

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

---

Die Beeinflussung des Hypoxie-induzierbaren Faktors  
HIF-1  $\alpha$   
durch den Eisenchelator Ciclopiroxolamin  
und das Übergangsmetall Kupfer

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Medizinischen Fakultät -**  
vorgelegt von  
Tobias Linden  
aus Hamburg  
Lübeck 2005

1. Berichterstatter: ..... Prof. Dr. phil. nat. Roland H. Wenger
2. Berichterstatterin: ..... Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Silvia Bulfone-Paus
3. Berichterstatter: ..... Prof. Dr. med. Joachim Fandrey

Tag der mündlichen Prüfung: .....02.11.2005

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.11.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>4</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1).....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Klonierung und Struktur .....	8
1.2.2. Posttranslationelle Regulation der HIF-1 $\alpha$ Stabilität durch Prolyl-4-hydroxylierung .....	9
1.2.3. Regulation der Transkriptionsaktivität von HIF-1 $\alpha$ .....	10
1.2.3.1. Kofaktoren der Transkription.....	10
1.2.3.2. Phosphorylierung und Redox-Reaktionen am HIF-1 $\alpha$ Protein.....	10
1.2.3.3. Andere Modifikationen der HIF-1 Aktivität .....	11
1.2.4. DNA-Bindung und Transaktivierung.....	11
<b>1.3. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung         des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4. Pharmakologische Beeinflussung der HIF-1<math>\alpha</math> regulierten         Genexpression in vitro und in vivo .....</b>	<b>16</b>
1.4.1. Agonisten.....	16
1.4.1.1. Ciclopiroxolamin.....	16
1.4.1.2. Kupfer .....	17
1.4.2. Antagonisten .....	18
<b>1.5. Angiogenese.....</b>	<b>18</b>
1.5.1. Die Entstehung von Blutgefäßen <i>de novo</i> – Vaskulogenese .....	19
1.5.2. Die weitere Entwicklung der Blutgefäße – Angiogenese.....	19
1.5.3. Exogene Beeinflussung der Angiogenese .....	20
1.5.3.1. Hemmung der Angiogenese .....	20
1.5.3.2. Förderung der Angiogenese .....	21
<b>1.6. Angiogenese-Induktion über HIF-1<math>\alpha</math> und der Ansatz dieser Arbeit.....</b>	<b>22</b>

<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1. Zellkultur</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2. Transiente und stabile Transfektion</b> .....	<b>24</b>
2.2.1. Plasmidkonstrukte.....	24
2.2.2. Plasmidamplifikation und -extraktion.....	24
2.2.3. Transfektion .....	24
<b>2.3. Reporter-gen-Assay</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4. MTT-Assay und Überprüfung des Zell-Überlebens</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5. Proteinuntersuchungen</b> .....	<b>26</b>
2.5.1. SDS-PAGE und Westernblot .....	26
2.5.2. ELISA.....	27
2.5.3. Immunfluoreszenz.....	27
<b>2.6. Isoliert perfundierte Rattenniere</b> .....	<b>27</b>
<b>2.7. mRNA-Präparation und Northern Blot</b> .....	<b>28</b>
<b>2.8. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) Assay</b> .....	<b>29</b>
<b>3. RESULTATE</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1. Einfluss von CPX auf HIF-1<math>\alpha</math> Stabilität und     Transaktivierungsaktivität</b> .....	<b>30</b>
3.1.0. Vorversuche – Evidenz für eine CPX induzierte Angiogenese im Mäusehaut-Wundmodell .....	30
3.1.1. Etablierung von zwei Hypoxie-induzierbaren Reporter-gen-Zelllinien ...	30
3.1.2. CPX induziert HIF-1 $\alpha$ abhängige Reporter-gene unter leichter Inhibition der zellulären Proliferation bzw. Viabilität .....	31
3.1.3. HIF-1 $\alpha$ Protein wird durch CPX unter normoxischen Bedingungen stabilisiert.....	33
3.1.4. HIF-1 $\alpha$ abhängige Gene werden unter CPX-Behandlung vermehrt transkribiert .....	33
3.1.5. HIF-1 $\alpha$ abhängige VEGF-Proteinexpression und VEGF- Promotoraktivierung .....	34
3.1.6. In der isoliert perfundierten Rattenniere ist ein CPX-abhängiger Effekt auf HIF-1 $\alpha$ Zielgene nicht nachweisbar. ....	35
3.1.7. CPX induziert Angiogenese im CAM-Modell.....	36

<b>3.2. Der Einfluss von Kupfer(II)-Ionen auf Stabilisierung und Transaktivierungsaktivität von HIF-1<math>\alpha</math></b> .....	<b>37</b>
3.2.1. Kupfer(II)-Ionen induzieren HIF-1 $\alpha$ abhängige Reportergene unter leichter Inhibition der zellulären Proliferation bzw. Viabilität .....	37
3.2.2. Kupfer(II)-Ionen stabilisieren HIF-1 $\alpha$ unter normoxischen Konditionen	38
3.2.3. Kupfer(II)-Ionen induzieren die Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ im Zellkern .	39
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1. Beeinflussung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1<math>\alpha</math> durch den Eisenchelator CPX</b> .....	<b>42</b>
4.1.1. CPX im Vergleich zu anderen eisenchelierenden Substanzen .....	42
4.1.2. CPX und Angiogeneseinduktion .....	43
4.1.3. Die Wirkung von CPX auf den Zellzyklus.....	44
<b>4.2. Beeinflussung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1<math>\alpha</math> durch das Übergangsmetall Kupfer</b> .....	<b>48</b>
4.2.1. Mögliche physiologische Funktionen der HIF-1 $\alpha$ Stabilisierung durch Kupfer .....	49
4.2.1.1. Kupfer und Anämie .....	49
4.2.1.2. Kupfer und Angiogenese .....	49
4.2.1.3. Kupfer und Coeruloplasmin und ihre Verbindung zum Eisenstoffwechsel	51
4.2.2. Die Kupferkonzentration im menschlichen Serum liegt im relevanten Bereich für die Beeinflussung des HIF-1 $\alpha$ Systems .....	51
4.2.3. Schlussbemerkungen zur HIF-1 $\alpha$ Stimulation durch Kupfer .....	53
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>56</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>57</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>80</b>
<b>8. VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....	<b>81</b>
<b>9. DANKSAGUNGEN</b> .....	<b>82</b>
<b>10. LEBENS LAUF</b> .....	<b>84</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff

Der zelluläre Energiehaushalt ist abhängig von der zur Verfügung stehenden Sauerstoffmenge. Unter aeroben Bedingungen werden aus einem Mol Glukose in Glykolyse, Zitratzyklus und letztlich in der oxidativen Phosphorylierung der mitochondrialen Atmungskette 30 Mol des universellen Energieträgers ATP gewonnen. Die anaerobe Verstoffwechslung eines Mols Glukose durch alleinige Glykolyse resultiert lediglich in 2 Mol ATP.

Die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff wird in einzelligen Organismen allein durch Diffusionsprozesse gewährleistet. Im menschlichen Körper ist ein spezialisiertes, mehrere Organe einbeziehendes System nötig, um eine effektive Sauerstoffdistribution sicherzustellen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Sauerstoffaufnahme abhängig vom Sauerstoffpartialdruck ( $P_{O_2}$ ) der Atemluft, d.h. von der Fraktion des Sauerstoffs in der Einatemluft ( $F_{iO_2}$ ) und dem Umgebungsluftdruck. Die Sauerstoffaufnahme in den Körper erfolgt *per diffusionem* über die Alveolen der Lungen und der Transport erfolgt *per convectionem* an Hämoglobin gebunden über den Blutkreislauf. Ein filigranes Kapillarnetz stellt sicher, dass die Diffusionsstrecke zwischen Blutgefäß und zu versorgender Zelle nicht zu groß ist. Herz- und Atemarbeit können in Abhängigkeit vom arteriellen  $P_{O_2}$  reguliert werden, um die  $O_2$ -Versorgung dem aktuellen Bedarf anzupassen.

Die Regulations- und Anpassungsmechanismen, die auf zellulärer und molekularer Ebene zur Verfügung stehen, waren bis vor 10 Jahren noch weitgehend unbekannt. Zwar konnte man verschiedene Effekte der Hypoxie bereits biochemisch nachweisen, z. B. die Erhöhung von Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit aufgrund einer erhöhten Erythropoietin-(EPO) Konzentration. Der zelluläre Sauerstoffsensoren blieb jedoch im Dunkeln.

## 1.2. Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1)

### 1.2.1. Klonierung und Struktur

1992 gelang es Semenza und seinen Mitarbeitern in der 3'-Enhancerregion des EPO-Gens eine Bindungsstelle nachzuweisen, die unter hypoxischen Bedingungen von einem Transkriptionsfaktor besetzt war und die Transkription des EPO-Gens einleitete. Der biochemischen Aufreinigung (203) dieses Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (HIF-1) konnte seine genauere Charakterisierung folgen. HIF-1 ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus einer 120 kDa schweren  $\alpha$ - und einer 91 bis 94 kDa schweren  $\beta$ -Untereinheit. Beide Untereinheiten gehören zur PAS-Superfamilie, einer Gruppe von Sensorproteinen, die v. a. auf Umwelt- und Entwicklungssignale spezialisiert sind und ihren Namen von den zuerst identifizierten Proteinen Per, ARNT und Sim erhalten haben. Weitere Mitglieder sind CLOCK und MOP3 (CYCLE), die beim zirkadianen Rhythmus taktangehend sind (für eine Übersicht siehe (61)). Wie die meisten PAS-Proteine ist auch HIF-1 strukturell ein basisches Helix-Loop-Helix (bHLH)-Protein, das seine Zielsequenz in der großen Furche der DNA bindet (94, 138).

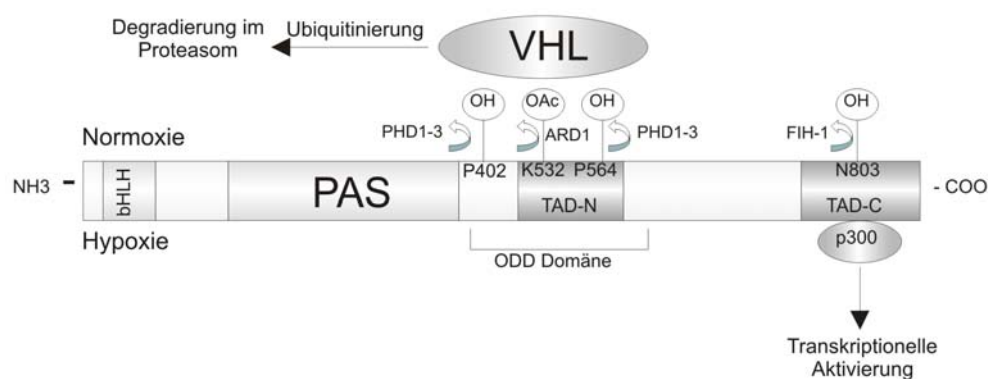
Bei HIF-1 $\beta$  handelt es sich um ein ubiquitäres, nicht Sauerstoff-reguliertes Protein, das bereits als ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) bekannt war und als Heterodimerisierungspartner des Dioxin-Rezeptors (*aryl hydrocarbon receptor*, AhR) transkriptionsinitiierend an spezifischen *dioxin response elements* (DREs) agiert.

Nur die  $\alpha$ -Untereinheit von HIF-1 ist sauerstoffabhängig reguliert. Auch sie wird konstitutiv transkribiert und translatiert, unter normoxischen Bedingungen aber nach einer Ubiquitinierung durch das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) erkannt, ubiquitiniert und sofort im Proteasom degradiert (74, 129, 130).

Neben HIF-1 $\alpha$  sind mittlerweile zwei weitere Mitglieder der HIF-Familie entdeckt worden. Sie werden, anders als HIF-1 $\alpha$ , nicht ubiquitär exprimiert (192). Ihre Funktion ist nur teilweise geklärt. HIF-2 $\alpha$  wurde initial als „endotheliales PAS-Protein“ (EPAS) beschrieben (194). Gu *et al.* beschrieben 1998 HIF-3 $\alpha$  (60).

### 1.2.2. Posttranslationelle Regulation der HIF-1 $\alpha$ Stabilität durch Prolyl-4-hydroxylierung

Die Stabilität von HIF-1 $\alpha$  ist direkt sauerstoffabhängig. Unter normoxischen Bedingungen erfolgt die Ubiquitinierung fortwährend nach vorhergehender Hydroxylierung an zwei Prolin-Resten (Pro402 und Pro564) in der ODD (*oxygen dependent degradation*) Domäne (Abb. 1). Die verantwortlichen Prolyl-4-hydroxylasen benötigen als limitierenden Faktor molekularen Sauerstoff (79, 82). Dabei wird ein Sauerstoffatom für die Hydroxylierung benötigt, das zweite reagiert mit dem Kosubstrat  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinat und Kohlenstoffdioxid. Ein zentrales Eisen(II)-Atom, das durch zwei Histidin- und einen Asparaginsäurerest koordiniert wird, erklärt die Beeinflussbarkeit der Prolyl-4-hydroxylasen durch Eisenchelatoren, Übergangsmetalle sowie die Bedeutung von Vitamin C als reduzierendem Kofaktor. Insgesamt erinnern diese Monooxygenasen an die bereits seit längerem aus dem Kollagenstoffwechsel bekannten Prolylhydroxylasen (123), sind aber nicht mit diesen identisch.



**Abb. 1:** Struktur des HIF-1 $\alpha$  Proteins (modifiziert nach (175)). Die Lokalisation der basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-, der Per-Arnt-Sim (PAS)- und der oxygen-dependent degradation (ODD)-Domäne sind zu erkennen. Die Angriffsorte der einzelnen Hydroxylasen (PHD, Prolylhydroxylase; FIH-1, Asparaginsäurehydroxylase) sind mit entsprechenden Aminosäureresten (P, Prolin; N, Asparagin) gezeigt. Die Bindung des von-Hippel-Lindau (VHL)-Proteins erfolgt über die hydroxylierten P402 und P564 und ist der Ansatzort einer Ubiquitinligase, die unter normoxischen Bedingungen (oberhalb) zur Degradierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins im Proteasom führt. Die Bindung von VHL wird durch Acetylierung (OAc) des Lysins (K) 532 über eine Acetyltransferase (ARD1) erleichtert. Im unteren Teil dargestellt ist die Bindung des Transkriptionsaktivators p300/CBP an das nun nicht hydroxylierte N803. TAD-C, carboxy-terminale Transaktivierungsdomäne. TAD-N, amino-terminale Transaktivierungsdomäne. Weitere Erklärungen im Haupttext.

Die Klonierung der HIF-Prolyl-4-hydroxylasen erfolgte zunächst in *C. elegans* als *Egl* (*egg laying abnormal*)-9. Die humanen sequenzhomologen Gene tragen daher die Namen *EGLN-1* bis *EGLN-3* und die Genprodukte PHD-1 bis 3 (Prolyl-



Hydroxylase-Domäne enthaltendes Protein) bzw. HPH1 bis HPH3 (HIF Prolyl-4-hydroxylase) (12, 37, 193). Verschiedene *splice*-Varianten und niedermolekulare Inhibitoren sind inzwischen beschrieben (70). Mit ihrer Entdeckung scheint der molekulare Sauerstoffsensoren gefunden. Die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  ist für seine transkriptionelle Aktivität allein aber nicht ausreichend (91).

### 1.2.3. Regulation der Transkriptionsaktivität von HIF-1

#### 1.2.3.1. Kofaktoren der Transkription

Auch die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 ist maßgeblich Hypoxie-abhängig: Die Transaktivierung bedarf der Bindung des Kofaktors CBP/p300, einer Histon-Acetyltransferase, an die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne (TAD-C) des HIF-1 Proteins (3). Die Bindung kann nur erfolgen, wenn der Aminosäurerest Asn803 nicht hydroxyliert ist (Abb. 1). Funktion und Struktur der ebenfalls Sauerstoff-abhängigen Asparaginy-Hydroxylase wurden vor kurzem entschlüsselt (29, 69, 107, 108, 115). Sie war anfangs als FIH (*factor inhibiting HIF*) beschrieben worden (110), dem die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen zugeschrieben wurde.

Ebenfalls über CBP/p300 wirkt p35<sup>srj</sup>/CITED2 (5), in diesem Fall inhibierend, auf die HIF-1 Aktivität, indem es an die CH1 Domäne von CBP/p300 bindet und so ein sterisches Hindernis der HIF-1 Bindung bildet. p35<sup>srj</sup> ist selbst ein HIF-1 Zielgen und trägt so zu einem negativen *feedback* in der zellulären Antwort auf Hypoxie bei (eine Übersicht bietet Wenger (208)).

#### 1.2.3.2. Phosphorylierung und Redox-Reaktionen am HIF-1 $\alpha$ Protein

Die beschriebenen sauerstoffabhängigen Regulationswege der HIF-1 $\alpha$  Stabilität und Aktivität sind physiologisch am relevantesten. Zeitlich schon vor der Translokation in den Kern finden nach der HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung weitere posttranslationelle Modifikationen des Proteins statt. Die über die p42/p44 (Erk2/Erk1) Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) erfolgte Phosphorylierung bislang nicht bekannter Aminosäurereste verleiht HIF-1 $\alpha$  in der Elektrophorese ein Laufverhalten, das dem nach hypoxischer Modifikation gleicht, und erhöht die Transaktivierungsaktivität (157). Über diesen Mechanismus ist auch der Einfluss

von Wachstumsfaktoren und Zytokinen erklärlich, die MAPK über eine Rezeptor-Tyrosinkinase und den Ras/Raf → MEK Pfad aktivieren können.

PI3-Kinase → PTEN → Akt Kinase bieten eine zweite Möglichkeit der HIF-1 $\alpha$  Phosphorylierung. PI3-Kinase Inhibition resultiert in verringerter HIF-1 Aktivität (183, 185). Bei Verlust des Tumorsuppressor-Gens PTEN ist die HIF-1 bedingte Genexpression erhöht (218). Die HIF-1 $\alpha$  Proteinsynthese wird außerdem durch Überexpression der Rezeptortyrosinkinase Her2/neu gesteigert (110).

Redoxreaktionen scheinen bei der Beeinflussung der HIF-1 Transaktivierungsaktivität eine eher geringe Rolle zu spielen (57), werden aber immer wieder diskutiert.

### 1.2.3.3. Andere Modifikationen der HIF-1 Aktivität

Physiologische Relevanz hat die Inhibition der HIF-1 Aktivität durch eine kurze *splice*-Variante des HIF-3 $\alpha$  Gens (inhibierendes PAS-Protein, IPAS), die im Kornea-Epithel der Maus die Vaskularisation verhindert (126) und in Herz und Lunge für eine negative Rückkopplung der hypoxisch induzierten Genaktivität verantwortlich zu sein scheint (127).

Bislang noch wenig verstandene Modifikationswege der HIF-1 Aktivität werden in den kommenden Jahren auf ihre physiologische und pharmakologische Relevanz überprüft werden. Als Beispiele seien genannt die über ARD-1 vermittelte Acetylierung und Destabilisierung von HIF-1 $\alpha$  (87) und das ubiquitäre Vorhandensein von natürlichen HIF-1 $\alpha$  *antisense* Transkripten (162). Eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  durch Mikrotubulus-Beeinflussung, vermittelt über den nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), wurde ebenfalls vor kurzem beschrieben (90).

### 1.2.4. DNA-Bindung und Transaktivierung

Um seine Eigenschaft als Transkriptionsfaktor zu erlangen, muss HIF-1 $\alpha$  seinen Dimerisierungspartner ARNT binden und in den Kern translozieren. Ein regulatives Element scheint in diesen Vorgang nicht involviert zu sein (208).

Die DNA-Bindung des HIF-1 Heterodimers erfolgt an der HIF-1 Bindungsstelle der Ziel-DNA (HBS, *HIF-1 binding site*). Die Konsensus-Sequenz besteht aus der Basenfolge 5'-RCGTG-3' (207). Eine funktionelle *cis*-Aktivierungseinheit (HRE,

*hypoxia response element*) besteht zusätzlich zu einer oder mehreren HBS aus weiteren Bindungsstellen für Kofaktoren, die je nach Zielgen unterschiedlich sein können (28, 39, 47).

### **1.3. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1**

Um die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von HIF-1 zu verstehen, ist es nützlich, die verschiedenen Szenarien zu beleuchten, bei denen eine zelluläre Unterversorgung mit Sauerstoff entstehen kann. Sie sind untereinander eng verwoben, verdienen jedoch auch einzeln Beachtung:

1. Unmittelbar einleuchtend ist dabei die Situation, in der ein zuvor gesunder Organismus oder Teile davon einem Sauerstoffmangel ausgesetzt werden. Dieser kann verschiedene Gründe haben: einen niedrigen  $P_{O_2}$  der Atemluft, beispielsweise bei Aufenthalt in großer Höhe, einen niedrigen arteriellen  $P_{O_2}$  aufgrund kardialer, pulmonaler oder kreislaufbedingter Erkrankungen, eine erniedrigte  $O_2$ -Transportkapazität aufgrund einer Anämie, eine verminderte  $O_2$ -Ausnutzung in der Peripherie aufgrund eines interstitiellen Ödems mit erhöhter Diffusionsstrecke oder aufgrund einer entkoppelten Atmungskette unter dem Einfluss von Zyanid. Die hypoxischen Zellen können dieser Herausforderung mit verschiedenen Strategien begegnen, die durch HIF-1 gesteuerte Genexpression vermittelt werden: (i) Der Stoffwechsel wird den anaeroben Verhältnissen angepasst (Pasteur-Effekt) durch eine Erhöhung der Konzentration glykolytischer Enzyme und eine verbesserte Glukoseaufnahme in die Zelle. (ii) Die Sauerstoffversorgung wird über eine höhere Sauerstofftransportkapazität durch Steigerung der Erythropoiese (EPO) und die Gewebedurchblutung durch Modifikation des Vasotonus verbessert. Eine Neovaskularisation bzw. Angiogenese, die im Rahmen dieser Arbeit noch genauere Beachtung finden wird, und schließlich eine verbesserte Eisenausnutzung tragen mittel- und langfristig zu einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung bei. (iii) Die pH-Regulation zur Pufferung der Gewebsazidose wird durch Carboanhydratase 9 unterstützt (89). (iv) Die Zellproliferation und das Zellüberleben werden auf vielen Ebenen beeinflusst, ohne dass bislang ein eindeutig pro- oder antiapoptotisches Muster erkenntlich wäre. Eine milde Hypoxie scheint dabei aber eher zu Anpassungsvorgängen zu führen, eine stärkere

Hypoxie zur Apoptose (z. B. (54)). Eine Übersicht über die involvierten HIF-1 Zielgene und die entsprechenden Literaturangaben gibt Tabelle 1.

