

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und  
Internistische Intensivmedizin, Campus Virchow Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Interaktion zwischen der durch Hypoxie-induzierbare  
Transkriptionsfaktoren vermittelten Genexpression und  
Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Kügler

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K.-U. Eckardt  
2. Prof. Dr. Chr. Dame  
3. Prof. Dr. med. A. Kurtz

Datum der Promotion: 01. Juni 2008

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren .....</b>	<b>2</b>
1.1.1.	Stabilisierung und Aktivierung von HIF $\alpha$ .....	2
1.1.2.	Wirkung von HIF .....	6
1.1.3.	Hypoxieunabhängige Regulation von HIF .....	8
1.1.4.	HIF in vivo .....	9
<b>1.2.</b>	<b>Das Renin-Angiotensin-System .....</b>	<b>10</b>
1.2.1.	Angiotensin II-Rezeptoren .....	11
1.2.1.1.	Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1R) .....	11
1.2.1.2.	Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT2R) .....	16
<b>1.3.</b>	<b>Herleitung der Fragestellung .....</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>22</b>
2.1.1.	PC12W .....	22
2.1.2.	3T3-L1 .....	22
2.1.3.	Aortale Gefäßmuskelzellen der Ratte (RASMC) .....	22
2.1.4.	Kardiale Fibroblasten der Ratte (rFib) .....	22
2.1.5.	Kulturbedingungen .....	23
<b>2.2.</b>	<b>mRNA-Analyse .....</b>	<b>24</b>
2.2.1.	Extraktion der RNA .....	24
2.2.2.	mRNA-Nachweis mittels RT-PCR .....	24
2.2.3.	mRNA-Analyse mittels Ribonuklease-Protection-Assay .....	26
2.2.3.1.	In vitro-Transkription und <sup>32</sup> P-Markierung der RPA-Sonden .....	26
2.2.3.2.	RNase-Protection-Assay .....	27
<b>2.3.</b>	<b>Proteinnachweis mittels Western-Blot .....</b>	<b>28</b>
2.3.1.	Proteinextraktion .....	28
2.3.2.	Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE und Western-Blot .....	29
2.3.3.	Immunfärbung .....	29
<b>2.4.</b>	<b>Proteinnachweis mittels <sup>125</sup>J-Ang II Bindungsassay .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5.</b>	<b>MTS Proliferationsassay .....</b>	<b>30</b>
<b>2.6.</b>	<b>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....</b>	<b>31</b>
2.6.1.	Präparation von Kernextrakten aus PC12W-Zellen .....	32
2.6.2.	<sup>32</sup> P-Markierung der EMSA-Sonden .....	32
2.6.3.	Electrophoretic Mobility Shift Assay .....	33

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1.</b>	<b>Teil 1: Regulation der Angiotensin II-Rezeptor-Expression durch Hypoxie und Hypoxie-Mimetika .....</b>	<b>35</b>
3.1.1.	HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ werden in den untersuchten primären Nagerzellen und Zelllinien exprimiert.....	35
3.1.2.	Sauerstoffabhängige Expression von AT1R-mRNA .....	36
3.1.3.	Sauerstoffabhängige Expression von AT2R-mRNA .....	38
3.1.4.	Abhängigkeit der AT2R-mRNA-Regulation von de-novo Proteinexpression	40
3.1.5.	AT2R-mRNA-Stabilität unter Hypoxie .....	41
3.1.6.	Sauerstoffabhängiges Wachstum von PC12W-Zellen.....	42
3.1.7.	Untersuchung potenzieller HIF-Bindungsstellen im AT2R-Gen.....	43
3.1.8.	Untersuchung der sauerstoffabhängigen AT1R-mRNA-Expression <i>in vivo</i> ...	46
3.1.9.	Sauerstoffabhängige ATR-Protein-Expression .....	47
<b>3.2.</b>	<b>Teil 2: Induktion von HIF durch Ang II und Protein-Kinase-Aktivatoren.....</b>	<b>49</b>
3.2.1.	Induktion von HIF-1 $\alpha$ -Protein in RASMCs.....	49
3.2.2.	Regulation von HIF-1 $\alpha$ -mRNA in RASMCs.....	50
3.2.3.	Expression von HIF-2 $\alpha$ in RASMCs .....	51
3.2.4.	Regulation von HIF-1 $\alpha$ in rFibs .....	52
3.2.5.	Regulation von HIF-2 $\alpha$ in rFibs.....	53
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1.</b>	<b>Auswahl und Limitationen der Methoden .....</b>	<b>55</b>
4.1.1.	Der Ribonuklease-Protection-Assay zum Nachweis von mRNA-Transkripten.....	55
4.1.2.	Zellkultur .....	56
4.1.3.	Protein-Nachweis / Bindungsassay .....	56
<b>4.2.</b>	<b>Auswirkung von Hypoxie auf die Angiotensin II-Rezeptor-Expression .....</b>	<b>57</b>
4.2.1.	Die Wirkung von Hypoxie auf die AT1R-Expression ist abhängig vom untersuchten Zelltyp und Organ.....	57
4.2.2.	Der Einfluss von Sauerstoffmangel auf die AT1R-Expression ist von der Stärke der Hypoxie abhängig.....	58
4.2.3.	Vergleich der Wirkung von akuter und chronischer Hypoxie auf die AT1R-Expression .....	59
4.2.4.	Die Wirkung von Hypoxie auf die Expression von AT2R .....	60
4.2.5.	Die Reduktion von AT2R unter Hypoxie ist nicht eine Folge gesteigerter Proliferation.....	61
4.2.6.	Hinweise für eine Beteiligung von HIF an der Regulation von AT1R und AT2R.....	61
<b>4.3.</b>	<b>Induktion von HIF durch nicht hypoxische Mechanismen.....</b>	<b>63</b>

4.3.1.	Hohe Dosen von Ang II induzieren HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ in der Zellkultur.....	64
4.3.2.	PMA induziert HIF-1 $\alpha$ stärker als Ang II in RASMCs .....	64
4.3.3.	PMA induziert HIF-1 $\alpha$ in rFibs posttranskriptionell .....	65
4.3.4.	HIF-2 $\alpha$ wird nicht durch Ang II aber durch PMA induziert.....	65
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>70</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>79</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>80</b>
	<b>Erklärung</b> .....	<b>82</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1.a Schematische Darstellung der HIF $\alpha$ -Degradation in Normoxie .....	3
Abb. 1.1.1.b Schematische Darstellung der hypoxischen Aktivierung von HIF .....	5
Tabelle 1: Wichtige HIF-Zielgene .....	7
Abb. 1.1.3 Schematische Darstellung der möglichen hypoxieunabhängigen Aktivierung von HIF .....	9
Abb. 1.2.1.1 Signaltransduktionswege des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 .....	14
Abb. 1.2.1.2 Signaltransduktionswege des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2 .....	17
Tabelle 2: RPA-Sonden .....	27
Abb. 3.1.1.a HIF-Induktion in PC12W-Zellen.....	35
Abb. 3.1.1.b HIF-Induktion in RASMCs .....	36
Abb. 3.1.2.a AT1R-mRNA-Expression in RASMCs unter Hypoxie und Stimulation mit Hypoxie-Mimetika.....	37
Abb. 3.1.2.b AT1R-mRNA-Expression in rFibs unter Hypoxie und Hypoxie-Mimetika.....	37
Abb. 3.1.2.c Zeitverlauf der AT1R-mRNA-Expression unter Hypoxie in RASMCs .....	38
Abb. 3.1.3.a Zellspezifische Expression von AT2R-mRNA.....	38
Abb. 3.1.3.b AT2R-mRNA-Expression in PC12W-Zellen unter Hypoxie und Hypoxie-Mimetika.....	39
Abb. 3.1.3.c AT2R-mRNA-Expression in 3T3L1-Zellen unter Hypoxie und Hypoxie-Mimetika.....	39
Abb. 3.1.3.d Zeitverlauf der AT2R-mRNA-Expression unter Hypoxie und DP-Stimulation in PC12W-Zellen.....	40
Abb. 3.1.4 Die hypoxische Reduktion von AT2R-mRNA ist abhängig von de-novo Proteinexpression .....	41
Abb. 3.1.5 AT2R-mRNA-Stabilität unter Hypoxie .....	42
Abb. 3.1.6 Relative Proliferationsrate von PC12W-Zellen unter Hypoxie und Dipyridyl-Stimulation.....	43
Abb. 3.1.7.a Lage der drei potenziellen HIF-Bindungsstellen (HRE) im AT2R-Gen .....	44
Abb. 3.1.7.b Hypoxieabhängige Bindung von Kernproteinen an potenzielle HREs im AT2R-Gen.....	45
Abb. 3.1.7.c Konkurrenz der hypoxieabhängigen Bindung von Kernproteinen an das EPO-HRE durch potenzielle HREs des AT2R-Gens.....	46
Abb. 3.1.8 AT1R-mRNA-Expression in Rattengewebe nach Aktivierung von HIF durch funktionelle Anämie oder Gabe von L-Mimosin .....	47
Abb. 3.1.9.a Expression von AT1R- und AT2R-Protein in nicht stimulierten Zellen .....	48
Abb. 3.1.9.b Expression von AT1R- und AT2R-Protein in stimulierten Zellen .....	48
Abb. 3.2.1.a HIF-1 $\alpha$ -Induktion durch Ang II in RASMCs .....	49
Abb. 3.2.1.b HIF-1 $\alpha$ -Induktion durch nicht-hypoxische Stimuli in RASMCs .....	50
Abb. 3.2.2 Zeitverlauf der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression in RASMCs nach Stimulation mit Angiotensin II .....	50
Abb. 3.2.3.a HIF-2 $\alpha$ -Proteinexpression in RASMCs .....	51
Abb. 3.2.3.b Zeitverlauf der HIF 2 $\alpha$ -mRNA-Expression in RASMCs nach Stimulation mit Angiotensin II.....	52
Abb. 3.2.4.a HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression in rFibs.....	52
Abb. 3.2.4.b Zeitverlauf der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression in rFibs nach Stimulation mit PMA .....	53
Abb. 3.2.5.a HIF-2 $\alpha$ -Proteinexpression in rFibs.....	53
Abb. 3.2.5.b Zeitverlauf der HIF-2 $\alpha$ -mRNA-Expression in rFibs nach Stimulation mit PMA .....	54

## 1. Einleitung

Molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) ist für alle Zellen höherer Tierarten existentiell, da alle aktiven Stoffwechselvorgänge und Replikationsmechanismen auf die ausreichende Bereitstellung von ATP angewiesen sind. Durch die aerobe Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat umgewandelt und dieses dann im Rahmen von Citratzyklus und Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran zu  $H_2O$  und  $CO_2$  oxidiert. Dabei entstehen pro Mol Glukose 36 bzw. 38 Mol ATP. Durch anaerobe Glykolyse entstehen nur 2 Mol ATP pro Mol Glukose, und sie ist damit wesentlich ineffektiver. Ist eine ausreichende Gewebe-Oxygenierung nicht gewährleistet (Hypoxie), sind nur wenige Zellen in der Lage, ihre Funktion und Struktur längere Zeit aufrecht zu erhalten. Unterschiedlicher Verbrauch von  $O_2$ , unterschiedliche Reserven an energiereichen Phosphaten oder gespeichertem  $O_2$  sowie die molekulare Ausstattung zur anaeroben Glykolyse erklären, warum manche Zelltypen wie z.B. Skelettmuskelzellen und Makrophagen unter Hypoxie länger ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten können als andere Zellen, z.B. der Großhirnrinde.

Multizelluläre Organismen haben eine Vielzahl von Organsystemen entwickelt, um eine ausreichende Oxygenierung aller Gewebe zu gewährleisten. Dazu gehören Atemwege und Lunge ebenso wie das Herz-Kreislauf-System und die Erythrozyten des Blutes. Alle diese Systeme werden in ihren Stellgrößen (z. B. Atemfrequenz, Herzfrequenz, Blutdruck, Zahl der Erythrozyten, Menge des Hämoglobins) direkt oder indirekt durch den Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) im Blut bzw. im Gewebe beeinflusst.

Hypoxie spielt in der Entstehung oder im Verlauf nahezu aller Krankheiten gleich welcher Ätiologie eine wichtige Rolle. Offensichtlich ist dies bei primär ischämischen Erkrankungen. So ist bei einem Infarkt Hypoxie die wichtigste Ursache des Zell- und Gewebeuntergangs. Sauerstoffmangel ist aber auch für den Verlauf von inflammatorischen oder neoplastischen Erkrankungen von erheblicher Bedeutung. Während es bei entzündlichen Reaktionen mit fibrotischem Umbau von Gewebe (Narben, Remodeling) in Folge der Verlängerung der Diffusionsstrecken im Gewebe zu lokaler Hypoxie kommt, kommt es im Kern schnell wachsender Tumore oft zu einer ausgeprägten Hypoxie und Nekrose und damit zu einer Veränderung des Wachstumsverhaltens.

Auf die Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung bei Hypoxie und den damit einhergehenden Energiemangel reagieren Zellen und damit der gesamte Organismus mit verschiedenen spezifischen Mechanismen. Bestimmte erregbare Zellen wie die Typ-1-Zellen im Glomus caroticum oder Zellen der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 reagieren auf systemische

arterielle Hypoxämie bzw. Hypoxie sehr schnell mit einer Depolarisation. Der daraus folgende  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt zu einer Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden, was in einer Ausschüttung von Neurotransmittern und Katecholaminen wie Dopamin und Noradrenalin resultiert. Dies hat unter anderem eine verstärkte Atmung zur Folge. Außerdem findet durch eine zelltypabhängige Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z. B. AP-1 (c-fos) und NF- $\kappa$ B eine Veränderung der Genexpression statt (Conforti 1999; Kobayashi 1999; Premkumar 2000; Alvarez-Tejado 2001; Beitner-Johnson 2001; Beitner-Johnson 2002).

Der wichtigste Mechanismus für mittel- und langfristige hypoxische Adaptation und Reaktion auf lokale Hypoxie sind jedoch die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF).

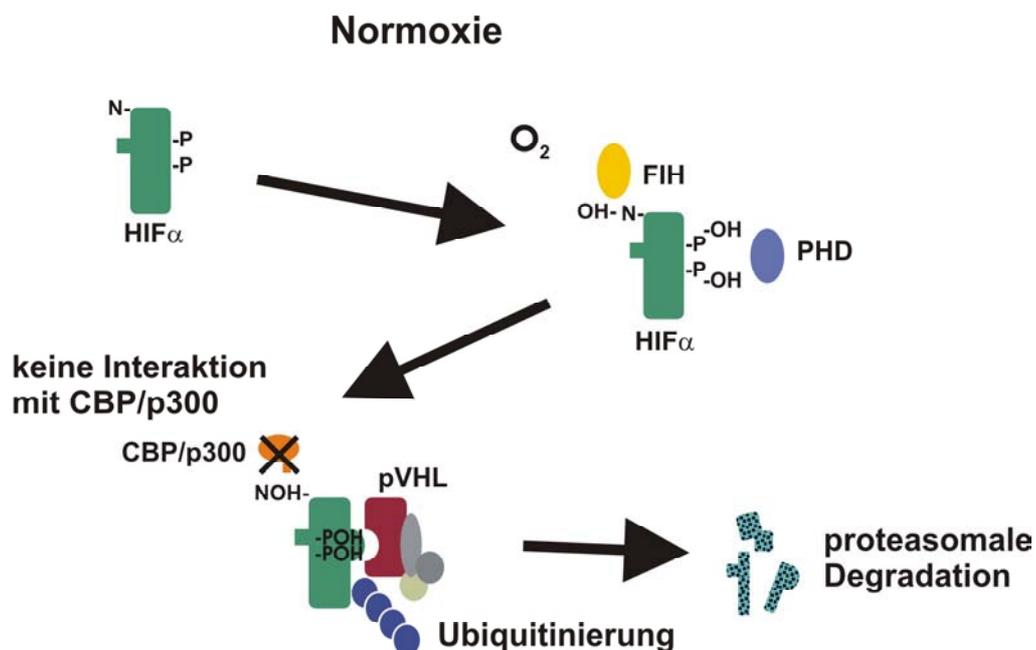
## 1.1. Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren

HIF ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, welche beide zur Familie der „basic helix-loop-helix PAS domain“ Proteine gehören. Es gibt zwei Isoformen der HIF $\alpha$ -Untereinheit, die an der hypoxischen Geninduktion beteiligt sind, nämlich HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  (auch EPAS-1=„Endothelial PAS domain protein-1“ genannt), die beide auf ähnliche Weise auf Proteinebene hypoxieabhängig reguliert werden, während HIF $\beta$  (auch ARNT=„Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ genannt) konstitutiv exprimiert wird und auch mit anderen Transkriptionsfaktoren als HIF $\alpha$  dimerisiert (Wang 1995; Wiesener 1998).

### 1.1.1. Stabilisierung und Aktivierung von HIF $\alpha$

Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  durch spezifische Prolyl-Hydroxylasen (PHD 1, 2, 3) an zwei Prolylresten (Pro402 und Pro564) hydroxyliert. Die PHDs sind eisenabhängige Dioxigenasen, die  $\text{O}_2$  und 2-Oxoglutarat als Kosubstrat sowie Ascorbat als Kofaktor benötigen. Durch einen  $K_m$ -Wert, der im Bereich der (patho)physiologischen Schwankungen des  $\text{pO}_2$  im Gewebe liegt, stellen diese Prolyl-Hydroxylasen den Sauerstoffsensor des HIF-Systems dar (Epstein 2001; Ivan 2001; Jaakkola 2001). Durch die Prolyl-Hydroxylierung kann das Von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) an HIF $\alpha$  binden. pVHL ist Teil einer Ubiquitin Ligase. Zusammen mit Elongin C und mehreren anderen, erst teilweise identifizierten Proteinen (z. B. Cullin B) bildet es einen Komplex, der zur Ubiquitinierung und letztlich zur proteasomalen Degradation der HIF $\alpha$ -Untereinheit führt (Salceda 1997; Kallio 1999; Maxwell 1999). Dieser Prozess führt dazu, dass unter normoxischen Bedingungen praktisch kein HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$  in Zellen oder Geweben nachweisbar ist. Eine Inaktivierung von pVHL führt daher zu einer  $\text{O}_2$ -unabhängigen Stabilisierung von HIF $\alpha$  (Wiesener 2001).

Eine weitere O<sub>2</sub>-abhängige Hydroxylierung findet an einem Asparaginylnrest in der c-terminalen Transaktivierungsdomäne von HIF $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ : Asn803; HIF-2 $\alpha$ : Asn851) statt. Die dafür verantwortliche Asparaginyln-Hydroxylase wurde vor kurzem kloniert und ist identisch mit dem vorher identifizierten Factor Inhibiting HIF-1 (FIH) (Mahon 2001; Hewitson 2002; Lando 2002a). Durch die Asparaginyln-Hydroxylierung wird im Gegensatz zu den Prolyl-Hydroxylierungen nicht die Stabilität, sondern die Aktivität der HIF $\alpha$ -Untereinheit beeinflusst, indem die Bindung des transkriptionellen Koaktivators CBP/p300 behindert wird (Lando 2002b). Dadurch lässt sich die Beobachtung erklären, dass eine alleinige Stabilisierung von HIF $\alpha$  nicht ausreicht, um unter normoxischen Bedingungen die gesamte transaktivierende Aktivität von HIF zu induzieren (Hofer 2001). Es gibt allerdings auch Hinweise, dass die Wirkung von FIH nicht primär über die Sauerstoffspannung reguliert wird, sondern vielmehr darüber, dass VHL HIF an FIH heranträgt. So hat FIH Bindungsdomänen sowohl für HIF als auch für VHL (Mahon 2001).



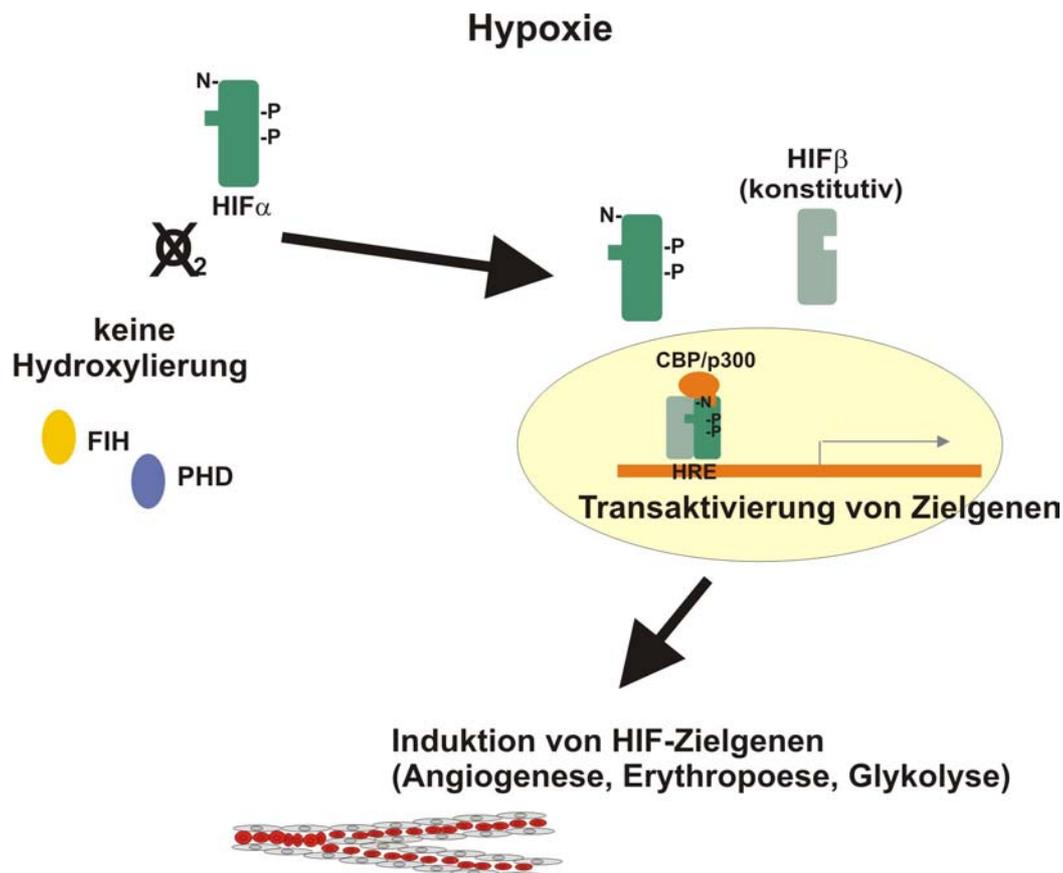
**Abb. 1.1.1.a Schematische Darstellung der HIF $\alpha$ -Degradation in Normoxie**

Unter normoxischen Bedingungen werden bestimmte Prolyl- (P) und Asparaginylnreste (N) von HIF $\alpha$  durch spezifische Prolyl- (PHD) bzw. Asparaginyln-Hydroxylasen (FIH) hydroxyliert. Durch die Prolyl-Hydroxylierung kann das Von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) die HIF $\alpha$ -Untereinheit binden. Anschließend wird die HIF $\alpha$ -Untereinheit durch eine E3-Ubiquitin-Ligase ubiquitiniert und proteasomal degradiert. Die Asparaginyln-Hydroxylierung verhindert die Bindung des Kofaktors CBP/p300 und reduziert damit die transaktivierende Wirkung von HIF.

Unter Hypoxie kann die Hydroxylierung von HIF $\alpha$  nicht mehr stattfinden, so dass HIF $\alpha$  sowohl stabilisiert als auch aktiviert wird. HIF $\alpha$  transloziert dann durch einen noch nicht genau bekannten Mechanismus in den Zellkern (Chilov 1999). Um dort DNA binden und seine Zielgene transaktivieren zu können, muss HIF $\alpha$  mit HIF $\beta$ /ARNT dimerisieren (Gradin 1996;

Salceda 1996; Wood 1996; Kallio 1997; Chilov 1999). Das HIF Heterodimer bindet an das HIF-bindende Sequenz-Motiv (HBS) 5'-RCGTG-3', das Teil der sogenannten „hypoxia-responsive elements“ (HRE) in den Promotoren oder Enhancern der HIF-Zielgene ist. Datenbankanalysen ergeben, dass dieses Motiv sehr häufig zu finden ist, ohne dass sich daraus zwingend eine funktionelle Bedeutung ergibt. Man muss also davon ausgehen, dass es weitere Faktoren gibt, die die DNA-Bindung von HIF regulieren. Ein Mechanismus scheint die CpG-Methylierung der potenziellen Bindungsstellen zu sein, die die Bindung von HIF verhindert (Wenger 1998a).

Durch die Rekrutierung von Kofaktoren wie CBP/p300, SRC-1 oder TIF2 initiiert HIF die Transkription (Arany 1996; Ebert 1998; Kallio 1998; Ema 1999; Carrero 2000; Gu 2001). Es hat sich gezeigt, dass die Bindung von HIF zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Induktion der Transkription ist. So finden sich in den HREs von hypoxie-induzierbaren Genen immer Bindungsstellen für mehrere Transkriptionsfaktoren. Obwohl diese Transkriptionsfaktoren selbst in der Regel nicht durch Hypoxie reguliert werden, kann durch sie die Hypoxieantwort amplifiziert oder gewebespezifisch reguliert werden. Beispiele dafür sind Interaktion von HIF mit ATF-1/CREB-1 am Laktat-Dehydrogenase A-Gen (Firth 1995; Ebert 1998), mit AP1 am Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Gen (Damert 1997) und mit HNF-4 am Erythropoetin-Gen (Galson 1995). Auch können zwei oder mehr HBS ein funktionelles HRE bilden, zum Beispiel im Transferrin-Gen (Rolfs 1997). Die Bedeutung mehrerer Bindungsstellen für die Bildung eines HRE erklärt sich durch die Beobachtung, dass für eine feste Bindung von CBP/p300 die Interaktion mit mehr als einem Transkriptionsfaktor notwendig ist.



**Abb. 1.1.1.b Schematische Darstellung der hypoxischen Aktivierung von HIF**

Bei Sauerstoffmangel findet die Prolyl- und Asparaginy-Hydroxylierung nicht statt. Dadurch entgeht die HIF $\alpha$ -Untereinheit der Degradation und kann in den Kern translozieren. Dort rekrutiert HIF $\alpha$  die konstitutiv exprimierte HIF $\beta$ -Untereinheit und Kofaktoren wie CBP/p300, bindet an die *hypoxia response elements* (HRE) der Zielgene und aktiviert dadurch deren Transkription.

Mehrere negative Rückkopplungsmechanismen, die die HIF-Antwort auf Hypoxie regulieren, wurden beschrieben. So sinkt nach längerer Hypoxie die Konzentration von HIF-1 $\alpha$ -mRNA (Wenger 1998b). Außerdem wurde eine HIF-1-abhängige Induktion von p35srj beobachtet. Durch p35srj wird die Bindung von HIF und CBP/p300 behindert und somit die Transaktivierung deutlich inhibiert (Bhattacharya 1999). Der wichtigste negative Rückkopplungsmechanismus ist jedoch wahrscheinlich die transkriptionelle Induktion der HIF-Prolyl-Hydroxylasen PHD2 und PHD3 durch HIF selbst (Cioffi 2003; D'Angelo 2003).

HIF $\alpha$  lässt sich durch pharmakologische Inhibition der PHDs und FIH stabilisieren und aktivieren. Dazu können verschiedene Substanzen verwendet werden. Eisen-Chelatbildner wie Dipyrindyl bilden Komplexe mit intrazellulärem Eisen, so dass die eisenabhängige Hydroxylierung von HIF $\alpha$  nicht mehr erfolgen kann. Kobalt kann die enzymatische Reaktion behindern, indem es den notwendigen Kofaktor Ascorbat aus den Zellen depletiert (Salnikow 2004). Mittlerweile konnte auch in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass spezifische

Inhibitoren der PHDs HIF stabilisieren und dadurch HIF-Zielgene und Angiogenese induziert werden (Ivan 2002; Warnecke 2003).

### **1.1.2. Wirkung von HIF**

Die große Bedeutung von HIF für die Anpassung des Organismus an Hypoxie erklärt sich durch die große Anzahl von Genen, die durch HIF reguliert werden und die Wirkung des HIF-Systems in allen Zellen.

Viele der durch HIF induzierten Genprodukte (s. Tab. 1) bewirken eine bessere Sauerstoffversorgung des Gewebes. So kommt es durch Induktion von HIF zu einer erhöhten O<sub>2</sub>-Transportkapazität, da eine vermehrte Erythropoetin (EPO) Produktion in den peritubulären Fibroblasten der Niere eine verstärkte Erythropoese induziert (Bachmann 1993; Maxwell 1993). HIF-2 $\alpha$  ist für die Regulation der EPO-Synthese die entscheidende Isoform (Warnecke 2004; Scortegagna 2005). Eisenmangel ist ein häufiger Grund für eine nicht ausreichende Erythropoese, da Eisen für die Hämoglobinsynthese notwendig ist. HIF induziert sowohl Transferrin als auch den Transferrin-Rezeptor und Ceruloplasmin. Dadurch kommt es zu einer verbesserten Eisen-Transportkapazität und zu einer besseren Versorgung des blutbildenden Gewebes mit Eisen.

Gleichzeitig wird die lokale Durchblutung verbessert. Es wurde gezeigt, dass VEGF ein Zielgen von HIF ist. Durch VEGF wird die Angiogenese in hypoxischen Geweben induziert. Als Folge steigt die Kapillardichte und die Diffusionsstrecke für O<sub>2</sub> im Gewebe sinkt. Auch der VEGF-Rezeptor Flt-1 wird durch HIF reguliert.

Transgene Mäuse, bei denen ein stabilisiertes HIF-1 $\alpha$  unter der Kontrolle eines keratinozyten-spezifischen Promotors überexprimiert wird, entwickeln eine hypervaskularisierte Haut. Im Gegensatz zu Tieren, die nur VEGF überexprimieren, zeigen sich hier keine „undichten“ Gefäße oder Entzündungsreaktionen (Elson 2001). Dies zeigt, dass HIF als „master regulator“ der Angiogenese nicht nur über VEGF, sondern durch die Induktion eines komplexen Musters an unterschiedlichen, zusammenwirkenden Faktoren Angiogenese induziert. Durch Microarray Analysen wurden in den letzten Jahren ca. 200 HIF-1 $\alpha$  induzierbare Gene identifiziert. Eine Auswahl der wichtigsten HIF-Zielgene ist in Tabelle 1 aufgeführt.

