C. und Claffey, K. P. (2001). Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF- β activation of VEGF expression. *Growth Factors* **19**: 19-34.

98. **Smith, L. E., Shen, W., Perruzzi, C., Soker, S., Kinose, F., Xu, X., Robinson, G., Driver, S., Bischoff, J., Zhang, B., Schaeffer, J. M. und Senger, D. R.** (1999). Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat. Med.* **5**: 1390-5.
99. **Sodhi, A., Montaner, S., Miyazaki, H. und Gutkind, J. S.** (2001). MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1 α in rasV12 upregulation of VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**: 292-300.
100. **Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E. A. und Gutkind, J. S.** (2000). The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Res.* **60**: 4873-80.
101. **Srinivas, V., Zhang, L. P., Zhu, X. H. und Caro, J.** (1999). Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor α (HIF- α) proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**: 557-61.
102. **Stiehl, D. P., Jelkmann, W., Wenger, R. H. und Hellwig-Bürgel, T.** (2002). Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 α by insulin and interleukin-1 β involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett.* **512**: 157-62.
103. **Stroka, D. M., Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R. H., Neil, D. A., Bauer, C., Gassmann, M. und Candinas, D.** (2001). HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* **15**: 2445-53.
104. **Sutter, C. H., Laughner, E. und Semenza, G. L.** (2000). Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 4748-53.
105. **Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A. und Cairo, G.** (1999). Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **274**: 24142-6.
106. **Taha, C., Mitsumoto, Y., Liu, Z., Skolnik, E. Y. und Klip, A.** (1995). The insulin-dependent biosynthesis of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in L6 muscle cells is mediated by distinct pathways. Roles of p21ras and pp70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 24678-81.
107. **Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. und Poellinger, L.** (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* **19**: 4298-309.
108. **Thornton, R. D., Lane, P., Borghaei, R. C., Pease, E. A., Caro, J. und Mochan, E.** (2000). Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem. J.* **350 Pt 1**: 307-12.
109. **Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G. L. und Van Obberghen, E.** (2002). Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **277**: 27975-81.
110. **Unruh, A., Ressel, A., Mohamed, H. G., Johnson, R. S., Nadrowitz, R., Richter, E., Katschinski, D. M. und Wenger, R. H.** (2003). The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* **22**: 3213-20.

111. Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. und Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**: 5241-8.
112. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. und Semenza, G. L. (1995a). 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**: 5510-4.
113. Wang, G. L., Jiang, B. H. und Semenza, G. L. (1995b). Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**: 669-75.
114. Wang, G. L. und Semenza, G. L. (1993a). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **268**: 21513-8.
115. Wang, G. L. und Semenza, G. L. (1993b). Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* **82**: 3610-5.
116. Wang, G. L. und Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **270**: 1230-7.
117. Wanner, R. M., Spielmann, P., Stroka, D. M., Camenisch, G., Camenisch, I., Scheid, A., Houck, D. R., Bauer, C., Gassmann, M. und Wenger, R. H. (2000). Epolones induce erythropoietin expression via hypoxia-inducible factor-1 α activation. *Blood* **96**: 1558-65.
118. Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Ferrara, N. und Donner, D. B. (1996). Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J. Biol. Chem.* **271**: 29483-8.
119. Wenger, R. H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* **16**: 1151-62.
120. Yamagishi, S., Kawakami, T., Fujimori, H., Yonekura, H., Tanaka, N., Yamamoto, Y., Urayama, H., Watanabe, Y. und Yamamoto, H. (1999). Insulin stimulates the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *Microvasc. Res.* **57**: 329-39.
121. Yu, F., White, S. B., Zhao, Q. und Lee, F. S. (2001). HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 9630-5.
122. Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B. Z., Rubinstein, M. und Cohen, B. (1998). Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *EMBO J.* **17**: 5085-94.
123. Zhong, H., Agani, F., Baccala, A. A., Laughner, E., Rioseco-Camacho, N., Isaacs, W. B., Simons, J. W. und Semenza, G. L. (1998). Increased expression of hypoxia inducible factor-1 α in rat and human prostate cancer. *Cancer Res.* **58**: 5280-4.
124. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., Simons, J. W. und Semenza, G. L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* **60**: 1541-5.

- 125. Zhong, H., Hanrahan, C., van der Poel, H. und Simons, J. W.** (2001). Hypoxia-inducible factor 1α and 1β proteins share common signaling pathways in human prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**: 352-6.
- 126. Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A. R., Ryan, H. E., Johnson, R. S., Jefferson, A. B., Stokoe, D. und Giaccia, A. J.** (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* **14**: 391-6.