2. Ein weiteres Szenario, in dem Hypoxie und die durch sie ausgelöste Genexpression von Bedeutung sind, ist der sich entwickelnde Organismus. Unmittelbar einleuchtend ist dies bei der embryonalen Entwicklung, die zunächst komplett ohne eine Blutgefäßversorgung auskommen muss. Später dürfte dann die Neugeborenen-Polyglobulie auf eine HIF-1 $\alpha$  vermittelte EPO-Ausschüttung zurückzuführen sein. Beschrieben ist außerdem der Einfluss von HIF-1 über TGF $\beta$  auf die Differenzierung menschlicher Trophoblastzellen und die weitere plazentare Entwicklung (15, 167) sowie auf das Überleben von Chondrozyten (168) und die Entwicklung von Mammaepithelzellen (171) *in vivo*. Die Ergebnisse beruhen auf Experimenten mit genetisch modifizierten Mäusen, die zwei „gefloxt“ Allele des HIF-1 $\alpha$  Gens enthalten (164), welche unter der zeitlichen und örtlichen Kontrolle der *Cre*-Rekombinase stehen. Im *Cre-loxP*-Modell erwies sich auch die Bedeutung von HIF-2 $\alpha$  in der Entwicklung der Retinopathie prämaturner Neugeborener (134). Zuvor wurde die Relevanz von HIF-1 in der Entwicklung vor allem anhand von *knock out*-Mäusen (HIF-1 $\alpha$  *-/-*) untersucht. Da die Mutation phänotypisch am Tag 10 der Embryonalentwicklung letal ist, ist die Aussagekraft dieses Modells eingeschränkt. Es zeigten sich Wachstumsstillstand am Tag 8, kombiniert mit Defekten des Neurolohrs, stark dilatierten Gefäßen aufgrund mesenchymalen Zelluntergangs und einem hyperplastischen Myokard (81, 103, 163). In partiellen HIF-1 *knock-out* Modellen (HIF-1 $\alpha$  *-/+*) scheint die Antwort auf chronische Hypoxie vermindert, die über das Glomus caroticum vermittelt wird (96). Der Katecholamin-Stoffwechsel ist ebenfalls betroffen (34, 141). Zum Szenario der Zelldifferenzierung gehört auch die Wundheilung, die ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen abläuft, und in die HIF-1 eng einbezogen zu sein scheint (35). Kürzlich wurde die Chemotaxis zirkulierender Stamm- und Progenitorzellen entlang eines Sauerstoffgradienten in hypoxische Areale *in vivo* beschrieben (17).

3. Eine weitere Konstellation, die hier nur kurz umrissen werden kann, ist die Verknüpfung von HIF-1 mit dem Wachstum solider Tumore: (i) HIF-1 wird durch die Hypoxie des rasch wachsenden Tumors stabilisiert, der initial schlecht bis gar nicht vaskularisiert ist. (ii) Der Verlust von Tumorsuppressorgenen führt zusätzlich zur transkriptionellen HIF-1 Aktivität. Beispiele sind Mutationen des pVHL-Gens (129), des PTEN-Gens (218) oder des p53-Gens (154).

Sauerstoffregulierte Gene	Referenzen
<u>Sauerstofftransport: Erythropoiese und Eisenstoffwechsel</u>	
• Erythropoietin (Erythropoiese)	(202)
• Transferrin (Eisentransport)	(160)
• Transferrinrezeptor (Eisenaufnahme)	(191)
• Coeruloplasmin (Eisenoxidation)	(128, 137)
<u>Sauerstofftransport: Gefäßtonusregulation und –bildung</u>	
• VEGF (Angiogenese)	(42, 89)
• VEGF-Rezeptor 1 (Flt-1)	(50)
• Endothelial-gland-derived VEGF (Angiogenese)	(113)
• Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1 (Angiogenese)	(78)
• iNOS (induzierbare NOS, NO-Produktion)	(145)
• eNOS (endotheliale NOS, NO-Produktion)	(25)
• Haemoxygenase 1 (CO-Produktion)	(116)
• Adrenomedullin (Gefäßtonusregulation)	(141)
• $\alpha$ 1b-Adrenozeptor (Gefäßtonusregulation)	(34)
• Endothelin-1 (Gefäßtonusregulation)	(76)
• Tyrosinhydroxylase (Gefäßtonusregulation)	(169)
• atriales natriuretisches Peptid (Gefäßtonusregulation)	(23)
<u>Anaerober Stoffwechsel: Glukoseaufnahme und Glykolyse</u>	
• Glukosetransporter-1 (GLUT-1)	(33)
• PFKFB-3 (Glykolyse)regulation)	(131, 132)
• Phosphofruktokinase (Glykolyse)	(173)
• Aldolase A (Glykolyse)	(174, 173)
• Glycerophosphatdehyd-3-Dehydrogenase (GAPDH)	(58)
• Phosphoglyzeratkinase 1 (Glykolyse)	(174, 173)
• Enolase 1 (Glykolyse)	(174, 173)
• Laktatdehydrogenase (Glykolyse)	(39)
• Carboanhydratase-9 (Azidosepufferung)	(89)
<u>Zellmigration und -adhäsion: Chemotaxis und Metastasierung</u>	
• Chemokinrezeptor CXCR4 (Metastasierung)	(184)
• c-MET (Aktivierung von Onkogenen)	(166)
• Selektinliganden (Leukozytenadhäsion)	(101)
• Stromal-cell-derived factor-1 (Stammzell-homing)	(17)
<u>Immunologische Faktoren:</u>	
• Motilität und Funktion myeloider Zellen	(26)
• Entwicklung von B-Zellen	(100)
<u>Wachstum und Apoptose:</u>	
• Nip3 (Apoptoseauslösung)	(10, 133)
• Wilms-Tumorsuppressor	(199)
• Multidrug-Resistenz P-Glykoprotein	(206)
• Myc-Inhibierung (Zellzyklusarrest)	(102)
• Ndr1 (Wachstumshemmung)	(111)
• Bid Inhibition (Multidrug-Resistenz über Apoptosehemmung)	(38)
• Noxa (Apoptoseauslösung)	(95)
<u>Matrix- und Barrierefunktion</u>	
• intestinaler Trefoilfaktor (Darmbarriere)	(92)
• Ekto-5'-Nukleotidase (CD73, Darm- und vaskuläre Barriere)	(189)

**Tabelle 1. HIF-1 $\alpha$  regulierte Gene.** Angepasst nach (208). NOS, Stickstoffmonoxidsynthase. PFKFB-3, 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase-Familie. c-MET, Protoonkogen, v. a. in Schilddrüsenkarzinomen. Myc, zellzyklusfördernder Transkriptionsfaktor. Ndr1, N-myc downstream regulated gene-1. Bid, Noxa, Nip3 proapoptotische Proteine der Bcl2-Familie. Trefoilfaktor, Schutzfaktor von mukösen Epithelien.

Immunhistochemische Untersuchungen zeigen eine Überexpression von HIF-1 $\alpha$  in verschiedenen humanen Tumoren (192, 216) und in mehreren Studien konnte inzwischen eine Korrelation zwischen HIF-1 $\alpha$  Expression, Differenzierungsgrad und Prognose gezeigt werden (1, 6), die aber in Abhängigkeit von der Tumorart zu stehen scheint. Eine Übersicht bietet (175). HIF-1 abhängige Genexpression bewirkt in diesem Szenario eine Favorisierung der Energiegewinnung aus anaerober Glykolyse (Warburg-Effekt) über die Kontrolle des limitierenden Enzyms Fruktose-2,6-bisphosphatase (131), die bereits erwähnte bessere Pufferung der Azidose unter Hypoxie über Expression von Carboanhydratase und v. a. eine Tumorangiogenese und damit die Versorgung der Tumorzellen mit Substraten und Sauerstoff, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden soll. Das Hypoxie-induzierte CXCR4 trägt außerdem zum Metastasierungspotential bei (184), ebenso wie Hypoxie-kontrollierte Adhäsionsmoleküle (99). Insgesamt spricht die überwiegende Mehrzahl der gegenwärtigen Studien für eine Tumorprogression unter erhöhter HIF-1 Transaktivierungsaktivität (175). Zudem konnten wir hier in Lübeck zeigen, dass HIF-1 $\alpha$  defiziente Mausembryofibroblasten unter der Behandlung mit Carboplatin, Etoposid oder Bestrahlung zu einem größeren Anteil apoptotisch werden als die unveränderten Kontrollzellen (196).

4. Zu beachten ist weiterhin, dass HIF-1 nicht nur unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert wird, sondern unter physiologischen Bedingungen *in vitro* auch dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen unterliegt (z. B. (45, 90, 98, 185)). In der jüngeren Literatur finden sich zunehmend Beispiele, in denen die Signaltransduktion über HIF-1 auch in Bereichen gesteuert wird, in denen die sonst zugrunde liegende Hypoxie nicht unmittelbar einsichtig ist. So hat HIF-1 $\alpha$  maßgeblichen Anteil an der Immunantwort sowie an der Entwicklung des Immunsystems (26, 86, 100). Aber auch die Leukozytenadhäsion unter hypoxischen Konditionen ist HIF-1 abhängig (101).

## **1.4. Pharmakologische Beeinflussung der HIF-1 regulierten Genexpression *in vitro* und *in vivo***

### **1.4.1. Agonisten**

Der Einfluss der Übergangsmetalle Kobalt (56) und Nickel (84) auf die EPO-Produktion ist bereits seit einem halben Jahrhundert bekannt, die resultierende Polyzythämie im *in vivo* Modell seit den 30'er Jahren (143). Später wurde auch eine EPO-Induktion unter Mangan (55) und kürzlich durch Chrom (48) beschrieben. Zink hingegen kann die EPO-Genexpression beeinträchtigen (22, 32). Beginnend mit Desferrioxamin (201) wurde der Einfluss einer Eisenchelierung auf HIF-1 $\alpha$  klar (20, 204). Eine Erklärung des zugrunde liegenden Mechanismus wurde erst mit der Erkenntnis möglich, dass der Sauerstoff-Sensor ein Ferro-Enzym ist (37). Inzwischen kann die HIF-1 Wirkung auch genetisch beeinflusst werden. Transgene Mäuse, die HIF-1 $\alpha$  überexprimieren, zeigen eine konsekutive Hypervaskularisation (36). Es gibt außerdem Untersuchungen zur Einschleusung nackter HIF-1 $\alpha$  DNA im *in vivo* Modell der Ratte (177) und des Kaninchens (198). Die Versuche in der vorliegenden Arbeit bedienen sich zweier agonistischer Substanzen, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll.

#### **1.4.1.1. Ciclopiroxolamin**

Ciclopiroxolamin, CPX, auch bekannt als HOE296 oder Cic, ist ein extrem lipophiler Eisen(III)-Chelator der Hydroxypyridon-Gruppe. Es handelt sich um das 2-Aminoethanolsalz des 6-Cyclohexyl-1-hydroxy-3-methyl-2(1H)-pyridons. Die Substanz ist seit ihrer Entwicklung und pharmakologischen Charakterisierung (2, 93) durch den Hoechst-Konzern als verbreitetes Antimykotikum unter dem Handelsnamen Batrafen® auf dem Markt. Für CPX sind außerdem Wirkungen gegen grampositive und gramnegative Bakterien (62), eine antivirale Aktivität gegen HPV (190) und antiphlogistische Effekte (161) beschrieben. Der Wirkmechanismus wurde bislang nicht exakt entschlüsselt, bekannt ist die Inhibition fungaler Enzyme mit Beeinflussung des transmembranären Transports von Aminosäuren, Kalium und Phosphat (80). Die stark eisenchelierende Wirkung (204) hat wahrscheinlich ebenfalls antibiotisches Potential, die mit den auf die Eisenaufnahme spezialisierten Siderophoren der Pilze um einen limitierenden Faktor konkurriert. Von CPX ist wie von anderen Eisenchelatoren außerdem eine

Zellzyklus inhibierende Wirkung bekannt (24, 72), die zu einem Zellzyklus-Arrest in der späten G1-Phase führt.

Die vorliegende Arbeit baut teilweise auf Untersuchungen auf, die 2000 von Wanner *et al.* publiziert worden sind: CPX wurde in funktionellen und spektroskopischen Studien als bidentater Eisenchelator beschrieben, der HIF-1 $\alpha$  Proteinakkumulation im Zellkern, HIF-1 DNA-Bindung und konsekutive Aktivierung exogener Reportergene bewirkt (204). Die Eisenchelierung erfolgt dabei über eine Hydroxamsäuregruppe, die im bidentaten CPX einfach vorliegt, im hexadentaten DFX dreifach. Die Stöchiometrie der Eisenchelierung ist dementsprechend unterschiedlich (204).

#### 1.4.1.2. Kupfer

Kupfer ist ein Übergangsmetall. Im Periodensystem ist es in einer Reihe zu finden mit den die HIF-1 Aktivität modulierenden Elementen  $^{24}\text{Cr}$ ,  $^{25}\text{Mn}$ ,  $^{26}\text{Fe}$ ,  $^{27}\text{Co}$ ,  $^{28}\text{Ni}$ ,  $^{29}\text{Cu}$ ,  $^{30}\text{Zn}$  der 1. Nebengruppe. Bekanntlich sind die Valenzelektronen der äußeren Elektronenschale, in diesen Fällen zwei N-Elektronen, in einer Nebengruppe konstant, weshalb sich das Reaktionsverhalten ähnelt; die Oxidationszahl kann sich jedoch verhältnismäßig leicht ändern (21). Dies prädestiniert Kupfer für seine biochemische Rolle - als ein Redox-Reaktionen beeinflussendes Enzym. Die wichtigsten Kupfer enthaltenden Enzyme sind die Cytochrom c-Oxidase, die den Elektronentransfer von Cytochrom c zu  $\text{O}_2$  katalysiert, und die Superoxid-Dismutase, in der  $\text{Cu}^{2+}$  als Akzeptor für ein Superoxidanion dient. Die Verbindung zum Eisenstoffwechsel wird durch Coeruloplasmin hergestellt. Dieses an Kupferbindung und -transport beteiligte Enzym katalysiert gleichzeitig als Ferroxidase die Oxidation des Eisens von der Ferro(II)- in die Ferri(III)- Form. Weitere Kupfer enthaltende Enzyme sind Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase, Monoaminoxidase, Tyrosinase und Katalase (187). Sie machen Kupfer nach Eisen zum zweithäufigsten Spurenelement mit einem Gesamtkupferbestand des menschlichen Körpers von 40-80 mg (1,6 - 2,4 mmol). Der tägliche Kupferbedarf liegt bei 2,5 mg, d.h. 40  $\mu\text{mol}$  (122). Ein Einfluss von Kupfer auf die HIF-1 Aktivität ist bisher nicht beschrieben worden. Bekannt ist allerdings der Angiogenese fördernde Effekt (147) sowie eine VEGF-Induktion durch Kupfer (176).



### **1.4.2. Antagonisten**

Die therapeutischen Möglichkeiten einer Unterbrechung der HIF-1 Signaltransduktion über dominant negative HIF-1 $\alpha$  Überexpression (18) oder Blockierung der CBP/p300-Bindungsstellen (105) zeigen erste, ermutigende Ergebnisse im Tiermodell bezüglich einer Anti-Angiogenese und damit einer Hemmung malignen Zellwachstums. Kürzlich wurden der inhibitorische Effekt von Topoisomerase-Inhibitoren über einen bislang nicht bekannten Mechanismus beschrieben (153) sowie der hemmende Einfluss von YC-1 (3'(5'-hydroxy-methyl-2'furyl)-1 benzylindazol), einem niedermolekularen Inhibitor, auf HIF-1 $\alpha$  Aktivität und Xenograft-Wachstum (211). Eine Übersicht geben (175, 212).

### **1.5. Angiogenese**

Angiogenese ist die Neubildung von Blutgefäßen, ein fundamentaler Prozess in Entwicklung, Adaptation und Reparatur von Geweben. Sie kann sowohl physiologischen als auch pathologischen Ursprungs sein. Das Interesse an der Erforschung der Angiogenese erwachte erst am Anfang der 70'er Jahre mit der Hypothese, das Wachstum von Tumoren sei von ihr abhängig und könne daher auch durch ihre Beherrschung gebremst oder unterbunden werden (41). Die Innovation dieses Therapieansatzes war dabei, dass nicht die Tumorzelle selbst angegriffen werden sollte, sondern die nicht entarteten Endothelzellen die Zielzellen waren. Gab es in den frühen 90'er Jahren noch etwa 200 Publikationen pro Jahr zu diesem Thema und taucht der Terminus „Angiogenese“ in der 257. Auflage des Pschyrembel (1994) noch überhaupt nicht auf, ist die Zahl inzwischen auf mehr als 3000 Publikationen pro Jahr angestiegen (4) und das Feld entsprechend unübersichtlich geworden. Für die vorliegende Arbeit soll daher nur ein kurzer Überblick gegeben werden, unter besonderer Berücksichtigung der HIF-1 abhängigen Prozesse. Im Weiteren muss auf die Übersichtsliteratur verwiesen werden (83). Die Blutgefäßbildung unterteilt sich in eine primäre Vaskulo- und eine anschließende Angiogenese.

### **1.5.1. Die Entstehung von Blutgefäßen *de novo* – Vaskulogenese**

Im menschlichen Embryo entstehen die Blutgefäße in der dritten Woche der Entwicklung, anfänglich durch im Mesenchym gelegene, intra- und extraembryonal zunächst voneinander getrennte, inselartige Ansammlungen von Zellen, die Hämangioblasten. Die inneren Zellen dieser Blutinseln entwickeln sich zu hämatopoietischen Stammzellen, die peripheren Zellen differenzieren unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren zu Gefäßendothelzellen, die das entstehende Gefäßrohr auskleiden. Vornehmlich sind hieran der Fibroblastenwachstumsfaktor bFGF (basic fibroblast growth factor), VEGF und sein Rezeptor VEGFR2 sowie TGF $\beta$ -1 beteiligt (16). Die *de novo* entstehenden Gefäße sind also nicht Verzweigungen größerer Gefäße, sondern entstehen in jedem Organ „von selbst“. Dieser Vorgang wird Vaskulogenese genannt. Die endothelialen Vorläuferzellen gehen während der Embryonalentwicklung nicht zugrunde, sondern lassen sich auch im späteren Leben noch aus dem Knochenmark mobilisieren und können unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF, IGF (insulin-like growth factor)-1 und GM-CSF eine Neovaskularisation initiieren.

### **1.5.2. Die weitere Entwicklung der Blutgefäße – Angiogenese**

Anschließend können Expansion und Remodellierung des primitiven hin zu einem komplexeren Netzwerk erfolgen, d.h. Wachstum, Verknüpfung und erneute Aufspaltung der Blutgefäße sowie letztlich ihre „Reifung“ und Differenzierung in Arterien, Venen und Kapillaren. Man spricht nun von Angiogenese. An diesem Prozess beteiligt sind anfänglich eine Vasodilatation unter dem Einfluss von NO und die Erhöhung der vaskulären Permeabilität durch VEGF und Angiopoietin 2 sowie die Degradierung extrazellulärer Matrixbestandteile (ECM), u.a. durch VEGF und Matrixmetalloproteinasen (MMP), gefolgt von der Aussprossung von Endothelzellen. Die anschließende Stabilisierung der neuen Gefäße geschieht durch Angiopoietin 1, das den Einfluss von Angiopoietin 2 am gemeinsamen Rezeptor Tie-2 antagonisiert und durch die Rekrutierung glatter Muskelzellen und Fibroblasten durch TGF $\beta$ -1, seinen Rezeptor sowie durch PDGF (16). Involvierte HIF-1 Zielgene sind in Tabelle 1 aufgeführt.

### 1.5.3. Exogene Beeinflussung der Angiogenese

#### 1.5.3.1. Hemmung der Angiogenese

Eine Hemmung der Neovaskularisation kann bei ganz unterschiedlichen Krankheitsbildern von Nutzen sein, z.B. in der Tumorthherapie, in der Behandlung neovaskularisierender Retinaerkrankungen des Frühgeborenen- und Erwachsenenalters, der Arthritis oder der Endometriose (40). Die Mechanismen der pharmakologischen Angiogenesehemmung sind mannigfach und lassen sich unterscheiden in die Blockierung der ECM-Degradierung, z. B. durch Dalteparin oder Suramin, die direkte Inhibition endothelialer Zellen, beispielsweise durch Thalidomid oder den PI3-Kinase- $\beta$ -Inhibitor LY317615, die Inhibition endothelialer Integrine durch spezifische Antikörper und die Inhibition von Angiogenese-Induktoren, wozu v. a. auch VEGF gehört. Außerdem gibt es eine Reihe unspezifischer Angiogenesehemmer, z. B. die selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib sowie Interleukin-12, deren Wirkprinzip noch nicht verstanden ist. Viele der genannten Substanzen befinden sich bereits in der klinischen Prüfung bzw. Anwendung. Eine aktualisierte Übersicht bietet das amerikanische National Cancer Institute (<http://www.nci.nih.gov/clinicaltrials/>). Dort sind z. Z. beispielsweise 37 klinische Studien mit dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab aufgelistet, von denen sich vier in der Phase III der klinischen Prüfung befinden (Stand 09.12.2004). Beim Nierenzellkarzinom wurde kürzlich eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Intervalls unter Bevacizumab Behandlung beschrieben (210). Außerdem kommen lösliche VEGF-Rezeptoren (50) und seit kurzem auch „designte“ chimäre VEGF-Rezeptoren (73) zum Einsatz. Eine Weiterentwicklung der bisherigen Therapie mit monoklonalen Antikörpern sind die intrazellulären, bispezifischen Antikörper (*intrabodies*) gegen VEGF-R2 und Tie-2-Rezeptor (85). HIF-1 ist bislang kein Zielmolekül in der Erforschung der Antiangiogenese. Zu beachten ist aber, dass es zunehmende Evidenz für einen antiangiogenen Effekt durch Kupfer-Chelierung gibt (14, 146). Auch für Ciclopirox gibt es - paradoxerweise - Untersuchungen, in denen eine antiangiogene Wirkung beschrieben wird (24).

### 1.5.3.2. Förderung der Angiogenese

Die therapeutische Angiogenese wird seit einigen Jahren zunehmend beforscht. Eine aktuelle Übersicht bietet (182). Sie kommt v. a. zum Einsatz bei ischämischen Erkrankungen der Herzkranzgefäße oder der Extremitäten. Die VEGF Gentherapie wurde erstmals 1996 am Menschen eingesetzt (77) und wird mittlerweile in Phase I und II Studien zur Behandlung chronischer myokardialer Ischämie (67, 124) und intermittierender Claudicatio (151) geprüft. Erste Ergebnisse im Ein-Jahres Follow-Up nach intramyokardialer Gabe nackter VEGF-DNA unter Thorakotomiebedingungen scheinen viel versprechend (43). Experimentelle Studien in Tiermodellen untersuchen die VEGF-Gentherapie in Magen- (88) und Duodenalgeschwüren (88) sowie in dermalen Ulcera, dermalen Exzisions- (30) und Brandwunden (46). Eine erfolgreiche Therapie der diabetischen Neuropathie durch VEGF-Gentransfer wurde ebenfalls beschrieben (170). In einer doppelblinden, Plazebo-kontrollierten Phase II Studie in der intrakoronaren und intravenösen Anwendung rekombinanten humanen VEGFs (rhVEGF) in der Behandlung von Angina pectoris Patienten (VIVA Studie) zeigte sich eine Verbesserung des klinischen Bildes (68). Die Behandlung mit VEGF allein zeigte in einigen Studien aufgrund der Permeabilitätserhöhung der Gefäße durch VEGF „leckende Gefäße“ (*leaky vessels*) und vermehrte Entzündungszeichen. Die Umgehung dieses Problems kann durch HIF-1 induzierte VEGF Expression erfolgen (36). Die Gentherapie mittels HIF-1 wurde im Tierversuch ebenfalls untersucht und zeigte ein besseres Resultat als die Behandlung mit einem VEGF-Transkript im Kaninchen-Modell (198). In einem weiteren Versuch am Modell der intramyokardialen Injektion nackter DNA am Rattenherz zeigte sich die Behandlung mit HIF-1 und VEGF gleichwertig (177). Weitere proangiogene Strategien, die sich der Gentherapie bedienen, sind die VEGF-Induktion über die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die Erfolge im Rattenmodell zeigt (140), oder die Verstärkung der hypoxischen VEGF-Induktion über die Einführung weiterer HREs in das VEGF Gen (188).