<b>Erythropoese und Eisentransport</b>		<b>Glukose Aufnahme und Glykolyse</b>	
Erythropoetin	Erythropoese	Glukose-Transporter 1	Glukose Aufnahme
Transferrin	Eisentransport	Laktat-Dehydrogenase A	Glykolyse
Transferrin-Rezeptor	Eisenaufnahme	Phosphofruktokinase L	Glykolyse
Ceruloplasmin	Eisenoxidation	Aldolase A	Glykolyse
		GAPDH	Glykolyse
		Phosphoglyzerat-Kinase 1	Glykolyse
<b>Angiogenese und Gefäßtonus</b>		Enolase 1	Glykolyse
VEGF	Angiogenese	PFKFB3	Regulation der Glykolyse
Flt-1	VEGF-Rezeptor		
EG-VEGF	Angiogenese		
PAI-1	Angiogenese	<b>Andere</b>	
iNOS	NO-Produktion	p35srj	HIF-Regulation
HO-1	CO-Produktion	Kollagen Prolyl-4-Hydroxylase $\alpha$	Kollagen-Synthese
Adrenomedullin	Gefäßtonus	ETS-1	Transkriptionsfaktor
Endothelin 1	Gefäßtonus	IGFBP-1	Wachstumsfaktor
$\alpha_{1B}$ -Adrenerger-Rezeptor	Gefäßtonus	Carboanhydrase 9	pH-Regulation

**Tabelle 1: Wichtige HIF-Zielgene**

Wirkung von HIF (nach Wenger 2002). Weitere Erläuterungen im Abschnitt 1.1.2

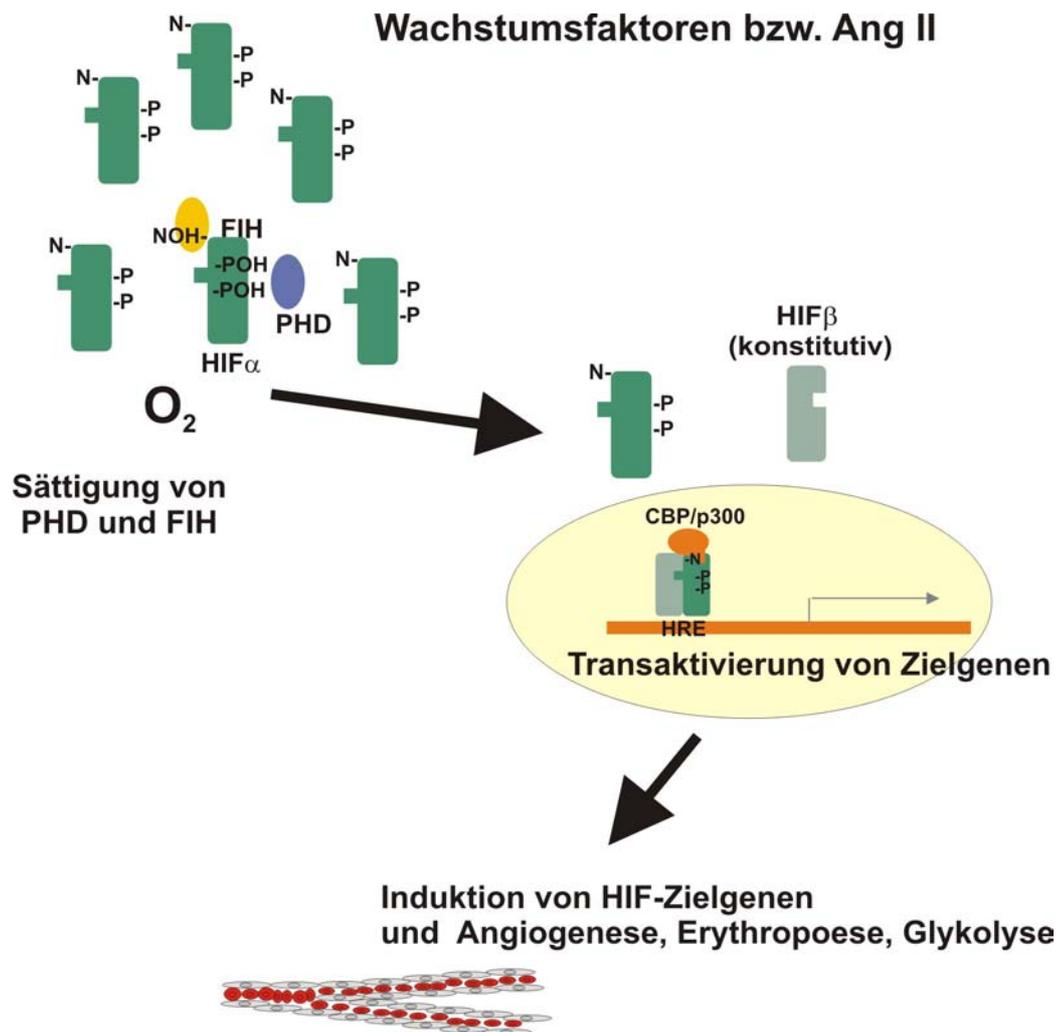
Die lokale Durchblutung wird wesentlich durch den Gefäßtonus beeinflusst. Dieser wird unter anderem durch NO, CO oder Hormone wie Endothelin, Adrenomedullin oder Noradrenalin gesteuert. Auch in diese Systeme greift HIF ein, indem es die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die Häm-Oxygenase 1 (HO-1), Endothelin 1, Adrenomedullin und den  $\alpha_{1B}$ -Adrenergen-Rezeptor induziert.

In hypoxischen Geweben kann durch anaerobe Glykolyse auch ohne O<sub>2</sub> ATP generiert werden. Viele der für die Glukose-Aufnahme oder für die Glykolyse notwendigen Enzyme sind HIF-Zielgene (s. Tab. 1), so dass die Zelle in die Lage versetzt wird, einem O<sub>2</sub>-Mangel mit einer verstärkten anaeroben Glykolyse zu begegnen. Dadurch kann die Lebensfähigkeit der Zelle unter hypoxischen Bedingungen erheblich verbessert werden.

Am Beispiel von  $\alpha$ -Fetoprotein (afp) konnte erstmals gezeigt werden, dass HIF-1 auch die Transkription behindern kann, indem es mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z. B. c-Myc um eine DNA-Bindungsstelle kompetitiert (Mazure 2002).

### 1.1.3. Hypoxieunabhängige Regulation von HIF

Mehrfach wurde berichtet, dass Wachstumsfaktoren und Zytokine unabhängig von Hypoxie die Proteinexpression und Aktivität von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  beeinflussen können. Ohne dass der Mechanismus bis jetzt eindeutig geklärt wurde, wird HIF in einigen Zelltypen durch Faktoren wie Insulin, Insulin-like Growth Factor 1 und 2, Interleukin 1 $\beta$ , Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ , Thrombin, Transforming Growth Factor  $\beta_1$ , Platelet-derived Growth Factor, Hepatocyte Growth Factor und Angiotensin II induziert (Übersicht in (Bilton 2003)). Eine Hypothese ist, dass über die Aktivierung von Rezeptor Tyrosin Kinasen und die nachfolgende Phosphorylierung und Aktivierung von Ras/Raf-, MEK- und p42/p44-MAP-Kinasen die Transkription und/oder Translation der HIF $\alpha$ -Untereinheit stimuliert wird. Durch eine Sättigung der PHDs oder von pVHL könnte HIF $\alpha$  der proteasomalen Degradation entkommen und so stabilisiert werden. Auch die Aktivierung von Akt scheint HIF-1 $\alpha$  über einen ähnlichen Mechanismus zu stabilisieren (Laughner 2001). Da diese Beobachtungen bisher nur in der Zellkultur gemacht wurden und meist die Induktion der transkriptionellen Aktivität von HIF durch diese Faktoren um ein Vielfaches geringer ist als die hypoxische Induktion, bleibt offen, welche Bedeutung nicht hypoxischen Mechanismen bei der Aktivierung von HIF *in vivo* zukommt. Eine möglicherweise größere physiologische Bedeutung hat die post-translationale Modifizierung von HIF $\alpha$  durch Phosphorylierungen. So steigert eine Phosphorylierung von HIF $\alpha$ -Untereinheiten deren transkriptionelle Aktivität nach erfolgter hypoxischer Stabilisierung. Obwohl gezeigt werden konnte, dass p42/p44-MAP-Kinasen an der Phosphorylierung beteiligt sind, konnten die phosphorylierten Aminosäurereste der HIF $\alpha$ -Untereinheiten noch nicht identifiziert werden (Richard 1999). Die (patho)physiologische Bedeutung dieser Befunde ist noch nicht geklärt, obwohl man spekulieren kann, dass durch Wachstumsfaktoren die HIF-Antwort auf Hypoxie je nach Gewebetyp und Hypoxie-auslösender Noxe, z. B. inflammatorische Ereignisse, moduliert werden kann.



**Abb. 1.1.3 Schematische Darstellung der möglichen hypoxieunabhängigen Aktivierung von HIF**

Durch Wachstumsfaktoren oder Angiotensin II (Ang II) wird die Transkription und Translation von HIF $\alpha$  deutlich gesteigert. Möglicherweise kommt es dadurch zu einer Sättigung der spezifischen Prolyl-(PHD) bzw. Asparaginyll-Hydroxylasen (FIH). Dann entgeht HIF $\alpha$  der proteasomalen Degradation, kann in den Kern translozieren und dort nach Dimerisierung mit HIF $\beta$  Zielgene transaktivieren.

#### 1.1.4. HIF *in vivo*

Die herausragende Bedeutung von HIF *in vivo* konnte mittlerweile durch verschiedene Untersuchungen gezeigt werden. In Tumoren induziert HIF eine verstärkte Angiogenese und anaerobe Glykolyse. Dabei wird HIF entweder durch Hypoxie im Kern solider Tumoren oder durch Mutationen, insbesondere von VHL, stabilisiert. Dies hat eine besondere Bedeutung für die Tumoren des vererblichen von-Hippel-Lindau-Syndroms. Die betroffenen Patienten haben eine Keimbahnmutation in einem Allel des VHL-Gens. Aus noch unbekanntem Gründen tritt im Laufe des Lebens in bestimmten Organen eine (somatische) Mutation auch des anderen VHL-Allels auf und führt dann zur Entstehung von Phäochromozytomen, Hämangioblastomen des ZNS und der Retina und klarzelligem Nierenzellkarzinomen. Für diese Tumore, die gekennzeichnet sind durch eine besonders ausgeprägte Vaskularisierung, ist die Mutation im

VHL-Gen in den Nierenzellkarzinomen, vielleicht sogar nur die damit einhergehende Stabilisierung von HIF, das entscheidende Ereignis in der Tumorentstehung (Kondo 2002; Mandriota 2002; Maranchie 2002).

Durch Knockout-Experimente an Mäusen konnte die Bedeutung von HIF für die embryonale Entwicklung demonstriert werden. Homozygoter Knock-out von HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$  führte zu einem Absterben der Embryonen, verursacht durch schwere Fehlentwicklungen des kardiovaskulären Systems bzw. Bradykardie in Folge einer gestörten Katecholaminsynthese bei einem HIF-2 $\alpha$  Knock-out Modell (Maltepe 1997; Iyer 1998; Ryan 1998; Tian 1998; Peng 2000). Zusätzlich zeigten HIF-2 $\alpha$ -defiziente Mäuse Störungen der Lungenreife (Tian 1998; Compernelle 2002). Mäuse mit einem heterozygoten Defekt von HIF-1 $\alpha$  sind lebensfähig, zeigen aber eine gestörte Anpassung an Hypoxie.

Im Jahr 2003 gelang erstmals durch aufwändige Rückkreuzungen die Generierung von lebensfähigen HIF-2 $\alpha$  Knock-out Mäusen. Diese Mäuse zeigten eine Multiorgan-Pathologie, die an Erkrankungen durch gestörte Mitochondrien-Funktion erinnerte, sowie Defekte in der Hämatopoese (Scortegagna 2003a; Scortegagna 2003b). In einer späteren Arbeit wurde gezeigt, dass die hämatopoetischen und biochemischen Defekte weitgehend durch eine EPO-Substitution aufgehoben werden konnten (Scortegagna 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass EPO evtl. das einzige HIF-2 $\alpha$  Zielgen sein könnte.

## 1.2. Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine entscheidende Rolle in der Homöostase des kardiovaskulären Systems, insbesondere bei der Regulation von Blutdruck und Blutvolumen und der Aufrechterhaltung der Gewebepерfusion und damit auch der Gewebeoxygenierung. Klassischer Weise wurde das RAS als ein endokrines Hormonsystem gesehen. Dabei wird Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere durchblutungsabhängig freigesetzt und dadurch die Umwandlung des in der Leber gebildeten Angiotensinogens in Angiotensin I (Ang I) katalysiert. Das zirkulierende Decapeptid Ang I wird im pulmonalen Gefäßbett durch endothelständiges Angiotensin Converting Enzyme (ACE) zum Octapeptid Angiotensin II (Ang II) umgewandelt. Ang II ist das Effektormolekül des RAS und wirkt über membranständige Angiotensin II-Rezeptoren (ATR) an den Zellen des jeweiligen Zielorgans. An der glatten Gefäßmuskulatur führt Ang II zu einer Kontraktion. U.a. über das sympathische Nervensystem wirkt es am Herzen positiv inotrop und chronotrop. In der Nebennierenrinde steigert Ang II die Synthese von Aldosteron, welches in der Niere eine verstärkte Rückresorption von Natrium und Wasser zur

Folge hat. Durch ein verstärktes Durstgefühl sowie eine vermehrte Sekretion von Vasopressin wird das intravaskuläre Volumen weiter gesteigert. Im Endeffekt führen diese Mechanismen zu einer Steigerung des Blutdrucks und damit zu einer Verbesserung der Organperfusion (Übersicht in Achard 2001).

In den letzten Jahren hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass neben diesem zirkulierenden RAS auch in vielen Organen ein lokales, gewebeständiges RAS besteht. Dieses ist von besonderer Bedeutung in der Niere, der Gefäßwand, dem Herzen, dem Gehirn und der Nebenniere. Dabei werden sämtliche Komponenten des RAS auch lokal exprimiert. Auch sind außer Renin und ACE weitere Enzyme wie Chymase oder Tissue Plasminogen Activator in der Lage, Ang II zu bilden (Übersicht in Bader 2001).

### **1.2.1. Angiotensin II-Rezeptoren**

Bisher wurden zwei verschiedene Typen von ATR charakterisiert. Sie werden Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1R) und Typ 2 (AT2R) genannt. Ein erster Nachweis von unterschiedlichen Subtypen des ATR gelang durch die Entwicklung von spezifischen Liganden und die Beobachtung, dass Dithiothreitol (DTT) die Affinität von Ang II mit den Rezeptoren unterschiedlich beeinflusst. Durch DTT wird die Affinität von Ang II mit AT1R verringert, während die Affinität mit AT2R gesteigert wird (Chang 1982; Gunther 1984; Chiu 1989; Speth 1991). Später konnte durch die Klonierung der ATR-Gene gezeigt werden, dass beide Rezeptoren zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen (GPCR) gehören (Murphy 1991; Sasaki 1991; Kambayashi 1993; Mukoyama 1993). Eine G-Protein-Kopplung konnte für den AT2R bisher allerdings noch nicht sicher nachgewiesen werden. Auch wird dieser Rezeptor nach Ligandenbindung nicht internalisiert, verhält sich also auch in diesem Punkt nicht wie ein klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor (Dudley 1991; Csikos 1998). Eine strukturelle Erklärung für diese fundamentalen Unterschiede zwischen den ATR-Subtypen findet sich möglicherweise in der Aminosäuresequenz beider Angiotensin II-Rezeptoren, die eine Homologie von lediglich 34% aufweist (Kambayashi 1993; Mukoyama 1993).

#### **1.2.1.1. Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1R)**

Die klassischen Wirkungen des RAS wie Blutdruckregulation, Wasser- und Elektrolythomöostase werden über den AT1R vermittelt.

Der AT1R wurde erstmals aus RASMCs sowie Rinder-Nebennieren kloniert. Das Produkt des AT1R-Gens besteht aus 359 Aminosäuren und hat – im nicht-glykosylierten Zustand – ein Molekulargewicht von 41 kDa (Murphy 1991; Sasaki 1991). Das humane Genom enthält ein

einziges für den AT1R kodierendes Gen auf Chromosom 3 (Curnow 1992; Davies 1994). Im Gegensatz dazu gibt es bei Nagetieren zwei Isoformen des AT1R, AT1<sub>A</sub>R und AT1<sub>B</sub>R mit einer Sequenzhomologie von 94%, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden (Langford 1992; Takeuchi 1993). AT1<sub>A</sub>-Rezeptoren werden vor allem in der Niere, der Lunge, der Leber und glatten Gefäßmuskulatur exprimiert. Dagegen konnte man den AT1<sub>B</sub>-Rezeptor überwiegend in der Nebenniere und im Hypophysenvorderlappen nachweisen (Übersicht in de Gasparo 2000). Spezifische Antagonisten für den AT1-Rezeptor sind die Sartane, z.B. Losartan, Irbesartan oder Candesartan.

#### 1.2.1.1.1. Regulation der AT1R-Expression

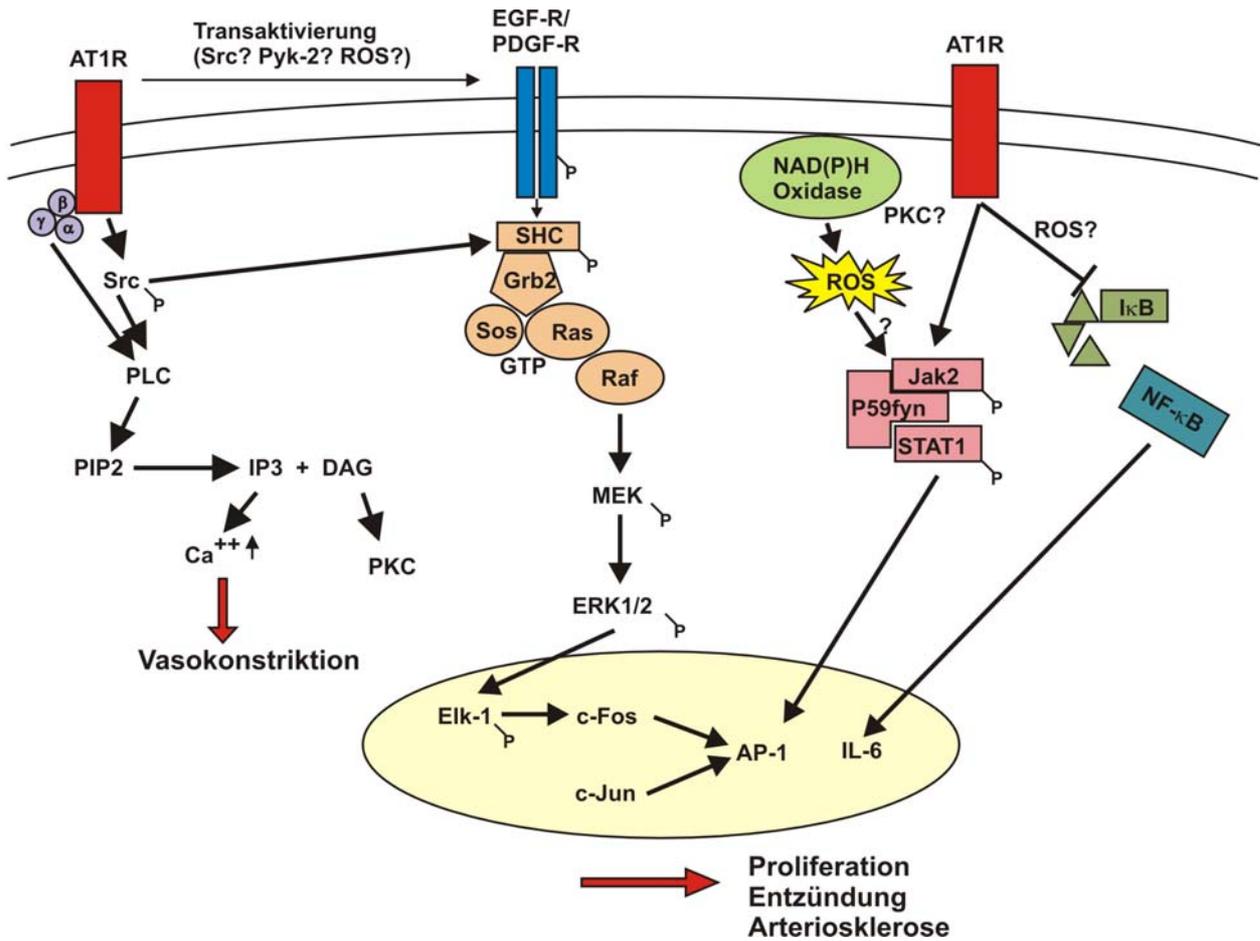
Die Expression der AT1-Rezeptoren ist gewebe- und zelltypabhängig. In der Promotorregion des AT1R wurden Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert, die einen positiven Einfluss auf die Transkriptionsrate des AT1R-Gens haben. Darunter finden sich Glucocorticoid response elements, eine PEA3-Bindungsstelle, ein cAMP response element sowie je eine AP1- und GATA4-Bindungsstelle im AT1<sub>A</sub>R-Gen der Ratte (Übersicht in Matsubara 1998). Weiterhin wurde eine sogenannte Negative Regulatory Region (NRE) beschrieben. Nur in Zellen neuronalen Ursprungs binden dort Kernproteine und inhibieren dadurch die Transkription (Murasawa 1993; Murasawa 1995).

Über diese sowie vermutlich über weitere bisher nicht identifizierte Bindungsstellen regulieren viele Wachstumsfaktoren die AT1R-Expression. So induzieren Insulin und Wachstumshormon (GH) die Expression (Wyse 1997; Nickenig 1998). Im Gegensatz dazu reduzieren andere Wachstumsfaktoren wie Platelet-derived Growth Factor, Epidermal Growth Factor oder Basic Fibroblast Growth Factor sowie Stickstoffmonoxid (NO) die AT1R-Expression in der glatten Gefäßmuskulatur. Dieser Effekt, der über eine Destabilisierung der mRNA vermittelt wird (Nickenig 1994; Ichiki 1998), überspielt jedoch häufig positive transkriptionelle Effekte durch Wachstumsfaktoren. Ebenso haben verschiedene Zytokine wie Interleukin 1 $\alpha$ , Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  und Interferon  $\gamma$  eine inhibierende Wirkung auf die AT1R-Expression. (Übersicht in de Gasparo 2000).

#### 1.2.1.1.2. Signaltransduktionswege des AT1R

Die Bindung von Ang II an den AT1R aktiviert zelltypabhängig verschiedenste Signaltransduktionswege. Über die Kopplung an G<sub>q/11</sub> wird Phospholipase C aktiviert, was über die Bildung von Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) zu einer Freisetzung von Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) aus intrazellulären Speichern und einer Aktivierung von Proteinkinase C (PKC)

führt. Sowohl die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  als auch die Aktivierung von PKC verursachen eine Kontraktion von Gefäßmuskelzellen und verursachen dadurch eine Vasokonstriktion. Damit einhergehend reduziert die Aktivierung von an  $G_{i/o}$ -gekoppelten AT1R die Aktivität der Adenylatcyclase, wodurch die Produktion des vasodilatatorisch wirkenden „second messengers“ zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermindert wird (Übersicht in Hughes 2000). In einigen Zelltypen, z. B. VSMC, wirkt Ang II über die Aktivierung des nukleären Faktors kappa B (NF- $\kappa$ B) proinflammatorisch (Kranzhofer 1999; Ruiz-Ortega 2000). Ebenso wirkt die Aktivierung der Phospholipase D (PLD) durch Ang II proinflammatorisch. PLD stimuliert die Freisetzung von Arachidonsäure und begünstigt damit die Bildung von Prostaglandinen (Lassegue 1993). Des Weiteren ist der AT1-Rezeptor an der Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen beteiligt, wodurch extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  in den Intrazellulärraum strömt. Dieser Mechanismus spielt eine Rolle bei der Ang II induzierten Aldosteronproduktion und -sekretion sowie bei der Vasokonstriktion (Apfeldorf 1988). Der AT1R hat auch Eigenschaften einer Rezeptortyrosinkinase: Durch die Transaktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wie dem Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGF-R) oder dem Platelet derived Growth Factor-Rezeptor (PDGF-R) stimuliert AT1R Zellproliferation und -hypertrophie. Dabei werden durch Phosphorylierung die „mitogen-activated protein“ (MAP-) Kinasen ERK1 und ERK2 („extracellular signal-regulated kinases“) aktiviert, was letztlich zu einer verstärkten Expression von „early response“ Genen wie den Transkriptionsfaktoren c-Fos, c-Jun und c-Myc führt. Weiterhin aktiviert der AT1R Signaltransduktionswege von Zytokinrezeptoren, so z. B. Janus-Kinasen (JAK), die wiederum STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription)-Transkriptionsfaktoren aktivieren, und induziert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in einigen Zelltypen. (Übersicht in Guo 2001).



**Abb. 1.2.1.1 Signaltransduktionswege des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1**  
 Erläuterung der Abkürzungen siehe Abschnitt 1.2.1.1.2.

### 1.2.1.1.3. Verteilung und Funktion von AT1R *in vivo*

Der AT1R wird fast in allen Organen exprimiert. Hohe AT1R-Dichten wurden vor allem im Gehirn, in den Nebennieren, dem Herzen, den Gefäßen und in den Nieren gefunden. Die gut charakterisierten Wirkungen des RAS wie die Steigerung des Blutdrucks, der Natrium- und Wasserretention und die Stimulation von Proliferation und Kollagensynthese kardiovaskulärer Zellen werden über den AT1R vermittelt.

Im Gehirn verändert Ang II über den AT1R u.a. den Salzappetit, moduliert die zentrale Blutdruckregulation und beeinflusst die Hormonausscheidung in der Hypophyse (Culman 1995; Aguilera 1996).

In den Nebennieren werden AT1R insbesondere in der Zona Glomerulosa der Nebennierenrinde und den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks gefunden (Montiel 1993). Dort bewirken sie eine Freisetzung von Katecholaminen sowie von Aldosteron (Giacchetti 1996).

Im Herzen ist die Konzentration von AT1R im Reizleitungssystem besonders hoch, während die Konzentration im Myokard relativ gering ist (Allen 1990; Saavedra 1993). Über diese AT1-

Rezeptoren sowie über die Freisetzung von Katecholaminen hat Ang II einen positiv chronotropen und inotropen Effekt (Moravec 1990). Ang II stimuliert außerdem direkt und über die Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren Proliferation und Hypertrophie von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten sowie von glatten Gefäßmuskelzellen (Huckle 1994). Diese Prozesse spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von linksventrikulärer Hypertrophie und kardiovaskulärem „Remodeling“ (Übersicht in Bader 2001). Es konnte mittlerweile gezeigt werden, dass der Einfluss von Ang II auf die Entwicklung von linksventrikulärer Hypertrophie und Herzversagen unabhängig von einer Steigerung des arteriellen Blutdrucks ist (Paradis 2000). Die AT1R vermittelte Konstriktion von Gefäßmuskelzellen ist eine zusätzliche Belastung des kardiovaskulären Systems und trägt entscheidend zur Entwicklung eines arteriellen Hypertonus bei. Als weiterer kardiovaskulärer Risikofaktor wird die Entwicklung von Atherosklerose durch die proinflammatorische Wirkung der AT1R Stimulation beeinflusst.

In der Niere findet sich eine hohe AT1R-Expression auf den mesangialen Zellen des Glomerulums, auf interstitiellen Zellen der äußeren Medulla sowie den renalen Gefäßen. Etwas geringer ist AT1R-Dichte auf dem Epithel des proximalen Tubulus (Zhuo 1992a; Zhuo 1992b). Ang II inhibiert durch den AT1R die weitere Ausschüttung von Renin aus den Zellen der Macula densa und vermittelt so eine negative Rückkopplung auf das RAS (Zhuo 1992c; Bell 1999). Obwohl Ang II den renalen Gefäßwiderstand steigert und damit der renale Plasmafluss sinkt, fällt die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) nicht ab. Ang II steigert überwiegend in den efferenten Arteriolen den Gefäßwiderstand, wodurch der Filtrationsdruck in den glomerulären Kapillaren verstärkt und die GFR gesichert wird (Cervenka 1999). In den letzten Jahren ist zunehmend deutlich geworden, dass Ang II in der Pathophysiologie von chronischen Nierenerkrankungen und bei der Entwicklung einer Niereninsuffizienz eine wichtige Rolle spielt. Im Rahmen von chronischen Nierenerkrankungen kommt es zu einem Wachstum von überlebenden Nephronen. Durch die Aktivierung von AT1R werden sowohl Zellen im Glomerulum (mesangiale Zellen, Endothel) als auch Tubulusendothelzellen und interstitielle Fibroblasten zu Proliferation und/oder Hypertrophie angeregt. Ferner wird durch AT1-Rezeptoren eine verstärkte Bildung von Molekülen der extrazellulären Matrix induziert (Übersicht in Wolf 2003). Zusammen mit der durch Ang II gesteigerten Freisetzung des transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) beeinflusst dies das renale Remodeling durch verstärkte Fibrose. Hinzu kommt, dass Ang II durch die proinflammatorische Wirkung des AT1R Entzündungsprozesse unterhält und damit das Fortschreiten der Grunderkrankung unterstützt.

### 1.2.1.2. Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT2R)

Ang II bindet mit gleicher Affinität an den AT2R wie an den AT1R. Ebenso wie für den AT1R wurden für den AT2R spezifische Antagonisten, wie z.B. PD123319, entwickelt.

Sowohl im humanen Genom als auch im Genom der Ratte und der Maus findet sich ein einzelnes Gen für den AT2R auf dem X-Chromosom. Das Gen kodiert für ein Protein mit 363 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 41 kDa im unglykosylierten Zustand (Kambayashi 1993; Mukoyama 1993).

#### 1.2.1.2.1. Regulation der AT2R-Expression

Die Expression des AT2-Rezeptors ist proliferations- und wachstumsfaktorabhängig. Fötale Kälberserum, Wachstumsfaktoren wie PDGF oder basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) (Dudley 1993; Horiuchi 1995; Ichiki 1995a) oder Aktivatoren von PKC wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) reduzieren die AT2R-Expression (Kijima 1996; Murasawa 1996). Wahrscheinlich ändert die Aktivierung des PKC-Ca<sup>2+</sup>-Signaltransduktionsweges die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor des AT2R-Gens. In der Promotorregion des AT2R-Gens konnten u. a. AP1- und C/EBP-Bindungsstellen nachgewiesen werden, die eine negativ-regulatorische Wirkung auf die AT2R-Genexpression haben (Ichiki 1996).

Eine vermehrte AT2R-Expression konnte nach Stimulation mit Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Insulin und Insulin like Growth Factor (IGF-1) beobachtet werden (Kambayashi 1996).

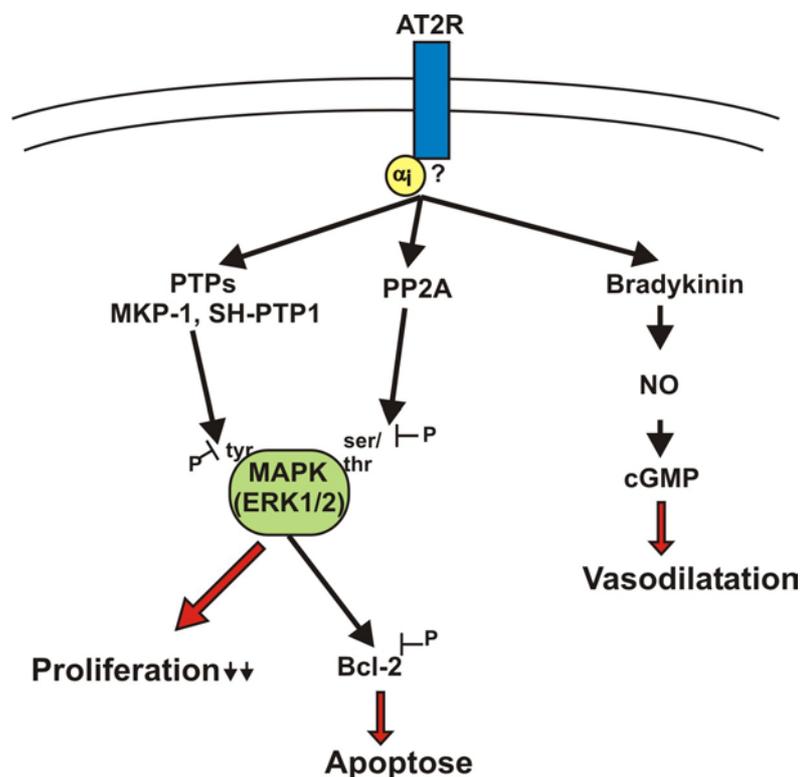
Eine höhere Expression von Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) in ruhenden Zellen scheint zumindest teilweise für die gesteigerte AT2R-Expression in ruhenden im Vergleich zu proliferierenden Zellen verantwortlich zu sein (Horiuchi 1995).