7 Anhang

7.1 Materialien

Zur erleichterten Übersicht sind alle in den hier beschriebenen Experimenten eingesetzten Materialien und deren Bezugsquellen in den folgenden Abschnitten alphabetisch verzeichnet. Hierdurch kommt es gegebenenfalls zu inhaltlichen Überschneidungen mit Angaben aus Abschnitt 2.

7.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, deren Bezugsquellen im Nachfolgenden nicht ausdrücklich angeführt sind, wurden über die zentrale Hausapotheke der Medizinischen Universität zu Lübeck bezogen und entsprechen dem höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

[γ - ³² P]- ATP	MWG bzw. Amersham
Akt-Antikörper-Kit	New England Biolabs GmbH
anti-HIF-1 α -Antikörper, monoklonal, Maus	Transduction Laboratories
anti-Kaninchen-Antikörper, HPO-gekoppelt	DakoCytomation GmbH
anti-Maus Antikörper, HPO-gekoppelt	Santa Cruz
anti-PI 3-K p85, Kaninchen-Antiserum	Biomol
Aprotinin	Sigma
β -Glycerophosphat	Fluka Chemika
Benzamidin	Sigma
Coomassie G250	Sigma
DTT	Sigma
<i>Dual Luciferase Kit</i>	Promega
<i>E. coli</i> BL21	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5 α	Stratagene
ECL®	Amersham
EPO-ELISA	medac Diagnostika
Gradienten SDS-PAG; 4-20%	Biorad
Insulin	Höchst Marion Roussel
Interleukin-1 β	Ciba Geigy
IPTG	Sigma
Lachstestis-DNS	Sigma

Laemmli Probenpuffer	Biorad
Leupeptin	Sigma
Levamisol	Sigma
LY294002	Calbiochem
MBP	Sigma
MTT	Sigma
Na ₃ VO ₄	Sigma
NP-40	Sigma
PD098059	Calbiochem
Pepstatin	Sigma
PLB®	Promega/ Boehringer Ingelheim
PMSF	Sigma
Polyacrylamid	Roth
Ponceau S	Sigma
Proteasen-Inhibitor-Mix	Sigma
PVDF-Membran	Roth
rekombinante MAPK, aktiviert	Biomol
Trockenmilch	Biorad
U0126	Promega
VEGF-ELISA	Quantikine, R&D Systems

7.1.2 Puffer und Lösungen

Im Folgenden ist eine alphabetische Zusammenstellung der verwendeten Puffer und Lösungsprotokolle wiedergegeben. Ist das Lösungsmittel nicht gesondert vermerkt, so wurden die Reagenzien in deionisiertem H₂O gelöst.

Inhalt

<i>Blotpuffer</i>	83
<i>Bradford-Reagenz</i>	83
<i>Coomassie-Färbelösung</i>	84
<i>Elektrophoresepuffer</i>	84
<i>Kernextraktionspuffer</i>	84
<i>Puffer A</i>	84
<i>Puffer C</i>	84
<i>Lysepuffer für MTT-Test</i>	85
<i>MAPK Puffer</i>	85
<i>MTT-Lösung</i>	85
<i>NETN Lyse-Puffer</i>	85
<i>PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung); pH 7,4</i>	86
<i>PLB® (Passiver Lysepuffer)</i>	86
<i>TAE-Puffer, 50-fach konzentriert</i>	86
<i>TE Puffer</i>	86
<i>Zell-Lysepuffer für Gesamtzellextrakte (nach R. Wenger)</i>	86

- **Blotpuffer**

<i>Tris Base</i>	3,3 g
<i>Glycin</i>	14,4 g
<i>Methanol</i>	200 ml
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

- **Bradford-Reagenz**

<i>Coomassie G 250</i>	50 mg
<i>Ethanol absolut</i>	25 ml
<i>Phosphorsäure, 85%</i>	50 ml
<i>Aqua bidest.</i>	ad 500 ml

Die filtrierte Bradford-Lösung kann bei Raumtemperatur abgedunkelt für 4-6 Monate gelagert werden.

