

Aus der Klinik mit Schwerpunkt
Nephrologie und internistische Intensivmedizin

der Medizinischen Fakultät Charite -
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren-Transkriptionsfaktors
ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Erythropoietin
Expression in Nierenzellkarzinomen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charite -
Universitätsmedizin Berlin

von

Markus Gläser

aus

Karl-Marx-Stadt/Chemnitz

- 1.Gutachter: Priv.-Doz. Dr.med. M.Wiesener
- 2.Gutachter: Prof. Dr. med. St.Loening
- 3.Gutachter: Prof. Dr. med. A.Kurtz

Datum der Urkundenverleihung: 15.12.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Erythropoietin	8
1.1.1. Historische Hintergründe	8
1.1.2. Syntheseorte und Regulation von EPO	8
1.2. „Hypoxia-inducible Factor-1“ (HIF-1)	9
1.2.1. Struktureller Aufbau	9
1.2.2. Regulation von HIF-1	10
1.2.3. Funktion des HIF-1 Gens	12
1.2.4. Folgen der HIF-1 Überexpression in Tumoren	13
1.3. Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL)	14
1.3.1. Entdeckung und Charakteristika/Aufbau des VHL-Gen	14
1.3.2. Folgen der VHL-Gen Inaktivierung	15
1.4. Nierenzellkarzinom (NZK)	15
1.4.1. Klinische Daten des NZK	15
1.4.2. Histologische Klassifikation der NZK	16
1.4.3. EPO bedingte Polyzythämie	17
1.5. Fragestellung	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Probengewinnung und Asservierung des humanen Nierengewebes	19
2.2. Zellkultur	20
2.3. Proteinnachweis im Immunoblot	20
2.3.1. Proteinextraktion	20
2.3.2. Proteinquantifizierung	20
2.3.3. Immunoblotting	21
2.3.4. Auswertung der Signale im Immunoblotting	22

2.4. RNA Analyse im RNase Protection Assay	22
2.4.1. RNA-Extraktion	22
2.4.2. Quantifizierung der RNA-Extrakte	23
2.4.3. Herstellung der radioaktiven Sonden	23
2.4.4. RNase Protection-Assay	24
2.5. In situ Hybridisierung	26
2.6. Lösungen und Antikörper	26
2.7. Chemikalien	28
2.8. Geräte	29
3. Ergebnisse	31
3.1. Klinische Daten	31
3.1.1. Tumorkollektiv	31
3.2. Expression der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α in menschlichen Nierentumoren	33
3.3. Expression von Erythropoietin in menschlichen Nierentumoren	37
3.3.1. Hämoglobinkonzentrationen der Patienten	41
3.4. In situ Hybridisierung für EPO	47
4. Diskussion	49
4.1. EPO Genexpression in NZK	50
4.2. Ursachen der EPO Expression	52
4.3. Auswirkungen der EPO Expression	54
4.4. Perspektiven	55
5. Zusammenfassung	56

6. Literaturverzeichnis	58
7. Anhang	66
7.1. Lebenslauf	66
7.2. Eidesstattliche Erklärung	68
7.3. Darstellung aller Patientendaten-Tabelle 8	69
7.4. Tabellenverzeichnis	71
7.5. Abbildungsverzeichnis	71
7.6. Abkürzungsverzeichnis	72
7.7. Danksagung	74

7. Anhang

7.1. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

7.2. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Markus Gläser, erkläre, dass, ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren-Transkriptionsfaktors ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Erythropoietin Expression in Nierenzellkarzinomen“, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Chemnitz, den 28.04.06

Markus Gläser

7.4. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** HIF und eine Auswahl seine Zielgene
- Tabelle 2:** Patientendaten-Charité
- Tabelle 3:** Proteinexpression von HIF-1 α /HIF-2 α
- Tabelle 4:** Quantifizierung der Proteinexpression von HIF-1 α /HIF-2 α in klarzelligen und nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomen
- Tabelle 5:** EPO-Expression in Nierenzellkarzinomen
- Tabelle 6:** Expression von EPO in klarzelligen und nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomen
- Tabelle 7:** Hb-Wert in Bezug auf Expression von HIF-1 α /HIF-2 α Protein und EPO mRNA
- Tabelle 8:** Darstellung aller Patientendaten

7.5. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Aufbau und Regulation von HIF-1
- Abbildung 2a:** Immunoblot: Expression des Proteins HIF-1 α in klarzelligen Nierenzellkarzinomen
- Abbildung 2b:** Immunoblot: Expression des Proteins HIF-2 α in klarzelligen Nierenzellkarzinomen

- Abbildung 3a:** RNase Protection Assay: Expression von EPO mRNA und CA9 bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen
- Abbildung 3b:** RNase Protection Assay: Expression von EPO mRNA von 22 Nierenzellkarzinomen
- Abbildung 4:** Vergleich der EPO Expression mit der Hb-Konzentration
- Abbildung 5:** Korrelation Tumorgröße versus Hb-Wert
- Abbildung 6:** In situ Hybridisierung von gesundem Nierengewebe, klarzelliger EPO positiver und EPO negativer NZK

7.6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α	Alpha
APS	Ammonium persulfate
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
AS	Amminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basic-helix-loop-helix
β	Beta
bzw	Beziehungsweise
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleid acid
DTT	Dithiothreitol
EPO	Erythropoietin
Hb	Hämoglobin
HIF	Hypoxie-induzierter-Faktor
IGF	Insulin-like growth factor
Ig	Immunglobulin

IL-1 β	Interleukin-1 β
kD	kilo Dal ton
Leu	Leucin
mA	Milliamper
NLS	nuclear localization signal
nm	Nanometer
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
ODD	oxygen-dependent degradation domain
O ₂	Sauerstoff
PE	Proteinextraktionspuffer
PMSF	Phenylmethyl Sulfonyl Fluorid
Pro	Prolin
pVHL	von Hippel-Lindau Protein
RASS	Renin-Angiotensin System
RCC	Renal cell carcinoma
RNA	Ribonucleic acid
RPM	Round per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TAD	Transaktivierungsdomäne
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
VEGF	Vascular endothel growth factor
VHL	von Hippel-Lindau Erkrankung
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

7.7. Danksagung

Herrn PD Dr. M. Wiesener und Herrn Professor Dr. K.-U. Eckardt danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, sowie der Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen und der intensiven Betreuung während der gesamten Arbeit.

An dieser Stelle sei mein ganz besonderer Dank, Herrn PD Dr. M. Wiesener, für seine ausdauernde und außergewöhnliche Betreuung vom Anfang bis zum Ende meiner Dissertationsschrift gesagt. In vielen Situationen hat er durch seine Geduld und fachliche Kompetenz das wissenschaftliche Arbeiten und das Verfassen dieser Arbeit möglich gemacht. Zu jedem Zeitpunkt hat er sich als ein gerechter und freundlicher Lehrer erwiesen.

Desweiteren gilt mein Dank den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. K.-U. Eckardt. Besonders seien hier Susanne Scholz und Ahmad Sarmadi zu nennen.

Auch gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meiner Frau, welche mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und immer die nötige Kraft geschenkt haben. Durch Sie ist dies überhaupt erst möglich geworden!