#### 1.2.1.2.2. Signaltransduktionswege des AT2R

Im Gegensatz zum AT1R konnte die Signaltransduktion des AT2R bisher nur ansatzweise aufgeklärt werden. Obwohl der AT2R strukturell zur Familie der GPCR gehört, wurde bisher eine Kopplung des Rezeptors an ein G-Protein nicht eindeutig nachgewiesen. Ein von einigen Arbeitsgruppen favorisiertes Konzept ist, dass der AT2R eine die AT1R-Signaltransduktion antagonisierende Wirkung besitzt. Eine Funktion des AT2R scheint die Aktivierung von Protein-Phosphorylasen bzw. -Phosphatasen zu sein. Die Bindung von Ang II an den AT2R aktiviert die Serin/Threoninphosphatase PP2A in neonatalen hypothalamischen Neuronen. PP2A dephosphoryliert und inaktiviert die durch AT1R-Stimulation aktivierten MAP-Kinasen (Huang 1996a; Huang 1996b). Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Aktivierung von Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP) wie der induzierbaren MAP-Kinase Phosphatase 1 (MKP-1) oder der SH-

PTP1 (SHP-1) durch den AT2-Rezeptor (Yamada 1996; Horiuchi 1997). Eine Aktivierung von MKP-1 würde MAP-Kinasen deaktivieren (Sun 1993). Unter bestimmten Bedingungen kann durch den AT2R die Aktivierung von MAP-Kinasen allerdings auch verstärkt werden. Werden PC12W-Zellen durch Nerve Growth Factor (NGF) zu einem neuronalen Phänotyp differenziert, hat die Bindung von Ang II an den AT2R eine vorübergehend vermehrte Aktivität der MAP-Kinasen ERK-1 und -2 zur Folge (Stroth 2000).

Aktivierung von MKP-1 dephosphoryliert und inaktiviert auch das Apoptose-Schutz-Protein Bcl-2 (Horiuchi 1997). Dies könnte der beschriebenen proapoptotischen Wirkung der AT2-Rezeptor-Stimulation zugrunde liegen. In mehreren Arbeiten konnte außerdem gezeigt werden, dass AT2R Stimulation, wahrscheinlich über eine gesteigerte Bradykinin-Freisetzung, die Bildung von NO stimuliert (Gohlke 1998). Durch die von NO vermittelte Steigerung des intrazellulären zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) bewirkt der AT2R so letztlich eine Vasodilatation und damit eine Blutdrucksenkung.



**Abb. 1.2.1.2 Signaltransduktionswege des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2**  
 Erläuterung der Abkürzungen siehe Abschnitt 1.2.1.2.2.

### 1.2.1.2.3. Verteilung und Funktion von AT2R *in vivo*

Im Fetus ist der AT2R der dominierende ATR-Subtyp und wird besonders in mesenchymalen Geweben hoch exprimiert. Direkt nach der Geburt sinkt die AT2R-Expression jedoch deutlich (Grady 1991). Aufgrund dieser Beobachtung wurde für den AT2R eine Funktion in der fötalen Entwicklung postuliert. Da sich jedoch AT2R-Knock-out-Mäuse normal entwickeln (Hein 1995; Ichiki 1995b), bleibt die Bedeutung von AT2R für die fötale Entwicklung weiter unklar. Im Gegensatz zum AT1R ist die Expression des AT2R im adulten Menschen und Nagetier auf wenige Organe wie Gehirn, Herz, Nebenniere, Niere und Fortpflanzungsorgane und bestimmte Zellpopulationen beschränkt. Dabei unterscheidet sich die Expression je nach Spezies deutlich.

Während der AT2R im Rattengehirn vor allem in Kerngebieten mit sensorischer Funktion zu finden ist, beschränkt sich die Expression beim Menschen auf das Cerebellum (Übersicht in Hohle 1995). Aufgrund von Knock-out Experimenten wird angenommen, dass der AT2R eine Rolle bei Steuerung von Durstentwicklung und explorativem Verhalten spielt. Außerdem reagierten die AT2R-Knock-out Mäuse auf Ang II-Infusionen mit einer größeren Steigerung des arteriellen Blutdrucks als Wildtyp-Tiere bzw. hatten einen höheren basalen Blutdruck (Hein 1995; Ichiki 1995b).

Bei Ratten konnte der AT2R im Herzen in geringen Mengen auf Myozyten und in den Koronarien nachgewiesen werden. Dagegen scheint der AT2R beim Menschen der dominierende Rezeptorsubtyp im Myokard zu sein und wird vor allem auf interstitiellen Fibroblasten und evtl. in geringerer Menge auf Myozyten exprimiert (Regitz-Zagrosek 1995).

Im Gegensatz zu den meisten Spezies, bei denen eine hohe AT2-Rezeptordichte im Nebennierenmark gefunden wird, ist diese im menschlichen Nebennierenmark deutlich geringer. In Nieren von erwachsenen Ratten wird der AT2R vor allem in Glomeruli, aber auch in kortikalen Tubuli und auf interstitiellen Zellen exprimiert (Edwards 1992; Sechi 1992). Im Tiermodell verbessert er durch eine Steigerung der cGMP-Bildung in der Niere die renale Mikrozirkulation (Siragy 1996; Siragy 1997).

Wichtig ist, dass die AT2R-Expression unter vielen pathophysiologischen Bedingungen wie Herzinsuffizienz, Nierenversagen, Myokardinfarkt, Hirnverletzungen, Gefäßschädigung und Wundheilung z. T. massiv gesteigert wird (Übersicht in de Gasparo 2000). Die Hypothese, dass AT2R für die Regulation von Heilungs- und Remodelingprozessen von Bedeutung sind, wird unterstützt durch die Beobachtung, dass durch die Gabe eines AT2R-Antagonisten die Neointima-Bildung nach Gefäßverletzungen verringert wird (Janiak 1992). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass AT2R für die Regeneration von peripheren Nerven nach

traumatischen Läsionen von Bedeutung sind (Reinecke 2003). Im Gegensatz dazu wurde von mehreren Gruppen eine AT1R-antagonistische antiangiogene AT2R Wirkung gezeigt, die aber nicht unumstritten ist (Munzenmaier 1996; Silvestre 2002; Walther 2003).

Die Hochregulation der AT2R-Expression auf kardialen Fibroblasten nach Myokardinfarkt und im Rahmen von kardialem Remodeling könnte auf profibrotische und proliferationsstimulierende AT2R-Effekte hindeuten (Tsutsumi 1998; Wharton 1998). Knock-out Modelle kardiovaskulärer Erkrankungen führten auch hier jedoch zu widersprüchlichen Befunden (Akishita 2000; Senbonmatsu 2000; Ichihara 2001; Inagami 2001; Ichihara 2002). Das ursprüngliche auf Zellkulturexperimenten mit PC12W und R3T3 Zellen beruhende Konzept, dass der AT2R AT1R-antagonistische antiproliferative und proapoptotische Ang II Effekte vermittelt, muss also differenzierter betrachtet werden.

### **1.3. Herleitung der Fragestellung**

Das Renin-Angiotensin-System und das HIF-„System“, d. h. die Gesamtheit der von HIF induzierten Zielgene, dienen gemeinsam der Aufrechterhaltung der Gewebe- bzw. Organperfusion und damit letztendlich der Versorgung von Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob und inwieweit beide System interagieren. So liegen bereits einige fragmentarische Hinweise auf eine ATR-Regulation durch Hypoxie vor.

In der Randzone von Myokardinfarkten wurde z. B. eine gesteigerte AT2R-Expression gezeigt (Wharton 1998). In diesem Bereich ist auch die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression am stärksten (Jurgensen 2004).

Beim Remodeling nach Myokardinfarkt verändert sich auch das Expressionsmuster der Angiotensin II-Rezeptoren. In der Regel ist beim Menschen und beim Nager die ATR-Expression in frühen Phasen von Kardiomyopathien oder nach einem Infarkt hochreguliert (Übersicht in Volpe 2003). Inwieweit das Remodeling und die ATR-Induktion direkt durch die lokale Ischämie oder indirekt durch eine vermehrte Bildung von Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren reguliert wird, ist aber nicht geklärt.

Der Einfluss von Hypoxie auf die ATR-Expression ist bisher in Tiermodellen mit meistens chronischer, über mehrere Tage andauernder, Hypoxie untersucht worden. In der Ratte führte diese zur vermehrten Expression von AT1R im Glomus caroticum (Leung 2000; Fung 2002). Im Ratten-Pankreas wurde nach chronischer Hypoxie eine gesteigerte AT1<sub>B</sub>R- und AT2R-Expression nachgewiesen (Chan 2000). Im Rahmen eines durch Hypoxie induzierten

pulmonalen Hochdrucks konnte eine gesteigerte kardiale AT2R-Expression gemessen werden, ohne dass sich die AT1R-Expression veränderte (Chassagne 2000). Werden Ratten sieben Tage in einer Umgebung mit 10% O<sub>2</sub> gehalten, findet sich an den alveolären Membranen eine um ein Drittel gesteigerte AT1R-Dichte (Zhao 1996). Bei diesen chronischen Modellen können jedoch direkte hypoxische Effekte nicht von sekundären Mechanismen, z.B. im Rahmen von Geweberemodelling, differenziert werden.

Auch die hohe Expression von AT2R im Fötus, die offenbar nicht mit der Regulation von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen zusammenhängt, könnte durch den niedrigen pO<sub>2</sub> im fetalen Blutkreislauf bedingt sein.

Zusammengenommen sind dies Hinweise darauf, dass Hypoxie einen regulatorischen Einfluss auf die ATR-Expression haben könnte. Bisher gibt es aber keine Daten, die dies eindeutig nachweisen. Insbesondere gibt es noch fast keine Daten über den Einfluss von Sauerstoff auf die ATR-Expression in Zellkulturen. Lediglich für den AT1R wurde bisher eine Induktion von mRNA und Protein in Gefäßmuskelzellen der Ratte unter Hypoxie beschrieben (Sodhi 2003). In dieser Arbeit wurde jedoch nicht auf die zugrunde liegenden Mechanismen der hypoxischen Induktion eingegangen. Konkrete Daten über den Einfluss von HIF auf die ATR-Expression und die Identifizierung der funktionellen HREs fehlen daher bis heute.

Umgekehrt gibt es Befunde, die auf eine Regulation von HIF durch Ang II hindeuten. In isolierten Gefäßmuskelzellen der Ratte induzierte Ang II über den AT1R HIF-1 $\alpha$ . Diese Induktion übertraf sogar die Induktion durch Hypoxie und ist wahrscheinlich auf transkriptionelle und translationale Mechanismen zurückzuführen (Richard 2000).

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass es bis zu vier Wochen nach einem experimentellen Myokardinfarkt in der Ratte zu einer Proteininduktion von HIF, besonders HIF-2 $\alpha$ , in infarktfernen Regionen des Myokards kommt (Jurgensen 2004). Dies könnte ein Anzeichen für eine sauerstoffunabhängige Stabilisierung von HIF sein, z. B. durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Angiotensin II.

Als ein weiterer Hinweis auf eine Beeinflussung der HIF-Expression durch Ang II können die „post kidney transplantation erythrocytosis“ (PTE), die durch ACE-Hemmer behandelt werden kann, und die Beobachtung, dass eine medikamentöse Blockade des RAS u.U. zu einer Anämie mit inadäquat niedriger EPO-Produktion führen kann, gewertet werden.

Diesen Hinweisen auf eine Interaktion zwischen dem RAS und dem HIF-„System“ sollte in der vorliegenden Arbeit in Zellkulturmodellen nachgegangen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es konkret,

1. hypoxieabhängige Veränderungen der Regulation der ATR-Expression in isolierten Zellen (VSMC und kardialen Fibroblasten für AT1R, PC12 und 3T3Li für AT2R) darzustellen und einen möglichen direkten Einfluss von HIF auf die ATR-Expression nachzuweisen;
2. die postulierte Induktion von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  durch Ang II in VSMC zu überprüfen und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu charakterisieren.

## 2. Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma (München) bezogen.

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. PC12W

Die Zelllinie PC12W ist ein Subklon der Zelllinie PC12. Diese wurde aus einem Phäochromocytom der Ratte isoliert (Greene 1976) und wird häufig als Modell für neuronale oder katecholamin-synthetisierende Zellen genutzt. PC12W-Zellen exprimieren im Gegensatz zu PC12 Zellen keine AT1R sondern ausschließlich AT2R (Speth 1990). Damit eignen sie sich besonders für Untersuchungen zu Regulation und Funktion von AT2R.

Die Zelllinie PC12W wurde freundlicherweise von Prof. S. Bottari (INSERM, Grenoble, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2. 3T3-L1

Die Zelllinie 3T3-L1 besteht aus immortalisierten neonatalen Fibroblasten der Maus (Dudley 1991). Sie wurde freundlicherweise von Dr. M. Praus (Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité, Berlin) überlassen.

#### 2.1.3. Aortale Gefäßmuskelzellen der Ratte (RASMC)

Aortale Gefäßmuskelzellen der Ratte (RASMC) werden häufig für die Simulation und Untersuchung kardiovaskulärer Erkrankungen genutzt. Da RASMC AT1R in größerer Zahl exprimieren und Gefäßmuskelzellen pathophysiologisch bei kardiovaskulären Erkrankungen eine große Bedeutung haben, wurden sie insbesondere bei der Erforschung der physiologischen und pathophysiologischen Ang II-Wirkung häufig eingesetzt. Die hier verwendeten RASMC wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe PD Dr. K. Graf (DHZB, Berlin) zur Verfügung überlassen.

#### 2.1.4. Kardiale Fibroblasten der Ratte (rFib)

Die in dieser Arbeit verwendeten kardialen Fibroblasten der Ratte (rFib) wurden aus Herzen von Ratten isoliert, die Teil einer Kontrollgruppe für andere Experimente waren (Bernhardt 2006).

Für die Isolation wurden folgende Lösungen benutzt:

PBS (ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ): 8,5 mM  $Na_2HPO_4$ , 1,5 mM  $KH_2PO_4$ , 137 mM NaCl, 3 mM KCl

Collagenase-/Dispase-Lösung: 120 µl Trypsin (2,5%), 188 µl CaCl<sub>2</sub> (0,1 M), 900 µl Rinderserumalbumin (BSA 7,5%), 250 µl HEPES (1 M), 925 µl Kollagenase (2%), 96 µl Dispase (24 U/ml) ad 25 ml Krebs-Henseleit-Puffer, pH 7,4.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Schritte auf Eis oder mit gekühlten (4°C) Lösungen durchgeführt.

Das in sehr kleine Gewebestücke (ca. 1 mm Kantenlänge) zerteilte Myokard wurde mit PBS gewaschen, bis der Überstand frei von zellulären Bestandteilen war. Anschließend wurde das Gewebe 20 min bei 37°C mit der Collagenase-/Dispase-Lösung inkubiert. Dann wurde der Überstand mit den Fibroblasten abgenommen und etwaige Gewebereste wurden erneut mit der Collagenase-/Dispase-Lösung verdaut. Schließlich wurden alle Überstände gepoolt und mit einem gleichen Volumen DMEM mit 10% FKS versetzt, um die Enzymaktivität zu unterbinden. Die Zellen wurden pelletiert, mit PBS (ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>) gewaschen, erneut pelletiert und dann auf Zellkulturschalen in Kulturmedium (s.u.) verteilt. Nach einer Stunde Inkubation im Zellkulturschrank wurde das Medium vorsichtig abgenommen, die Schalen zwei Mal mit eiskaltem PBS (ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>) gewaschen und anschließend wieder mit Kulturmedium aufgefüllt. Dieser Waschvorgang wurde am ersten und zweiten Tag nach Isolation wiederholt.

### **2.1.5. Kulturbedingungen**

Alle Kulturmedien, Zusätze und Enzyme für die Zellkultur wurden von PAA (Linz, Österreich) bezogen.

Sämtliche Zellen wurden bei 37°C in 95% Raumluft und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. PC12W-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% Pferdeserum und 5% fötalem Kälberserum (FKS) sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Für 3T3-L1-Zellen, RASMC sowie rFib wurde DMEM-Medium mit Zusatz von 10% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet.

Erreichten die Zellen eine Konfluenz von ca. 80%, wurden sie mit 0,1 % Trypsin/0,67 mM EDTA in PBS von der Kulturschale gelöst und in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:5 auf neue Kulturschalen verteilt. Für die Experimente wurden von RASMC und rFib Zellen zwischen der 4. und 10. Passage verwendet.

Für Experimente mit Hypoxie wurde ein NuAire-Inkubator (Zapf, Sarstedt) benutzt, bei dem der O<sub>2</sub>-Gehalt frei wählbar ist. Dabei wird Sauerstoff bis zum gewünschten O<sub>2</sub>-Gehalt durch Stickstoff ersetzt. In den hier dargestellten Experimenten wurde ein Gasgemisch von 0,5% - 21% O<sub>2</sub>, 74% - 94,5% N<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> verwendet.

## 2.2. mRNA-Analyse

### 2.2.1. Extraktion der RNA

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit gekühlten Reagenzien durchgeführt, um die Degradierung von RNA durch ubiquitär vorhandene RNasen zu minimieren.

Zur Isolierung von RNA aus Zellkultur wurde eine Modifikation der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski 1987) angewandt. Die Zellen wurden einmal mit PBS (ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) gespült, in 10 ml PBS abgeschabt und pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml RNA-Bee (Tel-Test, Friendswood, USA) gelöst, mit 100  $\mu$ l Chloroform versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Der saure pH-Wert während der Extraktion in Verbindung mit der speziellen Phenol/Chloroform-Mischung (Phenol : Chloroform = 5 : 1) führt dazu, dass sich die DNA in der Interphase und die RNA in der oberen, wässrigen Phase befindet. Nach dem Trennen der Phasen durch Zentrifugation wurde die wässrige Phase mit der RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von einem Volumenteil Isopropanol gefällt ( $-80^{\circ}C$ ,  $> 1$  h). Anschließend wurde die RNA pelletiert, einmal mit 80%igem Ethanol gewaschen, in Hybridisierungspuffer (80% Formamid; 40 mM PIPES, pH 6,4; 400 mM NaCl; 1mM EDTA) aufgenommen und zur vollständigen Lösung 15 min bei  $95^{\circ}C$  erhitzt. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Die Absorption einer 1:100 Verdünnung wurde bei 260 und 280 nm Wellenlänge im Photometer (Pharmacia, Erlangen) gemessen. Der Quotient optischen Dichte (OD)  $OD_{260}:OD_{280}$  diente zur Beurteilung möglicher Proteinkontamination der extrahierten RNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Gegebenenfalls wurde die Proteinkontamination durch einen weiteren Isolationsschritt verringert. Die RNA-Konzentration wurde anhand der  $OD_{260}$  bestimmt: 1  $OD_{260}$  entspricht 40  $\mu$ g RNA/ml. Bis zur weiteren Analyse wurden die Extrakte bei  $-80^{\circ}C$  aufbewahrt.

### 2.2.2. mRNA-Nachweis mittels RT-PCR

Die Reverse Transkription (RT) in Verbindung mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine verhältnismäßig einfache und schnelle Methode zum Nachweis spezifischer mRNA-Transkripte. Für eine genaue Quantifizierung von Gen-Transkripten eignet sich diese Methode jedoch nicht gut, da insbesondere die Effizienz der reversen Transkription größeren Schwankungen unterliegt.

Bei der Reversen Transkription wird mit Hilfe eines aus Retroviren stammenden Enzyms, der Reversen Transkriptase, und unspezifischen Primern („random hexamers“) die gesamte zelluläre RNA, also auch die mRNA, in „complementary“ DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend

wird eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt, und die Produkte werden auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Als Kontrolle wurde das  $\beta$ -Aktin-Gen benutzt.

Für die RT wurde folgender Ansatz auf Eis vorbereitet: (alle MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

5 $\mu$ l	5x First Strand Buffer
2 $\mu$ l	dNTPs (je 2,5 mM)
2,5 $\mu$ l	Random Hexamers (50 $\mu$ M)
2,5 $\mu$ l	DTT (Dithiothreitol ; 100 mM)
1,25 $\mu$ l	RNasin
8,75 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O (RNase frei)

Diesem Ansatz wurde 1  $\mu$ g RNA zugegeben. Um RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen, wurde der Ansatz anschließend 5 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l (10 U) Superscript II RT (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) erfolgte die reverse Transkription 45 min bei 37°C. Danach wurde die reverse Transkriptase durch 10 min Inkubation bei 93°C denaturiert. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Für die PCR wurden 2,5  $\mu$ l der cDNA mit folgendem PCR-Ansatz versetzt: (alle MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

2,5 $\mu$ l	10x Taq Pol Puffer
1 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
1 $\mu$ l	dNTPs (je 2,5 mM)
1,25 $\mu$ l	Primer AT2R+ (10 $\mu$ M)
1,25 $\mu$ l	Primer AT2R- (10 $\mu$ M)
15,25	H <sub>2</sub> O
0,25	Taq Pol (5 U/ $\mu$ L)

Primer:

Primer forward (AT2R+): TATGGCTTTCCACCTGAGA

Primer reverse (AT2R-): AACAGCAGCTGCCATCTTCA

Programm:

5 min	94°C	} 24 Zyklen
1 min	93°C	
1 min	60°C	
1 min	72°C	
10 min	72°C	

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarose/TAE (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,5)-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert.

### 2.2.3. mRNA-Analyse mittels Ribonuklease-Protection-Assay

Im Ribonuklease-Protection-Assay (RPA) wird mRNA durch eine radioaktiv markierte Antisense-Sonde nachgewiesen. Dazu wird in ein geeignetes Plasmid ein definierter Abschnitt der cDNA des Zielgens kloniert und dann so *in vitro* transkribiert, dass eine spezifische, radioaktiv markierte RNA-Sonde entsteht, die dem definierten Abschnitt des Zielgens komplementär ist, also eine antisense RNA. Ein Überschuss an Sonde wird mit den zu untersuchenden mRNA-Extrakten inkubiert, so dass stabile RNA-Hybride aus Sonde und mRNA des Zielgens entstehen. Nicht hybridisierte Sonden und andere einzelsträngige RNA-Moleküle werden durch Verdau mit Ribonuklease (RNase) A und T<sub>1</sub> degradiert und die „geschützte“ Sonde wird durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie dargestellt. Als interne Kontrolle für den Einsatz gleicher RNA-Mengen wurde die U6 small nuclear (U6sn) RNA verwendet. U6snRNA ist ein Spleißfaktor und daher in ihrer Expression einem „housekeeping gene“ vergleichbar.

#### 2.2.3.1. In vitro-Transkription und <sup>32</sup>P-Markierung der RPA-Sonden

Die benötigten Plasmide lagen bei Beginn der Arbeit vor (Wiesener 2003; Warnecke 2003; Jurgensen 2004). Es handelte sich um das Plasmidgrundgerüst pcDNA3, in das definierte Abschnitte der cDNA der zu analysierenden Gene kloniert worden waren. Dabei wurden die Genabschnitte so in den Polylinker des Plasmids kloniert, dass durch *in vitro*-Transkription des linearisierten Plasmids mit SP6-RNA-Polymerase bzw. T7-RNA-Polymerase (für die U6snRNA-Sonde) eine Antisense-Sonde entsteht. Für die Generierung der radioaktiven Sonden wurde der Transkriptions-Ansatz mit einem finalen Volumen von 20 µl (1x Transkriptionspuffer; 10 mM DTT (Dithiothreitol); je 0,5 mM CTP, ATP, UTP; 20 U RNasin (alle Roche, Mannheim); 4 µl α-<sup>32</sup>P-GTP (= 40µCi; 400 Ci/mmol, Amersham, Freiburg); 1-2 µg Plasmid; 20 U RNA-Polymerase (SP6 oder T7, Roche, Mannheim)) 90 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Um die Plasmid-DNA aus dem Ansatz zu entfernen, wurden anschließend 20 U DNase I (Roche, Mannheim) zugegeben, und der Ansatz wurde für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µl STE (10 mM Tris, pH 7,5; 2 nM EDTA; 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat)) beendet. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden mit Sephadex-G-50 Säulen (Roche, Mannheim) entfernt. Zum Fällern der RNA-Sonde wurde der Ansatz mit 250 µl Ethanol, 10 µl 3 M Natriumacetat und 40 µg *E. coli* tRNA (Roche, Mannheim) versetzt, 1 h auf Trockeneis präzipitiert und anschließend pelletiert. Das Pellet wurde in 80 µl

Hybridisierungspuffer bei 95°C gelöst. Die spezifische Aktivität der Sonde wurde in einem Szintillationszähler (Wallac, Boston, USA) gemessen.

Gen	Geschütztes Fragment	5' – 3'-Ende	Accession-Nr.
HIF-1 $\alpha$	165 bp	nt 682 – 846	NM02439
HIF-2 $\alpha$	298 bp	nt 1654 – 1951	AJ277828
VEGF	223 bp	nt 2280 – 2502	M63971
AT1R	200 bp	nt 141 - 340	M87003.1
AT2R	209 bp	nt 374 - 582	D16840.1
U6snRNA	107 bp	nt 1 – 107	X01366

Tabelle 2: RPA-Sonden

### 2.2.3.2. RNase-Protection-Assay

#### 2.2.3.2.1. Hybridisierung

Für die Hybridisierung der Sonde mit der mRNA des jeweiligen Gens wurden 30  $\mu$ g (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ ) oder 50  $\mu$ g (AT1R, AT2R, VEGF) der RNA-Extrakte mit Hybridisierungspuffer auf 50  $\mu$ l aufgefüllt. Hiervon wurde jeweils ein 1  $\mu$ l abgenommen und in einem neuem Reaktionsgefäß auf 50  $\mu$ l aufgefüllt, um mit der U6snRNA-Sonde hybridisiert zu werden. Es wurden jeweils ca. 1.000.000 cpm der Sonden pro Ansatz verwendet. Für jede Sonde wurde ein Ansatz ohne RNA mitgeführt, um die Vollständigkeit des RNase-Verdau zu kontrollieren. Die Ansätze wurden 10 min bei 95°C denaturiert und dann 16 h bei 55°C (60°C für Ratten-HIF-2 $\alpha$  Sonde) im Wasserbad hybridisiert.

#### 2.2.3.2.2. Ribonuklease-Verdau und Phenol-Chloroform-Extraktion

Durch Zugabe von 350  $\mu$ l RNase-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 300 mM NaCl), RNase A (40  $\mu$ g/ml) und RNase T<sub>1</sub> (2  $\mu$ g/ml) und Inkubation bei 25°C, 30 min wurde einzelsträngige RNA degradiert. Um die RNasen zu inaktivieren, wurden 60  $\mu$ l einer Proteinase K Lösung (1 mg Proteinase K/ml wurden zuvor mit 200  $\mu$ l 20% SDS versetzt) pro Ansatz hinzugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nun wurden 50  $\mu$ l des U6snRNA-Ansatzes dem zugehörigen Ansatz mit der Sonde des zu untersuchenden Gens hinzugefügt. Die geschützten RNA-Hybride wurden mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:25:1)-Extraktion extrahiert. 410  $\mu$ l der wässrigen, RNA-haltigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol und 40  $\mu$ g tRNA (Roche, Mannheim) auf

Trockeneis gefällt (>1/2 h). Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation (30 min, 16000 x g, 4°C) pelletiert.

#### **2.2.3.2.3. Gelelektrophorese**

Die RNA-Pellets wurden in 5 µl Ladepuffer (1x TBE; 80% Formamid; 0,1% Bromophenolblau; 0,1% Xylen Cyanol) aufgenommen und 10 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden auf ein denaturierendes Harnstoff-6% Acrylamid-Gel (National Diagnostics, Hesse Hul, UK) aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde ein <sup>32</sup>P-markierter DNA-Marker, pBR322 DNA-MspI Digest (New England Biolabs, Frankfurt) mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 65 W (ca. 1600 V, 55 mA) für 2,5 h. Anschließend wurden das Gel auf einem Vakuumtrockner getrocknet und ein Röntgenfilm (X-OMAT LS, Kodak, Chalon-sur-Saône, Frankreich) bei -80°C über Nacht exponiert.

#### **2.2.3.2.4. Quantifizierung der Signale**

Für eine genaue Quantifizierung der Signalintensität wurde ein Phosphoimager (Fujix BAS 2000, Fuji, Japan) benutzt. Die Auswertung der Signalintensität erfolgte mit dem Programm TINA 2.0 (Raytest, Straubenhardt). Dabei wurde das Signal des Zielgens in Relation zur Signalintensität der U6sn-Sonde gesetzt.

### **2.3. Proteinnachweis mittels Western-Blot**

#### **2.3.1. Proteinextraktion**

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit gekühlten Reagenzien durchgeführt, um die Degradierung von Proteinen zu minimieren.

Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS (ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>) gewaschen und dann in 10 ml pro Fraktion abgeschabt und pelletiert. Das Zellpellet wurde, je nach Größe, in 150-300 µl Extraktionspuffer (8 M Urea; 10mM Tris, pH 6,8; 10% Glycerol; 1% SDS; 5 mM DTT; 0,5 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid); je 1 mg/l der Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin) aufgenommen und homogenisiert (Homogenisator Ultra-Turrax; Ika, Staufen).

Die Proteinkonzentration wurde colorimetrisch nach Anweisung des Herstellers mittels Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad, München) bestimmt. Bis zur weiteren Analyse wurden die Extrakte bei -80°C aufbewahrt.

### 2.3.2. Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE und Western-Blot

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Für HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  – mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa – wurde ein Gel mit einer Acrylamidkonzentration von 10% gewählt. Um die Größe der Proteine abschätzen zu können, wurde in eine der Spuren ein Proteinmarker (Prestained Molecular Weight Marker; MBI Fermentas, St.Leon-Rot) geladen, der u. a. ein 120 kDa-Protein enthält. Je 50 – 100  $\mu$ g der Proteinextrakte wurden mit 5x Ladepuffer (250  $\mu$ M Tris; 50% Glycerol; 10% SDS; 500  $\mu$ M DTT; 0,5% Bromophenol Blau) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte für 2,5 h bei 100 V in Tris-Glycin Puffer (25 mM Tris-Base; 200 mM Glycin; 0,1% SDS). Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P; Millipore, Bedford, USA) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 120 V und einer Begrenzung der Stromstärke auf 200 mA für 2 h in Tris-Glycin-Methanol Puffer (10 mM Tris; 200 mM Glycin; 20% Methanol).

### 2.3.3. Immunfärbung

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Membranen 16 h bei 4°C in einem Blockpuffer (PBS; 5% Trockenmilch; 0,1% Tween 20) inkubiert.

Für HIF-1 $\alpha$  wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes HIF-1 $\alpha$  (Novus; Littleton, USA) verwendet, der mit Ratten-HIF-1 $\alpha$  kreuzreagiert. Der Antikörper wurde 1:1000 mit Blockpuffer verdünnt und für 2 h bei RT mit der Membran inkubiert.

Für HIF-2 $\alpha$  wurde ein affinitätsgereingter polyklonaler Kaninchen-Antikörper (PM9, (Rosenberger 2002)) genutzt. Er wurde uns freundlicherweise von Herrn P. Ratcliffe (Wellcome Trust Center for Human Genetics, Oxford, UK) überlassen. Der Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuren 337-439 des murinen HIF-2 $\alpha$  und erkennt auch Ratten-HIF-2 $\alpha$ . Es wurde eine Verdünnung von 1:500 in Blockpuffer eingesetzt und die Membranen wurden ebenfalls 2 h bei RT mit dem Antikörper inkubiert.

Als sekundäre Antikörper wurden, je nach Spezies des primären Antikörpers, Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase = HRP)-gekoppelte Antikörper benutzt: Ziege-anti-Maus-HRP für HIF-1 $\alpha$  und Schwein-anti-Kaninchen-HRP für HIF-2 $\alpha$  (beide DAKO; Ely, UK). Die Detektion der Signale erfolgte durch Chemilumineszenz mit dem Supersignal West Extended Duration Substrate (Pierce; Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers auf X-omat LS Röntgenfilm (Kodak; Chalon-sur-Saône, Frankreich). Um den Transfer der Proteine und gleiche Beladung zu überprüfen, wurden die Membranen mit Coomassie-Lösung (0,1% Coomassie Brilliant Blue; 50% Methanol) angefärbt.

## 2.4. Proteinnachweis mittels $^{125}\text{J}$ -Ang II Bindungsassay

Die ATR-Protein-Expression wurde mit Hilfe von  $^{125}\text{J}$ -(Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)-Ang II-Bindungsexperimenten an nativen, in 24-Loch-Platten kultivierten Zellen bestimmt. Man verwendet hierzu ein Ang II-Derivat, das nach Bindung an die Rezeptoren nicht internalisiert wird. Vor der Inkubation mit dem  $^{125}\text{J}$ -(Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)-Ang II wurde gebundenes Ang II aus dem Zellkulturmedium bzw. dem FKS durch Waschen mit einem sauren Glycinpuffer entfernt. Der Anteil an gebundenem  $^{125}\text{J}$ -(Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)-Ang II im Bindungsexperiment, der nicht durch Vorinkubation mit 1  $\mu\text{M}$  kaltem Ang II verdrängt werden kann, wird als unspezifische Bindung definiert.