- **Coomassie-Färbelösung**

<i>Methanol</i>	40%
<i>Eisessig</i>	10%
<i>Coomassie R 250 (w/vol.)</i>	0,025%

Aus den angegebenen Reagenzien wird eine wässrige Lösung hergestellt, der Coomassie-Farbstoff vollständig gelöst bzw. ungelöste Pigmentreste durch Filtration entfernt. Zum Fixieren und Entfärben der Gele wird eine entsprechende Lösung ohne Farbstoff benötigt.

- **Elektrophoresepuffer**

<i>Tris Base</i>	3 g
<i>Glycin</i>	72,2/5 g
<i>SDS</i>	1g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

- **Kernextraktionspuffer**

Puffer A

<i>Aprotinin</i>	2 mg/ml
<i>Leupeptin</i>	10 µg/ml
<i>Pepstatin</i>	20 µg/ml
<i>Natrium-ortho-Vanadat</i>	1 mM
<i>Benzamidin</i>	0,5 mM
<i>Levamisol</i>	2 mM
<i>β-Glycerophosphat</i>	10 mM
<i>DTT</i>	0,5 mM
<i>PMSF</i>	0,4 mM
<i>Tris pH 7,8</i>	10 mM
<i>MgCl₂</i>	1,5 mM
<i>KCl</i>	10 mM

Der hypotone Zell-Lysepuffer wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt und auf Eis gelagert. PMSF wurde aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit zuletzt zugegeben.

Puffer C

<i>Aprotinin</i>	2 mg/ml
<i>Leupeptin</i>	10 µg/ml
<i>Pepstatin</i>	20 µg/ml
<i>Natrium-ortho-Vanadat</i>	1 mM

<i>Benzamidin</i>	<i>0,5 mM</i>
<i>Levamisol</i>	<i>2 mM</i>
<i>β-Glycerophosphat</i>	<i>10 mM</i>
<i>DTT</i>	<i>0,5 mM</i>
<i>PMSF</i>	<i>0,4 mM</i>
<i>Tris pH 7,8</i>	<i>20 mM</i>
<i>MgCl₂</i>	<i>1,5 mM</i>
<i>KCl</i>	<i>420 mM</i>
<i>Glycerin</i>	<i>20% (vol/vol)</i>

Ansatz und Gebrauch siehe Puffer A.

- **Lysepuffer für MTT-Test**

<i>N,N-dimethylformamid</i>	<i>100 ml</i>
<i>SDS</i>	<i>40 g</i>
<i>Aqua bidest.</i>	<i>100 ml</i>

SDS wurde bei 37°C unter Rühren gelöst und der pH-Wert mit 2,5 ml 80% Essigsäure und 2,5 ml 1M HCl auf pH 4,7 eingestellt.

- **MAPK Puffer**

<i>Hepes pH 8,0</i>	<i>25 mM</i>
<i>MgCl₂</i>	<i>10 mM</i>
<i>DTT</i>	<i>1 mM</i>

- **MTT-Lösung**

<i>MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid</i>	<i>5 mg/ml</i>
---	----------------

5 mg/ml MTT wurde in steriler PBS- Lösung bei Raumtemperatur gelöst, steril filtriert und portioniert in geschlossenen, abgedunkelten Flaschen bei –20°C tiefgefroren.

- **NETN Lyse-Puffer**

<i>NaCl</i>	<i>100 mM</i>
<i>EDTA</i>	<i>1 mM</i>
<i>Tris HCl</i>	<i>20 mM</i>
<i>Nonidet P-40</i>	<i>0,5%</i>

- **PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung); pH 7,4**

<i>NaCl</i>	8 g
<i>Na₂HPO₄</i>	0,765 g
<i>KCl</i>	0,2 g
<i>KH₂PO₄</i>	0,2 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

Die Substanzen wurden in Aqua bidest. vollständig unter Rühren bei Raumtemperatur gelöst und auf ein endgültiges Volumen von 1000 ml aufgefüllt. Auf Vorrat angesetzte Lösung wurde 10-fach konzentriert eingewogen, mikrofiltriert (0,2 µm Porengröße) und in sterile Gefäße abgefüllt. Jeweils vor Benutzung der einfach konzentrierten Lösung wurde der pH-Wert durch Titration mit 1M HCl bzw. 1M NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

- **PLB® (Passiver Lysepuffer)**

Der von der Firma Promega in 5-fach konzentrierter Form angebotene Lysepuffer wurde unmittelbar vor Gebrauch mit Aqua bidest. auf die 1-fache Arbeitskonzentration verdünnt.

