

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Zelluläre Adaptationsmechanismen in episodischer Hypoxie“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vicky Süß, geb. Heß

aus Templin

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhaltsverzeichnis

Abstract (deutsch).....	5
Abstract (english).....	7
1. Hintergrund und Fragestellung.....	9
2. Methodik.....	12
2.1. Gene Ontology Analysen.....	12
2.2. Zellversuche.....	12
2.3. Transfektion.....	12
2.4. qPCR.....	13
2.5. Western Blot.....	14
2.6. Differentielle Zentrifugation.....	15
2.7. Methylierungsanalyse.....	15
2.8. Apoptoseinduktion und ROS Messung.....	16
3. Ergebnisse.....	18
3.1. Das <i>in vivo</i> Modell CsA vermittelter Hypoxie bringt ein hypoxie-untypisches Genexpressionsmuster hervor.....	18
3.2. Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells episodischer Hypoxie.....	18
3.3. Episodische Hypoxie erhöht die HIF-1 α Proteinstabilität.....	19
3.4. Episodische Hypoxie <i>in vitro</i> initiiert nicht die typische HIF Antwort.....	21
3.5. Eine beeinträchtigte nukleäre HIF-1 α Translokation erklärt die fehlende HIF Antwort....	23
3.6. Episodische Hypoxie führt zu einem moderaten Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies sowie zu einer Aktivierung zellulärer Schutzmechanismen.....	27
3.7. Episodische Hypoxie schützt <i>in vitro</i> vor Apoptose.....	27
4. Schlussfolgerung.....	29
5. Literaturverzeichnis.....	32
6. Eidesstattliche Versicherung.....	36
7. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	37
8. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge).....	39
9. Publikation.....	40
10. Lebenslauf.....	57
11. Publikationsliste.....	58
12. Danksagung.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Primersequenzen für die qPCR der *in vitro* Versuche 14

Tabelle 2 Primersequenzen für die qPCR der Methylierungs-Versuche 16

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Keine Erhöhung der Hif-1 α mRNA Menge nach episodischer Hypoxie 19

Abbildung 2 HIF-1 α Stabilität in DCT-Zellen in den verschiedenen Hypoxieformen 20

Abbildung 3 Herabgesetzte transkriptionelle Aktivität von HIF-1 nach episodischer Hypoxie in humanen HT1080 Zellen 22

Abbildung 4 Exemplarisch getestete HIF Kofaktoren zeigen keine Änderung auf mRNA Ebene in DCT-Zellen nach episodischer Hypoxie..... 24

Abbildung 5 Methylierungsstatus der getesteten HRE in den Promotorregionen der HIF Zielgene Aldolase C (*Aldo-C*) und *Egln3* (alias *PHD3*)..... 26

Abstract (deutsch)

Hintergrund: Sauerstoff ist für den Energiestoffwechsel nahezu aller eukaryotischen Lebewesen essentiell. Sauerstoffmangel (Hypoxie) stellt somit eine für das Überleben maßgebliche Veränderung dar, die zwingend einer Anpassung bedarf. Der *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) ist ein Hauptmediator in Hypoxie. Er vermittelt u. a. die Anpassung der anaeroben Glykolyserate und die pH-Regulation. Episodische Hypoxie stellt eine Sonderform dar, die durch wiederkehrende Phasen aus Hypoxie und Reoxygenierung gekennzeichnet ist und bisher vorrangig im Kontext von kardiovaskulären Erkrankungen und obstruktiver Schlafapnoe untersucht wurde. Kürzlich wurde jedoch auch gezeigt, dass die Gabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) in der Niere eine episodische Hypoxie auslöst. Die hierbei aktivierten Signalwege unterscheiden sich deutlich von denen einer kontinuierlichen Hypoxie. Ziel dieser Arbeit war es, die zelluläre Anpassung an episodische Hypoxie mit Fokus auf der Aktivität von HIF in einem *in vitro* Modell zu untersuchen.

Methoden: Die *in vitro* Untersuchungen zur renalen episodischen Hypoxie erfolgten durch Inkubation von DCT- und HT1080-Zellen für 4 h pro Tag unter 1 % Sauerstoff über einen Zeitraum von 6 Tagen. Zum Vergleich dienten normoxische Kontrollzellen sowie eine einmalige Inkubation bei 1 % Sauerstoff für 4 h bzw. 24 h. Für die Untersuchungen zur HIF Aktivität wurden qPCRs ausgesuchter HIF Zielgene und Reporteragen-Assays durchgeführt und HIF interagierende Faktoren quantifiziert. Mit Hilfe der Bisulfitkonversion erfolgten Analysen zum Methylierungsstatus hypoxieresponsiver Elemente in den Promotorregionen ausgewählter HIF Zielgene. Western Blot Analysen dienten zur Quantifizierung und subzellulären Lokalisierung von HIF-1 α sowie dem Nachweis des Apoptose-Markers aktive Caspase-3. Intrazelluläre ROS Mengen wurden durch Behandlung mit 2'7'-Dichlorfluorescein-Diacetat-Assays bestimmt.

Ergebnisse: Im Zellmodell führte episodische Hypoxie zu stark erhöhten HIF-1 α Proteinmengen, wobei eine erhöhte Expression von HIF-1 Zielgenen ausblieb. Die geringe HIF Aktivität in episodischer Hypoxie korrelierte mit einer beeinträchtigten nukleären Translokation von HIF-1 α , nicht jedoch mit einer HRE-Methylierung in Promotorregionen getesteter HIF Zielgene. Die HIF Kofaktoren Ep300 und Cited-2 zeigten keine Expressionsänderung auf mRNA-Ebene. Episodische Hypoxie führte gegenüber Kurz- und Langzeithypoxie zu einem veränderten zellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und schützte vor einer Staurosporin induzierten Apoptose.

Schlussfolgerung: Episodische Hypoxie im Zellmodell bildet das weitgehend HIF unabhängige Transkriptom wiederholter CsA-Gaben *in vivo* nach. Die Hemmung der HIF Aktivität wird durch eine unzureichende nukleäre HIF-1 α Translokation erzeugt. Die zelluläre Anpassung an episodische Hypoxie erfolgt demnach scheinbar HIF unabhängig. Hingegen scheint die tägliche Wiederholung von Hypoxie/Reoxygenierung eine Aktivierung zellulärer Schutzmechanismen hervorzurufen, die gegen Zellstress und Apoptose schützen, wobei moderat erhöhte ROS Mengen vermutlich als Signalgeber fungieren. Parallelen zu dem als „Präkonditionierung“ beschriebenen Phänomen müssen weiter untersucht werden.

Abstract (english)

Background: During evolution, aerobic organisms developed numerous mechanisms to cope with hypoxia and ensure an adequate oxygen supply. As a key mediator of those adaptations, the *hypoxia inducible factor* (HIF) orchestrates a couple of processes such as a metabolic switch to anaerobic glycolysis and pH regulation. Episodic hypoxia is characterized by repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation and has been mainly described in the context of cardiovascular diseases and obstructive sleep apnea. Recently, it has been shown that treatment with the immunosuppressant cyclosporine A (CsA) causes renal episodic hypoxia. Here we establish an *in vitro* model of episodic hypoxia to investigate the underlying signaling pathways, especially the HIF response.

Methods: DCT- and HT1080 cells were cultured under 4 h hypoxia (1% O₂) for 6 daily courses to mimic episodic hypoxia. Cells grown in normoxia or short (4 h) and long-term (24 h) hypoxia served as controls. Reporter gene assays and qPCR measurements served for quantification of the transcriptional activity of HIF-1 and to scan for alterations in HIF co-transcription factors. Western Blot analyses were conducted to quantify and reveal the subcellular localization of HIF-1 α . Bisulfite conversion was performed to investigate the methylation status of hypoxia response elements of selected HIF target genes. Active Caspase-3, as a marker of apoptosis, was detected by Western blotting and intracellular ROS levels were detected in a 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay.

Results: *In vitro*, episodic hypoxia exhibited elevated HIF-1 α protein levels. However, transcriptional activity of HIF-1 was inhibited, which has been associated with impaired nuclear translocation of the HIF-1 α subunit. In contrast, no alteration in HRE methylation of promoter regions of HIF target genes was found. Furthermore, no alteration was found in the expression level of HIF co-transcription factors Ep300 or Cited-2 at mRNA level. Following episodic hypoxia, cellular ROS levels were different compared to short- and long-term hypoxia and were associated with increased resistance to staurosporine-induced apoptosis.

Conclusion: *In vitro*, episodic hypoxia largely mimics the HIF independent renal transcriptome, that has been described following repetitive CsA application *in vivo*. Although HIF-1 α protein levels are strongly elevated following episodic hypoxia, transcriptional activity of HIF is low due to an impaired nuclear translocation. Thus, the cellular adaptation to daily cycles of short hypoxic episodes seems to be HIF independent. However, episodic hypoxia activates protective mechanisms against cellular stress and apoptosis that seems to be mediated by moderately

elevated ROS levels. Further investigations are needed to elucidate potential parallels to the “preconditioning” phenomenon.

1. Hintergrund und Fragestellung

Sauerstoff ist essentiell für das Überleben zahlreicher Spezies. Im Laufe der Evolution ermöglichte ein oxidativer Stoffwechsel immer komplexer werdenden Lebewesen eine effiziente Methode der Energiegewinnung [1]. Je nach metabolischem Bedarf und der Entfernung zu sauerstoffzuführenden Gefäßen herrschen in unterschiedlichen Geweben verschiedene Sauerstoffkonzentrationen, die jedoch stets in zelltypspezifischen, engen Toleranzgrenzen konstant gehalten werden. Übersteigt der Sauerstoffbedarf die zelluläre Sauerstoffverfügbarkeit (Hypoxie), muss eine rasche Wahrnehmung (O_2 -Sensoren) und Anpassung erfolgen, um das Überleben der Zelle zu sichern [2]. Dies erreicht die Zelle über verschiedene Adaptationsmechanismen, wobei der *Hypoxie-induzierbare Faktor* (HIF), ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität sich in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration ändert, eine Schlüsselrolle einnimmt [3 - 5]. HIF fungiert als Transkriptionsfaktor, wenn seine konstitutiv exprimierte β -Untereinheit mit der regulatorischen α -Untereinheit dimerisiert. Letztere wird unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert. Dabei wird der Abbau der α -Untereinheit über eine Prolylhydroxylasehemmung verhindert. Diese Prolylhydroxylasen hydroxylieren in Normoxie Prolinreste von HIF-1 α und ermöglichen so die Ubiquitinylierung durch den VHL/E3-Ubiquitinligase-Komplex und damit den proteasomalen Abbau. HIF-Prolylhydroxylasen (PHD-1, -2, -3, alias EglN-2, -1, -3) sind somit essentielle Sensoren für den zellulären Sauerstoffgehalt [6]. Unter Hypoxie transloziert akkumuliertes HIF-1 α in den Zellkern, wo es mit der β -Untereinheit dimerisiert und an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) der DNA bindet. Im Zusammenspiel mit weiteren Kofaktoren wird so die Transkription von Genen gefördert, die letztlich eine Adaptation der Zelle an Hypoxie ermöglichen [7 - 9]. Die verschiedenen HIF Isoformen (HIF-1 α , -2 α , -3 α) weisen eine zelltypspezifische Verteilung auf. HIF-1 α wird in nahezu allen Zellen exprimiert, während HIF-2 α vor allem in der Leber, im Gefäßendothel, in Typ II Pneumozyten und im Nierenepithel exprimiert wird. HIF-3 α wurde insbesondere in den Purkinjezellen des Kleinhirns, im Kornea-Epithel und im Thymus nachgewiesen [10]. In der Niere findet sich HIF-1 vor allem in den Tubuluszellen, während Zellen des Interstitiums und Endothels sowie einige glomeruläre Zellen vermehrt HIF-2 exprimieren [11]. Die Funktionen der Isoformen überlappen sich nur teilweise. HIF-1 reguliert vor allem die Expression glykolytischer Enzyme; HIF-2 sorgt über die Regulierung von VEGF (Endothelwachstumsfaktor) und Erythropoetin durch Anregung der Angiogenese und Blutbildung für einen Anstieg des verfügbaren Sauerstoffes. HIF-1 ist vor allem für die initiale Hypoxieantwort der Zelle verantwortlich, während HIF-2 die Anpassungen in länger andauernder Hypoxie koordiniert [12]. HIF-3 α ist in der Lage, die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 zu hemmen, indem es mit dessen α - oder β -Untereinheit komplexiert – hierbei handelt es sich also um eine negative Feedback-Schleife in prolongierter Hypoxie [13]. Eine bedeutende

Anpassung der Zelle an Hypoxie ist das Umstellen von aerobem auf einen anaeroben Metabolismus, vor allem auf Energiegewinnung durch Glykolyse. Da die ATP-Synthese hier deutlich ineffizienter abläuft als unter aeroben Bedingungen, ist eine Kompensation nötig, die u.a. über den vermehrten Einbau von Glukosetransporten in die Zellmembran erreicht wird – ein HIF vermittelter Effekt [14].

Auch über reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die nicht nur bei einem Überangebot an Sauerstoff, sondern auch bei Sauerstoffmangel vermehrt produziert werden, kann Hypoxie ischämische Erkrankungen, Inflammation und Tumorwachstum fördern. Auch für die Niere konnte bereits experimentell ein Anstieg inflammatorischer Marker im Interstitium nach transienter Ischämie mit nachfolgender Reperfusion nachgewiesen werden [15]. ROS können einen direkten Einfluss auf HIF haben, den sie z. B. über die Nitrosylierung von Cysteingruppen im HIF Molekül mit konsekutiv verbesserter Interaktion zwischen HIF und seinem Koaktivator Ep300 ausüben [16, 17]. Eine Betrachtung von Hypoxie und der Anpassung der Zelle an Sauerstoffmangel muss zusammengefasst also stets den Energiehaushalt der Zelle und die Signaltransduktion durch HIF und ROS berücksichtigen.

Auf der Organebene ist der Einfluss von Hypoxie komplex und unterliegt organspezifischen Besonderheiten. So sind der Energiebedarf und auch die Möglichkeit zur anaeroben Energiegewinnung sehr verschieden. Während unser neuronales System kaum zur anaeroben Energiegewinnung in der Lage ist, kann Muskelgewebe dies in hohem Ausmaß gewährleisten [18, 19]. In dieser Arbeit soll ein spezieller Fokus auf der Niere liegen. Daher wird im Folgenden auf die speziellen renalen Gegebenheiten eingegangen.

Innerhalb der Niere sind vor allem Teile des Nierenmarks (Medulla) wie zum Beispiel die Markstrahlen geringen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Der Grund dafür ist der spezielle Aufbau der Gefäßversorgung der Niere, der sich nach der Funktion der Harnkonzentrierung richtet. Um einen osmotischen Gradienten aufzubauen, herrscht ein Gegenstromprinzip zwischen den Vasa recta, was im Umkehrschluss auch zur Abdiffusion von Sauerstoff in proximalen Anteilen der Vasa recta führt [20]. Aufgrund der Shunt diffusion zwischen aufsteigenden und absteigenden Schenkeln der Vasa recta und dem damit einhergehenden Sauerstoffgradienten, beträgt der Sauerstoffgehalt in der Medulla teilweise unter 10 mmHg, was die Niere besonders sensitiv gegenüber Sauerstoffschwankungen macht.

In der Nierenrinde (Cortex) besteht ein enormer Energie- und damit Sauerstoffbedarf, da hier die filtrierte Aminosäuren, Glukose und Elektrolyte in hohem Ausmaß rückresorbiert werden. Vor allem im proximalen Tubulus ist ein Ausweichen auf anaerobe Glykolyse zur ATP-Generierung kaum möglich, da entsprechende Enzyme hier weniger exprimiert werden [21, 22]. Für die renale Pathophysiologie nimmt Hypoxie somit einen entscheidenden Anteil ein [23].

Intermittierende Hypoxie bezeichnet wiederkehrende Phasen aus Hypoxie und Reoxygenierung und ruft eine einzigartige zelluläre Reaktion hervor. Häufig werden Schlafapnoesyndrome als

Beispiel chronisch intermittierender Hypoxie herangezogen [13]. Während die HIF Level nach Reoxygenierung nach kontinuierlicher Hypoxie rasch abfallen, bleiben sie bei Reoxygenierung nach intermittierender Hypoxie lang erhöht. Nicht nur die HIF Menge, sondern auch seine transkriptionelle Aktivität ist in einigen Modellen intermittierender Hypoxie erhöht, was unter anderem auf die Phosphorylierung des HIF-Koaktivators Ep300 zurückzuführen ist [24]. Die HIF Akkumulation in intermittierender Hypoxie wird nicht nur über eine erhöhte Proteinstabilität, sondern auch über eine vermehrte HIF Synthese erreicht [25]. Darüber hinaus wurde in intermittierender Hypoxie eine erhöhte ROS-Produktion in bestimmten Zellmodellen nachgewiesen und als Maladaptation gewertet [13]. Bereits in früheren Arbeiten wurde diskutiert, wie intermittierende Hypoxie trotz kurzer und moderater Sauerstoffmangelphasen signifikante zelluläre Antworten hervorrufen kann – ROS wurde hierbei eine mögliche Verstärkerrolle zugeschrieben [26]. Unter anderem über eine Beeinflussung der PHD-2 Aktivität findet eine Redoxregulation von HIF-1 statt [27].

Ein Auslöser renaler Hypoxie ist Cyclosporin A (CsA), ein Immunsuppressivum, das unter anderem im Rahmen von Organtransplantationen eine wichtige Rolle im klinischen Alltag spielt und das Transplantatüberleben deutlich steigern konnte [28 - 30]. Problematisch ist jedoch, dass CsA, insbesondere bei chronischer Anwendung, nephrotoxisch wirkt. Seine nephrotoxischen Effekte beruhen auf Veränderungen der renalen Mikrozirkulation und auf vermehrter ROS Produktion, die zu einer ausgeprägten renalen Hypoxie und Schädigung der Niere beitragen [31, 32]. Kürzlich wurde gezeigt, dass repetitive Behandlungen mit CsA zu transienter renaler Hypoxie mit einem prominenten Anstieg von HIF-1 α führen. Dabei war die CsA vermittelte renale Hypoxie innerhalb von Stunden reversibel, so dass nach jeder CsA Applikation von einer Hypoxie mit Reoxygenierung ausgegangen werden muss. Daten aus dem Mausmodell suggerieren, dass die durch CsA ausgelöste episodische Hypoxie mit einem einzigartigen Transkriptom einhergeht, dass sich von der typischen Hypoxieantwort unterscheidet [28]. Die medikamentöse Auslösung einer organbezogenen, episodischen Hypoxie stellt eine neue Betrachtungsweise in der Pathophysiologie dar und wurde bisher kaum untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein *in vitro* Modell der unter CsA Behandlung beobachteten episodischen Hypoxie zu etablieren, um die molekularen Unterschiede zu konstanter Hypoxie zu untersuchen. Hierbei sollte insbesondere die Rolle von HIF fokussiert werden.

2. Methodik

2.1. Gene Ontology Analysen

Für die Betrachtung globaler Genexpressionsveränderungen nach *in vivo* Behandlung mit CsA (1 x täglich für 1 Woche) wurden Microarray Daten aus Mausnieren ausgewertet. Die zugehörigen Versuche wurden in Fähling *et al.* beschrieben [28]. Zum Vergleich mit anderen Modellen renaler Hypoxie (Rhabdomyolyse) oder HIF Aktivierung (VHL-ko) wurden Microarray Daten aus Fähling *et al.* verwendet [33]. Mit Hilfe des WEB-based GENE SeT AnaLYsis Toolkit (WebGestalt; <http://www.webgestalt.org/>) erfolgte die Suche nach funktionellen Gruppen innerhalb der herauf- und herunterregulierten Gene nach CsA Behandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Für signifikant regulierte Gene wurde ein p-Wert von $< 0,01$ zugrunde gelegt. Die Anreicherung von regulierten Genen in funktionellen Gruppen erfolgte mit Hilfe der WikiPathways-, KEGG Pathway- und Gene Ontology-Datenbanken.