Die Beeinflussung der endogenen VEGF-Expression kommt ohne gentherapeutische Maßnahmen aus: Eine Möglichkeit ist der Einsatz „designter“ Transkriptionsfaktoren. Mit einem artifiziell geschaffenen Zinkfinger-Protein liegen erste *in vivo* Erfahrungen zur Angiogenese-Induktion in der Maus vor (155). Eine weitere Möglichkeit liegt in der Gabe HIF-1 stabilisierender Substanzen.

Intravesikale Kobaltinfusionen können in der Harnblase der Ratte eine Angiogenese der Tela submukosa auslösen (13). Insgesamt gibt es hierzu allerdings nur wenige Untersuchungen, was zur Fragestellung der vorliegenden Arbeit führte.

### **1.6. Angiogenese-Induktion über HIF-1 und der Ansatz dieser Arbeit**

Angiogenese kann im menschlichen Organismus auf physiologischem Wege durch Hypoxie und den Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 ausgelöst werden. Eine therapeutische Angiogenese zu erzielen ist bei vielen Krankheitsbildern wünschenswert. Darüber hinaus ist das Verständnis der Angiogenese-Induktion notwendig, um in einem entgegen gesetzten Therapieansatz pathologische Angiogenese besser kontrollieren zu können. Die vorliegende Arbeit verfolgte in diesem Rahmen zwei Ziele:

1. Für den Eisenchelator CPX ist bereits in geringer Konzentration die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins sowie dessen *in vitro* Aktivität beschrieben. Bei CPX handelt es sich um eine in vielen klinischen Studien geprüfte Substanz, die ohne Auftreten einer nennenswerten Toxizität oder gravierender Nebenwirkungen v. a. dermal angewandt wird. Ein Ziel ist daher die Überprüfung der Induktion des proangiogenen Wachstumsfaktors VEGF auf molekularbiologischer Ebene sowie die Übertragbarkeit auf *in vivo* Versuche, um ggf. mit CPX einen leicht zu applizierenden Wirkstoff für die Angiogenese-Induktion zu erhalten.
2. Für das Übergangsmetall Kupfer ist in therapeutischer Dosierung eine Angiogenese-Induktion beschrieben. Jüngere klinische Studien zeigen außerdem die Möglichkeit der Angiogenese-Inhibition durch Kupferchelierung. Bei Beginn der Versuche zu dieser Arbeit war der molekulare Wirkmechanismus von Kupfer nicht geklärt. Seit 2002 ist die Induktion von VEGF durch Kupfer beschrieben. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist daher zu prüfen, ob die VEGF-Induktion und konsekutive Angiogenese durch Kupfer auf HIF-1 beruht, um darüber ein besseres Verständnis von bereits in die klinische Forschung eingegangenen Pharmaka zu erlangen.

## 2. Material und Methoden

Im Folgenden werden nur die Materialien und Geräte näher bezeichnet, die für die Versuche von besonderer Wichtigkeit waren oder die zusätzlich zur Standard-Laboraausstattung verwendet wurden.

### 2.1. Zellkultur

HepG2- (ATCC Nummer HB-8065), Hep3B- (HB-8064), HeLaS3- (CCL-2.2) und CHO-Zellen (CCL-61) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. HRCHO5-Zellen wurden von R. Wenger zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um CHO-Zellen, die eine stabil transfizierte Glühwürmchen-Luziferase (*firefly luciferase*) unter der Kontrolle von drei HREs aus dem humanen Transferrin-Gen (Tf) exprimieren (160, 204). Das Luziferase-Gen wird damit Hypoxie-abhängig transkribiert (HR = *hypoxia reporter*).

Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, high glucose, GIBCO BRL, Karlsruhe) kultiviert, das mit 10% hitzeinaktiviertem, fetalen Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) und 50 µM β-Mercaptoethanol (Sigma, Taufkirchen) versetzt wurde. Die adhärennten Zellen wuchsen in 150 cm<sup>2</sup> Petrischalen, die nicht adhärennten HeLa-Zellen in Zellkulturfläschchen und wurden in einem Zellkulturschrank (Heraeus, Düsseldorf) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft bei 37°C inkubiert. Der P<sub>O<sub>2</sub></sub> unter normoxischen Bedingungen betrug 140 mmHg, entsprechend 20% O<sub>2</sub> vol/vol.

Für die Versuche unter hypoxischen Bedingungen wurden die Zellen in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und ausgleichendem N<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Die Hypoxie von 1% vol/vol, entsprechend einem P<sub>O<sub>2</sub></sub> von 7 mmHg, wurde durch regelmäßig kalibrierte Sonden kontrolliert und stabil gehalten. Die Eisenchelatoren CPX (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Bohn, Aventis, Frankfurt) und 2-2'-Dipyridyl (DP) wurden in Methanol als 0,5 M bzw. 1 M Stammlösung angelegt. Desferrioxamin (DFX) wurde in einer Ausgangskonzentration von 10 mM jeweils frisch in Zellkulturmedium gelöst. Die

Metallsalze Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2$ ), Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ), Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) und Nickelchlorid ( $\text{NiCl}_2$ , Sigma) wurden jeweils am Tag des Versuchs als 1 M Stammlösungen in destilliertem Wasser vorbereitet und vor dem Einsetzen in Zellkulturexperimenten mit einem Filter der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  steril filtriert.

## **2.2. Transiente und stabile Transfektion**

### **2.2.1. Plasmidkonstrukte**

Für die stabile Transfektion von HepG2 und Hep3B wurde das pH3SVL-Plasmid benutzt, das auch die HRCHO5 Zellen enthalten. pH3SVL enthält drei Abschnitte aus dem Tf *enhancer*, die um eine Glühwürmchen Luziferase unter der Kontrolle eines SV40 Promotors gruppiert sind (Abb. 3 A). Damit sind in einem Plasmid 6 HBS vorhanden, da jedes HRE zwei HBS beinhaltet. Der Ursprungsvektor ist pGL3Promotor (Promega, Heidelberg). Für die Transfektion wurde pH3SVL mittels *XmnI*-Verdau linearisiert und mit dem *EcoRI* linearisierten Neomycinresistenz-Expressionsvektor pSV2neo in einem molaren Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Für die transienten Transfektionen wurde das Plasmid pmVh verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hugo H. Marti), bei dem es sich um das gesamte murine VEGF-Gen in einem pBluescript Vektor handelt. Bei dem Konstrukt handelt es sich um ein RT-PCR Amplifikationsprodukt aus Maushirn (106).

### **2.2.2. Plasmidamplifikation und –extraktion**

Die Plasmide wurden in *E. coli* (Stamm DH5alpha) amplifiziert und über eine Ionenaustauscher-Säule (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Eine Fragmentlängenbestimmung bestätigte Identität und Reinheit der Plasmide. Hierfür wurde ein Aliquot des Eluats mit *EcoRI* verdaut und über eine Elektrophorese in 0,8%igem Agarose-Gel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Beleuchtung (Herolab, Wiesloch) sichtbar gemacht.

### **2.2.3. Transfektion**

Für die Transfektion wurden jeweils  $10^6$  HepG2- bzw. Hep3B-Zellen eingesetzt. Die Elektroporation fand in 350  $\mu\text{l}$  FCS-freiem Medium nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Plasmid-Lösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA in 10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) mittels

GenePulser II (BioRad, München) mit 1000  $\mu\text{F}$  und 250 V ( $\tau$  etwa 25 ms) statt. Die transient transfizierten Zellen wurden nach 12 h im Reporter-gen-Assay eingesetzt. Die stabil transfizierten Zellen wurden in Medium mit 2 mg/ml G418 (Alexis, Läufelfingen, Schweiz) in einer limitierten Verdünnungsreihe ausplattiert, um monoklonale Linien zu erhalten. Diese wurden im Reporter-gen-assay nach Transfektionseffizienz, d.h. hypoxischem Ansprechen, selektiert und erhielten die Namen HRG1 bzw. HRB5.

### **2.3. Reporter-gen-Assay**

In 96-Lochplatten wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Medium ausplattiert. Nach 4 h wurden die Zellen mit den zu prüfenden Substanzen versetzt und 24 h unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert. Dabei wurde zunächst in Verdünnungsreihen der zu untersuchende Konzentrationsbereich eingegrenzt (Daten nicht gezeigt). Die Luziferase-Aktivität wurde mit einem kommerziell erhältlichen Test nach Herstellerangaben (Promega) bestimmt. Nach der Lyse der Zellen wurde zunächst ein Aliquot für die Proteinbestimmung verwendet, die nach der Methode von Bradford (7) erfolgte. Dabei wurde die Extinktion der mit dem Farbstoff Coomassie-Blau G versetzten Probe in Bezug zu einer Standardverdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) gesetzt. Ein zweites Aliquot wurde mit dem Substrat der Luziferase (steady glo®) versetzt, die Lichtemission im Mikrolumat LB96P Luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim) bestimmt und auf den Proteingehalt normiert dargestellt.

### **2.4. MTT-Assay und Überprüfung des Zell-Überlebens**

Die MTT-Assays wurden parallel zu den Reporter-gen-Assays in 96-Lochplatten mit jeweils  $10^3$  Zellen/Loch durchgeführt. Die Zellen wurden einige Stunden zum Anwachsen nur in Medium kultiviert und dann 24 h mit den auf ihre Toxizität zu prüfenden Substanzen jeweils in Triplikaten inkubiert. Jede Reihe enthielt außerdem Lösungsmittel- und Mediumkontrolle. Nach 24 h wurde das Medium durch frisches ersetzt und mit 1 mg/ml MTT (3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Sigma) versetzt. MTT wurde dann durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen zum bräunlichen, unlöslichen



Formazan reduziert (63, 135). Die Reaktion wurde nach 4 h durch Zugabe eines Lyse-Puffers (20% SDS, 50% N-N-Dimethylformamid, pH 4,7) unterbrochen. Nach einer mindestens zwölfstündigen Resolubilisierung wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm im Spektrofotometer bestimmt (SLT Spectra Rainbow, SLT Labinstrumente GmbH, Crailsheim). Das Zellüberleben wurde bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle mit einem angenommenen Überleben von 100% als Quotient der jeweiligen Extinktionen nach Subtraktion des Leerwerts (Mediumkontrolle) prozentual angegeben und die Zytotoxizität bzw. Inhibition des Zellwachstums entsprechend der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = 100 \times [ 1 - ( \text{ODProbe} - \text{ODleer} ) / ( \text{ODKontrolle} - \text{ODleer} ) ].$$

## **2.5. Proteinuntersuchungen**

### **2.5.1. SDS-PAGE und Westernblot**

Für die Proteinuntersuchungen wurden die Zellen in 150 cm<sup>2</sup> Petrischalen im subkonfluenten Bereich kultiviert. Gesamtproteinextrakte, d.h. kombinierte zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte, wurden gewonnen durch osmotische Lyse unter Detergentienzusatz (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 400 mM NaCl, 0,1% Nonidet P40 unter Proteasehemmung mit 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM NaVaO<sub>3</sub>, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A) und nachfolgender Zentrifugierung zur Entfernung unlöslicher Zelltrümmer. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford, s.o. Die Proben wurden in einem 5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden 100 µg Protein/Spur eingesetzt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Freiburg) übertragen (Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell, BioRad). PonceauS-Färbung bestätigte eine gleichmäßige Proteinbeladung. Die Fixierung erfolgte mittels 3% Trichloressigsäure und 3% Sulfosalizylsäure. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 5% fettfreier Trockenmilch in PBS geblockt. HIF-1 $\alpha$  wurde nachgewiesen über den monoklonalen Maus-anti-human-HIF-1 $\alpha$ -IgG1 Antikörper (TransductionLab, BD Biosciences, Heidelberg), gefolgt von einem Peroxidasegekoppelten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien). Die Peroxidase-Reaktion wurde durch Inkubation in 100

mM Tris/HCl, pH 8,5, 0,625 mM Kumarinsäure in DMSO, 0,45 mM Luminol in DMSO und 2,65 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgelöst, ein Röntgenfilm aufgelegt und nach Standardverfahren entwickelt.

### **2.5.2. ELISA**

Für den Proteinnachweis mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) wurde der gleiche Ansatz verwendet wie für die Westernblots, allerdings wurde in diesem Fall eine Proteinbestimmung aus den Zellkulturüberständen durchgeführt. Die VEGF-Konzentration wurde mit einem kommerziell erhältlichen Test nach den Angaben des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden) bestimmt.

### **2.5.3. Immunfluoreszenz**

Die nukleäre Akkumulation des HIF-1 $\alpha$  Proteins unter Kupferbehandlung wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Zellen wurden auf Deckgläschen in 6-Lochplatten kultiviert. Dabei wurden nur 4 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml eingesetzt und für 24 h mit der Testsubstanz inkubiert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und in 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert, durch Waschen mit 1% Triton X100 in PBS permeabilisiert und anschließend durch 10% FCS in PBS geblockt. HIF-1 $\alpha$  wurde nachgewiesen über einen anti-HIF-1 $\alpha$  IgG1 Antikörper (Transduction Laboratories) in einer Verdünnung von 1:10, gefolgt von einem sekundären, Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper (DAKO, Kopenhagen, Dänemark) 1:50. In einem zweiten Ansatz wurde ein weiterer sekundärer anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet, der in diesem Fall Tetramethyl-Rhodamin-Isothiozyanat (TRITC)-markiert war (DAKO). Anschließend wurden die Deckgläschen nach mehrmaligem Waschen mit PBS auf einem Objektträger eingebettet. Die Mikroskopie erfolgte im Phasenkontrast sowie fluoreszenzmikroskopisch mit einer Vergrößerung von 1:630 (Axioplan, Carl Zeiss Vision, Mannheim).

## **2.6. Isoliert perfundierte Rattennieren**

Die explantierten und *ex vivo* behandelten Rattennieren wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. rer. nat. Horst Pagel zur Verfügung gestellt. Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes

und mit Genehmigung der Tierversuchskommission des Ministeriums für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein durchgeführt. Die Nieren männlicher Sprague-Dawley Ratten wurden *ex vivo* isoliert perfundiert wie zuvor beschrieben (144). Das Perfusionsmedium wurde äquilibriert mit einem Gasgemisch, das 3% bzw. 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und ausgleichendes N<sub>2</sub> enthielt. CPX wurde in entsprechender Konzentration dem Medium beigefügt und die Nieren jeweils 3 h perfundiert.

### **2.7. mRNA-Präparation und Northern Blot**

mRNA-Präparation: Für die Zellkulturexperimente wurden 150 cm<sup>2</sup> Petrischalen mit subkonfluent wachsenden Zellen (1-2 x 10<sup>6</sup>) verwendet. Die Rattennieren wurden durch mehrmalige Passage durch eine 18 gauge-Kanüle homogenisiert. Die mRNA-Isolation erfolgte durch saure Guanidinthiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion wie zuvor beschrieben (19). Die RNA wurde in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser aufgenommen und die Extinktion bei 260 nm zur Konzentrationsbestimmung gemessen (GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

Gelelektrophorese und Blot: Die Elektrophorese erfolgte in einem 1%igen Agarosegel mit 20 µg RNA/Spur bei 150 mA. Das Übertragen auf Nylonmembran (Nytran Plus, Schleicher und Schüll, Dassel) erfolgte mittels Kapillarblottransfer. Anschließend erfolgte eine Fixierung (*crosslinking*) mit UV-Licht.

Sonden: cDNA-Plasmide für VEGF, Aldolase, ribosomales Protein L28, β-Aktin (106) und Glut-1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Thorens, Universität Lausanne, Schweiz) wurden wie oben beschrieben amplifiziert und die Sonden über Restriktionsverdau gewonnen, über Gelelektrophorese gereinigt und radioaktiv markiert. Für die Hybridisierung der hitzedenaturierten cDNA-Sonde mit Random-Nonameren und α<sup>32</sup>P-dCTP wurde das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA Polymerase I verwendet. Die markierte Sonde wurde über eine Sephadex G50-Säule aufgereinigt und die Effektivität der radioaktiven Markierung durch die Messung der Čerenkov-Strahlung bestimmt.

Hybridisierung und Autoradiographie: Nach einer zweistündigen Prähybridisierung der Membran fand die Hybridisierung in 10% Dextransulfat, 0,9 M NaCl, 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,1% (w/v) Ficoll 400, 0,1% (w/v) Polivinylpyrrolidon

K90, 0,1% BSA, 1% SDS und 400 µg denaturierter DNA aus Lachs Sperma bei pH 7,4 und 42°C über 12 h statt. Der Blot wurde dann mehrmals mit steigender Stringenz gewaschen in zuletzt 0,1 x SSC/0,2% SDS bei 50°C über 1 h und anschließend in Saran®-Folie eingeschlagen. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Phosphoimagers (BAS 1000, Fuji, Düsseldorf) quantifiziert. Vor dem Einsatz der folgenden Sonde wurde der Blot in 96% Formamid, 10 mM Tris/HCl und 10 mM EDTA, pH 8 bei 60°C über 30 min von der alten Sonde befreit.

### **2.8. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) Assay**

Für die Darstellung der Neovaskularisation auf der chorioallantoiden Membran (CAM) des Hühnereiembryos wurden befruchtete Eier (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven) in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37°C bis zu Tag 6 der Entwicklung in Seitenlage inkubiert und solange zweimal täglich gewendet. Unter starkem Durchlicht wurde an Tag 6 ein kleines Loch durch die Schale in den Luftsack gebohrt. Auf der embryonalen Seite wurde dann ein Fenster von ca. 1 cm<sup>2</sup> ausgesägt und zunächst mit Klebeband wieder verschlossen. CPX wurde an Tag 9 appliziert. Hierfür wurde die Elvax®-Methode angewendet (109, 142): Ethylen-/Vinylazetat Kopolymer-Kügelchen (Elvax 40L-03, DuPont, Wilmington, DE; freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch C.H. Erbslöh KG, Krefeld) wurden ausgiebig mit Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Elvax wurde in Methylenchlorid gelöst, so dass eine 10% (w/v) Lösung entstand. CPX wurde in der gewünschten Konzentration hinzugefügt. Ein Tropfen der Lösung (etwa 40 µl) wurde auf einen silikonisierten Objektträger aufgetropft. Nach vollständiger Verdunstung des Lösungsmittels wurde das Kunststoffplättchen mit einer Pinzette abgezogen und auf die CAM aufgelegt. An Tag 11 wurde die Schalenöffnung erweitert und das Bild im Maßstab 1 : 100 fotodokumentiert (Olympus, Hamburg).

## **3. Resultate**

### ***3.1. Einfluss von CPX auf HIF-1 $\alpha$ Stabilität und Transaktivierungsaktivität***

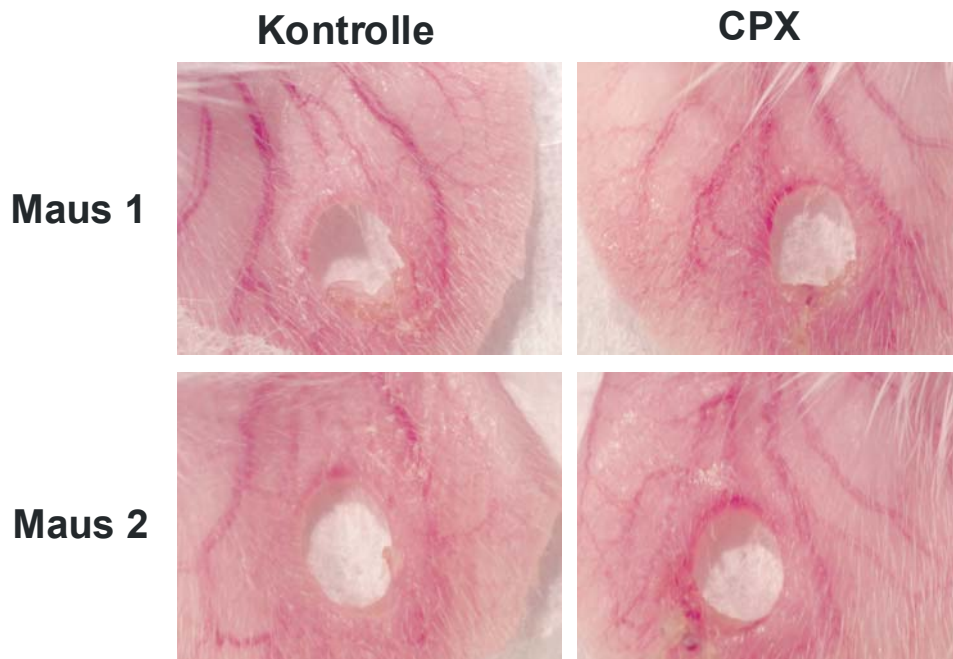
#### **3.1.0. Vorversuche – Evidenz für eine CPX induzierte Angiogenese im Mäusehaut-Wundmodell**

In frühen Studien zur Verträglichkeit von CPX wurde bei Applikation von 1% CPX-Lösung über 20 Tage an Kaninchenhaut in etwa der Hälfte der Fälle eine vorübergehende Rötung gesunder Haut und eine anhaltende Rötung im Wundmodell beobachtet. In Vorstudien zu dieser Arbeit wurden diese Ergebnisse an Mäusen bestätigt (Annette Scheid und Leonhard Schäffer, Universität Zürich-Irchel, Schweiz). 2 mm durchmessende Ohrlöcher, wie üblicherweise zur Markierung von Mäusen verwendet, wurden täglich mit kommerziell erhältlicher Hautcreme mit 1% CPX behandelt. Das zweite Ohr wurde mit der CPX-freien Salbengrundlage behandelt. Dabei zeigten 4 von 10 Tieren eine Rötung im Bereich der Wundgrenzen. In keinem Fall war die Rötung der Placebo-behandelten Wundränder ausgeprägter als die der CPX-behandelten (Abb. 2). Da von CPX eine antiinflammatorische Wirkung bekannt ist (104, 161), vermuteten wir einen angiogenen Effekt unter CPX im Rahmen der Wundheilung als Ursache dieser Rötung und nicht eine entzündliche Reaktion. Diese Versuche bildeten eine der Grundlagen für unsere Frage, ob CPX die Induktion von VEGF und darüber eine Angiogenese auslösen kann.

