

Aus dem Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

---

**HEMMUNG DES HYPOXIE- INDUZIERBAREN  
FAKTORS 1 (HIF-1) DURCH GLUKOKORTIKOIDE**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

**Anika Eva Wagner**

aus Gelnhausen

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.11.2006

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
- Dekan der Medizinischen Fakultät-

für meine Eltern

# INHALT

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i> .....	<i>I</i>
<i>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</i> .....	<i>IV</i>
<i>TABELLENVERZEICHNIS</i> .....	<i>V</i>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Bedeutung des Sauerstoffs für die Zelle</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Der Transkriptionsfaktor HIF-1</b> .....	<b>3</b>
1.2.1. Der Aufbau von HIF-1.....	3
1.2.2. Die Zielgene von HIF-1.....	5
1.2.3. HIF-1 Knock-out Mäuse.....	6
1.2.4. Die Regulation von HIF-1.....	6
1.2.5. Die Rolle der Kinasen bei der HIF-1-Aktivierung.....	8
1.2.6. Die normoxische Induktion von HIF-1 $\alpha$ .....	9
<b>1.3. Entzündung</b> .....	<b>12</b>
1.3.1. Glukokortikoide und Glukokortikoid-Rezeptor (GR).....	13
1.3.2. HIF-1 und Entzündung.....	16
<b>1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1. Chemikalien</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2. Zellkultur</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3. Zellkulturversuche</b> .....	<b>24</b>
2.3.1. Gesamtzellextraktion.....	25
2.3.2. Kernextraktion.....	25
2.3.3. Proteinbestimmung nach Bradford.....	26
<b>2.4. Western Blot</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5. Reportergenuntersuchungen</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b> .....	<b>27</b>
<b>2.7. RNA-Isolierung</b> .....	<b>29</b>
<b>2.8. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)</b> .....	<b>29</b>
<b>2.9. Real time RT-PCR</b> .....	<b>29</b>

2.10.	Plasmidherstellung .....	30
2.11.	In vitro Transkription/Translation (IVTT).....	30
2.12.	Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP).....	30
2.13.	Zytotoxizitätstest mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid) .....	31
2.14.	Messung von sekretiertem VEGF .....	32
2.15.	Radioaktive Markierung von EMSA-Oligonukleotiden .....	32
2.16.	HIF-1-EMSA .....	33
2.17.	Immunfluoreszenz .....	34
2.18.	Transiente Transfektion.....	34
2.19.	Herstellung kompetenter E.coli Bakterien .....	35
2.20.	Ligation von DNA in den Vektor pcDNA3.....	35
2.21.	Transformation von kompetenten E.coli Bakterien .....	35
2.22.	Mini-Präparation.....	36
2.23.	Maxi-Präparation .....	36
2.24.	Statistische Auswertung .....	36
3.	<b>ERGEBNISSE</b> .....	37
3.1.	Dex reduziert den nukleären HIF-1 $\alpha$ Proteingehalt .....	37
3.2.	Der Einfluss von Dex auf HIF-1 $\alpha$ ist ein kernspezifischer Prozess .....	38
3.3.	Dex beeinflusst auch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA .....	39
3.4.	Verschiedene Glukokortikoide beeinflussen die transkriptionelle Aktivität von HIF-1.....	41
3.5.	Der Effekt von Dex auf HIF-1 ist vom Glukokortikoid-Rezeptor (GR) .....	44
3.6.	Der GR und HIF-1 $\alpha$ interagieren <i>in vitro</i> .....	44
3.7.	Die Induktion des HIF-1-Zielgens VEGF durch IL-1 wird durch Dex aufgehoben .....	45
3.8.	VEGF-Sezernierung in HepG2-Zellen wird von Dex beeinflusst.....	46

3.9. Dex führt in Immunfluoreszenzen von transfizierten U2OS-Zellen zu einer Translokation des GR.....	47
4. <i>DISKUSSION</i> .....	51
4.1. Das synthetische Glukokortikoid Dex beeinflusst die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge in HepG2-Zellkulturen .....	51
4.2. Dex beeinflusst die DNA-Bindung von HIF-1 .....	52
4.3. Glukokortikoide beeinflussen die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 .....	53
4.4. Dex beeinflusst die HIF-1-Zielgenexpression .....	54
4.5. In vitro kommt es zu einer Protein-Protein-Wechselwirkung von GR mit HIF-1 $\alpha$ .....	55
4.6. Wie sieht ein möglicher neuer antiinflammatorischer Mechanismus für die Glukokortikoide aus? .....	56
4.7. Schlussbetrachtung.....	61
5. <i>ZUSAMMENFASSUNG</i> .....	64
6. <i>SUMMARY</i> .....	66
7. <i>LITERATURVERZEICHNIS</i> .....	68
8. <i>ANHANG</i> .....	84
8.1. Abkürzungen und Dimensionen.....	84
8.2. Danksagung.....	87
8.3. Lebenslauf .....	88
8.4. Wissenschaftliche Vorleistungen.....	89

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1</i>	<i>Der biologische Kreislauf von Sauerstoff zwischen Atmosphäre und Hydrosphäre.....</i>	<i>2</i>
<i>Abb. 2</i>	<i>Struktur des Transkriptionsfaktors HIF-1.....</i>	<i>4</i>
<i>Abb. 3</i>	<i>Die Regulation von HIF-1.....</i>	<i>8</i>
<i>Abb. 4</i>	<i>Struktur des GR.....</i>	<i>14</i>
<i>Abb. 5</i>	<i>Schema des pH3SVL Reportergen-Konstrukts.....</i>	<i>27</i>
<i>Abb. 6</i>	<i>Zytotoxizität von Dex.....</i>	<i>37</i>
<i>Abb. 7</i>	<i>Dex reduziert sowohl das hypoxisch induzierte als auch das durch IL-1<math>\beta</math> in Normoxie induzierte HIF-1<math>\alpha</math>-Protein.....</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 8</i>	<i>Der Effekt von Dex auf HIF-1<math>\alpha</math> ist nur in Kernextrakten zu finden.....</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 9</i>	<i>Die DNA-Bindung von HIF-1 wird durch Dex reduziert.....</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 10</i>	<i>Die DNA-Bindung von NF-<math>\kappa</math>B wird durch IL-1 induziert und durch Dex wieder reduziert.....</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 11</i>	<i>Glukokortikoide reduzieren die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 in HRG1-Zellen...43</i>	
<i>Abb. 12</i>	<i>Dex reduziert die transkriptionelle Aktivität von HIF-1<math>\alpha</math> nur bei vorhandenem GR.....44</i>	
<i>Abb. 13</i>	<i>HIF-1<math>\alpha</math> und GR interagieren in vitro.....45</i>	
<i>Abb. 14</i>	<i>Durch IL-1<math>\beta</math> induzierte VEGF<sub>165</sub>-mRNA wird durch Dex reduziert.....46</i>	
<i>Abb. 15</i>	<i>Die VEGF<sub>165</sub>-Sekretion wird in HepG2-Zellen durch Dex beeinflusst.....47</i>	
<i>Abb. 16</i>	<i>Immunfluoreszenz von hypoxischen U2OS-Zellen.....48</i>	
<i>Abb. 17</i>	<i>Immunfluoreszenz von hypoxische inkubierten und mit Dex behandelten U2OS-Zellen.....48</i>	
<i>Abb. 18</i>	<i>Immunfluoreszenz von normoxischen U2OS-Zellen.....49</i>	
<i>Abb. 19</i>	<i>Immunfluoreszenz von normoxische inkubierten und mit Dex behandelten U2OS-Zellen....49</i>	
<i>Abb. 20</i>	<i>Immunfluoreszenz von normoxischen U2OS-Zellen ohne Antikörperbehandlung.....50</i>	
<i>Abb. 21</i>	<i>Mögliche Mechanismen der Wirkung von Glukokortikoiden auf HIF-1.....61</i>	

**TABELLENVERZEICHNIS**

<i>Tab. 1</i>	<i>Übersicht über HIF-1-Zielgene. Eine ausführliche Übersicht findet sich bei Semenza (2003, Nat Reviews).....</i>	<i>6</i>
<i>Tab. 2</i>	<i>Zelllinien, die durch Zytokinbehandlung unter normoxischen Bedingungen HIF-1<math>\alpha</math> induzierbar sind.....</i>	<i>11</i>
<i>Tab. 3</i>	<i>Nukleotidsequenzen der synthetischen TfHBS-Oligonukleotide und NF<math>\kappa</math>B-Oligonukleotide für Gel Shift Analysen.....</i>	<i>33</i>

# 1. EINLEITUNG

Sauerstoff ist für alle biologischen Organismen essentiell und stellt die Grundvoraussetzung für die Atmungsvorgänge der aeroben Lebewesen dar.

## 1.1. Bedeutung des Sauerstoffs für die Zelle

Sauerstoff wurde von dem Schweden Carl Wilhelm Scheele und dem Engländer Joseph Priestley nahezu zeitgleich jedoch unabhängig voneinander entdeckt. 1771/1772 entdeckte Scheele beim Erhitzen von Silber- und Quecksilbercarbonat, Quecksilberoxid, Kalium- und Magnesiumnitrat ein Gas, das er zunächst als Feuerluft bezeichnete. Joseph Priestley experimentierte ebenfalls mit Quecksilberoxid. 1774 erhitzte er diese Verbindung und stellte den Sauerstoff mit durch eine Linse gebündelten Sonnenstrahlen dar. Die bekannteste Form des Sauerstoffs ist der zweiatomige Disauerstoff ( $O_2$ ). [Römpf Chemie Lexikon, 1995].

1,2 – 1,5 Milliarden Jahre nach Entstehung der Erde entwickelten sich phototrophe Organismen, die Photosynthese durchführen konnten. Diese neue Methode der Energiegewinnung bewirkte eine Veränderung der gesamten Biosphäre. Die notwendige Energie bezogen diese Organismen aus dem Licht, während als Wasserstoffquelle Wasser diente. Sauerstoff fiel bei der Photosynthese lediglich als Abfallprodukt an, was jedoch im Laufe von Hunderten Millionen Jahren zu der heutigen sauerstoffhaltigen Atmosphäre führte [Nelson und Cox, 2001]. Liegen photosynthetische und Sauerstoff-verbrauchende Reaktionen in der Biosphäre im Gleichgewicht, so entsteht ein geschlossener Sauerstoff-Kreislauf (Abbildung 1) [Schäfer, 2004].

Mehrzellige Organismen haben mit den Atemwegen und den Lungen ein komplexes System entwickelt, um eine zuverlässige Verteilung von Sauerstoff im Organismus zu gewährleisten. Die große Oberfläche dieser Organe ermöglicht einen effizienten Austausch von  $O_2$  zwischen Luft und Blut. In den roten Blutzellen wird der Sauerstoff an den roten Blutfarbstoff Hämoglobin gebunden. Die Zirkulation des Blutes durch den gesamten Organismus ermöglicht eine ausreichende Sauerstoffversorgung. In der Zelle werden unter Energiefreisetzung in der mitochondrialen Atmungskette vier Elektronen schrittweise auf den Elektronen-Akzeptor Sauerstoff übertragen, sodass zwei Moleküle  $O_2^-$  entstehen, welche mit freien Wasserstoffionen sofort zu  $H_2O$  reagieren. Mit dieser Reaktion schließt sich der biologische Kreislauf des Sauerstoffs (Abbildung 1) [Schäfer, 2004]. Sauerstoff ist

damit maßgeblich an der Bildung des energiereichen Substrats Adenosintriphosphat (ATP) beteiligt. ATP besteht aus einem Adeninrest, einer Riboseeinheit und drei Phosphatresten. Ein Phosphatrest ist über eine Esterbindung an die Hydroxylgruppe der Riboseeinheit gebunden, die beiden anderen über energiereiche Säureanhydridbindungen. Die Hydrolyse einer solchen Säureanhydridbindung setzt eine große Menge Energie frei, die von der Zelle in mechanische Arbeit umgesetzt, für Biosynthesen oder den aktiven Transport von Molekülen genutzt werden kann [Müller-Esterl, 2004]. In eukaryontischen Zellen ist die Bildung von ATP durch oxidative Phosphorylierung nur unter aeroben Bedingungen möglich. Um auch bei sinkender Sauerstoff-Versorgung die Energieversorgung zu gewährleisten, haben fast alle Organismen und Gewebe die Möglichkeit, durch die anaerobe Glykolyse ATP zu gewinnen. Allerdings beträgt die dabei zu gewinnende ATP-Menge lediglich 5% verglichen mit der aeroben Glykolyse, bei der die Stoffwechselprodukte weiter metabolisiert und schließlich in der Atmungskette oxidativ phosphoryliert werden.

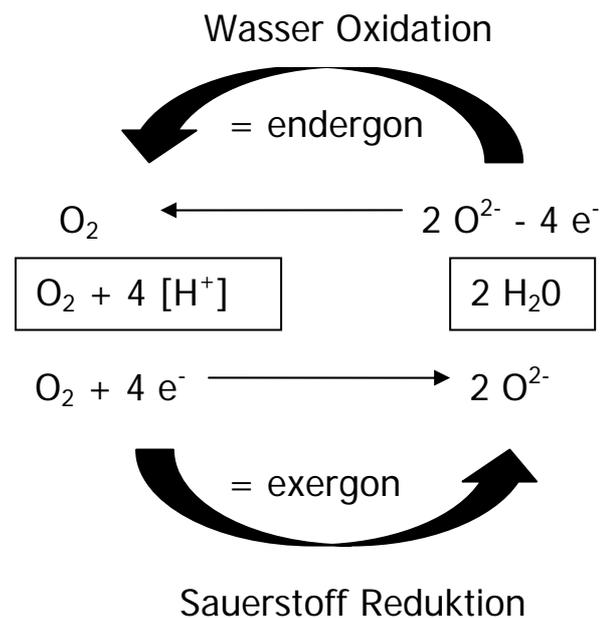


Abb. 1 Der biologische Kreislauf von Sauerstoff zwischen Atmosphäre und Hydrosphäre.

## 1.2. Der Transkriptionsfaktor HIF-1

Um ausreichend Sauerstoff für die entscheidenden Sauerstoff-abhängigen Prozesse im Organismus zur Verfügung zu stellen, bedarf es einer strikten Regulation der Sauerstoff-Homöostase. Übersteigt der Sauerstoffbedarf das Sauerstoffangebot, besteht also eine Hypoxie, kommt es zu verschiedenen physiologischen Reaktionen im Organismus. Beispielsweise steigt die Transportkapazität des Blutes für Sauerstoff an, um die Versorgung der Gewebe weiterhin zu gewährleisten. Außerdem gewinnt die Zelle das ATP „vereinfacht“ über die anaerobe Glykolyse. Im Organismus gibt es hypoxische Anpassungsmechanismen, die über die sogenannten Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) vermittelt werden. Sie regulieren auf transkriptioneller Ebene die Antwort des Organismus auf den Sauerstoffmangel.

### 1.2.1. Der Aufbau von HIF-1

HIF-1 wurde durch Semenza und Wang [Semenza und Wang, 1992] identifiziert, die zunächst im 3' Enhancer des Erythropoietin Gens ein Hypoxie-responsibles Element (hypoxia responsive element, HRE) entdeckten. Im darauffolgenden Jahr charakterisierten die beiden Autoren HIF als ein phosphorylierungsabhängiges und redoxsensitives Protein, das unter hypoxischen Bedingungen an die große Furche der DNA bindet [Wang und Semenza, 1993]. Die erfolgreiche Klonierung, anschließende Aufreinigung und Sequenzierung zeigte, dass es sich bei HIF um einen heterodimeren Komplex aus einem neuen Protein namens HIF-1 $\alpha$ , und dem bereits als Bindungspartner des Dioxin/Arylhydrocarbon Rezeptors (DR/AhR) bekannten Protein aryl-hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) handelt, welcher nun auch als HIF-1 $\beta$  bezeichnet wird [Wang und Semenza, 1995; Wang et al., 1995]. Für HIF-1 $\alpha$  wurde sowohl ARNT als auch p300/CBP als Bindungspartner identifiziert [Li et al., 1996; Arany et al., 1996]. Nicht nur HIF-1 $\alpha$  sondern auch HIF-1 $\beta$  gehören zur Klasse der basischen helix-loop-helix bHLH/PAS Proteine. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist 100-120 kDa groß, die  $\beta$ -Untereinheit 91-94 kDa. In Abbildung 2 ist die Struktur von HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  dargestellt.

Die bHLH-Domäne vermittelt neben der Dimerisierung der Untereinheiten auch die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors, die PAS-Domäne stellt einen zusätzlichen Vermittler für die Dimerisierung dar [Semenza, 1999]. PAS ist ein Akronym, das aus den ersten Mitgliedern dieser Proteinfamilie: Per/ARNT/Sim zusammengesetzt ist [Taylor und Zhulin, 1999]. HIF-1 $\alpha$  besitzt N-terminal und C-terminal eine nukleäre

Lokalisationssequenz (NLS), wobei nur die C-terminale NLS den Kernimport vermittelt [Depping et al., 2005]. Außerdem gibt es zwei transaktivierende Domänen (TAD) im Carboxy-terminalen Bereich, die mit den Ko-Aktivatoren (z.B. CBP und p300) interagieren und so die Transkription aktivieren. Beide TADs werden durch die inhibitorische Domäne (ID), die unter normoxischen Bedingungen die TAD-Aktivität unterdrückt, voneinander getrennt. Die N-terminale TAD wird von einer sauerstoffabhängigen Degradationsdomäne (oxygen dependent degradation domain, ODDD) überlagert, die für die normoxische Instabilität von HIF-1 $\alpha$  verantwortlich ist [Jiang et al., 1997; Pugh et al., 1997; Kallio et al., 1998; Ema et al., 1999; Carrero et al., 2000].

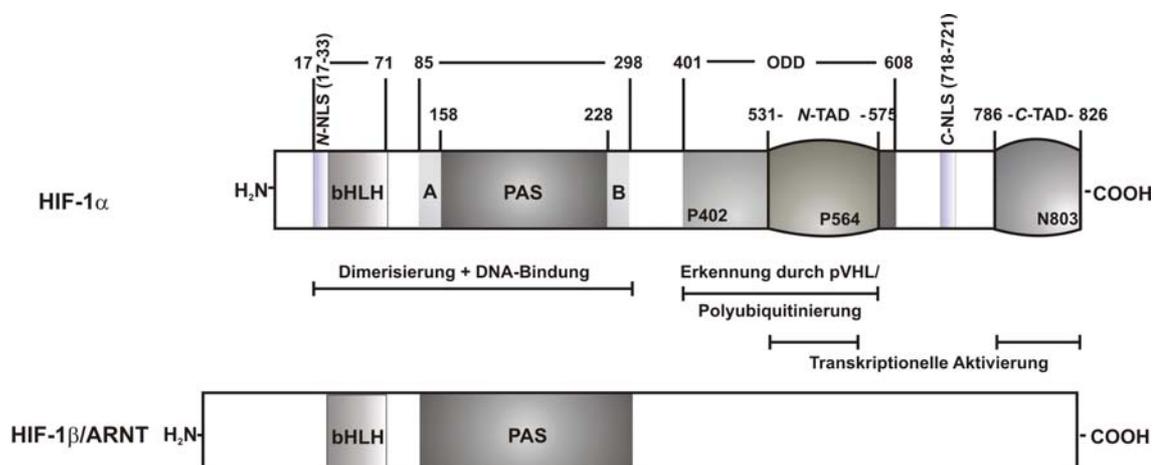


Abb. 2 Struktur des Transkriptionsfaktors HIF-1.

Kurz nach der Klonierung von HIF-1 $\alpha$  wurde ein zweiter Hypoxie-induzierbarer Faktor, HIF-2 $\alpha$ , entdeckt. Dieser stimmt zu 48% mit der Sequenz von HIF-1 $\alpha$  überein, heterodimerisiert ebenfalls mit HIF-1 $\beta$  und bindet an die HREs [Tian et al., 1997; Ema et al., 1997]. Darüber hinaus weisen beide Proteine eine sehr ähnliche Struktur auf. Untersuchungen von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  zeigen, dass beide Proteine sowohl in Human- als auch in Mausgewebe ständig sauerstoffunabhängig exprimiert werden [Tian et al., 1997; Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Wenger et al., 1997; Wiesener et al., 1998]. Gu et al. fanden 1998 [Gu et al., 1998] noch ein drittes HIF-Protein (HIF-3 $\alpha$ ). Neben der Dimerisierung mit HIF-1 $\beta$  und der Bindung an die HRE-Sequenzen der DNA, ist es auch in der Lage, Reporterexpression Hypoxie- und HIF-1 $\beta$ -abhängig zu induzieren. Eine Splicevariante von HIF-3 $\alpha$ , das sogenannte „inhibitory PAS“ (IPAS), wurde von Makino

et al. [Makino et al., 2001] identifiziert. Das Protein scheint als dominant-negativer Regulator von HIF-1 zu funktionieren, indem es mit der N-terminalen Region von HIF-1 $\alpha$  interagiert und so die DNA-Bindung verhindert. IPAS wird in den Purkinje Zellen des Kleinhirns und der Hornhaut des Auges exprimiert und ist in der Lage einer hypoxisch-induzierten Angiogenese entgegenzuwirken. In Herz und Lunge ist IPAS hypoxisch induzierbar und führt in diesen Geweben möglicherweise zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus der HIF-Aktivität [Makino et al., 2002].

### **1.2.2. Die Zielgene von HIF-1**

HIF-1 bindet an die HREs mit der Sequenz (A/G)CGTG in den regulierenden Regionen der Zielgene, was zu einer Steigerung der Genexpression führt [Semenza und Wang, 1992; Kvietikova et al., 1995; Wenger et al., 1998]. Viele dieser HIF-1-Zielgene können nach ihrer Funktion geordnet werden. Beispielsweise wird die Transportkapazität der roten Blutkörperchen für Sauerstoff durch Gene, die an der Erythropoiese beteiligt sind, erhöht. Dazu gehören das Erythropoietin (Epo) sowie einige Gene die am Eisenstoffwechsel beteiligt sind und die Hämbildung kontrollieren. Neben dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), der die Angiogenese induziert, sind auch die für die Glukoseaufnahme und Glykolyse verantwortlichen Gene direktes Ziel von HIF-1. Damit werden sowohl kurzfristige, hypoxisch induzierte Reaktionen, wie Erythropoiese und Glykolyse, als auch langfristige Reaktionen wie die Angiogenese reguliert [Bracken et al., 2003]. Aber es scheint, als ob HIF sehr viel mehr Prozesse reguliert. Es wurden bereits erste Hinweise gefunden, dass HIF an der Regulierung der Adipogenese [Yun et al., 2002], der Apoptose [Bruick, 2000], Entwicklung der B-Lymphozyten [Kojima et al., 2002] und der Karotiskörperchen-Entwicklung [Kline et al., 2002] beteiligt ist. Tabelle 1 zeigt eine Auflistung einiger HIF-1-Zielgene.

**Tab. 1 HIF-1-Zielgene.** Eine ausführliche Übersicht findet sich bei Semenza [Semenza, 2003].

Zielgene von HIF-1	
Zellproliferation	IGF-2, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 3, u. a.
Überleben der Zellen	EPO, NOS-2, VEGF, u. a.
Motilität	TGF- $\alpha$ , LRP-1, u. a.
Zelladhäsion	MIC-2
Erythropoiese	EPO
Angiogenese	VEGF, TGF- $\beta$ 3, EG-VEGF, u.a.
Vaskulärer Tonus	A1B-adrenerger Rezeptor, Haemoxygenase-1, NOS-2 u.a.
Transkriptionelle Regulation	DEC-1, NUR-77, u. a.
pH-Regulation	Carboanhydrase 9
Eisenstoffwechsel	Ceruloplasmin, Transferrin, Transferrin-Rezeptor
Glukosestoffwechsel	GLUT-1, GAPDH, PGK-1, u. a.

### 1.2.3. HIF-1 Knock-out Mäuse

Mäuse, in denen das HIF-1 $\alpha$  Gen ausgeschaltet ist, sogenannte HIF-1 $\alpha$  -/- Knock-out Mäuse, sind nicht lebensfähig - die Embryonen sterben bereits an Tag 11 der Embryonalentwicklung. Diese Embryonen entwickeln einen Phänotyp, der mit defekter Gefäßbildung, kardiovaskulärer Fehlbildungen und Neuralrohrdefekten aufgrund des Absterbens von mesenchymalen Zellen einhergeht. HIF-1 $\alpha$  -/- embryonale Stammzellen zeigen neben einer verminderten Proliferation auch niedrigere Spiegel hypoxisch-induzierbarer HIF-1-Zielgene [Iyer et al., 1998; Kotch et al., 1999]. Sind die Mäuse heterozygot, also HIF-1 +/-, entwickeln sich die Tiere normal, allerdings sind einige physiologische Funktionen verglichen mit den Wildtyp-Tieren verändert. Bei einer andauernden Hypoxie entwickeln sie eine Hypertrophie im rechten Ventrikel des Herzens, Lungenhochdruck, ein verringerter Anstieg der Erythrozytenzahl sowie eine anormale vaskuläre Gefäßumbildung [Kline et al., 2002; Yu et al., 1999].

### 1.2.4. Die Regulation von HIF-1

Unter normoxischen Bedingungen ist die  $\alpha$ -Untereinheit instabil und wird rasch abgebaut [Wang et al., 1995; Yu et al., 1998; Huang et al., 1998]. Dieser Abbau wird durch die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODDD) des HIF-1 $\alpha$  kontrolliert [Huang et al.,

1998], in der zwei Prolinreste Pro-402 und Pro-564 hydroxyliert werden [Masson et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Ivan et al., 2001]. Diese Reaktion wird durch die HIF-1 $\alpha$ -spezifischen Prolylhydroxylase-Domäne enthaltenden Enzyme (PHDs) katalysiert. PHDs gehören zur Enzymklasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen und Fe<sup>2+</sup>-abhängigen Dioxygenasen [Epstein et al., 2001]. Im menschlichen Organismus werden mindestens drei verschiedene HIF- $\alpha$  PHDs exprimiert; dabei ist PHD-1 ausschließlich im Zellkern, PHD-2 hauptsächlich im Zytoplasma und PHD-3 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert [Huang et al., 2002; Metzzen et al., 2003].