2.2. Zellversuche

Mit der Frage nach Reproduzierbarkeit der Unterschiede im Tiermodell, wurde ein *in vitro*-Modell verschiedener Hypoxieformen entwickelt. Die Zellversuche wurden mit Zellen aus dem distalen Tubulus, pars convoluta der murinen Niere (DCT, zur Verfügung gestellt durch Dr. P. A. Friedman) sowie mit humanen Fibrosarkomzellen (HT1080, DSMZ, Deutschland, ACC 315) durchgeführt. Es wurden 3 Formen der Hypoxiebehandlung unterschieden: 1.) 24 h konstante Hypoxie (Langzeithypoxie), 2.) 4 h konstante Hypoxie (Kurzzeithypoxie) und 3.) 6 x 4 h Hypoxie/Tag (episodische Hypoxie) (Figure 1 in Heß *et al.* 2019). Hypoxie wurde definiert als 1 % Sauerstoff. DCT-Zellen wurden in RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute-Medium), versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, kultiviert. HT1080-Zellen wuchsen in DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium), versetzt mit 10 mM HEPES und 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum. Die Zellkultur erfolgte unter Normoxie oder Hypoxie bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, unverzüglich nach Ende der (letzten) Hypoxie auf Eis.

2.3. Transfektion

Um die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 in den verschiedenen Hypoxieformen zu untersuchen, wurden die Zellen auf 96-well-Platten (Greiner Bio-One GmbH) kultiviert und vor dem letzten Hypoxiezyklus mit einem modifizierten Firefly Luciferase pGL3-Promotor-Vektor (Promega) transfiziert, der das Hypoxie-responsive Element (HRE) 5' RCGTG in sechsfacher Ausführung enthält (pGL3p_6xHRE). Die nicht-modifizierte Variante des Vektors diente als Kontrolle (pGL3p).

Die Kotransfektion des Renilla Luciferase Vektors (Renilla-Vektor) diente der Überprüfung der Transfektionseffizienz und Normalisierung. Die kryokonservierten Plasmide wurden durch Plasmidpräparation gewonnen. Hierzu erfolgte nach Kultivierung in LB-Medium die Aufarbeitung mit einem entsprechenden Plasmid-Reinigungs Kit (QIAGEN). Die Prüfung auf Unversehrtheit der Plasmide erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Genetische Modifikationen wurden in der PCR Analytik überprüft.

12 h vor Beginn des letzten Hypoxiezyklus wurden die Zellen mit Hilfe des PolyMag-Systems (Oz Biosciences) transfiziert. Für die DCT-Zellen wurden pro well 100 µl RPMI-Medium, 2 µl (200 ng) des Renillavektors und 1 µl (100 ng) des pGL3-Promotor-Vektors bzw. seiner modifizierten Variante gemischt und zu 0,3 µl des Polymag-Reagenz gegeben. Entsprechend wurden für die HT1080-Zellen 100 µl DMEM mit 2,25 µl (225 ng) Renilla-Vektor und 0,75 µl (75 ng) pGL3-Promotor-Vektor bzw. dessen modifizierte Variante zu 0,3 µl Polymag-Reagenz gegeben. Nach 20 min Komplexbildung bei Raumtemperatur wurde dieser Ansatz zu den Zellen gegeben. Die 96-well-Platten wurden für 30 min auf der Magnetplatte in den Inkubator gestellt, dann erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS der Mediumwechsel. Nicht-transfizierte Zellen auf derselben Platte dienten als Kontrolle zur besseren Einschätzung des Ausmaßes eines möglichen Zellstresses durch die Transfektion. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte nach Zellyseinduktion mit dem Dual-Glo[®] assay System (Promega) im Synergy HTX multi-mode Reader (BioTek Instruments GmbH).

2.4. qPCR

Für die qPCR-Messungen wurde Gesamt-RNA isoliert. Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit RNA-Bee (Biozol Diagnostica) versetzt. Anschließend erfolgte die RNA-Präparation. Nach Phasentrennung mit Chloroform wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und mit Hilfe von Isopropanol die enthaltene RNA präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 4°C, 15 min, 12000 x g wurde das Nukleinsäurepellet 2 x mit Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte die Lösung der RNA in nukleasefreiem Wasser. Zur cDNA-Synthese wurden 2 µg der so gewonnenen RNA in 10 µl Wasser gelöst und 10 µl eines Mastermixes aus dNTPs, Randomprimern, Reverser Transkriptase, RNase-Inhibitor, Puffer und Wasser hinzugegeben (Applied Biosystems). Die cDNA-Synthese erfolgte in folgenden Reaktionsschritten: 10 min 25°C, 120 min 37°C und 5 min 85°C.

Das Primerdesign für die qPCRs erfolgte mit Hilfe von *Primer-Blast* des National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index>). Wann immer möglich, wurden Intron-überspannende Primer ausgewählt, die eine möglichst geringe Selbstkomplementarität aufwiesen.

Für die qPCR setzten wir neben den entsprechenden Primern und der cDNA den SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher) ein, der DNA-Polymerase, dNTPs, Puffer, SYBR Green I zur Detektion doppelsträngiger DNA sowie eine interne Referenz zur Normalisierung und damit zum Herausrechnen unspezifischer Fluoreszenzsignale enthält.

Die qPCR erfolgte jeweils für Triplikate und in 40 Zyklen aus Denaturierung (15 s, 95°C), Annealing (1 min, 62°C) und Elongation (30 s, 77°C) im StepOnePlus-System (Applied Biosystems). Die hierfür genutzten Primer sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Normalisierung erfolgte über die 18S rRNA-Level mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Es wurden jeweils mindestens 3 biologische Replikate zugrunde gelegt.

Tabelle 1 Primersequenzen für die qPCR der *in vitro* Versuche

Primer	Sequenz
18S_rRNA_Fw	5' GATCAAAACCAACCCGGTCA
18S_rRNA_Re	5' CCGTTTCTCAGGCTCCCTCT
AldoC_Fw_Maus	5' GCTGAGCCAAATTGGGGTGG
AldoC_Re_Maus	5' CCATCCAGCCCTTGAGTGGT
Hk2_Fw_Maus	5' GTGCATCGCGGACTTCCTTG
Hk2_Re_Maus	5' GGCGAATGGCTTCCTTCAGC
Slc2a1_Fw_Maus	5' TCTTAAGTGCGTCAGGGCGT
Slc2a1_Re_Maus	5' CTCCGTAGCGGTGGTTCCAT
Adm_Fw_Maus	5' CAGCAGCTACCCTACGGGAC
Adm_Re_Maus	5' CATCCATTGCTGCGGGAACC
Hif-1 α _Fw_Maus	5' CTTCCCCCGTCCACCCATTT
Hif-1 α _Re_Maus	5' CTTCCGCGAGATCTTGCTGC
Cited-2_Fw_Maus	5' GGGTTTGGACCGCATCAAGG
Cited-2_Re_Maus	5' TCTTTCCGCCTGCGAGGTTA
Ep300_Fw_Maus	5' ACCAGATTCCACCACAACCC
Ep300_Re_Maus	5' GGCCACACCAGCATTTTCAC
ALDO-C_Fw_human	5' TGCGGCTGCTAACTGGCTGCG
ALDO-C_Re_human	5' TTGCCCGGGGCTACAATCCGC
CA-9_Fw_human	5'CGGGAGGCCTGGCCGTGTTG
CA-9_Re_human	5' CCTGGGCACAGGGCGGTGTAGT

2.5. Western Blot

Für die Proteinanalysen wurden die Zellen lysiert und für Gesamtprotein aufgearbeitet. Der Lysepuffer enthielt 50 mM Tris (pH 6,8), 12,5 mM Dithiothreitol (DTT), 1% sodium dodecyl sulfate / Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie 4 M Harnstoff.

Die Gele für die Elektrophorese wurden wie folgt vorbereitet: aus Aqua dest. und Ammoniumpersulfat (APS) wurde eine 10 %-ige Lösung hergestellt. Je nach zu detektierender Proteingröße, wurden Trenngele unterschiedlicher Konzentration gewählt. Für ein 10 %-iges Trenngel wurden 4,5 ml SDS-Puffer (pH 8,8), 1,5 ml Aqua dest. und 3 ml 3 % Acrylamid mit 7,5 μ l TEMED und 75 μ l der APS-Lösung versetzt. Nach Polymerisierung wurde das Trenngel mit dem

Ansatz für das Sammelgel (SDS-Puffer (pH 6,8), Aqua dest., Acrylamid, TEMED, APS) überschichtet. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit Laemmli-Puffer befüllt und nach Einfüllen der Proben erfolgte die Elektrophorese (30 min bei 80 V, dann ca. 1 h bei 100 V). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Der entsprechende Blottingpuffer enthielt dabei 22,5 mM Tris, 172,8 mM Glycin, 0,05 % SDS und 20% Methanol. Die Membranen wurden im Anschluss mit einer 5 %-igen Milchpulverlösung in TBS-T (20,1 mM Tris, 136,9 mM NaCl, 0,1 % Tween pH 7,6) blockiert und mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte jeweils über Nacht bei 4°C. Nach erneutem Waschen in TBS-T wurde für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert, und dann nach weiteren Waschschritten das Chemilumineszenzsubstrat (WesternBight™ Sirius, Advansta) zugegeben. Die Detektion erfolgte mittels Röntgenfilm (Fuji Film Super RX-N) bzw. im intas ECL Chemostar (Intas Science Imaging Instruments GmbH). Als Primärantikörper wurden anti-HIF-1 α (10006421, Cayman Chemical), anti-acetyl-Histone H3 (06599, Biomol), anti-Tubb2B (TA 337744, Origene), anti-caspase 3 (AM08377PU-N, Acris) und anti-active caspase (3015-100, Biovision) verwendet. Als Sekundärantikörper nutzten wir donkey anti-rabbit und goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2317 und sc-2031, Santa Cruz Biotechnology).

Mit Hilfe von Cycloheximid (CHX), einem Inhibitor der Elongation bei der Proteintranslation, wurde die Proteinstabilität von HIF-1 α in den verschiedenen Hypoxieformen verglichen. CHX wurde in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml nach der (letzten) Hypoxie zu den Zellen gegeben. Nach einer Stunde erfolgte die Zellernte mit anschließender Aufarbeitung wie oben beschrieben.

2.6. Differentielle Zentrifugation

Für eine separate Untersuchung der Kern- und Cytosolproteine wurden Zellen mit einem Lysispuffer (Proteaseninhibitor-Cocktail (Roche), 1 mM DTT, 0,5% Nonidet P40, 25% Glukose, 0,1% SDS, 140 mM NaCl, 20 mM Tris) für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4°C und 10 000 x g zentrifugiert. Der hierdurch erhaltene Überstand enthielt die cytosolischen Proteine, das Pellet die nukleären Anteile. Das Pellet wurde nach einem Waschschriff mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in SDS resuspendiert und dann ebenso wie die cytosolischen Proteine wie oben beschrieben dem üblichen Western Blot-Verfahren unterzogen.

2.7. Methylierungsanalyse

Die Isolierung genomischer DNA aus den oben beschriebenen Versuchen mit DCT-Zellen erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit von QIAGEN. Die Analyse der Methylierung von hypoxie-responsiven Elementen in den Promotorregionen ausgewählter HIF Zielgene erfolgte dann mit dem EZ DNA Methylation-Startup™ Kit (ZYMO RESEARCH), das sich die Bisulfit-

Konversion mit anschließender PCR-basierter Amplifikation zunutze macht. Bisulfit überführt nicht-methyliertes Cytosin in Uracil, während methylierte Cytosine nicht konvertiert werden. Entsprechende Methylierungsspezifische Primer wurden mit Hilfe des Bisulfite Primer Seeker-Programms (www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker) abgeleitet; ihre Sequenzen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Primersequenzen für die qPCR der Methylierungs-Versuche

Primer	Sequenz
Aldo-C_HRE3methyl_Fw	5' TATTTATAGGTGAGTAAGTTGAGGGTTATG
Aldo-C_HRE3methyl_Re	5' ATTCTCCTCCAAAATATACCTCTACAATAC
Egln-3_methyl_Fw	5' AAATAGAAGAGGAAAGAAGGAAAGATATTAGG
Egln-3_methyl_Re	5' AATCCCCTAACAAACTTAAAAACCTAAATCTC

Nach Amplifikation der bisulfit-behandelten DNA mit Hilfe der spezifischen Primer und des Zymo Taq Premix (10 min 95°C, 42 Zyklen aus je 30 sek 95°C, 45 sek 54°C und 1 min 72°C, dann 7 min 72°C), erfolgte eine Säulenreinigung (Qiagen). Als Positivkontrolle der PCR diente der *universal methylated human DNA standard* (bisulfit-behandelt) (50 ng, Primer aus dem Kit mit einer Annealing-Temperatur von 59°C). Als Negativkontrollen wurden nicht-bisulfit-behandelte *universal methylated human DNA standards* mit den entsprechenden Primern sowie eine Probe ohne DNA-Template mitgeführt. Anschließend erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Hilfe des Restriktionsenzym HpyCH4IV (New England Biolabs). Dieses schneidet die Sequenz A'CGT und damit die HRE-Sequenz der Promotoren oben genannter Gene, vorausgesetzt, CG ist methyliert und somit nach Bisulfitbehandlung und PCR nicht in CT umgeschrieben (A'TGT wird nicht durch das Restriktionsenzym geschnitten). Der 50 µl-Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl DNA aus o.g. PCR, 0,1 µl HPYCH4IV (entspricht 1 U), 5 µl 10x Puffer und 39,9 µl Wasser) – die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C, gefolgt von 20 min bei 65°C. Eine Säulenreinigung wurde angeschlossen, die Analyse erfolgte auf einem 2 %-igen Agarosegel. Eine DNA-Methylierung konnte über Bandengrößen des Amplikons bzw. ggf. der Restriktionsfragmente im Agarosegel erkannt werden.

2.8. Apoptoseinduktion und ROS Messung

Um die ROS Produktion in den verschiedenen Versuchsbedingungen zu untersuchen, wurden die Zellen nach der (letzten) Hypoxie in Normoxie überführt und in Serum-freiem Medium unter Lichtabschluss 30 min lang mit jeweils 10 µM 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat (DCFDA, Sigma) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Inkubation mit 0,03 % Wasserstoffperoxid. DCFDA diffundiert in die Zellen und wird von dort agierenden Esterasen

deacetyliert und dann durch ROS zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein oxidiert. Über die Messung der Intensität der Fluoreszenz im Synergy HTX multi-mode plate reader (BioTek Instruments GmbH) erfolgte die indirekte Quantifizierung der ROS Produktion. Eine Normalisierung auf die jeweilige Zellzahl ist erfolgt. Es wurden drei biologisch unabhängige Experimente mit jeweils 10 Replikaten durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen für 3 h unter Normoxie im Anschluss an die (letzte) Hypoxiephase mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Dabei handelt es sich um einen unspezifischen Kinasehemmer, der über Caspase-3 die Apoptose induziert. Es erfolgten dann die Aufarbeitung der Zellen für Gesamtprotein sowie Western Blots nach oben beschriebenem Protokoll zur Detektion von aktiver Caspase-3 (n=3).

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz von zwei zu vergleichenden Bedingungen wurde der ungepaarte Students-T-Test angewendet. Bei mehr als zwei zu vergleichenden Bedingungen wurde der one-way ANOVA mit post hoc Tukey Test benutzt (GraphPad Prism 8.0). Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Das *in vivo* Modell CsA vermittelter Hypoxie bringt ein hypoxie-untypisches Genexpressionsmuster hervor

Frühere Versuche haben gezeigt, dass CsA im Mausmodell episodische Hypoxie auslöst, die mit einem Anstieg der HIF-1 α Menge, jedoch nicht mit einer vermehrten Transkription von HIF Zielgenen einhergeht [28]. Ausgehend von Vergleichen der HIF Zielgen-mRNA-Expression in qPCR-Versuchen verschiedener renaler Hypoxiemodelle wurde die Hypothese aufgestellt, dass die durch CsA ausgelöste episodische Hypoxie bezüglich der zellulären Reaktion weder mit konstanter Hypoxie nach Rhabdomyolyse-induziertem Nierenversagen, noch mit konstanter tubulärer HIF Aktivierung durch VHL-ko gleichgesetzt werden kann (Figure 2 in Heß *et al.* 2019) [34]. Die weiterführende Auswertung von Microarraydaten aus den CsA vs. VHL-ko Modellen wiesen ebenfalls auf eine mangelnde HIF Antwort hin (Figure 3 in Heß *et al.* 2019) [34]. Genexpressionsanalysen zu funktionellen Signalwegen zeigten, dass nach CsA Behandlung *in vivo* spezifisch Gene mit Zuordnung zum oxidativen Stoffwechsel herauf reguliert wurden (Pathways: „Elektron Transport Chain“, „Oxidative Phosphorylation“) (Table 1 in Heß *et al.* 2019) [34]. Ein wesentlicher Unterschied zum Genexpressionsmuster nach renaler Hypoxie, zum Beispiel durch Rhabdomyolyse ist weiterhin, dass nach CsA Behandlung Gene mit Assoziation zu oxidativem Stress vermehrt exprimiert werden (Pathways: „Oxidative Stress“, „Glutathione Metabolism“) (Table 1 in Heß *et al.* 2019) [33, 34]. Die Frage, warum es nach CsA vermittelter episodischer Hypoxie der Nieren *in vivo* trotz verstärkter HIF-1 α Akkumulation zu keiner Erhöhung der HIF Aktivität kommt, sollte näher untersucht werden.

3.2. Etablierung eines *in vitro* Modells episodischer Hypoxie

Um die der episodischen Hypoxie nach CsA Behandlung zugrundeliegenden molekularen Signalwege zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Modell etabliert. DCT- und HT1080-Zellen wurden an 6 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils für 4 h einer Hypoxie ausgesetzt. Zum Vergleich dienten Zellen aus Normoxie sowie aus 4 h und 24 h Hypoxie (Figure 1 in Heß *et al.* 2019) [34]. Wir entschieden uns für eine tägliche Hypoxie von 4 h, weil frühere Versuche im Mausmodell 2 h nach CsA Gabe eine signifikante Hypoxie gezeigt hatten und eine gewisse Zeitspanne für die Diffusion durch das Zellmedium sowie die molekulare Reaktion zusätzlich gewählt wurde [28]. Für eine bessere Vergleichbarkeit wählten wir für die episodische Hypoxie 6 x 4 h, also eine Gesamthypoxie von 24 h. Western Blot Analysen zeigten, dass es *in vitro* nach episodischer Hypoxie zu einer ausgeprägten Akkumulation von HIF-1 α kommt. Tatsächlich zeigte sich sowohl

in DCT- als auch in HT1080-Zellen ein signifikant stärkerer HIF-1 α Anstieg im Vergleich zu 24 h Hypoxie (Figure 4 in Heß et al. 2019) [34].

3.3. Episodische Hypoxie erhöht die HIF-1 α Proteinstabilität

Als Ursache für diesen Anstieg der HIF-1 α Proteinmenge waren zunächst sowohl eine vermehrte Transkription des HIF-1 α Gens, eine verstärkte Translationsrate sowie eine erhöhte Proteinstabilität denkbar. Eine vermehrte Transkription des HIF Gens in episodischer Hypoxie konnten wir mit Hilfe von qPCR-Untersuchungen ausschließen (Abbildung 1).