#### **3.1.1. Etablierung von zwei Hypoxie-induzierbaren Reporter-gen-Zelllinien**

Für die schnelle Überprüfung CPX-vermittelter HIF-1 Transaktivierungsaktivität wurden Reporter-gen-Assays durchgeführt. Es stand bereits eine Hypoxie-induzierbare Reporter-gen-Zelllinie auf der Basis von chinesischen Hamster Ovar-Zellen (CHO) zur Verfügung. Zusätzlich wurden zwei weitere Zelllinien auf der Grundlage von HepG2 und Hep3B-Zellen generiert. Bei diesen handelt es sich um menschliche Hepatomzellen. Nach der stabilen Transfektion mit einem Luziferasegen, das HIF-1 $\alpha$  abhängig transkribiert wird (Abb. 3 A), wurde die hypoxische Induktion der Luziferaseaktivität bestätigt (Abb. 3 B). Die Zellen

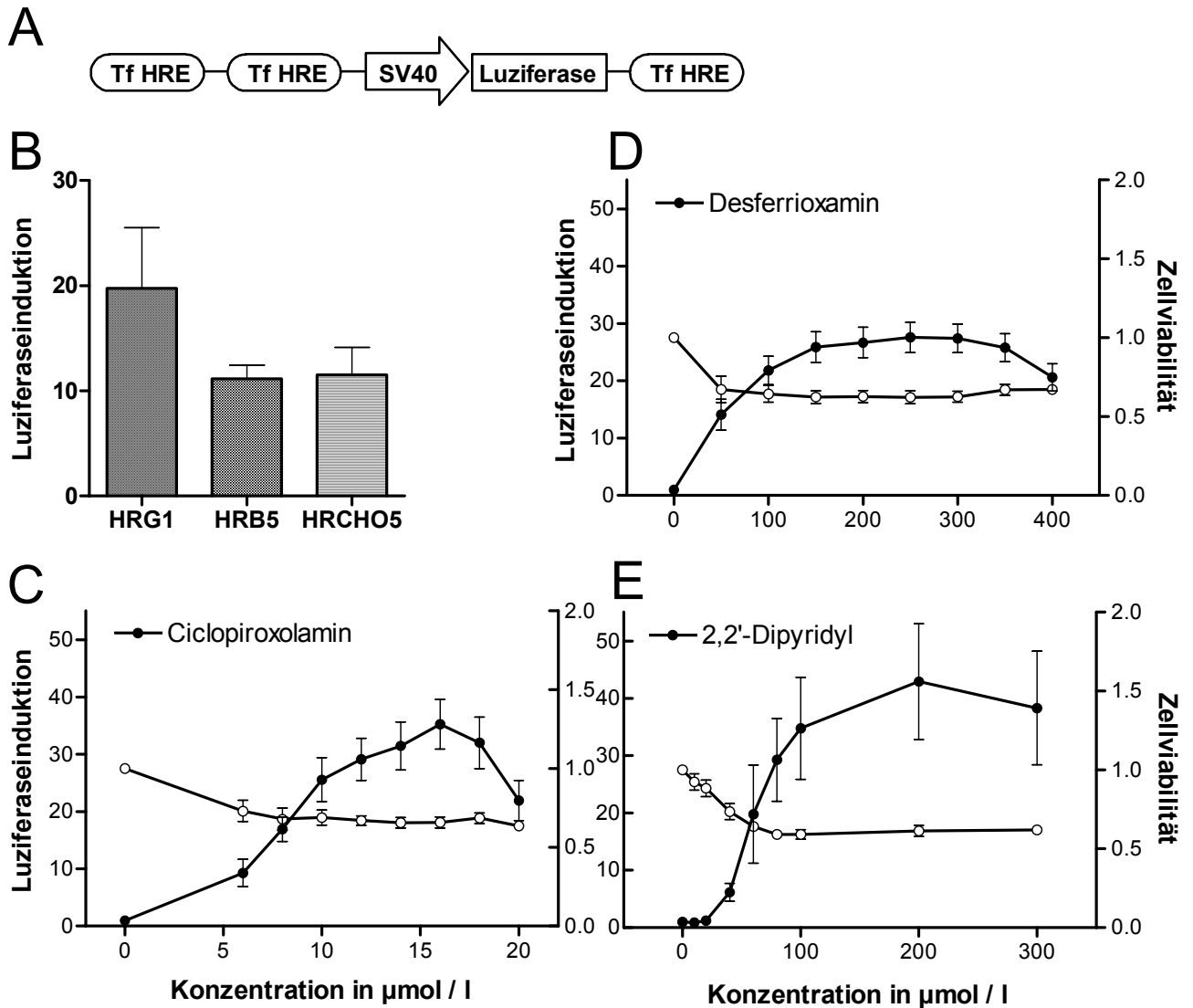
standen während der weiteren Untersuchungen auch für die Überprüfung anderer Substanzen zur Verfügung.



**Abb. 2:** Rötung von Mausohren nach zehntägiger Behandlung mit CPX. Gezeigt sind exemplarisch die Ohren zweier Mäuse. Das behandelte Ohr wurde täglich mit 1% CPX behandelt, das Kontrollohr mit der Salbengrundlage.

### 3.1.2. CPX induziert HIF-1 $\alpha$ abhängige Reportergene unter leichter Inhibition der zellulären Proliferation bzw. Viabilität

CPX wurde auf seine Fähigkeit, HIF-1 $\alpha$  Aktivität zu induzieren, zusammen mit DFX und 2,2'-DP, zwei weiteren Eisenchelatoren, untersucht, für die diese Wirkung bekannt ist. Alle drei Substanzen induzieren in HRCHO5-Zellen HIF-1 $\alpha$  abhängige Reportergenexpression bis zum 25- bis 40-fachen der normoxischen Aktivität (Abb. 3 C-E). Dabei fällt auf, dass CPX bereits bei einer Konzentration von 16  $\mu$ M maximal aktiv ist, während die optimalen Konzentrationen von DFX und 2,2'-DP zehnfach höher liegen. In HRG1-Zellen zeigt sich für CPX ein ähnliches Konzentrationsoptimum, in HRB5-Zellen ist es sogar noch niedriger. Gleichzeitige hypoxische Exposition bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 1% zeigte unter ansonsten identischen Bedingungen keine Erhöhung der Luziferaseaktivität (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3:** **A** Reportergenkonstrukt. Die Klonierung erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. TfHRE, hypoxia response element auf dem Transferrinpromotor mit *enhancer* Funktion. SV40, simian virus 40 promotor. **B** Überprüfung der stabil transfizierten Reporterzelllinien. Gezeigt ist die Luziferase-Induktion nach 24 Stunden Inkubation bei 1% O<sub>2</sub> als Vielfaches der normoxischen Kontrolle bei 21% O<sub>2</sub> der jeweiligen Zelllinie, gesetzt als 1. (Mittelwerte +/- SEM, n = 4 für HRG1 und HRCHO5, n = 6 für HRB5, unabhängige Experimente, jeweils durchgeführt in Triplikaten). **C, D, E** Reportergenassays. Luziferase-Induktion durch den entsprechenden Chelator (geschlossene Kreise) als Vielfache der normoxischen Kontrolle auf der linken Y-Achse. **C** n = 9, **D** n = 6, **E** n = 4. Zellviabilität, bestimmt nach der MTT-Methode (offene Kreise), in Abhängigkeit zur Normalkontrolle auf der rechten Y-Achse, n = 3. n unabhängige Experimente, jeweils in Triplikaten.

Gleichzeitig wurden mit den Zellen MTT-Assays durchgeführt (Abb. 3 C-E), um die Beeinflussung der Proliferationsaktivität bzw. der Zellviabilität durch die Eisenchelatoren beurteilen zu können. In HRCHO5-Zellen reduzierten alle Eisenchelatoren den MTT-Umsatz um 30-40%, bereits bei Konzentrationen, die noch unter dem Konzentrationsoptimum in Bezug auf die HIF-1α Beeinflussung

lagen. Bei weiterer Steigerung der Chelatorkonzentration ließ sich kein weiterer Abfall der Proliferation bzw. Viabilität beobachten. Der Einfluss von CPX auf den MTT-Umsatz von HRG1- und HRB5-Zellen war vergleichbar.

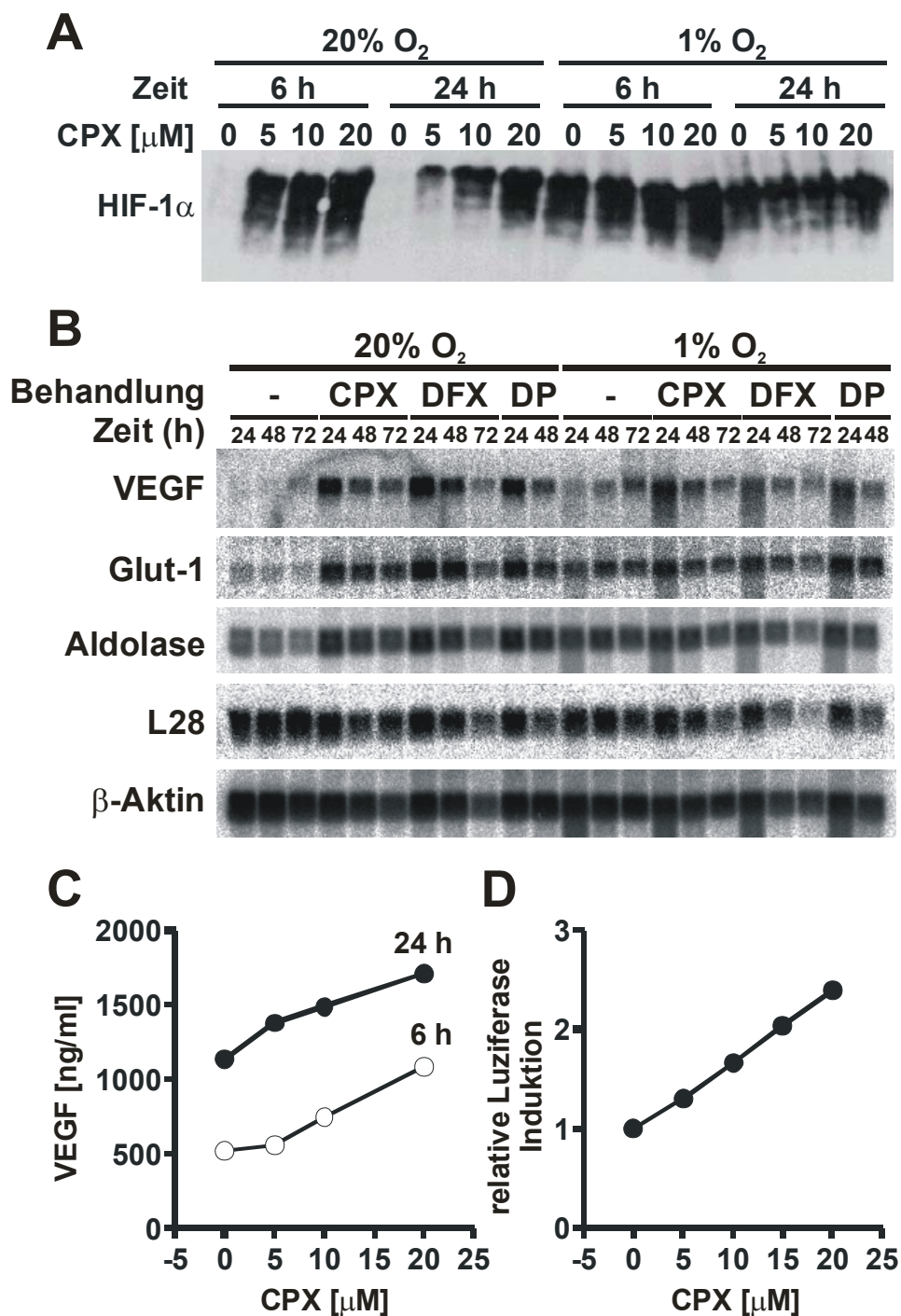
### **3.1.3. HIF-1 $\alpha$ Protein wird durch CPX unter normoxischen Bedingungen stabilisiert**

Die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins durch CPX unter normoxischen Bedingungen wurde in HepG2-Zellen im Westernblot überprüft (Abb. 4 A). Unter normoxischen Bedingungen ließ sich HIF-1 $\alpha$  unter Standardkulturbedingungen nicht nachweisen. Nach Behandlung mit CPX war ein HIF-1 $\alpha$  Bandenmuster und eine Bandenstärke vergleichbar der unter hypoxischer Induktion nachweisbar. Dabei zeigte sich eine proportionale Konzentrationsabhängigkeit im Bereich von 0 bis 20  $\mu$ M CPX, ähnlich wie im Reporterassay bei entsprechenden HRG1-Zellen. Nach 6 und 24 h war der Konzentrationseffekt gleichermaßen ausgeprägt, wobei die Bandenstärke nach 24 h geringer ausgeprägt war als nach 6 h. Wie im Reporterassay ließ sich auch im Westernblot eine additive Wirkung von Hypoxie und CPX nach 6 Stunden nicht nachweisen. In HeLa-Zellen sahen wir ebenfalls eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  Protein unter normoxischen Bedingungen durch CPX, welche proportional zur Konzentration des CPX war (Abb. 7).

### **3.1.4. HIF-1 abhängige Gene werden unter CPX-Behandlung vermehrt transkribiert**

Der Einfluss von Eisenchelatoren auf endogene HIF-1 Zielgene wurde im Northernblot in HepG2-Zellen untersucht. Für VEGF, Glukosetransporter-1 (Glut-1) und Aldolase wurde die Regulation über HIF-1 zuvor beschrieben und ließ sich auch nach Behandlung mit CPX (10  $\mu$ M), DFX und 2,2'-DP (jeweils 100  $\mu$ M) über 24, 48 und 72 Stunden zeigen (Abb. 4 B). Die nicht Sauerstoff-regulierten Kontrollgene (ribosomales Protein L28 und  $\beta$ -Aktin) zeigten keine Abhängigkeit von der Chelatorbehandlung. Die Expression HIF-1 abhängiger und unabhängiger Gene war nach Behandlung über mehr als 24 Stunden im weiteren zeitlichen Verlauf unter allen drei Eisenchelatoren rückläufig.





**Abb. 4:** **A** HIF-1 $\alpha$  Proteinnachweis im Westernblot. HepG2-Zellen wurden 6 bzw. 24 Stunden mit unterschiedlichen CPX-Konzentrationen unter norm- und hypoxischen Bedingungen inkubiert. **B** Northernblot aus HepG2-Zellen, die für 24, 48 und 72 Stunden mit 10  $\mu$ M CPX, 100  $\mu$ M DFX, 100  $\mu$ M DP resp. Lösungsmittel allein inkubiert wurden. Derselbe Blot wurde nacheinander mit Sonden für HIF1-Zielgene (VEGF, Aldolase, Glut-1) und Hypoxie-unabhängige Gene ( $\beta$ -Aktin, L28) hybridisiert. **C** ELISA auf VEGF Protein aus dem Überstand von HepG2 Zellen, die für 6 bzw. 24 Stunden mit unterschiedlichen CPX-Konzentrationen inkubiert wurden. **D** Relative Luziferase-Aktivität unter Kontrolle des VEGF-Promotors in transient transfizierten HepG2 Zellen. Die Luziferase-Aktivität wurde zur kotransfizierten Renilla-Luziferase ins Verhältnis gesetzt und als Vielfaches der Lösungsmittelkontrolle angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

### **3.1.5. HIF-1 abhängige VEGF-Proteinexpression und VEGF-Promotoraktivierung**

Die Funktionalität der CPX-induzierten VEGF-mRNA konnte über den Nachweis sezernierten VEGF-Proteins in den Überstand CPX-behandelter HepG2-Zellen nach 6 und 24 Stunden im ELISA gezeigt werden (Abb. 4 C). Die Menge des VEGF-Proteins ist dabei sowohl zur Dosis des CPX als auch zur Dauer der Exposition proportional. VEGF-Protein akkumuliert auch nach 24 stündiger CPX-Wirkung noch, obwohl im Westernblot - wie gezeigt - die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge zu dieser Zeit bereits wieder abfällt.

Die Bedeutung des VEGF-Promotors für die CPX-Wirkung wurde in HepG2-Zellen demonstriert, die transient transfiziert wurden mit einem Plasmid, das ein Luziferase-Gen unter der Kontrolle eines Fragments des VEGF-Promotors exprimiert. Anschließende Behandlung mit CPX zeigte wiederum einen dosisabhängigen Anstieg der Luziferase-Aktivität bis zum 2,5fachen der normoxischen Kontrolle, was – wie erwartet – deutlich unter der Induktion in den stabilen Transfektionen liegt (Abb. 4 D).

### **3.1.6. In der isoliert perfundierten Rattenniere ist ein CPX-abhängiger Effekt auf HIF-1 Zielgene nicht nachweisbar.**

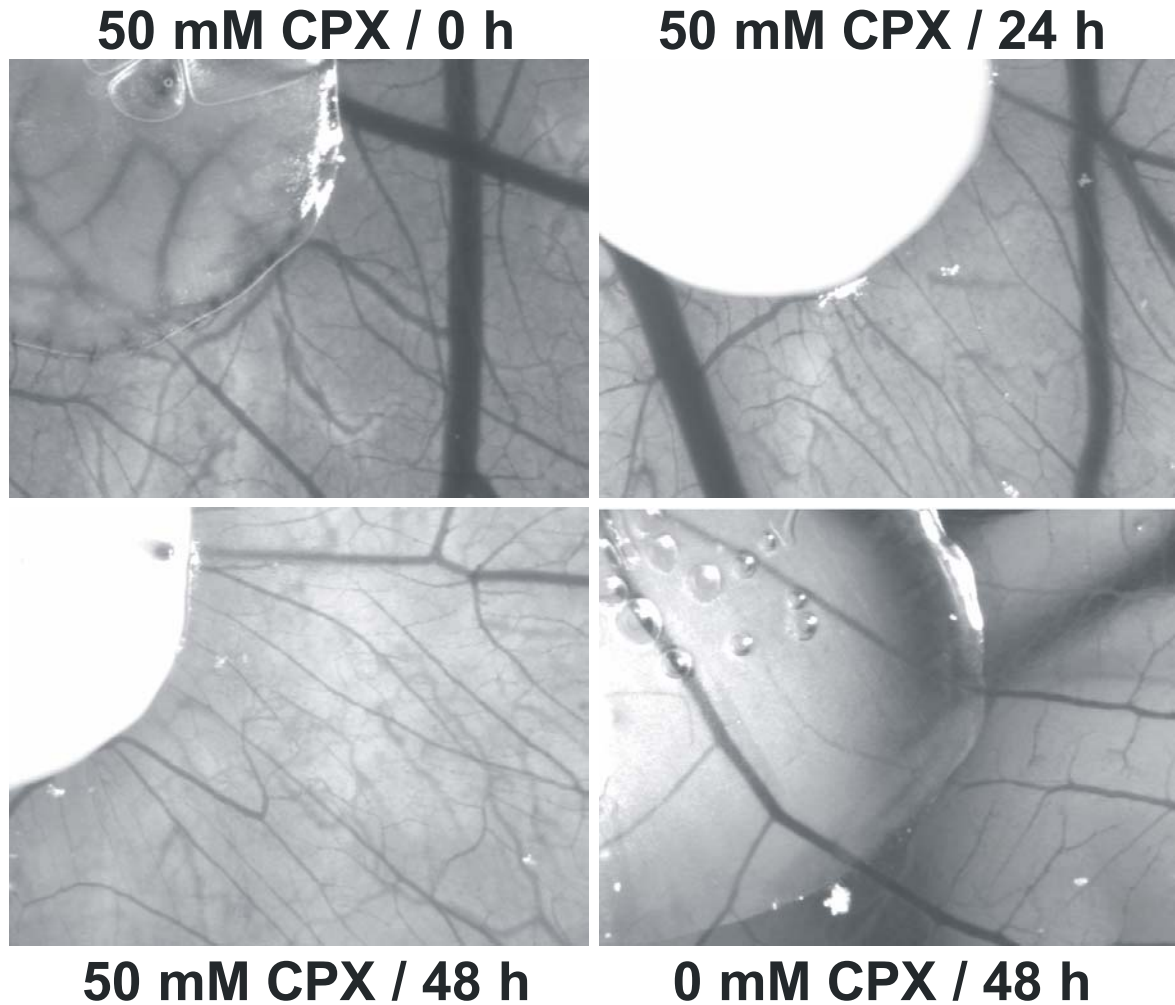
Der Einfluß von DFX auf HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung und EPO-Expression in Mausnieren ist beschrieben (201). Im Hinblick auf die potentielle topische Anwendung von CPX zur Erzeugung einer therapeutischen Angiogenese und unter Berücksichtigung der hohen Lipophilie von CPX wurden mögliche systemische Wirkungen von CPX im ex vivo-Modell der isoliert perfundierten Rattenniere untersucht. Nach dreistündiger Perfusion der Nieren unter normoxischen Bedingungen mit CPX-Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 100  $\mu$ M im Perfusat ließ sich keine HIF-1 abhängige Genexpression im Northernblot nachweisen. Gleichzeitig zeigte sich ein zunehmender toxischer Effekt unter sehr hohen CPX-Konzentrationen von 33 und 100  $\mu$ M, der deutlich wurde an einer 30fachen Erhöhung der fraktionierten Albuminclearance im Sinne einer erhöhten glomerulären Permeabilität für Makromoleküle sowie an einem Abfall der fraktionierten Natrium-Reabsorption auf etwa die Hälfte der Werte der

unbehandelten Seite. (Daten nicht gezeigt. Die Versuche wurden mit Ausnahme des Northernblots durch Prof. Dr. H. Pagel und Frau U. Frackowski durchgeführt.) Da sich keine HIF-1 abhängige Genexpression nachweisen ließ, weder unter Perfusion mit 3% O<sub>2</sub> noch mit CPX, beschränkt sich die Aussagekraft dieses *ex-vivo* Modelles auf die Toxizität von CPX.

### **3.1.7. CPX induziert Angiogenese im CAM-Modell.**

Der Einfluss des unter CPX-Behandlung *in vitro* exprimierten VEGF wurde im *in vivo*-Modell der CAM im Hinblick auf die Auslösung einer Angiogenese untersucht. CPX wurde dabei über ein inertes Kunststoffträgermaterial auf neun Tage alte CAM-Membranen aufgebracht und diese im Verlauf von drei Tagen täglich mikroskopisch auf Neovaskularisation geprüft. Während sich in den Lösungsmittelkontrollen über 72 Stunden keine Angiogenese zeigte, konnte unter 50 mM CPX bereits nach 24 Stunden eine beginnende Angiogenese in Form von radiär auf die CPX-Kunststoffscheibchen zustrebenden neuen Gefäßen beobachtet werden. Der Effekt verstärkte sich über die weitere Beobachtungszeit von zwei Tagen (Abb. 5) und war nach 72 Stunden in sechs von sechs behandelten CAM ausgeprägt, ohne dass es in einer von 10 Negativkontrollen zur Neovaskularisation gekommen wäre. Die Ergebnisse wurden in einer unabhängigen Serie mit 10 weiteren behandelten CAM bestätigt (durchgeführt durch PD Dr. D. M. Katschinski).