Sauerstoff bindet an das Fe<sup>2+</sup> der PHDs und wird gespalten, wobei ein O zum Prolinrest gelangt, während das andere O bei der Umwandlung von 2-Oxoglutarat zu Succinat das CO<sub>2</sub> bildet. In dieser Reaktion verhindert Ascorbat die spontane Oxidation von Fe<sup>2+</sup> [Knowles et al., 2003]. Da die PHDs für ihre Enzymaktivität Sauerstoff benötigen, werden sie als die physiologischen Sauerstoff-Sensoren bezeichnet. Unmittelbar nach Hydroxylierung der Proline bindet dort das „von Hippel-Lindau“ Genprodukt (pVHL) [Jaakkola et al., 2001; Ivan et al., 2001], das als Substrat für die E3-Ubiquitinligase dient [Maxwell et al., 1999; Ohh et al., 2000]. Diese polyubiquitiniert das HIF-1 $\alpha$ , was daraufhin im 26S Proteasom der Zelle abgebaut wird [Salceda und Caro, 1997; Huang et al., 1998]. Neben der Hydroxylierung der beiden Proline wird in Gegenwart von Sauerstoff auch ein Asparaginrest in Position 803 hydroxyliert, vermittelt durch die HIF-1 $\alpha$  Asparaginyli-Hydroxylase, auch als „Factor-inhibiting HIF“ (FIH) bezeichnet. Dadurch wird die Bindungsfähigkeit von HIF-1 $\alpha$  an den transkriptionellen Ko-Aktivator CBP/p300 abgeschwächt [Lando et al., 2002; Dann et al., 2002; McNeill et al., 2002; Metzzen et al., 2003].

Da molekularer Sauerstoff für die Aktivität der PHDs und des FIH essentiell ist, kann HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen folglich nicht abgebaut werden. Über Bindung an Importin  $\alpha$  gelangt HIF-1 $\alpha$  in den Zellkern [Depping et al., 2005], wo es mit HIF-1 $\beta$  dimerisieren und schließlich als Dimer an die HRE der Promotor- oder Enhancerregion von Sauerstoff-abhängigen Genen binden kann [Semenza et al., 1996; Camenisch et al., 2001]. Die hydroxylierenden Enzyme benötigen neben dem molekularen Sauerstoff auch Fe<sup>2+</sup> für ihre katalytischen Reaktionen. Der Abbau von HIF-1 $\alpha$  kann so beispielsweise durch Eisenchelatoren wie Desferrioxamin (DFO) [Masson und Ratcliffe, 2003] oder auch durch Kobaltchlorid, dessen Wirkung vermutlich auf die Verdrängung des Eisens aus dem aktiven Zentrum der PHDs zurückzuführen ist [Epstein et al., 2001], verhindert werden.

Die normoxische und hypoxische Regulation von HIF-1 $\alpha$  ist in Abbildung 3 in einem Schema dargestellt.

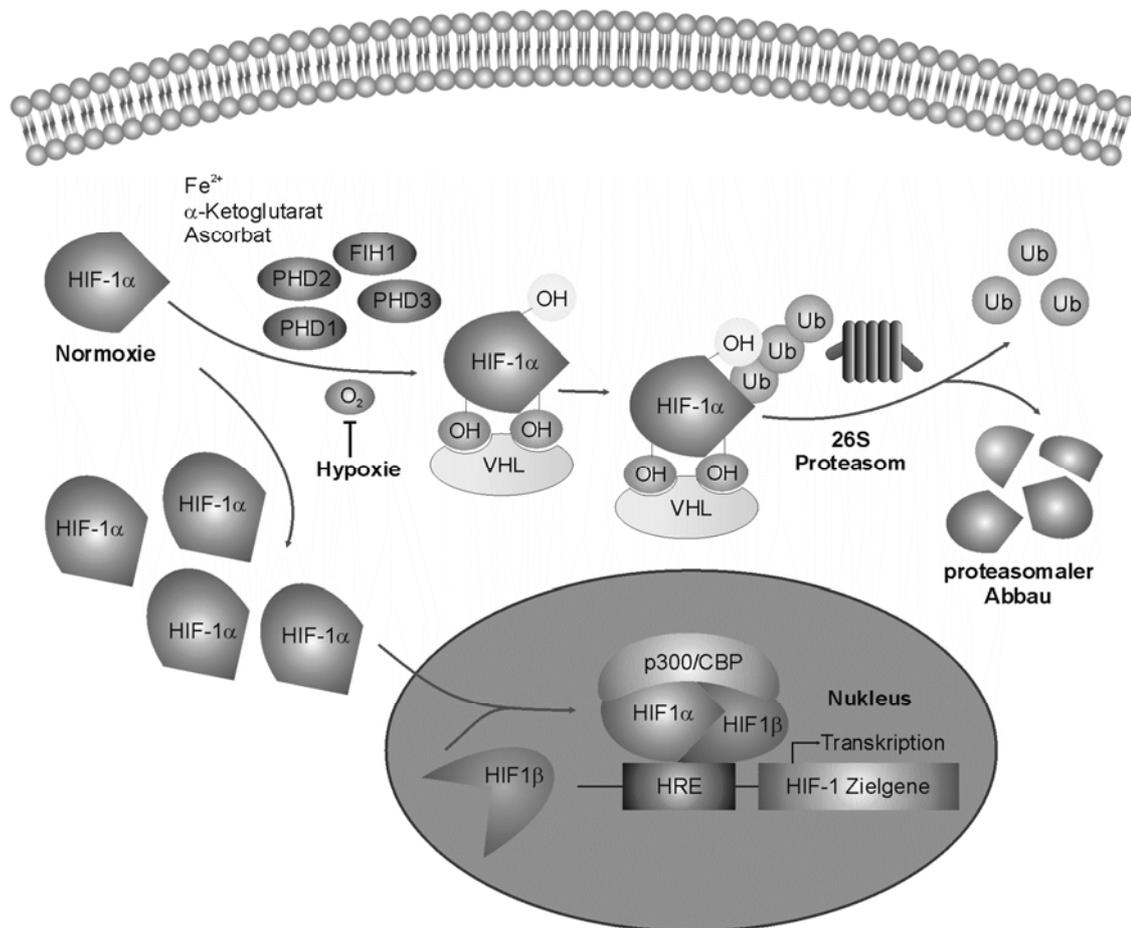


Abb. 3 Die Regulation von HIF-1.

### 1.2.5. Die Rolle der Kinasen bei der HIF-1-Aktivierung

Sowohl an der hypoxischen als auch an der Liganden-induzierten HIF-1-Aktivierung sind zwei Phosphorylierungswege beteiligt: der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K/Akt)-Weg und der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weg [Hellwig-Bürgel et al., 2005a]. Die PI3K gehört zu einer weit verbreiteten Familie von intrazellulären Regulationsproteinen, die durch die Evolution konserviert wurden. In den Wirbeltieren sind vier verschiedene PI3K-Gene beschrieben [Wyman und Pirola, 1998; Vanhaesebroeck et al., 2001]. Einige Gruppen zeigen, dass eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zu einem Anstieg der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge führt [Sodhi et al., 2001; Zhong et al., 2000; Chan et al., 2003],

während andere Autoren diese Beziehung nicht bestätigen [Alvarez-Tejado et al., 2002; Arsham et al., 2002]. Die HIF-1 $\alpha$ -Proteinsynthese wird durch Liganden wie Insulin [Zelzer et al., 1998; Feldser et al., 1999; Jiang et al., 2001; Stiehl et al., 2002], Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs) [Zelzer et al., 1998; Feldser et al., 1999; Shibata et al., 2003] und Heregulin [Laughner et al., 2001], die über den PI3K/Akt-Signalweg wirken, induziert [Treins et al., 2002]. Durch Inhibitoren des PI3K/Akt-Weges, wie Wortmannin und LY294002, wird die hypoxisch oder Liganden-induzierte HIF-1 $\alpha$ -Akkumulierung verhindert [Jiang et al., 2000; Sandau et al., 2001]. Wird mTOR (mammalian target of rapamycin), das PI3K/Akt im Signalweg nachgeschaltet ist, mit Rapamycin gehemmt, so sind in humanen Prostatakarzinom-Zellen [Zhong et al., 2000] und Mammakarzinom-Zellen (MCF-7) [Laughner et al., 2001] reduzierte HIF- $\alpha$ -Spiegel zu finden, was allerdings für die Maus-Fibroblasten-Zelllinie 3T3 nicht bestätigt werden konnte [Laughner et al., 2001]. Eine Hemmung der PI3K führt weiterhin zu einer reduzierten Bildung von Hitzeschock-Protein 90 (HSP 90) und Hitzeschock-Protein 70 (HSP 70), die als Chaperone an der Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins beteiligt sind [Zhou et al., 2004].

Die Phosphorylierung des HIF-1 $\alpha$  in der C-TAD wird durch die p38 oder p42/44 MAPKs katalysiert, was zu einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität des HIF-1-Komplexes führt [Richard et al., 1999; Minet et al., 2000]. Wird die MAPK-Kinase-1 (MEK-1) mit dem Inhibitor PD98059 blockiert, ist zwar in den meisten Zelllinien kein Einfluss auf die Stabilität des HIF-1 $\alpha$  zu beobachten, aber es hemmt das transaktivierende Potential von HIF-1 [Hur et al., 2001; Sodhi et al., 2000]. Nach einer Untersuchung von Sang et al. [Sang et al., 2003] wird deutlich, dass die Phosphorylierung der C-TAD scheinbar nicht so wichtig ist wie die der Transkriptionsfaktoren. Tatsächlich wird p300 durch die p42/44 MAPK phosphoryliert, was die Interaktion von p300 mit der C-TAD von HIF-1 $\alpha$  erleichtert; diese kann durch die Hemmung der MAPK verhindert werden [Sang et al., 2003; Gusterson et al., 2002].

### **1.2.6. Die normoxische Induktion von HIF-1 $\alpha$**

Einige Peptidmediatoren wurden bereits entdeckt, die eine HIF-1 $\alpha$ -Akkumulierung und HIF-1-DNA-Bindung auch in Normoxie hervorrufen können. Dazu gehören neben den Zytokinen sowohl Hormone wie Insulin oder IGF-1 und IGF-2 als auch vasoaktive Peptide wie Angiotensin II. Alle erwähnten Faktoren steigern auch die hypoxische HIF-1-Induktion, was möglicherweise im Vergleich zur normoxischen Induktion eine weit größere funktionelle Relevanz haben könnte [Hellwig-Bürgel et al., 2005b]. 1999 zeigten

Hellwig-Bürgel et al. [Hellwig-Bürgel et al., 1999], dass eine Behandlung der humanen Hepatomzelllinie HepG2 mit den Zytokinen Interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und dem Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zu einem Anstieg der HIF-1-Aktivität führt. Interessant war dabei, dass IL-1 $\beta$  nicht nur die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge sondern auch die HIF-1-DNA-Bindung in normoxisch inkubierten HepG2-Zellen erhöhte. Bei TNF- $\alpha$  ist zwar eine Steigerung der HIF-1-DNA-Bindung zu beobachten, allerdings bleibt der HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalt im Zellkern unverändert. Die HIF-1 $\alpha$  mRNA Spiegel werden weder von IL-1 $\beta$  noch von TNF- $\alpha$  beeinflusst. Der IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Effekt ist auch in anderen Zelllinien zu finden (siehe Tabelle 2).

**Tab. 2 Zelllinien, die durch Zytokinbehandlung unter normoxischen Bedingungen HIF-1 $\alpha$  induzierbar sind**

Zytokine	Zelllinie	Quelle
IL-1	Humane Hepatomzellen (HepG2)	[Stiehl et al., 2002] [Hellwig-Bürgel et al., 1999]
	Humane primäre renale proximale tubuläre Zellen	[El Awad et al., 2000] [Hellwig-Bürgel et al., 2005a]
	Humane gingivale/synoviale Fibroblasten	[Thornton et al., 2000]
TNF- $\alpha$	Humane Lungenepithelzellen (A549)	[Jung et al., 2003b]
	Humane Hepatomzellen (HepG2)	[Hellwig-Bürgel et al., 1999]
	Humane embryonale Nierenzellen (HEK-293)	[Jung et al., 2003a] [Zhou et al., 2003]
	Humane Mammacarcinomzellen (MCF-7) Renale tubuläre Zellen des Schweins	[Jung et al., 2003a] [Sandau et al., 2001] [Zhou et al., 2003]
	Polymorphkernige Zellen und Makrophagen der Ratte	[Albina et al., 2001]
	Fötale alveoläre Typ II Epithelzellen der Ratte	[Haddad und Land, 2001]
TGF- $\beta$	Mausfibroblasten (3T3)	[Jung et al., 2003a]
	Humane Fibrosarkomzellen (HT-1080) Humane vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta	[Shih und Claffey, 2001] [Görlach et al., 2001]
FGF-2	Humane embryonale Nierenzellen (HEK-293)	[Feldser et al., 1999]
EGF	Vaskuläre glatte Muskelzellen der Ratte	[Richard et al., 2000]
	Humane embryonale Nierenzellen (HEK-293)	[Feldser et al., 1999]
Heregulin	Humane Prostatakrebszellen (PC-3, DU 145, TSU, PPC-1)	[Zhong et al., 2000]
	Humane Brustkrebszellen (MCF-7)	[Jiang et al., 2001]
HGF	Humane Hepatomzellen (HepG2)	[Laughner et al., 2001]
PDGF	Primäre vaskuläre glatte Muskelzellen der Ratte	[Tacchini et al., 2001]
	Humane vaskuläre glatte Muskelzellen der Aorta	[Richard et al., 2000] [Görlach et al., 2001]

Scharte et al. [Scharte et al., 2003] haben IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in Kombination zu normoxisch inkubierten Dünndarmepithelzellen der Ratte gegeben (Linie JEC-6), was die HIF-1 $\alpha$  Akkumulation und die HIF-1-abhängige Genexpression induziert. Obwohl bei dieser Behandlung die NO-Synthese stimuliert wird, kann die durch HIF-1

induzierte Genexpression nicht durch den NO-Synthese-Inhibitor N-iminoethyllysin Hydrochlorid blockiert werden. Dies weist darauf hin, dass proinflammatorische Zytokine über einen NO-unabhängigen Mechanismus wirken. IL-1 und TNF- $\alpha$  sind in der Lage verschiedene intrazelluläre Signalwege, wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), p42/p44 MAPK, c-jun-terminale Kinase (JNK)/stressaktivierte Proteinkinase (SAPK) sowie den nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), anzuschalten [Hellwig-Bürgel et al., 2005b]. Die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  benötigt dafür die PI3K [Stiehl et al., 2002; Sandau et al., 2001]. Untersuchungen von Jung et al. [Jung et al., 2003b] an humanen Lungenepithelzellen (Linie A549) ergaben, dass IL-1 $\beta$  die HIF-1 $\alpha$ -Spiegel über zwei Wege induziert. Einerseits stimuliert IL-1 $\beta$  die HIF-1 $\alpha$ -Produktion durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B über PI3K/Akt/mTOR, andererseits hemmt es auch den pVHL-abhängigen Abbau von HIF-1 $\alpha$ . In primären humanen renalen proximalen tubulären Zellen wurde gezeigt, dass eine Hemmung der PI3K den Verlust der IL-1 $\beta$ -induzierten HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung zur Folge hat [Hellwig-Bürgel et al., 2005b]. Auch für eine durch TNF- $\alpha$  hervorgerufene normoxische HIF-1 $\alpha$ -Akkumulierung ist eine PI3K-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B notwendig [Jung et al., 2003a; Reddy et al., 2000]. Um HIF-1 $\alpha$  zu induzieren ist zwar eine gesteigerte Transkription notwendig, doch haben verschiedene Gruppen [Hellwig-Bürgel et al., 1999; Scharte et al., 2003; Jung et al., 2003a; Zhou et al., 2003], mit einer Ausnahme [Thornton et al., 2000], herausgefunden, dass die Transkription des HIF-1 $\alpha$ -Gens durch TNF- $\alpha$  nicht beeinflusst wird. Allerdings konnten Zhou et al. 2003 [Zhou et al., 2003] zeigen, dass eine Behandlung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) und renalen tubulären Schweinezellen (Linie LLC-PK1) mit TNF- $\alpha$  eine ubiquitinierte Form von HIF-1 $\alpha$  stabilisiert, an die pVHL immer noch binden kann. Daraus ergibt sich, dass entweder noch eine ausreichende Menge von nicht ubiquitiniertem HIF-1 $\alpha$  für den Kernimport vorhanden ist, oder aber, dass das ubiquitinierte HIF-1 $\alpha$  in der Lage ist, aktive Transkriptionskomplexe mit HIF-1 $\beta$  zu bilden.

### **1.3. Entzündung**

Bei einer Entzündung handelt es sich um eine Antwort des Gewebes auf eine Schädigung oder Infektion. Es gibt vier typische Symptome, die eine Entzündung charakterisieren:

Rötung (rubor), Schwellung (tumor), Wärme (calor) und Schmerz (dolor). Diese werden durch die Einwanderung weißer Blutzellen ausgelöst, die verschiedene Entzündungsmediatoren abgeben. Bei der Einleitung einer solchen Entzündungsreaktion spielen die beiden Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 eine wichtige Rolle. Sie werden von Zellen des angeborenen Immunsystems, den Makrophagen, gebildet und wirken proentzündlich. Durch die Bindung an die Zelloberflächen-Rezeptoren aktivieren sie NF- $\kappa$ B, was wiederum zur Transkription von mehr als 60 bekannten Genen, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, führt. Bei den Säugetieren sind fünf NF- $\kappa$ B-Proteine bekannt (RelA, RelB, NF- $\kappa$ B 1 und NF- $\kappa$ B 2), die Hetero- und Homodimere bilden [Hayden und Ghosh, 2004]. Sie werden als Dimere in großen Proteinkomplexen durch inhibitorische Proteine, die als I $\kappa$ B bezeichnet werden, inaktiv im Zytoplasma zurückgehalten [Greten und Karin, 2004; Hayden und Ghosh, 2004]. Bei einer Entzündung lösen die Signalmoleküle IL-1 und TNF- $\alpha$  einen Signalweg aus, der zu Phosphorylierung, Ubiquitinierung und schließlich zum Abbau von I $\kappa$ B und so zu einer Aktivierung der Dimere führt. Dadurch wird die NLS der NF- $\kappa$ B-Proteine freigelegt, sie wandern in den Kern und initiieren die Transkription spezifischer Gene [Ghosh und Karin, 2002].

### **1.3.1. Glukokortikoide und Glukokortikoid-Rezeptor (GR)**

Glukokortikoide gehören zur Klasse der stressinduzierbaren, endogen synthetisierten Steroidhormone. Sie regulieren eine Vielzahl biologischer Funktionen auf zell-, gewebe- und organspezifischer Ebene wie Entwicklung, Wachstum, Stoffwechsel, Verhalten und Apoptose. Unter Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse werden diese Hormone in der Nebennierenrinde gebildet und über das Blut an ihre Wirkorte transportiert [Barnes et al., 1998; Sapolsky et al., 2000]. Glukokortikoide sind die weltweit am meisten verschriebenen Substanzen. Aufgrund ihrer antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Effekte werden sie in der Therapie von Asthma, Dermatitis, Rheumatoider Arthritis, Transplantatabstossungen sowie Autoimmunerkrankungen eingesetzt [Coghlan et al., 2003; Barnes et al., 1995; Langhoff et al., 1986]. Ihre lipophilen Eigenschaften lassen sie frei durch die Zellmembran diffundieren und im Zytoplasma mit dem Glukokortikoid-Rezeptor (GR) interagieren. Die meisten hormon-induzierten Reaktionen werden über diesen Rezeptor vermittelt.

Der GR gehört zur Thyroid/Steroid Hormonrezeptor-Superfamilie und besitzt drei Domänen: eine N-terminale transaktivierende Domäne, eine zentrale Domäne mit zwei

Zinkfinger-Regionen, die DNA-Bindung und Rezeptordimerisierung vermittelt, sowie eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne [Giguere et al., 1986; Beato et al., 1995; Oro et al., 1988]. In Abbildung 4 ist die Struktur des GR dargestellt.



**Abb. 4 Struktur des GR.**

Im inaktiven Zustand ist der GR mit zwei HSP 90 und verschiedenen Immunophilinen verbunden. Wird der Rezeptor aktiviert, kommt es zu Konformationsänderungen, die HSP 90-Proteine lösen sich vom Rezeptor und legen damit dessen NLS frei [Isohashi und Okamoto, 1993; Okamoto et al., 1993]. Glukokortikoide entfalten ihre Wirkung über zwei Mechanismen. Bei der Transaktivierung gelangen die Rezeptoren über nukleäre Translokationsproteine als Homodimere in den Zellkern, interagieren dort mit dem Glukokortikoid responsiblen Element (GRE) und aktivieren so die Transkription [Refojo et al., 2001]. Bei der Transrepression kommt es über eine Protein-Protein-Wechselwirkung des GR mit einem anderen Transkriptionsfaktor zu einer Hemmung der Transkription von Zielgenen [Dumont et al., 1998]. Die Interaktionen zwischen dem aktivierten GR und den Transkriptionsfaktoren finden sowohl im Kern als auch im Zytoplasma statt [Adcock et al., 1996]. Es gibt also zwei Hauptwege, über die der GR die Transkription regulieren kann: 1. die Bindung des GR an ein positives GRE oder an ein negatives nGRE oder 2. transkriptionelle Interferenz über die Wechselwirkung des GR mit anderen Transkriptionsfaktoren [Karin, 1998].

Glukokortikoide beeinflussen die Chromatinstruktur. In Form von Nukleosomen wird die chromosomale DNA um Histonmoleküle gewunden. Einige Transkriptionsfaktoren interagieren mit großen Ko-Aktivatormolekülen, wie das CREB binding protein (CBP) und dem dazugehörigen Protein p300, die an das Transkriptionsfaktor System binden [Janknecht und Hunter, 1996]. Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF- $\kappa$ B und STAT sind in der Lage direkt an das CBP zu binden [Arias et al., 1994; Kamei et al., 1996; Zhang et al., 1996; Perkins et al., 1997]. Aufgrund einer begrenzten Menge an Bindungsstellen kommt es zwischen den Transkriptionsfaktoren zu einer Konkurrenz [Barnes et al., 1998].

Zunächst wurde der transrepressive Mechanismus der Glukokortikoide beschrieben, nämlich die Interaktion zwischen AP-1 und dem GR. Damit wurde die entzündungshemmende Aktivität der Glukokortikoide gezeigt, die durch die AP-1 Bindungsstelle des Kollagenase-Promotors hervorgerufen wird [Jonat et al., 1990; Schule et al., 1990]. Eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Steroide ist für den durch den GR vermittelten antiinflammatorischen Mechanismus hilfreich, da NF- $\kappa$ B in fast allen Zellen des Immunsystems zu finden ist und die meisten Gene der proinflammatorischen Zytokine durch diesen Faktor positiv reguliert werden [Refojo et al., 2001]. Der molekulare Mechanismus, über den Glukokortikoide die biologische Funktion der Zytokine unter NF- $\kappa$ B-Regulation antagonisieren, kann über zwei Wege ausgeübt werden [Wissink et al., 1998]. Ein Weg beinhaltet die physikalische Interaktion zwischen dem GR und NF- $\kappa$ B [Scheinman et al., 1995], wobei sowohl der Transkriptionsfaktor als auch der GR transkriptionell nicht aktiv sind. Während der GR mit dem aktivierten NF- $\kappa$ B interagiert, verhindert es die Wechselwirkung von NF- $\kappa$ B mit  $\kappa$ B-Bindungsstellen [Scheinman et al., 1995; Mukaida et al., 1994]. Diese Beobachtungen konnten jedoch von anderen Autoren nicht bestätigt werden [De Bosscher et al., 1997; Nissen und Yamamoto, 2000]. Bei dem zweiten Mechanismus wird I $\kappa$ B durch Glukokortikoide induziert [Scheinman et al., 1995; Auphan et al., 1995], was jedoch nicht bei allen Zelllinien stattfindet [Studer et al., 2000; Adcock et al., 1999; Steer et al., 2000]. Hier wird die NF- $\kappa$ B transkriptionelle Aktivität dadurch geblockt, dass eine größere Menge I $\kappa$ B-Protein mit aktiviertem NF- $\kappa$ B-Protein reagiert [Refojo et al., 2001]. Die Wechselwirkung des GR mit NF- $\kappa$ B oder AP-1 hemmt die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  und erklärt gleichzeitig die inhibitorischen Effekte von Steroiden auf Genexpression, Synthese und Ausschüttung von Zytokinen [Snyder und Unanue, 1982; Beutler und Cerami, 1986; Steer et al., 2000; Brack et al., 1997; Chensue et al., 1991; Joyce et al., 1997; Steer et al., 1997; Garrelds et al., 1999]. Darüber hinaus können die Funktionen der proentzündlichen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  durch NF- $\kappa$ B und AP-1 zum Kern vermittelt bzw. durch Glukokortikoide gehemmt werden [De Bosscher et al., 2001; Scheinman et al., 1995; Vanden Berghe et al., 1999; Ray et al., 1997].

Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich eine neue potentielle therapeutische Anwendungsmöglichkeit. Während die antiinflammatorischen Wirkungen der Glukokortikoide über den Transrepressions-Mechanismus laufen, werden die metabolischen und endokrinen Nebenwirkungen einer Glukokortikoid-Therapie über den

Transaktivierungs-Mechanismus vermittelt. Daraus entstanden Bemühungen, möglichst GR-Mutanten und Pharmaanaloga zu entwickeln, deren Wirkung nur über einen Mechanismus vermittelt wird, um die Nebenwirkungen der Glukokortikoid-Therapie zu reduzieren [Vanden Berghe et al., 1999; Heck et al., 1994; Heck et al., 1997; Vayssiere et al., 1997; Tao et al., 2001].

### **1.3.2. HIF-1 und Entzündung**

Wie bereits unter 1.2.6. erläutert, können Entzündungsmediatoren wie IL-1, TNF- $\alpha$  oder NO HIF-1 auch unter normoxischen Bedingungen stabilisieren. Viele der Zytokine, die HIF-1 induzieren, stimulieren auch die VEGF-Genexpression, wie z.B. TGF- $\beta$  und EGF [Hellwig-Bürgel et al., 2005b]. Die Genexpression des Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) wird bei Hypoxie hochreguliert und kann selbst wiederum die HIF-1-abhängige Genexpression durch einen autokrin-parakrinen Weg stimulieren [Zhang et al., 2003]. HIF-1 vermittelt die Expression von Genen, die für Angiogenese, Vasodilatation, vaskuläre Permeabilität, Glukoseaufnahme und Glykolyse verantwortlich sind. Diese gesteigerte Expression erscheint bei einer Entzündung sinnvoll, um den gesteigerten Nährstoffbedarf der entzündeten Gewebe zu decken [Bilton und Booker, 2003]. Dass HIF-1 ein Mediator für Immunreaktionen ist, wird sowohl durch klinische Befunde als auch durch tierexperimentelle Studien belegt. Makrophagen in rheumatoider Synovia zeigen im Gegensatz zu normaler Synovia hohe HIF-1 $\alpha$ -Spiegel [Hollander et al., 2001]. Albina et al. [Albina et al., 2001] finden heraus, dass unter TNF- $\alpha$ - aber nicht unter IL-1 $\beta$ -Behandlung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die aus dem Entzündungsgewebe künstlicher Wunden in Ratten isoliert werden, das HIF-1 $\alpha$ -Protein erhöht ist. Auch Scheid et al. [Scheid et al., 2002] detektieren am Rand von künstlich erzeugten Wunden am Schaf signifikant erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Spiegel während der inflammatorischen Phase der Wundheilung. Wird HIF-1 $\alpha$  in Makrophagen zielgerichtet zerstört, führt das unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen zu einem Verlust der Geninduktion von VEGF, des glykolytischen Enzyms Phosphoglycerat-Kinase und dem Glukose-Transporter GLUT-1 [Cramer et al., 2003]. Bei der Wundheilung und anderen Krankheitsbilder könnte durch Förderung der Angiogenese eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  durch hypoxische Mimetika vorteilhaft sein [Giaccia et al., 2003]. HSP 90-Antagonisten wie beispielsweise das Antibiotikum Geldanamycin, wirken antikanzerogen.

Diese Wirkungen werden zumindest teilweise auf die Destabilisierung von HIF-1 $\alpha$  und der damit verbundenen Abnahme der HIF-1-abhängigen Genexpression zurückgeführt [Isaacs et al., 2002]. Für die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und deren physiologisches Produkt Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) konnten Jung et al. [Jung et al., 2003b] zeigen, dass sie eine Hochregulierung von HIF-1 $\alpha$  in humanen Lungenepithel-Zellen und Kolon-Zellen bewirken. Nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente (NSAID) blockieren die Prostaglandin-Synthese, u. a. über Hemmung der Angiogenese, und beeinträchtigen so die Heilung gastrointestinaler Ulzera sowie das Wachstum von Kolon-Tumoren. Die HIF-1-abhängige Genexpression wird bezüglich VEGF und dessen Rezeptor Flt 1 reduziert, da NSAID die Bildung von pVHL induzieren und dieses wiederum für die Ubiquitinierung von HIF-1 $\alpha$  benötigt wird, was schließlich den Abbau des Proteins im Proteasom einleitet [Jones et al., 2002].

#### **1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit war bereits bekannt, dass verschiedene Substanzen, u. a. die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  [Hellwig-Bürgel et al., 1999], in der Lage sind, auch unter normoxischen Bedingungen HIF-1 zu stabilisieren. Dies war ein erster Hinweis auf die Verbindung zwischen HIF-1 und Entzündung. 2002 entdeckten Scheid et al. [Scheid et al., 2002] während der inflammatorischen Phase der Wundheilung an den Rändern künstlich erzeugter Wunden im Schaf erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Spiegel. Und auch mit den Ergebnissen von Cramer et al. [Cramer et al., 2003] an Makrophagen, waren weitere Anzeichen für die Beteiligung von HIF-1 an der Entzündungsantwort gefunden. Da Glukokortikoide zur Behandlung der Entzündung eingesetzt werden und bekannt ist, dass sie eine starke antientzündliche Wirkung haben, kam die Frage auf, ob eine Glukokortikoid-Behandlung möglicherweise HIF-1 beeinflusst oder sogar über dieses Protein seine Wirkung vermittelt. Dazu wurden Untersuchungen an der Hepatomzelllinie HepG2, der Hepatomzelllinie Hep3B und den aus diesen Zelllinien hervorgegangenen HRG-1 sowie HRB-5-Zellen, denen ein HIF-1 abhängiges Reportergen stabil transfiziert wurde, durchgeführt. Weitere Untersuchungen erfolgten an den Zervix-Karzinomzellen HeLa und primär kultivierten humanen Fibroblasten. Die Zellen sollten während der Behandlung mit Glukokortikoiden sowohl unter normoxischen (20% O<sub>2</sub>) als auch hypoxischen (3% O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert werden. Um festzustellen, ob Glukokortikoide auch das durch IL-1 $\beta$  induzierte HIF-1 beeinflussen, sollten die Zellen

zum Teil vor der Behandlung mit IL-1 $\beta$  stimuliert werden. Es sollten Methoden eingesetzt werden, die u. a. Aussagen über mögliche Veränderungen des HIF-1 $\alpha$ -Proteingehaltes, Abweichungen der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 und eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen HIF-1 und dem GR erlauben. Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die Hemmung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 durch Glukokortikoide einen neuen antiinflammatorischen Mechanismus darstellt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Chemikalien

Acrylamid	Rotiphorese, Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Biomol, Hamburg
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Becton, Frankreich
Borsäure	Fluka, Seelze
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Fluka, Seelze
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassieblau	Biomol, Hamburg
Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Seelze
DABCO (1,4-Diazobicyclo[2,2,2]-Octan)	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNA Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
dNTP	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
ECL	Amersham, Braunschweig
Ethanol 96%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe
FuGene6	Roche, Basel, Schweiz
G418	PAA Laboratories, Cölbe
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Biomol, Hamburg
Guanidin Thiocyanat	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Karlsruhe
NP-40	Fluka, Seelze
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Mowiol 4-88	Calbiochem, Darmstadt
Oligonucleotide	MWG, Ebersberg
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe
Poly-dIdC	Fluka, Seelze
Lachs Testis DNA	Sigma, Deisenhofen
Sephadex G-50	Amersham, Braunschweig
SDS	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat und Natriumpyrodox	Gibco, Karlsruhe
N, N, N', N' – Tetramethylethyl-	Fluka, Seelze

Enediamine (TEMED)	
Tris base	Biomol, Hamburg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Merck, Darmstadt
Urea	Merck, Darmstadt
<b>Radiochemikalien</b>	
$\gamma$ [ $^{32}$ ]-ATP, 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ L	NEN, Köln
$^{35}$ S-Methionin	Amersham, Braunschweig
<b>Ready Kits</b>	
„TNT®Quick coupled“ (Transkription/ Translations-System)	Promega, Mannheim
Assay on Demand for VEGF	Applied Biosystems, Darmstadt
ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
5x Lysepuffer für Luziferase-Assay	Promega, Mannheim
Nucleospin DNA Extraktionskit	Macherey & Nagel, Düren
Plasmid Mini Kit	Promega, Mannheim
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
SYBR green PCR kit	Applied Biosystems, Darmstadt
<b>Zytokine, Enzyme und Vektoren</b>	
Oligo(dT) Primer	Promega, Mannheim
<i>XhoI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>KpnI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
Interleukin-1 $\beta$	Ciba-Geigy, Basel
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T-4 kinase	MBI Fermentas, St Leon-Rot
T-4 ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Zelllinien und Medien</b>	
Humane Hepatom Zelllinie (HepG2)	ATCC, Rockville, MD, USA
Humane Hepatom Zelllinie (Hep3B)	ATCC, Rockville, MD, USA
Humane Zervixkarzinom Zelllinie (HeLa)	ATCC, Rockville, MD, USA
Humane Osteosarkom Zelllinie (U2OS)	ATCC, Rockville, MD, USA
HRG-1 Zellen (stabil transfizierte HepG2)	Institut für Physiologie, Lübeck
HRB-5 Zellen (stabil transfizierte Hep3B)	Institut für Physiologie, Lübeck
DMEM F12 (HAM)	Gibco, Karlsruhe
DMEM Medium	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco, Karlsruhe
Monoklonaler Anti- $\beta$ -Actin	Sigma, Deisenhofen
Monoklonaler Anti- HIF-1 $\alpha$	Transduction Laboratories, Heidelberg
Polyklonaler Anti-GR	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler Anti-SP1	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler Anti- NF-kB p50 Untereinheit	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler Anti- NF-kB p65 Untereinheit	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Mouse IgG-HRP Konjugat	DAKO, Hamburg

Anti-Rabbit IgG-HRP Konjugat DAKO, Hamburg  
 Anti-Goat IgG-HRP Konjugat DAKO, Hamburg

***Proteaseinhibitoren***

Aprotinin Fluka, Seelze  
 Benzamidin Fluka, Seelze  
 Leupeptin Calbiochem, Darmstadt  
 Levamisol Sigma, Deisenhofen  
 Pepstatin Calbiochem, Darmstadt  
 PMSF Sigma, Deisenhofen  
 Proteaseinhibitor Cocktail Calbiochem, Darmstadt

***Phosphataseinhibitoren***

$\beta$ -Glycerophosphat Sigma, Deisenhofen  
 Natrium-ortho-vanadat Calbiochem, Darmstadt

***Lösungen und Puffer***

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) 136,9 mM NaCl  
 2,7 mM KCl  
 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>K

Triton-Lysepuffer

25 mM Tris-Phosphat, pH 7,8  
 1 mM EDTA  
 1 mM DTT  
 15 % (v/v) Glycerol  
 1 % (v/v) Triton X-10

Puffer A hypoton (für NF- $\kappa$ B)

10 mM Hepes-OH, pH 7,9  
 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM KCl  
 Inhibitoren/DTT  
 ad 100 ml H<sub>2</sub>O

Puffer B hyperton (für NF- $\kappa$ B)

20 mM Hepes-OH, pH 7,9  
 420 mM NaCl  
 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM EDTA  
 25 % Glycerin  
 Inhibitoren/DTT  
 ad 100 ml H<sub>2</sub>O

Puffer A hypoton (für HIF-1)

10 mM Tris, pH 7,8  
 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM KCl  
 Inhibitoren/DTT  
 ad 100 ml H<sub>2</sub>O

Puffer C hyperton (für HIF-1)

20 mM Tris, pH 7,8  
 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 420 mM KCl

---

	20 % Glycerin Inhibitoren/ DTT ad 10 mL H <sub>2</sub> O
<u>5 x Bindungspuffer (für NF-κB)</u>	5 mM MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM EDTA 2,5 mM DTT 250 mM NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 20% Glycerin H <sub>2</sub> O
<u>5 x Bindungspuffer (für HIF-1)</u>	25 mM Tris, pH 7,5 125 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 4,75 mM EDTA 25 mM DTT 0,15 % NP40 H <sub>2</sub> O
<u>10 x TBE Puffer</u>	90 mM Tris, pH 8,3 2,5 mM EDTA 90 mM Borsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, pH 8,3 einstellen autoklavieren
<u>50 x TAE Puffer</u>	242 g Tris Base 57,1 ml Eisessig 100ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<u>5x Laufpuffer</u>	125 mM Tris base 960 mM Glycin 5 % SDS ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<u>Blotpuffer</u>	25 mM Tris base 192 mM Glycin 20 % Methanol ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<u>4-fach Ladepuffer</u>	3 ml H <sub>2</sub> O 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 1,6 ml Glycerin 10 % SDS 0,5 % (w/v) Bromophenolblau (in H <sub>2</sub> O) 1:20 β-Mercaptoethanol frisch zugeben
<u>5 % Trockenmilchlösung</u>	5 g Magermilchpulver PBS ad 100 ml

---

---

<u>T-PBS (Tween-PBS)</u>	0.05 % Tween-20 in PBS
<u>LB (Luria Bertoni) medium</u>	1 % Trypton 0,5 % NaCl 0,5 % Hefeextrakt ad 1000 ml H <sub>2</sub> O autoklavieren
<u>SOB</u>	2 % Bacto Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> ad 1000 ml H <sub>2</sub> O autoklavieren
<u>TB Lösung</u>	10 mM PIPES 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl pH 6,7 mit KOH einstellen sterilfiltrieren
<u>TE Puffer (Tris-EDTA)</u>	10 mM Tris-HCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0
<u>TAE Puffer 50x</u>	500 mM Tris-Acetat, pH 8,0 50 mM EDTA pH 8,0 einstellen
<u>DNA Ladepuffer</u>	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanid 30 % Glycerin ad 10 ml H <sub>2</sub> O
<u>DEPC Wasser</u>	0,1 % (v/v) DEPC über Nacht rühren autoklavieren
<u>MENG-Puffer</u>	25 mM MOPS, pH 7,5 1 mM EDTA 0,02% NaN <sub>3</sub> 10% Glycerin
<u>Urea-Puffer</u>	8 M Urea, pH 6,8 1% SDS 8,7% Glycerin (vol/vol) 10 mM Tris
<u>Mowiol</u>	2,4 g Mowiol 4-88

---

6 ml H<sub>2</sub>O  
 12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5)  
 2% DABCO

### Polyacrylamid-Gele für Western Blot

*10 ml Trenngel (7,5 %ig)*

2,5 ml Acrylamid  
 4,85 ml H<sub>2</sub>O  
 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8  
 100 µl 10% SDS  
 50 µl 10% APS  
 5 µl TEMED

*5 ml Sammelgel (4 %ig)*

0,65 ml Acrylamid  
 3,05 ml H<sub>2</sub>O  
 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8  
 50 µl 10% SDS  
 25 µl 10% APS  
 5 µl TEMED

## 2.2. Zellkultur

Die nachfolgenden Versuche wurden an den humanen Hepatoma-Zelllinien HepG2 und Hep3B, der humanen Zervix-Karzinom-Zelllinie HeLa, der humanen Osteosarkom-Zelllinie U2OS (alle American Type Culture Collection, Rockville, MD) sowie an primären humanen Fibroblasten (zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Marxsen, Institut für Hämatologie, Universität zu Lübeck) durchgeführt. HepG2-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland) mit einem Zusatz von 10% (vol/vol) fetalem Kälberserum (FCS) (GIBCO BRL), Hep3B-Zellen und HeLa-Zellen in DMEM Medium (GIBCO BRL) mit einem Zusatz von 10% (vol/vol) fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin, U2OS-Zellen in DMEM (GIBCO BRL) mit einem Zusatz von 10% (vol/vol) FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin (GIBCO BRL), die primären humanen Fibroblasten in DMEM F12 (HAM) (GIBCO BRL) Medium und Zusatz von 10% (vol/vol) FCS sowie 0,2% Penicillin/Streptomycin unter einer luftbefeuchteten Atmosphäre aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft bei 37 °C ( Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert.

## 2.3. Zellkulturversuche

Für die Versuche wurden die Zellen auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 145 mm bis zu einer Konfluenz von 60-80% kultiviert. Vor Versuchsin Kubation wurden die Zellen vom Medium befreit und mit Interleukin-1β (IL-1β) (300 bzw. 600 pg/ml)

und/oder Cortison (C), Hydrocortison (HC) oder Dexamethason (Dex) (0.1 nM-10 µM) in Medium für 4 h inkubiert. Die Hypoxie-Versuche wurden in einem Inkubator (Heraeus, Hanau, Deutschland) mit 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 92% N<sub>2</sub> durchgeführt.

### **2.3.1. Gesamtzellextraktion**

Im Anschluss an die Stimulation wurden HepG2-Zellkulturen mit eiskalter phosphatgepufferter Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“ (PBS), 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) gewaschen. Das PBS wurde verworfen, die Zellen zusammengeschaßt, in 1 ml PBS aufgenommen und bei 3500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zell-Pellet in 100 µl denaturierendem Urea-Puffer (8 M Urea, 1% SDS, 8.7% Glycerin (vol/vol), 10 mM Tris pH 6,8) aufgenommen. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellmembranen mittels Ultraschall mechanisch aufgeschlossen und die Extrakte bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.3.2. Kernextraktion**

Nach Beendigung der Stimulation wurden HepG2-Zellkulturen mit eiskaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde abgegossen, die Zellen zusammengeschaßt und in 2 ml bzw. 1 ml PBS aufgenommen und bei 3500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zell-Pellet in 1 ml Puffer A (10 mM Tris, pH 7,8; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl; 1:1000 verdünnter Protease-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland); 0,4 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) gewaschen, in 1 ml Puffer A resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Kontrolle der Zell-Lyse erfolgte mit Trypanblau. Danach wurde erneut bei 3500 x g 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in ca. 100 µl Puffer C (20 mM Tris, pH 7,8; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 420 mM KCl; 20% Glycerin; 1:1000 verdünnter Protease-Inhibitor Cocktail; 0,4 mM PMSF) aufgenommen, weitere 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (=Kernextrakt) wurde abgenommen und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 2.3.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Kernextrakte wurde nach der Bradford-Methode mit 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Standard photometrisch gemessen (Bradford, 1976). Es wurden in einer Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) Doppelbestimmungen mit jeweils 2  $\mu$ l Kernextrakt, 18  $\mu$ l 0,9% NaCl und Zugabe von 200  $\mu$ l Bradford-Reagenz durchgeführt und im Anschluss daran die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Photometer (SLT Rainbow, SLT LAB Instruments GmbH, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

## 2.4. Western Blot

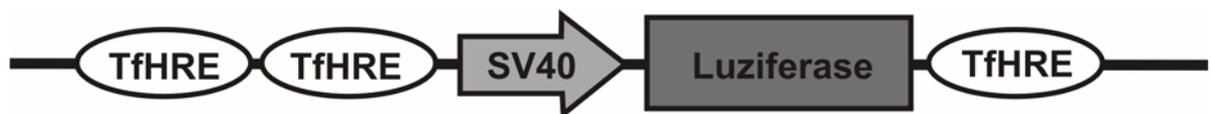
Kernextrakte aus HepG2-Zellen wurden auf das Vorkommen des HIF-1 $\alpha$ -Protein im Zellkern mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Proteinkonzentrationen wurden mit der oben beschriebenen Bradford-Methode bestimmt und in einem SDS-Polyacrylamidgel (7,5%) nach der Masse aufgetrennt. Hierbei wurden zwischen 20 und 40  $\mu$ g nukleäres Protein aufgetragen. Um die Proteine zu immobilisieren wurden diese elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond Amersham, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Dieser Proteintransfer wurde mit Ponceau S überprüft. Die Membran wurde dann über Nacht in 5% Trockenmilch in PBS bei 4 °C geblockt und anschließend für 1 h mit einem 1:1000 in 5% Trockenmilch in PBS verdünntem monoklonalen Antikörper gegen humanes HIF-1 $\alpha$  (Maus-anti HIF-1 $\alpha$ , BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland) bei RT inkubiert. Um die spezifische Bindung zu detektieren, wurde die Membran mit einem „horseradish“ (=engl. Meerrettich)-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (anti-Maus IgG HRP gekoppelt, DAKO, Hamburg, Deutschland), der 1:2000 in 5% Trockenmilch in PBS verdünnt wurde, 1 h inkubiert und schließlich mit dem „enhanced chemiluminescence substrate“ (ECL, Amersham, Braunschweig, Deutschland) photooptisch nachgewiesen. Die Proteingröße des posttranslational modifizierten humanen HIF-1 $\alpha$  liegt bei ca. 110 kDa.

## 2.5. Reporter-genuntersuchungen

Die Untersuchungen wurden an HRG1/HRB5-Zellen durchgeführt, die durch stabile Transfektion von HepG2 mit einem Hypoxie-responsiblen Reporter-gen-Konstrukt [Stiehl et al., 2002; Martin et al., 2005] entstanden sind. Grundlage ist das Reporter-gen-Plasmid

pH3SLV mit drei HIF-1-responsiblen Elementen, deren Sequenz aus dem humanen Transferrin-Gen stammt. Jedes HRE ist in der Lage zwei HIF-1-Proteine zu binden, weshalb auf dem Plasmid sechs HIF-1-Bindungsstellen (HBS) vorliegen. Darüber hinaus enthält das Reporter-Gen-Konstrukt cDNA des Luziferasegens aus *Photinus pyralis* unter Kontrolle eines SV40 Promotors (Abbildung 5) [Wanner et al., 2000].

HRG1 bzw. HRB5 Zellen wurden in 24er Zellkulturplatten ausgesät und bis zu einer Zelldichte von 40-60% in 500 µl DMEM, supplementiert mit 10% FCS (vol/vol), L-Glutamin sowie G418 (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), wachsen gelassen. Die Zellen wurden für 24 h in Normoxie (20% O<sub>2</sub>) bzw. Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) mit C, HC oder Dex (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer Konzentration von 0,1-1000 nM und IL-1β (Ciba Geigy, Basel, Schweiz) in einer Konzentration von 300 oder 600 pg/ml stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit eiskaltem PBS kurz gewaschen und anschließend mit Hilfe des „passive lysis buffer“ (Promega, Mannheim, Deutschland) lysiert. Die Messung der Luziferase-Aktivität wurde mit einem Microumat R LB96P Luminometer (EG&G Berthold, Bad Wildbach, Deutschland) durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte als relative Luziferase-Aktivität in %, wobei das Kontrollexperiment mit 100% gleichgesetzt wurde.



**Abb. 5 Schema des pH3SVL Reporter-Gen-Konstrukts.**

Das hypoxisch induzierbare Reporter-Gen pH3SVL enthält drei Hypoxie-responsible Elemente (HREs) aus dem humanen Transferrin-Promotor, die jeweils 2 HIF-1 Proteine binden können.

## 2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Durch thermische Denaturierung wird die Template-DNA in einzelsträngige DNA überführt, an welche im nachfolgenden Schritt die Oligonukleotid-Primer hybridisieren. Im letzten Schritt erfolgt die Synthese der komplementären Stränge durch die DNA-Polymerase. Wird der aus drei Schritten bestehende Zyklus mehrfach wiederholt, kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten Nukleotidsequenzen.

Aus dem Glukokortikoid-Rezeptor-Expressionsplasmid pRShGR (American Type Culture Collection, Rockville, MD) wurde mittels PCR der Glukokortikoid-Rezeptor (GR)

amplifiziert. Als forward-Primer diente die Sequenz 5'-CAGCGGGATCCGCTAGCGGTACCATGGACTCCAAAGAATCATTAAC-3' mit einer *KpnI*-Restriktionsschnittstelle und als reverse-Primer die Sequenz 5'-CAGTCTCGAGTCACTTTTGATGAAACAGAAG-3' mit einer *XhoI*-Restriktionsschnittstelle. Als Polymerase wurde Taq Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Für die PCR wurden folgende Bedingungen gewählt: 1. initiale Denaturierung: 2 min bei 95 °C; 2. Denaturierung: 95° C für 1 min, 3. Primer-Hybridisierung: 47 °C für 1 min 30 s, 4. Polymerisation: 72 °C für 2 min, Wiederholung der Schritte 2-4 32-mal; 5. abschließende Polymerisation: 5 min bei 72 °C. Der Erfolg der PCR wurde per Gelelektrophorese mit einem 0,8%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid durchgeführt. Die DNA-Fragmente werden dabei nach ihrer Größe aufgetrennt und können anhand eines Vergleichs mit einem Größenmarker beurteilt werden.

## 2.7. RNA-Isolierung

HepG2-Zellen wurden in 24er Zellkulturplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 60% wachsen lassen. Anschließend wurden sie für weitere 12 h mit 0,1 – 1000 nM Dex und/oder 300 pg/ml IL-1 $\beta$  unter normoxischen (20% O<sub>2</sub>) oder hypoxischen (3% O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte mithilfe der ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) die RNA-Isolierung der Zellen. Dazu wurden die Zellen zunächst in 500  $\mu$ l Lysepuffer lysiert. Über ein Säulensystem wurde schließlich aus dem Zellysate durch verschiedene Wasch- und Elutionsschritte die RNA nach den Herstellervorgaben isoliert.

## 2.8. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Da die RNA nicht direkt als Template in die PCR eingesetzt werden kann, muss zunächst die RNA in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgt durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen, sogenannte reverse Transkriptasen.

Aus 1  $\mu$ g RNA aus HepG2-Zellen wurde mit 100 U Reverse Transkriptase (Invitrogen) cDNA hergestellt. Zunächst wurde die RNA mit Wasser und Oligonukleotid gemischt und bei 68 °C für 15 min zur Denaturierung erhitzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Puffer, dNTP-Basen und reverser Transkriptase. Der 25  $\mu$ l Ansatz wurde 45 min bei 42 °C, 45 min bei 52 °C und 10 min bei 100 °C inkubiert.

## 2.9. Real time RT-PCR

Bei dieser Methode handelt es sich um eine quantitative PCR, bei der aus der Menge an amplifiziertem Produkt auf die Menge der eingesetzten RNA-Matrize geschlossen werden kann. So kann beispielsweise eine Aussage über die Transkriptionshäufigkeit bestimmter Gene getroffen werden. Die Real time RT-PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt. Dort werden die PCR-Produkte direkt während der Bildung erfasst. Dazu werden sequenzspezifische Sondenmoleküle, die mit Fluoreszenzfarbstoffen oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter und einem Quencher-Molekül markiert sind, verwendet. Auch quantitative PCR-Systeme, die DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe benutzen, sind verbreitet.

5  $\mu$ l der cDNA aus der RT-PCR wurden als Template für die Real time RT-PCR eingesetzt. VEGF<sub>165</sub> cDNA wurde im ABI 7000 Detection System (Applied Biosystems) quantifiziert.

Dafür wurde ein kommerziell erhältliches „Assay on demand“ für VEGF<sub>165</sub>, (Applied Biosystems) verwendet. Als endogene Kontrolle wurde das 60S ribosomale Protein L28 verwendet, das in 5 µl einer 1:1000 Verdünnung quantifiziert wurde. Die verwendeten Primer-Sequenzen waren für den L28 forward Primer 5'-ATGGTCGTGCGGAACTGCT-3' und für den L28 reverse Primer 5'-TTGTAGCGGAAGGAATTGCG-3'. Die relative Expression wurde mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (normalisiert auf L28) berechnet.

### **2.10. Plasmidherstellung**

Aus dem Expressionsplasmid pRShGR (American Type Culture Collection, Rockville, MD) wurde das Plasmid pcDNA3\_hGR hergestellt, das den Leserahmen des humanen GR enthält. Der GR wurde aus dem Expressionplasmid mit PCR-Technik amplifiziert (s. oben) und schließlich in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) über eine *XhoI*- und *KpnI*-Restriktionsschnittstelle ligiert. pcDNA3 besitzt einen T7 Promotor, der für den Einsatz im „in vitro Transkription/Translation“-System benötigt wird. Die erfolgreiche Klonierung wurde mit einer Sequenzanalyse (SEQ Lab, Göttingen, Deutschland) bestätigt.

### **2.11. In vitro Transkription/Translation (IVTT)**

Für die IVTT wurde entweder das „TNT®Quick coupled“ Transkription/Translation-System (Promega, Mannheim, Deutschland) auf Basis von Retikulozytenlysate für HIF-1 $\alpha$  oder das TNT®coupled Transkription/Translation-System (Promega) auf Basis von Weizenkeim für GR verwendet. Der in vitro transkribierte und translatierte GR wurde mit <sup>35</sup>S-Methionin (Amersham) radioaktiv markiert. Als Negativkontrolle für die Ko-Immunpräzipitation wurde eine IVTT von pcDNA3 verwendet.

### **2.12. Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP)**

10 µl, der mit <sup>35</sup>S-Methionin radioaktiv markierten IVTT des GR, und 10 µl der nicht radioaktiven IVTT des HIF-1 $\alpha$  wurden in MENG-Puffer (25 mM MOPS pH 7,5, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,02% NaN<sub>3</sub>, 10% Glycerin, 20 mM Molybdat, 2 mM Dithithreitol (DTT), 0,1% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)) aufgenommen und bei 500 Umdrehungen/min, bei 4 °C für mindestens 8 h inkubiert. 2µl Anti-HIF-1 $\alpha$  (Transduction

Laboratories) wurde zum Ko-IP-Ansatz hinzugegeben und bei 500 Umdrehungen/min auf einem Drehrad bei 4 °C über Nacht inkubiert. Protein G/A Agarose (Oncogene, Cambridge, USA) wurde in MENG-Puffer aufgenommen, 100 µl pro Ko-IP-Ansatz dazugegeben und für weitere 3 h bei 500 Umdrehungen/min auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben 3-mal mit MENG-Puffer gewaschen. Die immunpräzipitierten Proteine wurden in 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,5% SDS, 0,5% Bromphenol Blau, 20% Glycerin, 5% β-Mercaptoethanol aufgenommen und durch Bioseparatoren (Millipore, Schwalbach, Deutschland) getrennt. Die Proteine wurden über ein SDS/7,5%iges Polyacrylamid Gel nach der Größe aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend vakuumgetrocknet und die Komplexe über einen Phosphoimager (Phosphoimager BAS 100, Fuji, Düsseldorf, Deutschland) detektiert.

### **2.13. Zytotoxizitätstest mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid)**

Der MTT-Test erlaubt Rückschlüsse auf die Zahl vitaler Zellen einer Kultur. Dies erfolgt über die Bestimmung der Aktivität intrazellulärer Dehydrogenasen, die das Substrat MTT zu wasserlöslichem Formazan umsetzen. Das nur in den lebenden Zellen gebildete Formazan hat ein charakteristisches Absorptionsspektrum von 480-660 nm mit einem relativen Absorptionsmaximum bei 570 nm.

Für den MTT-Test wurden HepG2-Zellen in eine 96er Mikrotiterplatte ausgesät und kultiviert. Nach 24 h wurden die Dexamethason-Konzentrationen von 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM sowie 100 µM in jeweils acht Replikaten gegeben und für weitere 24 h inkubiert. Um die Zellvitalität abzuschätzen, wurde 25 µl MTT-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zum Medium hinzugegeben und die Platte für weitere 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Lysepuffer (40 g Natrium-Dodecyl-Sulfat, 100 ml *N,N*-Dimethylformamid, 100 ml A. dest, pH 4,7). Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank lysiert und die Extinktion bei 570 nm bestimmt. Die Messwerte wurden um den Betrag des Leerwertes korrigiert und der Mittelwert der unbehandelten Kontrollgruppe als Bezugswert (100% Vitalität) zur Abschätzung der Zytotoxizität von Dex definiert.

## 2.14. Messung von sekretiertem VEGF

Sekretiertes VEGF<sub>165</sub> wurde im Medium-Überstand von Zellkulturen mit einem kommerziell erhältlichen enzymgekoppelten Immunoassay („enzyme-linked immunosorbent assay“, ELISA, Quantikine; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. HepG2-Zellen wurden in 24er Platten bis zu einer Konfluenz von 40% kultiviert und anschließend mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM Dex für 6 h bzw. 12 h stimuliert. Der Überstand aus der Zellkultur wurde bei 13000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und die Proteinkonzentration des sekretierten VEGF<sub>165</sub> direkt bestimmt. Das Zellprotein wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt.

Der VEGF-ELISA der Firma R&D Systems ist nach einem „Sandwich“-Prinzip aufgebaut: Der an der festen Phase adhären, monoklonale Antikörper ist gegen humanes VEGF<sub>165</sub> gerichtet. Mit einem zweiten, polyklonalen Antikörper, der zusätzlich mit einer „horseradish-Peroxidase“ gekoppelt ist, wird das immobilisierte VEGF-Protein aus den Zellkultur-Überständen in einer kolorischen Reaktion nachgewiesen.

## 2.15. Radioaktive Markierung von EMSA-Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden mit einer T4 Polynukleotid-Kinase in Gegenwart von  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]-ATP (New England Nuclear, Köln, Deutschland) markiert. Die „forward“-Reaktion der T4 Polynukleotid-Kinase katalysiert den Transfer des ATP- $\gamma$ Phosphats an das 5'-Hydroxylende der DNA. Die freien Nukleotide wurden säulenchromatographisch abgetrennt.

2 pmol der einsträngigen Oligonukleotide wurden mit 10 U T4 Polynukleotid-Kinase, 1,1 MBq  $\gamma$  [<sup>32</sup>P]-ATP markiert, in einem Endvolumen von 10  $\mu$ L Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,1 mM Spermidin) aufgenommen und als spezifische Proben für den EMSA verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min auf 90 °C erhitzt, um die Oligonukleotide mit dem Gegenstrang hybridisieren zu lassen und über Nacht langsam abkühlen zu lassen. Der Reaktionsansatz wurde über eine Sephadex-Säule aufgereinigt und schließlich wurde 1  $\mu$ L der markierten Oligonukleotide zur Messung der Markierungseffizienz verwendet.

## 2.16. HIF-1-EMSA

Um die funktionelle Aktivität von DNA-bindenden Proteinen darzustellen, wurden Kernextrakte im „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) analysiert. Im Gegensatz zu den stark denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen im Western Blot-Verfahren, die nur eine Aussage über den totalen Gehalt des untersuchten Proteins erlauben, werden bei EMSA-Experimenten Gele unter nativen Pufferbedingungen verwendet. Die vor dem Gellauf durchgeführten Bindungsreaktionen von Proteinextrakten mit spezifischen, doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden erlauben die Bindung der nativ in ihrer Struktur enthaltenen Proteine an spezifische DNA-Abschnitte. Im Gel werden anschließend die durch die Bindung entstandenen Protein-DNA-Komplexe in Abhängigkeit von Masse und Größe aufgetrennt, was zu einem charakteristischen Bandenmuster führt. Für den EMSA wurden spezifische DNA-Oligonukleotide für Gel Shift Experimente synthetisiert (MWG, Ebersberg, Deutschland). Die 33 bp langen Sequenzen korrespondieren mit der Enhancer-Sequenz des humanen Transferringens (TfHBS) und enthalten zwei HIF-1-Bindungsstellen.

**Tab. 3 Nukleotidsequenzen der synthetischen TfHBS-Oligonukleotide und NFκB-Oligonukleotide für Gel Shift Analysen.**

TfHBS (sense):	5'-TTCCTGCACGTACACACAAAGCGCACGTATTTC-3'
TfHBS (antisense):	5'-GAAATACGTGCGCTTTGTGTGTACGTGCAGGAA-3'
NF-κB (sense):	5'-AGTTGAGGGGACTTTC-3'
NF-κB (antisense):	5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTC-3'

In Tabelle 3 sind die Sequenzen der Nukleotide angegeben.

Die Bindungsreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Darin waren 5 µg Kernextrakt in einer Pufferlösung aus 5 mM Tris, pH 7,5; 25 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,95 mM EDTA; 5 mM DTT; 0,03% Nonidet P-40 und 400 ng Lachstestis-DNA. Lachstestis-DNA wurde zugesetzt, um unspezifische Bindungen an die eingesetzten Oligonukleotide zu verhindern. Im Anschluss wurden die Proben mit dem doppelsträngigen, radioaktiv markierten HIF-1- oder NFκB-Oligonukleotid (10000 cpm)

über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für den Supershift wurde der Probe 1 µl des HIF-1-spezifischen Antikörpers zugesetzt.

### **2.17. Immunfluoreszenz**

GR-defiziente U2OS-Zellen wurden auf Deckgläschen in 24er Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz Lipofektamin (Invitrogen) transient mit dem GR-Expressionsplasmid pRShGR (American Type Culture Collection) und dem HIF-1 $\alpha$ -Expressionsplasmid pcDNA3\_HIF-1 $\alpha$  (zur Verfügung gestellt von Prof. Peter Ratcliffe, Oxford, UK) transfiziert. Anschließend wurden sie mit einer Konzentration von 100 nM Dex stimuliert und für weitere 4 h unter normoxischen (20% O<sub>2</sub>) bzw. hypoxischen Bedingungen (3% O<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zellen wurden in 3,7% igem p-Formaldehyd/PBS für 5 min fixiert, mit PBS gewaschen und mit 0,1% igem Triton X-100/PBS permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und schließlich mit 5% Trockenmilch/PBS über Nacht bei 4 °C geblockt. Darauf erfolgte zunächst die Inkubation mit dem ersten Antikörper Anti-HIF-1 $\alpha$  (Transduction) bzw. Anti-GR (Santa Cruz) in der Verdünnung 1:500 bzw. 1:1000 in 5% Skim Milk für 1 h bei RT und anschließend mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 (Invitrogen) für HIF-1 $\alpha$  bzw. Alexa 594 (Invitrogen) für GR in der Verdünnung von 1:1000 in 5% Trockenmilch/PBS für 1 h bei RT. Die Kernfärbung wurde mit Bisbenzimid (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) in PBS durchgeführt. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden in Mowiol auf einem Objektträger eingebettet und getrocknet. Die Auswertung erfolgte am Laser Scanning Microscope (Meta 510, Zeiss, Jena, Deutschland).

### **2.18. Transiente Transfektion**

Unter Transfektion versteht man das Einbringen fremder DNA in kultivierte Zellen. Es gibt verschiedene Methoden, um die DNA in die vorgesehenen Zellen zu bringen. Neben CaPO<sub>4</sub>-Ko-Präzipitation und Elektroporation stehen verschiedene kationische liposomale Reagenzien zur Verfügung. Letztere wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Um in die GR-defizienten HRB5-Zellen das Expressionsplasmid des humanen GR (pRShGR) zu transfizieren, wurden diese mit FuGENE6 (Roche, Basel, Schweiz) behandelt, für die in der Immunfluoreszenz verwendeten U2OS-Zellen wurde Lipofektamin (Invitrogen) verwendet.

Die Zellen wurden in 24er oder 12er Platten bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert und unter Einsatz von FuGENE-6 (HRB-5-Zellen) bzw. Lipofektamin (U2OS-Zellen) nach den Angaben des Herstellers mit dem pRShGR-Plasmid und/oder dem pcDNA3\_HIF-1 $\alpha$  transfiziert. Bevor die Zellen hypoxisch bzw. normoxisch inkubiert und mit Dex stimuliert wurden, erfolgte ein Wechsel des Mediums.

## **2.19. Herstellung kompetenter E.coli Bakterien**

E.coli-DH5 $\alpha$  wurden auf einer Agar-Platte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Kolonien in SOB-Medium kultiviert und unter Schütteln bei 19 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden für 10 min auf Eis inkubiert und dann bei 2500 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 80 ml TB-Lösung aufgenommen und für 10 min auf Eis gestellt. Die Suspension wurde erneut bei 2500 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 20  $\mu$ l TB-Lösung aufgelöst. Die Zellen wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

## **2.20. Ligation von DNA in den Vektor pcDNA3**

Der linearisierte Vektor pcDNA3 und das zu ligierende DNA-Fragment im Verhältnis 1:5 wurde mit 10 U T4-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) in einem Endvolumen von 10  $\mu$ l Puffer (50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25  $\mu$ g/ml BSA) bei 16 °C über Nacht ligiert.

## **2.21. Transformation von kompetenten E.coli Bakterien**

200  $\mu$ l kompetente DH5 $\alpha$  Bakteriensuspension wurden mit 7  $\mu$ l Ligat vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf 42 °C für 90 s im Wasserbad erhitzt und danach kurz in Eiswasser abgekühlt. 800  $\mu$ l LB-Medium wurden zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Probe wurde dann in ein frisches Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) überführt und 30 s bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet in 150  $\mu$ l LB-Medium aufgelöst und auf Agar-Platten, die mit 50  $\mu$ g/ $\mu$ l Ampicillin zur Transformationsselektion supplementiert wurden, konzentriert oder verdünnt (1:10) ausgestrichen. Die Platten blieben über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

## 2.22. Mini-Präparation

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits für Mini-Präparationen (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. In einem 0,8%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid wurde die Plasmidgröße durch Vergleich mit einem Größenmarker getestet. Die Plasmide mit der richtigen Größe wurden mit einem Geextraktions-Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers aus dem Gel eluiert und sequenziert (SEQLab, Göttingen, Deutschland).

## 2.23. Maxi-Präparation

Nachdem das „richtige Plasmid“ per Sequenzierung ermittelt wurde, erfolgte die Plasmid-DNA-Aufreinigung mit einem kommerziellen Kit für Maxi-Präparationen (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

## 2.24. Statistische Auswertung

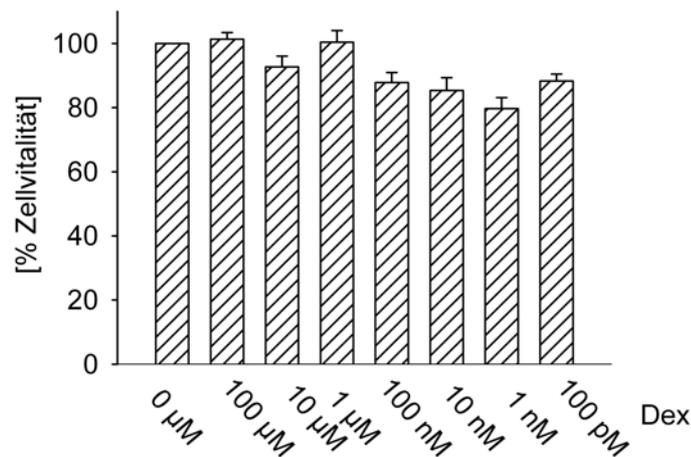
Zur Darstellung der Daten in den Abbildungen wurden für alle Werte der arithmetische Mittelwert + der Standardfehler aus den Einzelmesswerten gebildet. Der Stichprobenumfang ist in der Legende der jeweiligen Abbildung vermerkt. Unterschiede in den Mittelwerten innerhalb einer Gruppe wurde mit einer „one-way-ANOVA“ (one way analysis of variance) und anschließendem Post Test auf Signifikanz getestet: Der Vergleich von Mittelwerten mit einer Kontrollgruppe erfolgte mit dem Test nach Dunnett. Konnte die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\leq 5\%$  verworfen werden, so wurde der Unterschied als statistisch signifikant bezeichnet. In den Abbildungen sind die Signifikanzschwellen ( $p < 0,05$ ) mit einem Sternchen (\*) oder einer Raute (#) gekennzeichnet.

Die statistische Auswertung erfolgte auf Grundlage des Programms *GraphPad Prism 0.3* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Dex reduziert den nukleären HIF-1 $\alpha$ Proteingehalt

Für das synthetische Glukokortikoid Dex wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt, um eine zellschädigende Wirkung der eingesetzten Substanz auszuschließen. Dafür wurden die für die Versuche relevanten bzw. um den Faktor 10 darüber oder darunterliegenden Konzentrationen von 100 pM bis 100  $\mu$ M getestet. Bei keiner der untersuchten Konzentrationen wurde nach einer Behandlungszeit von 24 h ein Einfluss auf die Zellvitalität festgestellt (Abbildung 6). Die Substanz konnte somit in der Zellkultur eingesetzt werden. In den Reporterstudien wurden zwei weitere Glukokortikoide verwendet (HC, C), die jedoch eine deutlich niedrigere glukokortikoide Wirksamkeit aufweisen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Zellvitalität nicht beeinflusst wird. Auch für IL-1 $\beta$  wurden solche Tests durchgeführt, die ebenfalls eine Auswirkung auf die Zellvitalität ausschlossen (Daten nicht gezeigt).



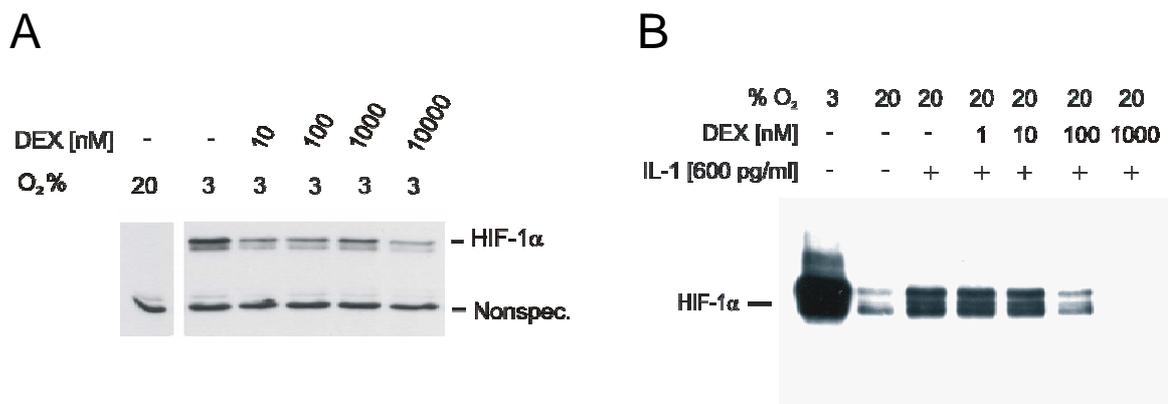
**Abb. 6 Zytotoxizität von Dex**

Vitalität von HepG2-Zellkulturen (MTT-Test) nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in den angegebenen Konzentrationen. (Mittelwerte + Standardfehler [SE], n=8)

HepG2-Zellen wurden für 4 h unter hypoxischen Bedingungen (3% O<sub>2</sub>) inkubiert und zeigten erwartungsgemäß eine deutliche HIF-1 $\alpha$  Akkumulation im Kern (Abbildung 7 A). Entsprechend zeigten normoxisch (20% O<sub>2</sub>) inkubierte HepG2-Zellen nur einen geringen Gehalt an HIF-1 $\alpha$  im Kern. Wurden die Zellen jedoch für 4 h unter hypoxischen Bedingungen mit Dex (10 nM, 100 nM, 1 $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M) stimuliert, nahm die HIF-1 $\alpha$

Proteinmenge im Kern deutlich ab (Abbildung 7 A). Die stärkste Abnahme konnte dabei bei einer Behandlung von 10  $\mu$ M Dex verzeichnet werden.

HIF-1 $\alpha$  kann auch unter normoxischen Bedingungen stabilisiert werden, wie beispielsweise durch das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  (Abbildung 7 B). Durch eine gleichzeitige Applikation von Dex wird auch das durch IL-1 $\beta$  aktivierte HIF-1 $\alpha$  im Kern reduziert (Abbildung 7 B). Mit 1  $\mu$ M Dex war das HIF-1 $\alpha$ -Signal im Western Blot nicht mehr detektierbar.



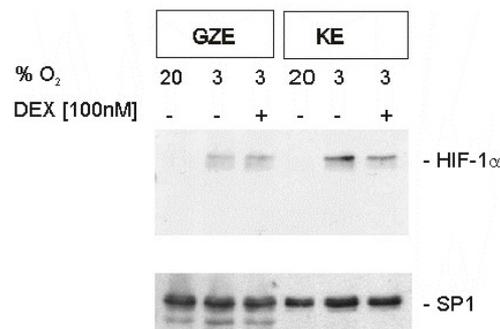
**Abb. 7 Dex reduziert sowohl das hypoxisch induzierte als auch das durch IL-1 $\beta$  in Normoxie induzierte HIF-1 $\alpha$ -Protein.**

A: Western Blot Analyse zum Nachweis von HIF-1 $\alpha$ -Protein in Kernextrakten aus HepG2-Zellen, die für 4 h in Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) bzw. Normoxie (20% O<sub>2</sub>) inkubiert und mit Dex stimuliert wurden. 20  $\mu$ g nukleäres Gesamtprotein wurden in einer 7,5% SDS-PAGE massenspezifisch aufgetrennt und auf den HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalt untersucht. Die untere Bande (ca. 55 kDa) wird durch unspezifische Bindung des sekundären anti-Maus-Antikörpers verursacht.

B: Nachweis durch Western Blot Analyse von HIF-1 $\alpha$ -Protein in Kernextrakten aus hypoxischen (3% O<sub>2</sub>) und normoxischen (20% O<sub>2</sub>) HepG2-Zellkulturen, die für 4 h mit IL-1 $\beta$  und/oder Dex stimuliert wurden. 20  $\mu$ g nukleäres Gesamtprotein wurde in einer 7,5% SDS-PAGE massenspezifisch aufgetrennt und auf den HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalt untersucht.

### 3.2. Der Einfluss von Dex auf HIF-1 $\alpha$ ist ein kernspezifischer Prozess

Aus normoxisch (20% O<sub>2</sub>) bzw. hypoxisch (3% O<sub>2</sub>) inkubierten HepG2-Zellkulturen wurden Gesamtzellextrakte und Kernextrakte gewonnen. Sowohl bei den Kernextrakten als auch bei den Gesamtzellextrakten ist erwartungsgemäß unter Normoxie kein HIF-1 $\alpha$  nachzuweisen, während in Hypoxie bei beiden eine deutliche HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation zu finden ist (Abbildung 8). Werden die Zellen in Hypoxie mit 100 nM Dex für 4 h stimuliert, zeigt sich bei den Kernextrakten eine Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge, während bei den Gesamtzellextrakten zwischen hypoxischen und zusätzlich mit Dex behandelten Zellen kein Unterschied im HIF-1 $\alpha$ -Gehalt zu finden ist (Abbildung 8).



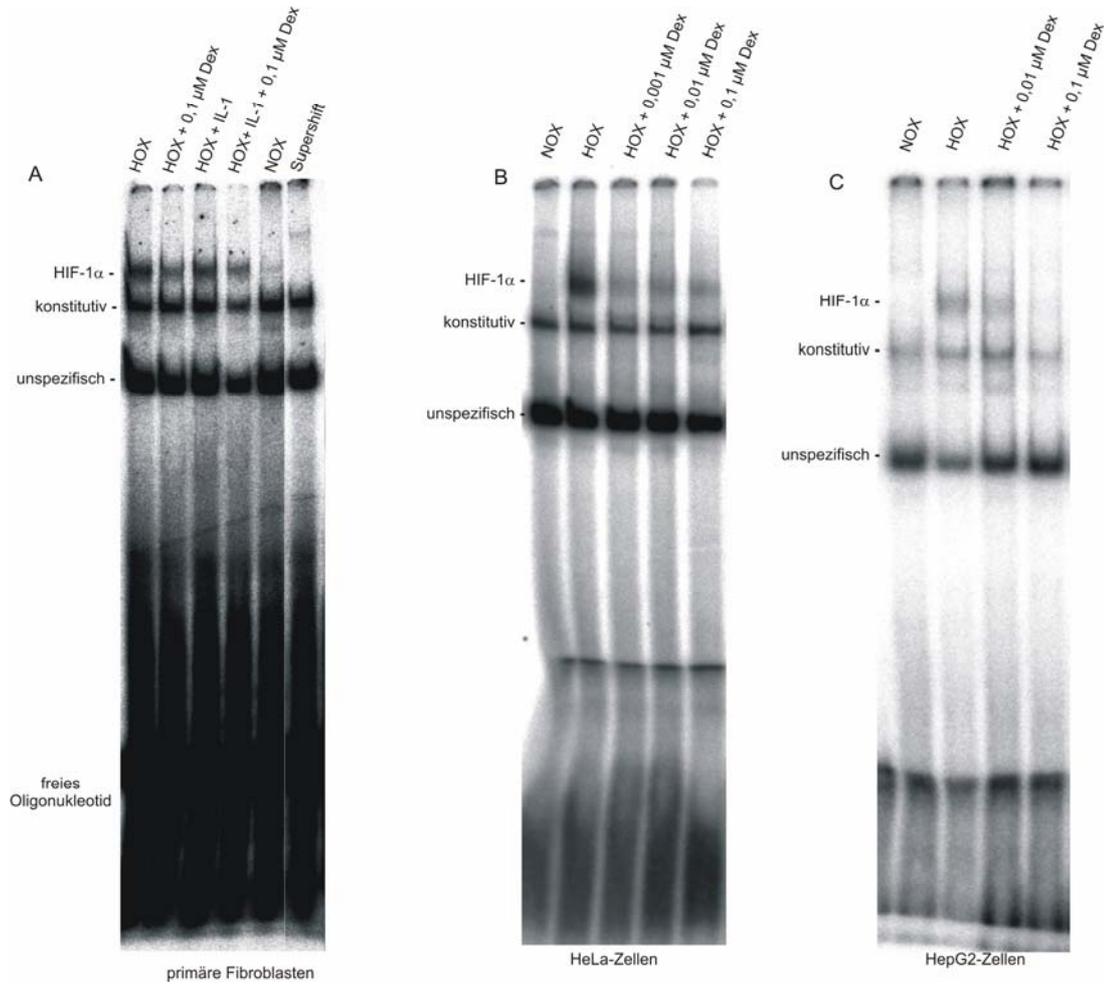
**Abb. 8 Der Effekt von Dex auf HIF-1 $\alpha$  ist nur in Kernextrakten zu finden.**

Western Blot Analyse von HIF-1 $\alpha$ -Protein in Kernextrakten und Gesamtzellextrakten von HepG2-Zellen, die für 4 h normoxisch (20% O<sub>2</sub>) und hypoxisch (3% O<sub>2</sub>) inkubiert bzw. mit 100 nM Dex für 4 h stimuliert wurden. Es wurden 30  $\mu$ g nukleäres bzw. 70  $\mu$ g gesamtzelluläres Protein geladen; die SP-1-Bande korreliert mit der geladenen Proteinmenge.

### 3.3. Dex beeinflusst auch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA

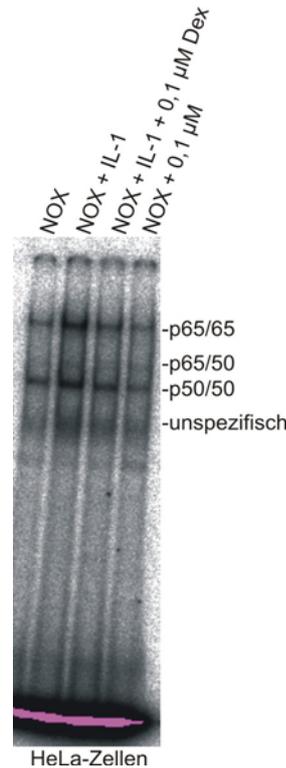
Primäre humane Fibroblasten wurden unter normoxischen (20% O<sub>2</sub>) oder hypoxischen (3% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert und für 4 h mit IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  + Dex oder Dex behandelt. Aus den Fibroblasten wurden Kernextrakte gewonnen, die im EMSA auf die Bindung von HIF-1 an die DNA untersucht wurden. Abbildung 9 A zeigt bei den hypoxischen Kernextrakten eine Bindung von HIF-1 an die DNA, die durch 100 nM Dex abgeschwächt wird. Die Behandlung mit IL-1 $\beta$  führt zu einer gesteigerten HIF-1-DNA-Bindung, die durch gleichzeitige Applikation von Dex wieder aufgehoben wird. Die Inkubation von hypoxischem, unbehandeltem Kernextrakt mit einem HIF-1 $\alpha$ -spezifischen Antikörper (Supershift) führt zur Retardierung der Bande, was darauf hinweist, dass es sich bei den Banden um spezifische HIF-1-DNA-Komplexe handelt. Auch in Kernextrakten von HeLa-Zellen (Abbildung 9 A) und HepG2-Zellen (Abbildung 9 C) konnte eine Abschwächung der HIF-1-DNA-Bindung beobachtet werden.

In einem weiteren EMSA wurde mit Kernextrakten aus normoxischen HeLa-Zellen gezeigt, dass IL-1 $\beta$  in der Lage ist, die Bindung von NF $\kappa$ B an die DNA zu induzieren, während eine gleichzeitige Behandlung mit Dex die Bindung wieder abschwächt. Bei Behandlung mit Dex zeigt sich eine ähnlich schwache DNA-Bindung von NF $\kappa$ B wie bei den normoxischen Kontroll-Kernextrakten (Abbildung 10).



**Abb. 9 Die DNA-Bindung von HIF-1 wird durch Dex reduziert**

Gel-Shift-Analyse aus hypoxischen und normoxischen Kernextrakten von primären humanen Fibroblasten, HeLa-Zellen oder HepG2-Zellen, die mit IL-1 $\beta$  und/oder verschiedenen Konzentrationen Dex behandelt wurden. Durch Zugabe von anti-HIF-1 $\alpha$ -Antikörper zur HOX-Probe ließ sich ein „Supershift“ nachweisen, der spezifisch für den HIF-1-TfHBS-Komplex ist.

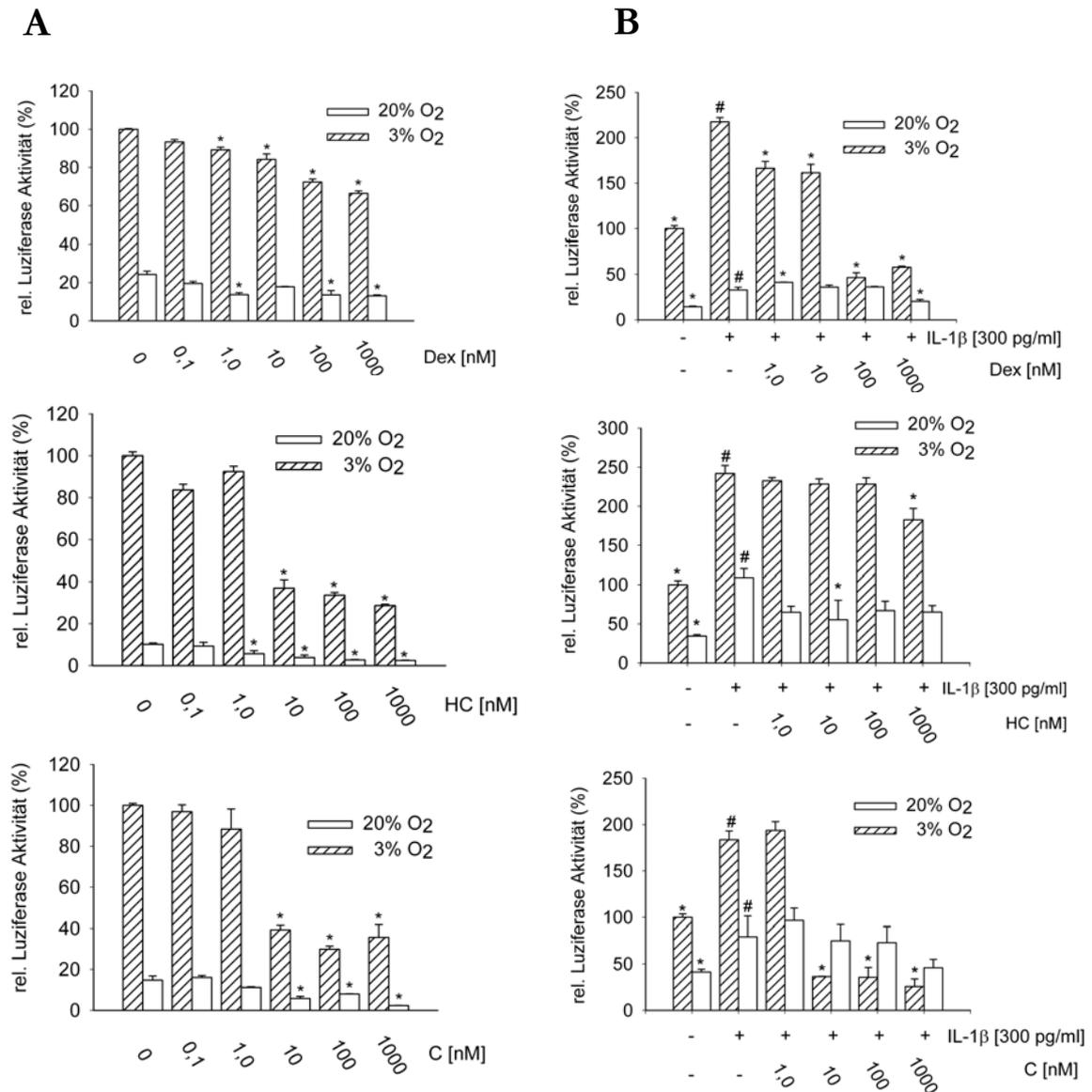


**Abb. 10 Die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B wird durch IL-1 induziert und durch Dex wieder reduziert.** Gel-Shift-Analyse aus normoxischen Kernextrakten von HeLa-Zellen, die mit IL-1 $\beta$  und/oder 0,1  $\mu$ M Dex behandelt wurden.

### 3.4. Verschiedene Glukokortikoide beeinflussen die transkriptionelle Aktivität von HIF-1

Die Reportergenstudien wurden mit HRG-1-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit IL-1 $\beta$  und/oder verschiedenen Konzentrationen Dex, HC, C unter normoxischen (20% O<sub>2</sub>) oder hypoxischen (3% O<sub>2</sub>) Bedingungen für 24 h inkubiert und anschließend die Luziferase-Aktivität gemessen. Verglichen mit der hypoxischen Kontrolle reduzierte Dex in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM die HIF-1-abhängige Genexpression in Hypoxie signifikant. Mit Ausnahme von 10 nM führte Dex auch unter normoxischen Bedingungen zu einer Abnahme der HIF-1-Aktivität (Abbildung 11 A). Auch die beiden Glukokortikoide HC und C, die beide eine deutlich niedrigere glukokortikoide Potenz als Dex aufweisen, riefen unter Hypoxie bei Konzentrationen von 10 nM bis 1  $\mu$ M eine signifikante Abnahme der transkriptionellen HIF-1-Aktivität hervor (Abbildung 11 A). Wie in Abbildung 11 A zu sehen, führte die HC-Behandlung in Normoxie bereits ab einer Konzentration von 1 nM zu einer signifikanten Reduktion der HIF-1-Aktivität, während diese bei C-Behandlung ab 10 nM nicht gefunden werden

konnte. Die Stimulierung der HRG-1-Zellen mit IL-1 $\beta$  (300 pg/ml) führte sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Kulturbedingungen zu einem signifikanten Anstieg der HIF-1-abhängigen Genexpression (Abbildung 11 B). Die durch IL-1 $\beta$ -induzierte transkriptionelle Aktivität von HIF-1 konnte unter Hypoxie durch 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1  $\mu$ M Dex signifikant reduziert werden (Abbildung 11 B). Auch C führte in hypoxisch inkubierten HRG-1-Zellen in Konzentrationen von 10 nM, 100 nM und 1  $\mu$ M zu einer signifikanten Abnahme der IL-1 $\beta$ -induzierten HIF-1-abhängigen Genexpression (Abbildung 11 B), während dies bei HC erst bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M zu beobachten war (Abbildung 11 B). Unter normoxischen Bedingungen zeigte nur die höchste eingesetzte Konzentration von 1  $\mu$ M Dex die signifikante Reduktion der IL-1 $\beta$ -induzierten transkriptionellen Aktivität von HIF-1 (Abbildung 11 B).



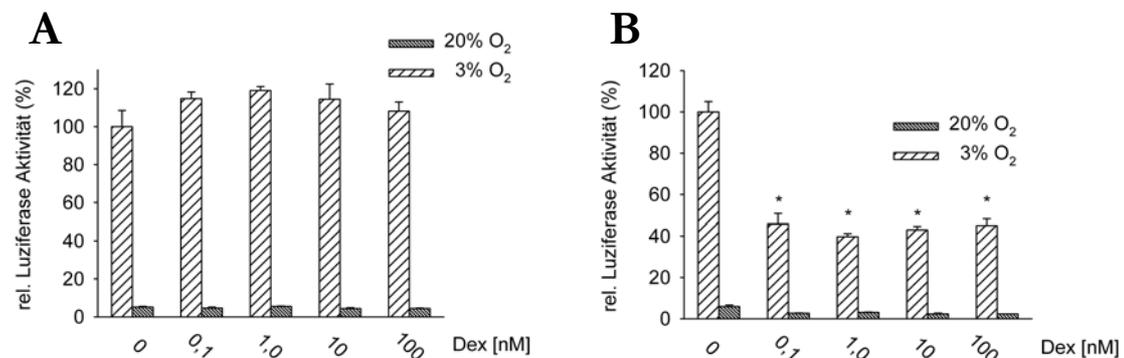
**Abb. 11** Glukokortikoide reduzieren die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 in HRG1-Zellen.

A: HRG1-Zellen mit einem stabil transfizierten HIF-1-abhängigen pH3SVL-Reportergen wurden 24 h in Normoxie (20% O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) inkubiert und für die Versuchsdauer mit den angegebenen Konzentrationen Dex, HC, C behandelt. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert + SE, n=4. Alle Werte wurden auf die hypoxische Kontrolle normiert (als 100% definiert). Die mit (\*) markierten Balken zeigen die signifikanten Differenzen zwischen den unterschiedlichen Behandlungen verglichen mit der hypoxischen Kontrolle (\*p<0,05; Test nach Dunnett).

B: HRG1-Zellen wurden 24 h in Normoxie (20% O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) inkubiert, mit IL-1β stimuliert und mit den angegebenen Konzentrationen Dex, HC, C behandelt. Im Anschluss daran wurde die Luziferase-Aktivität gemessen. Dargestellt sind der Mittelwert + SE, n=4. Alle Werte wurden auf die hypoxische Kontrolle normiert (als 100% definiert). Die mit (\*) markierten Balken stellen die signifikanten Differenzen (p<0,05) zwischen den unterschiedlichen Behandlungen verglichen mit der IL-1β behandelten Kontrolle dar, während mit (#) markierte Balken die Signifikanz (p<0,05) zwischen Kontrolle und IL-1β-Behandlung zeigen (Test nach Dunnett).

### 3.5. Der Effekt von Dex auf HIF-1 ist vom Glukokortikoid-Rezeptor (GR) abhängig

Weitere Reportergergenstudien wurden mit HRB-5-Zellen durchgeführt, die GR-defizient sind. Diese wurden für 24 h mit 1 nM, 10 nM oder 100 nM Dex in Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Abbildung 12 A zeigt, dass bei diesen Zellen weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen ein Effekt von Dex auf die HIF-1-Aktivität zu finden war. Wurden diese Zellen jedoch mit einem Expressionsplasmid für den humanen GR (pRShGR) transfiziert, so fand bei den hypoxischen Zellen bei allen eingesetzten Konzentrationen eine signifikante Abnahme der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 im Vergleich zur Kontrolle statt. In den normoxischen Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abbildung 12 B).



**Abb. 12 Dex reduziert die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 nur bei vorhandenem GR.**

A: HRB5-Zellen mit einem stabil transfizierten HIF-1-abhängigen pH3SVL-Reportergergen wurden 24 h normoxisch (20% O<sub>2</sub>) oder hypoxisch (3% O<sub>2</sub>) inkubiert und für die Dauer des Versuches mit den angegebenen Konzentrationen Dex behandelt. Im Anschluss wurde die Luciferase-Aktivität gemessen.

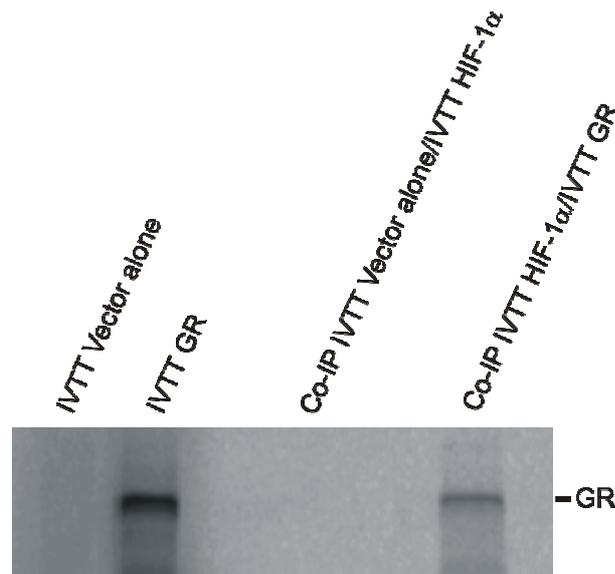
B: HRB5-Zellen wurden mit dem GR-Expressionsplasmid pRShGR transient transfiziert und anschließend für 24 h bei Normoxie (20% O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) inkubiert und mit den erwähnten Konzentrationen Dex behandelt. Danach wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt.

Dargestellt sind in beiden Graphen der Mittelwert + SE, A: Nox n=2, Hox n=4; B: Nox n=4, Hox n=4; alle Werte wurden auf die hypoxische Kontrolle normiert, die als 100% definiert wurde. Die mit (\*) markierten Balken stellen die signifikanten Differenzen zwischen den unterschiedlichen Behandlungen verglichen mit der Kontrolle dar (\*p<0,05; Test nach Dunnett).

### 3.6. Der GR und HIF-1 $\alpha$ interagieren in vitro

Der humane GR wurde erfolgreich über eine *KpnI*- und eine *XhoI*-Restriktionschnittstelle in der Multiple Cloning Site (MCS) in einen pcDNA3-Vektor mit T7 Promotor kloniert. Das Plasmid pcDNA3\_HIF-1 $\alpha$  war bereits im Labor vorhanden. Beide Proteine wurden *in*

*in vitro* transkribiert sowie translatiert und schließlich in einer Ko-IP auf eine mögliche Wechselwirkung getestet. Wie in Abbildung 13 deutlich zu erkennen ist, interagieren der GR und das HIF-1 $\alpha$ . Um zu zeigen, dass es sich um eine spezifische Bindung zwischen beiden Proteinen handelte, wurde der Vektor pcDNA3 alleine in der IVTT hergestellt und darauf in der Ko-IP anstelle des GR eingesetzt. Es war keine Wechselwirkung zu erkennen, was bestätigt, dass die Interaktion zwischen dem GR und HIF-1 $\alpha$  spezifisch ist (Abbildung 13).



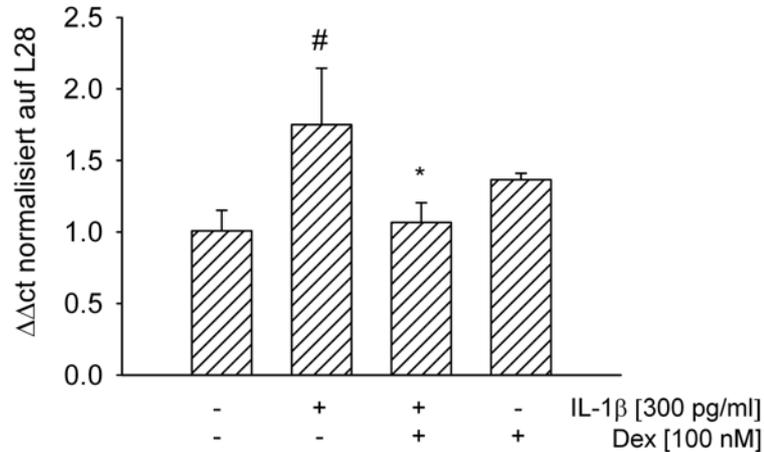
**Abb. 13** HIF-1 $\alpha$  und GR interagieren *in vitro*.

HIF-1 $\alpha$  und GR wurden in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. Daraus wurden die Proteine in einer IVTT hergestellt, wobei der GR mit  $^{35}\text{S}$  radioaktiv markiert wurde. Das HIF-1 $\alpha$ - und das GR-Protein wurden für 8 h gemeinsam in einem Reaktionsgefäß inkubiert und schließlich mit einem HIF-1 $\alpha$ -Antikörper präzipitiert. Als Negativkontrolle diente die Ko-IP zwischen der IVTT des Expressionsvektors pcDNA3 ohne Insert und der IVTT des HIF-1 $\alpha$ . In diesem Ansatz wurde der leere Expressionsvektor mit  $^{35}\text{S}$  radioaktiv markiert. Die Detektion erfolgte radiophotographisch mit einem Phospho-Imager.

### 3.7. Die Induktion des HIF-1-Zielgens VEGF durch IL-1 wird durch Dex aufgehoben

Die Untersuchung des HIF-1-Zielgens VEGF wurde mit Hilfe der Real-Time RT-PCR durchgeführt. Etwa 50% konfluente HepG2-Zellen wurden für 6 h unter hypoxischen Bedingungen mit IL-1 $\beta$  und/oder 100 nM Dex stimuliert. Im Anschluss wurde die RNA isoliert, woraus danach mit RT-PCR die cDNA hergestellt wurde, die in den Real-Time-RT-PCR-Versuchen als Matrize eingesetzt wurde. In hypoxischen Bedingungen führte eine IL-1 $\beta$  Stimulierung zu einer signifikanten Steigerung der VEGF-Expression. Durch

Applikation von Dex fiel die Expression wieder auf den Kontrollwert ab. Dex-Behandlung alleine führte verglichen mit der Kontrolle zu einer nicht signifikanten Steigerung der VEGF-mRNA-Expression.

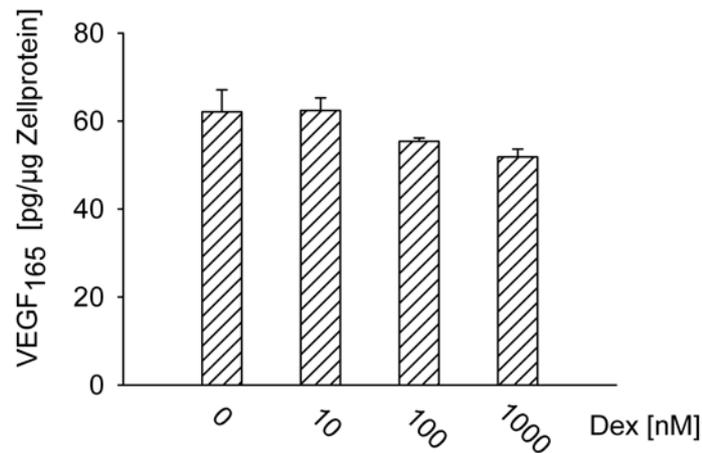


**Abb. 14** Durch IL-1β induzierte VEGF<sub>165</sub>-mRNA wird durch Dex reduziert.

HepG2-Zellen wurden für 6 h unter hypoxischen Bedingungen (3% O<sub>2</sub>) mit IL-1β und/oder 100 nM Dex stimuliert. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert, mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese als Matrize in der Real Time RT-PCR eingesetzt. VEGF<sub>165</sub> wurde mit einem „Assay on demand“ detektiert. Dargestellt sind der arithmetische Mittelwert + SE, n=4; der mit # markierte Balken stellt die Signifikanz (p<0,05) zwischen Kontrolle und IL-1-Behandlung dar. \* zeigt die Signifikanz (p<0,05) zwischen IL-1- und Dex-Behandlung (Test nach Dunnett).

### 3.8. VEGF-Sezernierung in HepG2-Zellen wird von Dex beeinflusst

Der ELISA wurde mit dem Zellüberstand aus HepG2-Zellen durchgeführt, die für 24 h bei Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) inkubiert und für die Versuchsdauer mit den angegebenen Konzentrationen Dex behandelt wurden. Signifikante Unterschiede in der Sekretion von VEGF zwischen den einzelnen Behandlungen wurden nicht gefunden. Tendenziell führen Behandlungen mit steigenden Dex-Konzentrationen zu einer Abnahme der VEGF-Konzentration im Zellüberstand (Abbildung 15).

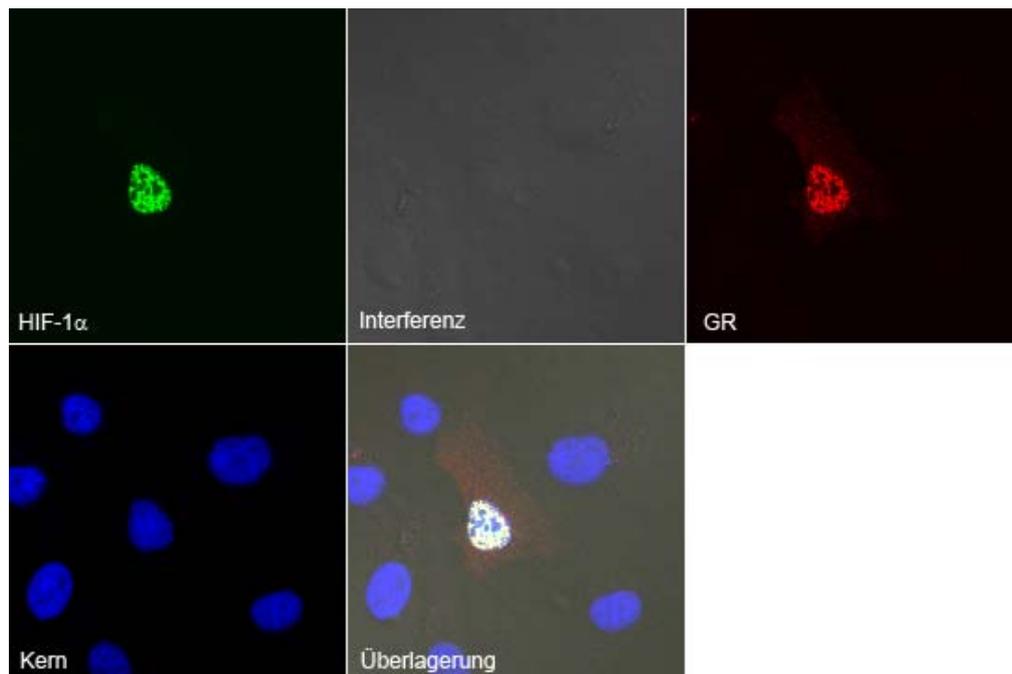


**Abb. 15 Die VEGF<sub>165</sub>-Sekretion wird in HepG2-Zellen durch Dex beeinflusst.**

Auswirkungen einer 12-stündigen Dex-Behandlung (10 – 1000 nM) auf die Produktion von VEGF<sub>165</sub> durch hypoxisch (3% O<sub>2</sub>) inkubierte HepG2-Zellen.

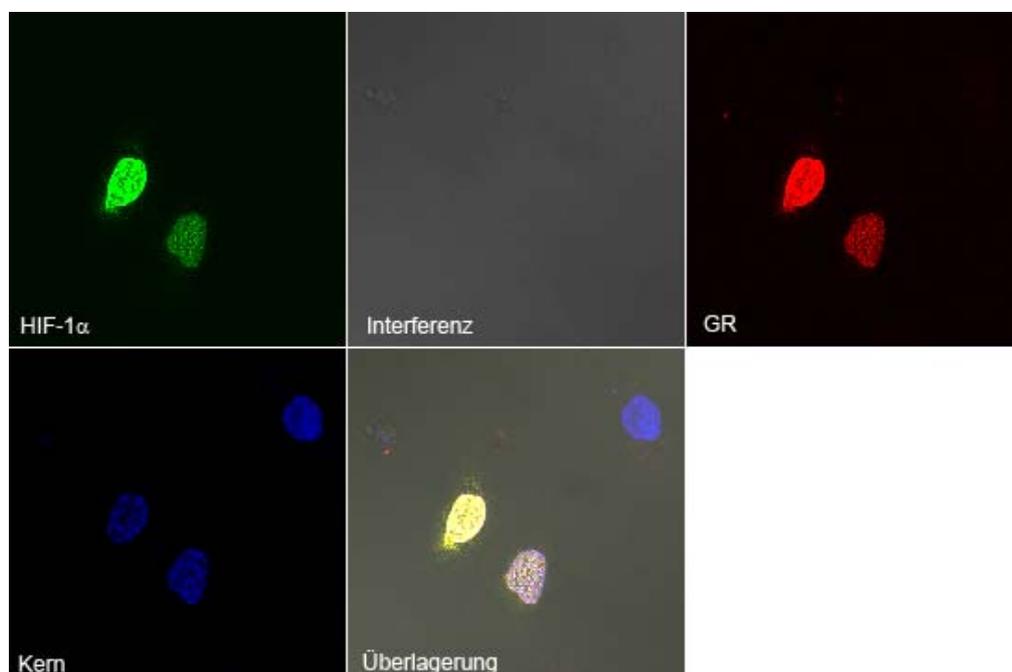
### 3.9. Dex führt in Immunfluoreszenzen von transfizierten U2OS-Zellen zu einer Translokation des GR

Für die Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden U2OS-Zellen verwendet, die keinen funktionellen GR haben. Die Zellen wurden sowohl mit einem Expressionsplasmid für den GR als auch für HIF-1 $\alpha$  transient transfiziert, bevor die Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse wurden folglich an einem Überexpressionssystem gewonnen. Sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen lag der nichtaktivierte GR im Kern und im Zytoplasma vor (Abbildung 16, Abbildung 18). Verglichen mit den jeweiligen Kontrollen führte eine Behandlung mit 0,1  $\mu$ M Dex zu einer Translokation des GR in den Kern. Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, war nach einer Behandlung mit Dex unter hypoxischen Bedingungen zu beobachten, dass kleine Mengen des HIF-1 $\alpha$ - und GR-Proteins nicht mehr in den Kern gelangen konnten und im Zytoplasma zurückblieben. Die Antikörperkontrolle war negativ, was die Spezifität der verwendeten Antikörper belegt (Abbildung 20).