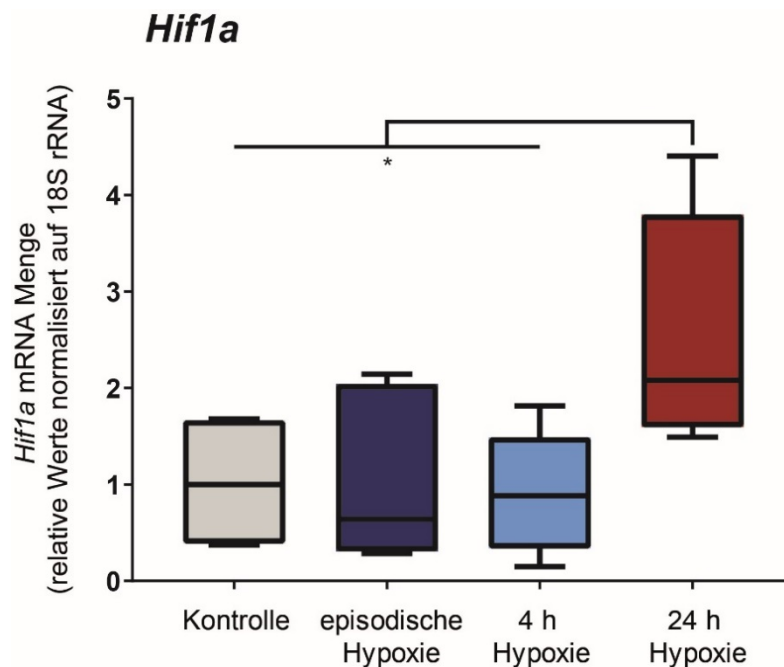


Abbildung 1 Keine Erhöhung der Hif-1 α mRNA Menge nach episodischer Hypoxie. Real time PCR Analyse der Hif-1 α mRNA in DCT-Zellen nach Normoxie (Kontrolle), episodischer Hypoxie (6 Tage à 4 h 1 % O₂ pro Tag) bzw. einmalige Inkubation bei 1 % O₂ für 4 oder 24 h. Die Normalisierung erfolgte auf 18S rRNA. *: p < 0,05 (n=6)

Da die α -Untereinheit für ihre Stabilitätsvarianz unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen bekannt ist, testeten wir anschließend die Stabilität der α -Untereinheit in den verschiedenen Hypoxieformen mit Hilfe des Translationshemmers Cycloheximid [35, 36]. Aufgrund der kurzen Proteinhalbwertszeit von HIF-1 α [37], wurden die Zellen 1 h nach Zugabe von Cycloheximid geerntet und aufgearbeitet. Im anschließenden Western Blot konnte eine signifikant erhöhte HIF-1 α Menge in allen Hypoxieformen gegenüber Normoxie nachgewiesen werden. Zudem zeigte

sich eine signifikant erhöhte Proteinmenge in episodischer Hypoxie gegenüber 24 h Hypoxie (Abbildung 2). Eine erhöhte Proteinstabilität scheint demnach die verstärkte Akkumulation von HIF-1 α in episodischer Hypoxie – zumindest partiell – zu erklären.

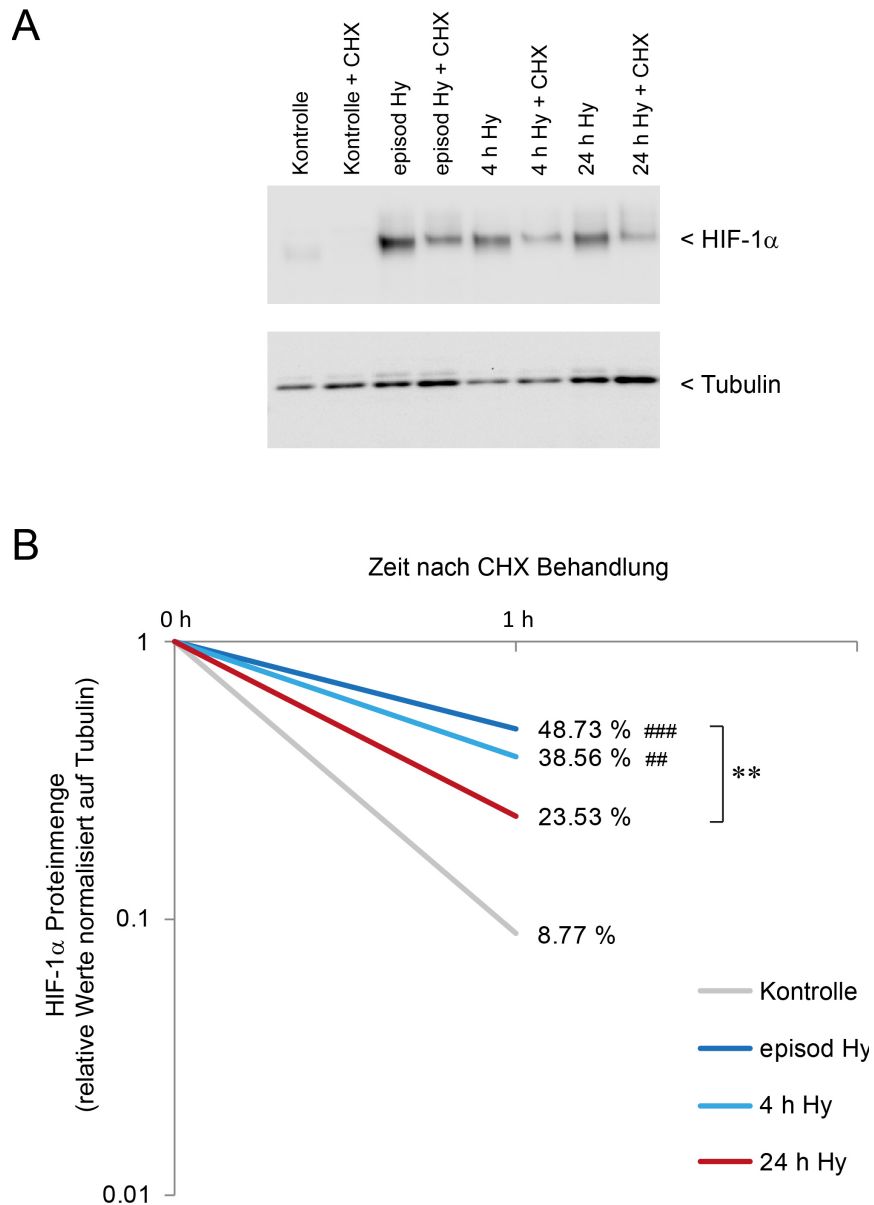
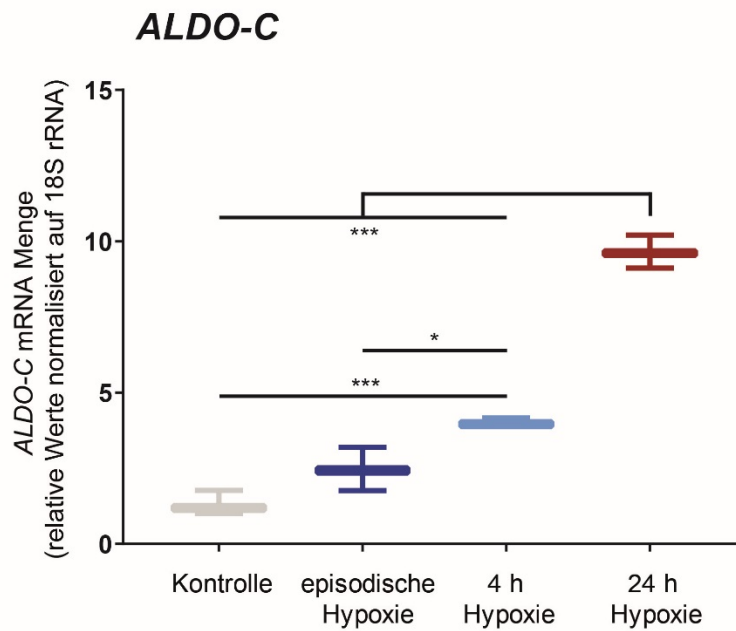


Abbildung 2 HIF-1 α Stabilität in DCT-Zellen in den verschiedenen Hypoxieformen. (A) repräsentativer Western Blot der HIF-1 α Menge in den verschiedenen Hypoxieformen mit und ohne CHX-Behandlung für 1 h. (B) Quantifizierung der Ergebnisse. Tubulin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist die HIF-1 α Proteinmenge nach 1 h CHX-Behandlung in Prozent vom Ausgangswert. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Proteinstabilität in episodischer Hypoxie verglichen zu 24 h Hypoxie. Signifikanz im Vergleich zu Kontrolle: ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$. Signifikanz zwischen den Hypoxieformen: **: $p < 0,01$ ($n=6$)

3.4. Episodische Hypoxie *in vitro* initiiert nicht die typische HIF Antwort

Um zu testen, ob die HIF-1 α Akkumulation in episodischer Hypoxie zu einer vermehrten Expression von HIF Zielgenen führt, wurde die Gesamt-RNA aus den Zellversuchen im Rahmen von qPCRs auf HIF Zielgene untersucht. Die getesteten HIF Zielgene (Aldolase-C, Hexokinase-2, Glukosetransporter-1, Adrenomedullin) waren in DCT-Zellen jeweils nach 24 h Hypoxie signifikant stärker exprimiert als in episodischer Hypoxie (Figure 6 in Heß *et al.* 2019) [34]. Um zu untersuchen, ob die Beobachtung spezifisch für renale Mauszellen ist, wurde zusätzlich eine mRNA Quantifizierung zu den HIF Zielgenen Aldolase C und Carboanhydrase 9 in humanen Fibrosarkomzellen (HT1080) mit je 3 biologischen Replikaten durchgeführt, die denselben Trend zeigten (Abbildung 3).

A



B

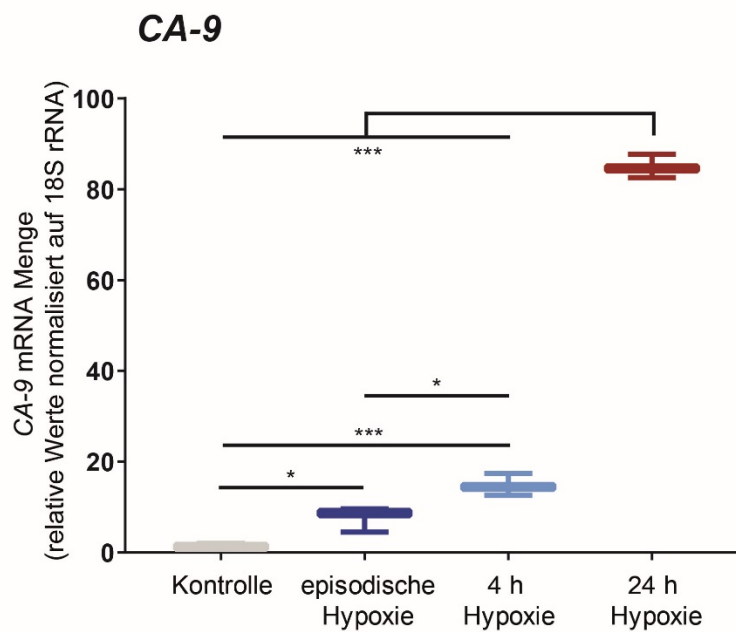


Abbildung 3 Herabgesetzte transkriptionelle Aktivität von HIF-1 nach episodischer Hypoxie in humanen HT1080 Zellen. Real time PCR Analyse der HIF-1 Zielgene (A) Aldolase C (ALDO-C) und (B) Carboanhydrase (CA-9). Die Normalisierung erfolgte auf 18S rRNA. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ ($n=3$)

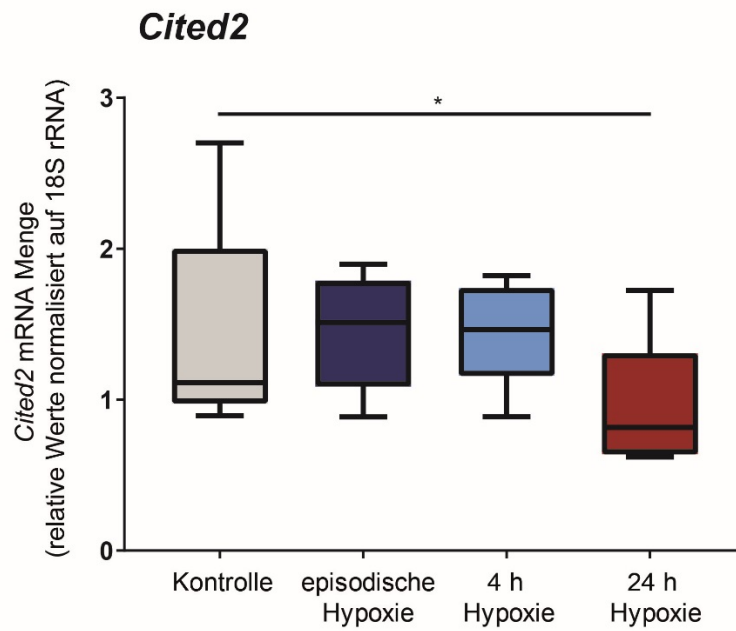
Zur Bestätigung einer inadäquaten HIF Aktivität nach episodischer Hypoxie wurden DCT- und HT1080-Zellen mit einem HIF abhängigen Luciferase-Reportervektor transfiziert, dessen

Promotor sechs HRE (*Hypoxia Response Elements*) Motive enthält. Auch hier zeigte sich trotz starker HIF-1 α Akkumulation eine limitierte transkriptionelle Aktivität von HIF-1 in episodischer Hypoxie in beiden Zelllinien (Figure 5 in Heß *et al.* 2019) [34].

3.5. Eine beeinträchtigte nukleäre HIF-1 α Translokation erklärt die fehlende HIF Antwort

Als mögliche Erklärung für die fehlende HIF Antwort trotz HIF-1 α Akkumulation, zogen wir 1) eine veränderte Interaktion zwischen HIF und seinen Kofaktoren, 2) Veränderungen der Methylierung, sowie 3) eine verminderte nukleäre Translokation der α -Untereinheit in Betracht. Epigenetische Einflüsse spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von HIF Zielgenen [38]. EP300 (*E1A binding protein p300*) ist ein bekannter Koaktivator von HIF-1. Er besitzt Histon-Acetyltransferase-Aktivität und induziert eine Entwindung des Chromatins, was die Expression zahlreicher HIF Zielgene erleichtert. Indem er an die Transaktivierungsdomäne von HIF-1 α bindet, ist er als epigenetischer Regulator aktiv. Seine Funktion wird u.a. durch posttranslationelle Modifikationen von HIF beeinflusst – ein Beispiel hierfür ist die Hydroxylierung eines Asparagins von HIF-1 α durch FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) [38]. CITED-2 (*CBP/p300 interacting transactivator 2*) ist wiederum dazu in der Lage mit EP300 zu interagieren und so die Aktivität EP300-abhängiger Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 zu beeinflussen. Die Affinität von CITED-2 zu EP300 ist um ein Vielfaches höher als die von HIF-1 α . Deshalb kann CITED-2 die HIF-1 α Aktivität verringern [39]. Unter der Annahme, dass EP300 und / oder CITED-2 in ihrer Menge in den verschiedenen Hypoxieformen verändert sein könnten, untersuchten wir die entsprechende mRNA-Menge in den verschiedenen Hypoxieformen exemplarisch mittels qPCR. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen 4 h, 24 h und 6 x 4 h Hypoxie (Abbildung 4).

A



B

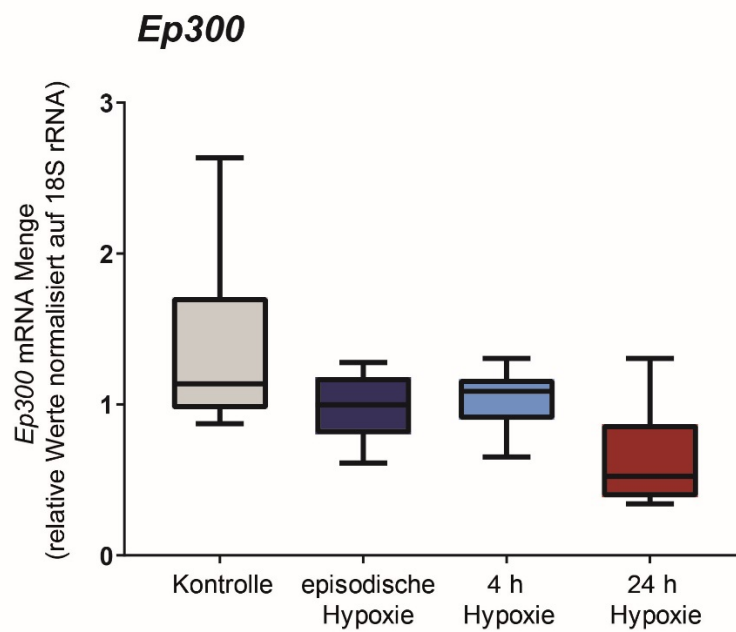


Abbildung 4 Exemplarisch getestete HIF Kofaktoren zeigen keine Änderung auf mRNA Ebene in DCT-Zellen nach episodischer Hypoxie. qPCR Analyse; die Normalisierung erfolgte auf 18S rRNA. (A) zeigt den inhibitorischen HIF Kofaktor Cited-2. (B) zeigt den HIF Koaktivator Ep300. *: $p < 0,05$ ($n=6$)

Anschließend wurde die Methylierung der DNA untersucht. Die vermehrte Bindung von CH_3 -Gruppen an Cytosine in CpG-Dinukleotiden im Promotorbereich von Genen führt üblicherweise

zur verminderten Transkription des entsprechenden Gens [40]. Da auch eine veränderte Methylierung in episodischer Hypoxie eine Rolle spielen könnte, untersuchten wir exemplarisch bestimmte hypoxie-responsive Elemente in den Promotorregionen der HIF Zielgene Prolylhydroxylase 3 (*Phd3*, alias *Egln3*) und Aldolase C (*Aldo-C*) auf eventuell veränderte Methylierung in den verschiedenen Hypoxieformen. Nach Bisulfitkonversion und Amplifikation der ausgewählten Promotorsequenzen wurden die Amplikons einem Restriktionsansatz mit HpyCH4IV zugeführt. HpyCH4IV konnte das Amplikon aus dem *Phd3*-Promotor in keiner der 3 Hypoxieformen schneiden, während das Amplikon des *Aldo C*-Promotors in allen Hypoxieformen geschnitten wurde. Wir gehen deshalb davon aus, dass das untersuchte HRE im *Phd3*-Promotor unter allen Testbedingungen unmethyliert vorliegt, jenes im *Aldo C*-Promotor hingegen methyliert. Es zeigten sich jeweils keine Unterschiede in der Methylierung der untersuchten HRE zwischen den verschiedenen Hypoxieformen (Abbildung 5). Zu beachten ist, dass der Aldolase C Promotor weitere HRE beinhaltet, deren Methylierungsstatus hier nicht untersucht wurde.