Bei einer Konzentration von 5 mM CPX kam es in zwei von sechs Fällen ebenfalls zu einer leichten Angiogenese. Eine CPX-Konzentration von 500 mM war toxisch, was sich in einer Demarkierung der Auflagefläche durch die Zerstörung der umliegenden Gefäße zeigte.



**Abb. 5:** Induktion von Angiogenese in der chorioallantoischen Hühnereimembran (CAM) durch 50 mM CPX. Die inerten Kunststoffträger wurden an Tag 9 der Embryonalentwicklung aufgebracht und nach 24, 48 und 72 h in der Vergrößerung 1:100 fotografiert. Dargestellt ist eine exemplarische CAM vor sowie 24 und 48 h nach Aufbringen des CPX-Trägers sowie eine Negativkontrolle nach 48 h. Das Kunststoffscheibchen ist jeweils am linken oberen Bildrand erkennbar. Wenn CPX enthalten war, wurde das Polymer nach einigen Stunden undurchsichtig.

### **3.2. Der Einfluss von Kupfer(II)-Ionen auf Stabilisierung und Transaktivierungsaktivität von HIF-1 $\alpha$**

#### **3.2.1. Kupfer(II)-Ionen induzieren HIF-1 $\alpha$ abhängige Reportergene unter leichter Inhibition der zellulären Proliferation bzw. Viabilität**

Kupfer(II)-Ionen bzw. die wässrigen Lösungen von Kupfer(II)chlorid  $\text{CuCl}_2$  und Kupfer(II)sulfat  $\text{CuSO}_4$  induzieren in den bereits beschriebenen unterschiedlichen Reporter-gen-Zelllinien die HIF-1 abhängige Luziferase in unterschiedlichem Ausmaß. Dabei wurde initial eine geringfügige, aber stabile Steigerung der

Transaktivierungsaktivität in HRCHO5-Zellen (Abb. 6 A) gefunden und anschließend in HRB5-Zellen (Abb. 6 B) überprüft. Der Effekt war in HRB5-Zellen deutlich stärker ausgeprägt und außerdem synergistisch zu einer hypoxischen Inkubation (Abb. 6 C). Es lag eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit vor. In HRG1-Zellen war der Effekt interessanterweise in wiederholten Versuchen nicht nachweisbar (Abb. 6 D).

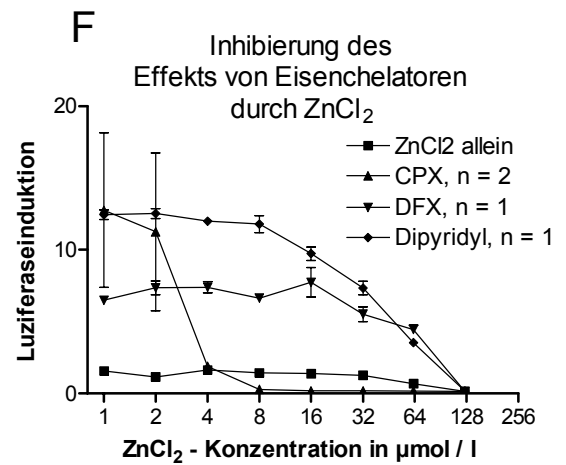
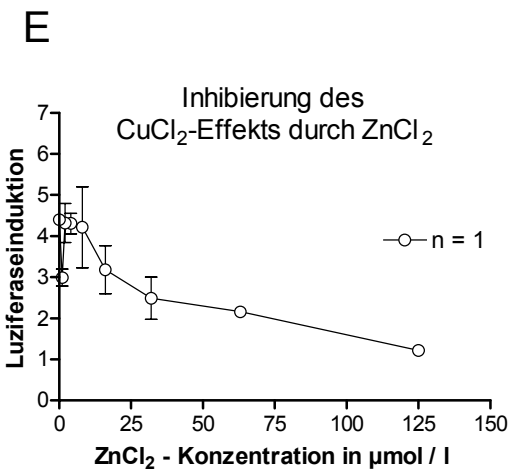
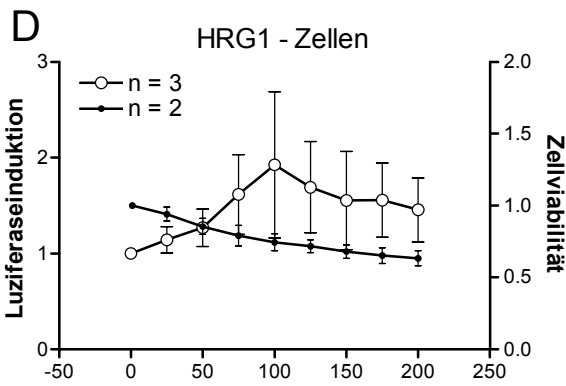
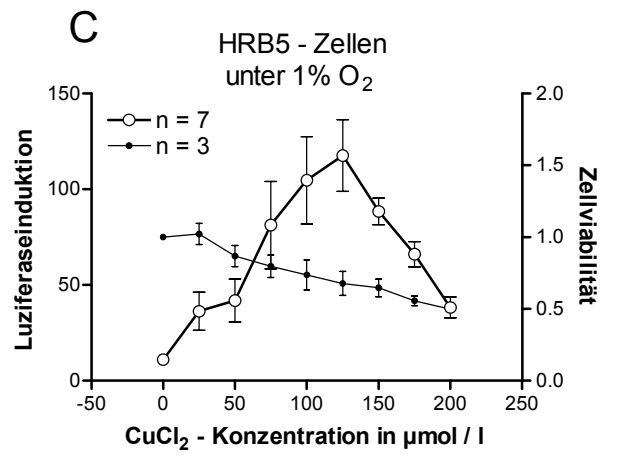
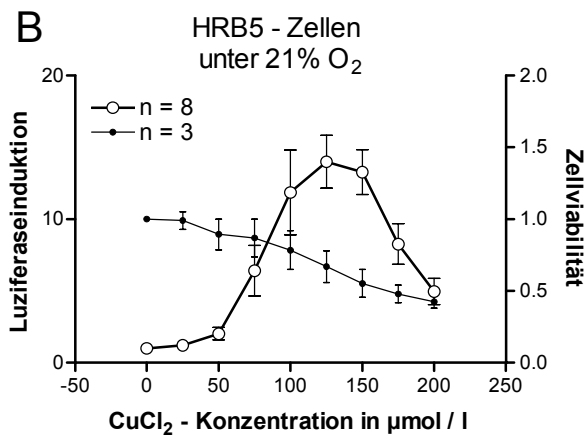
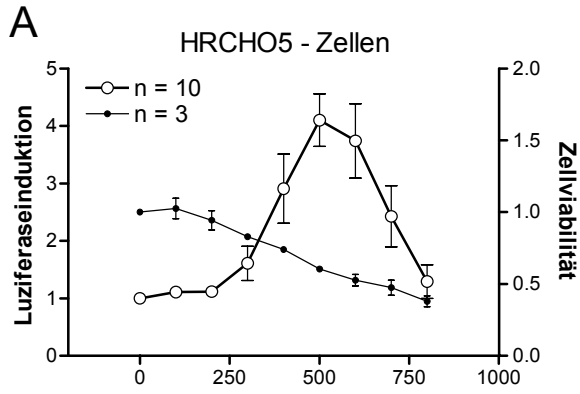
Die Zytotoxizität wurde mittels MTT-Assay überprüft (Abb. 6 A-D). Im untersuchten Konzentrationsbereich fand sich ein durchschnittlicher Rückgang der Viabilität auf 50% des Ausgangswertes. Ausschlaggebend für die HIF-1 $\alpha$  Transaktivierungsaktivität ist dabei nicht der durch Kupfer(II)-Ionen ausgelöste zytotoxische Stress, wie wir mit anderen Metall-Ionen in ähnlich zytotoxischen Konzentrationen nachweisen konnten, was nicht zur HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung führte (Daten nicht gezeigt).

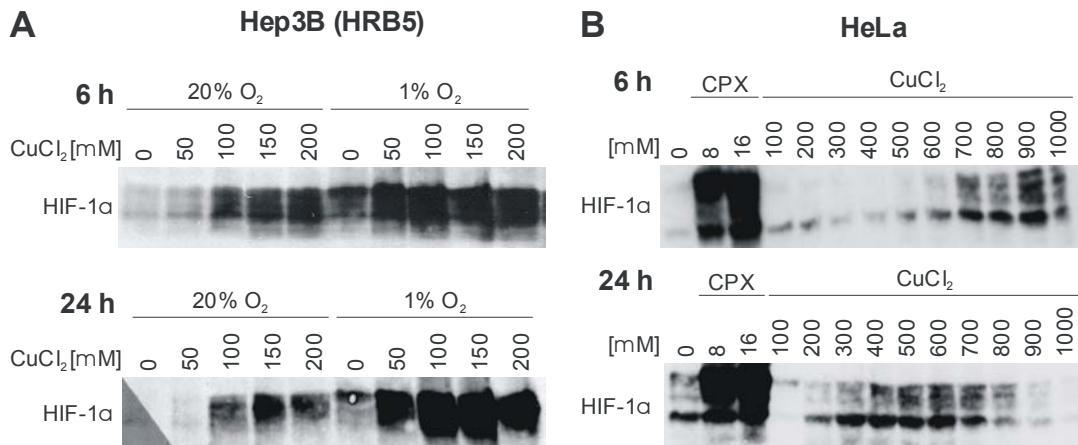
In einem weiteren Versuch wurde gezeigt, dass der Effekt einer funktionellen HIF-1 $\alpha$  Induktion durch Kupfer (Abb. 6 E) und Eisenchelatoren (Abb. 6 F) jeweils durch Zinkchlorid in konzentrationsabhängiger Weise inhibiert werden konnte. Für den letzteren Fall ist dies bereits beschrieben (22).

### 3.2.2. Kupfer(II)-Ionen stabilisieren HIF-1 $\alpha$ unter normoxischen Konditionen

Zum Nachweis des HIF-1 $\alpha$  Proteins wurden wiederum Westernblot-Analysen durchgeführt. Dabei wurde zusätzlich zu den HRB5-Zellen der Effekt auch in humanen HeLa-Zellen, einer Zervixkarzinom-Zelllinie, nachgewiesen (Abb. 7). Es zeigte sich eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit wie in den Versuchen mit den Reporter-gen-Zelllinien. Der zu Hypoxie synergistische Effekt des Kupfers, der im Reporter-gen-assay deutlich wurde, ist in HRB5-Zellen im Westernblot ebenfalls erkennbar.

**Abb. 6:** (folgende Seite) Reporter-gen-assays. Luziferaseinduktion (offene Kreise) durch Cu<sup>2+</sup> in HRCHO5-Zellen (A), HRB5-Zellen unter normoxischen (B) und hypoxischen Bedingungen (C) sowie in HRG1-Zellen (D). Beachtenswert ist in (B) und (C) der unterschiedliche Maßstab der Y-Achse. Gleichzeitig dargestellt ist die Zellviabilität, die mittels MTT-Assay bestimmt wurde (geschlossene Kreise). Der durch Kupfer (E) und Eisenchelatoren (F) ausgelöste Effekt lässt sich durch ZnCl<sub>2</sub> inhibieren. n unabhängige Experimente, jeweils in Triplikaten.

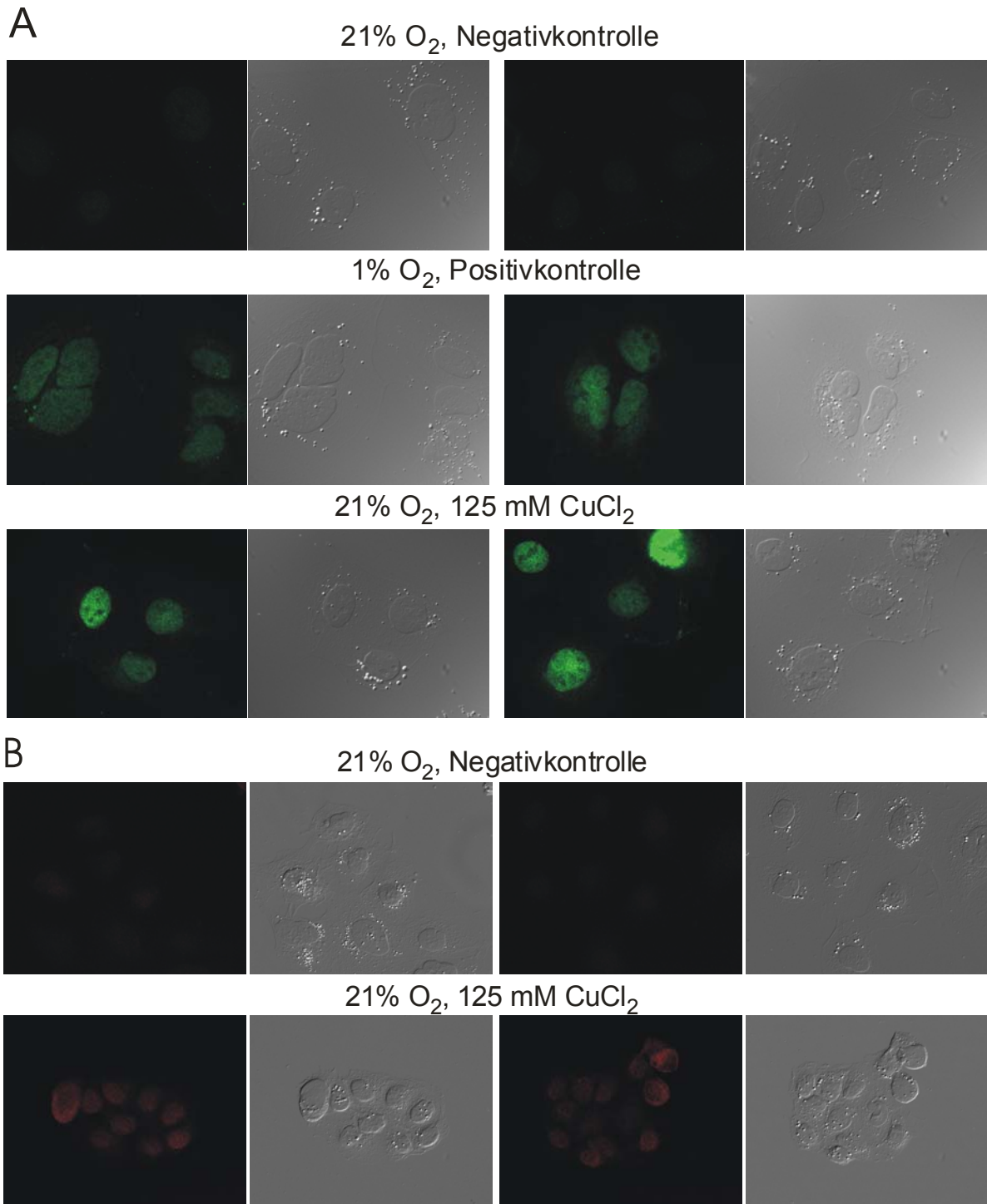




**Abb. 7:** HIF-1 $\alpha$  Proteinnachweis im Westernblot. HRB5-Zellen (**A**) bzw. HeLa-Zellen (**B**) wurden für 6 bzw. 24 Stunden mit unterschiedlichen CPX-Konzentrationen unter norm- und hypoxischen Bedingungen inkubiert.

### 3.2.3. Kupfer(II)-Ionen induzieren die Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ im Zellkern

HIF-1 $\alpha$  ist unter normoxischen Konditionen nicht im Zellkern nachweisbar. Unter hypoxischen Bedingungen akkumuliert HIF-1 $\alpha$  im Zellkern bzw. wird dort nach Stabilisierung und Heterodimerisierung mit HIF-1 $\beta$  nachweisbar. Um diesen auf die Stabilisierung folgenden Schritt nachzuweisen, führten wir den immunzytologischen Nachweis, dass unter dem Einfluß von Cu<sup>2+</sup> das HIF-1 $\alpha$  Protein auch unter Normoxie im Kern akkumuliert (Abb. 8).



**Abb. 8:** Subzelluläre Lokalisation des durch Kupfer induzierten HIF-1 $\alpha$  mittels Immunfluoreszenz. Hep3B-Zellen (Subklon HRB5) wurden für 24 h unter normoxischen Bedingungen mit Cu<sup>2+</sup> oder Lösungsmittel inkubiert. Der verwendete HIF-1 $\alpha$  Antikörper ist in **A** FITC-, in **B** TRITC-markiert. Eine 24 stündige hypoxische Inkubation diente als Positivkontrolle. Ursprüngliche Vergrößerung 1:630.



## 4. Diskussion

### **4.1. Beeinflussung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 durch den Eisenchelator CPX – Methodische Diskussion des Angiogenese-Assays**

Ausgehend von der Beobachtung, dass CPX im Tiermodell trotz seiner antiinflammatorischen Wirkung zu einer Hautrötung im Wundbereich führt ((2) und eigene Beobachtungen, Abb. 2), untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit, ob CPX eine Angiogenese induzieren kann. CPX führte in unseren Versuchen zu einer funktionellen Aktivierung von HIF-1 Zielgenen *in vitro* und *in vivo* sowie zu einem proangiogenen Phänotyp in der CAM. Der von uns gewählte Angiogenese-Assay auf der chorioallantoiden Membran des Hühnereiembryos ist ein einfach durchzuführender und trotzdem aussagekräftiger Assay. Die Aussagekraft kann durch weitergehende Untersuchungen mittels Evans-Blau- oder Tinteninjektion zur besseren Darstellung der Gefäße sowie histochemische und molekularbiologische Untersuchungen an explantierten CAM nach Behandlung erhöht werden. Die genannten Untersuchungen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden. Eine Bestätigung des proangiogenen Effekts von CPX sollte mittels weiterer etablierter Angiogenese-Assays (z. B. Matrigel- oder Kornealmodell) sowie zudem in humanen Hautmodellen (z. B. CellSystems® Advanced Skin Test-2000) erfolgen, um den Effekt zu sichern sowie die Übertragbarkeit auf mögliche Einsatzgebiete am Menschen, beispielsweise in der Versorgung chronischer Wunden oder von Verbrennungen, zu zeigen. Wir halten unsere Ergebnisse in der CAM daher für eine Grundlage für weitergehende Experimente.

#### **4.1.1. CPX im Vergleich zu anderen eisenchelierenden Substanzen**

Grundsätzlich ist für Eisenchelatoren eine Induktion von HIF-1 $\alpha$  bekannt (53, Abb. 2, 201). Diese wird durch CPX schon bei einer etwa 10fach geringeren Konzentration ausgelöst. Wir führen die höhere Potenz des CPX im Vergleich zu DFX und Dipyridyl zum einen auf seine höhere Lipophilie zurück. CPX vermag in der Applikationsform eines Lacks sogar die Nagelplatte zu überwinden (31, 93),

wohingegen DFX aufgrund eines niedrigen Verteilungskoeffizienten kaum intrazelluläres Eisen zu mobilisieren vermag (125, 149). Es konnte zum anderen gezeigt werden, dass die Eisenaffinität des CPX mindestens ebenso hoch ist wie die des DFX (118). Die höhere Effektivität des CPX im Vergleich zu Dipyridyl lässt sich nicht allein durch eine leichtere Überwindung der Zellmembran erklären, da auch Dipyridyl eine äußerst lipophile Substanz ist (149), so dass bei CPX ein weiterer Faktor, möglicherweise eine außergewöhnlich hohe Eisenaffinität oder eine direkte Beeinflussung der Prolyl-4-hydroxylase, anzunehmen ist. Bei einer Konzentration von 16  $\mu\text{M}$  könnte durch das bidentate CPX der chelierbare intrazelluläre Eisenpool von 3 – 6  $\mu\text{M}$  (148, 149) vollständig cheliiert werden, wenn man eine komplette Penetration nach intrazellulär voraussetzt.

Von Bedeutung ist ferner, dass die therapeutisch topisch eingesetzte CPX-Konzentration in der Größenordnung der von uns *in vivo* im CAM-Assay eingesetzten Konzentration liegt. Die im Handel erhältliche 1%ige Creme entspricht bei einer Molmasse des CPX von 170 g/mol einer Konzentration von 60 mM.

#### 4.1.2. CPX und Angiogeneseinduktion

Die Induktion einer therapeutischen Angiogenese kann bei vielen Krankheitsbildern ein wünschenswertes Ziel sein. Die prinzipielle Möglichkeit einer VEGF-Gentherapie wurde bereits in verschiedenen Modellen gezeigt (68, 170). Dabei wurde deutlich, dass VEGF allein häufig zur Bildung instabiler und nicht funktionsfähiger Gefäße, sogenannter leaky vessels, führt (11, 36). Ein Weg, diesen speziellen VEGF-Effekt zu umgehen, den eine VEGF-„Monotherapie“ mit sich bringt, könnte der Rückgriff auf die HIF-1 Achse sein, derer sich der Organismus auch unter physiologischen Konditionen bedient, sobald ein Gewebeareal hypoxisch wird. Eine HIF-1 $\alpha$ -Gentherapie kann prinzipiell erfolgreich sein (71). Sicherer und billiger erscheint aber der Verzicht auf den Einsatz genetisch manipulierter Vektoren durch den Gebrauch pharmakologisch wirksamer und klinisch erprobter Substanzen, die HIF-1 $\alpha$  stabilisieren können.

Zu diesen gehört, wie erst kürzlich beschrieben, das als Antihypertensivum bekannte Hydralazin (97), das *in vivo* im murinen Modell sowohl die Gewebe-HIF-1 $\alpha$  und -VEGF-Konzentration erhöht als auch eine Angiogenese in subkutan

implantierten Schwämmchen induziert. Der von Knowles *et al.* gewählte systemische Applikationsweg kann bei Multigefäßerkrankungen (z. B. der diabetischen Neuropathie (170)) oder nicht oberflächennahen Gefäßen wie den Koronarien Erfolg versprechend sein. In vielen Fällen, z. B. bei chronischen Wunden oder nach Transplantation avaskulärer, artifizierender Haut nach Verbrennungen, wird ein gezielter und v. a. räumlich begrenzter Einsatz von proangiogenen Pharmaka vorzuziehen sein. CPX ist topisch in verschiedenen Galeniken einsetzbar und hat darüber hinaus den Vorteil einer gleichzeitigen fungiziden, sporoziden, antibakteriellen und antiinflammatorischen Begleitkomponente ohne bekannte systemische Nebenwirkungen bei Einsatz im therapeutischen Bereich. In seiner Eigenschaft als Eisenchelator bindet es das von chronischen Wunden sezernierte Eisen(III), das damit nicht mehr in einer Fenton-Reaktion zur Bildung gewebescheidigender Sauerstoffradikale und damit zur Chronifizierung der Inflammation führen kann. Für Zellulose-gekoppeltes und in einer Wundauflage appliziertes DFX konnte bereits eine Reduktion der Eisenkonzentration, der Matrixbestandteile abbauenden Metalloproteinase MMP-1 sowie der gewebetoxischen Lipidperoxidation von humanen dermalen Fibroblasten gezeigt werden (209). Insgesamt halten wir den Einsatz von CPX zur topischen Induktion von Angiogenese für sehr viel versprechend und hoffen, mit der vorliegenden Arbeit eine Grundlage für tierexperimentelle und klinische Studien geschaffen zu haben. Die vorliegende Arbeit hat die Sanofi Aventis Gruppe inzwischen dazu veranlasst, den Patentschutz von CPX und seinem Derivat Rilopirox auf die Indikation der Angiogeneseinduktion bzw. Wundheilungsstörung weltweit zu erneuern (The Use of Hydroxypyridone-Derivatives in Wound Healing. Wenger R.H., Kraemer K. and Bohn M. European Patent Office application number: 02 008902.5-2112).