- **TAE-Puffer, 50-fach konzentriert**

<i>Tris Base</i>	242 g
<i>Eisessig (glacial acetic acid)</i>	57,1 ml
<i>0,5 M EDTA, pH 8,0</i>	100 ml
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

Unmittelbar vor Gebrauch wurde die 50-fach konzentrierte Stammlösung auf die 1-fache Arbeitskonzentration verdünnt.

- **TE Puffer**

<i>Tris HCl pH 8,0</i>	10 mM
<i>EDTA</i>	1 mM

- **Zell-Lysepuffer für Gesamtzellextrakte (nach R. Wenger)**

<i>Tris pH 8,0</i>	10 mM
<i>EDTA pH 8,0</i>	1 mM
<i>NaCl</i>	400 mM
<i>Nonidet P-40</i>	0,1%

<i>Aprotinin</i>	<i>1 µg/ml</i>
<i>Leupeptin</i>	<i>1 µg/ml</i>
<i>Pepstatin</i>	<i>1 µg/ml</i>
<i>Natrium-ortho-Vanadat</i>	<i>1 mM</i>
<i>DTT</i>	<i>1 mM</i>
<i>PMSF</i>	<i>1 mM</i>

Der hypertone, aktiv lysierende Extraktionspuffer wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt und auf Eis gelagert. Zellkulturen können direkt auf den Gewebeskulturschalen lysiert werden (empfohlenes Puffervolumen 0,5 ml pro 100 mm Kulturschalen).

7.1.3 Zellkultur-Medien

- **HepG2 Zellkultur**

Kulturmedium

RPMI 1650 (Gibco)
10% (vol/vol) fetales Kälberserum (FCS; Sigma)
0,2% (vol/vol) Penicillin/Streptomycin

Versuchsmedium

RPMI 1650
ohne FCS
0,2% (vol/vol) Penicillin/ Streptomycin

- **HRG1 Zellkultur**

Selektionsmedium

DMEM high glucose ® (Gibco)
10% (vol/vol) FCS (Gibco)
1% (vol/vol) Penicillin/Streptomycin
0,55 mg/ml G 418

Versuchsmedium

DMEM high glucose ® (Gibco)
10% (vol/vol) FCS (Gibco)
1% (vol/vol) Penicillin/Streptomycin

7.2 Firmen

American Type Culture Collection	Rockville, MD, USA
Amersham	Freiburg, Deutschland
Biorad	München, Deutschland
Calbiochem	Bad Soden, Deutschland
Ciba Geigy	Basel, Schweiz
DakoCytomation GmbH	Hamburg, Deutschland
EG&G Berthold	Bad Wildbach, Deutschland
Fluka Chemie AG	Buchs, Schweiz
Fuji	Düsseldorf, Deutschland
GIBCO™ BRL	Karlsruhe, Deutschland
GraphPad Software	SanDiego, CA, USA
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
Hoechst Marion Roessel	Frankfurt, Deutschland
Invitrogen™ life technologies	Karlsruhe, Deutschland
medac Diagnostica	Wedel, Deutschland
MWG	Ebersberg, Deutschland
New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, Deutschland
New England Nuclear	Köln, Deutschland
Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Promega/ Boehringer Ingelheim	Heidelberg, Deutschland
R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Santa Cruz	Heidelberg, Deutschland
Sigma	Deisenhofen, Deutschland
SLT LAB INSTRUMENTS GmbH	Crailsheim, Deutschland
Transduction Laboratories	Heidelberg, Deutschland

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	<i>Hypoxische Stabilisation von HIF-1α</i>	7
Abbildung 2:	<i>PI 3-Kinase und PTEN: Funktionelle Antagonisten</i>	13
Abbildung 3:	<i>Zelluläre und metabolische Insulin-Effekte</i>	16
Abbildung 4:	<i>Schema des pH3SVL Reporter-gen-Konstrukts</i>	24
Abbildung 5:	<i>Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pcDNA3-Myr-PI 3-K; pcDNA3.1-p85ΔiSH2 und pcDNA3-Myr-Akt</i>	25
Abbildung 6:	<i>Insulin induziert die Akkumulation von HIF-1α in normoxisch kultivierten HepG2-Zellen</i>	31
Abbildung 7:	<i>Zytotoxizität der Inhibitorsubstanzen LY294002, PD098059 und U0126</i>	33
Abbildung 8:	<i>LY294002 inhibiert die Insulin-induzierte Akkumulation von HIF-1α unter normoxischen Bedingungen</i>	34
Abbildung 9:	<i>Einfluss von LY294002 und PD098059 auf die Produktion von VEGF und EPO in Insulin-stimulierten, normoxischen HepG2-Zellkulturen</i>	35
Abbildung 10:	<i>IL-1β induziert HIF-1α in normoxischen HepG2- Kulturen</i>	36
Abbildung 11:	<i>LY294002 inhibiert die IL-1β- induzierte normoxische Akkumulation von HIF-1α</i>	37
Abbildung 12:	<i>Insulin und IL-1β steigern die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 in normoxisch kultivierten HRG1-Zellen</i>	38
Abbildung 13:	<i>LY294002 inhibiert die Akkumulation von hypoxisch induziertem HIF-1α</i>	40
Abbildung 14:	<i>LY294002 inhibiert die Luziferase-Aktivität in hypoxisch kultivierten HRG1-Zellen</i>	41
Abbildung 15:	<i>Einfluss der Kinase-Inhibitoren auf die hypoxisch gesteigerte Produktion von EPO und VEGF durch HepG2-Zellen</i>	42
Abbildung 16:	<i>Einfluss konstitutiv aktiver sowie inaktiver Formen von PI 3-K und Akt auf den normoxischen und hypoxischen HIF- 1α-Proteingehalt</i>	44
Abbildung 17:	<i>Einfluss von dominant-positiver PI 3-K auf die transkriptionelle Aktivität von HIF-1</i>	46
Abbildung 18:	<i>U0126 inhibiert die Luziferase-Aktivität in hypoxisch kultivierten HRG1-Zellen, nicht aber die HIF-1α- Akkumulation im Zellkern</i>	47
Abbildung 19:	<i>In vitro MAPK Phosphorylierungsstudien von HIF-1α</i>	48

7.4 Tabellen

Tabelle 1:	<i>Physiologische Stimuli einer normoxischen HIF-1 Aktivierung</i>	11
Tabelle 2:	<i>Nukleotidsequenzen der synthetischen TfHBS-Oligonukleotide für Gel Shift Analysen</i>	20

7.5 Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, deren Rat und Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben. Herrn Prof. W. Jelkmann danke ich für die Vergabe des Themas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Hierbei gilt mein besonderer Dank für die in jeder Hinsicht uneingeschränkte Unterstützung auch eigener Ideen und Vorhaben, die stets ein offenes Ohr fanden und konstruktiv diskutiert wurden. Für das entgegengebrachte Vertrauen unter anderem bei internationalen Kongressbeiträgen und die Hilfe beim Erstellen und der Korrektur meiner Manuskripte möchte ich mich besonders bedanken.

Herrn Dr. T. Hellwig-Bürgel danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die geduldige Einweisung in die molekularbiologische Methodik wie auch für die jederzeit tatkräftige Hilfe bei der Planung und Durchführung von Experimenten.

Bei Herrn Prof. R. Wenger und Dr. E. Metzen bedanke ich mich für anregende Diskussionen, das Überlassen von Arbeitsmaterialien sowie die Unterstützung der Planung und Finanzierung meines dreimonatigen Gastaufenthaltes in den USA.

Besonderer Dank gilt hier Prof. MD J. Caro sowie N. Sang, MD des *Institute for Hematologic Research (Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA)* für die hervorragende fachliche und persönliche Unterstützung und Betreuung während meines dortigen Gastaufenthaltes. Des Weiteren bedanke ich mich für die großzügige finanzielle Unterstützung dieses Reisevorhabens durch ein Stipendium des *Boehringer Ingelheim Fonds*. Ebenso danke ich der *Deutschen Physiologischen Gesellschaft* sowie dem *Verein der Freunde und Förderer der Universität zu Lübeck* für Reisestipendien im Zusammenhang mit Kongressteilnahmen.

Frau Dr. P. Stengel gilt ein besonderes Dankeschön für hilfreiche Anregungen und kritisches Korrekturlesen dieses Manuskriptes.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Eva sowie meiner Familie bedanken, die mir im Verlaufe meines Studiums und dieser Arbeit nach besten Kräften hilfreich zur Seite gestanden haben – Danke!