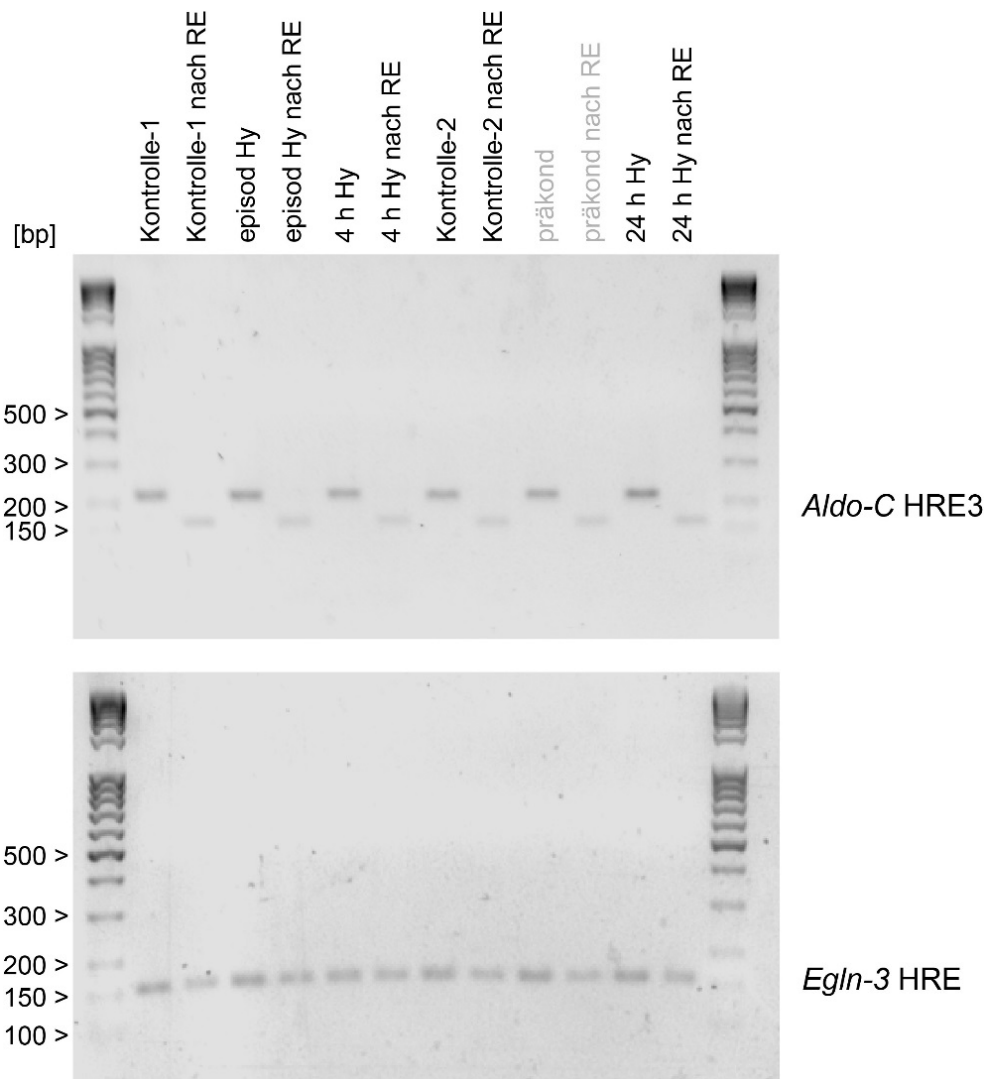


Abbildung 5 Methylierungsstatus der getesteten HRE in den Promotorregionen der HIF Zielgene Aldolase C (*Aldo-C*) und *PHD3* (alias *EglN3*). Agarosegelelektrophorese nach Bisulfitkonversion, PCR und Restriktion für die Promotoren von *Aldo C* (oben) und *Phd3* (unten) in DCT Zellen in verschiedenen Hypoxieformen. Episodische Hypoxie führt nicht zu einer Änderung des Methylierungsstatus der getesteten HRE in den Promotorregionen der HIF Zielgene *Aldo-C* und *Phd3*. Das das HRE 3 beinhaltende Amplikon des *Aldo C* Promotors hat eine Länge von 220 bp, nach Restriktion waren 164 und 56 bp große Restriktionsfragmente zu erwarten. Das Amplikon für den *Phd3* Promotor ist 158 bp groß – nach Restriktion wären 126 und 32 bp zu erwarten. Für die Zellen in 4 h Hypoxie und episodischer Hypoxie bestand ein anderer Erntezeitpunkt als für Zellen in 24 h Hypoxie, so dass auch 2 Kontrollen (1 & 2) mitgeführt wurden. Auf dem Agarosegel mit untersuchte Bedingungen zur Präkonditionierung („präkond“) waren Bestandteil parallel durchgeführter Versuchsreihen und sollen hier nicht weiter erläutert werden. (n=3)

Um als Transkriptionsfaktor zu fungieren, muss die α -Untereinheit von HIF-1 in den Zellkern gelangen [8]. Der nukleäre Proteinimport stellt einen wichtigen regulatorischen Mechanismus in Hinblick auf Transkription und Replikation dar [41]. Unsere bisherigen Western Blots konnten nur die Gesamtmenge von HIF-1 α in den Zellen detektieren – Aufschlüsse über die genaue Lokalisation ergaben sich hieraus nicht. Nachdem sich kein Hinweis auf eine Beeinträchtigung der transkriptionellen HIF Aktivität durch eine veränderte Kofaktorexpression oder veränderte Methylierungsmuster der Zielgene zeigte, wurde die subzelluläre Lokalisation von HIF-1 α mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation zur Isolation von cytosolischen- vs. Kernextrakten untersucht. Während nach 24 h Hypoxie HIF-1 α fast ausschließlich in der Kernfraktion akkumulierte, blieb nach episodischer Hypoxie die HIF-1 α Proteinmenge weitestgehend auf das Cytosol beschränkt (Figure 7 in Heß *et al.* 2019) [34]. Somit korrelierte eine unzureichende HIF Aktivität in episodischer Hypoxie mit einer gestörten nukleären HIF-1 α Translokation.

3.6. Episodische Hypoxie führt zu einem moderaten Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies sowie zu einer Aktivierung zellulärer Schutzmechanismen

Ausgehend von den *in vivo* Gene Ontology- und Microarray-Analysen, untersuchten wir das renale Transkriptom CsA behandelter Mäuse auf eine mögliche Aktivierung zellulärer Schutzmechanismen gegen ROS und fanden signifikant heraufregulierte Gene, die mit dem Glutathionsystem assoziiert sind. Hierbei handelt es sich erneut um einen Unterschied im Transkriptom verglichen mit anhaltender HIF Aktivierung im VHL-Knockout-Modell (Figure 8A in Heß *et al.* 2019). Es erfolgte die *in vitro* Verifizierung dieser Ergebnisse mit Hilfe eines 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat-Assays mit DCT-Zellen. Hier zeigte sich keine Erhöhung der ROS Mengen nach 4 h Hypoxie, eine moderate Erhöhung nach episodischer und die deutlichste Erhöhung nach 24 h Hypoxie (Figure 8B in Heß *et al.* 2019). Zusammenfassend konnte sowohl auf Expressionsebene für Kandidatengene des Glutathionsystems *in vivo*, als auch über die detektierte ROS Menge *in vitro* eine Besonderheit der episodischen Hypoxie gegenüber Kurzzeit- (4 h) und Langzeit- (24 h) Hypoxie aufgezeigt werden.

3.7. Episodische Hypoxie schützt *in vitro* vor Apoptose

Zur genaueren Untersuchung der Konsequenzen der beobachteten Unterschiede zwischen episodischer und anhaltender Hypoxie, sollte der Einfluss episodischer Hypoxie auf das Zellüberleben analysiert werden. Hierzu erfolgte die Apoptoseinduktion mit Hilfe des unspezifischen Kinaseinhibitors Staurosporin nach Exposition der Zellen gegenüber den beschriebenen Hypoxieformen mit anschließender Reoxygenierung (3 h). Sowohl im Vergleich zu 4 h Hypoxie als auch zu 24 h Hypoxie, zeigten die Zellen nach episodischer Hypoxie signifikant

geringere Mengen des Apoptosemarkers aktive Caspase-3 (Figure 9 in Heß *et al.* 2019). Diese Ergebnisse lassen einen protektiven Einfluss episodischer Hypoxie gegenüber Apoptose vermuten, der hauptsächlich auf HIF unabhängigen Schutz vor ROS zu beruhen scheint.

4. Schlussfolgerung

Die Forschung rund um Hypoxie und Reoxygenierung beschäftigt Wissenschaftler weltweit bereits seit Jahrzehnten. Vor allem im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt oder Apoplex sowie Tumorerkrankungen und Schlafapnoesyndromen wurden diesem Phänomen spezifische Effekte zugeschrieben [42 - 45].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Modell episodischer Hypoxie etabliert, mit dessen Hilfe die zellulären Signalwege einer CsA Behandlung im Mausmodell nachempfunden werden konnten. Unsere Ergebnisse konnten die Beobachtung einer renalen HIF-1 α Akkumulation ohne korrespondierenden Anstieg der transkriptionellen Aktivität verifizieren. Damit unterscheiden sich diese Ergebnisse von üblichen Modellen episodischer Hypoxie wie beispielsweise Modellen für obstruktive Schlafapnoe oder Krebserkrankungen, die neben der erhöhten HIF Menge auch einen Anstieg von HIF Zielgenen zeigen [24, 46].

Ausschlaggebend für die unzureichende HIF Aktivität nach episodischer Hypoxie ist die Beeinträchtigung der nukleären Translokation von HIF-1 α . Obwohl unsere Versuche zu DNA-Methylierung und HIF Kofaktoren keine signifikanten Unterschiede zu anhaltender Hypoxie zeigten, ist ein Einfluss dieser Faktoren auf die HIF Aktivität in episodischer Hypoxie nicht auszuschließen, da diese nur exemplarisch an einigen Beispielen und nur auf mRNA Ebene untersucht wurden. Eine Einflussnahme ist daher auch nur für die hier untersuchten Beispiele auf der jeweils untersuchten Ebene auszuschließen.

In vielen experimentellen Szenarien intermittierender Hypoxie ist eine vermehrte ROS Produktion nachweisbar, was beispielsweise auf eine Hemmung des Komplexes I der mitochondrialen Elektronentransportkette zurückzuführen ist [47]. Tatsächlich zeigte sich dieser Anstieg der ROS Menge in episodischer Hypoxie verglichen mit Normoxie und 4 h Hypoxie auch unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit. Im Vergleich zu 24 h Hypoxie war die ROS Menge jedoch signifikant geringer. Es ist bekannt, dass hohe Mengen reaktiver Sauerstoffspezies Zellen schädigen und deren Lebenszeit verkürzen können. Moderat erhöhte ROS Spiegel hingegen sind in der Lage vor Apoptose zu schützen, zum Teil über die Aktivierung antioxidativer Mechanismen, und tragen so zu einer gewissen Langlebigkeit diverser Organismen bei [48 - 50].

So konnte auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Zeitregime, bzw. im Vergleich verschiedener Hypoxieformen, die geringste Apoptoserate nach Auslösung von Zellstress nach episodischer Hypoxie detektiert werden. Es wird vermutet, dass die hiermit verbundenen protektiven Mechanismen zum verspäteten Beginn der Gewebeschädigung beitragen, die in früheren Versuchen 6 Wochen nach CsA Behandlung zu verzeichnen waren [28]. Während Lee *et al.* & Zhao *et al.* beschreiben, dass erhöhte ROS Level zu einer verbesserten HIF Aktivität führen, was wiederum die ROS Mengen reduziert, scheint die hier beobachtete Widerstandsfähigkeit gegenüber Apoptose HIF unabhängig zu sein [51, 52]. Entgegen unserer Annahme eines

Zusammenhangs zwischen der fehlenden HIF Antwort in episodischer Hypoxie und den nephrotoxischen Nebenwirkungen der CsA Therapie, zeigten die DCT-Zellen in episodischer Hypoxie sogar eine Verstärkung anti-apoptotischer Schutzmechanismen.

Obwohl einige *in vivo* Ergebnisse *in vitro* reproduziert werden konnten, ist anzunehmen, dass CsA weitere Mechanismen beeinflusst. D' Angelo *et al.* konnten nachweisen, dass eine einzelne CsA Gabe *in vitro* die hypoxieabhängige HIF-1 α Stabilisierung verhindern kann, was ein intaktes Proteasom erfordert [53]. Unsere *in vivo* und *in vitro* Versuche hingegen ergaben eine HIF-1 α Akkumulation und weisen damit auf einen von HIF Hydroxylierung und proteasomalem Abbau abweichenden Mechanismus hin. Abhängig von Zeitpunkt, Dauer und Zelltyp scheinen also verschiedene Signalwege zu existieren, die die HIF Aktivität verhindern.

Allgemein weist eine Vielzahl von Daten aus der Niere auf ein Zusammenspiel aus ROS und Inflammation als Ursache der renalen Schädigung durch Ischämie / Reperfusion, zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis oder akuten Infarzierung hin [54]. Episodische Hypoxie wie in dieser Arbeit untersucht, ist letztlich eine wiederkehrende Abfolge zwischen Hypoxie und Reoxygenierung. Entgegen der Annahme, dass eine möglichst schnelle Reoxygenierung nach Hypoxie durch ein Wiederauffüllen der ATP-Reserven und eine Wiederherstellung der zellulären Homöostase das Überleben der Zelle sichert, kann die Gewebeschädigung durch Reoxygenierung noch verstärkt werden. Dieses Phänomen wird unter anderem auf das Ungleichgewicht zwischen einer vermehrten ROS Produktion durch Reoxygenierung einerseits und der Unfähigkeit der noch energiedepletierten Zelle, diese ROS zu detoxifizieren andererseits, zurückgeführt [55]. Mit der Präkonditionierung ist ein Phänomen bekannt geworden, das intrinsische zelluläre Schutzmechanismen aktivieren und so eine Adaptation an Zellstress ermöglichen kann [56]. Zellen, die einem transienten, subletalen Stress, wie beispielsweise kurzen Hypoxien, ausgesetzt werden, entwickeln also eine gewisse Toleranz gegenüber einem folgenden, potentiell tödlichen Stressor [57]. Auch bei der Präkonditionierung spielt HIF u.a. als Initiator der Reprogrammierung des zellulären Energiestoffwechsels und als Vermittler zwischen oxidativem Stress und der Immunantwort eine entscheidende Rolle [36]. Darüber hinaus ist bekannt, dass ROS in geringen Mengen als Signalmediatoren fungieren und so im Rahmen von Präkonditionierung „Survival“-Programme der Zelle aktivieren können. Unter anderem wird Ihnen ein Einfluss auf die Gefäßweite und damit auf die metabolischen Anforderungen zugeschrieben [57]. Für HIF konnten sowohl vorteilhafte als auch nachteilige Effekte im Kontext von intermittierender Hypoxie und Hypoxie / Reoxygenierung gezeigt werden. Während HIF im Allgemeinen ein zelluläres Überleben in Sauerstoffmangelsituationen ermöglicht, indem er eine vom Sauerstoff unabhängige ATP-Produktion begünstigt, spielt er andererseits eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung renaler Fibrose [52, 58 - 61]. In unserem Modell wird von einer weitestgehend HIF unabhängigen zellulären Anpassung ausgegangen, da die gewählte Hypoxie-Zeit von 4 h pro Tag offenbar zu kurz für eine adäquate HIF Antwort ist. Parallelen

zwischen zellulärer Konditionierung wie in dieser Studie beobachtet und dem Phänomen „Präkonditionierung“ sollten weiter untersucht werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass das vorliegende *in vitro* Modell episodischer Hypoxie eine HIF unabhängige Antwort hervorruft und in dieser Hinsicht den Ergebnissen der CsA Versuche *in vivo* entspricht. Die HIF Akkumulation, die sich jedoch hauptsächlich auf das Cytosol zu beschränken scheint und daher nicht zu einer Aktivierung entsprechender HIF Zielgene führt, wurde verifiziert. Zudem konnte gezeigt werden, dass Zellen in episodischer Hypoxie einen moderaten Anstieg der Menge reaktiver Sauerstoffspezies aufweisen, was mit einem gewissen Schutz vor Apoptose korreliert. Es wird angenommen, dass die Zellen in episodischer Hypoxie ein gewisses „zelluläres Gedächtnis“ für die Dauer und Periodik der Zyklen von Hypoxie / Reoxygenierung bzw. eine Konditionierung aufbauen und so eine adäquate Adaptation initiieren können, die vor allem eine suffiziente ROS Eliminierung beinhaltet.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich episodische Hypoxie im Kontext von CsA von allgemeinen Modellen intermittierender Hypoxie sowie anhaltender Hypoxie oder HIF Aktivierung teilweise unterscheidet. Die hier aktivierten Schutzmechanismen könnten die CsA vermittelten nephrotoxischen Effekte abmildern, sie aber möglicherweise aufgrund der fehlenden schützenden Effekte von HIF auf lange Sicht nicht verhindern.

Zukünftige Forschungsbemühungen werden die molekularen Mechanismen hinter den anti-apoptotischen Effekten episodischer Hypoxie und ihren Einfluss auf Gewebeschädigung fokussieren, um mögliche Zielstrukturen für eine Abmilderung nephrotoxischer Nebenwirkungen von CsA zu identifizieren. Weitere Untersuchungen sind außerdem nötig, um die spezifischen Regulatoren der HIF-1 Aktivität / Translokation in episodischer Hypoxie zu entschlüsseln und die Pathogenese der Organschädigung durch Hypoxie / Reoxygenierung zu beleuchten. Ob der moderate Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies, die fehlende HIF Antwort oder ein anderer Mechanismus die langfristige, CsA vermittelte Nephrotoxizität bestimmt, muss in weiteren Untersuchungen ermittelt werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Jeltsch A. Oxygen, epigenetic signaling, and the evolution of early life. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(4):172-6.
2. Schonenberger MJ, Kovacs WJ. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:42
3. Fratantonio D, Cimino F, Speciale A, Virgili F. Need (more than) two to Tango: Multiple tools to adapt to changes in oxygen availability. *Biofactors.* 2018;44(3):207-18.
4. Lopez-Barneo J, Pardal R, Ortega-Saenz P. Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:259-87.
5. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(9):4304-8.
6. Katschinski DM. In vivo functions of the prolyl-4-hydroxylase domain oxygen sensors: direct route to the treatment of anaemia and the protection of ischaemic tissues. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;195(4):407-14.
7. Haase VH. The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int.* 2006;69(8):1302-7.
8. Andringa KK, Agarwal A. Role of hypoxia-inducible factors in acute kidney injury. *Nephron Clin Pract.* 2014;127(1-4):70-4.
9. Shih HM, Wu CJ, Lin SL. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(11):955-63.
10. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(12):967-75.
11. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt KU. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013;40(2):148-57.
12. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(9):364-72.
13. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev.* 2012;92(3):967-1003.
14. Yang C, Jiang L, Zhang H, Shimoda LA, DeBerardinis RJ, Semenza GL. Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. *Methods Enzymol.* 2014;542:425-55.
15. Bivol LM, Iversen BM, Hultstrom M, Wallace PW, Reed RK, Wiig H, Tenstad O. Unilateral renal ischaemia in rats induces a rapid secretion of inflammatory markers to renal lymph and increased capillary permeability. *J Physiol.* 2016;594(6):1709-26.
16. Sumbayev VV, Yasinska IM. Mechanisms of hypoxic signal transduction regulated by reactive nitrogen species. *Scand J Immunol.* 2007;65(5):399-406.
17. Clanton TL. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2007;102(6):2379-88.
18. Allaman I, Magistretti PJ. *Fundamental Neuroscience, Fourth Edition.* Elsevier Inc. 2014;261.
19. Hargreaves M. Skeletal muscle metabolism during exercise in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27(3):225-8.
20. Kriz W. [Renal medullary circulation: morphological characteristics of vessels and their organization]. *Klin Wochenschr.* 1982;60(18):1063-9.