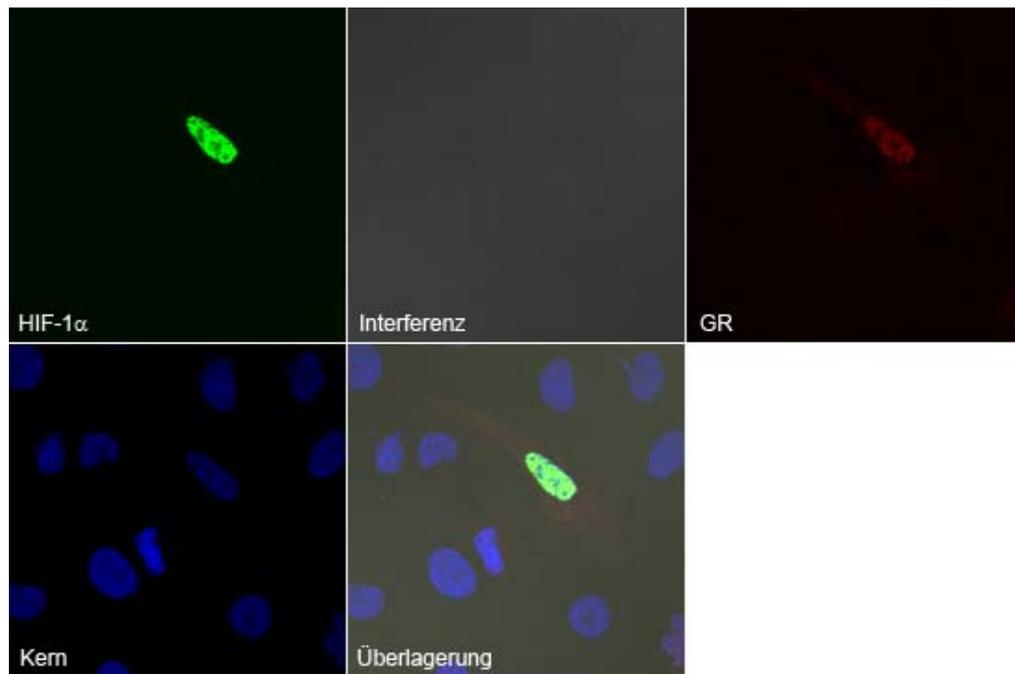
**Abb. 16 Immunfluoreszenz von hypoxischen U2OS-Zellen**

Immunfluoreszenzanalyse von transient mit einem GR- und HIF-1 $\alpha$ -Expressionsplasmid transfizierten U2OS-Zellen, die für 4 h unter hypoxischen Bedingungen (3% O<sub>2</sub>) inkubiert wurden. 1. Antikörper: Anti-HIF-1 $\alpha$ , Anti-GR, 2. Antikörper: Alexa 488, Alexa 594, Kernfärbung: Bisbenzimid.



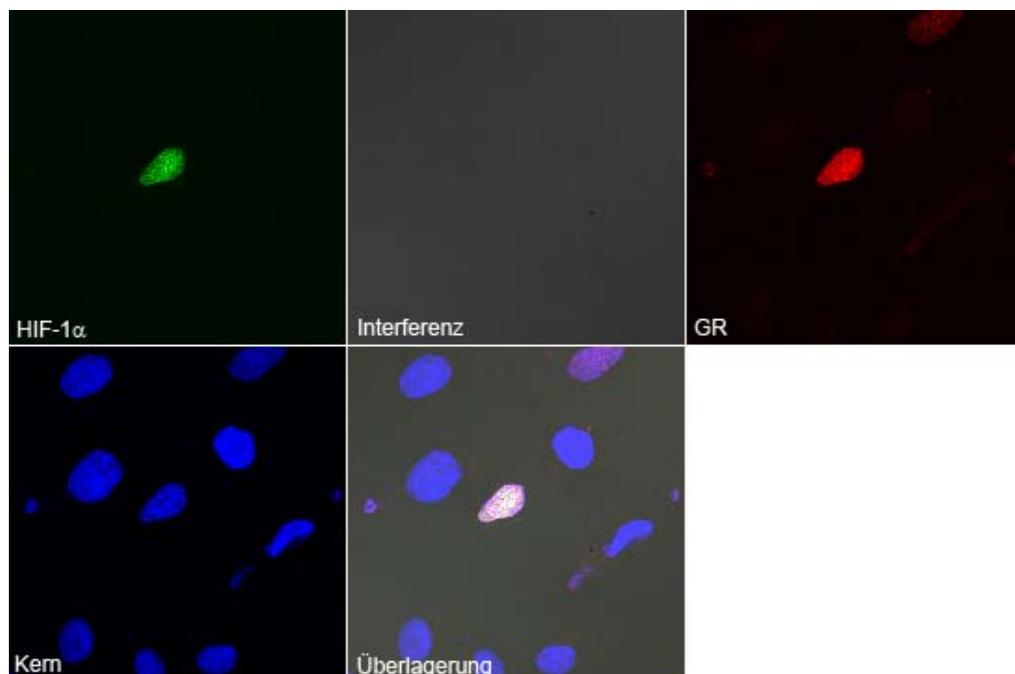
**Abb. 17 Immunfluoreszenz von hypoxisch inkubierten und mit Dex behandelten U2OS-Zellen**

Immunfluoreszenzanalyse von transient mit einem GR- und HIF-1 $\alpha$ -Expressionsplasmid transfizierten U2OS-Zellen, die mit 0,1  $\mu$ M Dex behandelt wurden und für 4 h unter Hypoxie (3% O<sub>2</sub>) inkubiert wurden. 1. Antikörper: Anti-HIF-1 $\alpha$ , Anti-GR, 2. Antikörper: Alexa 488, Alexa 594, Kernfärbung: Bisbenzimid.



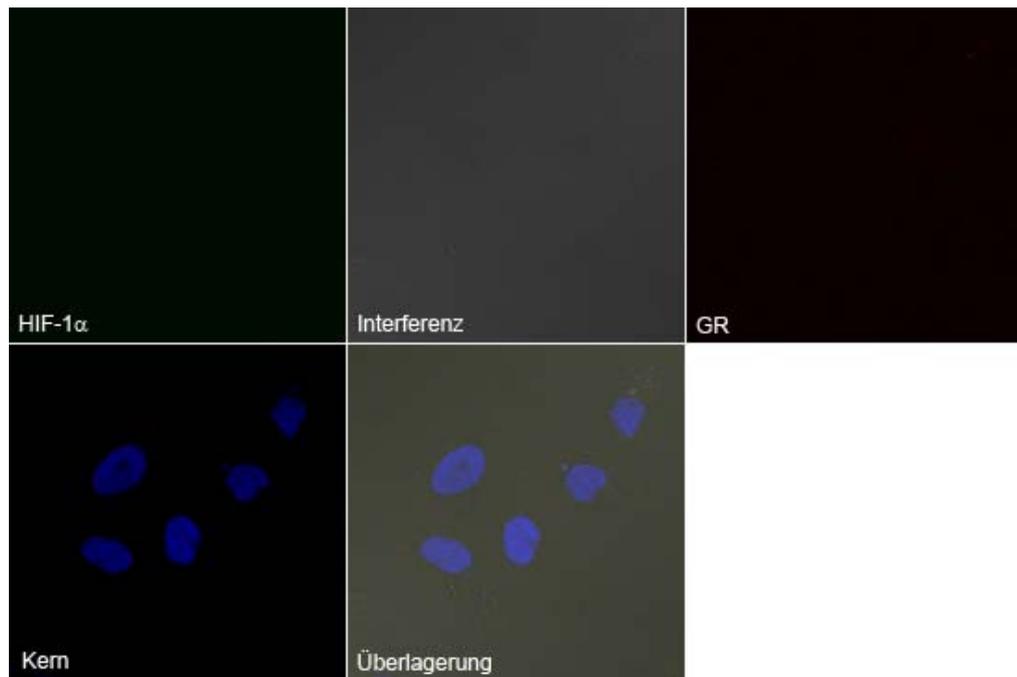
**Abb. 18 Immunfluoreszenz von normoxischen U2OS-Zellen**

Immunfluoreszenzanalyse von transient mit einem GR- und HIF-1 $\alpha$ -Expressionsplasmid transfizierten U2OS-Zellen, die in Normoxie (20% O<sub>2</sub>) für 4 h inkubiert wurden. 1. Antikörper: Anti-HIF-1 $\alpha$ , Anti-GR, 2. Antikörper: Alexa 488, Alexa 594, Kernfärbung: Bisbenzimid.



**Abb. 19 Immunfluoreszenz von normoxisch inkubierten und mit Dex behandelten U2OS-Zellen**

Immunfluoreszenzanalyse von transient mit einem GR- und HIF-1 $\alpha$ -Expressionsplasmid transfizierten U2OS-Zellen, die mit 0,1  $\mu$ M Dex behandelt wurden und für 4 h normoxisch (20% O<sub>2</sub>) inkubiert wurden. 1. Antikörper: Anti-HIF-1 $\alpha$ , Anti-GR, 2. Antikörper: Alexa 488, Alexa 594, Kernfärbung: Bisbenzimid.



**Abb. 20 Immunfluoreszenz von normoxischen U2OS-Zellen ohne Antikörperbehandlung.**

Immunfluoreszenzanalyse von transient mit einem GR- und HIF-1 $\alpha$ -Expressionsplasmid transfizierten U2OS-Zellen, die für 4 h in Normoxie (20% O<sub>2</sub>) inkubiert wurden. Ohne 1. und 2. Antikörper, Kernfärbung: Bisbenzimid.

## 4. DISKUSSION

Glukokortikoide gehören zur Klasse der Steroidhormone und werden in der Nebennierenrinde produziert. Ihre physiologischen Funktionen liegen in der Regulation des Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinmetabolismus. Synthetisch hergestellte Glukokortikoide zählen zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten weltweit. Eingesetzt werden sie u. a. zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen. Wie bereits unter 1.3.1. beschrieben, entfalten sie ihre Wirkung über einen Rezeptor, den GR.

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 wird unter hypoxischen Bedingungen in der Zelle stabilisiert, initiiert die Transkription verschiedener Zielgene und ermöglicht der Zelle so eine Anpassung an hypoxische Umweltbedingungen. Werden Zellen unter normalen Sauerstoffbedingungen mit proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ , stimuliert, wird HIF-1 ebenfalls aktiviert und transkriptionell aktiv.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Glukokortikoiden auf verschiedene hypoxisch oder normoxisch inkubierte Zelllinien mit Hilfe unterschiedlicher Methoden untersucht.

### 4.1. Das synthetische Glukokortikoid Dex beeinflusst die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge in HepG2-Zellkulturen

In den ersten Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit an HepG2 Zellen wurde deutlich, dass ansteigende Konzentrationen Dex die HIF-1 $\alpha$  Proteinmenge in Kernextrakten unter hypoxischen Bedingungen stark reduzieren. Durch Behandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 wurde HIF-1 $\alpha$  in normoxischen Kernextrakten induziert und durch steigende Konzentrationen Dex wieder reduziert. Wurden HepG2-Zellen mit Dex behandelt, konnte in Gesamtzellextrakten keine Veränderung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden; wurden aus diesen Zellen jedoch Kernextrakte gewonnen und auf die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge untersucht, so nahm diese nach Dex-Behandlung ab. Damit konnten zum Teil die Ergebnisse von Kodama et al. [Kodama et al., 2003] bestätigt werden, die ebenfalls nach einer Behandlung der Zellen mit Dex in Gesamtzellextrakten keine Effekte auf die HIF-1 $\alpha$  Proteinmenge beobachten. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-1 erfolgt als erste Antwort des Gewebes auf eine Entzündung und führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B [Ghosh

und Karin, 2002]. Bereits Untersuchungen von 1999 durch Hellwig-Bürgel et al. [Hellwig-Bürgel et al., 1999] deuten auf eine Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  an der Entzündungsreaktion hin. Die Autoren zeigen, dass auch unter normoxischen Bedingungen HIF-1 aktiviert werden kann: durch die Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Es gibt weitere Arbeiten, die in HIF-1 einen Mediator von Immunreaktionen sehen. Scheid et al. [Scheid et al., 2002] fügen Schafen künstliche Wunden zu und ermitteln am Wundrand den HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalt. Während der inflammatorischen Phase der Wundheilung finden sie dort erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Spiegel. Wird HIF-1 $\alpha$  in den Zellen der myeloischen Linie in Mäusen selektiv inaktiviert, weisen diese eine beeinträchtigte Immunantwort auf [Cramer et al., 2003]. Weitere Versuche dieser Arbeitsgruppe untersuchen HIF-1-Zielgene auf deren Induzierbarkeit nach zielgerichteter Zerstörung von HIF-1 $\alpha$  in Makrophagen. Die HIF-1 Zielgene VEGF, das glykolytische Enzym PGK und der Glukosetransporter GLUT-1 sind sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen nicht mehr induzierbar [Cramer et al., 2003]. Auch eine Studie von Karhausen et al. [Karhausen et al., 2004] untermauert eine Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  an der Entzündungsreaktion. In Mäusen erzeugen die Autoren künstliche Darmentzündungen. Diese Mäuse weisen zum Teil einen „Knock-out“ für HIF-1 $\alpha$  oder pVHL im intestinalen Epithel auf, was entweder zu einem fehlenden oder einem ständig aktiven HIF-1 in diesem Gewebe führt. Die Ergebnisse der Untersuchungen deuten darauf hin, dass epitheliales HIF-1 ein protektives Element bei entzündlichen Erkrankungen der Mukosa darstellt und zu einem klinisch vorteilhaften Verlauf dieser Krankheit führt [Karhausen et al., 2004].

#### **4.2. Dex beeinflusst die DNA-Bindung von HIF-1**

Durch Dex zeigte sich unter hypoxischen Bedingungen im HIF-1-EMSA von Kernextrakten humaner primärer Fibroblasten, HeLa- und HepG2-Zellen eine abgeschwächte Bindung von HIF-1 an die DNA. Erwartungsgemäß unterblieb in Normoxie die Bindung von HIF-1 an die DNA. Bei den humanen primären Fibroblasten wurden auch Untersuchungen mit IL-1-Stimulation durchgeführt. In den vorliegenden Untersuchungen konnte unter hypoxischen Bedingungen eine Steigerung der DNA-Bindung von HIF-1 zu beobachtet werden, die durch eine gleichzeitige Applikation von Dex wieder reduziert wurde. Hellwig-Bürgel et al. [Hellwig-Bürgel et al., 2005a] zeigen, dass

eine Behandlung von renalen proximalen tubulären Zellen mit IL-1 $\beta$  bei Normoxie zu einem Anstieg der HIF-1-DNA-Bindung führt. Bei Behandlung der Zellen mit dem spezifischen PI3K-Inhibitor LY 294002 ist weder unter hypoxischen noch unter normoxischen Bedingungen nach IL-1 $\beta$ -Stimulation eine HIF-1-DNA-Bindung nachzuweisen. PD 98059, ein spezifischer Inhibitor der MAPK, weist nur einen geringen Effekt auf. In weiteren Experimenten können die Autoren nach IL-1 $\beta$ -Behandlung keine signifikante Induktion von pAKT nachweisen, jedoch führt LY 294002 zu einer Hemmung der durch IL-1 $\beta$  vermittelten HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation und der HIF-1-DNA-Bindung. Hellwig-Bürgel et al. [Hellwig-Bürgel et al., 2005b] schließen daraus, dass eine mäßige Aktivierung der PI3K einen Einfluss auf die HIF-1 $\alpha$ -Produktion oder Stabilisierung hat. Dies weist wiederum darauf hin, dass die PI3K-Aktivität zwar notwendig ist, aber offensichtlich nicht alleine für eine HIF-1 $\alpha$ -Akkumulierung ausreicht. Hellwig-Bürgel et al. [Hellwig-Bürgel et al., 1999] zeigen durch ihre Ergebnisse eine Beteiligung der PI3K an der hypoxischen und der durch IL-1 $\beta$ -induzierten HIF-1 $\alpha$  Akkumulation.

### **4.3. Glukokortikoide beeinflussen die transkriptionelle Aktivität von HIF-1**

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Glukokortikoide (Dex, HC und C) auf ihren Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen untersucht. Die Experimente wurden mit stabil transfizierten HRG-1- bzw. HRB-5-Zellen durchgeführt. Unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen nahm die HIF-1-Aktivität mit steigenden Konzentrationen Dex, HC und C signifikant ab. Die Abnahme setzte bei Dex bereits mit niedrigeren Konzentrationen verglichen mit HC und C ein, was über die geringere glukokortikoide Wirksamkeit von HC und C erklärt werden könnte. Weiterhin wurden Experimente mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  durchgeführt, das eine signifikante Steigerung der HIF-1-abhängigen Genexpression sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Inkubationsbedingungen hervorrief und durch eine Behandlung mit Dex, HC oder C signifikant reduziert werden konnte. Diesen Ergebnissen stehen Befunde von Kodama et al. [Kodama et al., 2003] gegenüber, die eine 1,5 – 3 fache Induktion der HIF-1-abhängigen Genexpression unter Dex-Behandlung finden. Sie untersuchen die mRNA-Expression der HIF-1-Zielgene VEGF, ADM und GLUT3, die unter hypoxischen Bedingungen durch Dex-Behandlung induziert werden und

in Normoxie keine Veränderung erkennen lassen. Auch in Reporterstudien mit HRE-Luziferase-Reportergen und Expressionsplasmid pCMX-GR transient transfizierter HeLa-Zellen weisen die Autoren unter Dex-Applikation eine gesteigerte HRE-abhängige Genexpression in Abhängigkeit steigender Konzentrationen des GR-Expressionsplasmids nach. Daraus schlussfolgern Kodama et al. [Kodama et al., 2003], dass die hypoxische Induktion durch Dex-Behandlung über den GR vermittelt wird. Leonard et al. [Leonard et al., 2005] führen ähnliche Untersuchungen mit der GR-abhängigen Genexpression durch. HK-2-Zellen werden transient mit einem GRE-Luziferase-Reportergen transfiziert, für 20 h hypoxisch und für weitere 24 h mit verschiedenen Konzentrationen Dex in Hypoxie inkubiert. Dies führt zu einer Potenzierung der GRE-Luziferase-Aktivität, die den deutlichsten Anstieg mit einer Dosierung von 10 nM erreicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von Untersuchungen an stabil transfizierten und GR defizienten HRB-5-Zellen ebenfalls gezeigt werden, dass für die Reduktion der HIF-1-Genaktivität durch Glukokortikoide der funktionelle GR notwendig ist. HRB-5-Zellen zeigten unter Dex-Behandlung keine Reduktion der HIF-1-abhängigen Genexpression. Wurden diese Zellen jedoch mit dem Expressionsplasmid des humanen GR, pRShGR, transfiziert, so nahm unter Dex-Behandlung die HIF-1-Aktivität signifikant ab, was auch hier den Schluss zulässt, dass die Vermittlung der Reduktion der HIF-1-abhängigen Genexpression möglicherweise über einen sogenannten „Crosstalk“ zwischen dem GR und HIF-1 $\alpha$  vermittelt wurde. Die nahezu identische Abnahme der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 nach hypoxischer Induktion durch unterschiedliche Konzentrationen Dex ist möglicherweise auf das durch eine transiente Transfektion hervorgerufene Überexpressionssystem zurückzuführen. Vermutlich werden so große Mengen an GR exprimiert, dass bereits niedrige Glukokortikoid-Konzentrationen eine maximale Abschwächung hervorrufen können.

#### **4.4. Dex beeinflusst die HIF-1-Zielgenexpression**

Als Zielgen für HIF-1 wurde mittels Real-Time RT-PCR quantitativ die mRNA von VEGF<sub>165</sub> untersucht. Durch IL-1 $\beta$ -Behandlung wurde die VEGF<sub>165</sub>-mRNA verdoppelt verglichen mit der hypoxischen Kontrolle. Bei zusätzlicher Applikation von Dex reduzierte sich die VEGF-mRNA wieder auf den hypoxischen Ausgangswert. Wurden die Zellen lediglich mit Dex behandelt, zeigte sich ein leichter aber nicht signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontroll-mRNA. Weiterhin wurde eine ELISA-Studie durchgeführt, die

keine signifikanten Veränderungen der VEGF<sub>165</sub>-Sekretion nach Dex-Behandlung zeigten. In den gewonnenen Daten lässt sich jedoch eine abnehmende Tendenz der VEGF<sub>165</sub>-Sekretion nach steigender Dex-Konzentration beobachten. Studien von Machein et al. [Machein et al., 1999] an C6 und GS9L-Zellen (Glioma-Zellen aus der Ratte) zeigen in normoxisch inkubierten Zellen eine signifikant stärkere Abnahme der VEGF-mRNA verglichen mit hypoxischen Zellen. Auch Heiss et al. [Heiss et al., 1996] weisen darauf hin, dass unter Hypoxie 9L-Zellen aus Ratten VEGF induziert wird, was jedoch durch Dex nicht reduziert werden kann. Diese Ergebnisse werden auch von Finkenzeller et al. [Finkenzeller et al., 1995] gefunden. Dex unterdrückt zwar den durch Phorbol-Ester und den Blutplättchen-Wachstumsfaktor (Platelet-derived growth factor = PDGF) hervorgerufenen Anstieg der VEGF mRNA, aber nicht den durch Hypoxie induzierten Anstieg. Nauck et al. [Nauck et al., 1997] führten Untersuchungen mit den zwei proinflammatorischen Mediatoren PAF (Plättchen aktivierender Faktor) und PDGF durch, die beide die VEGF mRNA zeitabhängig induzieren. Die transkriptionelle Aktivierung wird von steigenden VEGF-Proteinspiegeln begleitet, die durch Behandlung mit C, HC und Prednisolon wieder aufgehoben werden.

Da die hier diskutierten Ergebnisse von Untersuchungen in Hypoxie stammen, fallen möglicherweise die Effekte von Dex, mit Ausnahme der Induktion von IL-1, auf die mRNA nur gering aus.

#### **4.5. In vitro kommt es zu einer Protein-Protein-Wechselwirkung von GR mit HIF-1 $\alpha$**

In einer Ko-Immünpräzipitationsstudie konnte in der vorliegenden Arbeit eine direkte Wechselwirkung des GR mit dem HIF-1 $\alpha$ -Protein *in vitro* nachgewiesen werden. In der Literatur ist eine Wechselwirkung der beiden Proteine nicht beschrieben. Versuche von Kodama et al. [Kodama et al., 2003], diese Interaktion mit Hilfe von GST-pull-down-Assays nachzuweisen, scheiterten.

Chauvet et al. [Chauvet et al., 2004] weisen in ihren Untersuchungen den Retinoic acid-receptor-related orphan receptor (ROR)  $\alpha$  (Rora) als ein neues Zielgen für HIF-1 nach. Dieser Rezeptor ist ein Transkriptionsfaktor, der wie auch der GR, zur Hormonrezeptor-Superfamilie gehört. Die Autoren zeigen eine Beteiligung von HIF-1 an der hypoxischen ROR $\alpha$ -Antwort. Auf molekularer Ebene gibt es einen „crosstalk“ zwischen durch HIF-1-vermittelten und durch nukleäre Rezeptoren vermittelten Signalwegen. Diese Studien geben einen Hinweis darauf, dass es sich möglicherweise auch bei dem ebenfalls zur

Hormonrezeptor-Superfamilie gehörendem GR um ein neues HIF-1-Zielgen handeln könnte. Zur näheren Untersuchung einer möglichen Wechselwirkung zwischen den Proteinen GR und HIF-1 $\alpha$  wurde in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch die Lokalisation von HIF-1 $\alpha$  und/oder dem GR mit oder ohne Dex-Behandlung untersucht. Wie aus den Bildern zu erkennen ist, lag der GR sowohl in Normoxie als auch unter Hypoxie ohne Dex-Behandlung in Kern und Zytoplasma vor. Nach Aktivierung mit Dex translozierte der GR unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen nahezu vollständig in den Kern. HIF-1 $\alpha$  lag in Hypoxie unter Dex-Behandlung vermehrt im Zytoplasma vor, verglichen mit der hypoxischen Kontrolle. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Effekte von Glukokortikoiden auf HIF-1 möglicherweise über eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  und dem GR vermittelt werden.

#### **4.6. Wie sieht ein möglicher neuer antiinflammatorischer Mechanismus für die Glukokortikoide aus?**

Wie die Glukokortikoide die in dieser Arbeit ermittelten Wirkungen auf HIF-1 $\alpha$  entfalten, wurde bisher nicht geklärt. Möglicherweise handelt es sich um einen neuen antiinflammatorischen Mechanismus. So könnte beispielsweise der hemmende Effekt von Glukokortikoiden auf HIF-1 und dessen Zielgene durch eine Interaktion mit HSP90 erklärt werden. Wird der GR durch Glukokortikoide aktiviert, werden die beiden an den Rezeptor gebundenen HSP90-Moleküle in das Zytosol abgegeben. Dadurch steigt der HSP90-Gehalt im Zytoplasma an, was möglicherweise in verstärktem Maße an HIF-1 $\alpha$  bindet und dieses an der Translokation in den Kern hindert. Dass HIF-1 $\alpha$  und HSP90 interagieren können, wurde bereits in mehreren Studien bestätigt [Minet et al., 1999; Katschinski et al., 2002; Isaacs et al., 2002; Katschinski et al., 2004].

Minet et al. [Minet et al., 1999] zeigen, dass HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie nicht mehr aktiviert werden kann, wenn HSP90 durch einen spezifischen Inhibitor blockiert ist. Damit ist bewiesen, dass HSP90 an der Stabilisierung von HIF-1 beteiligt ist. Pratt [Pratt, 1997] sowie Scheibel und Buchner [Scheibel und Buchner, 1998] weisen nach, dass Geldanamycin (GA) die ATP-Bindungsaktivität von HSP90 hemmt. Dies führt zur Formation eines HSP90-Komplexes mit einer niedrigeren Affinität für Substrate. In ihren Untersuchungen zeigen Minet und Mitarbeiter [Minet et al., 1999] an einem chimären Protein, dem EGFP-HIF-1 $\alpha$ , dass dieses unter normoxischen Bedingungen deutlicher mit HSP90 interagiert als unter

Hypoxie. An diesem mutierten Protein, das nur den C-Terminus von HIF-1 $\alpha$  exprimiert und im Kern lokalisiert ist, kann keine Wechselwirkung mit HSP90 beobachtet werden. Dies sind Indizien für eine Interaktion von HSP90 und HIF-1 $\alpha$ , die nicht über den C-Terminus vermittelt wird. Mit Immunpräzipitation gelang es den Autoren zu zeigen, dass die Interaktion der beiden Proteine von der bHLH PAS-Domäne vermittelt wird. Unter hypoxischen Bedingungen dissoziiert das an das HIF-1 $\alpha$  gebundene HSP90 ab. Mit dem chimären Protein EGFP-HIF-1 $\alpha$  finden Minet et al. [Minet et al., 1999] keine Ko-Translokation von HSP90 mit HIF-1 $\alpha$  im Kern. In Normoxie interagiert HSP90 mit der bHLH-PAS-Domäne von HIF-1 $\alpha$ . Weiterhin zeigen die Autoren, dass HSP90 in die Translokation von HIF-1 $\alpha$  in den Kern involviert ist. Durch die Aktivierung des GR liegt vermehrt freies HSP90 im Zytoplasma vor. Es kann HIF-1 $\alpha$  stabilisieren, indem es an dessen PAS-Domäne bindet. Um die Translokation von HIF-1 $\alpha$  in den Kern zu initiieren, verdrängt ARNT das HSP90 von der PAS-Domäne, um selbst dort zu binden. Möglicherweise könnte der erhöhte HSP90-Gehalt im Zytoplasma nach GR Aktivierung dazu führen, dass ARNT nicht in der Lage ist, das HSP90 komplett zu verdrängen. So könnte die Translokation einer Vielzahl von HIF-1 $\alpha$ -Proteinen in den Kern verhindert werden.