#### **4.1.3. Die Wirkung von CPX auf den Zellzyklus**

Eisenchelatoren synchronisieren und inhibieren den Zellzyklus an der Grenze zwischen G1- und S-Phase und senken damit die zelluläre Proliferationsrate (75, 111, 114). Die höhere Effektivität des CPX im Vergleich zu DFX und Dipyridyl in Bezug auf die HIF-1 $\alpha$  Aktivität lässt vermuten, dass auch die Inhibierung des Zellzyklus durch CPX effektiver wäre. Unsere Ergebnisse zeigen hingegen, dass

die zelluläre Proliferation unter allen drei Eisenchelatoren gleichmäßig auf etwa 50% der Normalkontrollen absinkt, ohne dass im getesteten Konzentrationsbereich Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen deutlich würden. Das Ausmaß der Proliferationshemmung steht dabei in keinem direkten Zusammenhang mit der HIF-1 Aktivität, wie wir ebenfalls belegen konnten.

Der zugrunde liegende Mechanismus der Proliferationshemmung ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch wird seit Jahren die Hemmung der Ribonukleotidreduktase zur Erklärung herangezogen, einem Eisen-abhängigen Enzym. Neuere Arbeiten zeigen jetzt auch die Notwendigkeit von HIF-1 für einen Zellzyklusarrest unter hypoxischen Bedingungen (54), für den kürzlich die funktionelle Antagonisierung von Myc am p21cip1-Promotor verantwortlich gemacht werden konnte (102). Bei p21cip1 handelt es sich um einen Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor, der den G1-/S-Übergang kontrolliert. Unter HIF-1 abhängigen und unabhängigen Bedingungen wird durch verschiedene Eisenchelatoren außerdem das N-myc downstream regulated gene 1 (NdrG1) induziert, das ebenfalls eine Wachstumshemmung sowie eine Tumorsuppression bewirkt (111), sowie sequentiell die Caspasen 9, 3 und 8 (59) und die proapoptotischen Proteine PLAGL2 und Nip3 (133) induziert. Über die genaue Bedeutung von HIF-1 $\alpha$  für das Zellüberleben besteht bislang allerdings kein Einvernehmen. Andere Publikationen zeigen einen antiapoptotischen Einfluss von HIF-1 $\alpha$  in humanen Endothel-Zellen (213), der teilweise über die Inhibierung von Bid und Bax vermittelt sein dürfte (38).

Im Kontext der Proliferationshemmung durch Eisenchelatoren wird häufig deren Nutzen in der Tumorbehandlung diskutiert, mit besonderem Augenmerk gerade auf die hoch lipophilen Vertreter der Gruppe (111, 125). In der Tat laufen derzeit bereits 13 Phase I und Phase II Studien ([www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov), Zugriff vom 06.12.2004) mit dem Eisenchelator 3-Aminopyridin-2-carboxaldehyd (3-AP, Triapine®). Im Mausmodell mit Neuroblastom-Xenografts ließ sich allerdings kein inhibierender Effekt von DFX auf das Tumorwachstum nachweisen (172).

In diesem Zusammenhang wurde kürzlich ein antiangiogener Effekt für CPX beschrieben (24), der den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit unmittelbar zu widersprechen scheint. Die Arbeitsgruppe zeigte die Inhibierung der Eisen-koordinierenden Enzyme Deoxyhypusinhydroxylase und Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase durch Eisenchelatoren sowie eine Inhibierung des Zellwachstums

von humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen. Die Effektivität der getesteten Chelatoren entsprach der von uns gemessenen in Bezug auf HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung, nämlich in absteigender Reihenfolge CPX, DFX, Dipyridyl und Deferiprone. Darüber hinaus wurde in Angiogenese-Assays in Matrigel sowie der Huhn-Aorta ein „starker antiangiogener Effekt“ beschrieben, der die Autoren in CPX einen „exzellenten Kandidaten für klinische Studien als topisches Agens, allein und in Kombination, für die Behandlung oberflächlicher, solider Tumoren wie dem Kaposi Sarkom, der Mycosis fungoides sowie des Melanoms“ sehen ließ (24). Die eingesetzte Konzentration des CPX lag zwischen 10 und 30  $\mu$ M und entsprach damit etwa den von uns eingesetzten 16  $\mu$ M. Bemerkenswerterweise wurden von der Gruppe allerdings in allen Assays die Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und hEGF über das Medium supplementiert, so dass der Effekt der VEGF-Induktion über CPX nicht untersucht werden konnte und die Wirkung des Eisenchelators damit ausschließlich auf den proliferationshemmenden Effekt beschränkt wurde. Wir äußerten daher gegenüber dem Editor der Zeitschrift „International Journal of Cancer“ unsere Bedenken bezüglich des Vorschlags, CPX unkritisch in der Behandlung hochvaskulärer Tumoren wie des Kaposi Sarkoms (KS) einzusetzen (119), da dieses vermutlich überdies von VEGF-abhängigen Endothelzellen ausgeht. In unserem Versuchsansatz, der sowohl den Einfluss der Proliferationshemmung als auch den der VEGF-Induktion untersucht, konnten wir einen proangiogenen Effekt von CPX zeigen. Unterschiedliche Effekte von CPX zwischen *in vitro* und *in vivo*-Modellen fanden auch andere Autoren: Simonart *et al.* (179) beschrieben zunächst einen hemmenden Einfluss von Eisenchelatoren *in vitro* auf KS-Zellen, mussten sich aber nach Durchführung von *in vivo* Experimenten im Mausmodell korrigieren, in dem KS-Zellen bzw. Kaposi-Sarkom-Transplantate unter systemischer Chelatorgabe sogar proliferierten (180, 181). In diesem Zusammenhang scheint bemerkenswert, dass das KS-auslösende humane Herpesvirus 8 (HHV-8) zur Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  Protein führt, obwohl die zelluläre Proteinproduktion durch die Virusinfektion insgesamt drastisch gedrosselt wird (52). HHV-8 scheint darüber hinaus über ein im Virusgenom enthaltenes HRE direkt über HIF-1  $\alpha$  den lytischen Zyklus zu aktivieren (64). Überdies führen das Epstein-Barr-Virus (200) und das in immunkompromittierten Wirten eine tumoröse Angiomatose auslösende Bakterium *Barthoneilla henselae* (158) zu einer Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ . Bei allen

Mikroorganismen handelt es sich um proliferationsbeschleunigende und potentiell onkogene Mikroorganismen, und es ist gut vorstellbar, dass HIF-1 hier eine kausale Rolle spielt.

Zu bedenken wäre die Möglichkeit eines konzentrationsabhängigen Effektes der Eisenchelatoren, die bei niedrigen Konzentrationen den proangiogenen Phänotyp, bei höherer Konzentration den proliferationshemmenden Phänotyp bewirken könnten ((112), in direkter Beantwortung unseres Briefes an den Herausgeber). In einer großen multizentrischen Studie zur Beurteilung des kardioprotektiven Effektes des Eisenchelators Dexrazoxan bei 101 Kindern unter Anthrazyklintherapie bei akuter lymphoblastischer Leukämie ließ sich unter 300 mg/m<sup>2</sup> zumindest nach 2,5 Jahren kein Unterschied im ereignisfreien Überleben und damit keine Benachteiligung der Chelatorgruppe erkennen. Die Autoren geben aber selbst die relativ kurze Nachbeobachtungszeit zu bedenken (120). In der Tat waren Eisenchelatoren in der Therapie der Hämochromatose oder der sekundären Eisenüberladung bislang nicht mit Krankheitsbildern vergesellschaftet, die auf eine Neoangiogenese zurückzuführen wären. Es ist aber anzumerken, dass der bislang zum Einsatz kommende Eisenchelator DFX ein sehr hydrophiles Molekül ist, das in der eingesetzten Dosierung mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließlich eine extrazelluläre Wirkung entfaltet.

Nicht aus dem Weg räumen lässt sich außerdem die Sorge, dass sämtliche o. a. Studien, die eine Wachstumshemmung von Tumorzellen zeigen, bislang lediglich auf Zellkulturebene durchgeführt wurden und damit Gefahr laufen, die weiteren HIF-1 $\alpha$  abhängigen Effekte auf Gewebeebene zu vernachlässigen, z. B. die Schaffung eines metastasierungsfreudigeren Phänotyps (99), die Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika (38, 189, 196) sowie die Unterstützung des anaeroben Stoffwechsels der Tumorzellen über den Warburg-Effekt (für eine Übersicht siehe (49)). Dominant-negative HIF-1 $\alpha$  Zellen wachsen im *in vivo* Mausmodell zu signifikant kleineren Magenkarzinomen (186).

In der Zusammenschau der Daten halten wir den Einsatz von Eisenchelatoren in der Tumorthherapie bislang für fragwürdig. Unseres Wissens gibt es bisher lediglich eine Studie, die eine Reduktion des Tumolvolumens im Mausmodell zeigt (214). Wir würden vor der Durchführung von Phase II-Studien für eine genauere tierexperimentelle Evaluation votieren.

#### **4.2. Beeinflussung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 durch das Übergangsmetall Kupfer**

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass das Übergangsmetall Kupfer in Form seines zweiwertigen Kations ( $\text{Cu}^{2+}$ ) zu einer funktionellen Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  Zielgenen im Reporterassay führt (Abb. 2). Darüber hinaus wiesen wir die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins (Abb. 2) sowie seine nukleäre Akkumulation (Abb. 2) unter der Behandlung mit Kupfer nach. Nach Abschluss der experimentellen Arbeit an dieser Dissertation wurde durch unsere Arbeitsgruppe außerdem die Transkription der HIF-1 $\alpha$  Zielgene Coeruloplasmin (Cp), VEGF und Glut-1 im Northern Blot bzw. in der real time RT-PCR sowie die funktionelle Aktivierung des Cp-Promotors durch Kupfer gezeigt. Mit dem Nachweis der Inhibierung der Prolyl-4-hydroxylasen PHD-1, PHD-2 und PHD-3 durch  $\text{Cu}^{2+}$  *in vitro* wurde eine mögliche Ursache dieser Phänomene aufgezeigt (128).

Für zweiwertige Kationen aus der Gruppe der Übergangsmetalle ist seit langem eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  bekannt. Mit unserem Nachweis reiht sich Kupfer als ein weiterer Vertreter in diese Gruppe ein, der – wie zu zeigen sein wird – eine herausragende Rolle spielen könnte. Eine Verbindung zwischen Übergangsmetallen und durch Hypoxie ausgelöste physiologische Veränderungen vermutete man erstmalig mit der Feststellung, dass Kobaltionen eine Polyglobulie (z. B. (143)) auslösen. 1988 zeigte die Arbeitsgruppe von Bunn *et al.* in einem wegweisenden Aufsatz als Ursache die Stimulation des Erythropoietin-Gens durch Kobalt und Nickel, in geringerem Ausmaß auch durch Mangan (55). Weitere Übergangsmetalle mit ähnlichem Effekt sind mit Angabe der Literaturstellen eingangs beschrieben worden. Der Nachweis einer Induktion von EPO- und VEGF-mRNA durch Kupfer schlug im *RNase protection assay* in humanen Hep3B Hepatomzellen zunächst fehl (53). Allerdings wird in der Arbeit keine Dosierung des Kupfers angegeben. Retrospektiv lassen sich aber möglicherweise verschiedene durch Kupfer ausgelöste Phänomene über die HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung erklären.

## **4.2.1. Mögliche physiologische Funktionen der HIF-1 $\alpha$ Stabilisierung durch Kupfer**

### **4.2.1.1. Kupfer und Anämie**

Anekdotische, später auch experimentell belegbare Evidenz zur Förderung der Blutbildung durch Kupfer gibt es seit dem 19. Jahrhundert. „Chlorotische“, d.h. anämie Patientinnen konnten häufig erfolgreich mit Kupfer- und Eisensupplementation behandelt werden, wobei bemerkenswerterweise die Behandlung mit Eisen allein oft fehlschlug (für eine Übersicht siehe (44, 117)). Auch später wurde wiederholt gezeigt, dass bei Ratten und Schweinen unter Kupfer-defizienter Ernährung eine Anämie nicht durch alleinige Eisengaben, sehr wohl aber durch gleichzeitige Kupfergaben zu beheben war (66, 150). In der heutigen Zeit sieht man nur noch sehr selten Kupfermangelzustände bei Neugeborenen, unter totaler parenteraler Ernährung oder bei Zinkintoxikation (195). Eine Ursache für die Kupferwirkung ließ sich bislang nicht sicher ergründen, doch wird v. a. auch über eine durch Kupfer verbesserte Eisenaufnahme und -utilisation spekuliert. Kupfer kann vermittels der Induktion von HIF-1 $\alpha$  und konsekutiv von EPO, Transferrin und seinem Rezeptor zur Behebung einer Anämie beitragen. Über das Modell der HIF-1 Induktion durch Cu<sup>2+</sup> nur unzureichend geklärt ist aber die Frage, warum es für die Blutbildung unter anämischen Bedingungen noch eines zusätzlichen externen HIF-1 Stimulus' bedürfte.

### **4.2.1.2. Kupfer und Angiogenese**

Kupfer gilt für angiogene Prozesse sowohl als notwendiger als auch als hinreichender Faktor. Cu<sup>2+</sup>, in Form seines Sulfats, an Proteine oder Cp gebunden und in Elvax-Plättchen appliziert, löst in der Kaninchen-Kornea eine Neovaskularisation aus, wobei die Wahrscheinlichkeit einer inflammatorischen Genese durch histologische Beurteilung (152) und Koinkubation mit Dexamethason oder Flurbiprofen (147) minimiert wird. Humane Endothelzellen aus Nabelschnurarterie und -vene, nicht aber dermale Fibroblasten oder glatte Muskelzellen proliferieren *in vitro* unter Kupferbehandlung mit der gleichen Konzentrationsabhängigkeit wie in unseren Versuchen (76). Der vermittelnde humorale Faktor ist mit hoher Wahrscheinlichkeit VEGF, wie sich vor kurzem



durch den Nachweis der Induktion des Wachstumsfaktors in immortalisierten humanen Keratinozyten nach Kupfergabe, in etwas geringerer Konzentration als in unserem Ansatz, herausstellte (176). Die Gruppe konnte gleichzeitig außerdem zeigen, dass unter Behandlung mit Kupfersulfat dermale Exzisionswunden im Mausmodell schneller heilen. Die Beispiele zeigen, dass  $\text{Cu}^{2+}$  ein Auslöser von Angiogenese sein kann. Andererseits gilt Kupfer als notwendiger Faktor für einen proangiogenen Phänotyp: Ein potenter angiogener Stimulus, PGE<sub>1</sub>, bleibt nach Kupfer-defizienter Diät im o. a. Modell der Kaninchen-Kornea wirkungslos (217), und die Vaskularisierung von Hirntumoren ist im Kaninchen- und Rattenmodell nach Kupfer-defizienter Diät und zusätzlicher Kupfer-chelierender Therapie mit Penicillamin geringer ausgeprägt (8). Die Behandlung von Her2/neu transgenen Mäusen, denen Brustkrebs-Xenografts implantiert wurden, mit dem Kupferchelator Tetrathiomolybdat (TTM) drosselt sowohl Tumorangiogenese als auch Tumorstadium (146). Diese Beobachtungen haben zu ersten klinischen Studien mit TTM zur Behandlung maligner Tumoren geführt, die von den Autoren als viel versprechend gewertet werden, bislang allerdings als nicht kontrollierte und nicht verblindete Phase I und II-Studien noch wenig aussagekräftig sind (9, 156). In den Formenkreis der mit Kupfer und Angiogenese vergesellschafteten Erkrankungen gehört auch die rheumatoide Arthritis. Wiederum korreliert die ätiopathogenetisch für die Erkrankung mit verantwortliche Angiogenese mit erhöhten Serum-, Urin- und Synovialsiegeln von Kupfer, und auch in diesem Fall wird eine Behandlung mit Kupferchelatoren (Penicillamin, Trientine, TTM) erfolgreich angewendet. Unsere eigenen, nicht gezeigten Versuche zur Inhibierung des Kupfereffekts im Reporterassay durch Penicillamin zeigten eine Reduktion der HIF-1 $\alpha$  abhängigen Luziferaseinduktion um etwa 50% in gleichzeitig mit Kupfer stimulierten HRCHO5-Zellen, sind allerdings noch nicht ausreichend validiert. Es bleibt außerdem kritisch zu hinterfragen, ob die erhöhten Kupferspiegel in den o. a. Erkrankungen möglicherweise nur als Epiphänomen einer Induktion des Akut-Phase-Proteins Cp zu werten sind. Festzuhalten ist, dass die durch Kupfergabe hinreichend begründete Angiogenese vermutlich über HIF-1 $\alpha$  vermittelt wird. Die Notwendigkeit von Kupfer für die Angiogenese lässt sich allein aus unseren Beobachtungen nicht erklären.

#### **4.2.1.3. Kupfer und Coeruloplasmin und ihre Verbindung zum Eisenstoffwechsel**

Über die Regulation des im Kupferstoffwechsel wichtigen, v. a. aber auch als Ferrooxidase im Eisenstoffwechsel eminenten Coeruloplasmins (136) gibt es zurzeit widersprüchliche Daten. Als Akut-Phase-Protein steigt sein Serumspiegel unter zellulären Stressbedingungen, z. B. unter hohen Endotoxin- oder Interleukin-1 und -6-Konzentrationen. Die Beeinflussung des Cp-Spiegels über Kupfer im Sinne eines feedback-Mechanismus wird kontrovers diskutiert, d.h. es gibt sowohl Berichte über eine positive Regulation auf mRNA-Ebene (27) und Protein-Ebene (159, bedingt auch (51)) als auch solche, die keine wechselseitige Beeinflussung feststellen konnten (139, 165). Die Regulation über HIF-1 $\alpha$  gilt allerdings als sicher (137) und wird durch unsere Arbeit sowohl *in vitro* (Abb. 2) als auch *in vivo* bestätigt: Bei Mäusen lassen sich nach dreitägiger Hypoxie bei einer Sauerstoffkonzentration von 7,5% signifikant erhöhte Cp-Spiegel in der Leber nachweisen (128). Es besteht über HIF-1 $\alpha$  die Möglichkeit, dass freies Kupfer seinen Serumspiegel über den seines Bindungsproteins reguliert. Damit eröffnet sich eine weitere, spannende Perspektive bezüglich der Verwobenheit von Kupfer- und Eisenstoffwechsel untereinander und mit bzw. über HIF-1 $\alpha$ .

Zusammenfassend können wir für die diskutierten Kupfereffekte mit der Erkenntnis, dass HIF-1 $\alpha$  durch Kupfer stabilisiert wird, ein neues Erklärungsmodell anbieten.

#### **4.2.2. Die Kupferkonzentration im menschlichen Serum liegt im relevanten Bereich für die Beeinflussung des HIF-1 $\alpha$ Systems**

Kürzlich wurde nun auch von einer zweiten Gruppe der Nachweis geführt, dass Kupfer HIF-1 $\alpha$  *in vivo* in Leber und Kiemen der Regenbogenforelle stabilisieren kann (197). van Heerden und Mitarbeiter interessierte dies v. a. von einem ökotoxikologischen Standpunkt aus. Die eingesetzte Kupferkonzentration ist interessanterweise im Verhältnis zu der unseren fast 100fach geringer und liegt bei 1,65  $\mu$ M, was uns das Augenmerk auf die physiologische Relevanz unserer Daten richten lässt. Der endogene Kupferspiegel variiert, von Autor zu Autor und je nach Spezies und Nachweismethode, zwischen 1,26  $\mu$ M („locker gebundenes

Kupfer im Blutserum der Taube“, (205)), und 13-23  $\mu\text{M}$  (totales Serumkupfer im menschlichen Blutserum nach (121)) und liegt damit deutlich unter der Konzentration, unter der wir einen HIF-1 $\alpha$  stabilisierenden Effekt sahen. Jedoch, (i) steigt der Kupferspiegel im Blut unter verschiedenen Bedingungen stark an, v. a. bei akuten Blutverlusten oder einer Anämie anderer Genese, auch bei Inflammation und malignen Erkrankungen (für eine Übersicht (44)). (ii) Die durch Kupfer ausgelöste Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  hängt möglicherweise eher von der relativen Steigerung des Kupferspiegels als von seiner absoluten Höhe ab. Viele o. a. Beispiele zeigen einen Einfluss von Kupfer vor allem dann, wenn vor der Intervention eine Kupfer-Deprivation stattgefunden hatte. Auch van Heerden *et al.* (197) hielten ihre Versuchstiere vor der Kupfer-Exposition in kupferfreiem Wasser. (iii) Wir bestimmten die effektive Kupferdosis vorwiegend in Zellkulturexperimenten. Die Bestimmung der Hemmkonzentration der PHD-3 zeigt im zellfreien Versuchsansatz eine  $\text{IC}_{50}$  von ca. 2,3  $\mu\text{M}$ . Auch PHD-1 und PHD-2 hemmen konzentrationsabhängig stark die Prolyl-4-Hydroxylierung eines Peptids am HIF-1 $\alpha$  Pro564 (128). Diese Hemmung ist unabhängig von einer gleichzeitigen Gabe von Eisen(II) im Überschuss. Es liegt also die Annahme nahe, dass exogen zugesetztes  $\text{Cu}^{2+}$  nicht oder nur langsam die Zellmembran überwindet. Verschiedene Autoren beschreiben niedrigere effektive Kupferkonzentrationen, wenn Kupfer an kurze Proteine gebunden wird, für die eine Konsensussequenz z. B. im Falle des Albumins bereits bekannt ist. Der Tripeptid-Kupfer Komplex Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin- $\text{Cu}^{2+}$  beispielsweise induziert bereits im Bereich von 1  $\mu\text{M}$  Matrixmetalloproteinase-2-mRNA und deren Enzymaktivität in Fibroblasten (178) und wurde auch 1982 von Raju *et al.* im o. a. Modell in der Rattenkornea verwendet (152). (iv) Als Wirkprinzip der Übergangsmetalle ist lange Zeit ihre mögliche Substitution des Eisens in der PHD und damit deren Inhibition angesehen worden. In unseren Versuchen war die Inhibierung der PHD-3 durch Kupfer auch unter gleichzeitiger Eisenzugabe im Überschuss stabil, was diese Erklärung unwahrscheinlich macht. In einem kürzlich erschienenen Artikel beschreiben Yuan *et al.* (215) eine effektive Konzentration zur HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung von 50 bis 100  $\mu\text{M}$  für Kobaltchlorid, wenn dies nach Hydroxylierung des Pro564 zugegeben wird. Zusätzlich postulieren die Autoren nun einen mittels Massenspektroskopie nachgewiesenen Mechanismus der HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung durch direkte Bindung von Kobalt an einen Bereich der ODD zwischen den

Aminosäuren 523 bis 539, das dann vermutlich sterisch die Bindung der Prolyl-4-hydroxylase behindert. Wenn Kobalt bereits während der *in vitro* Translation von HIF-1 $\alpha$  vor der PHD zugegeben wird, reicht eine Hemmkonzentration von 0,5  $\mu$ M. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass endogenes Kupfer wahrscheinlich in physiologisch relevanter Konzentration in Bezug auf die von uns gezeigte Beeinflussung des HIF-1 $\alpha$  Signaltransduktionsweges vorliegt, und damit unter den sonstigen HIF-1 $\alpha$  beeinflussenden Übergangsmetallen eine besondere Rolle einnimmt.