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert und jeweils 24 h durch Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>), 100  $\mu\text{M}$  DP oder 100  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub> stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 5 min bei 4°C mit 250  $\mu\text{l}$  Glycinpuffer (50 mM Glycin, 150 mM NaCl, pH 3) inkubiert. Damit wurde eventuell gebundenes Ang II aus der Zellkultur entfernt. Danach wurden die Zellen drei Mal mit Bindungspuffer (50 mM TrisHCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 % Rinder-Serum-Albumin) gewaschen.

Gegebenenfalls erfolgte jetzt die Vorinkubation mit 1  $\mu\text{M}$  „kaltem“ Ang II oder 10  $\mu\text{M}$  DuP 753 in 200  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer für 30 min bei Raumtemperatur.

Dann wurden 25  $\mu\text{l}$  „Tracer working solution“ (5  $\mu\text{Ci}$   $^{125}\text{J}$ -Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup> Ang II/ml) zugesetzt und der Ansatz für eine 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Um das ungebundene  $^{125}\text{J}$ -(Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)-Ang II zu entfernen, wurden die Zellen vier Mal mit PBS gewaschen, wobei der erste Überstand zur späteren Messung aufbewahrt wurde. Die Zellen wurden im Anschluss durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  2 N NaOH lysiert und die Vertiefungen mit je 500  $\mu\text{l}$  1% SDS ausgewaschen. Das Zelllysat und die zugehörige SDS-Waschlösung wurden gepoolt und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Wallac, Boston, USA) gemessen.

Parallel wurde eine Proteinbestimmung aus je drei nicht mit  $^{125}\text{J}$  Ang II inkubierten Wells, durchgeführt, indem die Zellen gewaschen und anschließend in Aqua dest. lysiert wurden. Die Proteinmenge pro Vertiefung wurde wie oben beschrieben (s. Abschnitt 2.3.1) bestimmt. Zur Normalisierung wurde die gemessene  $^{125}\text{J}$ -Ang II-Bindung durch den Mittelwert der Proteinmenge der drei Vertiefungen geteilt und auf die unstimulierten Ausgangswerte bezogen.

## 2.5. MTS Proliferationsassay

Um die Proliferation von PC12W-Zellen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen zu bestimmen, wurde der Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega; Mannheim) benutzt. Mit diesem Assay wird die Aktivität von Dehydrogenasen in Mitochondrien

lebender Zellen gemessen, die das Substrat MTS (3-(4,5-Dimethylthiozol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazoliumsalz) mit Hilfe des Elektronenfängers PES (Phenazin-Ethosulfat) zu Formazan umwandeln. Die Umsetzung von MTS zu Formazan kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden und ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $5 \times 10^3$  Zellen/Vertiefung in 96-Well Platten in normalem Kulturmedium ausgesät, 24 h später wurde das Medium durch FKS-reduziertes Medium (0,5% FKS) ersetzt oder ein Mediumwechsel mit Kulturmedium durchgeführt. Weitere 24 h später wurden die Zellen 24 h durch 100  $\mu$ M DP bzw. Inkubation in 0,5% O<sub>2</sub>, 94,5% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel mit 80% Kulturmedium und 20% Substratlösung durchgeführt. Bis zu einer ausreichenden Färbung des Mediums wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Raumluft inkubiert. Die Absorption wurde bei 490 nm gegen 630 nm im ELISA-Reader (Dynatech MR5000; Dynatech Laboratories; Chantilly, USA) gemessen. Die Extinktion von je 24 Vertiefungen mit gleichen Versuchsbedingungen wurden gemittelt. Angegeben sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

## 2.6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit dieser Methode kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Dafür wird ein synthetisches, doppelsträngiges Oligonukleotid als radioaktive Sonde benutzt, das die Bindungssequenz eines Transkriptionsfaktors enthält. Durch Inkubation mit Kernextrakten binden die entsprechenden Transkriptionsfaktoren an die DNA. Die Proben werden auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die ungebundene Sonde läuft dabei bis zum unteren Ende des Gels. Durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren wird die Sonde im Gel retardiert und die Position der Bande auf dem Röntgenfilm daher verändert (= Gelshift).

Um die gebundenen Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, können die Proben mit einem spezifischen Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor vorinkubiert werden. Durch die Bindung des Antikörpers wird entweder die Sonde weiter verlangsamt, und es entsteht ein sogenannter Supershift, oder der Antikörper bindet in der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors und hebt die Bindung zwischen Transkriptionsfaktor und Sonde auf, so dass die spezifische Bande eliminiert wird.

Die Spezifität der Proteinbindung an die Sonde wird überprüft, indem in einem Ansatz die nicht radioaktive (=kalte) Sonde im Überschuss zugefügt wird und in einem anderen Ansatz ein nicht

spezifisches oder mutiertes kaltes Oligonukleotid. Nur die kalte spezifische Sonde kann dabei die radioaktive Sonde aus der Bindung verdrängen, d. h. die retardierte Bande wird eliminiert. Das unspezifische Oligonukleotid hat dagegen keinen Einfluss.

### 2.6.1. Präparation von Kernextrakten aus PC12W-Zellen

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit gekühlten Reagenzien durchgeführt, um die Degradierung von Proteinen zu minimieren. PC12W-Zellen wurden einmal mit kaltem PBS (ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) gewaschen und dann in 10 ml pro Fraktion abgeschabt und pelletiert. Das Pellet wurde in 400  $\mu$ l hypotonem Puffer (10 mM HEPES, pH 7,9; 1,5 mM  $MgCl_2$ ; 10 mM KCL; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 1 mM NaF; 4 mM Natriumorthovanadat) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Um die Zellmembran aufzuschließen, wurden 25  $\mu$ l 10% NP-40 zugegeben und kurz gevortext. Die Zellkerne wurden bei 1000 x g, 4°C für 5 min pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Kernpellet wurde in 200  $\mu$ l hypertonem Puffer (5 mM HEPES, pH 7,9; 26% Glycerol; 420 mM KCl; 1,5 mM  $MgCl_2$ ; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF) aufgenommen und für 20 min auf Eis geschüttelt, so dass die Proteine zusammen mit dem Wasser aus dem Zellkern in den Überstand gelangen konnten. Anschließend wurden die Extrakte bei 16000 x g, 4°C, 20 min zentrifugiert, der Überstand wurde in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Aliquots wurden jeweils nur einmal aufgetaut.

### 2.6.2. $^{32}P$ -Markierung der EMSA-Sonden

Im AT2R-Gen von Maus, Ratte und Mensch wurden durch eine Sequenzanalyse (MatInspector (Quandt 1995)) drei verschiedene potentielle HRE gefunden. Diese wurden nach ihrer Lage im Gen „AT2R-prom“ (Ratte, Mensch), „AT2R-5“ (nur Maus) und „AT2-3“ (alle drei Spezies) genannt. Folgende Oligonukleotide wurden als sense- und antisense-Strang synthetisiert. Dabei dienten die Oligo-dT Enden der besseren Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide. Gleichzeitig werden dadurch weitere potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen ausgeschlossen, da diese überwiegend aus G und C bestehen.

**AT2R-prom (+)** TTT TTT GTA CCA CGC CCT GCT TTT TT

Die HIF-bindende Sequenz (HBS; *kursiv*) befindet sich auf dem antisense-Strang. Der unterstrichene Bereich entspricht acc. no. D43778.1, nt 57-71 (RATAIIT2R „Rattus norvegicus gene for angiotensin II type 2 receptor“). Diese potenzielle HIF-Bindungsstelle liegt im Promotorbereich ca. 1500 bp stromaufwärts des TATA-Signals.

**AT2R-5'** (+) TTT TGT GTG TGC GTG TAT GAA TTT TTT

Das HBS-Motiv (*kursiv*) befindet sich auf dem sense-Strang. Der unterstrichene Bereich entspricht acc. no. U00768.1, nt 204-221 („Mus cookii 129/SV angiotensin II type 2 receptor gene“). Diese Sequenz liegt im Intron 1.

**AT2R-3'** (+) TTT CAT AGC AAC GTG TTA CTT TGG TTT.

Das HBS-Motiv (*kursiv*) befindet sich auf dem sense-Strang. Der unterstrichene Bereich entspricht acc. no. NM\_007429.1, nt 851-871 („Mus musculus angiotensin II receptor type 2 mRNA“) und acc. no. NM\_012494.1, nt 678-6981 („Rattus norvegicus Angiotensin receptor 2 (Agtr2) mRNA“). Diese Sequenz liegt im Ratten- und Maus-Gen am Ende des proteinkodierenden Bereichs im Exon 3. Im humanen AT2R-Gen liegt diese Sequenz in der 3'-UTR.

Für die Markierung wurde eine Mischung von sense- und antisense-Oligonukleotid zu je 0,5  $\mu\text{M}$  angesetzt. Für die radioaktive Endmarkierung wurde folgender Ansatz gewählt und für 45 min bei 37°C inkubiert:

- 2  $\mu\text{l}$  Polynukleotidkinase-Puffer A (MBI Fermentas; St. Leon-Rot)
- 8  $\mu\text{l}$  Oligomix (je 0,5  $\mu\text{M}$ )
- 3  $\mu\text{l}$   $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (=30  $\mu\text{Ci}$ ; 3000 Ci/mmol, Amersham; Freiburg)
- 6  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O
- 1  $\mu\text{l}$  T4- Polynukleotidkinase (MBI Fermentas; St. Leon-Rot)

Nicht inkorporierte Nukleotide wurden mit Sephadex-G-25 Säulen (Roche; Mannheim) entfernt. Zu der gereinigten Sonde wurden 4  $\mu\text{l}$  3 M NaCl gegeben. Die Radioaktivität der Sonde wurde in einem Szintillationszähler (Wallac, Boston, USA) gemessen. Um die sense- und antisense-Stränge der Sonde zu hybridisieren, wurde der Mix 10 min bei 93°C erhitzt und dann für jeweils 15 min bei 60°C und 37°C inkubiert und schließlich bei -20°C gelagert. Nicht radioaktive Oligonukleotide wurden nach dem selben Schema hybridisiert.

### 2.6.3. Electrophoretic Mobility Shift Assay

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit gekühlten Reagenzien durchgeführt, um die Degradierung von Proteinen zu minimieren. Für die Bindungsreaktion wurde folgender Ansatz gewählt:

5 µl	100 mM HEPES, pH 7,9
2,5 µl	50% Glycerol
0,275 µl	0,5 M DTT
0,25 µl	100 mM MgCl <sub>2</sub>
0,25 µl	100 mM EDTA
0,1 µl	1 µg/µl PolyIdC
0,25 µl	10 mg/ml PMSF
0,125 µl	200 mM Natriumorthovanadat
ad 20 µl mit H <sub>2</sub> O	

Dazu wurden 5 µg der Kernextrakte gegeben. Für die Bindungsreaktion sind 50 mM KCl notwendig. Die Konzentration von KCl in den Kernextrakten betrug 420 mM. Durch Zugabe von 200 mM KCl wurde die benötigte Konzentration von KCl erreicht.

Nach Zugabe von 1 µl Sonde (50.000 cpm/µl) wurden die Ansätze 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für Konkurrenzexperimente wurden die Ansätze erst mit 1 µl der kalten Sonde (1 µM) und dann mit der <sup>32</sup>P-markierten Sonde vermischt. Für Supershift Experimente wurde ein Antikörper gegen HIF-1α (Transduction Laboratories; Lexington, USA) dazugegeben und der Ansatz 45 min auf Eis inkubiert, bevor die Sonde dazugegeben wurde.

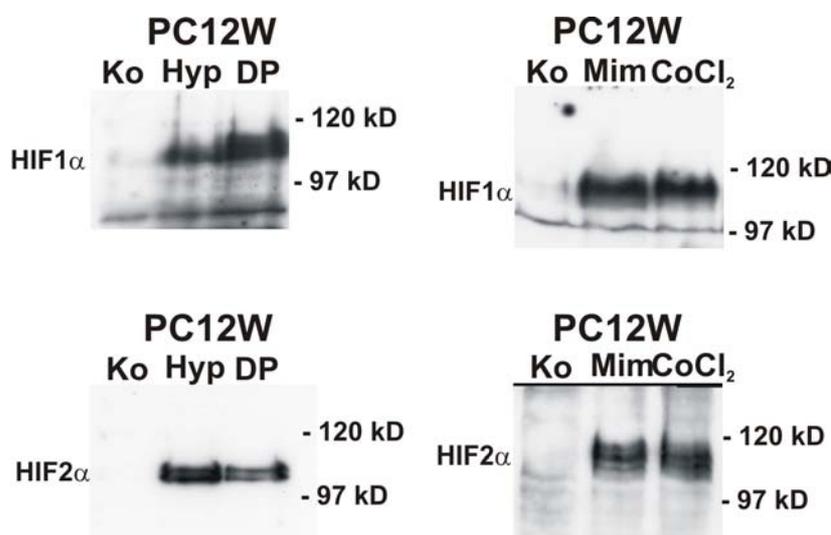
Anschließend wurden die Proben auf einem 5%igen, nicht denaturierenden 0,3x TBE-Polyacrylamidgel bei 4°C elektrophoretisch getrennt. Als Laufpuffer wurde 0,3x TBE/0,5% NP40 benutzt. Vor dem Auftragen der Sonden wurde das Gel bei 150 V, 4°C für mindestens 1 h equilibriert. Nach der Elektrophorese wurden das Gel auf einem Vakuumtrockner getrocknet und ein Röntgenfilm (X-OMAT LS, Kodak, Chalon-sur-Saône, Frankreich) bei -80°C über Nacht exponiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Teil 1: Regulation der Angiotensin II-Rezeptor-Expression durch Hypoxie und Hypoxie-Mimetika

##### 3.1.1. HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ werden in den untersuchten primären Nagerzellen und Zelllinien exprimiert

Zuerst wurde die hypoxische Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in RASMCs und PC12W-Zellen in Western-Blot Analysen dargestellt, um sicher zu stellen, dass diese Zellen mindestens eine HIF- $\alpha$ -Isoform sauerstoffabhängig induzieren und damit für Untersuchungen HIF-abhängiger Genexpression geeignet sind. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 4 h durch Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>) oder Chemikalien, die HIF stabilisieren, so genannte Hypoxie-Mimetika (100  $\mu$ M DP, 800  $\mu$ M Mim, 100  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>), stimuliert. Hypoxie-Mimetika inhibieren die HIF-Prolyl-Hydroxylasen, indem sie z. B. den notwendigen Kofaktor Eisen chelatieren (DP, Mim). Wie erwartet konnte HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Protein nur in den stimulierten Zellen nachgewiesen werden. PC12W-Zellen exprimierten anscheinend annähernd gleiche Mengen der beiden HIF- $\alpha$ -Isotypen. Ein direkter quantitativer Vergleich ist im Western-Blot jedoch nicht möglich, da man nicht voraussetzen kann, dass die Affinität der beiden Antikörper identisch ist (Abb. 3.1.1.a).



**Abb. 3.1.1.a HIF-Induktion in PC12W-Zellen**

Western-Blot (60  $\mu$ g Proteinextrakt aus PC12W-Zellen) für HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ . Die Zellen wurden 4 h in Normoxie (Ko) oder in Gegenwart von 0,5% O<sub>2</sub> (Hyp), 100  $\mu$ M Dipyridyl (DP), 800  $\mu$ M Mimosin (Mim) oder 100  $\mu$ M Kobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>) kultiviert.

RASMCs exprimierten deutlich weniger HIF-1 $\alpha$  als PC12W-Zellen. Daher musste mehr Proteinextrakt für den Western-Blot verwendet werden (100  $\mu$ g vs. 60  $\mu$ g) (Abb. 3.1.1.b). Die HIF-2 $\alpha$  Proteinexpression von RASMCs lag bei derselben Menge eingesetzten Gesamt-Proteins unter der Nachweisgrenze (s. Abschnitt 3.2.3).



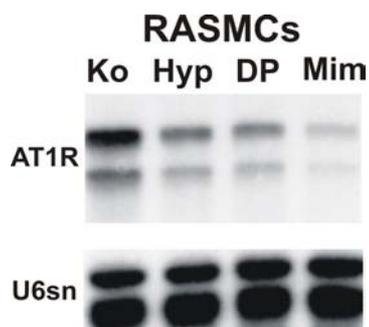
**Abb. 3.1.1.b HIF-Induktion in RASMCs**

Western-Blot (100  $\mu$ g Proteinextrakt aus RASMCs) für HIF-1 $\alpha$ . Die Zellen wurden 4 h in Normoxie (Ko)m oder in Gegenwart von 0,5% O<sub>2</sub> (Hyp), 100  $\mu$ M Dipyridyl (DP), 800  $\mu$ M Mimosin (Mim) oder 100  $\mu$ M Kobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>) kultiviert.

### 3.1.2. Sauerstoffabhängige Expression von AT1R-mRNA

Um eine mögliche sauerstoffabhängige Regulation der AT1R-mRNA-Expression nachzuweisen, wurden RASMCs 16 h durch Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>) stimuliert und die mRNA-Expression im RNase-Protection-Assay (RPA) mit <sup>32</sup>P-markierten antisense-RNA Sonden bestimmt. Für den Nachweis der AT1R-mRNA wurden (50-)100  $\mu$ g, für den Nachweis der AT2R-mRNA 100  $\mu$ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die AT1R-mRNA-Expression in RASMCs wurde durch Hypoxie deutlich reduziert (auf ca. 40%) (Abb. 3.1.2.a).

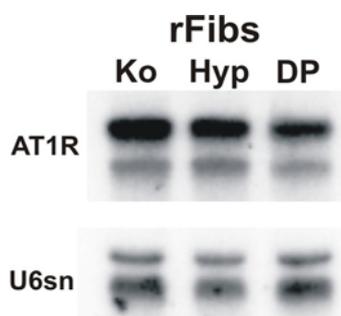
Da durch Hypoxie nicht nur HIF, sondern auch andere Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (s. Abschnitt 1.1.1)., wurden die Zellen auch mit chemischen HIF-Induktoren stimuliert und die Effekte mit denen der Hypoxie verglichen. Um eine mögliche Beteiligung von HIF an der sauerstoffabhängigen Regulation der AT1R-mRNA darzustellen, wurden RASMCs 16 h mit 100  $\mu$ M DP und 800  $\mu$ M Mim stimuliert und die mRNA-Expression durch RPA bestimmt. Vergleichbar mit der hypoxischen Stimulation zeigte sich auch hier eine deutliche Reduktion der mRNA-Menge auf ca. 30% (DP), bzw. 10% (Mim) (Abb. 3.1.2.a).



**Abb. 3.1.2.a AT1R-mRNA-Expression in RASMCs unter Hypoxie und Stimulation mit Hypoxie-Mimetika**  
RNase-Protection-Assay (50 µg RNA aus RASMCs) für AT1R-mRNA. Die Zellen wurden 16 h in Normoxie (Ko) oder in Gegenwart von 0,5% O<sub>2</sub> (Hyp), 100 µM Dipyridyl (DP) oder 800 µM Mimosin (Mim) kultiviert.

Entgegen der auf tierexperimentellen Daten basierenden Annahme, dass der AT1-Rezeptor durch Hypoxie induzierbar sein könnte, zeigte sich also eine Verminderung der AT1R-Genexpression nach 16 h hypoxischer Stimulation. Da durch chemische Induktion von HIF ein ähnlicher Effekt zu beobachten war, lag die Vermutung nahe, dass HIF an dieser Regulation – direkt oder indirekt – beteiligt sein könnte.

In rFibs zeigte sich kein Unterschied in der AT1R-mRNA-Expression zwischen hypoxischen und normoxischen Zellen. Auch die Stimulation von rFibs mit 100 µM DP ergab nur eine geringe Veränderung der AT1R-mRNA-Expression (Abb. 3.1.2.b).

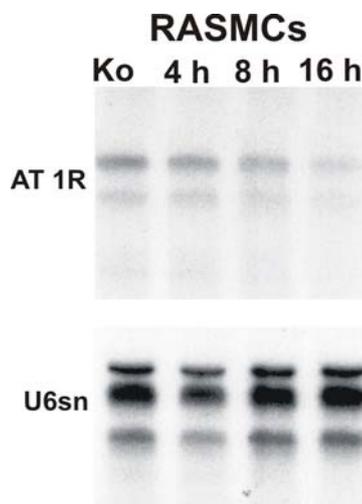


**Abb. 3.1.2.b AT1R-mRNA-Expression in rFibs unter Hypoxie und Hypoxie-Mimetika**  
RNase-Protection-Assay (50 µg RNA aus rFibs) für AT1R-mRNA. Die Zellen wurden 16 h in Normoxie (Ko), bei 0,5% O<sub>2</sub> (Hyp) oder in Gegenwart von 100 µM Dipyridyl (DP) kultiviert.

Die geringfügige Reduktion der Gesamt-mRNA-Expression, die bei allen Zelltypen unter längerer (16 h oder mehr) DP-Stimulation auftrat, ist sehr wahrscheinlich auf eine unspezifische Transkriptions- und Proliferationshemmung durch den starken Eisenchelator zurückzuführen (siehe auch Abschnitt 3.1.6).

Die hypoxische Reduktion der AT1R-mRNA ist also nur in RASMC, aber nicht in rFib nachweisbar, scheint also vom Zelltyp abhängig zu sein.

Um den Zeitverlauf der AT1R-mRNA-Expression unter Hypoxie darzustellen, wurden RASMCs 4 h, 8 h und 16 h durch Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>) stimuliert. Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle zeigte sich nach 4 h noch keine Reduktion der mRNA-Expression. Dagegen war nach 8 h Hypoxie die AT1R-mRNA-Expression auf ca. 2/3 und nach 16 h auf ca. 1/3 der Ausgangswerte reduziert (Abb. 3.1.2.c).

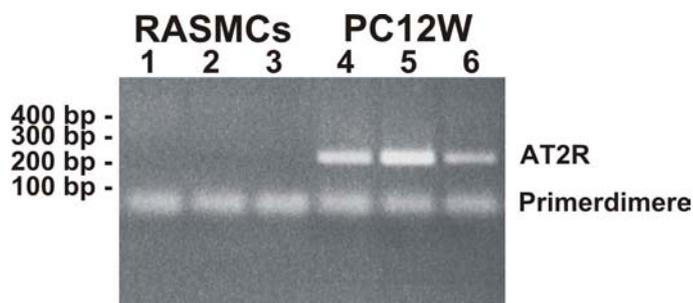


**Abb. 3.1.2.c Zeitverlauf der AT1R-mRNA-Expression unter Hypoxie in RASMCs**

RNase-Protection-Assay (50 µg RNA) für AT1R-mRNA. Die Zellen wurden in Normoxie (Ko) oder für 4 h, 8 h oder 16 h bei 0,5 % O<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.1.3. Sauerstoffabhängige Expression von AT2R-mRNA

Um zu bestätigen, dass die PC12W-Zellen den AT2-Rezeptor exprimieren, wurde AT2R-mRNA zuerst mittels RT-PCR nachgewiesen, da diese Methode sensitiver und weniger aufwändig ist als der RPA. Als Negativ-Kontrolle diente dabei RNA aus RASMCs. Wie erwartet exprimierten nur PC12W-Zellen nachweisbare Mengen an AT2R-mRNA (Abb. 3.1.3.a)



**Abb. 3.1.3.a Zellspezifische Expression von AT2R-mRNA**

RT-PCR für AT2R-mRNA (1 µg RNA pro RT-Ansatz).

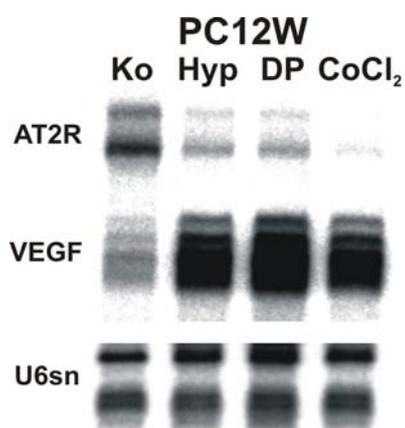
Spuren 1-3: Unabhängige RNA-Präparationen aus RASMCs

Spuren 4-6: Unabhängige RNA-Präparationen aus PC12W-Zellen

Um zu überprüfen, ob der AT2R sauerstoffabhängig reguliert wird, wurden PC12W-Zellen 16 h Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>) ausgesetzt und die AT2R-mRNA-Expression im RPA dargestellt, da sich

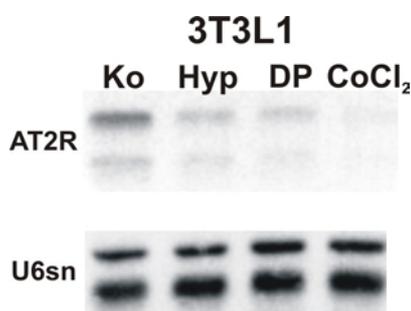
diese Methode besser für quantitative Analysen eignet als die RT-PCR. Entgegen der Annahme, dass die AT2R-Expression durch Sauerstoffmangel induziert wird, reduzierte Hypoxie die AT2R-mRNA-Expression auf 47% ( $\pm 11\%$ ;  $n=3$ ) der normoxischen Kontrollen (Abb. 3.1.3.b).

Da auch die Induktion von HIF durch 100  $\mu\text{M}$  DP und 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  zu einer deutlichen Abnahme der AT2R-mRNA-Menge führte (DP: 21% ( $\pm 8\%$ ;  $n=3$ );  $\text{CoCl}_2$ : 7% ( $\pm 2\%$ ;  $n=3$ )) (Abb. 3.1.3.b), erschien eine Beteiligung von HIF an der hypoxischen Reduktion der AT2R-mRNA wahrscheinlich. In den selben Proben zeigte sich durch Hypoxie, DP und  $\text{CoCl}_2$  eine deutliche Induktion der VEGF-mRNA als Zeichen einer Stabilisierung und Aktivierung von HIF (Abb. 3.1.3.b).



**Abb. 3.1.3.b AT2R-mRNA-Expression in PC12W-Zellen unter Hypoxie und Hypoxie-Mimetika**  
RNase-Protection-Assay (50  $\mu\text{g}$  RNA) für AT2R-mRNA und VEGF-mRNA. Die Zellen wurden 16 h in Normoxie (Ko) oder in Gegenwart von 0,5%  $\text{O}_2$  (Hyp), 100  $\mu\text{M}$  Dipyridyl (DP) oder 100  $\mu\text{M}$  Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) kultiviert. VEGF: vascular endothelial growth factor-mRNA als Kontrolle für die Induktion von HIF

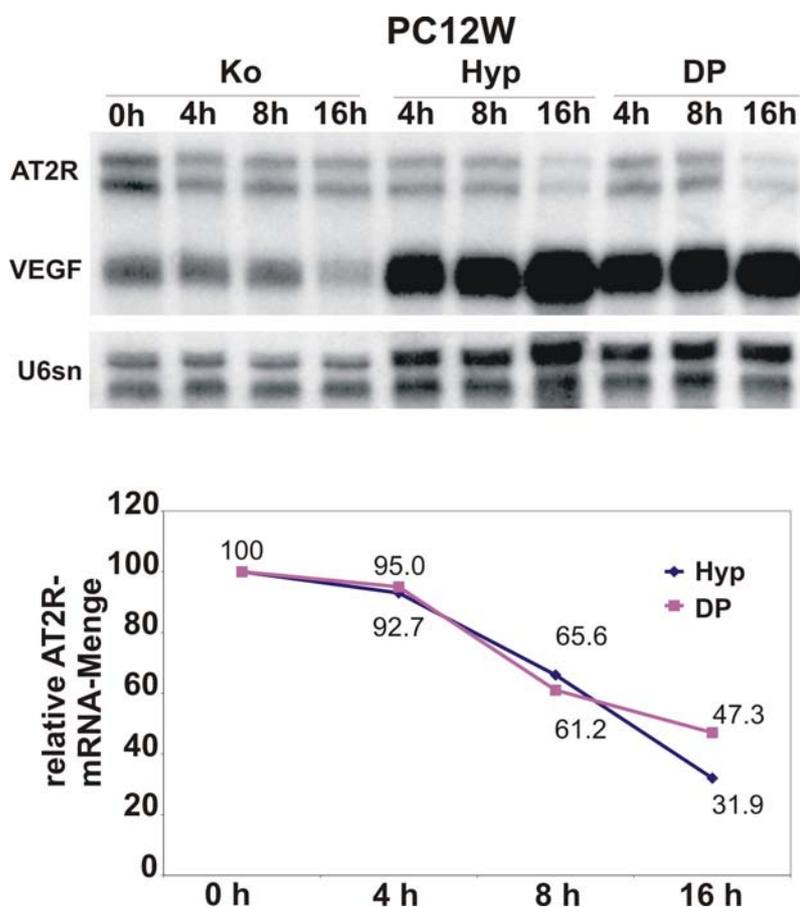
Auch in 3T3L1-Zellen reduzierten Sauerstoffmangel und Hypoxie-Mimetika die AT2R-mRNA-Expression eindeutig (Abb. 3.1.3.c), was bedeutet, dass die sauerstoffabhängige Regulation der AT2R-mRNA nicht auf einen Zelltyp beschränkt ist.



**Abb. 3.1.3.c AT2R-mRNA-Expression in 3T3L1-Zellen unter Hypoxie und Hypoxie-Mimetika**  
RNase-Protection-Assay (50  $\mu\text{g}$  RNA) für AT2R-mRNA. Die Zellen wurden 16 h in Normoxie (Ko) oder Hypoxie (Hyp, 0,5%  $\text{O}_2$ ) kultiviert oder mit 100  $\mu\text{M}$  Dipyridyl (DP) oder 100  $\mu\text{M}$  Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) stimuliert.

Um den Zeitverlauf der AT2R-mRNA-Regulation unter Hypoxie und chemischer HIF-Stabilisierung darzustellen, wurden PC12W-Zellen parallel durch Hypoxie (0,5%  $\text{O}_2$ ) oder 100

$\mu\text{M}$  DP stimuliert und nach 4 h, 8 h und 16 h mit den jeweiligen Kontrollen geerntet. Sowohl hypoxische als auch chemische Stimulation bewirkten bereits nach 8 h eine Reduktion der mRNA-Menge, die nach 16 h ca. 30% (Hypoxie) bzw. 50% (DP) des jeweiligen unstimulierten Kontrollwerts erreicht hatte (Abb. 3.1.3.d). Die vergleichbare Kinetik der AT2R-mRNA-Reduktion warf die Frage auf, ob sowohl die hypoxische als auch die chemische Stimulation identische Signaltransduktionswege aktivieren.

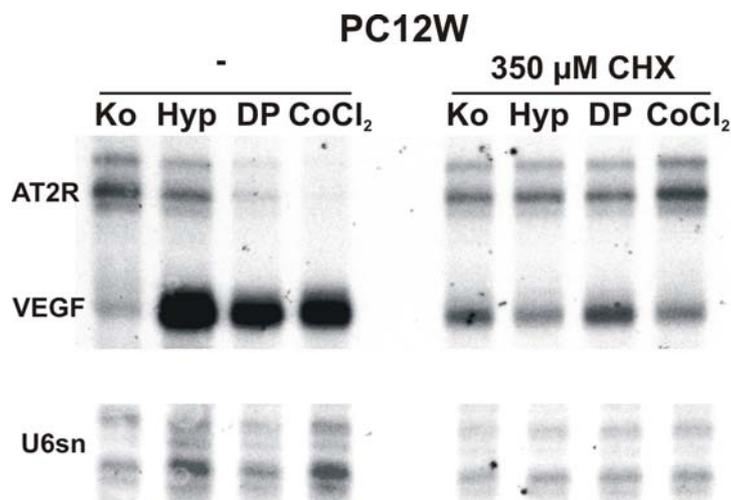


**Abb. 3.1.3.d Zeitverlauf der AT2R-mRNA-Expression unter Hypoxie und DP-Stimulation in PC12W-Zellen**  
RNase-Protection-Assay (50  $\mu\text{g}$  RNA) für AT2R-mRNA und VEGF-mRNA. Die Zellen wurden für 4 h, 8 h oder 16 h in Normoxie (Ko), bei 0,5 %  $\text{O}_2$  (Hyp) oder in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Dipyridyl (DP) kultiviert. Die Messwerte der AT2R-mRNA unter Hypoxie und Dipyridyl wurden auf die jeweilige normoxische Kontrolle bezogen. VEGF: Vascular endothelial growth factor-mRNA als Kontrolle für die Induktion von HIF

#### 3.1.4. Abhängigkeit der AT2R-mRNA-Regulation von de-novo Proteinexpression

Für die Wirkung von HIF unter Hypoxie ist eine andauernde Translation des Proteins Voraussetzung, da durch die ständige Degradation unter normoxischen Bedingungen praktisch kein HIF-1 $\alpha$  oder -2 $\alpha$ -Protein in der Zelle nachweisbar ist. Daraus folgt, dass durch eine Hemmung der Translation, z.B. durch Cycloheximid (CHX), die Wirkung von HIF verhindert werden kann (Wang 1993).

Um zu untersuchen, ob de-novo Proteinsynthese für die Regulation von AT2R-mRNA durch Hypoxie notwendig ist, wurden PC12W-Zellen 45 min mit 350  $\mu\text{M}$  CHX vorinkubiert und anschließend 16 h durch Hypoxie (0,5%  $\text{O}_2$ ), 100  $\mu\text{M}$  DP oder 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  stimuliert. Durch CHX wurde die Reduktion der AT2R-mRNA verhindert. Als Zeichen einer unterdrückten HIF-Aktivität durch CHX wurde auch VEGF-mRNA nicht mehr induziert (Abb. 3.1.4). Dies bedeutet, dass für die Reduktion der AT2R-mRNA und die Induktion von VEGF die andauernde Translation eines oder mehrerer Proteine, möglicherweise von HIF-1 $\alpha$  oder -2 $\alpha$ , notwendig ist.



**Abb. 3.1.4 Die hypoxische Reduktion von AT2R-mRNA ist abhängig von de-novo Proteinexpression**  
RNase-Protection-Assay (50  $\mu\text{g}$  RNA) für AT2R-mRNA und VEGF-mRNA. Die Zellen wurden für 16 h in Normoxie (Ko), oder in Gegenwart von 0,5 %  $\text{O}_2$  (Hyp), 100  $\mu\text{M}$  Dipyridyl (DP) oder 100  $\mu\text{M}$  Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) kultiviert. Durch Vorinkubation mit 350  $\mu\text{M}$  Cycloheximid (CHX) wurde die Proteintranslation unterdrückt.

VEGF: Vascular endothelial growth factor-mRNA als Kontrolle für die Induktion von HIF

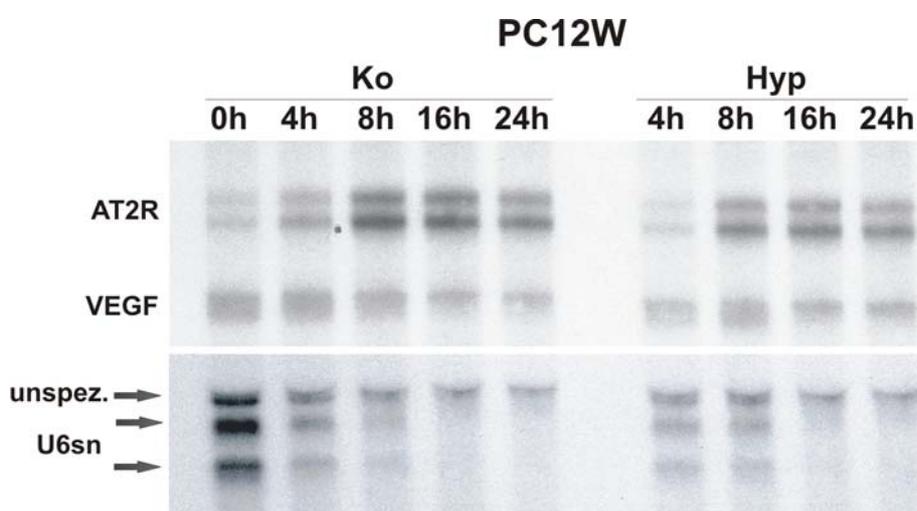
### 3.1.5. AT2R-mRNA-Stabilität unter Hypoxie

Die Reduktion der AT2R-mRNA unter Hypoxie kann sowohl Folge einer geringeren Transkriptionsrate als auch Folge einer verminderten mRNA-Stabilität sein. Um dies näher zu untersuchen, wurde Actinomycin D eingesetzt. Das Antibiotikum Actinomycin D (aus *Streptomyces antibioticus*) interkaliert in doppelsträngige DNA und behindert dadurch Enzyme der Replikation und Transkription. Es wirkt dadurch sowohl antibiotisch als auch zytostatisch. In diesem Fall wurde die transkriptionshemmende Eigenschaft von Actinomycin D genutzt.

PC12W-Zellen wurden mit Actinomycin D (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert und 30 min danach durch Hypoxie (0,5%  $\text{O}_2$ ) 4 h, 8 h, 16 h bzw. 24 h stimuliert.

Entgegen der erwarteten Reduktion wurde im RPA jedoch eine Zunahme an AT2R-mRNA gemessen, während die VEGF-mRNA-Induktion aufgehoben war. Die Zunahme der AT2R-mRNA war in normoxischen und hypoxischen Zellen in etwa gleich, erreichte nach 8 h ein

Maximum und fiel erst nach 24 h wieder ab. Geht man davon aus, dass Actinomycin D die Transkription vollständig hemmt, lässt sich diese scheinbare Induktion der AT2R-mRNA-Expression nur durch eine sehr lange Halbwertszeit der AT2R-mRNA erklären, die offenbar länger ist als die der meisten anderen zellulären RNAs, so dass es zu einem *relativen* Anstieg des Anteils der AT2R-mRNA an der Gesamt-RNA kommt. Dagegen war die U6snRNA bereits nach 8 h nur noch in geringen Mengen nachweisbar (Abb. 3.1.5), was auf eine kurze Halbwertszeit dieser RNA hinweist. Da in hypoxischen und normoxischen Zellen der Zeitverlauf der AT2R-mRNA-Expression vergleichbar war, scheint kein hypoxiereguliertes Protein an der Regulation der AT2R-mRNA-Stabilität beteiligt zu sein. Die verringerte AT2R-mRNA-Expression unter Hypoxie ist also vermutlich transkriptionell reguliert.



**Abb. 3.1.5 AT2R-mRNA-Stabilität unter Hypoxie**

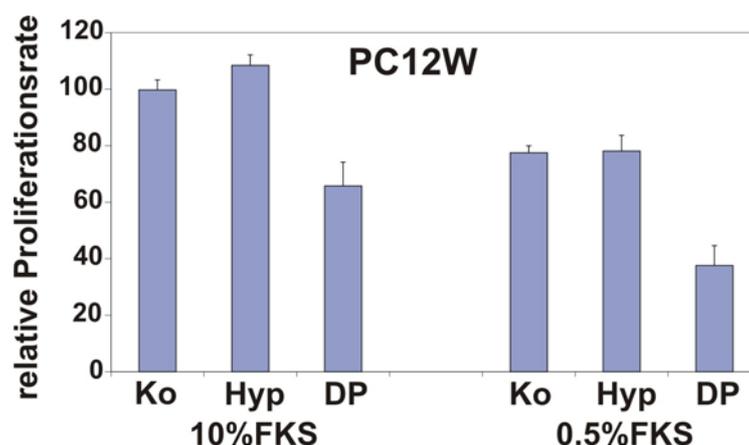
RNase-Potection-Assay (50 µg RNA) für AT2R-mRNA und VEGF-mRNA. Die Zellen wurden mit Actinomycin (2 µg/ml) vorbehandelt und anschließend für 4 h, 8 h, 16 h oder 24 h in Normoxie (Ko) oder Hypoxie (Hyp; 0,5 % O<sub>2</sub>) kultiviert.

### 3.1.6. Sauerstoffabhängiges Wachstum von PC12W-Zellen

Da bekannt ist, dass die AT2R-Expression in proliferierenden Zellen abnimmt (Horiuchi 1995), wurde untersucht, ob Hypoxie oder DP die Proliferationsrate von PC12W-Zellen stimulieren und so indirekt zu einer verminderten AT2R-Expression führen. PC12W-Zellen in Gegenwart von 10% oder 0,5% FKS wurden 24 h durch Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>) oder 100 µM DP stimuliert und die Proliferationsrate mit Hilfe des MTS-Assays bestimmt. Serumentzug reduzierte die relative Proliferationsrate in unstimulierten Zellen auf 78±3% (n=3).

Hypoxie steigerte in der Gegenwart von 10% FKS die relative Proliferationsrate von PC12W-Zellen auf 108±3% (nicht signifikant, p=0,23; n=3), während sie bei ruhenden Zellen keine

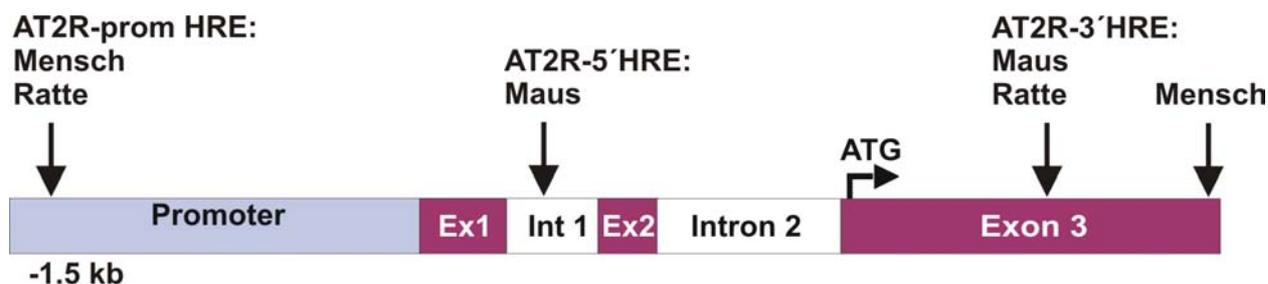
Änderung der Proliferation bewirkte. Dipyridyl hingegen reduzierte die relative Proliferationsrate in proliferierenden Zellen auf  $66\pm 9\%$  ( $p=0,03$ ;  $n=3$ ) und in ruhenden Zellen auf  $49\pm 7\%$  ( $p=0,01$ ;  $n=3$ ) (Abb. 3.1.6). Da weder Hypoxie noch DP zu einer signifikant verstärkten Proliferation von PC12W-Zellen führten, diese insbesondere durch DP sogar deutlich abnahm, wird die Reduktion der AT2R-mRNA nicht durch eine vermehrte Zellproliferation verursacht.



**Abb. 3.1.6 Relative Proliferationsrate von PC12W-Zellen unter Hypoxie und Dipyridyl-Stimulation**  
MTS-Proliferationsassay von PC12W-Zellen. Zellen wurden zuerst 24 h in 10% oder 0,5% FKS und anschließend in Normoxie (Ko), bei 0,5 % O<sub>2</sub> (Hyp) oder in Gegenwart von 100 µM Dipyridyl (DP) kultiviert. Angeben ist der Mittelwert der relativen Proliferation mit Standardabweichung, bezogen auf die Proliferation bei Normoxie in 10% FKS ( $n=3$ ).

### 3.1.7. Untersuchung potenzieller HIF-Bindungsstellen im AT2R-Gen

Durch Sequenzanalyse (MatInspector (Quandt 1995)) ließen sich im AT2R-Gen bei Maus, Ratte und Mensch insgesamt drei potenzielle Bindungsstellen für HIF identifizieren (Abb. 3.1.7.a). Sie wurden nach ihrer Lage im Gen „AT2R-prom“, „AT2R-5“ und „AT2R-3“ genannt. Das AT2R-prom HRE liegt ungefähr 1500 bp stromaufwärts des TATA-Signals im Promotor des Ratten- und humanen AT2R-Gens. AT2R-5' befindet sich im Intron I des Maus-Gens, während AT2R-3' im Exon 3, also in der proteinkodierenden Sequenz von Maus und Ratte und kurz hinter dieser beim Menschen zu finden ist. (Sequenzen und genaue Lage siehe Abschnitt 2.6.2).



**Abb. 3.1.7.a Lage der drei potenziellen HIF-Bindungsstellen (HRE) im AT2R-Gen**

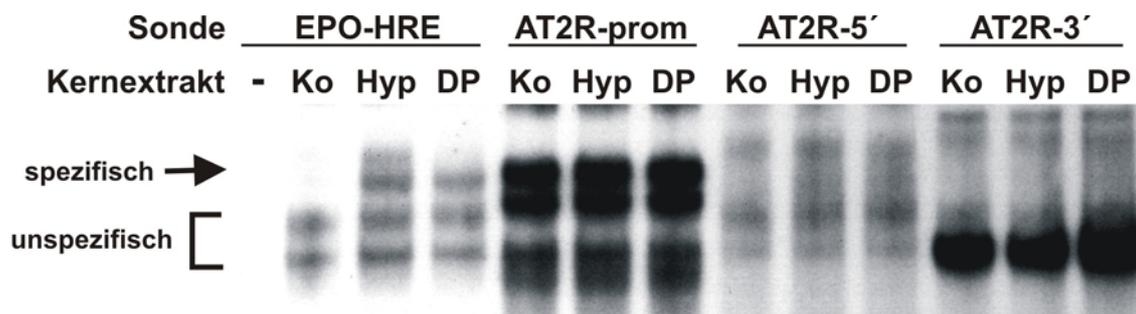
Schematische Darstellung der durch das MatInspector-Programm identifizierten potenziellen „Hypoxia-responsive elements“ (HRE) im AT2R-Gen.

AT2R-prom HRE im Promoter des AT2R-Gens von Mensch und Ratte; AT2R-5' HRE im Intron 1 des AT2R-Gens der Maus; AT2R-3' HRE im Exon 3 des AT2R-Gens von Mensch, Ratte und Maus.

Ex: Exon, Int: Intron, ATG: Startcodon.

In Gelshift-Analysen (electrophoretic mobility shift assays, EMSA) wurde untersucht, ob an diese potenziellen Bindungsstellen Kernproteine bzw. HIF binden. Es wurden Kernextrakte von unstimulierten und stimulierten PC12W-Zellen (4 h, 0,5% O<sub>2</sub>; 100 µM DP) verwendet, die mit den doppelsträngigen <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotidsonden mit den HIF-Bindungsstellen inkubiert wurden. Die entstehenden Proteinkomplexe wurden dann auf nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Bei Kernproteinbindung wurde die Sonde im Gel retardiert (= „band shift“), während die freie Sonde bis zum unteren Ende des Gels wanderte. Eine Sonde mit der HIF-Bindungsstelle des Erythropoetin-Gens (EPO-HRE) wurde als Kontrolle benutzt.

Kernproteinbindung war sowohl bei den drei AT2R-Sonden als auch bei der EPO-HRE-Sonde nachweisbar. Eine zusätzliche durch Hypoxie und Dipyrindyl-Stimulation induzierte HIF-spezifische Bande war jedoch nur mit der EPO-HRE-Sonde nachweisbar. Dagegen änderte sich das Bindungsmuster der AT2R-Sonden durch die hypoxische Stimulation der Zellen nicht (Abb. 3.1.7.b).



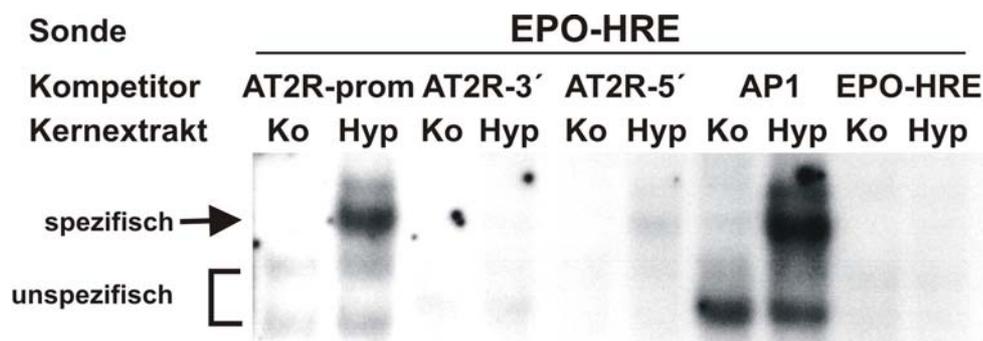
**Abb. 3.1.7.b Hypoxieabhängige Bindung von Kernproteinen an potenzielle HREs im AT2R-Gen**

Electrophoretic mobility shift assay mit Kernextrakten aus PC12W-Zellen. Die Zellen wurden 4 h in Normoxie (Ko), bei 0,5 % O<sub>2</sub> (Hyp) oder in Gegenwart von 100 µM Dipyridyl (DP) kultiviert.

EPO-HRE: Sonde mit der Sequenz des HRE im Enhancer des EPO-Gens; AT2R-prom: Sonde mit dem potenziellen HRE im Promoter des AT2R-Gens; AT2R-5': Sonde mit dem potenziellen HRE im Intron 1 des AT2R-Gens; AT2R-3': Sonde mit dem potenziellen HRE im Exon 3 des AT2R-Gens.

Verdrängungsexperimente mit einem Überschuss von „kalten“, also unmarkierten Oligonukleotidsonden dienen dem Nachweis der Spezifität der Kernproteinbindung. Ein Überschuss an kalter EPO-HRE-Sonde verhinderte, wie erwartet, die Bindung von Kernproteinen (HIF) an das EPO-HRE. Überraschenderweise hoben aber auch eine Zugabe der AT2R-3'-Sonde und der AT2R-5'-Sonde Proteinbindung an das EPO-HRE vollständig auf, während die Konkurrenz mit der AT2R-prom-Sonde zwar die unspezifischen Banden abschwächte, die HIF-spezifische induzierte Bande aber nicht beeinflusste. Eben so wenig beeinflusste die Konkurrenz mit einer Sonde mit einer AP1-Bindungsstelle die Proteinbindung an das EPO-HRE (Abb.3.1.7.c).

Kompetition mit der AT2R-5'- und der AT2R-3'-Sonde, aber nicht mit der AT2R-prom-Sonde, verdrängte also die EPO-HRE-Sonde aus der Bindung mit dem HIF-Komplex. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein Teil des HIF-Komplexes auch Teil des Proteinkomplexes ist, der konstitutiv an das AT2R-5'-HRE und das AT2-3'-HRE bindet. Da HIF-α in normoxischen, nicht stimulierten Zellen nicht in größeren Mengen vorhanden ist, ist es vermutlich ARNT/HIFβ.



**Abb. 3.1.7.c** Konkurrenz der hypoxieabhängigen Bindung von Kernproteinen an das EPO-HRE durch potenzielle HREs des AT2R-Gens

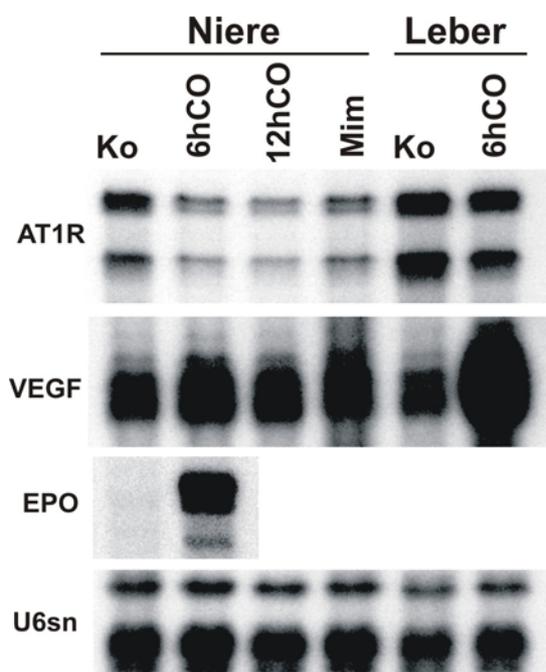
Electrophoretic mobility shift assay mit Kernextrakten aus PC12W-Zellen. Die Zellen wurden 4 h in Normoxie (Ko) oder bei 0,5 % O<sub>2</sub> (Hyp) kultiviert. Die Kernextrakte wurden mit einem Überschuss an nicht radioaktiven Sonden (Kompetitor) vorinkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte EPO-HRE-Sonde zugegeben.

EPO-HRE: Sonde mit dem HRE im Enhancer des EPO-Gens; AT2R-prom: Sonde mit dem potenziellen HRE im Promoter des AT2R-Gens; AT2R-5': Sonde mit dem potenziellen HRE im Intron 1 des AT2R-Gens; AT2R-3': Sonde mit dem potenziellen HRE im Exon 3 des AT2R-Gens; AP1: Sonde mit der Sequenz einer AP1-Bindungsstelle

### 3.1.8. Untersuchung der sauerstoffabhängigen AT1R-mRNA-Expression *in vivo*

Es stellte sich die Frage, ob auch *in vivo* eine sauerstoffabhängige Regulation von ATR-mRNA nachweisbar ist. Aus vorangegangenen Studien (Wiesener 2003; Warnecke 2003) lag Gewebe von Ratten vor, bei denen eine funktionelle Anämie und damit eine Gewebhypoxie durch 0,1% Kohlenmonoxid in der Einatemluft herbeigeführt oder bei denen HIF durch enterale Gabe von 600 mg/kg Körpergewicht L-Mimosin (Mim) induziert worden war.

Die relative ATR-mRNA-Expression in Niere und Leber wurde durch RPA bestimmt. Nach 6 h und 12 h CO Exposition konnte in der Niere eine Reduktion der AT1R-mRNA nachgewiesen werden. Gleichzeitig kam es zu einer Induktion der HIF-Zielgene VEGF und EPO. Vergleichbar wurde durch Mim die Expression von AT1R-mRNA in der Niere ebenfalls reduziert, während es VEGF-mRNA induzierte. In der Leber konnte keine Veränderung der AT1R-mRNA festgestellt werden. VEGF wurde dagegen noch deutlicher als in der Niere induziert, was auf eine starke Hypoxiesensitivität der Leber hinweist und damit ausschließt, dass eine zu geringe Hypoxiesensitivität der Grund für die ausbleibende Regulation der AT1R-mRNA in der Leber ist (Abb. 3.1.8).



**Abb. 3.1.8 AT1R-mRNA-Expression in Rattengeweben nach Aktivierung von HIF durch funktionelle Anämie oder Gabe von L-Mimosin**

RNase-Protection-Assay (100 µg RNA) für AT1R-mRNA, VEGF-mRNA und EPO-mRNA. Bei sechs Wochen alten männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurde für 6 h oder 12 h durch 0,1 % Kohlenmonoxid (CO) in der Einatemungsluft eine funktionelle Anämie herbeigeführt oder durch enterale Gabe von 600 mg/kg Körpergewicht L-Mimosin (Mim) eine Induktion von HIF erreicht.

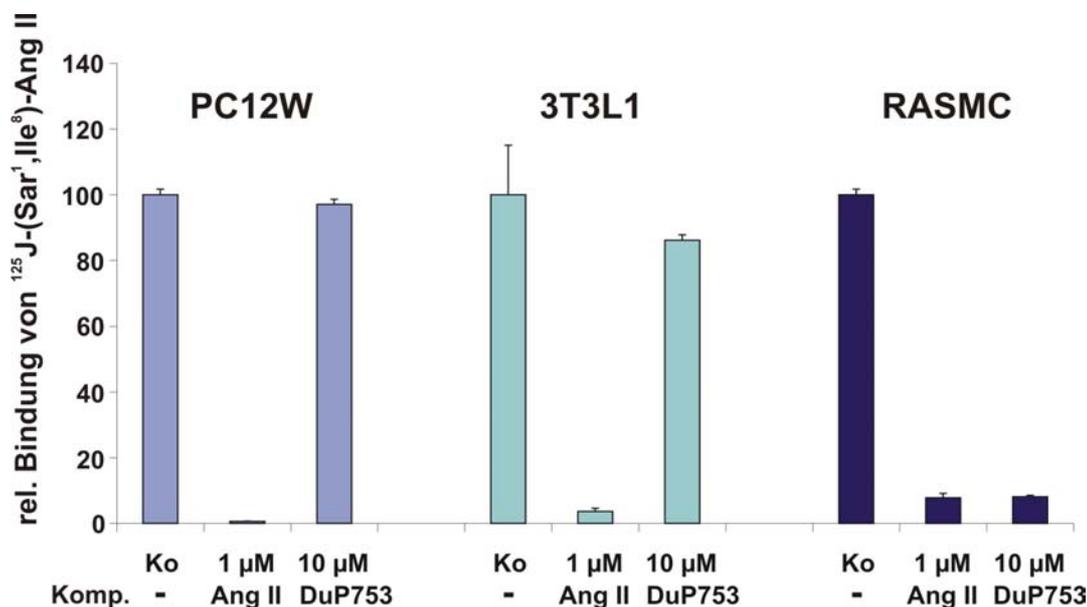
Die Expression von AT2R-mRNA lag unter der Nachweisgrenze des RPA (maximal 100 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt).

Die hypoxische Reduktion der AT1R-mRNA-Expression ist also nicht auf Zellkultur-Experimente beschränkt, sondern auch *in vivo* nachweisbar. Ähnlich wie bei den Experimenten mit RASMCs und rFibs ist die Regulation der AT1R-mRNA aber abhängig vom untersuchten Gewebe bzw. Zelltyp.

### 3.1.9. Sauerstoffabhängige ATR-Protein-Expression

Die ATR-Protein-Expression wurde mit Hilfe von Ang II-Bindungsexperimenten an nativen, in 24-Loch-Platten kultivierten Zellen bestimmt. Man verwendet hierzu das Ang II-Derivat  $^{125}\text{J}$ -(Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)-Ang II, das nach Bindung an die Rezeptoren nicht internalisiert wird. Vor der Inkubation mit  $^{125}\text{J}$ -(Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)-Ang II wurde gebundenes Ang II aus dem Zellkulturmedium bzw. dem FKS durch Waschen mit einem sauren Glycinpuffer entfernt. Der Anteil an gebundenem  $^{125}\text{J}$ -(Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)-Ang II im Bindungsexperiment, der nicht durch Vorinkubation mit 1 µM kaltem Ang II verdrängt werden kann, wird als unspezifische Bindung definiert. Diese unspezifische Bindung ist vom Zelltyp und von der Zelldichte abhängig und betrug zwischen 1% (PC12W) und 7% (RASMC). Durch Konkurrenz mit dem spezifischen AT1R-Blocker DuP753 (=

Losartan) konnte nachgewiesen werden, dass PC12W ausschließlich und 3T3L1 überwiegend AT2R exprimieren, während RASMCs ausschließlich AT1R exprimieren (Abb. 3.1.9.a).

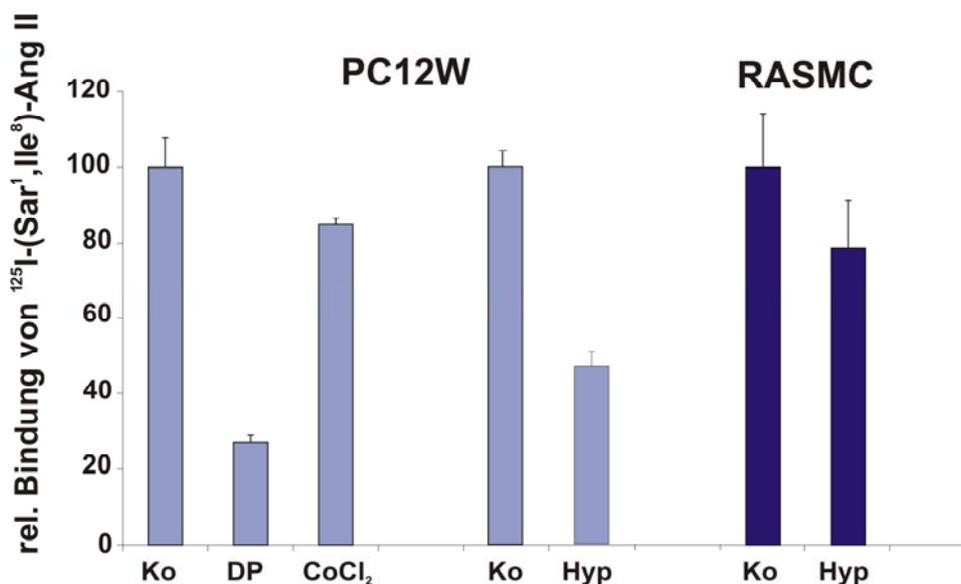


**Abb. 3.1.9.a Expression von AT1R- und AT2R-Protein in nicht stimulierten Zellen**

$^{125}\text{J}-(\text{Sar}^1, \text{Ile}^8)\text{-Ang II}$ -Bindung an nativen, nicht stimulierten Zellen. Ein Teil der Zellen wurde vor Zugabe des  $^{125}\text{J}-(\text{Sar}^1, \text{Ile}^8)\text{-Ang II}$  mit einem Kompetitor (Komp.) vorinkubiert.

DuP753: spezifischer AT1R-Antagonist (Losartan)

24 h Hypoxie (0,5%  $\text{O}_2$ ) sowie 100  $\mu\text{M}$  DP und 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  führten zu einer deutlichen Reduktion von AT2R-Protein in PC12W-Zellen. Analog dazu reduzierte Hypoxie die AT1R-Proteinexpression in RASMCs deutlich (Abb. 3.1.9.b). Die Werte wurden jeweils auf die Gesamtproteinmenge normalisiert, die in den stimulierten Zellen ebenfalls signifikant abnahm.



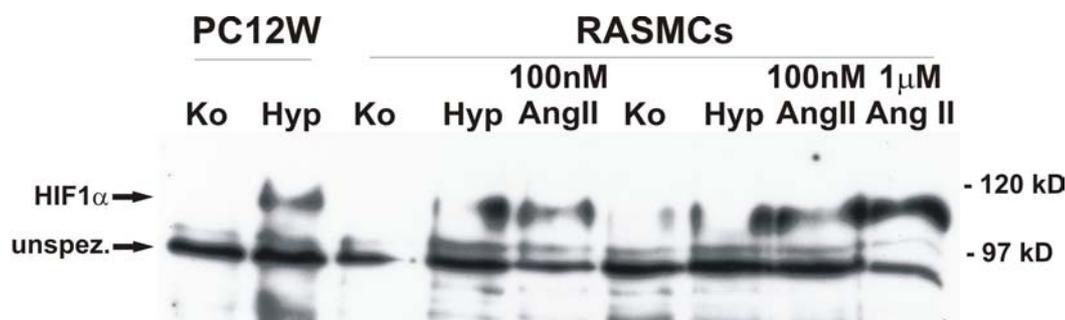
**Abb. 3.1.9.b Expression von AT1R- und AT2R-Protein in stimulierten Zellen**

$^{125}\text{I}-(\text{Sar}^1, \text{Ile}^8)\text{-Ang II}$ -Bindung an nativen stimulierten Zellen. Die Zellen wurden 24 h in Normoxie (Ko), in 0,5 %  $\text{O}_2$  (Hyp), mit 100  $\mu\text{M}$  Dipyridyl (DP) oder mit 100  $\mu\text{M}$  Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) kultiviert.

## 3.2. Teil 2: Induktion von HIF durch Ang II und Protein-Kinase-Aktivatoren

### 3.2.1. Induktion von HIF-1 $\alpha$ -Protein in RASMCs

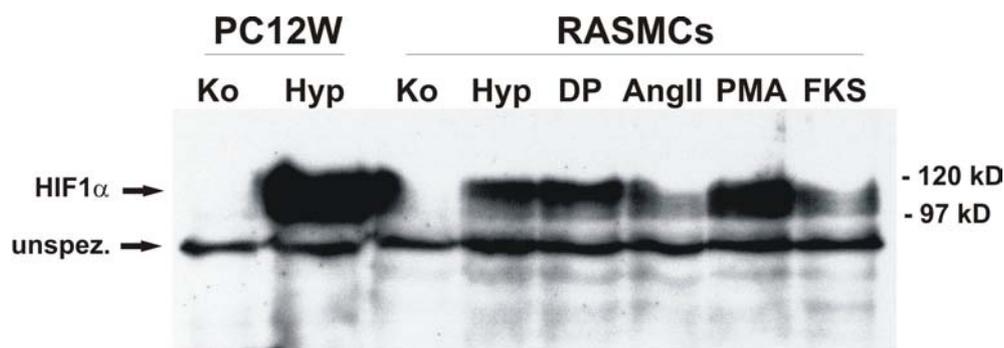
Im Jahr 2000 wurde erstmals gezeigt, dass Ang II über den AT1R in ruhenden, also serumfrei kultivierten RASMCs HIF-1 $\alpha$ -Protein sauerstoffunabhängig induzieren kann (Richard 2000). Um diese Daten zu überprüfen, wurden RASMCs 24 h in Medium ohne FKS inkubiert und anschließend 4 h mit 100 nM und 1  $\mu$ M Ang II stimuliert. Der Proteinnachweis erfolgte durch Western-Blot-Analyse. HIF-1 $\alpha$ -Protein wurde unabhängig vom Stimulus nur relativ schwach exprimiert, so dass die Intensität der Banden gering war bzw. eine größere Proteinmenge (100  $\mu$ g) verwendet werden musste. HIF-1 $\alpha$ -Protein wurde durch Ang II dosisabhängig induziert (Abb. 3.2.1.a). Eine deutliche Induktion war erst durch eine hohe Dosis – 1  $\mu$ M Ang II – zu erreichen. Die Amplitude der HIF-1 $\alpha$ -Induktion durch Ang II war sehr variabel, teilweise jedoch mit der durch Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>) vergleichbar.