Auch Isaacs et al. [Isaacs et al., 2002] identifizieren HSP90 als einen neuen VHL- und sauerstoffunabhängigen Regulator der HIF-1 $\alpha$ -Proteinstabilität. Die Experimente führten die Autoren an RCC C2 und C6-Zellen durch, die kein funktionelles pVHL besitzen und folglich auch unter normoxischen Bedingungen ein stabiles HIF-1 $\alpha$  exprimieren. Diese Zellen wurden mit den HSP90-Inhibitoren GA und 17-AAG behandelt, was zu einer Abnahme der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge führt. Eine Behandlung mit GA destabilisierte das transient transfizierte HIF-1 $\alpha$  in pVHL-defizienten 786-0-Zellen. GA und 17-AAG reduzieren sowohl unter Normoxie und Hypoxie als auch unter Gegenwart oder Abwesenheit von endogenem pVHL die HIF-1 $\alpha$  Spiegel. Im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Minet et al. [Minet et al., 1999] verbindet sich HSP90 unter hypoxischen und auch normoxischen Bedingungen mit HIF-1 $\alpha$ . Minet et al. [Minet et al., 1999] verwenden chemische Hypoxie-Mimetika, während in der Arbeit von Isaacs et al. [Isaacs et al., 2002] reduzierte Sauerstoffspiegel zur Erzeugung einer Hypoxie verwendet werden, was möglicherweise die unterschiedlichen Ergebnisse erklärt. Tatsächlich zeigen Katschinski et al. [Katschinski et al., 2002], dass die hypoxische Akkumulation des HIF-1 $\alpha$ -

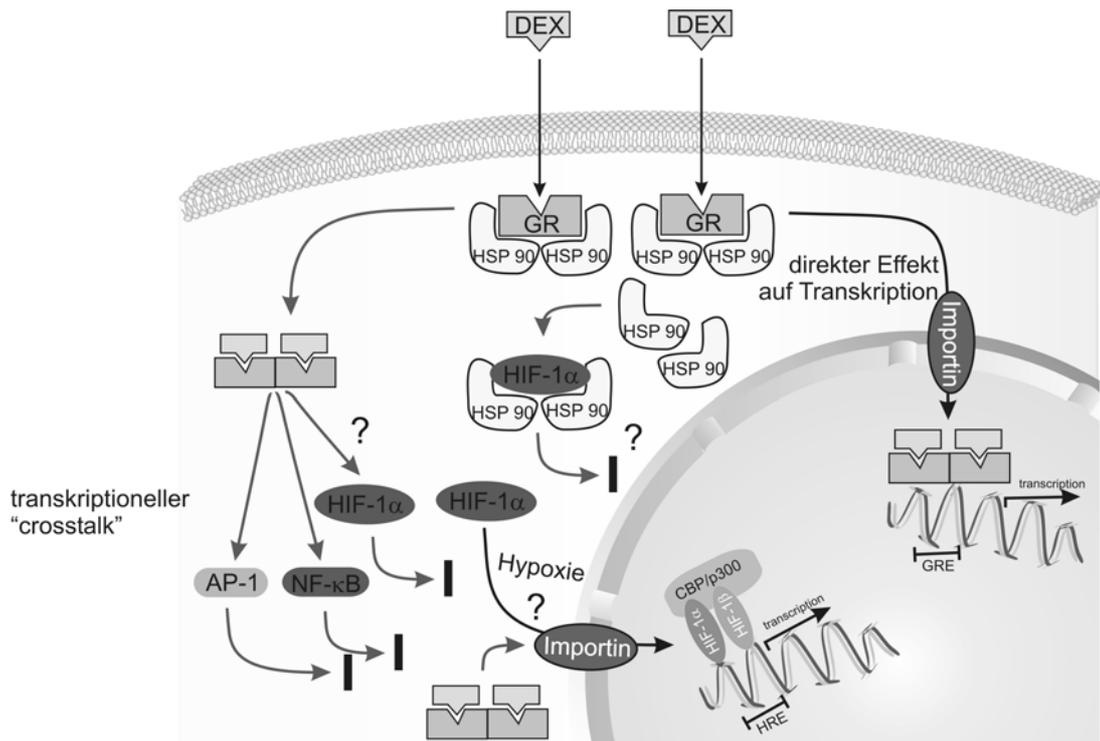
Proteins durch GA antagonisiert werden kann. Diese Beobachtungen unterstützen die Erkenntnisse von Isaacs et al. [Isaacs et al., 2002], dass HSP90 nicht nur unter hypoxischen sondern auch unter normoxischen Bedingungen mit HIF-1 $\alpha$  interagieren kann. Die Autoren vermuten auch, dass GA nicht dazu führt, dass HIF-1 $\alpha$  hochreguliert wird, sondern dass es den Abbau von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie begünstigt. In einer neueren Studie von Katschinski et al. [Katschinski et al., 2004] bestätigen die Autoren die bereits durch Minet et al. [Minet et al., 1999] entdeckte Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  und HSP90. Als Ort dieser Wechselwirkung ermitteln sie die PAS B Domäne von HIF-1 $\alpha$ . Unter Hypoxie steigt die Bindung von ARNT an HIF-1 $\alpha$  an, während sowohl die HSP90 als auch die HSP70 Bindung abnimmt. Die Verdrängung von HSP90 von der PAS B-Domäne durch ARNT ist möglicherweise ein entscheidender Vorgang für die vollständige Aktivierung von HIF-1. Unterstützt wird diese These durch Erkenntnisse, dass eine Zugabe von HSP90 zu einer DNA-Bindungsreaktion oder eine Überexpression von HSP90 die DNA-Bindung und die Transaktivierungsaktivität hemmt. Mit hypoxischen HSP90 $\beta$ -defizienten embryonalen Stammzellen können die Autoren *in vitro* zeigen, dass die HSP90-Aktivität für eine schnelle hypoxische Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  notwendig ist.

Eine weitere Möglichkeit, wie die Wirkungen von Glukokortikoiden auf HIF-1 erklärt werden könnte, ist der Kernimport. Eventuell entsteht zwischen den beiden Proteinen GR und HIF-1 $\alpha$  eine Konkurrenz um die Importine, die für den Kernimport benötigt werden. Es könnte sein, dass zu wenig Importine vorhanden sind, was es unmöglich macht, alle Proteine komplett in den Kern zu bringen. Depping et al. [Depping et al., 2005] konnten zeigen, dass die  $\alpha$ -Importine an der Translokation des HIF-1 $\alpha$  in den Kern beteiligt sind. Albermann et al. [Albermann et al., 2004] exprimierten in *Xenopus laevis* Oozyten den Ratten-GR (rGR), der im inaktiven Zustand im Zytoplasma vorliegt, nach Aktivierung durch einen Liganden wie beispielsweise der synthetische Agonist Triamcinolon Acetonid in den Kern gelangt und dort transkriptionell aktiv ist. Der Kerntransport des GR ist zeit- und hormonabhängig. Der nukleäre Import von Proteinen ist ein limitierender Prozess, da er von der Verfügbarkeit der Import-Rezeptoren und der Sättigung der Kernhülle abhängig ist. Bereits fünf Minuten nach Injektion von Triamcinolon Acetonid in die Oocyte wird die Transportkapazität für die Kerntranslokation überschritten, was 30 Minuten nach Hormonstimulation noch deutlicher ausfällt. Nach Ansicht der Autoren kann der limitierende Faktor nur eine begrenzte Menge von Transportrezeptoren sein, da *Xenopus*-Oocyten sehr viele Kernporen besitzen und sie folglich nicht limitierend sein können. Bei

Proteinen mit einer klassischen NLS wird der Kernimport über Importin  $\alpha/\beta$  vermittelt [Görlich und Kutay, 1999]. Viele Gruppen haben bereits die Interaktion von Importin  $\alpha/\beta$  mit der NL1 des GR untersucht [Savory et al., 1999; Tanaka et al., 2003; Freedman und Yamamoto, 2004]. Während Savory et al. [Savory et al., 1999] eine Interaktion zwischen dem GR und Importin  $\alpha$  in einem Yeast-two-hybrid-System beobachten, weisen Tanaka et al. [Tanaka et al., 2003] nach Kortikosteron-Behandlung eine Verbindung von Importin  $\alpha$  mit dem rGR im Zytoplasma lebender Zellen nach. Darüber hinaus zeigen sie einen parallelen Kernimport von fluoreszenz-markiertem rGR und Importin  $\alpha$  in Kortikosteron stimulierten Zellen. Durch einen Austausch der Lysine an Position 513 – 515 in Asparagine von NL1 kann die Interaktion aufgehoben werden. Freedman und Yamamoto [Freedman und Yamamoto, 2004] demonstrieren eine Wechselwirkung des rGR mit Importin  $\alpha$ , Importin 7 und Importin 8. Importin  $\alpha$  bindet an NL1, während Importin 7 und Importin 8 sowohl an NL1 als auch an NL2 bindet. Die Autoren beobachten, dass Importin  $\alpha$  und Importin 7, aber nicht Importin 8 den nukleären Import von rGR *in vitro* fördert. Diese Daten weisen auf einen Kernimport des rGR durch Importin  $\alpha/\beta$  über die Bindung an NL1 hin. Allerdings weisen die Ergebnisse von Albermann et al. [Albermann et al., 2004] auf einen zweiten Importweg für den rGR hin, der unabhängig von Importin  $\alpha/\beta$  und der Bindung an die NL stattfindet. Untersuchungen von Picard und Yamamoto [Picard und Yamamoto, 1987] unterstützen diese Beobachtungen. Sie zeigen eine effiziente, hormonabhängige und über NL2 vermittelte Kerntranslokation des GR, sowie einen unabhängigen Kernimport-Weg für den GR vermittelt über NL1 und NL2. Für Proteine scheint es durchaus üblich, dass sie mehr als einen Weg für ihren nukleären Import wählen oder mehr als ein Signal für die Förderung des Kernimportes benutzen [Picard und Yamamoto, 1987; Görlich und Kutay, 1999]. Der in *Xenopus*-Oocyten exprimierte rGR hat eine limitierende Kapazität für den Kernimport, was auf eine Importin  $\alpha/\beta$ -unabhängige Vermittlung des Kernimportes hinweist. Dies ist nach Albermann et al. [Albermann et al., 2004] vermutlich nicht auf eine mangelnde Importkapazität der Kernporenkomplexe zurückzuführen, sondern auf eine limitierte Menge eines bis jetzt noch nicht identifizierten Importrezeptors.

Die Wirkungen der Glukokortikoide könnten auch über eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung vermittelt sein, wie sie bereits für die beiden Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 beschrieben ist. Scheinman et al. [Scheinman et al., 1995] zeigten, dass NF- $\kappa$ B durch Glukokortikoide gehemmt wird. Die Interaktion zwischen NF- $\kappa$ B und dem GR

ist mit der Wechselwirkung zwischen AP-1 und dem GR vergleichbar. Bei beiden Transkriptionsfaktoren wird eine gegenseitige Hemmung beobachtet. Für die physische Interaktion von GR und AP-1 oder NF- $\kappa$ B ist die Zinkfinger-Region des GR-Proteins verantwortlich [Kerppola et al., 1993]. Die Zinkfinger-Region des GR-Proteins wird auch für die Hemmung der p65 Aktivität benötigt [Scheinman et al., 1995]. Außerdem führt Dex zu einem Verlust an nukleärem p65. Wird der GR durch ein Glukokortikoid aktiviert, dissoziiert das HSP90 ab und große Mengen an GR zirkulieren zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma [Johnston, 1989]. Scheinman et al. [Scheinman et al., 1995] postulieren, dass dieser Hormon-Rezeptor-Komplex mit dem freigesetzten NF- $\kappa$ B interagieren kann. Die Hormonbindung wird möglicherweise sowohl für die Abgabe von HSP90 als auch für die Verbindung des GR mit NF- $\kappa$ B benötigt. Die Autoren beobachten eine Wechselwirkung von p50 mit dem GR als auch eine endogene Wechselwirkung der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten, was zu einer Blockierung der DNA-Bindung führt. Eine Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren und deren DNA-Bindungsregionen können, wie bei NF- $\kappa$ B/bZIP-Komplexen, zu einer transkriptionellen Synergie führen oder zu einer transkriptionellen Repression wie für den AP-1/GR oder den NF- $\kappa$ B/GR-Komplex beschrieben [Scheinman et al., 1995]. Sowohl unsere Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation als auch der Immunfluoreszenz weisen auf diese Möglichkeit der Interaktion hin. Beide Proteine können *in vitro* miteinander interagieren und in der Immunfluoreszenz ist nach hypoxischer Inkubation im Zytoplasma vermehrtes HIF-1 $\alpha$ -Protein mit Dex-Stimulation im Vergleich zur nichtstimulierten hypoxischen Kontrolle zu sehen. In Abbildung 21 sind die drei möglichen Mechanismen schematisch dargestellt.



**Abb. 21 Mögliche Mechanismen der Wirkung von Glukokortikoiden auf HIF-1.**

Mögliche Mechanismen, auf die die Wirkung der Glukokortikoide auf HIF-1 zurückgeführt werden können. Direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen HIF-1 $\alpha$  und GR im Zytoplasma, Wechselwirkung von HIF-1 $\alpha$  und HSP90 im Zytoplasma, Importinkonkurrenz zwischen GR und HIF-1 $\alpha$ .

#### 4.7. Schlussbetrachtung

Zwei Publikationen sind bereits erschienen, die sich mit der Wechselwirkung des GR mit HIF-1 auseinandersetzen [Kodama et al., 2003; Leonard et al., 2005]. Während Kodama et al. [Kodama et al., 2003] den hier vorliegenden Ergebnissen konträre Beobachtungen machen, stehen die Befunde von Leonard et al. [Leonard et al., 2005] damit weitgehend im Einklang.

Kodama et al. [Kodama et al., 2003] wählen andere Versuchsbedingungen, was möglicherweise der Grund für die gegensätzlichen Ergebnisse zur vorliegenden Arbeit ist. So verwenden sie anstelle von 3% Sauerstoff als Hypoxie 1% Sauerstoff. Außerdem befreien sie vor Versuchsbeginn das FCS durch Aktivkohle von Serumsteroiden. Für Reporterstudien verwenden sie transient mit einem HRE-Luziferase-Reportergenplasmid und einem GR-Expressionsplasmid transfizierte HeLa-Zellen, obwohl für diese Zelllinie belegt ist, dass sie den GR auch endogen exprimiert [Kallio et al., 1999; Eggert et al., 1997]. Aus hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) oder normoxischen (20% O<sub>2</sub>) HeLa-Zellen, die teilweise mit verschiedenen Dex-Konzentrationen behandelt waren, werden Gesamtzellextrakte hergestellt. Eingesetzt im Western Blot sind keine Veränderungen im

HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalt zu erkennen. In der vorliegenden Arbeit wurde bei Kernextrakten sowohl aus hypoxischen HepG2-Zellen als auch aus normoxischen HepG2-Zellen, die mit IL-1 $\beta$  stimuliert wurden, nach Dex-Behandlung eine signifikante Abnahme des HIF-1 $\alpha$ -Proteingehaltes verzeichnet. Im Gegensatz zu den Versuchen von Kodama et al. [Kodama et al., 2003] wurden für die hier vorliegenden Reportergergenstudien stabil mit einem HRE-abhängigen Reportergergen transfizierte HepG2-Zellen verwendet. Lediglich für den Versuch mit den stabil transfizierten Hep3B-Zellen wurde transient ein GR-Expressionsplasmid transfiziert, um zu beweisen, dass der beobachtete Mechanismus von Dex auf HIF-1 über den GR vermittelt wird bzw. dieser dafür von außerordentlicher Wichtigkeit ist. Kodama et al. [Kodama et al., 2003] führen außerdem Versuche mit transfizierten COS-7-Zellen durch. Bei diesen Zellen handelt es sich um Affenzellen, während in den hier diskutierten Versuchen humane Hepatom-Zelllinien verwendet wurden. Möglicherweise sind die konträren Ergebnisse von Kodama et al. [Kodama et al., 2003] darauf zurückzuführen, dass sie mit einem Überexpressionssystem in Affenzellen arbeiten, das deutlich weiter vom Mensch entfernt ist, als die in den vorliegenden Versuchen verwendeten humanen Zelllinien. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass in der vorliegenden Arbeit FCS sowohl in der Zellkultur als auch im Versuch verwendet wurde, während Kodama et al. [Kodama et al., 2003] zwar FCS in der Zellkultur verwenden, aber für die Experimente nur von Serumsteroiden befreites FCS einsetzen. Es ist fraglich, ob eine Befreiung des FCS von Serumsteroiden für den Versuch ausreichend ist. Falls diese einen Einfluss haben sollten, ist dies möglicherweise bereits unter den „normalen“ Kulturbedingungen an die Zelle vermittelt worden. Kodama und Mitarbeiter [Kodama et al., 2003] untersuchen ebenfalls den Einfluss von HIF-1 auf die GR-abhängige transkriptionelle Aktivität, indem sie COS-7-Zellen transient mit HIF-1 $\alpha$ , ARNT und einem GRE-abhängigen Luziferase-Reportergergen transfizieren. Werden diese Zellen mit Dex behandelt, so zeigt sich weder unter Dex-Behandlung noch unter Hypoxie oder Normoxie ein Unterschied in der GR-abhängigen transkriptionellen Aktivität. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Untersuchungen von Leonard et al. [Leonard et al., 2005] an mit einem GRE-Promotor Luziferase-Reporter-Konstrukt transient transfizierten HK-2-Zellen, die unter Dex-Behandlung eine Potenzierung der GRE-Promotor-Aktivität feststellen. Wird die GR-Expression durch siRNA ausgeschaltet, schwächt sich die potenzierte Glukokortikoid-Aktivität wieder ab. Bei den HK-2-Zellen handelt es sich um humane proximale tubuläre Epithelzellen der Niere. Leonard und Mitarbeiter [Leonard et al., 2005] ermitteln mit Micorarray-Analyse eine Hochregulation des GR unter Hypoxie. Weiterhin führt auch die

Überexpression von HIF-1 $\alpha$  zu einer Hochregulation des GR und potenziert die Glukokortikoid-abhängige Aktivität. Insgesamt sehen Leonard et al. [Leonard et al., 2005], dass unter Hypoxie nicht nur die GR-Expression, sondern auch der Einfluss auf die Hypoxie-abhängige Genexpression verändert ist. Aufgrund ihrer Ergebnisse behaupten die Autoren, dass Hypoxie auch die Beseitigung von entzündlichen Erkrankungen stimuliert, was über die Induktion des GR und die nachträglich gesteigerte Sensitivität gegenüber der antiinflammatorischen Wirksamkeit der Glukokortikoide vermittelt wird.

Da HIF-1 wie beschrieben eine große Rolle in der Entzündung spielt, erklärt die negative Wirkung der Glukokortikoide auf HIF-1 möglicherweise die verzögerte Wundheilung bei Patienten, die mit Glukokortikoiden behandelt werden. So ist VEGF ein HIF-1-Zielgen und induziert die Angiogenese. Bleibt diese Induktion durch Glukokortikoid-Behandlung aus, so könnte es zu einer verzögerten Wundheilung kommen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Glukokortikoide einen negativen Einfluss auf die HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression, die HIF-1-DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 haben. Auch die durch das proinflammatorische Zytokin IL-1 ausgelöste Induktion der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression, der HIF-1-DNA-Bindung und der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 und der erhöhten HIF-1-Zielgenexpression kann durch Glukokortikoide wieder rückgängig gemacht werden. Um die bereits erwähnten möglichen Mechanismen, die hinter diesen Beobachtungen zu vermuten sind, zu ermitteln müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Es müssten die Wechselwirkungen zwischen HSP90, GR und HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie und/oder Glukokortikoid-Behandlung ermittelt werden. Weiterhin könnten Kompetitionsstudien Aussagen über den Kernimport von HIF-1 $\alpha$  und dem aktivierten GR machen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Anpassung des Organismus an Sauerstoff-Mangel wird auf transkriptioneller Ebene über die Aktivierung sogenannter Hypoxie-induzierbarer Faktoren (HIF) vermittelt. Dabei handelt es sich um heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Während die  $\beta$ -Untereinheit ständig im Kern vorhanden ist, wird unter normalen Sauerstoffbedingungen die  $\alpha$ -Untereinheit sofort ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Liegt ein Sauerstoffmangel vor, wird HIF- $\alpha$  stabilisiert. Es transloziert in den Kern, dimerisiert dort mit HIF- $\beta$ , bindet an weitere Ko-Faktoren und an das HRE (Hypoxie-responsible Element) der DNA, wo die die Transkription der HIF-Zielgene initiiert wird. Dazu zählen Faktoren, die Prozesse wie die Erythropoiese, die Angiogenese und den zellulären Energiestoffwechsel regulieren und damit eine Anpassung des Organismus an niedrige Sauerstoffkonzentrationen gewährleisten.

HIF-1 spielt eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen. Bestimmte proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) bewirken auch unter normoxischen Bedingungen eine Induktion von HIF-1 $\alpha$ . Da Glukokortikoide Medikamente mit anitnflammatorischer Wirkung sind, wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer Glukokortikoid-Behandlung von Zellen auf HIF-1 untersucht. Neben dem am häufigsten verwendeten Glukokortikoid Dexamethason (Dex) wurden Cortison (C) und Hydrocortison (HC) eingesetzt. In Westernblot-Analysen nahm das HIF-1 $\alpha$ -Protein in hypoxischen Kernextrakten nach Dex-Behandlung deutlich ab. Westernblots aus Kernextrakten ergaben, dass durch IL-1 unter Normoxie induziertes HIF-1 $\alpha$  nach Dex-Behandlung abnimmt. In Gesamtzellextrakten war nach Dex-Behandlung keine Veränderung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinbande zu beobachten. In EMSA (electrophoretic-mobility shift assay) Studien an verschiedenen Zelllinien wurde deutlich, dass Dex zu einer Abschwächung der HIF-1-DNA-Bindung führt bzw. die durch IL-1-induzierte HIF-1-DNA-Bindung wieder aufhebt. Im Ko-Immünpräzipitationsexperiment war eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) und HIF-1 $\alpha$  *in vitro* nachweisbar. An mit einem HRE-abhängigen Reporter gen stabil transfizierten HRG-1-Zellen wurde gezeigt, dass sowohl Dex als auch C und HC die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 reduzieren. Dies traf ebenfalls für die durch IL-1 induzierte Aktivität von HIF-1 zu. An mit einem HRE-abhängigen Reporter gen stabil transfizierten HRB-5 Zellen, die nativ keinen GR exprimieren, wurde ermittelt, dass die transkriptionelle Aktivität von HIF-

1 durch Dex nicht abgeschwächt wird. Wurde diesen Zellen jedoch ein GR-Expressionsplasmid transfiziert, so zeigte sich nach Dex-Behandlung eine signifikante Abnahme der HIF-1-Aktivität. Aus diesem Befund wurde geschlossen, dass der GR für die Wirkung von Glukokortikoiden auf HIF-1 essentiell ist.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei den beobachteten Wirkungen von Glukokortikoiden um einen bisher unbekanntenen neuen antiinflammatorischen Mechanismus handelt. Dabei könnte es sich um eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  und dem GR, eine Interaktion zwischen HSP90 und HIF-1 $\alpha$  oder eine Konkurrenz zwischen HIF-1 $\alpha$  und dem GR um Importine handeln, die eine Translokation von HIF-1 $\alpha$  in den Kern behindern.

## 6. SUMMARY

The adaptation of organisms to low oxygen levels is mediated via the activation of so called hypoxia inducible factors (HIF-1 and HIF-2). HIFs are heterodimeric transcription factors consisting of two subunits, the  $\alpha$ - and the  $\beta$ -subunit. The  $\beta$ -subunit is constitutively present in the nucleus whereas under normoxic conditions the  $\alpha$ -subunit is rapidly degraded by the proteasome. During oxygen deficiency HIF- $\alpha$  is stabilised, translocates to the nucleus where it dimerises with HIF- $\beta$  and accumulates with various co-factors. This complex binds to the HRE (hypoxia responsive element) of the DNA where it initiates the transcription of HIF-target genes that are involved in erythropoiesis, angiogenesis and the regulation of the cellular energy metabolism helping to adapt the organism to low oxygen levels.

HIF-1 plays a crucial role in the development of inflammations. Under normoxic conditions proinflammatory cytokines like Interleukin 1 (IL-1) cause an induction of HIF-1 $\alpha$ . As glucocorticoids are widely used antiinflammatory drugs, their effect on HIF-1 was tested in cells in the present dissertation. The mainly used glucocorticoid was dexamethasone (Dex), further studies were conducted with Cortisone (C) and Hydrocortisone (HC). In nuclear extracts of Dex-treated hypoxic cells HIF-1 $\alpha$ -protein was reduced as shown by Western blotting. In nuclear extracts from normoxic IL-1 treated cells HIF-1 $\alpha$  was also reduced after treatment with Dex. However, Western blots of whole cell extracts no difference was apparent between Dex-treated and non-treated cells. EMSA (electrophoretic mobility shift assay) studies of different cell lines showed decreased HIF-1-DNA-binding after application of Dex. In co-immunoprecipitation studies a direct protein-protein-interaction of the glucocorticoid receptor (GR) and HIF-1 $\alpha$  *in vitro* was found. In HRG-1 cells, that are stably transfected with a HRE-dependent reporter gene, Dex as well as HC and C were able to reduce the transcriptional activity of HIF-1. In reporter gene assays with GR deficient HRB-5 cells, likewise stably transfected with a HRE-dependent reporter gene, Dex was not able to reduce the transcriptional activity of HIF-1. However, when the cells were transfected with a GR expression plasmid a significant reduction of HIF-1 activity was observed. These results led to the assumption that the GR is essential for the effect of glucocorticoids on HIF-1.