#### 4.2.3. Schlussbemerkungen zur HIF-1 $\alpha$ Stimulation durch Kupfer

(i) Mit Kupfer haben wir erstmals eine Möglichkeit gefunden, HIF-1 $\alpha$  synergistisch zu einer hypoxischen Induktion zu beeinflussen. In HRB5-Zellen lässt sich die Luziferase-Aktivität durch Kupfer oder 1% O<sub>2</sub> allein auf das 10 bis 15fache steigern. Eine Inkubation unter 1% O<sub>2</sub> und gleichzeitiger Kupfergabe zeigt die gleiche konzentrationsabhängige Steigerung der HIF-1 $\alpha$  induzierten Reporterfunktion wie unter 21% O<sub>2</sub> (Abb. 2). Das bedeutet eine weitere Verzehnfachung des Effektes. Im Western-Blot aus HRB5-Zellen ist ebenfalls unter Kupferexposition allein eine der hypoxischen Induktion vergleichbare Bandenstärke erkennbar, die unter gemeinsamer Inkubation nochmals deutlich zunimmt (Abb. 2). Die Wirkung der übrigen Übergangsmetalle sowie auch die der Eisenchelatoren ist in der Literatur (z. B. (55)) wie auch in unseren Händen (Daten für CoCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CPX, DFX, Dipyritydyl nicht gezeigt) allenfalls als additiv anzusehen. Wir konnten zeigen, dass Kupfer die PHD-1, -2 und -3 hemmt, über die auch das hypoxische Signal transduziert wird. Unsere Erkenntnisse lassen vermuten, dass Kupfer sich noch eines weiteren Weges in der Beeinflussung dieses Systems bedient. Die Beeinflussung der PI3- sowie der MAP-Kinase-Wege scheinen dabei keine Rolle zu spielen (128). Damit wird die Hypothese der physiologischen Relevanz von Kupfer für die Beeinflussung des HIF-1 Systems gestärkt.

(ii) Es fällt auf, dass Kupfer nicht in allen Zellen zu einer HIF-1 $\alpha$  Induktion befähigt scheint. Uns gelang dieser Nachweis für die humane Hepatom-Zelllinie Hep3B und deren Subklon HRB5, für die humane Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa sowie in

einem Subklon chinesischer Hamsterovar-Zellen, HRCHO5. In HRG1-Zellen, die nach Transfektion und klonaler Selektion aus HepG2-Zellen hervorgegangen waren, sind die Ergebnisse im Reporter-gen-Assay inkonsistent (Abb. 2). Allenfalls lässt sich eine sehr leichte Induktion erkennen, die in keinem Verhältnis zu der in HRB5-Zellen steht. Die fehlende Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  in HepG2-Zellen unter Kupferbehandlung passt zu der fehlenden Induzierbarkeit ihres Subklons HRG1 im Reporter-gen-assay.

In Westernblots und mittels Immunfluoreszenz in HRG1- und HepG2-Zellen schließlich konnten wir bei guter hypoxischer Induzierbarkeit von HIF-1  $\alpha$  keinen Einfluss von Kupfer nachweisen. Auch die Literaturangaben sind widersprüchlich: Gleadle vermochte es auch in Hep3B-Zellen nicht, die HIF-1 $\alpha$ -Zielgene VEGF und EPO nachzuweisen (53). Der Nachweis der Coeruloplasmin-mRNA unter Kupfereinfluss hingegen gelang in HepG2-Zellen (27). Über die Ursache ist lediglich zu spekulieren: Möglicherweise ist die vorherige Kupferversorgung der Zellen von Belang. Gerade in Leberzellen ist eine Kupferspeicherung in sehr unterschiedlichem Ausmaß möglich, zumal es sich um immortalisierte bzw. Karzinom-Zelllinien handelt. Zudem ist eine unterschiedliche Aufnahme des Kupfers in die Zelle über verschiedene Populationen von Kupferkanälen (Cu<sup>2+</sup>-ATPasen) denkbar.

(iii) Ein hemmender Einfluss von Zinkchlorid (ZnCl<sub>2</sub>) auf die stimulierte EPO-Synthese ist bekannt (32). ZnCl<sub>2</sub> induziert zwar die Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ , führt aber gleichzeitig durch Inhibierung der nukleären Translokation von HIF-1 $\beta$  zur Inaktivierung des HIF-1-Systems (22). Auch in unseren Versuchen scheint sich eine Hemmung des Kupfereffekts auf HIF-1 $\alpha$  durch Zink zu bestätigen, auch wenn unsere Versuche aufgrund der geringen Anzahl unabhängiger Experimente noch vorsichtig zu interpretieren sind. Da überdies hierbei nicht gleichzeitig ein MTT-Assay durchgeführt wurde, ist eine Erklärung des Effekts durch Zytotoxizität möglich.

Eine enge Verwobenheit des Stoffwechsels von Kupfer und Zink ist seit langem bekannt und dürfte am ehesten einem wechselseitigen negativen feedback entsprechen. So führt eine Zinkintoxikation über eine Erniedrigung der Serumkupferkonzentration zu einer Anämie und Neutropenie (195), und Zinkacetat sowie Zinkorotat werden seit 1997 erfolgreich zur Reduktion der

Kupferüberladung bei Patienten mit Morbus Wilson eingesetzt (65). Die bisher angebotene Erklärung war die Hemmung der intestinalen Kupferresorption durch Sequestration mittels Induktion von Metallothionein. Möglicherweise spielt aber auch die Hemmung der potentiell gefährlichen HIF-1 $\alpha$  Induktion eine Rolle. Es finden sich nach derzeitigem Kenntnisstand allerdings keine Anhaltspunkte für einen proangiogenen Phänotyp in Leber oder Basalganglien, den Hauptablagerungsorten von Kupfer, in Patienten mit Morbus Wilson.

Zusammenfassend können wir mit der Entdeckung, dass HIF-1 $\alpha$  durch Kupfer im physiologisch relevanten Konzentrationsbereich induziert werden kann, einen möglichen Erklärungsansatz für viele unter physiologischer, pathophysiologischer und pharmakologischer Kupferexposition bekannte Effekte liefern. Am Interessantesten dürfte dabei unserer Ansicht nach die weitere Verknüpfung von Kupfer- und Eisenstoffwechsel sein (128).

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass der Eisenchelator CPX bereits in geringer, d.h. pharmakologisch relevanter Dosierung zu einer Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  führt. Wir konnten ferner zeigen, dass es unter dem Einfluss von CPX zu einer transaktivierenden Funktion von HIF-1 $\alpha$  und zur konsekutiven Transkription und Translation von sauerstoffabhängigen Genen kommt. Unter CPX kommt es in unseren Versuchen zu einer Neovaskularisation *in vivo* in der CAM, vermutlich durch das vermehrt sezernierte VEGF (118).

Wir ziehen daraus die Schlussfolgerungen, (i) dass dem CPX über seine bekannten Einsatzgebiete hinaus eine Bedeutung in der Induktion therapeutischer Angiogenese zukommt, z. B. in der Behandlung von Hauttransplantationen oder chronischer Wunden (118). (ii) Wir widersprechen aufgrund dieser Ergebnisse dem Vorschlag, Eisenchelatoren ohne weitere tierexperimentelle Prüfung in Studien zur Behandlung maligner Prozesse einzusetzen (119).

Ferner konnten wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Cu<sup>2+</sup> zu einer Stabilisierung, Transaktivierungsaktivität und nukleären Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  führt. Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte unsere Gruppe inzwischen auch die konsekutive Transkription von Coeruloplasmin *in vitro* unter dem Einfluss von Kupfer, *in vivo* auch unter dem Einfluss von Hypoxie zeigen (128). Wir ziehen daraus die Schlussfolgerung, dass über HIF-1 $\alpha$  und Coeruloplasmin eine weitere Verbindung im Stoffwechsel der Spurenelemente Kupfer und Eisen hergestellt wird. Ferner können wir mit unseren Ergebnissen zur Erklärung bereits beschriebener Kupfereffekte beitragen, wie z. B. der Auslösung einer Angiogenese unter dem Einfluss von Kupfer.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL: Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 61, 2911-2916 (2001)
- 2 Alpermann HG, Schutz E: Studies on the pharmacology and toxicology of ciclopiroxolamine. *Arzneimittelforschung* 31, 1328-1332 (1981)
- 3 Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM: An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12969-12973 (1996)
- 4 Augustin HG, Breier G: Angiogenesis: molecular mechanisms and functional interactions - 2<sup>nd</sup> Kloster Seeon Meeting of the German Priority Research Grant "Angiogenesis". *Thromb Haemost* 89, 190-197 (2003)
- 5 Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM: Functional role of p35<sup>sfj</sup>, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 13, 64-75 (1999)
- 6 Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G: Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 60, 4693-4696 (2000)
- 7 Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976)
- 8 Brem SS, Zagzag D, Tsanaclis AM, Gately S, Elkouby MP, Brien SE: Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am J Pathol* 137, 1121-1142 (1990)
- 9 Brewer GJ, Dick RD, Grover DK, LeClaire V, Tseng M, Wicha M, Pienta K, Redman BG, Jahan T, Sondak VK, Strawderman M, LeCarpentier G, Merajver SD: Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an



- anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clin Cancer Res* 6, 1-10 (2000)
- 10 Bruick RK: Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9082-9087 (2000)
- 11 Bruick RK, McKnight SL: Building better vasculature. *Genes Dev* 15, 2497-2502 (2001)
- 12 Bruick RK, McKnight SL: A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340 (2001)
- 13 Buttyan R, Chichester P, Stisser B, Matsumoto S, Ghafar MA, Levin RM: Acute intravesical infusion of a cobalt solution stimulates a hypoxia response, growth and angiogenesis in the rat bladder. *J Urol* 169, 2402-2406 (2003)
- 14 Camphausen K, Sproull M, Tantama S, Sankineni S, Scott T, Menard C, Coleman CN, Brechbiel MW: Evaluation of copper chelation agents as anti-angiogenic therapy. *Bioorg Med Chem* 11, 4287-4293 (2003)
- 15 Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M: Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF $\beta$ -3. *J Clin Invest* 105, 577-587 (2000)
- 16 Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395 (2000)
- 17 Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC: Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10, 858-864 (2004)
- 18 Chen J, Zhao S, Nakada K, Kuge Y, Tamaki N, Okada F, Wang J, Shindo M, Higashino F, Takeda K, Asaka M, Katoh H, Sugiyama T, Hosokawa M, Kobayashi M: Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. *Am J Pathol* 162, 1283-1291 (2003)
- 19 Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159 (1987)

- 20 Chong TW, Horwitz LD, Moore JW, Sowter HM, Harris AL: A mycobacterial iron chelator, desferri-exochelin, induces hypoxia-inducible factors 1 and 2, NIP3, and vascular endothelial growth factor in cancer cell lines. *Cancer Res* 62, 6924-6927 (2002)
- 21 Christen HR: *Chemie*. 12. Auflage, S. 61, Diesterweg Verlag, Frankfurt am Main (1984)
- 22 Chun YS, Choi E, Kim GT, Lee MJ, Lee SE, Kim MS, Park JW: Zinc induces the accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ , but inhibits the nuclear translocation of HIF-1 $\beta$ , causing HIF-1 inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 652-656 (2000)
- 23 Chun YS, Hyun JY, Kwak YG, Kim IS, Kim CH, Choi E, Kim MS, Park JW: Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem J* 370, 149-157 (2003)
- 24 Clement PM, Hanauske-Abel HM, Wolff EC, Kleinman HK, Park MH: The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 100, 491-498 (2002)
- 25 Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F: Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J Biol Chem* 278, 46230-46240 (2003)
- 26 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: HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112, 645-657 (2003)
- 27 Daffada AA, Young SP: Coordinated regulation of ceruloplasmin and metallothionein mRNA by interleukin-1 and copper in HepG2 cells. *FEBS Lett* 457, 214-218 (1999)
- 28 Damert A, Ikeda E, Risau W: Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J* 327, 419-423 (1997)
- 29 Dann CE 3<sup>rd</sup>, Bruick RK, Deisenhofer J: Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the

- hypoxic response pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15351-15356 (2002)
- 30 Deodato B, Arsic N, Zentilin L, Galeano M, Santoro D, Torre V, Altavilla D, Valdembri D, Bussolino F, Squadrito F, Giacca M: Recombinant AAV vector encoding human VEGF165 enhances wound healing. *Gene Ther* 9, 777-785 (2002)
- 31 Dittmar W, Grau W, Raether W, Schrinner E, Wagner WH: Microbiological laboratory studies with ciclopiroxolamine. *Arzneimittelforschung* 31, 1317-1322 (1981)
- 32 Dittmer J, Bauer C: Inhibitory effect of zinc on stimulated erythropoietin synthesis in HepG2 cells. *Biochem J* 285, 113-116 (1992)
- 33 Ebert BL, Gleadle JM, O'Rourke JF, Bartlett SM, Poulton J, Ratcliffe PJ: Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. *Biochem J* 313, 809-814 (1996)
- 34 Eckhart AD, Yang N, Xin X, Faber JE: Characterization of the  $\alpha 1B$ -adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9487-9492 (1997)
- 35 Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, Arbeit JM: Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 60, 6189-6195 (2000)
- 36 Elson DA, Thurston G, Huang LE, Ginzinger DG, McDonald DM, Johnson RS, Arbeit JM: Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Genes Dev* 15, 2520-2532 (2001)
- 37 Epstein AC, 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: *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43-54 (2001)
- 38 Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ, Dive C: Hypoxia-mediated down-

- regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* 24, 2875-2889 (2004)
- 39 Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ: Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 270, 21021-21027 (1995)
- 40 Folkman J: Angiogenese. In: Dietel M, Dudenhausen J, Suttrop N: *Harrisons Innere Medizin*, 15. Auflage, S. 575-587, ABW-Wissenschaftsverlag (2003)
- 41 Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186 (1971)
- 42 Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-4613 (1996)
- 43 Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, Symes J, DeLaria GA, Tyner JJ, Schaer GL, March R, Snell RJ, Henry TD, Van Camp J, Lopez JJ, Richenbacher W, Isner JM, Schatz RA: One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid desoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol* 92, 436-439 (2003)
- 44 Fox PL: The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship. *Biometals* 16, 9-40 (2003)
- 45 Fukuda R, Kelly B, Semenza GL: Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res* 63, 2330-2334 (2003)
- 46 Galeano M, Deodato B, Altavilla D, Squadrito G, Seminara P, Marini H, Stagno d'Alcontres F, Colonna M, Calo M, Lo Cascio P, Torre V, Giacca M, Venuti FS, Squadrito F: Effect of recombinant adeno-associated virus vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer on wound healing after burn injury. *Crit Care Med* 31, 1017-1025 (2003)
- 47 Galson DL, Tsuchiya T, Tendler DS, Huang LE, Ren Y, Ogura T, Bunn HF: The orphan receptor hepatic nuclear factor-4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene

- expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol Cell Biol* 15, 2135-2144 (1995)
- 48 Gao N, Jiang BH, Leonard SS, Corum L, Zhang Z, Roberts JR, Antonini J, Zheng JZ, Flynn DC, Castranova V, Shi X: p38 Signaling-mediated hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 277, 45041-45048 (2002)
- 49 Gatenby RA, Gillies RJ: Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891-899 (2004)
- 50 Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N: Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 60, 6253-6258 (2000)
- 51 Gitlin JD, Schroeder JJ, Lee-Ambrose LM, Cousins RJ: Mechanisms of caeruloplasmin biosynthesis in normal and copper-deficient rats. *Biochem J* 282, 835-839 (1992)
- 52 Glaunsinger B, Ganem D: Highly selective escape from KSHV-mediated host mRNA shutoff and its implications for viral pathogenesis. *J Exp Med* 200, 391-398 (2004)
- 53 Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ: Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol* 268, C1362-1368 (1995)
- 54 Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS: Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 23, 359-369 (2003)
- 55 Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF: Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242, 1412-1415 (1988)
- 56 Goldwasser E, Jacobson LO, Fried W, Plzak LF: Studies on erythropoiesis. V. The effect of cobalt on the production of erythropoietin. *Blood* 13, 55-60 (1958)
- 57 Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R: Thrombin activates the hypoxia-

- inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 89, 47-54 (2001)
- 58 Graven KK, Yu Q, Pan D, Roncarati JS, Farber HW: Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta* 1447, 208-218 (1999)
- 59 Greene BT, Thorburn J, Willingham MC, Thorburn A, Planalp RP, Brechbiel MW, Jennings-Gee J, Wilkinson Jt, Torti FM, Torti SV: Activation of caspase pathways during iron chelator-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 277, 25568-25575 (2002)
- 60 Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA: Molecular characterization and chromosomal localization of a third  $\alpha$ -class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 $\alpha$ . *Gene Expr* 7, 205-213 (1998)
- 61 Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA: The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 519-561 (2000)
- 62 Gupta AK: Ciclopirox: an overview. *Int J Dermatol* 40, 305-310 (2001)
- 63 Hansen MB, Nielsen SE, Berg K: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119, 203-210 (1989)
- 64 Haque M, Davis DA, Wang V, Widmer I, Yarchoan R: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) contains hypoxia response elements: relevance to lytic induction by hypoxia. *J Virol* 77, 6761-6768 (2003)
- 65 Harrisons Innere Medizin: Scheinberg, IH: Morbus Wilson. In: Dietel M, Dudenhausen J, Suttrop N: Harrisons Innere Medizin, 15. Auflage, S. 2477-2479, ABW-Wissenschaftsverlag (2003)
- 66 Hart EB, Steenbock H, Waddell J, Elvehjem CA: Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. (1928) Neuabdruck in *J Biol Chem* 277(34):e22 (2002)
- 67 Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A, Vanninen E, Mussalo H, Kauppila E, Simula S, Narvanen O, Rantala A, Peuhkurinen K, Nieminen MS, Laakso M, Yla-Herttuala S: Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent

- restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 107, 2677-2683 (2003)
- 68 Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER: The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107, 1359-1365 (2003)
- 69 Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ: Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 277, 26351-26355 (2002)
- 70 Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J: Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 278, 30772-30780 (2003)
- 71 Hofer T, Desbaillets I, Hopfl G, Gassmann M, Wenger RH: Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 $\alpha$  activation cascade: implications for HIF-1 $\alpha$  gene therapy. *FASEB J* 15, 2715-2717 (2001)
- 72 Hoffman BD, Hanauske-Abel HM, Flint A, Lalande M: A new class of reversible cell cycle inhibitors. *Cytometry* 12, 26-32 (1991)
- 73 Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS: VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11393-11398 (2002)
- 74 Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY: Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1  $\alpha$  by pVHL. *Nature* 417, 975-978 (2002)
- 75 Hoyes KP, Hider RC, Porter JB: Cell cycle synchronization and growth inhibition by 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators in leukemia cell lines. *Cancer Res* 52, 4591-4599 (1992)

- 76 Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA: Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 894-899 (1998)
- 77 Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 348, 370-374 (1996)
- 78 Issbrucker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler HC, Suttorp N, Clauss M: p38 MAP kinase-- a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB J* 17, 262-264 (2003)
- 79 Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr.: HIF-1 $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292, 464-468 (2001)
- 80 Iwata K, Yamaguchi H: Studies on the mechanism of antifungal action of ciclopiroxolamine/Inhibition of transmembrane transport of amino acid, K<sup>+</sup> and phosphate in *Candida albicans* cells. *Arzneimittelforschung* 31, 1323-1327 (1981)
- 81 Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL: Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Genes Dev* 12, 149-162 (1998)
- 82 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: Targeting of HIF-1 $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472 (2001)
- 83 Jain RK: Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9, 685-693 (2003)
- 84 Jasmin G, Solymoss B: Polycythemia induced in rats by intrarenal injection of nickel sulfide Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>. *Proc Soc Exp Biol Med* 148, 774-776 (1975)



- 85 Jendreyko N, Popkov M, Beerli RR, Chung J, McGavern DB, Rader C, Barbas CF, 3<sup>rd</sup>: Intradiabodies, bispecific, tetravalent antibodies for the simultaneous functional knockout of two cell surface receptors. *J Biol Chem* 278, 47812-47819 (2003)
- 86 Jeong HJ, Chung HS, Lee BR, Kim SJ, Yoo SJ, Hong SH, Kim HM: Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B activation on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 805-811 (2003)
- 87 Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW: Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111, 709-720 (2002)
- 88 Jones MK, Kawanaka H, Baatar D, Szabo IL, Tsugawa K, Pai R, Koh GY, Kim I, Sarfeh IJ, Tarnawski AS: Gene therapy for gastric ulcers with single local injection of naked DNA encoding VEGF and angiopoietin-1. *Gastroenterology* 121, 1040-1047 (2001)
- 89 Jubb AM, Pham TQ, Hanby AM, Frantz GD, Peale FV, Wu TD, Koeppen HW, Hillan KJ: Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , and carbonic anhydrase IX in human tumours. *J Clin Pathol* 57, 504-512 (2004)
- 90 Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L: Microtubule disruption utilizes an NF $\kappa$ B-dependent pathway to stabilize HIF-1 $\alpha$  protein. *J Biol Chem* 278, 7445-7452 (2003)
- 91 Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L: Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor-1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274, 6519-6525 (1999)
- 92 Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH: Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest* 114, 1098-1106 (2004)
- 93 Kellner HM, Arnold C, Christ OE, Eckert HG, Herok J, Hornke I, Rupp W: Pharmacokinetics and biotransformation of the antimycotic drug ciclopiroxolamine in animals and man after topical and systemic administration. *Arzneimittelforschung* 31, 1337-1353 (1981)

- 94 Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A: The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 189-204 (2004)
- 95 Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH: BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Exp Med* 199, 113-124 (2004)
- 96 Kline DD, Peng YJ, Manalo DJ, Semenza GL, Prabhakar NR: 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 (2002)
- 97 Knowles HJ, Tian YM, Mole DR, Harris AL: Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ Res* 95, 162-169 (2004)
- 98 Kodama T, Shimizu N, Yoshikawa N, Makino Y, Ouchida R, Okamoto K, Hisada T, Nakamura H, Morimoto C, Tanaka H: Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression. *J Biol Chem* 278, 33384-33391 (2003)
- 99 Koike T, Kimura N, Miyazaki K, Yabuta T, Kumamoto K, Takenoshita S, Chen J, Kobayashi M, Hosokawa M, Taniguchi A, Kojima T, Ishida N, Kawakita M, Yamamoto H, Takematsu H, Suzuki A, Kozutsumi Y, Kannagi R: Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8132-8137 (2004)
- 100 Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, Semenza GL, Sitkovsky MV: Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2170-2174 (2002)
- 101 Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS: Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of  $\beta$ 2-integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10440-10445 (2004)