**Abb. 3.2.1.a HIF-1 $\alpha$ -Induktion durch Ang II in RASMCs**

Western-Blot (60  $\mu$ g Proteinextrakt aus PC12W-Zellen, 100  $\mu$ g aus RASMCs) für HIF-1 $\alpha$ . Ruhende Zellen wurden 4 h in Normoxie (Ko), bei 0,5% O<sub>2</sub> (Hyp) oder mit 100 nM oder mit 1  $\mu$ M Ang II kultiviert. Dargestellt sind zwei von drei unabhängigen Experimenten mit dem selben Ergebnis.

Viele der Wirkungen von Ang II erfolgen über eine Aktivierung von Proteinkinasen, insbesondere der Proteinkinase C (PKC). Um zu untersuchen, ob auch die Induktion von HIF-1 $\alpha$  durch Aktivierung von PKC erfolgt, wurden RASMCs 24 h in Medium ohne FKS inkubiert und dann 4 h mit dem PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA 100 ng/ml), oder durch Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>), DP (100  $\mu$ M) und Ang II (1  $\mu$ M) stimuliert. Da auch andere Wachstumsfaktoren PKC aktivieren können und umgekehrt PMA auch andere Proteinkinasen als die PKC aktiviert, z. B. auch die PI3Kinase und die MAP-Kinasen ERK1 und 2, wurden RASMCs parallel auch mit 10% FKS stimuliert. PMA induzierte HIF-1 $\alpha$ -Protein deutlich stärker als Ang II und 10% FKS und geringfügig stärker als Hypoxie und DP (Abb. 3.2.1.b).



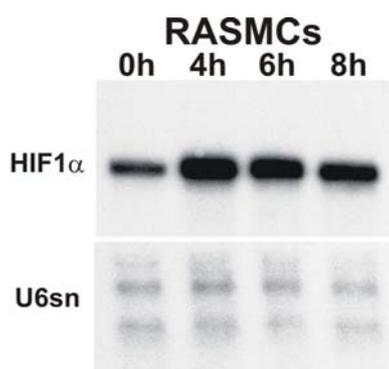
**Abb. 3.2.1.b HIF-1 $\alpha$ -Induktion durch nicht-hypoxische Stimuli in RASMCs**

Western-Blot (60  $\mu$ g Proteinextrakt aus PC12W-Zellen, 100  $\mu$ g aus RASMCs) für HIF-1 $\alpha$ . Ruhende Zellen wurden 4 h in Normoxie (Ko), bei 0,5% O<sub>2</sub> (Hyp) oder in Gegenwart von 100  $\mu$ M Dipyridyl (DP), 1  $\mu$ M Ang II (AngII), 100 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder 10 % fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Dargestellt ist eins von drei unabhängigen Experimenten mit dem selben Ergebnis.

Diese Daten zeigen, dass in ruhenden primären VSMCs durch eine plötzliche starke Aktivierung von proteinkinaseabhängigen Signalwegen, in denen wahrscheinlich die PKC, MAP-Kinasen und die PI3-Kinase eine wichtige Rolle spielen, HIF auch in der Gegenwart von Sauerstoff stabilisiert und vermutlich aktiviert werden kann.

### 3.2.2. Regulation von HIF-1 $\alpha$ -mRNA in RASMCs

Um mögliche Effekte von Ang II auf die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression nachzuweisen, wurden RASMCs 24 h in Medium ohne FKS inkubiert und anschließend 4 h, 6 h und 8 h mit 100 nM Ang II stimuliert. Im RPA konnte eine Verdreifachung der HIF-1 $\alpha$ -mRNA nach 4 h nachgewiesen werden. Nach 8 h war die nachgewiesene Menge an HIF-1 $\alpha$ -mRNA immer noch ungefähr verdoppelt gegenüber den Ausgangswerten (Abb. 3.2.2).



**Abb. 3.2.2 Zeitverlauf der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression in RASMCs nach Stimulation mit Angiotensin II**

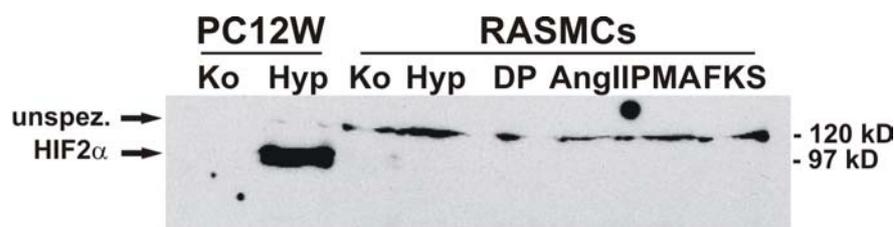
RNase-Protection-Assay (30  $\mu$ g RNA-Extrakt aus RASMCs) für HIF-1 $\alpha$ . Ruhende Zellen wurden in Normoxie (Ko) oder für 4 h, 6 h oder 8 h mit 100 nM Angiotensin II kultiviert.

Die beobachtete Induktion von HIF-1 $\alpha$ -Protein nach Stimulation mit Ang II scheint also zumindest teilweise durch eine verstärkte HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression, d. h. durch eine vermehrte Transkription oder eine reduzierte Degradation, verursacht zu sein. Obwohl bei der Aktivierung

von HIF durch Hypoxie die Stabilisierung der  $\alpha$ -Untereinheit des Proteins der entscheidende Schritt ist, kann also in primären Zellen offenbar auch eine Steigerung der mRNA-Expression und evtl. der Proteintranslation (in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht) zu einer so starken Anreicherung von HIF- $\alpha$  in den Zellen führen, dass die am HIF- $\alpha$ -Abbau beteiligten Faktoren gesättigt werden und es damit zu einer normoxischen Stabilisierung und Aktivierung von HIF kommt.

### 3.2.3. Expression von HIF-2 $\alpha$ in RASMCs

Als nächstes sollte untersucht werden, ob auch HIF-2 $\alpha$  durch nicht-hypoxische Stimuli wie Ang II, PKC oder FKS induzierbar ist. Dafür wurden die selben Proben, wie in 3.2.1 per Western-Blot-Analyse (100  $\mu$ g Protein/Spur) auf HIF-2 $\alpha$ -Expression untersucht. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass HIF-2 $\alpha$ -Protein in RASMCs nicht oder nur so gering exprimiert wird, dass es unter der Nachweisgrenze des Western-Blots liegt (Abb. 3.2.3.a).



**Abb. 3.2.3.a HIF-2 $\alpha$ -Proteinexpression in RASMCs**

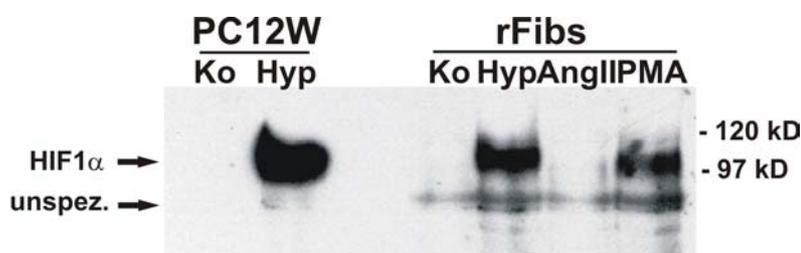
Western-Blot (60  $\mu$ g Proteinextrakt aus PC12W-Zellen, 100  $\mu$ g aus RASMCs) für HIF-2 $\alpha$ . Ruhende Zellen wurden 4 h in Normoxie (Ko), bei 0,5% O<sub>2</sub> (Hyp) oder mit 100  $\mu$ M Dipyridyl (DP), 1  $\mu$ M Ang II (AngII), 100 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder 10% fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert.

Da HIF-2 $\alpha$ -Protein in RASMCs nicht nachgewiesen werden konnte, wurde als nächstes untersucht, ob das HIF-2 $\alpha$ -Gen in RASMCs transkribiert wird. Dafür wurden die selben Proben wie in 3.2.2 untersucht. Im RPA konnte HIF-2 $\alpha$ -mRNA nachgewiesen werden, wenn auch in deutlich geringeren Mengen als HIF-1 $\alpha$ -mRNA. Warum kein HIF-2 $\alpha$ -Protein nachweisbar war, konnte nicht geklärt werden. Ang II hatte jedoch keinen Einfluss auf die HIF-2 $\alpha$ -mRNA-Expression (Abb. 3.2.3.b).

**Abb. 3.2.3.b Zeitverlauf der HIF 2 $\alpha$ -mRNA-Expression in RASMCs nach Stimualtion mit Angiotensin II**  
RNase-Potection-Assay (30  $\mu$ g RNA) für HIF-2 $\alpha$ . Die Zellen wurden in Normoxie (Ko) oder für 1 h, 2 h, 4 h oder 6 h in Gegenwart von 100 nM Angiotensin II kultiviert.

### 3.2.4. Regulation von HIF-1 $\alpha$ in rFibs

Anschließend sollte untersucht werden, ob die Induktion von HIF-1 $\alpha$  in RASMCs durch Ang II oder PMA auch in anderen AT1R-exprimierenden Zellen nachweisbar ist. Dazu wurden rFibs 24 h in Medium ohne FKS inkubiert und anschließend 4 h mit Ang II (1  $\mu$ M) oder PMA (100 ng/ml) stimuliert und die HIF-1 $\alpha$ -Expression durch Western-Blot-Analyse bestimmt. Im Gegensatz zu RASMCs induzierte in rFibs nur PMA, nicht aber Ang II, HIF-1 $\alpha$ -Protein (Abb. 3.2.4.a).

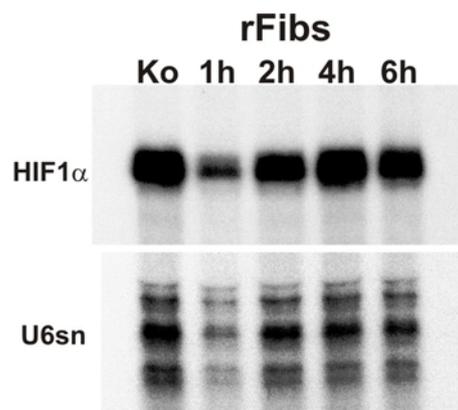


### Abb. 3.2.4.a HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression in rFibs

Western-Blot (60  $\mu$ g Proteinextrakt aus PC12W-Zellen, 100  $\mu$ g aus rFibs) für HIF-1 $\alpha$ . Ruhende Zellen wurden 4 h in Normoxie (Ko), bei 0,5% O<sub>2</sub> (Hyp) oder mit 1  $\mu$ M Ang II (AngII) oder 100 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) kultiviert.

Da die Induktion von HIF-1 $\alpha$ -Protein durch Ang II und PMA in RASMCs zumindest teilweise durch eine Erhöhung der HIF-1 $\alpha$ -mRNA bedingt ist, wurde untersucht, ob dies auch bei der Induktion von HIF-1 $\alpha$  durch PMA in rFibs der Fall ist.

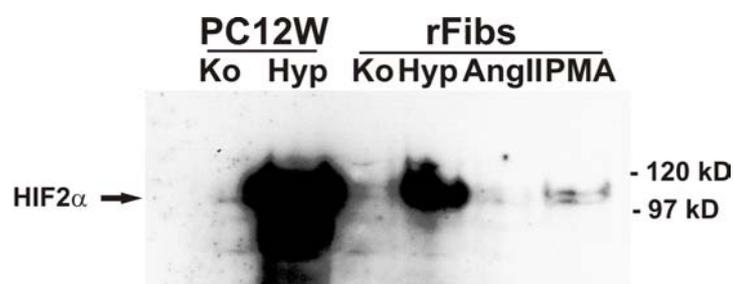
rFibs wurden 24 h in Medium oh.17 03 T Tmky.00ngt55toetoo4Tc 0.0801 TPlrk003 Tw 12.0059 0 0 12.0



**Abb. 3.2.4.b Zeitverlauf der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression in rFibs nach Stimulation mit PMA**  
RNase-Potection-Assay (30  $\mu$ g RNA) für HIF-1 $\alpha$ . Die Zellen wurden für 1 h, 2 h, 4 h oder 6 h mit 100ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) stimuliert und mit unstimulierten (Ko) Zellen verglichen.

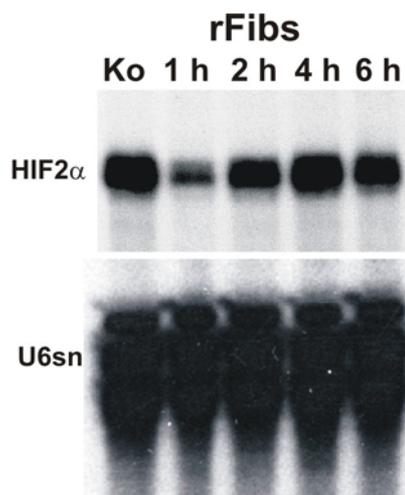
### 3.2.5. Regulation von HIF-2 $\alpha$ in rFibs

Da vermutet wurde, dass in rFibs im Gegensatz zu RASMCs auch HIF-2 $\alpha$ -Protein exprimiert wird, da Fibroblasten *in vivo* auch eher HIF-2 $\alpha$  als HIF-1 $\alpha$  exprimieren, sollte untersucht werden, ob es durch Ang II oder PMA zu einer Induktion von HIF-2 $\alpha$ -Protein in rFibs kommt. Dafür wurden rFibs nach 24 h Serumentzug 4 h durch Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>), Ang II (1  $\mu$ M) oder PMA (100 ng/ml) stimuliert und die HIF-2 $\alpha$ -Protein-Expression durch Western-Blot-Analysen bestimmt. Durch Hypoxie konnte eine deutliche Stabilisierung von HIF-2 $\alpha$ -Protein induziert werden. Ang II führte zu keiner nachweisbaren Expression, während PMA HIF-2 $\alpha$ -Protein geringfügig induzierte, wenn auch in deutlich geringerem Maße als Hypoxie (Abb. 3.2.5.a). Auch im Vergleich zur HIF-1 $\alpha$ -Induktion in RASMC war die HIF-2 $\alpha$ -Induktion durch PMA in rFib deutlich schwächer.



**Abb. 3.2.5.a HIF-2 $\alpha$ -Proteinexpression in rFibs**  
Western-Blot (60  $\mu$ g Proteinextrakt aus PC12W-Zellen, 100  $\mu$ g aus rFibs) für HIF-2 $\alpha$ . Ruhende Zellen wurden 4 h in Normoxie (Ko), bei 0,5% O<sub>2</sub> (Hyp) oder mit 1  $\mu$ M Ang II (AngII) oder 100ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) kultiviert.

Auch in rFib wurde eine Zeitkinetik der HIF-2 $\alpha$  mRNA-Expression nach PMA Stimulation erstellt. Zu einem Anstieg der mRNA-Expression kam es auch bei HIF-2 $\alpha$  nicht (Abb. 3.2.5.b).



**Abb. 3.2.5.b Zeitverlauf der HIF-2 $\alpha$ -mRNA-Expression in rFibs nach Stimulation mit PMA**  
RNase-Potection-Assay (30  $\mu$ g RNA) für HIF-2 $\alpha$ . Die Zellen wurden für 1 h, 2 h, 4 h oder 6 h mit 100 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) kultiviert; Ko = unstimulierte Kontrolle.

Zusammengenommen zeigen die Experimente, dass HIF-1 $\alpha$  besonders in RASMCs auch durch hypoxieunabhängige, proteinkinaseabhängige Stimuli induzierbar ist. Dieser Induktion liegt zumindest partiell eine Steigerung der mRNA-Expression zugrunde.

rFibs reagieren auf derartige Stimuli anscheinend schwächer, und HIF-2 $\alpha$  scheint weniger als HIF-1 $\alpha$  durch proteinkinaseabhängige Signaltransduktionswege induzierbar zu sein. Das Fehlen eines Ang II Effekts in rFib könnte mit einer geringeren AT1R-Expression in diesen Zellen zusammenhängen.

## 4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Interaktionen zwischen den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren und Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems darzustellen. Zum einen sollte die Frage beantwortet werden, ob Hypoxie die AT1R- oder die AT2R-Expression beeinflusst. Auf der anderen Seite sollten die bereits von einer anderen Gruppe beschriebene Induktion von HIF-1 $\alpha$  durch Ang II überprüft sowie eine mögliche Regulation von HIF-2 $\alpha$  durch Ang II dargestellt werden.

### 4.1. Auswahl und Limitationen der Methoden

#### 4.1.1. Der Ribonuklease-Protection-Assay zum Nachweis von mRNA-Transkripten

Für die Quantifizierung der spezifischen mRNAs wurde der Ribonuklease-Protection-Assay (RPA) gewählt. Der RPA bietet gegenüber anderen Methoden des mRNA-Nachweises mehrere Vorteile. Er ist gegenüber dem Northern-Blot in etwa um den Faktor 10 sensitiver, was bedeutet, dass die Nachweisgrenze bei etwa  $10^5$  Kopien eines Gens liegt, und über einen wesentlich größeren mRNA-Konzentrationsbereich linear, da es sich um eine Flüssigphasenhybridisierung handelt und somit eine Sättigung (wie z. B. die einer Hybridisierungsmembran beim Northern-Blot) nicht so leicht auftreten kann. Noch sensitiver ist die Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), mit der unter Umständen weniger als 100 Kopien eines Gens nachgewiesen werden können (Rottman 2002). Da dafür jedoch die reverse Transkription der mRNA und die Amplifizierung der cDNA notwendig sind, beinhaltet diese Methode mehr Fehlerquellen bei der Quantifizierung von Gen-Transkripten. Insbesondere eignet sie sich nicht gut, um kleinere (<50%) Unterschiede in der mRNA-Expression quantitativ exakt darzustellen. Im Gegensatz dazu entspricht beim RPA die Anzahl der „geschützten“ Sondenmoleküle exakt der Anzahl der in der Probe vorhandenen mRNA-Moleküle, und selbst kleine Unterschiede in der Genexpression lassen sich mit Hilfe eines Phosphoimagers gut quantifizieren. Außerdem müssen RNA-Proben für die RT-PCR in Wasser oder Tris-Puffer gelöst und gelagert werden. Damit sind diese Proben sehr anfällig für RNasen. Im Gegensatz dazu werden die Proben für den RPA in einem Formamidpuffer gelagert, der RNasen inhibiert (Dvorak 2003).

Für alle mRNA-Nachweismethoden gilt, dass durch sie nur mRNA-Fließgleichgewichte bestimmt werden können, die zum einen durch die Transkriptionsrate und zum anderen durch den mRNA-Abbau reguliert werden. Daher lässt sich keine Aussage treffen, ob eine verringerte

mRNA-Expression wie z. B. der ATR-mRNAs durch eine Hemmung der Transkription oder eine verstärkte Degradation verursacht ist. Diese Frage sollte durch eine Inkubation mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D geklärt werden. In den untersuchten Proben aus PC12W-Zellen zeigte sich, dass die AT2R-mRNA in Gegenwart von Actinomycin D scheinbar, d. h. in Relation zum Pool der gesamten zellulären RNA, zunahm und kein Unterschied im Zeitverlauf zwischen hypoxischen und normoxischen Proben zu erkennen war, d. h. keine veränderte mRNA-Stabilität unter Hypoxie vorlag. AT2R-mRNA hat unter Normoxie eine sehr lange Halbwertszeit (ca. 18.5 h; (Kijima 1996)). Es kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden, dass Actinomycin D durch Hemmung der Transkription eines nicht durch Hypoxie regulierten RNA-degradierenden Faktors zu einer weiteren Stabilisierung der AT2R-mRNA führte, wie es für die Erythropoetin-mRNA von Goldberg et al. (Goldberg 1991) gezeigt wurde. Die Methode des Nuclear-Runoff-Assays hätte theoretisch die Möglichkeit geboten, die AT2R-Transkriptionsrate unter Hypoxie bestimmen zu können. Diese Methode ist jedoch bei gering exprimierten Genen wie den Ang II Rezeptoren sehr schwierig und ungenau.

#### 4.1.2. Zellkultur

Um mit einem möglichst physiologischen Modell zu arbeiten, wurden soweit verfügbar keine Zelllinien sondern primäre Rattenzellen benutzt. Für die Untersuchungen zur Expression des AT1R unter Hypoxie und der Wirkung von Ang II auf die Expression von HIF wurden Gefäßmuskelzellen aus der Aorta (RASMCs) und kardiale Fibroblasten (rFibs) verwendet. Diese Zelltypen eignen sich besonders gut, da sie eine große pathophysiologische Bedeutung für Herz-Kreislauf-Erkrankungen besitzen und verhältnismäßig einfach isoliert werden können.

Für Untersuchungen des AT2R stehen nur wenige Zelllinien zur Verfügung. Sie stammen alle von Nagetieren. Eine humane Zelllinie, die AT2R exprimiert, ist bis jetzt nicht beschrieben worden. Primäre Zellen wie Endothelzellen, die *in vivo* AT2R exprimieren, regulieren diesen unter Zellkulturbedingungen sehr schnell herunter. PC12W- und 3T3L1-Zellen sind Zelllinien aus der Ratte bzw. der Maus. Daher können die Ergebnisse aus diesen Zelllinien nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden. Weiterhin muss bedacht werden, dass es sich bei diesen Zelllinien um entdifferenzierte Tumorzelllinien und bei PC12W-Zellen außerdem um einen neuronalen Zelltyp handelt und somit unter Umständen Signaltransduktionswege eine veränderte Aktivität zeigen.

#### 4.1.3. Protein-Nachweis / Bindungsassay

Da Western-Blot-Experimente mit kommerziell erhältlichen AT1R- und AT2R-Antikörpern aufgrund der unspezifischen Bindungsmuster keine verwertbaren Ergebnisse erbrachten, wurde

für die Bestimmung der ATR-Proteinexpression ein Bindungsassay mit radioaktiv markiertem Ang II verwendet. Spezifische Rezeptorblocker dienten zur Bestimmung des Rezeptorsubtyps. Bei der Inkubation der Zellen mit DP und der hypoxischen Exposition zeigte sich in den Proben stets eine Reduktion der gesamten Proteinmenge. Das war nicht unerwartet, da sowohl Hypoxie als auch Eisenchelatoren zu einer allgemeinen Hemmung der Transkription und Translation und längerfristig auch der Proliferation führen. Die Regulation der ATR-Proteinexpression wurde dadurch aber möglicherweise z. T. maskiert.

## **4.2. Auswirkung von Hypoxie auf die Angiotensin II-Rezeptor-Expression**

### **4.2.1. Die Wirkung von Hypoxie auf die AT1R-Expression ist abhängig vom untersuchten Zelltyp und Organ**

Sauerstoffmangel (0,5% O<sub>2</sub>) reduzierte die AT1R-mRNA-Expression in RASMCs nach 8 h auf 65% und nach 16 h auf 35-40% der normoxischen Kontrollwerte. In rFibs hatte Hypoxie dagegen keinen nachweisbaren Einfluss auf die AT1R-Expression.

*In vivo* führten Hypoxie und chemische Hypoxie-Mimetika in der Rattenniere ebenfalls zu einer Abnahme der AT1R-mRNA-Gehalte. Im Myokard war AT1R-mRNA selbst bei Verwendung von 100 µg Gesamt-RNA mit dem RPA kaum nachweisbar (nicht gezeigt). In der Rattenleber, in der die AT1R-Expression nicht verändert war, wurde durch Induktion einer funktionellen Anämie durch CO-Exposition oder durch die enterale Gabe des Hypoxie-Mimetikums L-Mimosin (Mim) die VEGF-mRNA-Expression deutlich gesteigert. Dies zeigt, dass auch in der Leber eine lokale Gewebhypoxie und HIF-Aktivierung vorlag. Der fehlende Einfluss von Sauerstoffmangel auf die AT1R-Expression in der Leber wurde daher nicht durch fehlende Hypoxieempfindlichkeit oder HIF-Expression verursacht. Vermutlich beeinflusst Hypoxie die AT1R-Expression indirekt und nicht durch einen HIF-vermittelten direkten Effekt auf die Transkription. Da die Genexpressionsmuster in Niere, Herz und Leber aufgrund der spezifischen Funktionen dieser Organe sehr unterschiedlich sind, könnten auch eventuelle Mediatoren der Hypoxiewirkung, z. B. Hypoxie-induzierbare Wachstumsfaktoren, differenziell reguliert sein. Außerdem können *in vivo* systemische Effekte einer lokalen Regulation durch Hypoxie entgegenwirken. Der durch eine akute schwere Hypoxie verursachte Blutdruckabfall könnte z. B. das RAS aktivieren, was durch einen negativen „feedback“-Mechanismus zu einer Herabregulation der AT1R-Expression (erst auf Proteinebene, dann transkriptionell) führen könnte.

Zelltypabhängige Unterschiede in der Regulation des AT1-Rezeptors und ihre molekularen Grundlagen wurden bereits in anderen Studien gezeigt. So findet sich im Promotor des AT1R-Gens ein „negative regulatory element“ (NRE). An dieses NRE bindet in PC12-Zellen ein bisher nicht näher charakterisiertes Kernprotein und unterdrückt damit die Expression des Rezeptors. Im Gegensatz dazu ist dieses Protein in Gefäßmuskel- und Gliazellen nicht präsent, so dass in diesen Zellen die AT1R-Expression nicht gehemmt wird (Murasawa 1993; Murasawa 1995). Obwohl dieser Mechanismus die Grundlage für gewebespezifische Unterschiede der *basalen* AT1R-Expression sein könnte, erklärt er jedoch noch nicht ausreichend die Unterschiede in der hypoxischen Induzierbarkeit. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Zusammenwirken von zell- bzw. gewebespezifischen und hypoxieregulierten Faktoren.

#### **4.2.2. Der Einfluss von Sauerstoffmangel auf die AT1R-Expression ist von der Stärke der Hypoxie abhängig**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Widerspruch zu Daten von Sodhi et al. (Sodhi 2003), die erst nach Beginn dieser Arbeit veröffentlicht wurden. Diese Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls die Auswirkung von Hypoxie (3% O<sub>2</sub>, 6 h – 24 h) auf die AT1R-Expression in RASMC und beschrieb eine Induktion des AT1R sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, ohne dabei die Induktion von HIF darzustellen oder die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen näher zu untersuchen. Im Gegensatz zu der relativ milden Hypoxie von 3% O<sub>2</sub> in der Arbeit von Sodhi et al. wurden die Zellen in den hier beschriebenen Experimenten durch eine schwere Hypoxie von 0,5% O<sub>2</sub> stimuliert.

Ein Sauerstoffgehalt von 0,5% wurde für diese Arbeit gewählt, da dabei die zu erwartende Induktion von HIF am größten ist. Dies bezieht sich sowohl auf die im Western-Blot nachweisbare Proteinmenge als auch auf die in Gelshift-Assays nachgewiesene DNA-Bindungsaktivität des HIF-Komplexes. Schon bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 1,5 – 2% wird nur noch etwa die Hälfte der maximalen HIF-Aktivität gemessen. In Gegenwart von 3% O<sub>2</sub> sinken Proteinmenge und DNA-Bindungsaktivität auf ca. ein Viertel der Werte unter 0,5% Luftsauerstoff (Jiang 1996). Dies könnte bedeuten, dass in der Arbeit von Sodhi et al. nicht die HIF-Induktion der wesentliche Faktor war, sondern andere durch Hypoxie induzierte Faktoren, die auch schon bei milderer Hypoxie aktiviert werden (s. Abschnitt 1) und einen positiven Effekt auf die AT1R-Expression haben. Dieser positive Effekt wird dann aber unter schwerer Hypoxie durch die transkriptions- und translationshemmende Wirkung der Hypoxie unterdrückt bzw. sogar ins Gegenteil verkehrt.

#### 4.2.3. Vergleich der Wirkung von akuter und chronischer Hypoxie auf die AT1R-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in der Rattenniere sowie in RASMCs *in vitro* schwere, akute Hypoxie (0,5% O<sub>2</sub>, max. 16 h) eine deutlich verminderte AT1R-Expression zur Folge hat.

In verschiedenen Tiermodellen mit chronischer Hypoxie ist dagegen eine Hochregulation der AT1R-Expression beschrieben worden. In Typ-1-Zellen des Glomus caroticum wurde durch chronische Hypoxie (4 Wochen, 10% O<sub>2</sub>) die Expression von AT1<sub>A</sub>- und AT1<sub>B</sub>-Rezeptoren verstärkt (Leung 2000). Werden Ratten sieben Tage in einer Umgebung mit 10% O<sub>2</sub> gehalten, findet sich an den alveolären Membranen eine um ein Drittel gesteigerte AT1R-Dichte (Zhao 1996). Im Gegensatz dazu war in einer anderen Studie in einem ähnlichen Modell keine Veränderung der AT1R-mRNA-Expression nachzuweisen (Chassagne 2000). Im Ratten-Pankreas verdoppelte sich die mRNA des AT1<sub>B</sub>R-Subtyps durch chronische Hypoxie (4 Wochen, 10% O<sub>2</sub>), während sich die Expression der AT1<sub>A</sub>R-mRNA nicht veränderte (Chan 2000). Die zu Beginn der Arbeit vorliegenden Daten waren also widersprüchlich, ließen aber eine hypoxieabhängige Induktion des AT1R vermuten. Jedoch wurden in keinem dieser Modelle die Mechanismen der veränderten Genexpression weiter untersucht. Außer HIF werden durch Hypoxie zelltypabhängig noch andere Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF-κB und AP1 und verschiedene Proteinkinasen und Ionenkanäle aktiviert (s. Abschnitt 1). Außerdem konnte in den Tiermodellen nicht zwischen einer direkten Wirkung der Hypoxie und den Folgen der systemischen und lokalen Reaktion auf die chronische Hypoxie unterschieden werden. So kam es in allen Studien zu signifikanten Blutdruckunterschieden zwischen den hypoxischen und den normoxischen Tieren. Im Gegensatz zu akuter schwerer Hypoxie (8% O<sub>2</sub> für 8 h), die für einen längeren Zeitraum zum Tod der Tiere führen würde und einen Blutdruckabfall verursacht, führt chronische, etwas mildere Hypoxie zu einem Blutdruckanstieg. Dies ist insbesondere beim Modell des Hypoxie-induzierten pulmonalen Hochdrucks mit einem Remodeling der pulmonalen Gefäße verbunden, was wiederum die Ursache für eine veränderte ATR-Expression sein könnte (Chassagne 2000).

Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit angewandten schweren akuten Hypoxie (gemeint ist hier ein Zeitraum von etwa 4-24 h *in vitro* und 8 h *in vivo*) werden bei chronischer Hypoxie wahrscheinlich andere Mediatoren freigesetzt und (Transkriptions-) Faktoren aktiviert. In humanen Endothelzellen der Pulmonalarterien (hPAEC) führt chronische Hypoxie (3% O<sub>2</sub>, 72 h) zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors activator protein-1 (AP-1) (Fantozzi 2003). Da die Aktivierung von AP-1 zu einer Induktion von AT1R führt (Suzuki 1993), könnte dies die

verstärkte Expression von AT1R in Modellen des Hypoxie-induzierten pulmonalen Hochdrucks erklären, vorausgesetzt, die Befunde aus humanen Endothelzellen lassen sich auf die Ratte übertragen.