21. Bagnasco S, Good D, Balaban R, Burg M. Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *Am J Physiol.* 1985;248(4 Pt 2):F522-6.
22. Zhuo JL, Li XC. Proximal nephron. *Compr Physiol.* 2013;3(3):1079-123.
23. Mole DR, Ratcliffe PJ. Cellular oxygen sensing in health and disease. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(5):681-94.
24. Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, Prabhakar NR. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4321-8.
25. Nanduri J, Yuan G, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Transcriptional responses to intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;164(1-2):277-81.
26. Prabhakar NR, Kumar GK, Nanduri J, Semenza GL. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(9):1397-403.
27. Niecknig H, Tug S, Reyes BD, Kirsch M, Fandrey J, Berchner-Pfannschmidt U. Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia. *Free Radic Res.* 2012;46(6):705-17.
28. Föhling M, Mathia S, Scheidl J, Abramovitch R, Milman Z, Paliege A, Peters H, Persson PB, Heyman SN, Rosenberger C. Cyclosporin a induces renal episodic hypoxia. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219(3):625-39.
29. Azzi JR, Sayegh MH, Mallat SG. Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without. *J Immunol.* 2013;191(12):5785-91.
30. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med.* 2000;342(9):605-12.
31. Baxter CR, Duggin GG, Willis NS, Hall BM, Horvath JS, Tiller DJ. Cyclosporin A-induced increases in renin storage and release. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1982;37(2):305-12.
32. Damiano S, Trepiccione F, Ciarcia R, Scanni R, Spagnuolo M, Manco L, Borrelli A, Capasso C, Mancini R, Schiattarella A, Iervolino A, Zacchia E, Bata-Csere A, Florio S, Anastasio P, Pollastro R, Mancini A, Capasso G. A new recombinant MnSOD prevents the cyclosporine A-induced renal impairment. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(8):2066-72.
33. Föhling M, Mathia S, Paliege A, Koesters R, Mrowka R, Peters H, Persson PB, Neumayer HH, Bachmann S, Rosenberger C. Tubular von Hippel-Lindau knockout protects against rhabdomyolysis-induced AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(11):1806-19.
34. Heß V, Kasim M, Mathia S, Persson PB, Rosenberger C, Föhling M. Episodic Hypoxia Promotes Defence Against Cellular Stress. *Cell Physiol Biochem.* 2019;52(5):1075-91.
35. Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25(6):297-310.
36. Kapitsinou PP, Haase VH. Molecular mechanisms of ischemic preconditioning in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;309(10):F821-34.
37. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).* 2004;19:176-82.
38. Luo W, Wang Y. Epigenetic regulators: multifunctional proteins modulating hypoxia-inducible factor-alpha protein stability and activity. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(6):1043-56.
39. Shin DH, Li SH, Chun YS, Huang LE, Kim MS, Park JW. CITED2 mediates the paradoxical responses of HIF-1alpha to proteasome inhibition. *Oncogene.* 2008;27(13):1939-44.

40. Morgan AE, Davies TJ, Mc Auley MT. The role of DNA methylation in ageing and cancer. *Proc Nutr Soc.* 2018;77(4):412-22.
41. Kosyna FK, Nagel M, Kluxen L, Kraushaar K, Depping R. The importin alpha/beta-specific inhibitor Ivermectin affects HIF-dependent hypoxia response pathways. *Biol Chem.* 2015;396(12):1357-67.
42. Laderoute KR, Webster KA. Hypoxia/reoxygenation stimulates Jun kinase activity through redox signaling in cardiac myocytes. *Circ Res.* 1997;80(3):336-44.
43. Ryou MG, Choudhury GR, Li W, Winters A, Yuan F, Liu R, Yang SH. Methylene blue-induced neuronal protective mechanism against hypoxia-reoxygenation stress. *Neuroscience.* 2015;301:193-203.
44. Koritzinsky M, Wouters BG. The roles of reactive oxygen species and autophagy in mediating the tolerance of tumor cells to cycling hypoxia. *Semin Radiat Oncol.* 2013;23(4):252-61.
45. Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest.* 2015;147(1):266-74.
46. Bhaskara VK, Mohanam I, Rao JS, Mohanam S. Intermittent hypoxia regulates stem-like characteristics and differentiation of neuroblastoma cells. *PLoS One.* 2012;7(2):e30905.
47. Prabhakar NR, Kumar GK. Oxidative stress in the systemic and cellular responses to intermittent hypoxia. *Biol Chem.* 2004;385(3-4):217-21.
48. Hekimi S, Wang Y, Noe A. Mitochondrial ROS and the Effectors of the Intrinsic Apoptotic Pathway in Aging Cells: The Discerning Killers! *Front Genet.* 2016;7:161.
49. Park SH, Ozden O, Jiang H, Cha YI, Pennington JD, Aykin-Burns N, Spitz DR, Gius D, Kim HS. Sirt3, mitochondrial ROS, ageing, and carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2011;12(9):6226-39.
50. Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett.* 2004;577(3):427-33.
51. Lee SJ, Hwang AB, Kenyon C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr Biol.* 2010;20(23):2131-6.
52. Zhao T, Zhu Y, Morinibu A, Kobayashi M, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hiraoka M, Harada H. HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Sci Rep.* 2014;4:3793.
53. D'Angelo G, Duplan E, Vigne P, Frelin C. Cyclosporin A prevents the hypoxic adaptation by activating hypoxia-inducible factor-1alpha Pro-564 hydroxylation. *J Biol Chem.* 2003;278(17):15406-11.
54. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev.* 2015;4(2):20-7.
55. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015;6:524-51.
56. Shokeir AA, Hussein AM, Awadalla A, Samy A, Abdelaziz A, Khater S, Barakat N. Protection against renal ischaemia/reperfusion injury: A comparative experimental study of the effect of ischaemic preconditioning vs. postconditioning. *Arab J Urol.* 2012;10(4):418-24.
57. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* 2014;2:702-14.
58. Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of kidney fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5(Suppl 1):S16.

59. Howell NJ, Tennant DA. The role of HIFs in ischemia-reperfusion injury. *Hypoxia (Auckl)*. 2014;2:107-15.
60. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev*. 2003;7(1):35-51.
61. Kimura K, Iwano M, Higgins DF, Yamaguchi Y, Nakatani K, Harada K, Kubo A, Akai Y, Rankin EB, Neilson EG, Haase VH, Saito Y. Stable expression of HIF-1alpha in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(4):F1023-9.

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Vicky Süß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zelluläre Adaptationsmechanismen in episodischer Hypoxie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Für die im Rahmen der Dissertation entstandene Publikation wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Top-Journal-Publikation:

Vicky Heß, Mumtaz Kasim, Susanne Mathia, Pontus B. Persson, Christian Rosenberger, Michael Fähling

“Episodic hypoxia promotes defence against cellular stress”

Cellular Physiology and Biochemistry. **2019**;52(5):1075-1091. doi: 10.33594/000000073.

Beitrag im Einzelnen:

Die Entwicklung der Projektidee erfolgte zusammen mit meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Fähling und Frau Dr. Mumtaz Kasim. Im Rahmen eines mehrwöchigen Laborpraktikums hatte ich die Möglichkeit, mich in die üblichen Methoden einzuarbeiten, die in einem molekularbiologischen- bzw. Zellkulturlabor relevant sind, wodurch ich während der Phase der Versuchsdurchführung dazu in der Lage war, die für die vorliegende Arbeit nötigen Experimente selbständig zu planen, durchzuführen und auszuwerten, wobei stets in der Gruppe der Koautoren über mögliche Verbesserungen und Änderungen diskutiert wurde und ich in sämtlichen Anliegen von den Erfahrungen der Arbeitsgruppe profitieren konnte. Hierfür wendete ich die üblichen Protokolle der Arbeitsgruppe an und passte sie, wann immer nötig, an besondere Erfordernisse der Versuche an. Die Arbeit mit der Zellkultur inklusive der Plasmidpräparation, Zelltransfektion mit anschließender Messung und Auswertung der Reporter-Gen-Assays sowie die Aufarbeitung der Zellen mit Gewinnung von RNA und Protein, die Synthese von cDNA, qPCR-Versuche, differentielle Zentrifugation und Western Blots wurden von mir geplant, durchgeführt und ausgewertet, wobei ich insbesondere bei der statistischen Auswertung und der grafischen Darstellung von Frau Dr. Kasim und Herrn Prof. Dr. Fähling unterstützt wurde. Die Etablierung des Protokolls für die Methylierungsuntersuchungen sowie dessen Ausführung und Anpassung konnte ich vollständig in Eigenarbeit absolvieren. Obwohl ich die Laborarbeiten und deren zahlreiche Wiederholungen zumeist selbständig durchführte, danke ich Frau Jeannette Schmidt, Frau Ursula Kastner und Frau Heide Lück dafür, dass sie mich mit einigen dieser Arbeiten unterstützten. Frau Dr. Kasim plante die ROS-Assays und Apoptoseinduktionsversuche, führte diese durch und wertete sie aus. Frau Dr. Susanne Mathia und Herr Prof. Dr. Christian Rosenberger trugen hauptsächlich zu den *in vivo*-Ergebnissen bei, indem sie die entsprechenden Tierversuche mit CsA, VHL-Knockout und Rhabdomyolyse-induziertem Nierenversagen durchführten, deren RNA Herr Prof. Dr. Fähling für qPCR-Versuche und Microarray-Analysen nutzen konnte. Herr Prof. Dr. Fähling wertete die Microarraydaten aus und führte die Gene Ontology-Analysen durch, die als Grundlage der weiteren Projektplanung dienten. Für die

Erstellung des Manuskriptes erfolgten diverse Diskussionen im Kreis der Koautoren. Die Konzeption und Ausformulierung erfolgten hauptsächlich durch uns Erstautoren, Frau Dr. Kasim und mich. Zusammen mit Herrn Prof. Dr. Fähling und Herrn Prof. Dr. Rosenberger, der insbesondere die Verbindung unserer Untersuchungen zur klinischen Anwendung diskutierte, konnten wir das Manuskript überarbeiten und fertigstellen. Die Bearbeitung der Revision erfolgte durch mich und meinen Doktorvater. Während des gesamten Projektes erhielten wir zudem hilfreiche Hinweise zu nötigen Projektüberarbeitungen von unserem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Pontus Persson.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

8. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"PHYSIOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 83 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	PHYSIOLOGICAL REVIEWS	27,680	24.014	0.030380
2	Annual Review of Physiology	9,111	14.327	0.013180
3	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	9,079	11.613	0.008600
4	PHYSIOLOGY	3,235	5.947	0.005780
5	Acta Physiologica	4,489	5.930	0.008330
6	Comprehensive Physiology	3,159	5.797	0.013090
7	International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity	8,371	5.548	0.019780
8	CELLULAR PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY	11,234	5.500	0.017450
9	EXERCISE AND SPORT SCIENCES REVIEWS	2,935	5.065	0.003070
10	JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON	48,647	4.540	0.045010
11	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY	13,256	4.092	0.016920
12	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	18,777	4.018	0.022800
13	JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY	18,225	3.923	0.019990
14	JOURNAL OF BIOLOGICAL RHYTHMS	3,031	3.906	0.003440
15	JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY	7,802	3.680	0.009350
16	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY	28,039	3.569	0.027570
17	Conservation Physiology	856	3.460	0.003160
18	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-CELL PHYSIOLOGY	15,675	3.454	0.015940
19	PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY	4,805	3.440	0.005730

Original Paper

Episodic Hypoxia Promotes Defence Against Cellular Stress

Vicky Heß^a Mumtaz Kasim^a Susanne Mathia^{a,b} Pontus B. Persson^a
Christian Rosenberger^b Michael Fähring^a

^aDepartment of Vegetative Physiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, ^bDepartment of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

Key Words

Episodic hypoxia • Intermittent hypoxia • Cycling hypoxia • Hypoxia-inducible factor (HIF) • Cyclosporine A • Reactive oxygen species (ROS) • Apoptosis

Abstract

Background/Aims: Recently, we have demonstrated that episodic hypoxia occurs in kidneys of mice challenged repetitively with the immunosuppressant cyclosporine A (CsA), in analogy to humans on CsA treatment. However, the molecular consequences of episodic hypoxia remain poorly defined, as is its impact on cell survival. Here, we systematically study cell response to episodic, as compared to single course hypoxia. **Methods:** *In vivo*, kidneys of mice challenged daily with CsA for one week were analyzed by microarray analysis, gene ontology analysis, and qPCR. *In vitro*, renal cells were subjected to hypoxia (1 % O₂) which was either episodic (4 h for 6 consecutive days), short-term (4 h), or sustained (24 h). Western blot analysis quantified hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). 2',7'-dichlorofluorescein diacetate detected intracellular ROS. After re-oxygenation, staurosporine served to induce apoptosis, quantified by active caspase-3. **Results:** *In vivo*, HIF target gene expression was suppressed by daily CsA treatment. Yet, we found up-regulation of genes involved in defence against cellular stress, notably against ROS. Renal cells *in vitro* behaved largely different under episodic and sustained hypoxia, while their response to short-term hypoxia oscillated between the previous two. Episodic hypoxia exhibited the highest total HIF-1 α protein level, lowest nucleus-to-cytoplasm ratio, and lowest HIF target gene expression. When compared with normoxia, re-oxygenation after sustained hypoxia increased ROS by 3.04 \pm 1.04 fold ($p < 0.001$), and re-oxygenation after episodic hypoxia by 1.26 \pm 0.16 fold ($p < 0.01$). Staurosporine-induced active caspase-3 was highest after sustained, and lowest after episodic hypoxia. **Conclusion:** *In vitro* episodic hypoxia mimics the largely HIF-independent transcriptome observed after repetitive CsA treatment *in vivo*. *In vitro* preconditioning with episodic hypoxia protects against stress-

V. Heß and M. Kasim contributed equally to this work.

Michael Fähring

Institut für Vegetative Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Charitéplatz 1, D-10117 Berlin (Germany)
Tel. +49 30 450 528268, Fax +49 30 450 7528972, E-Mail michael.faebling@charite.de

induced apoptosis. Despite of its long-term adverse effects, CsA derived episodic hypoxia induces a unique renal hypoxia response that provides adaptation to re-oxygenation mediated ROS damage.

© 2019 The Author(s). Published by
Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Introduction

Cellular injury caused by hypoxia-re-oxygenation (H/R) is immanent in organ transplantation, and in various ischemic diseases. Cycles of H/R may occur chronically, as in obstructive sleep apnea, or in preterm infants with immature respiratory control [1-3]. Cellular H/R is also a key player in ischemia/reperfusion injury that leads to organ damage [4]. Key mediators of H/R injury are cellular hypoxia and the generation of reactive oxygen species (ROS). Hypoxia boosts hypoxia inducible factors (HIF), which elicit canonical transcriptional activation of survival genes promoting adaptation to decreased oxygen levels. HIF is a heterodimeric oxygen-sensing transcription factor consisting of a regulated alpha subunit (HIF- α) and a constitutively expressed beta subunit (HIF- β). Under normoxic conditions, oxygen-dependent hydroxylation of HIF- α subunit by prolyl hydroxylase domain containing proteins (PHD) targets HIF- α for degradation by the proteasome [5]. While three different isoforms of HIF- α exist (HIF-1 α , 2 α , 3 α), HIF-1 and HIF-2 are primarily responsible for target gene activation in hypoxia [6, 7]. In general, HIF-1 is responsible for the initial response to hypoxia with HIF-2 coordinating the gene response under more prolonged hypoxic conditions in specific cell types [8, 9]. Recently, we have shown that treatment with the immunosuppressant cyclosporine A (CsA), which is standard of care in organ transplantation [10], in mice leads to transient renal hypoxia, as revealed by pimonidazole adducts, deoxygenated hemoglobin content, and accumulation of HIF-1 α [11]. Since with repetitive CsA treatment the above mentioned hypoxia markers largely oscillated within 24 h, we proposed the term “episodic hypoxia”, in order to delimitate this from continuous hypoxia generally employed in experimental models. The reasons for CsA-induced organ hypoxia are incompletely understood, but most likely include vasoconstriction [12] and generation of reactive oxygen species (ROS) [13]. In both, humans and rodents, chronic CsA treatment eventually leads to renal toxicity with so-called striped tubular-interstitial fibrosis. This is highly suggestive of a hypoxic cause, given the poor physiological oxygen supply to medullary rays [14]. Nevertheless, the mechanisms leading to CsA-induced kidney fibrosis are still incompletely understood. It has been proposed that in hypoxic areas, such as medullary rays, HIF would promote fibrosis through pro-fibrotic target genes [15-17]. Interestingly, in some tumor cells it has been shown that CsA acts as a potent inhibitor of HIF-1 α expression by accelerating the VHL-independent proteasomal degradation of the protein [18]. Moreover, in C6 glioma cells, CsA prevented HIF-1 α stabilization during hypoxia and, thus, inhibited HRE (hypoxia response element)-mediated hypoxic adaptation [19]. In line with a limited renal HIF response in CsA mediated episodic hypoxia *in vivo*, we found low HIF target gene levels, however, despite of a marked up-regulation of HIF-1 α protein [11]. It is unclear whether such disparity is specific for CsA treatment or a general phenomenon in episodic hypoxia, as are potential cell protective responses. In this study, we replicate episodic hypoxia *in vitro*, and systematically assess its consequences. We find that episodic hypoxia generates a specific, HIF-independent transcriptome, which confers resistance against cellular stress, and protects against apoptosis.

Materials and Methods

Animal Studies

Animal experiments were carried out according to the guidelines of the American Physiological Society. Pax8-erTA/LC1/VHL^{flox+/+} mice were used throughout, and experimental protocols for mice were as previously described [20, 21]. In order to obtain robust and sustained HIF up-regulation, VHL-KO was induced by a single SC injection of doxycycline, and kidneys were harvested 4 d later. This time lag was necessary to allow full establishment of the knock-out. Kidneys from untreated animals served as controls. In order to induce *in vivo* episodic hypoxia, seven daily SC injections of CsA (60 mg/kg) were delivered, and kidneys harvested 2 h after the last injection. Control animals received the CsA solvent cremophore [11]. Animal experiments with CsA were conducted without doxycycline induction.

Cell culture and *in vitro* hypoxia protocols

Mouse distal convoluted tubule (DCT) cells (gift from Dr. Peter A. Friedman) were cultured in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Human fibrosarcoma (HT1080) cells (DSMZ, Germany; ACC 315) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10 mM Hepes and 10% FBS. Cells were cultured under normoxia (21% O₂, 5% CO₂, 37°C) or placed in a hypoxia incubator (1% O₂, 5% CO₂, 37°C). Three *in vitro* hypoxia protocols were used (Fig. 1): Short-term hypoxia was chosen to replicate a single injection of CsA in mice, which led to a marked accumulation of hypoxia markers by 2 h [11]. Incubation time *in vitro* was set at 4 h, appreciating that some additional time would be needed for ambient oxygenation to reach its designated level. In mice, episodic hypoxia had consisted of 7 daily doses of CsA, with kidneys harvested 2 h after the last dose [11]. *In vitro*, we opted for 6 daily courses of short-term hypoxia (4 h, see above), with cell harvesting immediately after the last course. Although this was one day short of the corresponding *in vivo* experiment, we felt it was appropriate, since combined hypoxia time thus matched the 24 h of sustained hypoxia, the third protocol employed. The latter was chosen as the benchmark of hypoxia research.

Microarrays/ gene ontology (GO)-Analysis

Total RNA was extracted using RNA Bee (Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH) from halved kidneys harvested from control (n=5) and CsA treated (n=5) mice. The integrity of the prepared RNA was checked on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) prior to submission to the Charité Genome Analysis Facility for global gene expression analysis using the Affymetrix Mouse Gene ST 2.0 (Affymetrix Inc.). Microarray data were submitted to the Gene Expression Omnibus [GSE111516].

Microarray data served for functional enrichment analysis using the Web-based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt) [22]. Enrichment analysis of gene sets that were significantly either upregulated or downregulated in control animals or mice following one week of daily CsA treatment was performed based on the Gene Ontology, KEGG Pathway, and WikiPathways databases. To ensure high stringency, we selected groups of regulated genes according to a p-value < 0.01.

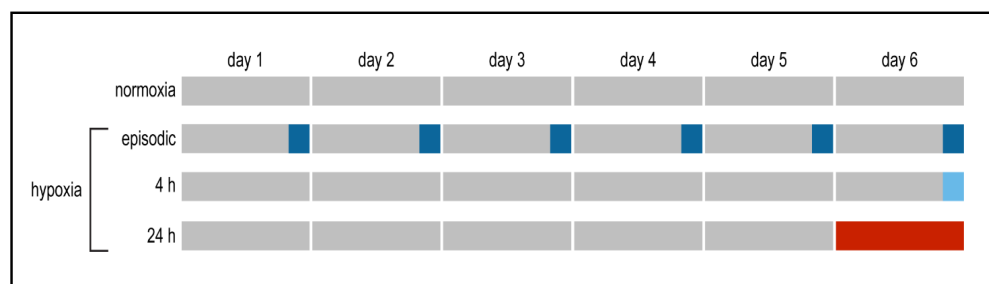


Fig. 1. Schematic of the experimental *in vitro* design used to create the different models of hypoxia. Renal (DCT) cells exposed to periods of normoxia are shown as grey boxes, short periods of 4 h hypoxia as short blue boxes, and sustained 24 h hypoxia as a longer red box. Note that episodic hypoxia, which consists of 6 daily doses of 4 h hypoxia each, is shown in a darker shade of blue.