The present results are a hint for a novel antiinflammatory mechanism of glucocorticoids. Potentially, there could be a direct protein-protein-interaction between HIF-1 $\alpha$  and the

GR, an interaction between HSP90 and HIF-1 $\alpha$  or a competition between HIF-1 $\alpha$  and the GR for importins not allowing the translocation of HIF-1 $\alpha$  into the nucleus.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**Adcock IM, Brown CR, Barnes PJ** (1996) Tumour necrosis factor alpha causes retention of activated glucocorticoid receptor within the cytoplasm of A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 545-550

**Adcock IM, Nasuhara Y, Stevens DA, Barnes PJ** (1999) Ligand-induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) trans-repression and transactivation: preferential targetting of NF-kappaB and lack of I-kappaB involvement. *Br J Pharmacol* 127: 1003-1011

**Albermann L, Shahin V, Ludwig Y, Schafer C, Schillers H, Oberleithner H** (2004) Evidence for importin alpha independent nuclear translocation of glucocorticoid receptors in *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Physiol Biochem* 14: 343-350

**Albina JE, Mastrofrancesco B, Vessella JA, Louis CA, Henry jr WL, Reichner JS** (2001) HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 $\alpha$  induction in primary inflammatory cells by TNF- $\alpha$ . *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1971-C1977

**Alvarez-Tejado M, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, Landazuri MO, 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: 13508-13517

**Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM** (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12969-12973

**Arias J, Alberts, AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy, M** (1994) Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370 (6486): 226-229

**Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Simon MC** (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 alpha nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *J Biol Chem* 277: 15162-15170

**Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M** (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270 (5234): 286-290

- Barnes NY, Li L, Yoshikawa K, Schwartz LM, Oppenheim RW, Milligan CE** (1998) Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons. *J Neurosci* 18: 5869-5880
- Barnes PJ, Greening AP, Crompton GK** (1995) Glucocorticoid resistance in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 152: S125-S140
- Beato M, Herrlich P, Schütz G** (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-857
- Beutler B, Cerami A** (1986) Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320: 584-588
- Bilton RL, Booker GW** (2003) The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF $\alpha$ ) regulation. *Eur J Biochem* 270: 791-798
- Brack A, Rittner HL, Younge BR, Kaltschmidt C, Weyand CM, Goronzy JJ** (1997) Glucocorticoid-mediated repression of cytokine gene transcription in human arteritis-SCID chimeras. *J Clin Invest* 99: 2842-2850
- Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ** (2003) The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* 60: 1376-1393
- Bruick RK** (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9082-9087
- Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH** (2001) Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Eur J Physiol* 443: 240-249
- Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L** (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 20: 402-415
- Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ** (2003) Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem* 277: 40112-40117
- Chauvet C, Bois-Joyeux B, Berra E, Pouyssegur J, Danan JL** (2004) The gene encoding human retinoic acid-receptor-related orphan receptor alpha is a target for hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 384: 79-85

- Chensue SW, Terebuh PD, Remick DG, Scales WE, Kunkel SL** (1991) In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia. Kinetics, Kupffer cell expression, and glucocorticoid effects. *Am J Pathol* 138: 395-402
- Coghlan MJ, Elmore SW, Kym PR, Kort ME** (2003) The pursuit of differentiated ligands for the glucocorticoid receptor. *Curr Top Med Chem* 3: 1617-1635
- Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS** (2003) HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112: 645-657
- Dann CE, Bruick RK, Deisenhofer J** (2002) Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *The Lancet* 99: 15351-15356
- De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G** (1997) Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13504-13509
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G** (2001) Glucocorticoid repression of AP-1 is not mediated by competition for nuclear coactivators. *Mol Endocrinol* 15: 219-227
- Depping R., Schindler S, Friedrich B, Sommer N, Hartmann E, Jelkmann W, Metzen E, Koehler, M** (2005) Nuclear translocation of hypoxia sensing transcription factors: involvement of the importin alpha/beta-system. *FEBS J* 272: Suppl 1, 400
- Dumont A, Hehner SP, Schmitz ML, Gustafsson JA, Liden J, Okret S, van der Saag PT, Wissink S, van der BB, Herrlich P, Haegeman G, De Bosscher K, Fiers W** (1998) Cross-talk between steroids and NF-kappa B: what language? *Trends Biochem Sci* 23: 233-235
- Eggert M, Michel J, Schneider S, Bornfleth H, Baniahmad A, Fackelmayer FO, Schmidt S, Renkawitz R** (1997) The glucocorticoid receptor is associated with the RNA-binding nuclear matrix protein hnRNP U. *J Biol Chem* 272: 28471-28478
- El Awad B, Kreft B, Wolber E-M, Hellwig-Burgel T, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W** (2000) Hypoxia and interleukin-1 $\beta$  stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int* 58: 43-50
- Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y** (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 $\alpha$  in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 18: 1905-1914

- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii KY** (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4273-4278
- Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ** (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-54
- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL** (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59: 3915-3918
- Finkenzeller G, Technau A, Marme D** (1995) Hypoxia-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is independent of functional AP-1 transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 432-439
- Flamme I, Frohlich T, von-Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W** (1997) HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 63: 51-60
- Freedman und Yamamoto KR** (2004) Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol Biol Cell* 15: 2276-2286
- Garrelds IM, van Hal PT, Haakmat RC, Hoogsteden HC, Saxena PR, Zijlstra FJ** (1999) Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukaemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. *Mediators Inflamm* 8: 229-235
- Ghosh S, Karin M** (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.: S81-S96
- Giaccia A, Siim BG, Johnson RS** (2003) HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2: 803-811
- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM** (1986) Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46: 645-652
- Görlich D, Kutay U** (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607-60.: 607-660

- Görlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R** (2001) Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22<sup>phox</sup>-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 89: 47-54
- Greten FR, Karin M** (2004) The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 206: 193-199
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA** (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 1998 205-213
- Gusterson R, Brar B, Faulkes D, Giordano A, Chrivia J, Latchman D** (2002) The transcriptional co-activators CBP and p300 are activated via phenylephrine through the p42/p44 MAPK cascade. *J Biol Chem* 277: 2517-2524
- Haddad JJ und Land SC** (2001) A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- $\alpha$ -dependent regulation of HIF-1 $\alpha$ . *FEBS Lett* 505: 269-274
- Hayden MS, Ghosh S** (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18: 2195-2224
- Heck S, Bender K, Kullmann M, Gottlicher M, Herrlich P, Cato AC** (1997) I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J* 16: 4698-4707
- Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Cato AC** (1994) A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 13: 4087-4095
- Heiss JD, Papavassiliou E, Merrill MJ, Nieman L, Knightly JJ, Walbridge S, Edwards NA, Oldfield EH** (1996) Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of the glucocorticoid receptor and vascular permeability factor. *J Clin Invest* 98: 1400-1408
- Hellwig-Bürigel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W** (1999) Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94: 1561-1567
- Hellwig-Bürigel T, Stiehl DP, Katschinski DM, Marxsen J, Kreft B, Jelkmann W** (2005a) VEGF production by primary human renal proximal tubular cells: requirement of HIF-1, PI3-kinase and MAPKK-1 signaling. *Cell Physiol Biochem* 15: 99-108
- Hellwig-Bürigel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W** (2005b) Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res* 25: 297-310

- Hollander AP, Corke KP, Freemont AJ, Lewis CE** (2001) Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum* 44: 1540-1544
- Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS** (2002) Sequence determinants in hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 277: 39792-39800
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF** (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7987-7992
- Hur E, Chang KY, Lee E, Lee S-K, 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 $\alpha$ . *Mol Pharmacol* 59: 1216-1224
- Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM** (2002) Hsp90 regulates a VHL-independent HIF-1 $\alpha$  degradative pathway. *J Biol Chem* 277: 29936-29944
- Isohashi F und Okamoto K** (1993) ATP-stimulated translocation promoter that enhances the nuclear binding of activated glucocorticoid receptor complex. Biochemical properties and its function (mini-review). *Receptor* 3: 113-124
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin Jr. WG** (2001) HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292: 464-468
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL** (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . *Genes Dev* 12: 149-162
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ** (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472
- Janknecht R, Hunter T** (1996) Transcription. A growing coactivator network. *Nature* 383: 22-23
- Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK** (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 12: 363-369

- Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK** (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: 1749-1753
- Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL** (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 272: 19253-19260
- Johnston KW** (1989) Multicenter prospective study of nonruptured abdominal aortic aneurysm. Part II. Variables predicting morbidity and mortality. *J Vasc Surg* 9: 437-447
- Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P** (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62: 1189-1204
- Jones MK, Szabo IL, Kawanaka H, Husain SS, Tarnawski AS** (2002) von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1alpha: new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis. *FASEB J* 16: 264-266
- Joyce DA, Steer JH, Abraham LJ** (1997) Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF-alpha secretion. *Inflamm Res* 46: 447-451
- Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L** (2003a) Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J* 370: 1011-1017
- Jung YJ, Isaacs JS, Sunmin L, Trepel J, Neckers L** (2003b) IL-1 $\beta$  mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  via an NF $\kappa$ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 17: 2115-2117
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L** (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* 17: 6573-6586
- Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L** (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274: 6519-6525
- Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG** (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85: 403-414

- Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH** (2004) Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest* 114: 1098-1106
- Karin M** (1998) New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 93(4): 487-90
- Katschinski D, Le L, Schindler S, Thomas T, Voss A, Wenger R** (2004) Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilization. *Cell Physiol Biochem* 14: 351-360
- Katschinski DM, Le L, Heinrich D, Wagner K.F., Hofer T, Schindler SG, Wenger RH** (2002) Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is dependent on heat shock protein-90 activity. *J Biol Chem* 277: 9262-9267
- Kerppola TK, Luk D, Curran T** (1993) Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro. *Mol Cell Biol* 13: 3782-3791
- Kline DD, Peng YJ, Manalo DJ, Semenza GL, Prabhakar NR** (2002) Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 821-826
- Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, Ratcliffe PJ** (2003) Effect of ascorbate on the activity of hypoxia inducible factor (HIF) in cancer cells. *Cancer Res* 63: 1764-1768
- Kodama T, Shimizu N, Yoshikawa N, Makino Y, Ouchida R, Okamoto K, Hisada T, Nakamura H, Morimoto C, Tanaka H** (2003) Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression. *J Biol Chem* 278: 33384-33391
- Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, Semenza GL, Sitkovsky MV** (2002) Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha -deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2170-2174
- Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL** (1999) Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 209: 254-267
- Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M** (1995) The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res* 23: 4542-4550

- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK** (2002) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16: 1466-1471
- Langhoff E, Ladefoged J, Jakobsen BK, Platz P, Ryder LP, Svejgaard A, Thaysen JH** (1986) Recipient lymphocyte sensitivity to methylprednisolone affects cadaver kidney graft survival. *Lancet* 1: 1296-1297
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL** (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21: 3995-4004
- Leonard MO, Godson C, Brady HR, Taylor CT** (2005) Potentiation of glucocorticoid activity in hypoxia through induction of the glucocorticoid receptor. *J Immunol* 174: 2250-2257
- Li H, Ko HP, Whitlock JP** (1996) Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1 $\alpha$ . *J Biol Chem* 271: 21262-21267
- Machein MR, Kullmer J, Ronicke V, Machein U, Krieg M, Damert A, Breier G, Risau W, Plate KH** (1999) Differential downregulation of vascular endothelial growth factor by dexamethasone in normoxic and hypoxic rat glioma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25: 104-112
- Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L** (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414: 550-554
- Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L** (2002) Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  locus. *J Biol Chem* 277: 32405-32408
- Martin F, Linden T, Katschinski DM, Oehme F, Flamme I, Mukhopadhyay CK, Eckhardt K, Troger J, Barth S, Camenisch G, Wenger RH** (2005): Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* 105: 4613-4619
- Masson N, Ratcliffe PJ** (2003) HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O<sub>2</sub> levels. *J Cell Sci* 116: 3041-3049
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ** (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20: 5197-5206

- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ** (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271-275
- McNeill LA, Hewitson KS, Claridge TD, Seibel JF, Horsfall LE, Schofield CJ** (2002) Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem J* 367: 571-575
- Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Buergel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J** (2003) Intracellular localisation of human HIF-1 $\alpha$  hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116: 1319-1326
- Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J, Michiels C** (2000) ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* 468: 53-58
- Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C** (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 $\alpha$ -Hsp90 interaction. *FEBS Lett* 460: 251-256
- Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, Matsushima K** (1994) Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 269: 13289-13295
- Müller-Esterl, W** (2004): Biochemie. 1. Aufl., Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag
- Nauck M, Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Wieland H, Stulz P, Perruchoud AP** (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 398-406
- Nelson D, Cox M** (2001). Lehninger Biochemie, 3. Aufl., Heidelberg, Berlin, New York, Springer Verlag
- Nissen RM, Yamamoto KR** (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14: 2314-2329
- Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG** (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the  $\beta$ -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2: 423-427
- Okamoto K, Hirano H, Isohashi F** (1993) Molecular cloning of rat liver glucocorticoid-receptor translocation promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 848-854

- Oro AE, Hollenberg SM, Evans RM** (1988) Transcriptional inhibition by a glucocorticoid receptor-beta-galactosidase fusion protein. *Cell* 55: 1109-1114
- Perkins TT, Smith DE, Chu S** (1997) Single polymer dynamics in an elongational flow. *Science* 276: 2016-2021
- Picard D, Yamamoto KR** (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 6: 3333-3340
- Pratt WB** (1997) The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:297-326.: 297-326
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ** (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the  $\alpha$  subunit. *J Biol Chem* 272: 11205-11214
- Ray KP, Farrow S, Daly M, Talabot F, Searle N** (1997) Induction of the E-selectin promoter by interleukin 1 and tumour necrosis factor alpha, and inhibition by glucocorticoids. *Biochem J* 328: 707-715
- Reddy SA, Huang JH, Liao WS** (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation. *J Immunol* 164: 1355-1363
- Refojo D, Liberman AC, Holsboer F, Arzt E** (2001) Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol* 79: 385-394
- Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J** (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 274: 32631-32637
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J** (2000) Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275: 26765-26771
- Römpp Chemielexikon** (1995) Hrsg: Falbe J, Regitz M, 9. korr. Aufl. auf CD-ROM, Vers. 1.0, *Stuttgart, Thieme Verlag*
- Salceda S, Caro J** (1997) Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 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: 22642-22647

- Sandau KB, Zhou J, Kietzmann T, Brune B** (2001) Regulation of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem* 276: 39805-39811
- Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J** (2003) Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling up-regulates the activity of hypoxia inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* 278: 14013-14019
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU** (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55-89
- Schäfer, G** (2004) Wie kam der Sauerstoff in die Atmosphäre: Ursprung und biologische Dynamik von Sauerstoff. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerztherapie* 39: Suppl I, 2-18
- Scharte M, Han X, Bertges DJ, Fink MP, Delude RL** (2003) Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G373-G384
- Scheibel T, Buchner J** (1998) The Hsp90 complex--a super-chaperone machine as a novel drug target. *Biochem Pharmacol* 56: 675-682
- Scheid A, Wenger R, Schaffer L, Camenisch I, Distler O, Ferenc A, Cristina H, Ryan HE, Johnson RS, Wagner K, Stauffer UG, Bauer C, Gassmann M, Meuli M** (2002) Physiologically low oxygen concentrations determined in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor  $\beta$ 3. *FASEB J* 16: 411-413
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS, Jr.** (1995) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15: 943-953
- Schule R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM** (1990) Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62: 1217-1226
- Semenza GL** (1999) Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 551-578
- Semenza GL** (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732

- Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A** (1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271: 32529-32537
- Semenza GL, Wang GL** (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: 5447-5454
- Shibata T, Imaizumi T, Matsumiya T, Tamo W, Hatakeyama M, Yoshida H, Munakata H, Fukuda I, Satoh K** (2003) Effect of MG132, a proteasome inhibitor, on the expression of growth related oncogene protein- $\alpha$  in human umbilical vein endothelial cells. *Cytokine* 24: 67-73
- Shih SC und Claffey KP** (2001) Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF- $\beta$  activation of VEGF expression. *Growth Factors* 19: 19-34
- Snyder DS und Unanue ER** (1982) Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production. *J Immunol* 129: 1803-1805
- Sodhi A, Montaner S, Miyazaki H, Gutkind JS** (2001) MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in *rasV12* upregulation of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 292-300
- Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS** (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 $\alpha$ . *Cancer Res* 60: 4873-4880
- Steer JH, Kroeger KM, Abraham LJ, Joyce DA** (2000) Glucocorticoids suppress tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by human monocytic THP-1 cells by suppressing transactivation through adjacent NF- $\kappa$ B and c-Jun-activating transcription factor-2 binding sites in the promoter. *J Biol Chem* 275: 18432-18440
- Steer JH, Vuong Q, Joyce DA** (1997) Suppression of human monocyte tumour necrosis factor- $\alpha$  release by glucocorticoid therapy: relationship to systemic monocytopenia and cortisol suppression. *Br J Clin Pharmacol* 43: 383-389
- Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Bürgel T** (2002) Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Letters* 512: 157-162

- Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay C** (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20: 7377-7383
- Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA** (2001) Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* 22: 1363-1371
- Tanaka M, Nishi M, Morimoto M, Sugimoto T, Kawata M** (2003) Yellow fluorescent protein-tagged and cyan fluorescent protein-tagged imaging analysis of glucocorticoid receptor and importins in single living cells. *Endocrinology* 144: 4070-4079
- Tao Y, Williams-Skipp C, Scheinman RI** (2001) Mapping of glucocorticoid receptor DNA binding domain surfaces contributing to transrepression of NF-kappa B and induction of apoptosis. *J Biol Chem* 276: 2329-2332
- Taylor BL, Zhulin IB** (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 479-506
- Thornton RD, Lane P, Borghaei RC, Pease EA, Caro J, Mochan E** (2000) Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem J* 350 Pt 1:307-12.: 307-312
- Tian H, McKnight SL, Russell DW** (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11: 72-82
- Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Semenza GL, 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: 27975-27981
- Vanden Berghe W, Francesconi E, De Bosscher K, Resche-Rigon M, Haegeman G** (1999) Dissociated glucocorticoids with anti-inflammatory potential repress interleukin-6 gene expression by a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 56: 797-806
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD** (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-602
- Vayssiere BM, Dupont S, Choquart A, Petit F, Garcia T, Marchandeu C, Gronemeyer H, Resche-Rigon M** (1997) Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol Endocrinol* 11: 1245-1255
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL** (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510-5514

- Wang GL, Semenza GL** (1993) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4304-4308
- Wang GL, Semenza GL** (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270: 1230-1237
- Wanner RM, Spielmann P, Stroka DM, Camenisch G, Camenisch I, Scheid A, Houck DR, Bauer C, Gassmann M, Wenger RH** (2000) Epolones induce erythropoietin expression via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activation. *Blood* 96: 1558-1565
- Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Camenisch G, Gassmann M** (1998) Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur J Biochem* 253: 771-777
- Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Gassmann M, Marti HH** (1997) Hypoxia-inducible factor-1 alpha is regulated at the post-mRNA level. *Kidney Int* 51: 560-563
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH** (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 92: 2260-2268
- Wissink S, van Heerde EC, vand der BB, van der Saag PT** (1998) A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 12: 355-363
- Wymann MP und Pirola L** (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436: 127-150
- Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL** (1998) Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* 275: L818-L826
- Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL** (1999) Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest* 103: 691-696
- Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ** (2002) Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell* 2: 331-341
- Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B** (1998) Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ /ARNT. *EMBO J* 17: 5085-5094

**Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell JE, Jr.** (1996) Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15092-15096

**Zhang SX, Gozal D, Sachleben LR, Jr., Rane M, Klein JB, Gozal E** (2003) Hypoxia induces an autocrine-paracrine survival pathway via platelet-derived growth factor (PDGF)-B/PDGF-beta receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in RN46A neuronal cells. *FASEB J* 17: 1709-1711

**Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL** (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  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: 1541-1545

**Zhou J, Schmid T, Brüne B** (2003) Tumor necrosis factor- $\alpha$  causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  through a nuclear factor- $\kappa$  B-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 14: 2216-2225

**Zhou J, Schmid T, Frank R, Brune B** (2004) PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem* 279: 13506-13513

## 8. ANHANG

### 8.1. Abkürzungen und Dimensionen

17-AAG	17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin
Abb.	Abbildung
Akt	<i>zelluläres Homologon des viralen Onkogens v-akt</i>
AP-1	Aktivator Protein 1
ARNT	Arylhydrokarbon nukleärer Translokator
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Domäne der DNA
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kortison
ca.	circa
CBP	CREB bindendes Protein
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalie Virus
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	(gezählte) Impulse pro Minute
CREB	cAMP responsives Element bindendes Protein
C-TAD	C-terminale Transaktivierungsdomäne
C-Terminus	Carboxyterminus
Dex	Dexamethason
DFO	Desferrioxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR/AhR	Dioxinrezeptor
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EG-VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor aus der endogenen Drüse
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoassay
EMSA	Gel-Shift Experiment
EPO	Erythropoietin
Erk	extrazellulär Signal-regulierte Proteinkinase, auch MAPK
et al.	und Kollegen

---

FCS	fetales Kälberserum
FIH	HIF inhibierender Faktor
g	Gramm
g	Erdschleunigung
GA	Geldanamycin
GAPDH	Glutaraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT-1	Glukose Transporter 1
GR	Glukokortikoid Rezeptor
GRE	Glukokortikoid responsables Element
h	Stunde
HBS	HIF Bindungsstelle
HC	Hydrokortison
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HOX	Hypoxie
HRE	Hypoxie responsables Element
HRP	Meerrettich Peroxidase
HSP90	Hitzeschock Protein 90
ID	Inhibitorische Domäne
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IPAS	inhibitorisches PAS Protein
IVTT	In Vitro Transkription/Translation
JNK	Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertoni
LRP-1	LDL-Rezeptor-Related Protein
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
M	Molar
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCS	Multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
MIC-2	CD 99 (Cluster of Differentiation)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Milimolar
mRNA	Boten-RNA

---

mTOR	Ziel von Rapamycin im Säugetier
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NOS-2	Stickstoffmonoxidsynthase 2
NOX	Normoxie
NSAID	nicht-steroidale anti-entzündliche Pharmaka
N-Terminus	Aminoterminus
NUR-77	nukleärer Orphan-Rezeptor
ODDD	Sauerstoffabhängige Degradationsdomäne
PAS	Per Arnt Sim
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor
PGE2	Prostaglandin E2
PGK-1	Phosphoglyceratkinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
PHD	Prolylhydroxylase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pVHL	"von Hippel-Lindau"-Protein
ROR	Retinolsäure-Rezeptor bezogener Orphan-Rezeptor
Rora	Retinolsäure-Rezeptor bezogener Orphan-Rezeptor $\alpha$
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SE	Standardfehler
si-RNA	kleine inhibitorische RNA
SV 40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TfHBS	Transferrin-HIF-Bindungsstelle
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
U	Unit
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel

---

## 8.2. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann danke ich für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für sein Engagement und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Thomas Hellwig-Bürgel danke ich für die Einweisung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden und seine Hilfestellungen bei der Planung und Durchführung der Experimente.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Gabriele Huck für die Durchführung der Real-Time-PCR-Experimente, Frau Patricia Rouina und Frau Tanja Svensson für die Durchführung der ELISA-Experimente sowie für die Arbeiten in der Zellkultur. Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Daniel Philipp Stiehl, der mich bei den Western Blot Analysen unterstützt hat.

Ein weiterer Dank gebührt Frau Dorit Zander für ihre Hilfsbereitschaft bei den Auswertungen am LSM.

Herrn Dr. Reinhard Depping gilt ein besonderer Dank für hilfreiche Anregungen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Frau Susanne Hentschel gilt mein Dank für die Korrekturen des Textes.

Meiner Mitstreiterin Frau Kathrin Doege danke ich für Krisengespräche, konstruktive Diskussionen und eine schöne gemeinsame Zeit im Büro.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit.

Außerdem möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung der Promotion durch ein Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 288 bedanken.

Mein Dank gilt auch meiner Schwester und allen Freunden für ihre Anteilnahme und Aufmunterungen in weniger erfolgreichen Situationen.

Ganz besonders danke ich Stephan Jans für sein Verständnis und seine persönliche Unterstützung.

Besonders dankbar bin ich meinen Eltern, Maria und Hans Wagner, die mir meine Ausbildung und damit das Entstehen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

### 8.3. Lebenslauf

#### Anika Eva Wagner

Geburtsdatum 4. November 1976  
Geburtsort Gelnhausen

#### Hochschulausbildung

seit 03/2003 Stipendiatin des Graduiertenkolleg 288 „Strukturen und Mediatoren der Zellinteraktion“; Anfertigung einer Doktorarbeit im Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck

09/1996 – 10/2002 Studium der Oecotrophologie mit Schwerpunkt Ernährungswissenschaften an der Justus-Liebig-Universität Gießen

#### Praktische Erfahrungen

09/2000 – 04/2001 Praktikum an der School of Applied Sciences, Robert-Gordon-University, Aberdeen, UK

02/2000 – 04/2000 Praktikum in der Ernährungspsychologischen Forschungsstelle, Göttingen

07/1999- 09/1999 Praktikum bei der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE e.V.), Frankfurt/Main

#### Schulbildung

1987 – 1996 Grimmelshausen-Gymnasium in Gelnhausen  
1983 – 1987 Grundschule in Biebergemünd-Wirtheim

## 8.4. Wissenschaftliche Vorleistungen

### Posterpräsentationen

- 03/2004      Keystone Symposia: Biology on Hypoxia, Steamboat Springs, CO, USA  
 09/2004      SFB 367 Meeting “Inflammation and Immune Response”, Lübeck  
 03/2005      84. Annual Meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Göttingen  
 04/2005      IUPS/EB Meeting, San Diego, CA, USA  
 07/2005      30<sup>th</sup> FEBS Congress and 9<sup>th</sup> IUBMB Conference “The Protein World”,  
 Budapest, Ungarn

### Vorträge

- 09/2004      13. Westerländer Gespräch, Westerland, Sylt  
 04/2005      IUPS/EB Meeting, San Diego, CA, USA

### Abstracts und Veröffentlichungen

**Wagner AE, Huck G, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel, T** (2006) Dexamethasone impairs hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) function. (Zur Publikation eingereicht)

**Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W** (2005) Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1): A Novel Transcription Factor in Immune Reactions. *J Interferon Cytokine Res* 25(6): 297-310

**Wagner AE, Stiehl DP, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T** (2005) Activation of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is inhibited by glucocorticoids. *FEBS J* 272(1):448

**Wagner AE, Stiehl DP, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T** (2005) Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) is affected by glucocorticoids. *Eur J Physiol, Pflügers Archiv* 449 (1): S111

**Wagner AE, Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Jelkmann W** (2005) Glucocorticoids inhibit hypoxia-inducible factor (HIF-1). *FASEB* 9 (5): A1603

**Wagner A, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W** (2004) Normoxically induced hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is negatively affected by glucocorticoids. *Keystone Symposia, Biology of Hypoxia: The Role of Oxygen Sensing in Development, Normal Function and Disease, Abstract No. 349*

**Hellwig-Bürgel T, Wagner A, W. Jelkmann** (2004) Glucocorticoids impair hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) function. *Keystone Symposia, Biology of Hypoxia: The Role of Oxygen Sensing in Development, Normal Function and Disease, Abstract No. 203*

Hiermit versichere ich, dass ich zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen habe und dass ich die hier beigefügte Arbeit selbständig angefertigt habe. Die dabei verwendeten Hilfsmittel und Quellen habe ich vollständig angegeben.

Lübeck, den