Auch der Transkriptionsfaktor CREB reguliert die AT1R-Transkription (Chen 1994). In isolierten Kardiomyozyten konnte nach Hypoxie und anschließender Reoxygenierung eine andauernde Aktivitätssteigerung von CREB nachgewiesen werden, die eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zur Folge hatte (El Jamali 2004). *In vivo* spielen Ischämie und Reperfusion insbesondere beim Herzinfarkt eine große Rolle. Möglicherweise ist dies ein Unterschied im Versuchsaufbau, der für die gegensätzliche Regulation von AT1R in akuter Hypoxie und Ischämie/Reperfusion von entscheidender Bedeutung ist.

#### **4.2.4. Die Wirkung von Hypoxie auf die Expression von AT2R**

Die Hochregulation der AT2R-Expression in Gewebeläsionen (Janiak 1992), Neointima, beim renalen und kardialen Remodeling und am Rand von Infarkten (Wharton 1998) sowie die hohe Expression im Fetus legten die Vermutung nahe, dass der AT2-Rezeptor durch Hypoxie induzierbar sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eindeutig gezeigt, dass dies nicht der Fall ist. Hypoxie reduzierte die AT2R-Proteinexpression in PC12W- und 3T3L1-Zellen auf ca. 50% der normoxischen Werte. In Rattengeweben lag die AT2R-Expression unter der Nachweisgrenze des RPA.

Die vorliegende Arbeit ist der erste Nachweis, dass akute Hypoxie in der Zellkultur einen direkten, negativ-regulatorischen Einfluss auf die AT2R-Expression hat. Dieser Befund steht scheinbar im Widerspruch zu den Daten aus Tierversuchen. In einem Modell des Hypoxie-induzierten pulmonalen Hochdrucks wurde z. B. eine Induktion des AT2R in Lungengefäßen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene beschrieben (Chassagne 2000). Außerdem führte chronische Hypoxie (4 Wochen, 10% O<sub>2</sub>) im Pankreas der Ratte zu einer vermehrten Expression von AT2R-mRNA (Chan 2000). Auch bei diesen Studien handelt es sich also um Tiermodelle mit chronischer Hypoxie, bei denen die zugrundeliegenden Mechanismen der verstärkten AT2R-Expression nicht näher untersucht wurden. Untersuchungen an Zellkulturen, die einen direkten Effekt der Hypoxie zeigen könnten, lagen bisher nicht vor. Wahrscheinlich sind auch für die Induktion des AT2R *in vivo* unter systemischer chronischer Hypoxie parakrine Effekte im Rahmen des Gewebe-Remodelings oder systemische Reaktionen die entscheidenden Faktoren.

#### **4.2.5. Die Reduktion von AT2R unter Hypoxie ist nicht eine Folge gesteigerter Proliferation**

Da bekannt ist, dass die Expression von AT2R in proliferierenden Zellen abnimmt (Horiuchi 1995), wurde untersucht, ob Hypoxie oder DP die Proliferationsrate von PC12W-Zellen beeinflussen. Weder Hypoxie noch DP führten nach 24 h zu einer signifikant gesteigerten Proliferationsrate von PC12W-Zellen. Durch DP-Stimulation kam es sogar zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation. Die Reduktion der AT2R-Expression durch Hypoxie und DP ist also nicht eine Folge gesteigerter Zellproliferation.

#### **4.2.6. Hinweise für eine Beteiligung von HIF an der Regulation von AT1R und AT2R**

Zwei Arbeiten zeigten bisher eine Regulation des AT1R durch akute Hypoxie in Zellkulturzellen, also ohne eine Wechselwirkung durch parakrine oder systemische Effekte der Hypoxie. Sodhi et al. fanden eine Stimulation der AT1R-mRNA-Expression in ruhenden (0% Serum) VSMCs in einer Atmosphäre, die 3% O<sub>2</sub> enthielt. Nach 6 h Hypoxie war der AT1R-mRNA-Gehalt um ca. 48% erhöht, nach 24 h auf das 2,5-fache der normoxischen Werte. Warum dieses Experiment nur unter Serumentzug durchgeführt wurde, ist nicht klar. HIF-abhängige Effekte sind in der Regel deutlicher in der Gegenwart von Serum nachweisbar, wahrscheinlich, weil die Transkription und Translation der HIF $\alpha$ -Untereinheiten verstärkt sind.

In der Arbeit von Krick et al. wurde 2005 gezeigt, dass Fibroblasten der pulmonal-arteriellen Adventitia unter akuter, schwerer Hypoxie (1% O<sub>2</sub>, 24 h) vermehrt AT1R-Protein exprimieren. Dieser Effekt konnte durch Transfektion mit siRNA gegen HIF-1 $\alpha$  abgeschwächt werden, so dass eine Regulation durch HIF-1 $\alpha$  postuliert wurde. Es wurden jedoch weder eine AT1R-mRNA-Induktion noch die Bindung von HIF an ein potenzielles HRE im AT1R-Gen gezeigt (Krick 2005). Daher bleibt offen, ob es sich bei den beschriebenen Effekten um eine direkte Wirkung von HIF auf die AT1R-Genexpression handelt oder nicht vielmehr um eine Wirkung von HIF auf andere Faktoren, die schließlich zu einer gesteigerten AT1R-Expression führen.

Ob die eindeutige Reduktion der ATR-Expression, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, durch Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht endgültig geklärt werden.

Einige Beobachtungen lassen jedoch eine Beteiligung von HIF an der verringerten Expression von AT1R und AT2R unter Hypoxie vermuten.

Sowohl AT1R- als auch AT2R-mRNA wurden nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch chemische Induktion von HIF mit DP, Mim oder CoCl<sub>2</sub> verringert. Dabei führte chemische

Induktion von HIF zu einer vergleichbaren oder noch stärkeren Reduktion der mRNA-Menge, und auch der Zeitverlauf der Reduktion war nahezu gleich. In der Rattenniere führte neben Hypoxie auch die Gabe von Mim zu einer deutlichen Reduktion der AT1R-mRNA.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass sowohl Hypoxie als auch Hypoxie-Mimetika identische Signaltransduktionswege aktivieren, die die ATR-Expression verringern, und dass HIF daran beteiligt ist. HIF ist in der Regel zwar ein aktivierender Transkriptionsfaktor, aber eine Konkurrenz mit anderen Faktoren, die die ATR-Expression unter Normoxie aktivieren, kann nicht ganz ausgeschlossen werden. Ein derartiger molekularer Mechanismus wurde bereits für  $\alpha$ -Fetoprotein, DNA-Reparaturenzyme und Zellzyklusregulatoren gezeigt (Mazure 2002; Koshiji 2004; 2005). Dabei verdrängt der HIF-Komplex den Transkriptionsfaktor Myc von seiner Bindungsstelle, der E-box (5' CACGTG), die partiell identisch mit der HIF-Bindungsstelle ist (5' RCGTG). In einigen Fällen wird die Myc-Aktivität jedoch auch unabhängig von einer E-Box gehemmt oder ist von der DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors SP1 abhängig.

Für die Expression und Aktivierung von HIF unter Hypoxie ist eine andauernde Transkription und Translation der  $\alpha$ -Untereinheiten notwendig, da es aufgrund der kurzen Halbwertszeit unter Normoxie nicht zu einer Speicherung des Proteins kommt. Inkubation von PC12W-Zellen mit Cycloheximid inhibierte die Induktion der VEGF-mRNA durch Hypoxie oder DP. Gleichzeitig war die Abnahme der AT2R-mRNA-Expression vollständig aufgehoben. Die Reduktion der AT2R-Expression unter Hypoxie ist also von de-novo Proteintranslation abhängig wie auch die Induktion von VEGF. Ob das regulatorische Protein, dessen Translation durch Cycloheximid gehemmt wurde, in beiden Fällen HIF ist, konnte aber mit diesem Experiment nicht geklärt werden.

Da in der Sequenz des AT2R-Gens drei mögliche HIF-Bindungsstellen (HREs) vorhanden sind, sollten diese durch Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) näher untersucht werden. Das Bindungsmuster von normoxischen Kernextrakten und Kernextrakten aus hypoxischen oder mit DP stimulierten Zellen unterschied sich jedoch nicht. Eine spezifische Bindung von HIF war auch mit Supershift-Analysen nicht darstellbar (nicht gezeigt). Trotzdem waren die Sonden AT2R-5' und AT2R-3' in der Lage, die Positiv-Kontrolle (ein Oligonukleotid mit dem EPO-HRE) aus der Bindung an den HIF-Komplex zu verdrängen. Auch für die Unterdrückung der  $\alpha$ -Fetoprotein-Transkription durch HIF sind Gelshift-Untersuchungen mit ähnlichen Resultaten veröffentlicht worden (Mazure 2002). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass vielleicht nicht HIF $\alpha$ , sondern ein konstitutiv exprimierter Teil des HIF-Komplexes, z. B. ARNT = HIF- $\beta$ , an diese HREs bindet.

Obwohl in den letzten Jahren die spezifische Induktion von bestimmten Genen unter Hypoxie durch HIF weitgehend aufgeklärt wurde, ist bisher über spezifische Unterdrückung einzelner Gene durch Hypoxie wenig bekannt. Neben der oben zitierten Inhibition von Myc-abhängiger Genexpression ist ein möglicher Mechanismus die Inhibition der RNA-Elongation durch das von Hippel-Lindau-Protein (VHL), das an Elongin B und C bindet (Duan 1995). Möglicherweise gelangt ein Teil des zytoplasmatischen VHL-Proteins zusammen mit HIF in den Zellkern und hemmt die RNA-Expression der Gene, die nicht durch HIF transaktiviert werden. Weiterhin haben bestimmte mRNAs eine verkürzte Halbwertszeit unter Hypoxie. Dabei wurde aber nachgewiesen, dass die verstärkte Degradation von hnRNP A2/B1-mRNA unter Hypoxie von HIF-1 unabhängig ist (Garayoa 2003).

Obwohl also zunehmend auch negative Genregulation durch HIF beschrieben wird (Mazure 2002; Koshiji 2004; 2005) und einige Ergebnisse als Hinweise auf eine solche Regulation interpretiert werden können, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden, welche Rolle HIF bei der Herabregulation der ATR-Expression spielt. Möglicherweise handelt es sich bei der Reduktion der ATR-Expression um eine Hemmung der Translation und Transkription, wie sie unter Hypoxie oder Eisenchelatoreinwirkung bei den meisten Genen mit Ausnahme der HIF-Zielgene nachzuweisen ist. Dafür spricht, dass in RNA-Interferenz (RNAi)-Experimenten, in denen die HIF-1 $\alpha$ -mRNA- und -Protein-Expression durch small interfering RNAs (siRNAs) partiell ausgeschaltet wurde (Warnecke 2004), keine Aufhebung der ATR-Herabregulation beobachtet wurde (C. Warnecke, unpublizierte Daten). Die Effizienz des „Knockdowns“ von HIF-1 $\alpha$  war allerdings in PC12W-Zellen gering (ca. 50%).

### **4.3. Induktion von HIF durch nicht hypoxische Mechanismen**

Zu Beginn der Arbeit lagen bereits einzelne Studien vor, die zeigten, dass HIF auch durch nicht-hypoxische Mechanismen induziert werden kann. Dabei ist die Aktivierung von HIF jedoch um ein Vielfaches geringer als der Anstieg der HIF-Aktivität unter Hypoxie (s. Abschnitt 1.1.3).

Eine Ausnahme scheint die HIF-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren in RASMCs zu sein. Richard et al. berichten, dass in RASMCs die Induktion von HIF-1 $\alpha$  durch Ang II und andere Wachstumsfaktoren der Induktion durch Hypoxie vergleichbar ist oder diese sogar übertrifft (Richard 2000). In einer späteren Arbeit wurde gezeigt, dass Ang II HIF aktiviert, indem es die Transkription und Translation von HIF-1 $\alpha$  induziert (Page 2002). Diese Ergebnisse sollten in der

vorliegenden Arbeit überprüft werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Ang II eine ähnliche Wirkung auf HIF-2 $\alpha$  besitzt.

#### **4.3.1. Hohe Dosen von Ang II induzieren HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ in der Zellkultur**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nur durch sehr hohe Dosen Ang II (1  $\mu$ M) nach vollständigem Serumentzug eine eindeutige Induktion von HIF-1 $\alpha$  in RASMCs nachzuweisen ist. Dabei übertraf diese Induktion nie die Induktion durch Hypoxie.

Eine Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte eine geringere AT1R-Expression in unseren RASMCs gewesen sein. Nach längerer *in vitro*-Kultivierung in der Gegenwart von fetalem Kälberserum verringert sich die AT1R-Expression von primären Zellen (Cresci 2003). Ebenso wie von Richard et al. und Pagé et al. beschrieben, wurden daher für diese Arbeit nur RASMCs zwischen der dritten und zehnten Passage benutzt.

In RASMCs unterdrücken sowohl Wachstumsfaktoren als auch Zytokine die Expression von AT1R u.a. durch Inhibition von Transkription und verminderte mRNA-Stabilität (Nickenig 1994; Lassegue 1995). Außerdem wird auch AT1R – ebenso wie AT2R – in proliferierenden Zellen vermindert exprimiert (Nickenig 1996). Um eine möglichst hohe Expression von AT1R zu induzieren, wurden die Zellen für die Ang II-Stimulationsexperimente für 24 h in Medium ohne FKS kultiviert, wie es in den Arbeiten von Richard et al. und Pagé et al. beschrieben wurde. Ein Unterschied im Versuchsaufbau ist daher nicht zu erkennen, so dass eine befriedigende Erklärung für die etwas abweichenden Ergebnisse nicht gegeben werden kann.

#### **4.3.2. PMA induziert HIF-1 $\alpha$ stärker als Ang II in RASMCs**

Da Ang II HIF-1 $\alpha$  über die Aktivierung von PKC und eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und 2 induzieren soll, wurden RASMCs auch mit PMA stimuliert. Im Vergleich zur Stimulation mit Ang II zeigte sich durch Aktivierung von PKC eine deutlichere Induktion von HIF-1 $\alpha$ -Protein, die zumindest partiell wahrscheinlich auf einer Steigerung der Transkriptionsrate beruht. Auch Pagé et al. (Page 2002) zeigten eine stärkere Induktion von HIF-1 $\alpha$  durch PMA als durch Ang II.

Die Aktivierung von PKC und ERK1/2 steigert also die Transkription und Translation von HIF-1 $\alpha$  in RASMCs. Da diese Induktion nur in ruhenden Zellen (mind. 24 h Serumentzug) nachweisbar war, liegt die Vermutung nahe, dass die durch PMA und Ang II plötzlich gesteigerte HIF- $\alpha$  Transkription und Translation die abbauenden Faktoren (z. B. PHD, VHL), die durch den Serumentzug evtl. ebenfalls herabreguliert werden, sättigt, so dass HIF $\alpha$  auch unter Normoxie nicht vollständig degradiert werden kann und somit auf Proteinebene

nachweisbar ist. Allerdings führte diese HIF $\alpha$ -Stabilisierung in der vorliegenden Arbeit nicht zu einer Aktivierung eines HIF-abhängigen Reportergens (nicht gezeigt), der sensitivsten Nachweismethode für eine HIF-Aktivierung.

Der Nachweis einer HIF-Stabilisierung *in vitro* ist also noch kein Beweis dafür, dass Ang II HIF auch *in vivo* aktiviert und dass dies zu einer biologisch relevanten Induktion von HIF-Zielgenen führt.

#### 4.3.3. PMA induziert HIF-1 $\alpha$ in rFibs posttranskriptionell

Um zu untersuchen, ob Ang II auch in anderen Zellen HIF-1 $\alpha$  induzieren kann oder ob dieser Effekt auf RASMCs beschränkt ist, wurden rFibs mit Ang II und PMA stimuliert. In rFibs induzierte nur PMA HIF-1 $\alpha$ -Protein (eventuell exprimierten die Zellen zu wenig AT1R für einen nachweisbaren Ang II Effekt). Im Gegensatz zu RASMCs führte die Stimulation von rFibs mit PMA jedoch nicht zu einer verstärkten HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression. Daher scheinen für die Induktion von HIF-1 $\alpha$  in rFibs durch PMA nicht transkriptionelle, sondern eher translationale und posttranslationale Mechanismen eine Rolle zu spielen.

#### 4.3.4. HIF-2 $\alpha$ wird nicht durch Ang II aber durch PMA induziert

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob auch HIF-2 $\alpha$  durch Ang II induziert wird. In RASMCs wurde zwar etwas HIF-2 $\alpha$ -mRNA exprimiert, jedoch war weder unter Hypoxie noch nach Stimulation mit Ang II oder PMA HIF-2 $\alpha$ -Protein nachweisbar. In rFibs induzierte PMA HIF-2 $\alpha$ -mRNA und -Protein, während Ang II keinen Effekt hatte. Dabei blieb die Menge an nachgewiesenem HIF-2 $\alpha$  aber deutlich unter der durch Hypoxie induzierten HIF-2 $\alpha$ -Proteinmenge.

Die geringere Ang II-Wirkung auf die HIF-2 $\alpha$ -Akkumulation bei rFib könnte zum einen auf einer geringeren AT1R-Expression dieser Zellen beruhen. Andererseits liegen zahlreiche Hinweise dafür vor, dass HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  neben der gemeinsamen Regulation durch Proteinstabilisierung zusätzlich durch transkriptionelle und translationale Mechanismen differentiell reguliert werden, so zum Beispiel durch noch nicht identifizierte zelltyp-spezifische Faktoren, die der gewebespezifischen Expression der beiden HIF $\alpha$ -Isoformen zugrunde liegen. Außerdem zeigt HIF-2 $\alpha$  in bestimmten Zelllinien (HeLa, PC12) eine veränderte Zeitkinetik mit einer maximalen Induktion nach 16 h im Gegensatz zur maximalen Induktion von HIF-1 $\alpha$  nach 4 h (Bracken 2006). In bestimmten Zelllinien aus klarzelligen Nierenzellkarzinomen regulieren sich die HIF $\alpha$ -Isoformen sogar reziprok, d. h. eine Überexpression von HIF-1 $\alpha$  unterdrückt HIF-

$2\alpha$  ebenso wie umgekehrt HIF- $2\alpha$  die HIF- $1\alpha$ -Expression. Vermutlich liegt diesem Mechanismus eine Hemmung der Proteintranslation zu Grunde, entweder direkt durch die jeweils andere HIF-Isoform oder durch andere, durch HIF induzierte Faktoren (Raval 2005). In Tumoren ist HIF- $2\alpha$  häufig auf RNA-Ebene hochreguliert, z. B. in Astrozytomen (Khatua 2003). Außerdem zeigen beide Faktoren auch während der Embryonalentwicklung z. B. in der Niere ein spezifisches Expressionsmuster, das sich nicht allein durch Sauerstoffgradienten erklären lässt (Bernhardt 2006). Als Poster wurde auf dem Keystone Symposium „Hypoxia and Development, Physiology and Disease“, 16.-21. Januar 2006, Breckenridge, Colorado, U.S.A. gezeigt, dass VHL die Translation von HIF- $2\alpha$ , aber nicht HIF- $1\alpha$  unterdrückt (Rapisarda A. et al. Differential inhibition of HIF- $1\alpha$  and HIF- $2\alpha$  protein accumulation by topotecan in human renal cancer cells; Poster 320, S. 92 Abstract Band).

Zusammengefasst sind die Befunde dieses Teilprojekts also ein weiterer Hinweis auf hypoxieunabhängige Regulationsmechanismen für HIF- $1\alpha$  und HIF- $2\alpha$  durch Ang II und den Proteinkinase-Aktivator PMA, wobei die funktionelle Relevanz der Ang II Effekte *in vivo* bis heute nicht geklärt ist. Weiterhin weisen sie auf eine differenzielle Regulation von HIF- $1\alpha$  und HIF- $2\alpha$  hin.

Sowohl das System der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren als auch das Renin-Angiotensin-System haben sich im Laufe der Evolution entwickelt, um in mehrzelligen Lebewesen eine optimale, dem jeweiligen Bedarf angepasste Gewebeoxygenierung sicherzustellen. Dies geschieht zum einen durch die Anpassung des jeweiligen Sauerstoffbedarfs, z. B. durch die verbesserte Möglichkeit zur anaeroben Glykolyse, zum anderen durch die vermehrte Bereitstellung von Sauerstoff durch verstärkte Vaskularisierung und Anpassung der Gewebepfusion bzw. des Blutdrucks. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich diese beiden Systeme auf verschiedenste Weise auf molekularer Ebene gegenseitig beeinflussen. In scheinbarem Widerspruch zu tierexperimentellen Befunden wurde jedoch keine Induktion der Angiotensin II-Rezeptor-Expression durch Hypoxie gefunden, sondern eine Reduktion. Dies zeigt, dass die chronische Hypoxie, wie sie in Tiermodellen induziert wurde und in pathologischen Remodeling-Prozessen auftritt, nicht gleichzusetzen ist mit Genregulationsvorgängen in der akuten schweren Hypoxie, deren wichtigster Mediator HIF ist. Dieser Befund ist klinisch nicht unbedeutend, da sich pharmakologische HIF-Aktivatoren bereits in der Phase der klinischen Testung befinden.

Die vorliegende Arbeit leistet somit einen Beitrag zum Verständnis der Regulation der Angiotensin II-Rezeptoren und legt die Grundlage für weiterführende Experimente, in denen die funktionelle Relevanz der Interaktion von RAS und HIF *in vivo* gezeigt werden sollte.

## 5. Zusammenfassung

Für alle höheren Lebewesen ist es überlebensnotwendig, eine ausreichende Gewebepfusion und -oxygenierung sicherzustellen. Zwei der wichtigsten körpereigenen Systeme zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung und Gewebepfusion sind die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF)-1 und -2, die durch eine Veränderung der Genexpression die Anpassung an eine verminderte Sauerstoffzufuhr vermitteln, und das Renin-Angiotensin-System (RAS), das Blutdruck und Plasmavolumen reguliert, besonders bei Überaktivität aber auch zu (pathologischen) Veränderungen der Genexpression führen kann. Tierexperimentelle Studien weisen auf ein Interaktion zwischen HIF und dem RAS hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Ang II Rezeptoren Typ 1 (AT1R) und Typ 2 (AT2R) durch Hypoxie und ihre molekularen Grundlagen eingehend analysiert. Umgekehrt wurde der Effekt einer Ang II-Stimulation auf die HIF-Stabilisierung untersucht. RNase-Protection-Assays dienten zur Messung von mRNA-Gehalten, Western-Blot-Analysen und Rezeptorbindungsstudien zu Darstellung von HIF bzw. der ATR-Proteinexpression.

In verschiedenen Zelllinien (PC12W, 3T3-L1) und aortalen Gefäßmuskelzellen der Ratte (RASMCs) wurde die AT1R-Expression auf mRNA- und Proteinebene durch akute Hypoxie (16 h, 0,5% O<sub>2</sub>) und chemische HIF-Stabilisatoren deutlich reduziert. Ebenso wurde der AT2R in PC12W- und 3T3-L1-Zellen durch Hypoxie und Hypoxie-Mimetika herabreguliert. *In vivo* reduzierte Hypoxie in Ratten organspezifisch die AT1R-Expression. Am Beispiel des AT2-Rezeptors wurde nachgewiesen, dass für die verminderte mRNA-Expression unter Hypoxie eine de-novo Proteintranslation nötig ist. In Gelshift-Analysen konnte eine Bindung von Kernproteinen an die drei potenziellen HIF-Bindungsstellen im AT2R-Gen nachgewiesen werden. Diese Bindung war zwar nicht hypoxieabhängig, konnte jedoch durch Konkurrenz mit einer Sonde für die HIF-Bindungsstelle des Erythropoetin-Gens, einem bekannten HIF-Zielgen, unterbunden werden. In RASMCs konnte eine Induktion von HIF-1 $\alpha$ -Protein durch eine hohe Dosis Ang II, PMA oder Serum gezeigt werden, die vermutlich auf einer transkriptionellen und/oder translationalen Induktion von HIF-1 $\alpha$  beruht. Ang II hatte keinen Effekt auf HIF-2 $\alpha$  in RASMCs sowie HIF-1 $\alpha$  und -2 $\alpha$  in kardialen Ratten-Fibroblasten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die in Tierversuchen beschriebene ATR-Induktion bei chronischer Hypoxie wahrscheinlich nicht auf die direkte Wirkung von HIF zurückzuführen ist, umgekehrt Ang II jedoch die HIF-Aktivierung beeinflussen kann. Diese Ergebnisse erleichtern

die Interpretation tierexperimenteller und klinischer Befunde und sind eine wichtige Grundlage für weiterführende Studien *in vivo*.

Schlagwörter: Angiotensin II Rezeptor, AT1R, AT2R, Hypoxie-induzierbarer Faktor, HIF, Hypoxie, Renin-Angiotensin-System

## 6. Literatur

- Achard, J., A. Fournier, H. Mazouz, V. J. Caride, P. L. Penar und L. A. Fernandez (2001). "Protection against ischemia: a physiological function of the renin-angiotensin system." *Biochem Pharmacol* **62**(3): 261-71.
- Aguilera, G. und A. Kiss (1996). "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and vasopressin secretion. Role of angiotensin II." *Adv Exp Med Biol* **396**: 105-12.
- Akeno, N., J. Robins, M. Zhang, M. F. Czyzyk-Krzeska und T. L. Clemens (2002). "Induction of vascular endothelial growth factor by IGF-I in osteoblast-like cells is mediated by the PI3K signaling pathway through the hypoxia-inducible factor-2alpha." *Endocrinology* **143**(2): 420-5.
- Akishita, M., M. Iwai, L. Wu, L. Zhang, Y. Ouchi, V. J. Dzau und M. Horiuchi (2000). "Inhibitory effect of angiotensin II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice." *Circulation* **102**(14): 1684-9.
- Allen, A. M., H. Yamada und F. A. Mendelsohn (1990). "In vitro autoradiographic localization of binding to angiotensin receptors in the rat heart." *Int J Cardiol* **28**(1): 25-33.
- Alvarez-Tejado, M., S. Naranjo-Suarez, C. Jimenez, A. C. Carrera, M. O. Landazuri und L. del Peso (2001). "Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis." *J Biol Chem* **276**(25): 22368-74.
- Apfeldorf, W. J. und H. Rasmussen (1988). "Simultaneous determination of intracellular free calcium and aldosterone production in bovine adrenal zona glomerulosa." *Cell Calcium* **9**(2): 71-80.
- Arany, Z., L. E. Huang, R. Eckner, S. Bhattacharya, C. Jiang, M. A. Goldberg, H. F. Bunn und D. M. Livingston (1996). "An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 12969-73.
- Bachmann, S., M. Le Hir und K. U. Eckardt (1993). "Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin." *J Histochem Cytochem* **41**(3): 335-41.
- Bader, M., J. Peters, O. Baltatu, D. N. Muller, F. C. Luft und D. Ganten (2001). "Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research." *J Mol Med* **79**(2-3): 76-102.
- Beitner-Johnson, D., T. Ferguson, R. T. Rust, S. Kobayashi und D. E. Millhorn (2002). "Calcium-dependent activation of Pyk2 by hypoxia." *Cell Signal* **14**(2): 133-7.
- Beitner-Johnson, D., R. T. Rust, T. C. Hsieh und D. E. Millhorn (2001). "Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells." *Cell Signal* **13**(1): 23-7.
- Bell, P. D. und J. Peti-Peterdi (1999). "Angiotensin II stimulates macula densa basolateral sodium/hydrogen exchange via type 1 angiotensin II receptors." *J Am Soc Nephrol* **10 Suppl 11**: S225-9.
- Bernhardt, W. M., R. Schmitt, C. Rosenberger, P. M. Munchenhagen, H. J. Grone, U. Frei, C. Warnecke, S. Bachmann, M. S. Wiesener, C. Willam und K. U. Eckardt (2006). "Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys." *Kidney Int* **69**(1): 114-22.
- Bhattacharya, S., C. L. Michels, M. K. Leung, Z. P. Arany, A. L. Kung und D. M. Livingston (1999). "Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1." *Genes Dev* **13**(1): 64-75.
- Bilton, R. L. und G. W. Booker (2003). "The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation." *Eur J Biochem* **270**(5): 791-8.
- Bracken, C. P., A. O. Fedele, S. Linke, W. Balrak, K. Lisy, M. L. Whitelaw und D. J. Peet (2006). "Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment." *J Biol Chem* **281**(32): 22575-85.
- Carrero, P., K. Okamoto, P. Coumilleau, S. O'Brien, H. Tanaka und L. Poellinger (2000). "Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha." *Mol Cell Biol* **20**(1): 402-15.
- Cervenka, L. und L. G. Navar (1999). "Renal responses of the nonclipped kidney of two-kidney/one-clip Goldblatt hypertensive rats to type 1 angiotensin II receptor blockade with candesartan." *J Am Soc Nephrol* **10 Suppl 11**: S197-201.
- Chan, W. P., M. L. Fung, R. Nobiling und P. S. Leung (2000). "Activation of local renin-angiotensin system by chronic hypoxia in rat pancreas." *Mol Cell Endocrinol* **160**(1-2): 107-14.
- Chang, R. S., V. J. Lotti und M. E. Keegan (1982). "Inactivation of angiotensin II receptors in bovine adrenal cortex by dithiothreitol: further evidence for the essential nature of disulfide bonds." *Biochem Pharmacol* **31**(10): 1903-6.
- Chassagne, C., S. Eddahibi, C. Adamy, D. Rideau, F. Marotte, J. L. Dubois-Rande, S. Adnot, J. L. Samuel und E. Teiger (2000). "Modulation of angiotensin II receptor expression during development and regression of hypoxic pulmonary hypertension." *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**(3): 323-32.

- Chilov, D., G. Camenisch, I. Kvietikova, U. Ziegler, M. Gassmann und R. H. Wenger (1999). "Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1alpha." *J Cell Sci* **112 ( Pt 8)**: 1203-12.
- Chiu, A. T., D. E. McCall, T. T. Nguyen, D. J. Carini, J. V. Duncia, W. F. Herblin, R. T. Uyeda, P. C. Wong, R. R. Wexler, A. L. Johnson und et al. (1989). "Discrimination of angiotensin II receptor subtypes by dithiothreitol." *Eur J Pharmacol* **170(1-2)**: 117-8.
- Chomeczynski, P. und N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162(1)**: 156-9.
- Cioffi, C. L., X. Q. Liu, P. A. Kosinski, M. Garay und B. R. Bowen (2003). "Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells." *Biochem Biophys Res Commun* **303(3)**: 947-53.
- Compernelle, V., K. Brusselmans, T. Acker, P. Hoet, M. Tjwa, H. Beck, S. Plaisance, Y. Dor, E. Keshet, F. Lupu, B. Nemery, M. Dewerchin, P. Van Veldhoven, K. Plate, L. Moons, D. Collen und P. Carmeliet (2002). "Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice." *Nat Med* **8(7)**: 702-10.
- Conforti, L., S. Kobayashi, D. Beitner-Johnson, P. W. Conrad, T. Freeman und D. E. Millhorn (1999). "Regulation of gene expression and secretory functions in oxygen-sensing pheochromocytoma cells." *Respir Physiol* **115(2)**: 249-60.
- Cresci, B., S. Giannini, L. Pala, C. Mavilia, C. Manuelli, P. Cappugi, E. Maggi und C. M. Rotella (2003). "AT1 and AT2 receptors in human glomerular endothelial cells at different passages." *Microvasc Res* **66(1)**: 22-9.
- Csikos, T., A. J. Balmforth, M. Grojec, P. Gohlke, J. Culman und T. Unger (1998). "Angiotensin AT2 receptor degradation is prevented by ligand occupation." *Biochem Biophys Res Commun* **243(1)**: 142-7.
- Culman, J., S. Hohle, F. Qadri, O. Edling, A. Blume, C. Lebrun und T. Unger (1995). "Angiotensin as neuromodulator/neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis." *Clin Exp Hypertens* **17(1-2)**: 281-93.
- Curnow, K. M., L. Pascoe und P. C. White (1992). "Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor." *Mol Endocrinol* **6(7)**: 1113-8.
- Damert, A., E. Ikeda und W. Risau (1997). "Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells." *Biochem J* **327 ( Pt 2)**: 419-23.
- D'Angelo, G., E. Duplan, N. Boyer, P. Vigne und C. Frelin (2003). "Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation." *J Biol Chem* **278(40)**: 38183-7.
- Davies, E., A. Bonnardeaux, G. M. Lathrop, P. Corvol, E. Clauser und F. Soubrier (1994). "Angiotensin II (type-1) receptor locus: CA repeat polymorphism and genetic mapping." *Hum Mol Genet* **3(5)**: 838.
- de Gasparo, M., K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright und T. Unger (2000). "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors." *Pharmacol Rev* **52(3)**: 415-72.
- Denko, N., K. Wernke-Dollries, A. B. Johnson, E. Hammond, C. M. Chiang und M. C. Barton (2003). "Hypoxia actively represses transcription by inducing negative cofactor 2 (Dr1/DrAP1) and blocking preinitiation complex assembly." *J Biol Chem* **278(8)**: 5744-9.
- Duan, D. R., A. Pause, W. H. Burgess, T. Aso, D. Y. Chen, K. P. Garrett, R. C. Conaway, J. W. Conaway, W. M. Linehan und R. D. Klausner (1995). "Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein." *Science* **269(5229)**: 1402-6.
- Dudley, D. T., S. E. Hubbell und R. M. Summerfelt (1991). "Characterization of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells." *Mol Pharmacol* **40(3)**: 360-7.
- Dudley, D. T. und R. M. Summerfelt (1993). "Regulated expression of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells." *Regul Pept* **44(2)**: 199-206.
- Dvorak, Z., J. M. Pascussi und M. Modriansky (2003). "Approaches to messenger RNA detection - comparison of methods." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **147(2)**: 131-5.
- Ebert, B. L. und H. F. Bunn (1998). "Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein." *Mol Cell Biol* **18(7)**: 4089-96.
- Edwards, R. M., E. J. Stack, E. F. Weidley, N. Aiyar, R. M. Keenan, D. T. Hill und J. Weinstock (1992). "Characterization of renal angiotensin II receptors using subtype selective antagonists." *J Pharmacol Exp Ther* **260(3)**: 933-8.
- Elson, D. A., G. Thurston, L. E. Huang, D. G. Ginzinger, D. M. McDonald, R. S. Johnson und J. M. Arbeit (2001). "Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha." *Genes Dev* **15(19)**: 2520-32.