RNA extraction and qPCR

Total RNA was extracted using RNA-Bee (Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH). mRNA levels were quantified by real time PCR measurements and performed in triplicates (StepOnePlus, Applied Biosystems). PCR steps were defined as follows: 10 min at 95° C and 40 cycles composed of 15 s at 95°C, 1 min annealing at 62°C, and 30 s elongation at 77°C. When possible, primers were designed to span an exon junction. The primer sequences used are as following: 18S_rRNA_Fw: 5'-GATCAAACCAACCCGGTCA; 18S_rRNA_Re: 5'-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCT; AldoC_Fw: 5'-GCTGAGCCAAATTGGGGTGG; AldoC_Re: 5'-CCATCCAGCCCTTGAGTGGT; Hk2_Fw: 5'-GTGCATCGCGGACTTCCTTG; Hk2_Re: 5'-GGCGAATGGCTTCCTTCAGC; Slc2a1_Fw: 5'-TCTTAAGTGCCTCAGGGCGT; Slc2a1_Re: 5'-CTCCGTAGCGGTGGTTCCAT; Adm_Fw: 5'-CAGCAGCTACCCTACGGGAC; Adm_Re: 5'-CATCCATTGCTGCGGAACC. mRNA expression levels were normalized to 18S rRNA using the ΔC_t method. Results are shown as arithmetic means of at least three independent biological replicates.

Protein Isolation and Western blot analysis

Total protein extracts were isolated using a lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 6, 8), 4 M urea, 1 % SDS, and 12.5 mM DTT. For investigation of protein translocation to the nucleus, cytosolic and nuclear extracts were prepared by differential centrifugation at 10,000 x g for 10 min in lysis buffer containing 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 25% glucose, 0.1% SDS, 0.5% Nonidet P40, 1x complete protease inhibitor cocktail (Roche) and 1 mM DTT. The S10 supernatant represented the cytoplasmic fraction. The resultant pellet (nuclear fraction) was washed in PBS, re-suspended in lysis buffer and boiled under shaking for 5 min at 95°C. Western blotting was performed as previously described [23]. The following primary antibodies were used: anti-HIF-1 α (10006421, Cayman Chemical), anti-acetyl-Histone H3 (06599, Biomol), anti-Tubb2B (TA 337744, Origene), anti-caspase 3 (AM08377PU-N, Acris), and anti-active caspase 3 (3015-100, Biovision). Secondary antibodies used were donkey anti-rabbit and goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2317 and sc-2031, Santa Cruz Biotechnology).

Cell Transfection and Reporter Gene Assays

Cells were grown in 96-well plates and transfected with the firefly luciferase pGL3-promoter vector (Promega) as a control or its modified variant containing 6 hypoxia responsive elements (6 x HRE) (5' RCGTG) for quantification of the transcriptional activity of HIF-1. Co-transfection of a renilla luciferase vector served as a control for transfection efficiency. Transfections were performed 12 h prior to the final hypoxia cycle (for *in vitro* hypoxia protocols see Fig. 1) using the PolyMag transfection reagent (Oz Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity was detected using the Dual-Glo[®] assay system (Promega) and measured using the Synergy HTX multi-mode reader (BioTek Instruments GmbH).

ROS assay *in vitro*

Following either normoxia, 4 h of hypoxia, 24 h of hypoxia, or the last of 6 daily courses of 4 h hypoxia (episodic hypoxia), cells were treated under normoxic conditions with 10 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, from Sigma) in serum-free media for 30 min in the dark, washed with PBS and allowed to recover in the presence of 0.03 % H₂O₂ for 30 min. Fluorescence intensity was read on a Synergy HTX multi-mode plate reader (BioTek Instruments GmbH). For each condition, 4 separate samples were used for cell counting. Fluorescence reads were normalized to cell number.

Induction of apoptosis *in vitro*

Following the above-described protocols, cells were treated with 1 μ M staurosporine (Sigma) for 3 h under normoxic conditions, followed by protein extraction and Western blot to detect apoptosis marker active caspase-3.

Statistics

All values are presented as mean \pm SD. Data were analysed by the unpaired t test or the ANOVA with post hoc Tukey test, as appropriate. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Episodic hypoxia creates a specific transcriptome in vivo

Recently, we have shown in mice that repetitive CsA treatment provoked episodic hypoxia and up-regulation of the regulatory α -subunit of the transcription factor HIF-1 [11]. However, marked up-regulation of HIF-1 α following CsA treatment, does not correlate with an elevated HIF response by detection of classical HIF-1 target genes. When comparing mRNA expression levels of HIF target genes in kidneys of mice following CsA treatment [11] with models of i) renal hypoxia (rhabdomyolysis induced acute kidney injury) [21] or ii) renal tubular HIF activation by VHL-KO [21], it can be demonstrated that the HIF response is absent in CsA mediated episodic hypoxia (Fig. 2).

Therefore, we here moved on to systematically analyze the transcriptome in CsA treated mice. By microarray analysis, we found 3,282 genes changed with a p-value of ≤ 0.01 in kidneys of mice daily treated with CsA for one week. Of these, 1,471 genes were up-regulated

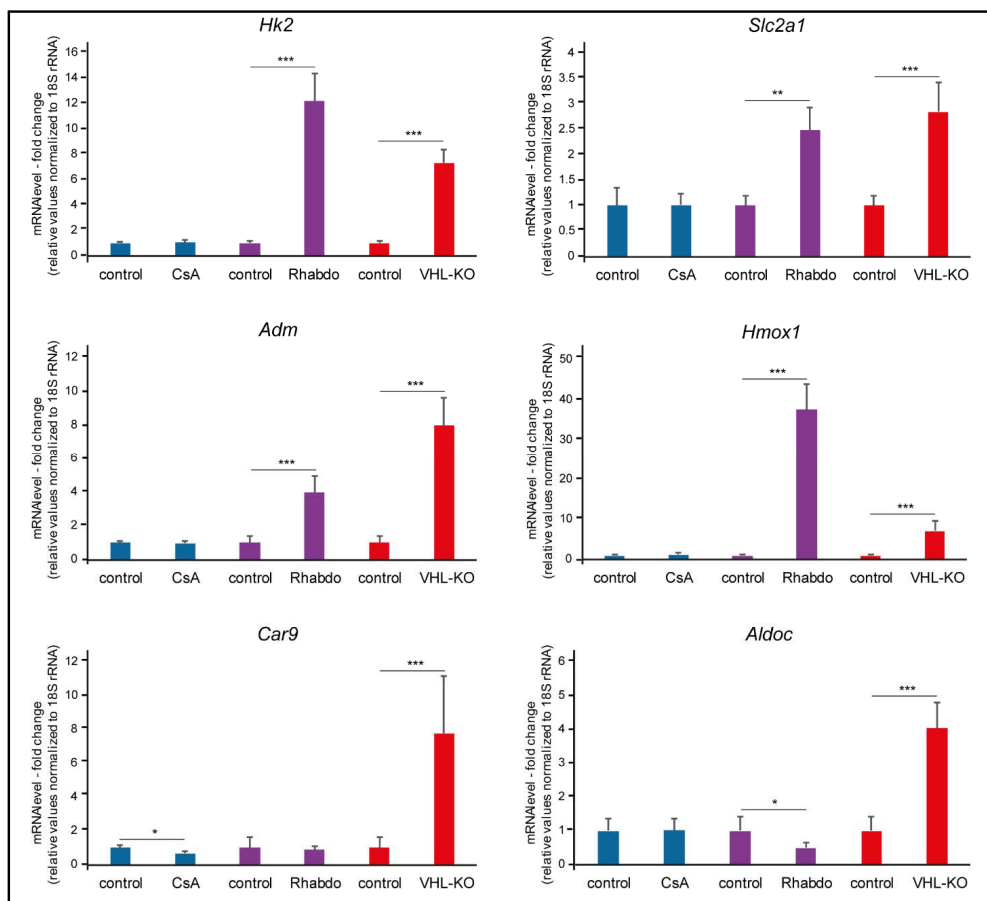


Fig. 2. HIF target genes elevated during renal hypoxia (Rhabdo) or renal HIF activation (VHL-KO) are not changed following CsA treatment. Quantification (qPCR) of renal expression of selected HIF target genes: hexokinase-2 (Hk2), Glucose-1 transporter (Slc2a1 alias Glut1), adrenomedullin (Adm), heme oxygenase-1 (Hmox1), carbonic anhydrase-9 (Car9) and aldolase C (Aldoc) in different in vivo settings. CsA: daily CsA treatment of mice (60 mg/kg BW) for one week as described and shown in [11]. Rhabdo: Rhabdomyolysis induced AKI in mice as a model of renal hypoxia as described and shown in [21]. VHL-KO: transgenic mice with inducible, tubulus specific VHL-knock out served as model of renal HIF activation as described and shown in [21]. *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001.

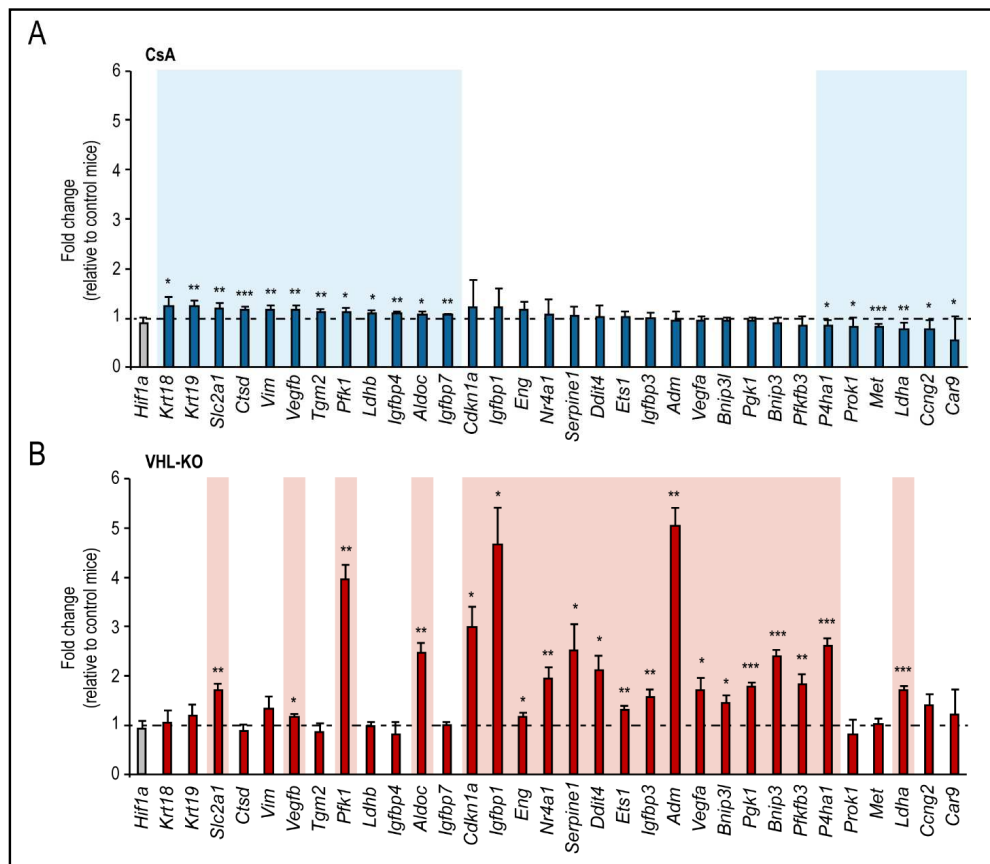


Fig. 3. CsA treatment in vivo leads to only modest activation of HIF-1 signaling. Yet, cellular defense against stress is promoted. (A) Fold changes and associated p-values for known HIF-1 target genes as determined from the microarray analysis are shown for CsA treated mice. (B) For comparison, a typical pattern of these HIF target genes is shown in mice expressing tubular VHL-KO, as a model of renal HIF response (data from GSE44925) [21]. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

and 1,811 genes were down-regulated. In order to characterize the HIF transcriptional response at a more global level, 32 acknowledged HIF target genes with robust renal expression were selected. Fig. 3A depicts the modest activation of HIF target genes in CsA-induced episodic hypoxia. For comparison, and to demonstrate a typical renal HIF response, Fig. 3B shows the alteration of these HIF target genes in kidneys of inducible, tubular specific VHL-KO mice, a transgenic model that elicits prominent renal up-regulation of HIF target genes (see Fig. 2), [21]. In CsA-induced episodic hypoxia, up-regulation of HIF target genes was less frequent, far less prominent, and rarely matching the pattern seen by VHL-KO. Indeed, when performing gene ontology analysis we observed no significant association with the terms “HIF transcriptional response” or “response to hypoxia”, indicating a lack of HIF response in CsA-induced episodic hypoxia. Instead, according to gene ontology analysis, up-regulated genes were significantly linked with the terms “Cytoplasmic Ribosomal Proteins” and “Translation Factors” (Table 1), indicating compensation of mRNA translation that normally is inhibited in hypoxia [24]. Furthermore, we found increased mRNA levels of factors involved in “Electron Transport Chain” and “Oxidative Phosphorylation”, while down-regulation of factors belonging to “TCA Cycle”.

Table 1. Pathways regulated in kidneys of mice following CsA treatment for one week (daily 60 mg/kg BW). Candidate genes that were either up- or down-regulated were selected from microarray data by significant regulation ($p < 0.01$). Enriched pathways (up-regulated: left side; down-regulated: right side) were obtained based on the Gene Ontology, KEGG Pathway, and WikiPathways databases at Web-based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt). C: the number of reference genes in the category, O: the number of genes in the gene set and also in the category, E: the expected number in the category, R: ratio of enrichment, rawP: p-value from hypergeometric test, adjP: p-value adjusted by the multiple test adjustment

CsA: p<0.01 UP		CsA: p<0.01 DOWN	
PathwayName	Statistics	PathwayName	Statistics
Cytoplasmic Ribosomal Proteins	C=77; O=48; E=3.66; R=13.13; rawP=4.10e-44; adjP=4.51e-42	TCA Cycle	C=32; O=17; E=2.09; R=8.12; rawP=1.51e-12; adjP=1.75e-10
Electron Transport Chain	C=99; O=19; E=4.70; R=4.04; rawP=1.78e-07; adjP=9.79e-06	mRNA Processing	C=455; O=57; E=29.78; R=1.91; rawP=1.93e-06; adjP=0.0001
Translation Factors	C=49; O=10; E=2.33; R=4.30; rawP=8.48e-05; adjP=0.0014	Diurnally regulated genes with circadian orthologs	C=48; O=13; E=3.14; R=4.14; rawP=8.56e-06; adjP=0.0002
Oxidative Phosphorylation	C=58; O=11; E=2.75; R=3.99; rawP=7.70e-05; adjP=0.0014	Amino Acid Metabolism	C=112; O=21; E=7.33; R=2.86; rawP=1.08e-05; adjP=0.0002
Macrophage Markers	C=10; O=5; E=0.47; R=10.53; rawP=4.94e-05; adjP=0.0014	Glycogen Metabolism	C=35; O=11; E=2.29; R=4.80; rawP=8.80e-06; adjP=0.0002
Focal Adhesion	C=186; O=22; E=8.83; R=2.49; rawP=7.73e-05; adjP=0.0014	Circadian Exercise	C=49; O=13; E=3.21; R=4.05; rawP=1.10e-05; adjP=0.0002
Complement Activation, Classical Pathway	C=17; O=6; E=0.81; R=7.43; rawP=8.91e-05; adjP=0.0014	Insulin Signaling	C=158; O=24; E=10.34; R=2.32; rawP=9.79e-05; adjP=0.0016
Oxidative Stress	C=28; O=7; E=1.33; R=5.26; rawP=0.0003; adjP=0.0037	Proteasome Degradation	C=59; O=12; E=3.86; R=3.11; rawP=0.0004; adjP=0.0058
Glutathione Metabolism	C=54; O=10; E=2.56; R=3.90; rawP=0.0002; adjP=0.0031	MAPK Signaling Pathway	C=165; O=22; E=10.80; R=2.04; rawP=0.0012; adjP=0.0155

“Focal Adhesion”, “Macrophage Marker” and “Complement Activation, Classical Pathway” support the view of activation of the innate immune system under conditions of CsA, which blocks the adaptive immunity. Finally, “Oxidative Stress” and “Glutathione Metabolism” nicely fit into the picture of episodic hypoxia being a condition of hypoxia/ re-oxygenation that causes elevated ROS levels. Analysis of the down-regulated genes by CsA-induced episodic hypoxia yielded e.g. genes that are involved in circadian rhythms.

Taken together, *in vivo* CsA mediated episodic hypoxia creates a specific transcriptome, clearly distinct from that obtained by HIF activation and/ or sustained hypoxia.

HIF-1 α accumulation and impaired transcriptional activity in episodic hypoxia in vitro

Given the disparity between the abundance of HIF-1 α protein and the lack of HIF target gene expression in CsA-induced episodic hypoxia [11], we attempted to replicate this pattern *in vitro* using renal distal convoluted tubule (DCT) cells. To this end, cells were exposed to 1 % O₂ for 4 h per day on 6 consecutive days (episodic hypoxia). The results were compared with a single 4 h course of (short-term) hypoxia, as well as with 24 h of (sustained) hypoxia (see Fig. 1). The latter is the benchmark protocol for activation of HIF and HIF target genes.

We observed highest levels of HIF-1 α in mouse renal DCT cells following episodic hypoxia (Fig. 4A); a finding that was also observed in human HT1080 fibrosarcoma cells subjected to similar cycles of episodic hypoxia (Fig. 4B). No significant difference, however, was observed when comparing episodic hypoxia to cells exposed to a single 4 h cycle of hypoxia.

Using a HIF dependent luciferase reporter construct where the luciferase gene was cloned downstream of a promoter containing six hypoxia-response elements (6 x HRE) (Fig. 5, left panel), we found that long-term hypoxia induced a 13.2 (+ 3.8)- and 22.0 (+ 4.9)-fold increase in transcriptional activity at 24 h of hypoxia in DCT and HT1080 cells,

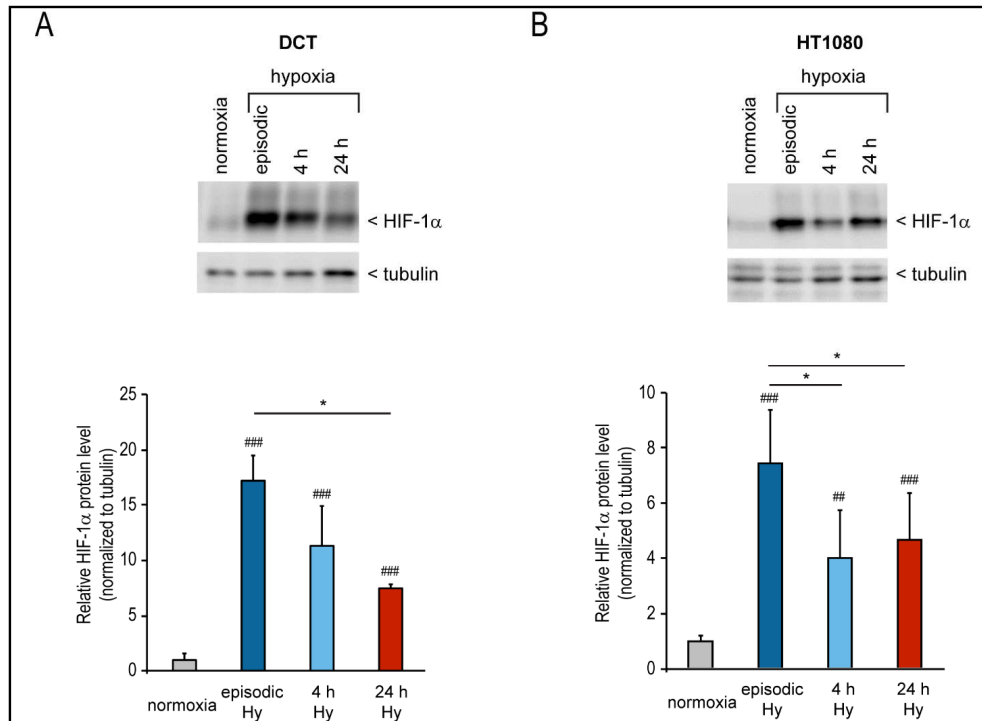


Fig. 4. Episodic hypoxia increases HIF-1 α protein levels. Western blot analysis of HIF-1 α protein levels (top panel) in (A) mouse renal cells (DCT) and (B) human fibrosarcoma cells (HT1080). Quantitation of the data is shown in the bottom panel. Detection of tubulin served as a loading control. Error bars indicate standard deviation (n=3). Significance to normoxia ##: p<0.01, ###: p<0.001. Asterisks denote significance between hypoxic groups. *: p<0.05.

respectively. In comparison, episodic hypoxia induced only a 2.7 (+ 1.0)- and 1.6 (+ 0.5)-fold increase in activity in DCT and HT1080, respectively. Values following episodic hypoxia were significantly (p<0.001) lower than those at 24 h of sustained hypoxia (Fig. 5). No significant alteration, however, was observed between episodic and short-term (4 h) hypoxia. Similar results were obtained by detection of HIF target genes (Fig. 6). All tested HIF target genes were significantly different in episodic hypoxia as compared to sustained hypoxia. Thus, collectively, these data confirm a lack in transcriptional activity of HIF-1 despite increased accumulation of the HIF-1 α protein, supporting the view that episodic hypoxia causes the lack in HIF response observed in CsA treated mice (Fig. 3).

Episodic hypoxia impairs nuclear localization of HIF-1 α

To address the question of how episodic hypoxia impairs HIF activity, we investigated the nuclear localization of HIF-1 α that is a prerequisite for its association with HIF-1 β and downstream transcription factor function. We prepared nuclear and cytoplasmic extracts by differential centrifugation and analyzed for the presence of HIF-1 α in each fraction by Western blot analysis (Fig. 7A). Samples were processed in parallel for total extracts in order to visualize the net accumulation of HIF-1 α and show, as previously observed, a significant increase in HIF-1 α during episodic hypoxia compared to 24 h hypoxia (Fig. 7B). Interestingly, these cells accumulated the least amount of HIF-1 α in the nucleus, with a significantly decreased nuclear/cytoplasmic distribution when compared to both normoxia and to cells exposed to long-term hypoxia (Fig. 7C). This indicates an impaired localization of the newly stabilized HIF-1 α to the nucleus and demonstrates subcellular distribution of HIF-1 α to be a contributing factor in episodic hypoxia.

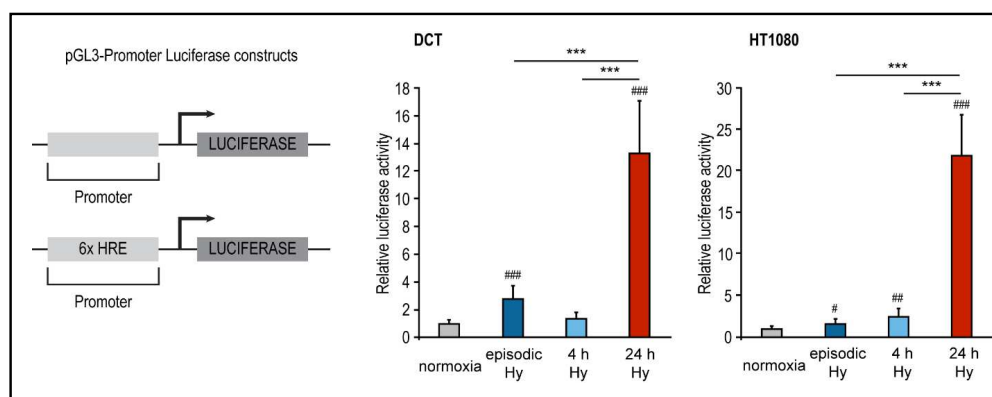


Fig. 5. Limited HIF-1 transcriptional activity in episodic hypoxia. Cells were transfected with a pGL3-Promoter Luciferase construct and its modified variant containing six hypoxia-response elements (6x HRE). Schematic of the used promoter constructs is shown in the left panel. Hypoxia typically induces an increase in 6x HRE-dependent transcription via HIF-1 α stabilization and a subsequent increase in HIF-1 activity. Following exposure to the different types of hypoxia, HRE-dependent transcription of the luciferase gene was measured directly in cellular extracts from DCT (middle panel) and HT1080 (right panel) cells. Transfection efficiency was normalized to the co-transfected renilla luminescence values. Data are expressed relative to the reporter construct without the 6x HRE. Error bars indicate standard deviation (n=8). Significance to normoxia: #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.001$. Asterisks denote significance between hypoxic groups. ***: $p < 0.001$.

ROS produced by re-oxygenation following different forms of hypoxia

To find out whether CsA mediated episodic hypoxia causes specific adaptations despite of the lacking HIF response, we went back to our findings by microarray analysis in CsA treated mice (Table 1). Notably, Gene Ontology analysis indicated activation of the Glutathione system by CsA, which is crucial to prevent from ROS damage. Since, by definition, episodic hypoxia consists of hypoxia/re-oxygenation cycles, an acknowledged source of ROS. Thus, we next screened the transcriptome of CsA-induced episodic hypoxia for ROS scavengers. Indeed, we found nine different transcripts associated with the glutathione antioxidant system that were significantly up-regulated (Fig. 8A, upper panel) with respect to controls. This is in contrast to VHL-KO, the benchmark of HIF-activation, where the same nine candidates were either unchanged or significantly down-regulated (Fig. 8A, lower panel). Obviously, beside the HIF response, activation of ROS detoxification is a hallmark of episodic hypoxia. To verify these observations *in vitro*, we quantified ROS production in renal cells returning to normoxia for 1 h after either episodic, short-term, or sustained hypoxia (Fig. 8B). ROS levels after short-term hypoxia were similar to controls. Interestingly, ROS levels after episodic hypoxia, were modestly, but significantly increased albeit candidate genes of the glutathione system are supposed to be elevated. As expected, ROS levels after sustained hypoxia were markedly increased, and significantly with respect to episodic hypoxia (Fig. 8B).

Our data show that episodic hypoxia leads to a modest increase in ROS, as well as to increased defence against ROS, which most likely is triggered by HIF-independent mechanisms.

Episodic hypoxia protects against apoptosis in vitro

Since our *in vivo* and *in vitro* data indicate that episodic hypoxia is associated with a defence against ROS, we next tested if this translated into a better cell survival in a toxic environment. To this end, cells were pre-exposed to either episodic, short-term, or sustained hypoxia. Then, cells were challenged with staurosporine to induce apoptosis under conditions of re-oxygenation (Fig. 9). Active caspase-3 served as a quantitative marker of apoptosis (Fig.

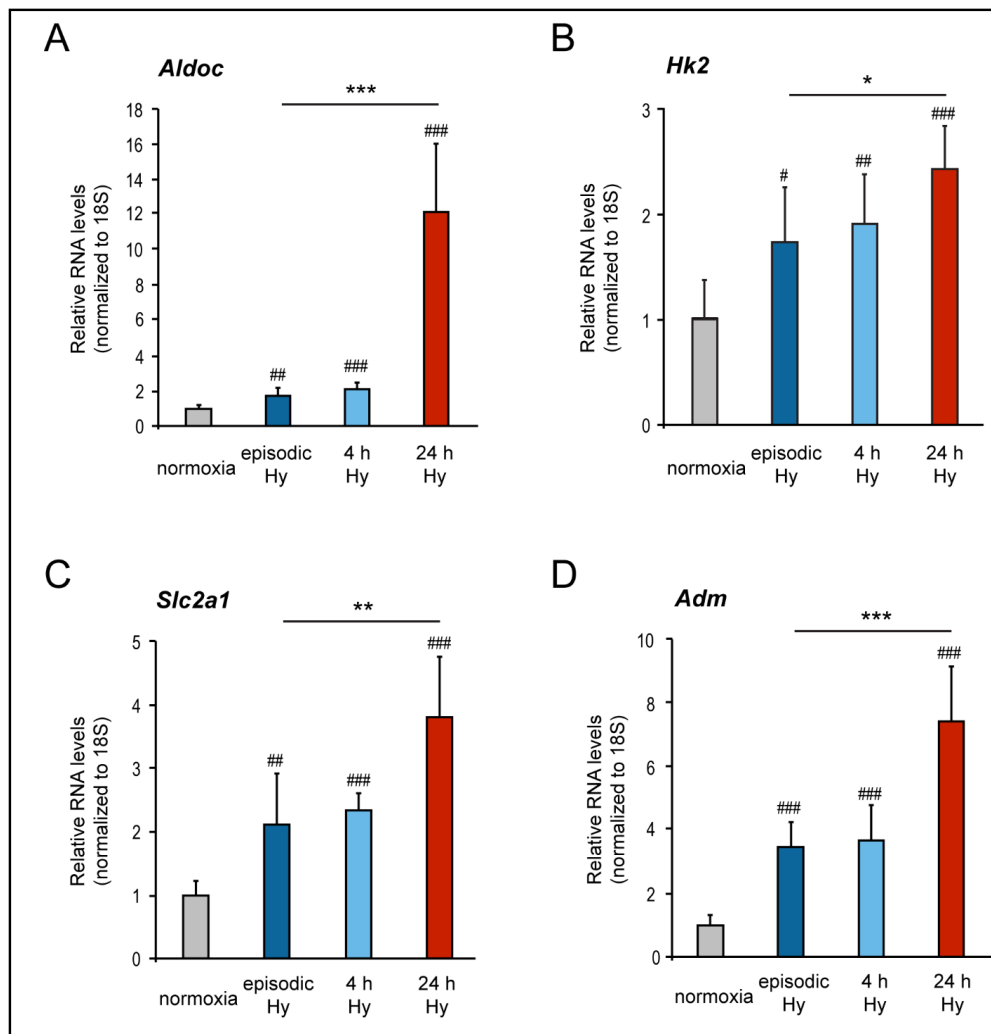
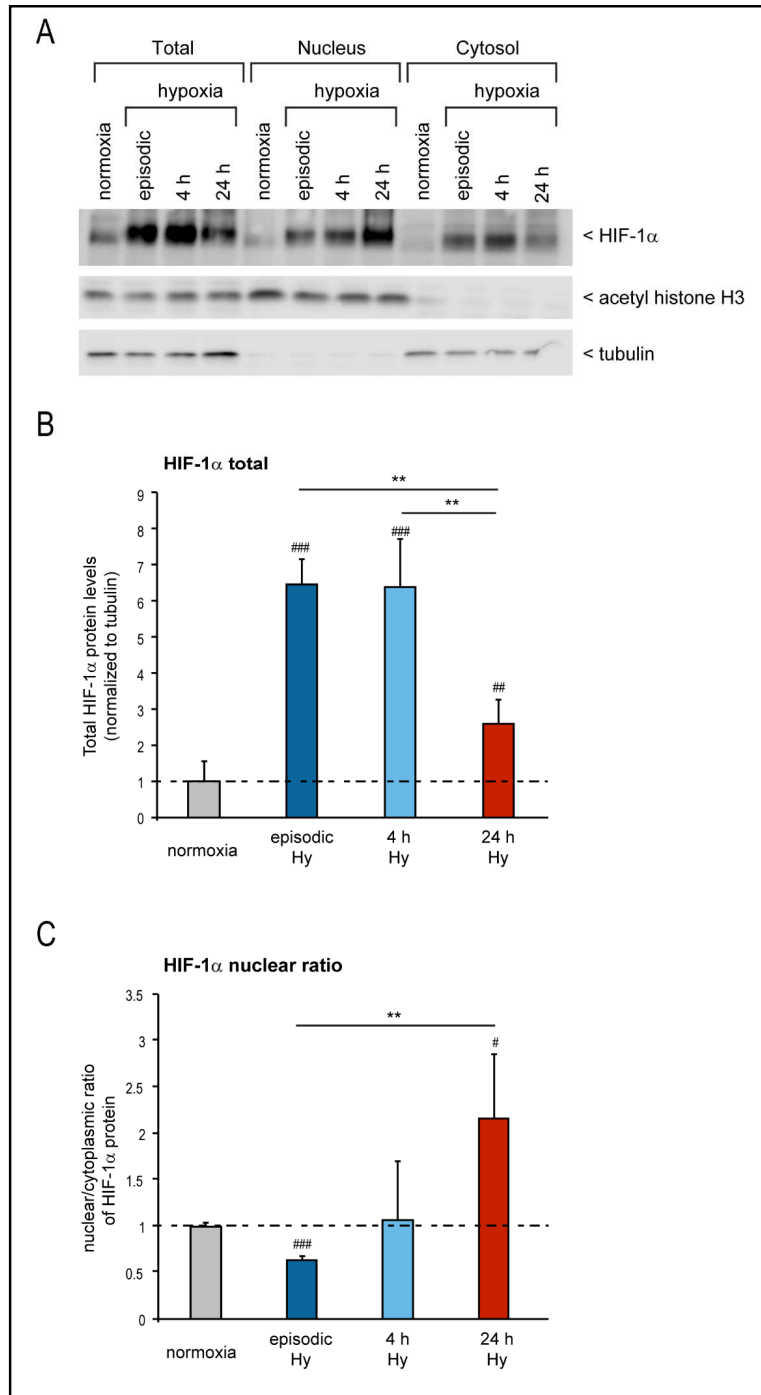


Fig. 6. Limited HIF-1 transcriptional response in episodic hypoxia. Real time PCR analysis of HIF-1 target genes (A) aldolase C (*Aldoc*), (B) hexokinase 2 (*HK2*), (C) solute carrier family 2 (*Slc2a1*, alias *Glut1*), and (D) adrenomedullin (*Adm*) in DCT cells. Values were normalized to 18S ribosomal RNA and significant differences to normoxia indicated with hash signs ###: $p < 0.001$, ##: $p < 0.01$. Asterisks denote significance between hypoxic groups. **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$. Error bars indicate standard deviation ($n = 6$).

9A, D). Pre-treatment with episodic hypoxia significantly reduced staurosporine-induced apoptosis, when compared with both short-term and sustained hypoxia. We further assessed HIF-1 α protein levels under staurosporine treatment. With respect to normoxic controls, all three hypoxic pre-treatment protocols led to a depression of HIF-1 α under staurosporine (Fig. 9A, B), and this effect was most pronounced after sustained hypoxia.

Remarkably, episodic hypoxia showed the least degree of apoptosis, even when compared to 4 h hypoxia, a finding that suggests that repetitive episodic hypoxia provides protection against apoptosis. As HIF-1 α levels and activity, as well as HIF target gene expression showed no differences between short term hypoxia and episodic hypoxia, we conclude that episodic hypoxia mainly mediates protection against re-oxygenation triggered ROS.

Fig. 7. Reduced nuclear accumulation of HIF-1 α in episodic hypoxia. (A) Representative Western blot of HIF-1 α protein levels in total, nuclear and cytosolic fractions after exposure of DCT cells to different types of hypoxia. Tubulin was used as a cytosolic marker and acetyl histone H3 served as a nuclear marker. (B) Quantitation of HIF-1 α protein levels in total cell lysates. Note the stronger increase in HIF1 α level in episodic hypoxia relative to 24 h of hypoxia. (C) Nuclear/cytoplasmic ratio of HIF-1 α protein levels with normoxia set at 1. While following 24 h of hypoxia HIF-1 α predominantly accumulates in the nucleus, episodic hypoxia causes a low nuclear/cytoplasmic ratio. Significance to normoxia #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.001$. Asterisks denote significance between hypoxic groups. **: $p < 0.001$. Error bars indicate standard deviation ($n = 3$).



Discussion

Although hypoxia was generally regarded as detrimental [25-27], preconditioning to hypoxia and intermittent hypoxia may have a beneficial impact on cell differentiation and survival [28-31]. Obviously, hypoxia is of double nature, depending on its extent, length, and timing. Here we systematically studied episodic hypoxia, as a distinct type occurring in both health and disease. Our key findings are that 1) Episodic hypoxia induces a specific transcriptome, which is distinct from that observed after sustained hypoxia; 2) In episodic hypoxia a disparity occurs between marked HIF-1 α accumulation, and low HIF target gene expression; 3) Episodic hypoxia mounts defence against cellular stress; 4) Pre-treatment with episodic hypoxia protects against apoptosis.

This study represents a continuation of our previous work demonstrating that *in vivo* daily CsA treatment provokes episodic hypoxia to the kidney [11]. By global gene expression analysis we confirmed that CsA mediated episodic hypoxia *in vivo* is virtually unable to up-

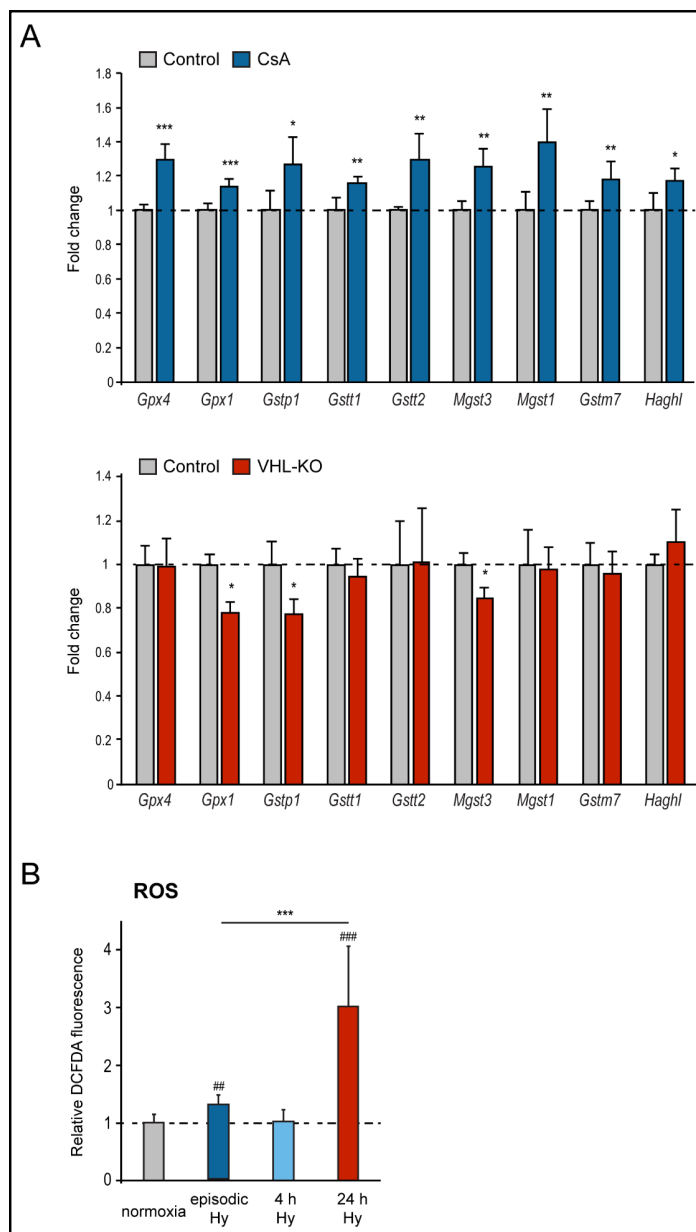


Fig. 8. Episodic hypoxia induces antioxidant mechanisms and attenuates ROS production. (A) Microarray analysis of expression level changes of genes associated with antioxidant defense in CsA treated mice (upper panel, n=5 each) and in mice with induced tubular-specific VHL-KO (lower panel; data taken from GSE44925) [21]. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001. Error bars indicate standard deviation. (B) Cellular ROS production in DCT cells after exposure to different types of hypoxia followed by 1 h re-oxygenation was monitored by 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. Significance to normoxia ##: p<0.01, ###: p<0.001. Asterisks denote significance between hypoxic groups. ***: p<0.001. Error bars indicate standard deviation of three independent biological experiments, each with 10 replicates.

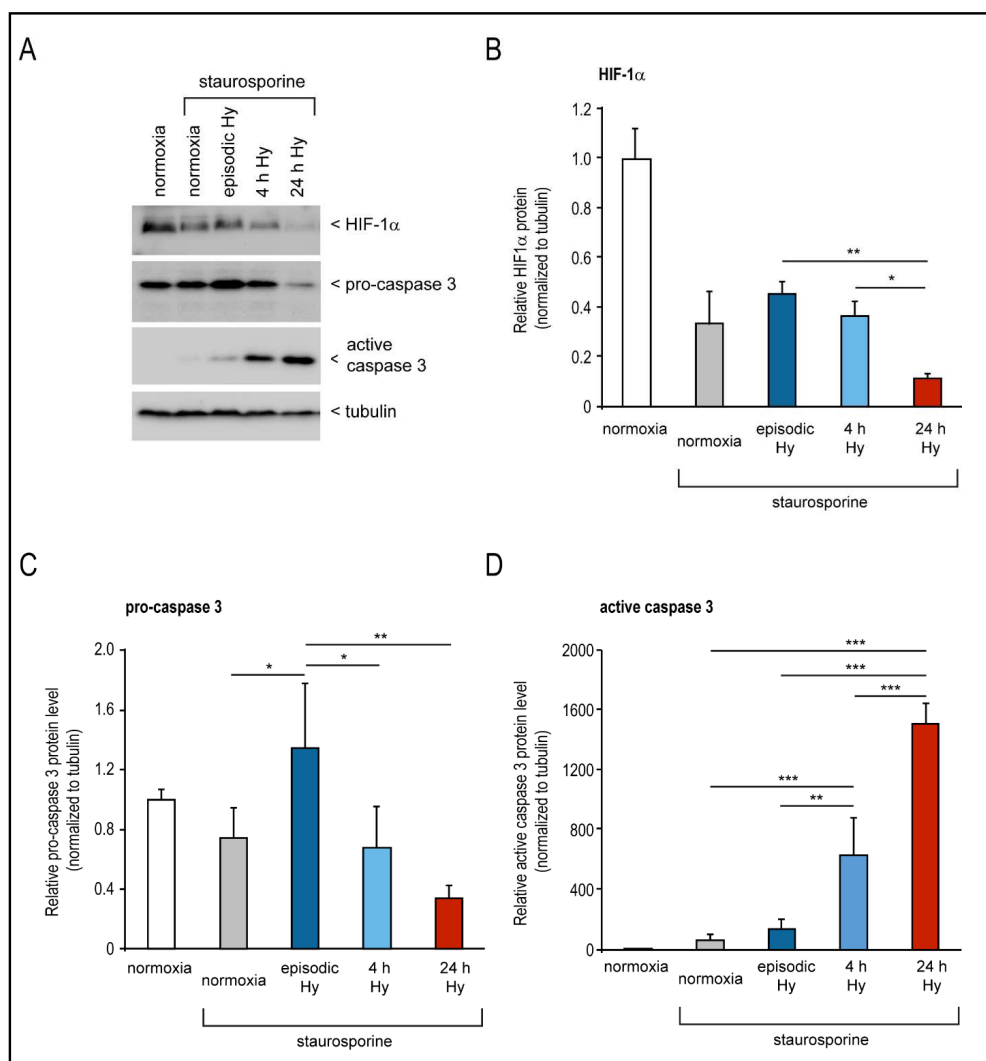


Fig. 9. Episodic hypoxia provides resistance to apoptosis. (A) Representative Western blot of HIF-1 α , Procaspase-3 and active Caspase-3 after apoptosis induction with 1 μ M staurosporine during 3 h re-oxygenation. DCT cells were prior exposed to the different types of hypoxia. Tubulin served as a loading control. (B) Quantitation of HIF-1 α protein levels. Asterisks denote significance between staurosporine treated groups *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Error bars indicate standard deviation ($n = 3$). (C) Quantitation of Procaspase-3 protein levels as in (B). (D) Quantitation of active Caspase-3 protein levels as in (B). Shown in white bars in each graph are the protein levels in untreated cells in normoxia. This can be used as a comparison for the effect of staurosporine on apoptosis in the absence of hypoxia in these cells.

regulate HIF target genes although HIF-1 α strongly accumulates.

To expand our *in vivo* work, we have created an *in vitro* protocol of episodic hypoxia, which, by its design, can easily be compared with either short-term, or sustained hypoxia. The latter is the benchmark protocol for HIF target gene up-regulation *in vitro*.

Our experiments conducted with two different cell lines (renal mouse and human fibrosarcoma cells) confirm the lack of HIF target gene up-regulation by episodic hypoxia as observed following daily CsA treatment for one week. We observed that, in contrast to sustained hypoxia, in episodic hypoxia the nuclear to cytoplasm ratio for HIF-1 α is shifted

in favor of the cytoplasm, thus precluding HIF's binding to DNA and explaining, at least in part, the unexpected low HIF response. Such mis-location of HIF-1 α is remarkable, and in contradiction with the current view of a rapid and unrestricted nuclear translocation, combined with a rapid cytoplasmic degradation of HIF-1 α [32-35]. The mechanisms behind cytoplasmic accumulation of HIF-1 α , as well as its potential role in cellular adaptation need further investigation. However, our data show that 4 hours of hypoxia are insufficient to activate a proper HIF response and HIF-1 α rapidly declines following re-oxygenation. The latter effect is attributed to hypoxic up-regulation of PHDs that elevate activity during re-oxygenation [36]. Thus, a cellular memory effect may exist that prevents a potentially maladaptive elevation of transcriptional HIF activity under conditions of repetitive short-term hypoxia cycles.

Although we were able to reproduce *in vivo* findings of repetitive CsA treatment by episodic hypoxia *in vitro*, it is suggested that CsA affects further mechanisms. Previously, it has been shown that, *in vitro*, CsA prevented most of the hypoxia-induced HIF-1 α stabilization by a single CsA dose and this inhibitory action of CsA requires a functional proteasomal machinery [19]. In contrast, we found marked accumulation of HIF-1 α in kidneys of mice following daily cycles of CsA and in renal cells exposed to repetitive short-term (episodic) hypoxia. Thus, our findings indicate a mechanism different from HIF-1 α hydroxylation and proteasomal degradation. As we observed inhibited HIF-1 α nuclear localization, we assume that depending on timing, application as well as cell type, different mechanisms exist to prevent HIF activity following CsA and/ or episodic hypoxia.

Pathway enrichment analysis predicts that CsA mediated episodic hypoxia mounts a specific defence against cellular stress. Assuming that repetitive hypoxia/re-oxygenation episodes would boost cellular defence against ROS led us to test for transcripts involved in protection against ROS. Indeed, nine such candidates associated with the glutathione antioxidant system were significantly up-regulated in CsA induced episodic hypoxia. In line with the limited HIF response, these data confirm that episodic hypoxia shapes a specific cell protective transcriptome, different from sustained hypoxia. Quantification of ROS generation upon re-oxygenation *in vitro* revealed that short-term hypoxia was comparable to controls and, as expected, sustained hypoxia/ re-oxygenation caused marked elevation in ROS. Episodic hypoxia, namely the daily repetition of short-term hypoxia, produced a modest, but significant increase. ROS have been implicated in a series of physiological and pathophysiological pathways [37]. While severe increases of ROS, as detected after sustained hypoxia, may be detrimental [38], modest increases of ROS may confer protection against cellular stress [39-43]. Supporting, mild elevations of ROS, as observed in our study following episodic hypoxia, has been also reported under CsA treatment *in vivo* [13]. Conceivably, moderate elevated ROS levels may trigger cellular defence mechanisms.

The striking and most specific effect of episodic hypoxia was observed by induction of apoptosis during re-oxygenation. Apoptosis was most pronounced when cells were subjected to sustained hypoxia/re-oxygenation and challenged with staurosporine, a competitive inhibitor of ATP binding to a series of kinases [44, 45]. Marked elevation of the apoptosis marker active caspase-3 was also found by pre-treatment with short-term hypoxia. By contrast, pre-treatment with episodic hypoxia conferred marked protection from staurosporine-induced apoptosis. Thus, the unique character of episodic hypoxia seems to be resistance to ROS mediated cell stress following re-oxygenation. Interestingly, in this setting HIF-1 α protein, though depressed with respect to untreated controls, was highest after episodic hypoxia, and lowest after sustained hypoxia. Obviously, strong HIF-1 α accumulation during episodic hypoxia persists following re-oxygenation. We can only speculate if this difference in HIF-1 α protein may translate into a survival benefit. At least within three hours of staurosporine toxicity, pre-existing HIF target genes, as built up by sustained hypoxia, could not prevent cell death.

Moving back to our initial *in vivo* experiment [11], and in light of our *in vitro* data, CsA-induced episodic hypoxia may elicit some cell protective mechanisms, at least in the short-term, despite of its acknowledged renal toxicity in the long-term. While in sustained hypoxia

the protective cellular response is mainly attributed to HIF, during episodic hypoxia, the rescue program involves ROS detoxification by the glutathione system. Moderate elevated ROS levels, persistent HIF-1 α accumulation and resistance to apoptosis represent key features of our episodic hypoxia setting. Expanding this concept may lead to new perspectives on other physiological and patho-physiological conditions of episodic hypoxia/re-oxygenation, like e.g. endurance training, intermittent claudication, sleep apnea etc.. Whether the modest increase in ROS or the lack of a HIF response determines CsA mediated nephrotoxicity in the long term, needs to be addressed in future studies.

Conclusion

We provide evidence for a specific cell protective re-programming induced by episodic hypoxia. Pre-conditioning with episodic hypoxia may become a tool to ameliorate organ damage under stress.

Acknowledgements

This study was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG) FOR-1368 (FA 845/4-2; RO 2449/2-2) and Else Kröner-Fresenius-Stiftung (2016_A207). We would like to thank Jeannette Schmidt for excellent technical assistance.

Disclosure Statement

All authors declare no conflicts of interest.

References

- 1 Almendros I, Farre N: Obstructive Sleep Apnea and Atherosclerosis: Both the Gut Microbiome and Hypercapnia Matter. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;57:501-503.
- 2 Fletcher EC: Cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea: experimental hypoxia and sympathetic activity. *Sleep* 2000;23 Suppl 4:S127-131.
- 3 Martin RJ, Wang K, Koroglu O, Di Fiore J, Kc P: Intermittent hypoxic episodes in preterm infants: do they matter? *Neonatology* 2011;100:303-310.
- 4 Grace PA: Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647.
- 5 Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzner E, Jelkmann W: Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:297-310.
- 6 Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J: HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells* 2010;29:435-442.
- 7 Ravenna L, Salvatori L, Russo MA: HIF3 α : the little we know. *FEBS J* 2016;283:993-1003.
- 8 Koh MY, Powis G: Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* 2012;37:364-372.
- 9 Kong X, Alvarez-Castelao B, Lin Z, Castano JG, Caro J: Constitutive/hypoxic degradation of HIF- α proteins by the proteasome is independent of von Hippel Lindau protein ubiquitylation and the transactivation activity of the protein. *J Biol Chem* 2007;282:15498-15505.
- 10 Azzi JR, Sayegh MH, Mallat SG: Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without. *J Immunol* 2013;191:5785-5791.
- 11 Fählng M, Mathia S, Scheidl J, Abramovitch R, Milman Z, Paliege A, Peters H, Persson PB, Heyman SN, Rosenberger C: Cyclosporin A induces renal episodic hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 2017;219:625-639.
- 12 Baxter CR, Duggin GG, Willis NS, Hall BM, Horvath JS, Tiller DJ: Cyclosporin A-induced increases in renin storage and release. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1982;37:305-312.

- 13 Damiano S, Trepiccione F, Ciarcia R, Scanni R, Spagnuolo M, Manco L, Borrelli A, Capasso C, Mancini R, Schiattarella A, Iervolino A, Zacchia E, Bata-Csere A, Florio S, Anastasio P, Pollastro R, Mancini A, Capasso G: A new recombinant MnSOD prevents the cyclosporine A-induced renal impairment. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:2066-2072.
- 14 Kriz W: Structural organization of the renal medulla: comparative and functional aspects. *Am J Physiol* 1981;241:R3-16.
- 15 Brezis M, Rosen S: Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med* 1995;332:647-655.
- 16 Haase VH: Hypoxia-inducible factor signaling in the development of kidney fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5:S16.
- 17 Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH: Hypoxia promotes fibrogenesis *in vivo* via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007;117:3810-3820.
- 18 Kong X, Lin Z, Caro J: Immunophilin-ligands FK506 and CsA inhibit HIF1alpha expression by a VHL- and ubiquitin-independent mechanism. *FEBS Lett* 2006;580:6182-6186.
- 19 D'Angelo G, Duplan E, Vigne P, Frelin C: Cyclosporin A prevents the hypoxic adaptation by activating hypoxia-inducible factor-1alpha Pro-564 hydroxylation. *J Biol Chem* 2003;278:15406-15411.
- 20 Mathia S, Paliege A, Koesters R, Peters H, Neumayer HH, Bachmann S, Rosenberger C: Action of hypoxia-inducible factor in liver and kidney from mice with Pax8-rtTA-based deletion of von Hippel-Lindau protein. *Acta Physiol (Oxf)* 2013;207:565-576.
- 21 Föhling M, Mathia S, Paliege A, Koesters R, Mrowka R, Peters H, Persson PB, Neumayer HH, Bachmann S, Rosenberger C: Tubular von Hippel-Lindau knockout protects against rhabdomyolysis-induced AKI. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1806-1819.
- 22 Wang J, Vasaikar S, Shi Z, Greer M, Zhang B: WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res* 2017;45:W130-W137.
- 23 Föhling M, Mrowka R, Steege A, Martinka P, Persson PB, Thiele BJ: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 modulate collagen prolyl 4-hydroxylase, alpha (I) mRNA stability. *J Biol Chem* 2006;281:9279-9286.
- 24 Föhling M: Cellular oxygen sensing, signalling and how to survive translational arrest in hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;195:205-230.
- 25 Filippi I, Saltarella I, Aldinucci C, Carraro R, Fia R, Vacca A, Naldini A: Different Adaptive Responses to Hypoxia in Normal and Multiple Myeloma Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem* 2018;46:203-212.
- 26 Liu ZZ, Bullen A, Li Y, Singh P: Renal Oxygenation in the Pathophysiology of Chronic Kidney Disease. *Front Physiol* 2017;8:385.
- 27 West JB: Physiological Effects of Chronic Hypoxia. *N Engl J Med* 2017;376:1965-1971.
- 28 Heyman SN, Leibowitz D, Mor-Yosef Levi I, Liberman A, Eisenkraft A, Alcalai R, Khamaisi M, Rosenberger C: Adaptive response to hypoxia and remote ischaemia pre-conditioning: a new hypoxia-inducible factors era in clinical medicine. *Acta Physiol (Oxf)* 2016;216:395-406.
- 29 Kapitsinou PP, Haase VH: Molecular mechanisms of ischemic preconditioning in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015;309:F821-834.
- 30 Li S, Hafeez A, Noorulla F, Geng X, Shao G, Ren C, Lu G, Zhao H, Ding Y, Ji X: Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. *Prog Neurobiol* 2017;157:79-91.
- 31 Wang C, Li H, Wang S, Mao X, Yan D, Wong SS, Xia Z, Irwin MG: Repeated Non-Invasive Limb Ischemic Preconditioning Confers Cardioprotection Through PKC-/STAT3 Signaling in Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem* 2018;45:2107-2121.
- 32 Depping R, Jelkmann W, Kosyna FK: Nuclear-cytoplasmatic shuttling of proteins in control of cellular oxygen sensing. *J Mol Med (Berl)* 2015;93:599-608.
- 33 Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L: Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* 1998;17:6573-6586.
- 34 Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF: Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996;271:32253-32259.

- 35 Salceda S, Caro J: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997;272:22642-22647.
- 36 D'Angelo G, Duplan E, Boyer N, Vigne P, Frelin C: Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem* 2003;278:38183-38187.
- 37 Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM: Biological and physiological role of reactive oxygen species -the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol (Oxf)* 2015;214:329-348.
- 38 Cannito S, Novo E, Compagnone A, Valfre di Bonzo L, Busletta C, Zamara E, Paternostro C, Povero D, Bandino A, Bozzo F, Cravanzola C, Bravoco V, Colombatto S, Parola M: Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* 2008;29:2267-2278.
- 39 Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S: Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett* 2004;577:427-433.
- 40 Chen TI, Hsu YC, Lien CF, Lin JH, Chiu HW, Yang KT: Non-lethal levels of oxidative stress in response to short-term intermittent hypoxia enhance Ca^{2+} handling in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 2014;33:513-527.
- 41 Prabhakar NR, Kumar GK: Oxidative stress in the systemic and cellular responses to intermittent hypoxia. *Biol Chem* 2004;385:217-221.
- 42 Yuan G, Adhikary G, McCormick AA, Holcroft JJ, Kumar GK, Prabhakar NR: Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells. *J Physiol* 2004;557:773-783.
- 43 Lien CF, Lee WS, Wang IC, Chen TI, Chen TL, Yang KT: Intermittent hypoxia-generated ROS contributes to intracellular zinc regulation that limits ischemia/reperfusion injury in adult rat cardiomyocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2018;118:122-132.
- 44 Falcieri E, Martelli AM, Bareggi R, Cataldi A, Cocco L: The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:19-25.
- 45 Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F: Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} -dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;135:397-402.

10. Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

11. Publikationsliste

Wissenschaftliche Artikel:

- **Heß V**, Kasim M, Mathia S, Persson PB, Rosenberger C, Fähling M. Episodic Hypoxia Promotes Defence Against Cellular Stress. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(5):1075-91. (Impact Factor: 5,5)
- Kasim M, **Heß V**, Scholz H, Persson PB, Fähling M. Achaete-Scute Homolog 1 Expression Controls Differentiation of Neuroblastoma. *Front Mol Neurosci*. 2016 Dec 21; 9:156. (Impact Factor: 5,1)

Kongressbeiträge:

- Fähling M, Mathia S, **Heß V**, Kasim M, Persson PB, Rosenberger C. Renal gene expression profile after repeated daily Cyclosporin-A treatment. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft. 2017. Greifswald. Deutschland.
- **Heß V**, Kasim M, Mathia S, Parsson PB, Rosenberger C, Fähling M. Episodic Hypoxia: A unique renal hypoxia response that protects against stress. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie. 2018. Berlin. Deutschland.

12. Danksagung

Den Abschluss des Promotionsvorhabens möchte ich nutzen, um meinen Unterstützern auf diesem Weg von Herzen zu danken.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Fähling, der die Entwicklung meiner Kenntnisse und Fertigkeiten im Bereich der Grundlagenforschung maßgeblich förderte und stets eine beispiellose Ausdauer, auch bei zwischenzeitlichen Misserfolgen, vorlebte. Ich danke ihm dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, selbständig entwickelte Projektideen voranbringen und aus eigenen Fehlern lernen zu dürfen.

Ein großes Dankeschön richte ich an Jeannette Schmidt, Ursula Kastner und Heide Lück, die meine ersten Schritte im Labor begleiteten und auf deren technische Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte.

Frau Dr. Mumtaz Kasim gilt ein besonderer Dank. Mit ihrem unerschöpflichen Wissen im Bereich der molekularen Techniken, ihren exzellenten Fähigkeiten beim wissenschaftlichen Schreiben und ihrer Bereitschaft, diese uneingeschränkt an den wissenschaftlichen Nachwuchs weiterzugeben, ist sie mir nicht nur als Wissenschaftlerin, sondern auch menschlich ein großes Vorbild.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie, die an einer erfolgreichen Fertigstellung der Promotion nie zweifelte und in besonderem Maße bei meinem Ehemann, der mich stets darin unterstützt, meine Ziele zu verfolgen und meine besten Seiten zum Vorschein zu bringen.