7.6 Lebenslauf

Personalien

Name: Daniel Philipp Stiehl
Geburtsort und -datum: Göttingen, 25. Juni 1976

Schulische und Universitäre Ausbildung

Mai 1996 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Melle in Melle (Prüfungsfächer: Deutsch, Mathematik, Chemie, Geschichte)
Okt. 1997 Immatrikulation in Humanmedizin an der Universität zu Lübeck (ehemals Medizinische Universität zu Lübeck)
Aug. 1999 Ärztliche Vorprüfung
Aug. 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Nov. 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

zusätzlich: Famulaturen in den Fachbereichen *Innere Medizin*, *Hämatologie und Onkologie* sowie *Neurologie*

Wissenschaftliche Tätigkeit

Feb. 2000 Aufnahme der experimentellen Studien zur vorliegenden Dissertation am Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. W. Jelkmann
Aug. 2002 dreimonatiger Gastaufenthalt an der *Cardeza Foundation for Hematologic Research* der Thomas Jefferson Universität, Philadelphia, PA, USA unter der Leitung von Prof. J. Caro, MD
(Forschungstipendium für Nachwuchswissenschaftler des *Boehringer Ingelheim Fonds*)

zusätzlich: seit 2000 studentischer Mitarbeiter im Praktikum der Physiologie für Humanmediziner am Physiologischen Institut der Universität zu Lübeck

Klinische Tätigkeit im Praktischen Jahr

- 16.06.- 08.08.03 **Klinik für Abdominalchirurgie**, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
(Prof. Dr. med. Bruch)
- 11.08.- 28.11.03 **Klinische Hämatologie/Onkologie**, Department of Internal Medicine, Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia/USA
(Prof. S. McKenzie, MD/PhD)
währenddessen Kurs in **Hämatopathologie**, TJUH
(Prof. R. Schwarting, MD)
- 01.12.03 - 19.03.04 **Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin**, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
(Prof. Dr. med. Kirchner)
- 22.03.04 - 15.05.04 **Klinik für Gefäßchirurgie**, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
(Prof. Dr. med. Bruch)

Stipendien

- 2001 Reisestipendium der **Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG)**; International annual meeting of the DPG in Berlin
- 2001 Reisestipendium der **Gesellschaft der Freunde und Förderer der Universität Lübeck**; Ostsee-physiologenkonferenz in Rostock
- 2002 Stipendium für Nachwuchswissenschaftler der **Boehringer Ingelheim Foundation for Basic Research in Biomedicine (B.I.F)** an der Thomas Jefferson University, Philadelphia/USA
- 2003 Reisestipendium der **Allianz Versicherungsgesellschaft** für ein PJ-Tertial an der Thomas Jefferson University, Philadelphia/USA
- 2003 Einladung durch Prof. J. Caro, Professor für Innere Medizin, als Gaststudent am **Thomas Jefferson University Hospital**, Philadelphia/USA, Klinik für Innere Medizin

7.7 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen:

Stiehl, D.P., Jelkmann, W., Wenger, R.H. und Hellwig-Bürgel, T. (2002). Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 α by insulin and interleukin-1 β involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway.

FEBS Lett. 512, 157-162

Sang, N., Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V. und Caro, J. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of Hypoxia-inducible Factors by its effects on p300.

J. Biol. Chem. 278, 14013-9.

Hellwig-Bürgel, T., Stiehl, D. P. und Jelkmann, W. (2003). HIF-1. More than a Hypoxia-inducible Transcription Factor.

in: Lahiri, S., Semenza, G. und Prabhakar, H. Oxygen Sensing: Responses and Adaptation to Hypoxia. 1. Aufl., 95-108, Marcel Dekker, New York, 2003.

Kongressbeiträge:

Stiehl, D., Jelkmann, W. und Hellwig-Bürgel T. (2001). Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) by insulin and interleukin-1 β is mediated via a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway.

Pflugers Arch. 441 [Suppl] R267

Jelkmann, W., Stiehl, D., Katschinski, D., Kreft, B. und Hellwig-Bürgel, T. (2002). HIF-1 DNA-binding and VEGF synthesis in human proximal tubular cell cultures require PI3 kinase activity.

Pflugers Arch. 443 [Suppl] S320

Jelkmann, W.E., Stiehl, D.P., Wenger, R.H. und Hellwig-Bürgel, T. (2002). Role of kinases in hypoxia-inducible factor 1 activation by hypoxia, insulin and interleukin 1.

FASEB J. 16, A451

Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., Caro, J. und Sang, N. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of Hypoxia-inducible Factor-1 by its effects on p300.

Ann. Hematol. 82, S109