- Ema, M., K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger und Y. Fujii-Kuriyama (1999). "Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF-1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300." *Embo J* **18**(7): 1905-14.
- Epstein, A. C., J. M. Gleadle, L. A. McNeill, K. S. Hewitson, J. O'Rourke, D. R. Mole, M. Mukherji, E. Metzen, M. I. Wilson, A. Dhanda, Y. M. Tian, N. Masson, D. L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, C. J. Schofield und P. J. Ratcliffe (2001). "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." *Cell* **107**(1): 43-54.
- Fantozzi, I., S. Zhang, O. Platoshyn, C. V. Remillard, R. T. Cowling und J. X. Yuan (2003). "Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitance Ca<sup>2+</sup> entry in human pulmonary artery endothelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(6): L1233-45.
- Firth, J. D., B. L. Ebert und P. J. Ratcliffe (1995). "Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements." *J Biol Chem* **270**(36): 21021-7.
- Fung, M. L., S. Y. Lam, X. Dong, Y. Chen und P. S. Leung (2002). "Postnatal hypoxemia increases angiotensin II sensitivity and up-regulates AT1a angiotensin receptors in rat carotid body chemoreceptors." *J Endocrinol* **173**(2): 305-13.
- Galson, D. L., T. Tsuchiya, D. S. Tendler, L. E. Huang, Y. Ren, T. Ogura und H. F. Bunn (1995). "The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1." *Mol Cell Biol* **15**(4): 2135-44.
- Garayoa, M., Y. G. Man, A. Martinez, F. Cuttitta und J. L. Mulshine (2003). "Downregulation of hnRNP A2/B1 expression in tumor cells under prolonged hypoxia." *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**(1): 80-5.
- Giacchetti, G., G. Opocher, R. Sarzani, A. Rappelli und F. Mantero (1996). "Angiotensin II and the adrenal." *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **3**: S119-24.
- Gohlke, P., C. Pees und T. Unger (1998). "AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism." *Hypertension* **31**(1 Pt 2): 349-55.
- Goldberg, M. A., C. C. Gaut und H. F. Bunn (1991). "Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events." *Blood* **77**(2): 271-7.
- Gradin, K., J. McGuire, R. H. Wenger, I. Kvietikova, M. L. Thelaw, R. Toftgard, L. Tora, M. Gassmann und L. Poellinger (1996). "Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5221-31.
- Grady, E. F., L. A. Sechi, C. A. Griffin, M. Schambelan und J. E. Kalinyak (1991). "Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus." *J Clin Invest* **88**(3): 921-33.
- Greene, L. A. und A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2424-8.
- Gu, J., J. Milligan und L. E. Huang (2001). "Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha-p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine." *J Biol Chem* **276**(5): 3550-4.
- Gunther, S. (1984). "Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat liver." *J Biol Chem* **259**(12): 7622-9.
- Guo, D. F., Y. L. Sun, P. Hamet und T. Inagami (2001). "The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins." *Cell Res* **11**(3): 165-80.
- Hein, L., G. S. Barsh, R. E. Pratt, V. J. Dzau und B. K. Kobilka (1995). "Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice." *Nature* **377**(6551): 744-7.
- Hewitson, K. S., L. A. McNeill, M. V. Riordan, Y. M. Tian, A. N. Bullock, R. W. Welford, J. M. Elkins, N. J. Oldham, S. Bhattacharya, J. M. Gleadle, P. J. Ratcliffe, C. W. Pugh und C. J. Schofield (2002). "Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family." *J Biol Chem* **277**(29): 26351-5.
- Hofer, T., I. Desbaillets, G. Hopfl, M. Gassmann und R. H. Wenger (2001). "Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy." *Faseb J* **15**(14): 2715-7.
- Hohle, S., A. Blume, C. Lebrun, J. Culman und T. Unger (1995). "Angiotensin receptors in the brain." *Pharmacol Toxicol* **77**(5): 306-15.
- Horiuchi, M., W. Hayashida, T. Kambe, T. Yamada und V. J. Dzau (1997). "Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis." *J Biol Chem* **272**(30): 19022-6.
- Horiuchi, M., G. Koike, T. Yamada, M. Mukoyama, M. Nakajima und V. J. Dzau (1995). "The growth-dependent expression of angiotensin II type 2 receptor is regulated by transcription factors interferon regulatory factor-1 and -2." *J Biol Chem* **270**(34): 20225-30.
- Huang, X. C., E. M. Richards und C. Summers (1996a). "Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors." *J Biol Chem* **271**(26): 15635-41.

- Huang, X. C., C. Summers und E. M. Richards (1996b). "Angiotensin II stimulates protein phosphatase 2A activity in cultured neuronal cells via type 2 receptors in a pertussis toxin sensitive fashion." Adv Exp Med Biol **396**: 209-15.
- Huckle, W. R. und H. S. Earp (1994). "Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II." Prog Growth Factor Res **5**(2): 177-94.
- Hughes, A. D. (2000). "AT(1)-signalling in vascular smooth muscle." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **1**(2): 125-30.
- Ichihara, S., T. Senbonmatsu, E. Price, Jr., T. Ichiki, F. A. Gaffney und T. Inagami (2001). "Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension." Circulation **104**(3): 346-51.
- Ichihara, S., T. Senbonmatsu, E. Price, Jr., T. Ichiki, F. A. Gaffney und T. Inagami (2002). "Targeted deletion of angiotensin II type 2 receptor caused cardiac rupture after acute myocardial infarction." Circulation **106**(17): 2244-9.
- Ichiki, T., Y. Kambayashi und T. Inagami (1995a). "Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type-2 receptor in R3T3 cells." Circ Res **77**(6): 1070-6.
- Ichiki, T., Y. Kambayashi und T. Inagami (1996). "Transcription of the rat angiotensin II type 2 receptor gene." Biochem Biophys Res Commun **222**(2): 566-71.
- Ichiki, T., P. A. Labosky, C. Shiota, S. Okuyama, Y. Imagawa, A. Fogo, F. Niimura, I. Ichikawa, B. L. Hogan und T. Inagami (1995b). "Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor." Nature **377**(6551): 748-50.
- Ichiki, T., M. Usui, M. Kato, Y. Funakoshi, K. Ito, K. Egashira und A. Takeshita (1998). "Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide." Hypertension **31**(1 Pt 2): 342-8.
- Inagami, T. und T. Senbonmatsu (2001). "Dual effects of angiotensin II type 2 receptor on cardiovascular hypertrophy." Trends Cardiovasc Med **11**(8): 324-8.
- Ivan, M., K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane und W. G. Kaelin, Jr. (2001). "HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing." Science **292**(5516): 464-8.
- Ivan, M., T. Haberberger, D. C. Gervasi, K. S. Michelson, V. Gunzler, K. Kondo, H. Yang, I. Sorokina, R. C. Conaway, J. W. Conaway und W. G. Kaelin, Jr. (2002). "Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13459-64.
- Iyer, N. V., L. E. Koch, F. Agani, S. W. Leung, E. Laughner, R. H. Wenger, M. Gassmann, J. D. Gearhart, A. M. Lawler, A. Y. Yu und G. L. Semenza (1998). "Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ ." Genes Dev **12**(2): 149-62.
- Jaakkola, P., D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh und P. J. Ratcliffe (2001). "Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation." Science **292**(5516): 468-72.
- Janiak, P., A. Pillon, J. F. Prost und J. P. Vilaine (1992). "Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury." Hypertension **20**(6): 737-45.
- Jiang, B. H., G. L. Semenza, C. Bauer und H. H. Marti (1996). "Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension." Am J Physiol **271**(4 Pt 1): C1172-80.
- Jurgensen, J. S., C. Rosenberger, M. S. Wiesener, C. Warnecke, J. H. Horstrup, M. Grafe, S. Philipp, W. Griethe, P. H. Maxwell, U. Frei, S. Bachmann, R. Willenbrock und K. U. Eckardt (2004). "Persistent induction of HIF-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium." Faseb J **18**(12): 1415-7.
- Kallio, P. J., K. Okamoto, S. O'Brien, P. Carrero, Y. Makino, H. Tanaka und L. Poellinger (1998). "Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ." Embo J **17**(22): 6573-86.
- Kallio, P. J., I. Pongratz, K. Gradin, J. McGuire und L. Poellinger (1997). "Activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(11): 5667-72.
- Kallio, P. J., W. J. Wilson, S. O'Brien, Y. Makino und L. Poellinger (1999). "Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway." J Biol Chem **274**(10): 6519-25.
- Kambayashi, Y., S. Bardhan, K. Takahashi, S. Tsuzuki, H. Inui, T. Hamakubo und T. Inagami (1993). "Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition." J Biol Chem **268**(33): 24543-6.
- Kambayashi, Y., K. Nagata, T. Ichiki und T. Inagami (1996). "Insulin and insulin-like growth factors induce expression of angiotensin type-2 receptor in vascular-smooth-muscle cells." Eur J Biochem **239**(3): 558-65.

- Kijima, K., H. Matsubara, S. Murasawa, K. Maruyama, N. Ohkubo, Y. Mori und M. Inada (1996). "Regulation of angiotensin II type 2 receptor gene by the protein kinase C-calcium pathway." *Hypertension* **27**(3 Pt 2): 529-34.
- Khatua, S., K. M. Peterson, K. M. Brown, C. Lawlor, M. R. Santi, B. LaFleur, D. Dressman, D. A. Stephan und T. J. MacDonald (2003). "Overexpression of the EGFR/FKBP12/HIF-2alpha pathway identified in childhood astrocytomas by angiogenesis gene profiling." *Cancer Res* **63**(8): 1865-70.
- Kline, D. D., Y. J. Peng, D. J. Manalo, G. L. Semenza und N. R. Prabhakar (2002). "Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(2): 821-6.
- Kobayashi, S. und D. E. Millhorn (1999). "Stimulation of expression for the adenosine A2A receptor gene by hypoxia in PC12 cells. A potential role in cell protection." *J Biol Chem* **274**(29): 20358-65.
- Kondo, K., J. Klco, E. Nakamura, M. Lechpammer und W. G. Kaelin, Jr. (2002). "Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein." *Cancer Cell* **1**(3): 237-46.
- Koshiji, M., Y. Kageyama, E. A. Pete, I. Horikawa, J. C. Barrett und L. E. Huang (2004). "HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc." *Embo J* **23**(9): 1949-56.
- Koshiji, M., K. K. To, S. Hammer, K. Kumamoto, A. L. Harris, P. Modrich und L. E. Huang (2005). "HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression." *Mol Cell* **17**(6): 793-803.
- Kranzhofer, R., M. Browatzki, J. Schmidt und W. Kubler (1999). "Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(3): 826-8.
- Krick, S., J. Hanze, B. Eul, R. Savai, U. Seay, F. Grimminger, J. Lohmeyer, W. Klepetko, W. Seeger und F. Rose (2005). "Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system." *Faseb J* **19**(7): 857-9.
- Lando, D., D. J. Peet, J. J. Gorman, D. A. Whelan, M. L. Whitelaw und R. K. Bruick (2002a). "FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor." *Genes Dev* **16**(12): 1466-71.
- Lando, D., D. J. Peet, D. A. Whelan, J. J. Gorman und M. L. Whitelaw (2002b). "Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch." *Science* **295**(5556): 858-61.
- Langford, K., K. Frenzel, B. M. Martin und K. E. Bernstein (1992). "The genomic organization of the rat AT1 angiotensin receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **183**(3): 1025-32.
- Lassegue, B., R. W. Alexander, M. Clark, M. Akers und K. K. Griendling (1993). "Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth-muscle cells." *Biochem J* **292** ( Pt 2): 509-17.
- Lassegue, B., R. W. Alexander, G. Nickenig, M. Clark, T. J. Murphy und K. K. Griendling (1995). "Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation." *Mol Pharmacol* **48**(4): 601-9.
- Laughner, E., P. Taghavi, K. Chiles, P. C. Mahon und G. L. Semenza (2001). "HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression." *Mol Cell Biol* **21**(12): 3995-4004.
- Leung, P. S., S. Y. Lam und M. L. Fung (2000). "Chronic hypoxia upregulates the expression and function of AT(1) receptor in rat carotid body." *J Endocrinol* **167**(3): 517-24.
- Mahon, P. C., K. Hirota und G. L. Semenza (2001). "FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity." *Genes Dev* **15**(20): 2675-86.
- Maltepe, E., J. V. Schmidt, D. Baunoch, C. A. Bradfield und M. C. Simon (1997). "Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT." *Nature* **386**(6623): 403-7.
- Mandriota, S. J., K. J. Turner, D. R. Davies, P. G. Murray, N. V. Morgan, H. M. Sowter, C. C. Wykoff, E. R. Maher, A. L. Harris, P. J. Ratcliffe und P. H. Maxwell (2002). "HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron." *Cancer Cell* **1**(5): 459-68.
- Maranchie, J. K., J. R. Vasselli, J. Riss, J. S. Bonifacino, W. M. Linehan und R. D. Klausner (2002). "The contribution of VHL substrate binding and HIF-1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma." *Cancer Cell* **1**(3): 247-55.
- Matsubara, H. und M. Inada (1998). "Molecular insights into angiotensin II type 1 and type 2 receptors: expression, signaling and physiological function and clinical application of its antagonists." *Endocr J* **45**(2): 137-50.
- Maxwell, P. H., M. K. Osmond, C. W. Pugh, A. Heryet, L. G. Nicholls, C. C. Tan, B. G. Doe, D. J. Ferguson, M. H. Johnson und P. J. Ratcliffe (1993). "Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice." *Kidney Int* **44**(5): 1149-62.

- Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher und P. J. Ratcliffe (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." *Nature* **399**(6733): 271-5.
- Mazure, N. M., C. Chauvet, B. Bois-Joyeux, M. A. Bernard, H. Nacer-Cherif und J. L. Danan (2002). "Repression of alpha-fetoprotein gene expression under hypoxic conditions in human hepatoma cells: characterization of a negative hypoxia response element that mediates opposite effects of hypoxia inducible factor-1 and c-Myc." *Cancer Res* **62**(4): 1158-65.
- Montiel, M., S. Barker, G. P. Vinson und E. Jimenez (1993). "Angiotensin II receptor isoforms in the rat adrenal gland: studies with the selective subtype antagonists DuP 753 and CGP42112A." *J Mol Endocrinol* **11**(1): 69-75.
- Moravec, C. S., M. D. Schluchter, L. Paranandi, B. Czerska, R. W. Stewart, E. Rosenkranz und M. Bond (1990). "Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro." *Circulation* **82**(6): 1973-84.
- Mukoyama, M., M. Nakajima, M. Horiuchi, H. Sasamura, R. E. Pratt und V. J. Dzau (1993). "Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors." *J Biol Chem* **268**(33): 24539-42.
- Munzenmaier, D. H. und A. S. Greene (1996). "Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure." *Hypertension* **27**(3 Pt 2): 760-5.
- Murasawa, S., H. Matsubara, K. Kijima, K. Maruyama, N. Ohkubo, Y. Mori, T. Iwasaka und M. Inada (1996). "Down-regulation by cAMP of angiotensin II type 2 receptor gene expression in PC12 cells." *Hypertens Res* **19**(4): 271-9.
- Murasawa, S., H. Matsubara, Y. Mori, K. Kijima, K. Maruyama und M. Inada (1995). "Identification of a negative cis-regulatory element and trans-acting protein that inhibit transcription of the angiotensin II type 1a receptor gene." *J Biol Chem* **270**(41): 24282-6.
- Murasawa, S., H. Matsubara, M. Urakami und M. Inada (1993). "Regulatory elements that mediate expression of the gene for the angiotensin II type 1a receptor for the rat." *J Biol Chem* **268**(36): 26996-7003.
- Murphy, T. J., R. W. Alexander, K. K. Griendling, M. S. Runge und K. E. Bernstein (1991). "Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor." *Nature* **351**(6323): 233-6.
- Nickenig, G. und T. J. Murphy (1994). "Down-regulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression." *Mol Pharmacol* **46**(4): 653-9.
- Nickenig, G., J. Roling, K. Strehlow, P. Schnabel und M. Bohm (1998). "Insulin induces upregulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms." *Circulation* **98**(22): 2453-60.
- Nickenig, G., A. Sachinidis, Y. Ko und H. Vetter (1996). "Regulation of angiotensin AT1 receptor gene expression during cell growth of vascular smooth muscle cells." *Eur J Pharmacol* **297**(3): 307-12.
- Page, E. L., G. A. Robitaille, J. Pouyssegur und D. E. Richard (2002). "Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms." *J Biol Chem* **277**(50): 48403-9.
- Paradis, P., N. Dali-Youcef, F. W. Paradis, G. Thibault und M. Nemer (2000). "Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 931-6.
- Peng, J., L. Zhang, L. Drysdale und G. H. Fong (2000). "The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8386-91.
- Premkumar, D. R., R. R. Mishra, J. L. Overholt, M. S. Simonson, N. S. Cherniack und N. R. Prabhakar (2000). "L-type Ca(2+) channel activation regulates induction of c-fos transcription by hypoxia." *J Appl Physiol* **88**(5): 1898-906.
- Quandt, K., K. Frech, H. Karas, E. Wingender und T. Werner (1995). "MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data." *Nucleic Acids Res* **23**(23): 4878-84.
- Raval, R. R., K. W. Lau, M. G. Tran, H. M. Sowter, S. J. Mandriota, J. L. Li, C. W. Pugh, P. H. Maxwell, A. L. Harris und P. J. Ratcliffe (2005). "Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma." *Mol Cell Biol* **25**(13): 5675-86.
- Regitz-Zagrosek, V., N. Friedel, A. Heymann, P. Bauer, M. Neuss, A. Rolfs, C. Steffen, A. Hildebrandt, R. Hetzer und E. Fleck (1995). "Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts." *Circulation* **91**(5): 1461-71.
- Reinecke, K., R. Lucius, A. Reinecke, U. Rickert, T. Herdegen und T. Unger (2003). "Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB." *Faseb J* **17**(14): 2094-6.
- Richard, D. E., E. Berra, E. Gothie, D. Roux und J. Pouyssegur (1999). "p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1." *J Biol Chem* **274**(46): 32631-7.
- Richard, D. E., E. Berra und J. Pouyssegur (2000). "Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* **275**(35): 26765-71.

- Rolfs, A., I. Kvietikova, M. Gassmann und R. H. Wenger (1997). "Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1." *J Biol Chem* **272**(32): 20055-62.
- Rosenberger, C., S. Mandriota, J. S. Jurgensen, M. S. Wiesener, J. H. Horstrup, U. Frei, P. J. Ratcliffe, P. H. Maxwell, S. Bachmann und K. U. Eckardt (2002). "Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys." *J Am Soc Nephrol* **13**(7): 1721-32.
- Rottman, J. B. (2002). "The ribonuclease protection assay: a powerful tool for the veterinary pathologist." *Vet Pathol* **39**(1): 2-9.
- Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, M. Ruperez, S. Konig, B. Wittig und J. Egido (2000). "Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms." *Circ Res* **86**(12): 1266-72.
- Ryan, H. E., J. Lo und R. S. Johnson (1998). "HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization." *Embo J* **17**(11): 3005-15.
- Saavedra, J. M., M. Viswanathan und K. Shigematsu (1993). "Localization of angiotensin AT1 receptors in the rat heart conduction system." *Eur J Pharmacol* **235**(2-3): 301-3.
- Salceda, S., I. Beck und J. Caro (1996). "Absolute requirement of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein for gene activation by hypoxia." *Arch Biochem Biophys* **334**(2): 389-94.
- Salceda, S. und J. Caro (1997). "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* **272**(36): 22642-7.
- Salnikow, K., S. P. Donald, R. K. Bruick, A. Zhitkovich, J. M. Phang und K. S. Kasprzak (2004). "Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress." *J Biol Chem* **279**(39): 40337-44.
- Sasaki, K., Y. Yamano, S. Bardhan, N. Iwai, J. J. Murray, M. Hasegawa, Y. Matsuda und T. Inagami (1991). "Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor." *Nature* **351**(6323): 230-3.
- Scortegagna, M., K. Ding, Y. Oktay, A. Gaur, F. Thurmond, L. J. Yan, B. T. Marck, A. M. Matsumoto, J. M. Shelton, J. A. Richardson, M. J. Bennett und J. A. Garcia (2003a). "Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1<sup>-/-</sup> mice." *Nat Genet* **35**(4): 331-40.
- Scortegagna, M., K. Ding, Q. Zhang, Y. Oktay, M. J. Bennett, M. Bennett, J. M. Shelton, J. A. Richardson, O. Moe und J. A. Garcia (2005). "HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner." *Blood* **105**(8): 3133-40.
- Scortegagna, M., M. A. Morris, Y. Oktay, M. Bennett und J. A. Garcia (2003b). "The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice." *Blood* **102**(5): 1634-40.
- Sechi, L. A., E. F. Grady, C. A. Griffin, J. E. Kalinyak und M. Schambelan (1992). "Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney." *Am J Physiol* **262**(2 Pt 2): F236-40.
- Senbonmatsu, T., S. Ichihara, E. Price, Jr., F. A. Gaffney und T. Inagami (2000). "Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload." *J Clin Invest* **106**(3): R25-9.
- Silvestre, J. S., R. Tamarat, T. Senbonmatsu, T. Ichiki, T. Ebrahimian, M. Iglarz, S. Besnard, M. Duriez, T. Inagami und B. I. Levy (2002). "Antiangiogenic effect of angiotensin II type 2 receptor in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb." *Circ Res* **90**(10): 1072-9.
- Siragy, H. M. und R. M. Carey (1996). "The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats." *J Clin Invest* **97**(8): 1978-82.
- Siragy, H. M. und R. M. Carey (1997). "The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats." *J Clin Invest* **100**(2): 264-9.
- Sodhi, C. P., Y. S. Kanwar und A. Sahai (2003). "Hypoxia and high glucose upregulate AT1 receptor expression and potentiate ANG II-induced proliferation in VSM cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(3): H846-52.
- Speth, R. C. und K. H. Kim (1990). "Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine6 angiotensin II." *Biochem Biophys Res Commun* **169**(3): 997-1006.
- Speth, R. C., B. P. Rowe, K. L. Grove, M. R. Carter und D. Saylor (1991). "Sulfhydryl reducing agents distinguish two subtypes of angiotensin II receptors in the rat brain." *Brain Res* **548**(1-2): 1-8.
- Stroth, U., A. Blume, K. Mielke und T. Unger (2000). "Angiotensin AT(2) receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells." *Brain Res Mol Brain Res* **78**(1-2): 175-80.
- Sun, H., C. H. Charles, L. F. Lau und N. K. Tonks (1993). "MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo." *Cell* **75**(3): 487-93.

- Suzuki, J., H. Matsubara, M. Urakami und M. Inada (1993). "Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy." *Circ Res* **73**(3): 439-47.
- Takeuchi, K., R. W. Alexander, Y. Nakamura, T. Tsujino und T. J. Murphy (1993). "Molecular structure and transcriptional function of the rat vascular AT1a angiotensin receptor gene." *Circ Res* **73**(4): 612-21.
- Tian, H., R. E. Hammer, A. M. Matsumoto, D. W. Russell und S. L. McKnight (1998). "The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development." *Genes Dev* **12**(21): 3320-4.
- Tsutsumi, Y., H. Matsubara, N. Ohkubo, Y. Mori, Y. Nozawa, S. Murasawa, K. Kijima, K. Maruyama, H. Masaki, Y. Moriguchi, Y. Shibasaki, H. Kamihata, M. Inada und T. Iwasaka (1998). "Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression." *Circ Res* **83**(10): 1035-46.
- Volpe, M., B. Musumeci, P. De Paolis, C. Savoia und A. Morganti (2003). "Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease?" *J Hypertens* **21**(8): 1429-43.
- Walther, T., A. Menrad, H. D. Orzechowski, G. Siemeister, M. Paul und M. Schirner (2003). "Differential regulation of in vivo angiogenesis by angiotensin II receptors." *Faseb J* **17**(14): 2061-7.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue und G. L. Semenza (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5510-4.
- Wang, G. L. und G. L. Semenza (1993). "Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia." *J Biol Chem* **268**(29): 21513-8.
- Warnecke, C., W. Griethe, A. Weidemann, J. S. Jurgensen, C. Willam, S. Bachmann, Y. Ivashchenko, I. Wagner, U. Frei, M. Wiesener und K. U. Eckardt (2003). "Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors." *Faseb J* **17**(9): 1186-8.
- Warnecke, C., Z. Zaborowska, J. Kurreck, V. A. Erdmann, U. Frei, M. Wiesener und K. U. Eckardt (2004). "Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells." *Faseb J* **18**(12): 1462-4.
- Wenger, R. H. (2002). "Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression." *Faseb J* **16**(10): 1151-62.
- Wenger, R. H., I. Kvietikova, A. Rolfs, G. Camenisch und M. Gassmann (1998a). "Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site." *Eur J Biochem* **253**(3): 771-7.
- Wenger, R. H., A. Rolfs, P. Spielmann, D. R. Zimmermann und M. Gassmann (1998b). "Mouse hypoxia-inducible factor-1alpha is encoded by two different mRNA isoforms: expression from a tissue-specific and a housekeeping-type promoter." *Blood* **91**(9): 3471-80.
- Wharton, J., K. Morgan, R. A. Rutherford, J. D. Catravas, A. Chester, B. F. Whitehead, M. R. De Leval, M. H. Yacoub und J. M. Polak (1998). "Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart." *J Pharmacol Exp Ther* **284**(1): 323-36.
- Wiesener, M. S., J. S. Jurgensen, C. Rosenberger, C. K. Scholze, J. H. Horstrup, C. Warnecke, S. Mandriota, I. Bechmann, U. A. Frei, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, S. Bachmann, P. H. Maxwell und K. U. Eckardt (2003). "Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs." *Faseb J* **17**(2): 271-3.
- Wiesener, M. S., P. M. Munchenhagen, I. Berger, N. V. Morgan, J. Roigas, A. Schwartz, J. S. Jurgensen, G. Gruber, P. H. Maxwell, S. A. Loning, U. Frei, E. R. Maher, H. J. Grone und K. U. Eckardt (2001). "Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas." *Cancer Res* **61**(13): 5215-22.
- Wiesener, M. S., H. Turley, W. E. Allen, C. Willam, K. U. Eckardt, K. L. Talks, S. M. Wood, K. C. Gatter, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe und P. H. Maxwell (1998). "Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha." *Blood* **92**(7): 2260-8.
- Wolf, G., U. Butzmann und U. O. Wenzel (2003). "The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology." *Nephron Physiol* **93**(1): P3-13.
- Wood, S. M., J. M. Gleadle, C. W. Pugh, O. Hankinson und P. J. Ratcliffe (1996). "The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells." *J Biol Chem* **271**(25): 15117-23.
- Wyse, B. und C. Sernia (1997). "Growth hormone regulates AT-1a angiotensin receptors in astrocytes." *Endocrinology* **138**(10): 4176-80.
- Yamada, T., M. Horiuchi und V. J. Dzau (1996). "Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 156-60.

- Yu, A. Y., L. A. Shimoda, N. V. Iyer, D. L. Huso, X. Sun, R. McWilliams, T. Beaty, J. S. Sham, C. M. Wiener, J. T. Sylvester und G. L. Semenza (1999). "Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha." J Clin Invest **103**(5): 691-6.
- Zhao, L., R. al-Tubuly, A. Sebki, A. A. Owji, D. J. Nunez und M. R. Wilkins (1996). "Angiotensin II receptor expression and inhibition in the chronically hypoxic rat lung." Br J Pharmacol **119**(6): 1217-22.
- Zhuo, J., D. Alcorn, A. M. Allen und F. A. Mendelsohn (1992a). "High resolution localization of angiotensin II receptors in rat renal medulla." Kidney Int **42**(6): 1372-80.
- Zhuo, J., K. Song, P. J. Harris und F. A. Mendelsohn (1992b). "In vitro autoradiography reveals predominantly AT1 angiotensin II receptors in rat kidney." Ren Physiol Biochem **15**(5): 231-9.
- Zhuo, J., D. Thomas, P. J. Harris und S. L. Skinner (1992c). "The role of endogenous angiotensin II in the regulation of renal haemodynamics and proximal fluid reabsorption in the rat." J Physiol **453**: 1-13.

## Danksagung

Ich danke Professor Kai-Uwe Eckardt für die Überlassung des Themas, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Labor sowie für die stete Bereitschaft, meine Ergebnisse konstruktiv zu diskutieren.

Dr. Christina Warnecke hat mir diese Arbeit ermöglicht. Ihr danke ich für ihre Mühen, mich in die Grundlagen der Molekularbiologie einzuarbeiten und für ihre Bereitschaft, ihr Wissen über HIF und RAS mit mir zu teilen. Mit ihrer täglichen Unterstützung, ihrer Geduld und ihrer Freundschaft hat sie mich in den letzten Jahren begleitet.

Durch Dr. Michael Wiesener, Dr. Philine Jung, Dr. Alexander Weidemann und Dr. Wanja Bernhardt herrschte eine freundliche und fröhliche Atmosphäre. Durch die Möglichkeit von ihnen zu lernen, mit ihnen zusammen zu arbeiten und zu lachen, ist mir diese Arbeit leichter gefallen. Dafür danke ich jedem Einzelnen.

Till Strowig, Dr. Johannes Meier, Wolf Blaum, Dr. Rike Born und Katharina Gamm danke ich für ihre Freundschaft und Unterstützung, die sie mir außerhalb des Labors gegeben haben und mit der sie mich in der Zeit dieser Arbeit begleitet haben.

Bei meiner Mutter, Charlotte Kügler, möchte ich mich für ihre Liebe und für die Möglichkeit dieses Studiums bedanken.

Birgit Klages danke ich für ihre Liebe, ohne die ich diese Arbeit nicht geschafft hätte.

## Lebenslauf

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

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

## **Erklärung**

„Ich, Jan Kügler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Interaktion zwischen der durch Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren vermittelten Genexpression und Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems* 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.“

Datum

Unterschrift