- 102 Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE: HIF-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* 23, 1949-1956 (2004)
- 103 Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL: Defective vascularization of HIF-1 $\alpha$ -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 209, 254-267 (1999)
- 104 Kruse R, Hengstenberg W, Hanel H, Raether W: Studies for the elucidation of the mode of action of the antimycotic hydroxypyridone compound, rilopirox. *Pharmacology* 43, 247-255 (1991)
- 105 Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM: Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med* 6, 1335-1340 (2000)
- 106 Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M: 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 (1995)
- 107 Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK: FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16, 1466-1471 (2002)
- 108 Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML: Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858-861 (2002)
- 109 Langer R, Folkman J: Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263, 797-800 (1976)
- 110 Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL: 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 (2001)
- 111 Le NT, Richardson DR: Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood* 104, 2967-2975 (2004)
- 112 Le NT, Richardson DR: Competing pathways of iron chelation: angiogenesis or anti-tumor activity: targeting different molecules to induce specific effects. *Int J Cancer* 110, 468-469 (2004)

- 113 LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N: Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412, 877-884 (2001)
- 114 Lederman HM, Cohen A, Lee JW, Freedman MH, Gelfand EW: Deferoxamine: a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. *Blood* 64, 748-753 (1984)
- 115 Lee C, Kim SJ, Jeong DG, Lee SM, Ryu SE: Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J Biol Chem* 278, 7558-7563 (2003)
- 116 Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM: Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 272, 5375-5381 (1997)
- 117 Linden M von: Das Kupfer in seiner biologischen und therapeutischen Bedeutung. *Schweiz Med Wochenschr* 29, 660-662 (1935)
- 118 Linden T, Katschinski DM, Eckhardt K, Scheid A, Pagel H, Wenger RH: The antimycotic ciclopirox olamine induces HIF-1 $\alpha$  stability, VEGF expression, and angiogenesis. *FASEB J* 17, 761-763 (2003)
- 119 Linden T, Wenger RH: Iron chelation, angiogenesis and tumor therapy. *Int J Cancer* 106, 458-459 (2003)
- 120 Lipshultz SE, Rifai N, Dalton VM, Levy DE, Silverman LB, Lipsitz SR, Colan SD, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Gelber RD, Sallan SE: The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 351, 145-153 (2004)
- 121 Löffler G, Petrides PE: Spurenelemente. In: Löffler G, Petrides PE, *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage, S. 637, Springer, Berlin (1997)
- 122 Löffler G, Petrides PE: Spurenelemente. In: Löffler G, Petrides PE, *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage, S. 635, Springer, Berlin (1997)
- 123 Löffler G, Petrides PE: Binde- und Stützgewebe. In: Löffler G, Petrides PE, *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage, S. 740, Springer, Berlin (1997)
- 124 Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE: Phase 1/2 placebo-controlled,

- double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 105, 2012-2018 (2002)
- 125 Lovejoy DB, Richardson DR: Iron chelators as anti-neoplastic agents: current developments and promise of the PIH class of chelators. *Curr Med Chem* 10, 1035-1049 (2003)
- 126 Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L: Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414, 550-554 (2001)
- 127 Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L: 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 (2002)
- 128 Martin F, Linden T, Katschinski DM, Oehme F, Flamme I, Mukhopadhyay CK, Eckhardt K, Tröger J, Barth S, Camenisch G, Wenger RH: Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* 105 (12), 4613-4619 (2005)
- 129 Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275 (1999)
- 130 Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP: Structure of an HIF-1 $\alpha$ -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296, 1886-1889 (2002)
- 131 Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I, Sang N, Srinivas V, Armstead V, Caro J: Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem* 277, 6183-6187 (2002)
- 132 Minchenko O, Opentanova I, Caro J: Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett* 554, 264-270 (2003)
- 133 Mizutani A, Furukawa T, Adachi Y, Ikehara S, Taketani S: A zinc-finger protein, PLAGL2, induces the expression of a proapoptotic protein Nip3, leading to cellular apoptosis. *J Biol Chem* 277, 15851-15858 (2002)

- 134 Morita M, Ohneda O, Yamashita T, Takahashi S, Suzuki N, Nakajima O, Kawauchi S, Ema M, Shibahara S, Udono T, Tomita K, Tamai M, Sogawa K, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y: HLF/HIF-2 $\alpha$  is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J* 22, 1134-1146 (2003)
- 135 Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63 (1983)
- 136 Mukhopadhyay CK, Attieh ZK, Fox PL: Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science* 279, 714-717 (1998)
- 137 Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL: Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* 275, 21048-21054 (2000)
- 138 Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, Matthews JR, Quong MW, Rivera RR, Stuiver MH: Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* 1218, 129-135 (1994)
- 139 Nakamura K, Endo F, Ueno T, Awata H, Tanoue A, Matsuda I: Excess copper and ceruloplasmin biosynthesis in long-term cultured hepatocytes from Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, a model of Wilson disease. *J Biol Chem* 270, 7656-7660 (1995)
- 140 Namba T, Koike H, Murakami K, Aoki M, Makino H, Hashiya N, Ogihara T, Kaneda Y, Kohno M, Morishita R: Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation* 108, 2250-2257 (2003)
- 141 Nguyen SV, Claycomb WC: Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 382-386 (1999)
- 142 Olivo M, Bhardwaj R, Schulze-Osthoff K, Sorg C, Jacob HJ, Flamme I: A comparative study on the effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), human angiogenic factor (h-AF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Anat Rec* 234, 105-115 (1992)

- 143 Orten JM, Underhill FA, Mugrage ER, Lewis RC: Blood Volume Studies in Cobalt Polycythemia. *J Biol Chem* 96, 457-463 (1932)
- 144 Pagel H, Jelkmann W, Weiss C: Isolated serum-free perfused rat kidneys release immunoreactive erythropoietin in response to hypoxia. *Endocrinology* 128, 2633-2638 (1991)
- 145 Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA: Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 274, L212-219 (1998)
- 146 Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, De Carvalho M, Mesri EA, Robins DM, Dick RD, Brewer GJ, Merajver SD: Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res* 62, 4854-4859 (2002)
- 147 Parke A, Bhattacharjee P, Palmer RM, Lazarus NR: Characterization and quantification of copper sulfate-induced vascularization of the rabbit cornea. *Am J Pathol* 130, 173-178 (1988)
- 148 Petrat F, Rauen U, de Groot H: Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology* 29, 1171-1179 (1999)
- 149 Porter JB, Gyparaki M, Burke LC, Huehns ER, Sarpong P, Saez V, Hider RC: Iron mobilization from hepatocyte monolayer cultures by chelators: the importance of membrane permeability and the iron-binding constant. *Blood* 72, 1497-1503 (1988)
- 150 Ragan HA, Nacht S, Lee GR, Bishop CR, Cartwright GE: Effect of ceruloplasmin on plasma iron in copper-deficient swine. *Am J Physiol* 217, 1320-1323 (1969)
- 151 Rajagopalan S, Mohler ER, 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS, Annex BH: Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 108, 1933-1938 (2003)
- 152 Raju KS, Alessandri G, Ziche M, Gullino PM: Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 69, 1183-1188 (1982)

- 153 Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, Selby M, Sausville EA, Shoemaker RH, Melillo G: Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res* 62, 4316-4324 (2002)
- 154 Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A: Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev* 14, 34-44 (2000)
- 155 Rebar EJ, Huang Y, Hickey R, Nath AK, Meoli D, Nath S, Chen B, Xu L, Liang Y, Jamieson AC, Zhang L, Spratt SK, Case CC, Wolffe A, Giordano FJ: Induction of angiogenesis in a mouse model using engineered transcription factors. *Nat Med* 8, 1427-1432 (2002)
- 156 Redman BG, Esper P, Pan Q, Dunn RL, Hussain HK, Chenevert T, Brewer GJ, Merajver SD: Phase II trial of tetrathiomolybdate in patients with advanced kidney cancer. *Clin Cancer Res* 9, 1666-1672 (2003)
- 157 Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J: 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 (1999)
- 158 Riess T, Andersson SG, Lupas A, Schaller M, Schafer A, Kyme P, Martin J, Walzlein JH, Ehehalt U, Lindroos H, Schirle M, Nordheim A, Autenrieth IB, Kempf VA: Bartonella adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* 200, 1267-1278 (2004)
- 159 Roeser HP, Lee GR, Nacht S, Cartwright GE: The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *J Clin Invest* 49, 2408-2417 (1970)
- 160 Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH: Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 272, 20055-20062 (1997)
- 161 Rosen T, Schell BJ, Orenko I: Anti-inflammatory activity of antifungal preparations. *Int J Dermatol* 36, 788-792 (1997)
- 162 Rossignol F, Vache C, Clottes E: Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  are detected in different normal and tumour human tissues. *Gene* 299, 135-140 (2002)



- 163 Ryan HE, Lo J, Johnson RS: HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17, 3005-3015 (1998)
- 164 Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS: Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 60, 4010-4015 (2000)
- 165 Sato M, Gitlin JD: Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 266, 5128-5134 (1991)
- 166 Scarpino S, Cancellario d'Alena F, Di Napoli A, Pasquini A, Marzullo A, Ruco LP: Increased expression of Met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in tumour cells in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 202, 352-358 (2004)
- 167 Schaffer L, Scheid A, Spielmann P, Breymann C, Zimmermann R, Meuli M, Gassmann M, Marti HH, Wenger RH: Oxygen-regulated expression of TGF- $\beta$ 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta* 24, 941-950 (2003)
- 168 Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS: Hypoxia in cartilage: HIF-1 $\alpha$  is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15, 2865-2876 (2001)
- 169 Schnell PO, Ignacak ML, Bauer AL, Striet JB, Paulding WR, Czyzyk-Krzeska MF: Regulation of tyrosine hydroxylase promoter activity by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible transcription factors. *J Neurochem* 85, 483-491 (2003)
- 170 Schratzberger P, Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Pola R, Curry C, Silver M, Krainin JG, Weinberg DH, Ropper AH, Isner JM: Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. *J Clin Invest* 107, 1083-1092 (2001)
- 171 Seagroves TN, Hadsell D, McManaman J, Palmer C, Liao D, McNulty W, Welm B, Wagner KU, Neville M, Johnson RS: HIF-1 $\alpha$  is a critical regulator of secretory differentiation and activation, but not vascular expansion, in the mouse mammary gland. *Development* 130, 1713-1724 (2003)
- 172 Selig RA, White L, Gramacho C, Sterling-Levis K, Fraser IW, Naidoo D: Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res* 58, 473-478 (1998)

- 173 Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL: Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269, 23757-23763 (1994)
- 174 Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A: 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 (1996)
- 175 Semenza GL: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732 (2003)
- 176 Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, Roy S: Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1821-1827 (2002)
- 177 Shyu KG, Wang MT, Wang BW, Chang CC, Leu JG, Kuan P, Chang H: Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1 $\alpha$ /VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc Res* 54, 576-583 (2002)
- 178 Simeon A, Emonard H, Hornebeck W, Maquart FX: The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu<sup>2+</sup> stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci* 67, 2257-2265 (2000)
- 179 Simonart T, Degraef C, Andrei G, Mosselmans R, Hermans P, Van Vooren JP, Noel JC, Boelaert JR, Snoeck R, Heenen M: Iron chelators inhibit the growth and induce the apoptosis of Kaposi's sarcoma cells and of their putative endothelial precursors. *J Invest Dermatol* 115, 893-900 (2000)
- 180 Simonart T, Boelaert JR, Andrei G, van den Oord JJ, Degraef C, Hermans P, Noel JC, Van Vooren JP, Heenen M, De Clercq E, Snoeck R: Desferrioxamine enhances AIDS-associated Kaposi's sarcoma tumor development in a xenograft model. *Int J Cancer* 100, 140-143 (2002)
- 181 Simonart T, Boelaert JR, Van Vooren JP: Enhancement of classic Kaposi's sarcoma growth after intralesional injections of desferrioxamine. *Dermatology* 204, 290-292 (2002)
- 182 Sivakumar B, Harry LE, Paleolog EM: Modulating angiogenesis: more vs less. *JAMA* 292, 972-977 (2004)

- 183 Sodhi A, Montaner S, Miyazaki H, Gutkind JS: 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 (2001)
- 184 Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W: Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425, 307-311 (2003)
- 185 Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T: Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 512, 157-162 (2002)
- 186 Stoeltzing O, McCarty MF, Wey JS, Fan F, Liu W, Belcheva A, Bucana CD, Semenza GL, Ellis LM: Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst* 96, 946-956 (2004)
- 187 Stryer L: *Biochemie*, S. 582, 4. Auflage, Spektrum, Heidelberg (1996)
- 188 Su H, Arakawa-Hoyt J, Kan YW: Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9480-9485 (2002)
- 189 Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP: Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 110, 993-1002 (2002)
- 190 Szeimies RM, Wimmershoff MB, Reisberger EM, Landthaler M: Treatment of therapy refractory verrucae vulgares with a ciclopirox-containing lacquer. *Hautarzt* 52, 489-491 (2001)
- 191 Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G: Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 274, 24142-24146 (1999)
- 192 Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL: The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157, 411-421 (2000)
- 193 Taylor MS: Characterization and comparative analysis of the EGLN gene family. *Gene* 275, 125-132 (2001)

- 194 Tian H, McKnight SL, Russell DW: Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11, 72-82 (1997)
- 195 Todd LM, Godber IM, Gunn IR: Iatrogenic copper deficiency causing anaemia and neutropenia. *Ann Clin Biochem* 41, 414-416 (2004)
- 196 Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH: The hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 22, 3213-3220 (2003)
- 197 van Heerden D, Vosloo A, Nikinmaa M: Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 69, 271-280 (2004)
- 198 Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, Magner M, Tio RA, Jiang C, Goldberg MA, Akita GY, Gregory RJ, Isner JM: Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 $\alpha$ /VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* 102, 2255-2261 (2000)
- 199 Wagner KD, Wagner N, Wellmann S, Schley G, Bondke A, Theres H, Scholz H: Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J* 17, 1364-1366 (2003)
- 200 Wakisaka N, Kondo S, Yoshizaki T, Murono S, Furukawa M, Pagano JS: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 24, 5223-5234 (2004)
- 201 Wang GL, Semenza GL: Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82, 3610-3615 (1993)
- 202 Wang GL, Semenza GL: Characterization of hypoxia-inducible factor-1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 268, 21513-21518 (1993)
- 203 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514 (1995)
- 204 Wanner RM, Spielmann P, Stroka DM, Camenisch G, Camenisch I, Scheid A, Houck DR, Bauer C, Gassmann M, Wenger RH: Epolones induce

- erythropoietin expression via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activation. *Blood* 96, 1558-1565 (2000)
- 205 Warburg O, Krebs HA: Über locker gebundenes Kupfer und Eisen im Blutserum. *Biochem Z* 190, 143-149 (1927)
- 206 Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Putz V, Hescheler J, Sauer H: Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J* 17, 503-505 (2003)
- 207 Wenger RH, Gassmann M: Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378, 609-616 (1997)
- 208 Wenger RH: Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* 16, 1151-1162 (2002)
- 209 Wenk J, Foitzik A, Achterberg V, Sabiwalsky A, Dissemond J, Meewes C, Reitz A, Brenneisen P, Wlaschek M, Meyer-Ingold W, Scharffetter-Kochanek K: Selective pick-up of increased iron by deferoxamine-coupled cellulose abrogates the iron-driven induction of matrix-degrading metalloproteinase 1 and lipid peroxidation in human dermal fibroblasts in vitro: a new dressing concept. *J Invest Dermatol* 116, 833-839 (2001)
- 210 Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA: A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349, 427-434 (2003)
- 211 Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW: YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor-1. *J Natl Cancer Inst* 95, 516-525 (2003)
- 212 Yeo EJ, Chun YS, Park JW: New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* 68, 1061-1069 (2004)
- 213 Yu EZ, Li YY, Liu XH, Kagan E, McCarron RM: Antiapoptotic action of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human endothelial cells. *Lab Invest* 84, 553-561 (2004)

- 214 Yuan J, Lovejoy DB, Richardson DR: Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: *in vitro* and *in vivo* assessment. *Blood* 104, 1450-1458 (2004)
- 215 Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE: Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem* 278, 15911-15916 (2003)
- 216 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW: Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59, 5830-5835 (1999)
- 217 Ziche M, Jones J, Gullino PM: Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 69, 475-482 (1982)
- 218 Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ: Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 14, 391-396 (2000)

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
CAM	chorioallantoide Membran des Hühnereiembryos
Cp	Coeruloplasmin
CPX / Cic	Ciclopiroxolamin
DFX	Desferrioxamin
2,2'-DP	2,2'-Dipyridyl
ECM	extrazelluläre Matrix
EGLN	egg laying abnormal
EPAS	endotheliales PAS-Protein
EPO	Erythropoietin
Erk1/Erk2	extracellular related kinase 1/2
FIH	factor inhibiting HIF
Fi <sub>O2</sub>	Sauerstofffraktion des inspirierten Gases
Glut-1	Glukosetransporter-1
GM-CSF	Granulozyten / Makrophagen – Koloniestimulierender Faktor
HBS	HIF-Bindungsstelle
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HPH	HIF Prolyl-4-hydroxylase
HRE	hypoxia response element
IGF	insulin-like growth factor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrixmetalloproteinase
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ODD	oxygen-dependent degradation
PAS	Per, ARNT, Sim
PHD	Prolylhydroxylase-Domäne enthaltendes Enzym
PI3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
P <sub>O2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PTEN	phosphatase and tensin homologue
pVHL	von-Hippel-Lindau-Protein
TAD-C	carboxyterminale Transaktivierungsdomäne
Tf	Transferrin
TGF	transforming growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 8. Veröffentlichungen

### 8.1 Originalpublikationen

Martin F<sup>1</sup>, Linden T<sup>1</sup>, Katschinski DM, Oehme F, Flamme I, Mukhopadhyay CK, Eckhardt K, Tröger J, Barth S, Camenisch G, Wenger RH: Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* 105 (12), 4613-4619 (2005)

<sup>1</sup> The first two authors contributed equally to this work.

Linden T, Katschinski DM, Eckhardt K, Scheid A, Pagel H, Wenger RH: The antimycotic ciclopirox olamine induces HIF-1 $\alpha$  stability, VEGF expression, and angiogenesis. *FASEB J* 17, 761-763 (2003)

### 8.2 Letter to the Editor

Linden T, Wenger RH: Iron chelation, angiogenesis and tumor therapy. *Int J Cancer* 106, 458-459 (2003)

### 8.3 Abstracts

Linden T, Pagel H, Scheid A, Wenger RH: Ciclopirox olamine, a novel inducer of hypoxia-inducible genes. *Pflugers Arch* 441 (6), R174 (2001)

Hellwig-Bürgel T, Linden T, Jelkmann W: Dexamethasone impairs hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) function. *Tagung der DPG, Berlin, Poster* (2001)

### 8.4 Vorträge

Linden T, Wenger RH: CPX ist ein neuer Induktor hypoxie-induzierbarer Gene *in vitro* und *in vivo*. Vortrag auf der hanseatischen Physiologentagung Kühlungsborn (2001)



## 9. Danksagungen

Danke...

... meinem Doktorvater, Roland Wenger, für die anstrengende und sehr schöne Zeit im Labor und drumherum. Ich habe während meines Studiums zu keiner Zeit schneller, konzentrierter oder mit mehr Spaß gelernt als bei Dir im Labor, Roli. Ich hoffe sehr, dass ich mich Deiner Mühen würdig erwiesen habe und erweisen werde.

... meiner Doktormutter Dörthe Katschinski, für die vielen Erklärungen, die Hilfe bei den transienten Transfektionen, der CAM und vor allem für die viele Zeit, die Du für mich erübrigt hast.

... Herrn Professor Jelkmann, für die Möglichkeit, die Experimente für meine Dissertation an Ihrem Institut durchführen zu dürfen, für die freundliche und produktive Arbeitsatmosphäre und für die Diskussionen und Ermutigungen.

... Bettina Stier und Susann Schindler, für die Geduld und die Zeit, an Urzula Frackowski, Helga Dünnebeil, Rita Meuer und Tanja Svensson für die technische Assistenz, und an den „Rest“ des Labors, Thomas Hellwig-Bürgel, Klaus Wagner, Professor Horst Pagel, Petra Stengel, Eva Wolber und Katja La Ferla, an meine Mitdoktoranden Christian, Daniel S., Daniel H., Jochen und Merle und besonders an meine Doktorschwester Annika für den Spaß an der Arbeit.

... Leo Schäffer und Annette Scheid für die Durchführung der Mausohr-Versuche. An Herrn Professor Pagel und Urzula Frackowski für das Durchführen der Versuche in der isoliert perfundierten Rattenniere.

... Gabi Fletschinger und nochmals an Daniel Stiehl für die Hilfe beim Erstellen der Graphiken.

... an Herrn Privatdozenten Doktor Malik, Frau Doktor Meyhöfer-Malik und vor allem an Inga Jensen für die Einführung in den CAM-Assay.

... Herrn Professor Hugo Marti für das pmVh Plasmidkonstrukt, der Firma Erbslöh für die Elvax pellets und der Firma Aventis für Ciclopirox- und Rilopirox-Proben.

... allen, die durch ihre Arbeit erst die Publikation von Teilen meiner Dissertation möglich gemacht haben: Falk Martin, Katrin Eckhardt, Felix Oehme, Ingo Flamme, Chinmay Mukhopadhyay, Juliane Tröger, Sandra Barth und Gieri Camenisch.

... auch an Tamás Laskay und Herrn Professor Solbach, in deren Labor ich über 15 Monate in verschiedenste molekularbiologische Arbeitsweisen mit viel Zeit und ausführlichen Erklärungen eingeführt worden bin.

Ein ganz besonderer Dank schließlich gilt meinen Eltern und Ann-Christin für den Rückhalt - und meiner lieben Martina.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch den Forschungsschwerpunkt Onkologie der Universität zu Lübeck und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG WE2672/1-1).

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Tobias Linden  
 Anschrift: Hartengrube 26  
 23552 Lübeck  
 Geburtstag: 29.03.1976  
 Geburtsort: Hamburg

### Schule

1982 – 1985 Grundschule Trittau, Schleswig-Holstein  
 1985 – 1995 Gymnasium Trittau  
 1995 Abitur

### Zivildienst

1995 – 1996 Lebenshilfe e. V., Ahrensburg, Arbeit mit geistig und körperlich behinderten Kindern und Erwachsenen

### Studium

seit 1996 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck  
 1998 Physikum  
 1999 1. Staatsexamen  
 2002 2. Staatsexamen  
 2003 3. Staatsexamen

seit 2000 Dissertation im Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck  
 Prof. Dr. phil. nat. R. Wenger, Prof. Dr. med. W. Jelkmann

### Berufliche Tätigkeit

2003 – 2004 Arzt im Praktikum  
 seit 2004 Assistenzarzt, Klinik für Kinderheilkunde,  
 Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck